

**Detektion *Borrelia-burgdorferi*-sensu-lato-spezifischer
Antikörper in Serumproben geimpfter und ungeimpfter Pferde
mittels drei verschiedener Line Immunoassays**

von Cornelia Veronica Bröckl

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

**Detektion *Borrelia-burgdorferi*-sensu-lato-spezifischer
Antikörper in Serumproben geimpfter und ungeimpfter Pferde
mittels drei verschiedener Line Immunoassays**

von Cornelia Veronica Bröckl
aus Wasserburg am Inn

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: Univ.-Prof. Dr. Angelika Schoster

Tag der Promotion: 26. Juli 2025

Für Ron
&
Für meine Eltern

Wer in die Fußstapfen anderer tritt, hinterlässt keine eigenen Spuren.

Wilhelm Busch (1832 - 1908)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	5
1.	DIE EQUINE LYME-BORRELIOSE	5
1.1.	Erreger der Lyme-Borreliose	5
1.2.	Klinische Manifestation der Lyme-Borreliose	8
1.3.	Morphologie des Erregers	10
1.3.1.	Oberflächenantigene von <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	13
1.4.	Ätiologie & Übertragung der Lyme-Borreliose-Erreger	17
1.4.1.	Zecken & Reservoirwirte	18
1.4.2.	Wirtsfindung.....	20
1.4.3.	Stechakt und Übertragung von <i>Bbsl</i> auf den Säugerwirt.....	21
1.5.	Pathogenese der <i>Bbsl</i> -Infektion.....	23
1.6.	Immunantwort des Wirtes nach einer <i>Bbsl</i> -Infektion	24
1.7.	Therapie.....	26
2.	LABORDIAGNOSTIK DER <i>BBSL</i> -INFEKTION BEI PFERDEN.....	26
2.1.	Methoden zum Direktnachweis von Borrelien	28
2.2.	Indirekte Nachweismethoden	29
2.2.1.	Zweistufentest.....	29
2.2.1.1.	IFAT/ IFT & ELISA/ EIA	30
2.2.1.2.	Immunoblots: Westernblot & LIA	33
2.2.2.	C ₆ -Peptid ELISA Schnelltest (SNAP® 4Dx Plus®).....	36
2.2.3.	Equine Lyme Multiplex Assay.....	37
2.3.	Aktuelle Herausforderungen der LB-Diagnostik	38
2.3.1.	Impfantikörper gegen <i>Bbsl</i> in der serologischen Diagnostik	38
2.3.1.1.	Impfung als Prophylaxe gegen die <i>Bbsl</i> -Infektion	38
2.3.1.2.	Wirkungsweise & Schutzmechanismus der LB-Vakzine.....	39
2.3.1.3.	Serologischer Nachweis von impfinduzierten spezifischen AK gegen <i>Bbsl</i> -AG	41
2.3.2.	Fehlende Standardisierung und Validierung von Diagnostikverfahren zum serologischen Nachweis von spezifischen AK gegen <i>Bbsl</i> -AG in equinen Seren	42
III.	PUBLIKATION.....	44
IV.	DISKUSSION	73
1.	GRUNDLAGE FÜR DIESE STUDIE & ZIELSETZUNG.....	73
2.	AUSWAHL DER STUDIENGRUPPEN	75

3.	VOR- UND NACHTEILE IN DER TECHNISCHEN DURCHFÜHRUNG.....	77
4.	LABORDIAGNOSTISCHE ERGEBNISSE: UNTERSCHIEDE IN SENSITIVITÄT, SPEZIFITÄT UND DER INTERPRETATION VON LIA-BANDEN	81
4.1.	Impfspezifische AK gegen OspA-AG	83
4.2.	Infektionsspezifische AK gegen VlsE-AG.....	90
4.3.	Diagnostische Endergebnisse für untersuchte Seren.....	97
5.	ANWENDUNG EINES STANDARDISIERTEN ERGEBNISINTERPRETATIONSPROTOKOLLS FÜR EQUINE SEREN IN LIAS.....	99
6.	FAZIT: NOTWENDIGKEIT DER ANPASSUNG UND STANDARDISIERUNG VON LIAS ZUR SERODIAGNOSTIK DER ELB	102
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	105
	SUMMARY	107
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	108
VII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	149
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS	151
IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	152
X.	DANKSAGUNG	155

I. EINLEITUNG

Die Lyme-Borreliose (LB; engl.: *Lyme borreliosis*, *Lyme disease*) ist eine in der nördlichen Hemisphäre (Asien, Nordamerika und Europa) vorkommende, bakterielle Infektionskrankheit und Zoonose. Die systemische Erkrankung wird durch verschiedene pleomorphe Spirochäten-Genospezies der Gattung *Borrelia* verursacht, die unter dem mit der LB assoziierten *Borrelia-burgdorferi*-sensu-lato-Komplex (*Bbsl*) zusammengefasst sind (BURGDORFER et al., 1982; MARGOS et al., 2011). Die Übertragung der obligat parasitären, extrazellulären Bakterien auf Menschen und Haussäugetiere erfolgt hauptsächlich durch Stiche infizierter Zecken der Gattung *Ixodes*, erfordert jedoch sowohl das Vorhandensein von kompetenten Vektoren (v.a. Zecken) als auch Reservoirwirten (v. a. Wildtiere wie Kleinsäuger und Vögel) in enzootischen Gebieten (BARBOUR&HAYES, 1986; HUMAIR&GERN, 2000; RADOLF et al., 2021; WOLCOTT et al., 2021). Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1975 stellt die LB in der Humanmedizin die am häufigsten diagnostizierte, Vektor-assoziierte Infektionskrankheit (VBD, *Vector-borne disease*) dar (STEERE et al., 1977b; KUGELER et al., 2021; DONG et al., 2022; MEAD, 2022; BURN et al., 2023; STARK et al., 2023). In Deutschland liegt die durchschnittliche jährliche Inzidenz der LB bei 37,2 pro 100.000 Personen und Jahr mit durchschnittlich 12.789 gemeldeten Erkrankungsfällen pro Jahr (Überwachungsdaten von 9 aus 16 Bundesstaaten für einen Zeitraum von 4 Jahren (2016–2020)). Davon wurden 94,7% klinisch diagnostiziert und 5,3% auch labordiagnostisch bestätigt. Die Inzidenzen variieren regional signifikant und Höhepunkte sind vor allem im Monat Juli zu beobachten (ENKELMANN et al., 2018; SKUFCA et al., 2023). In Europa liegt die durchschnittliche, geschätzte Inzidenz bei 128.888 gemeldeten LB-Erkrankungsfällen pro Jahr (Zeitraum 2005–2020, 25 Länder), jedoch ist diese Zahl kritisch zu betrachten, da die Überwachungsmethoden der europäischen Länder stark variieren (ENKELMANN et al., 2018; BURN et al., 2023). Eine Zunahme von Expositions- und Infektionsrisiko sowie der Inzidenz der LB-Erkrankung wird prognostiziert, da sich verändernde Klima- und Umweltbedingungen sowie anthropogene Landschaftsmodifikationen (z. B. Kulturlandschaften, Aufforstung) potenziell förderlich auf die geographische Verbreitung, räumliche Verteilung, Entwicklung sowie die Abundanz von Vektoren und LB-Erregern auswirken (ESTRADA-PENA, 2008; GRAY et al., 2009; MEDLOCK et al., 2013; KAHL et al., 2016; ALKISHE et al., 2017; DUMIC&SEVERNINI, 2018; SEMENZA et al., 2022; BEERMANN et al., 2023; DE LA FUENTE et al., 2023; GOREN et al., 2023).

Bei der LB handelt es sich primär um eine klinische Verdachtsdiagnose, welche durch labordiagnostische Maßnahmen untermauert werden kann (KNUF et al., 2023). Die durch bakterielle Immunogene ausgelösten, möglichen Krankheitssymptome können sich vielfältig und multisystemisch manifestieren, beim Haussäugetier verläuft eine *Bbsl*-Infektion jedoch oft klinisch

inapparent oder die klinischen Anzeichen sind unspezifisch (LISSMAN et al., 1984; APPEL et al., 1993; STRAUBINGER et al., 1998; CHANG et al., 2000; MULLER et al., 2002; BUTLER et al., 2005). Beim Menschen ist eine *Bbsl*-Infektion üblicherweise durch die Bildung eines *Erythema migrans* auf der Haut (um die Einstichstelle der Zecke; Frühmanifestation) in Kombination mit Grippe-ähnlichen Symptomen wie Kopfschmerz, Niedergeschlagenheit, Muskelschmerz, Fieber, sowie Gelenkschmerz und -schwellung charakterisiert. Weiters besteht die Möglichkeit, dass *Bbsl* peripher der Übertragungsstelle in weitere Organe disseminiert und Gelenke, Herz sowie das periphere und zentrale Nervensystem kolonisiert, was sich u. a. in einer Lyme-Arthritis, Karditis und Neuroborreliose manifestieren kann (STEERE et al., 1977a; STANEK&STRLE, 2018; PUSTIJANAC et al., 2024). Eine eindeutige Diagnosestellung ist oftmals schwierig aufgrund der Komplexität des Erregers und damit verbundenen diagnostischen Einschränkungen (LEEFLANG et al., 2016; BRANDA&STEERE, 2021; STELMA et al., 2023). In der Humanmedizin werden in der Labordiagnostik sowohl indirekte als auch direkte Nachweismethoden angewendet, in der Veterinärmedizin greift man fast ausschließlich auf die indirekte Serodiagnostik zurück – den Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen spezifische Antigene der Erreger des *Bbsl*-Komplexes in Form eines empfohlenen Zweistufentests (DRESSLER et al., 1993; WILSKE et al., 2007; STEERE et al., 2008). Dieser besteht aus einem aus einem hochsensitiven quantitativen Suchtest (ELISA (engl.: *Enzyme-linked immunosorbent assay*) oder IFT (engl.: *Immunofluorescence test*)), welchem bei Reaktivität ein spezifischer, qualitativer Bestätigungstest (Immunoblot) folgt (RUSSELL et al., 1984; WILSKE, 1988; JOHNSON et al., 1996; WILSKE et al., 2000).

Die serologische Labordiagnostik ist jedoch nach wie vor nicht ausgereift und eine Standardisierung blieb bisher aus (SHIN et al., 1993; BARTH et al., 2014; BOBE et al., 2021). Vergleichende Untersuchungen zu Serodiagnostikverfahren in der Human- und Veterinärmedizin zeigten, dass unterschiedliche Testsysteme oft voneinander abweichende, widersprüchliche, und nicht der Realität entsprechende Testresultate liefern können – tendenziell mit falsch-positiven Ergebnissen (SCHÖNERT et al., 2002; SCHÖNERT et al., 2008; MAY, 2009; LEEFLANG et al., 2016). Diese Diskrepanz mindert die Aussagekraft der Serodiagnostik empfindlich und erschwert eine zuverlässige Labordiagnose. Auch speziell die Labordiagnostik einer *Bbsl*-Infektion bei Pferden birgt diese Problematik (MAGNARELLI et al., 1997; DZIERZECKA&KITA, 2002b; JOHNSON et al., 2008; SCHVARTZ et al., 2015; DOFF et al., 2022).

Während einerseits nach wie vor kontrovers diskutiert wird, ob und inwieweit die *Bbsl*-Infektion bei Pferden klinisch relevant ist, wird die equine Lyme-Borreliose (eLB) andererseits tendenziell überdiagnostiziert (VENNER&DEEGEN, 1996; MULLER et al., 2002; BARTOL, 2013; DIVERS, 2013; LEHMANN et al., 2017; DIVERS et al., 2018). Ähnlich wie beim Menschen sind Haussäugetiere wie Hunde, Katzen und Pferde zufällige Wirte. Pferde – und deren Halter in LB-

Endemiegebieten sind dabei aufgrund der räumlichen Nähe zu Reservoirwirten (Vertebraten wie z. B. Vögel und Kleinsäuger) und dem Aufenthalt in Biotopen mit potenziell infizierten Zecken (z. B. Aufenthalt im Freiland, Weidehaltung), insbesondere in Sommermonaten, einem erhöhten Infektionsrisiko mit *Bbsl* ausgesetzt (MATUSCHKA et al., 1992; COMSTEDT et al., 2006; JENNETT et al., 2013; HEYLEN et al., 2014; ASGHAR et al., 2016; ROOME et al., 2022a; ROOME et al., 2022b; JANZEN et al., 2023; LIGUORI et al., 2023; SEPTFONS et al., 2023; JANZÉN et al., 2024). Obwohl Haussäugetieren auch an der LB erkranken können, ist die Erkrankung und Prävalenz noch wenig erforscht. Derzeit wird davon ausgegangen, dass klinische Anzeichen einer *Bbsl*-Infektion beim Haussäugetier eher selten auftreten, und wenn dann manifestiert sich die Erkrankung überwiegend mild und meist erst im späten Krankheitsstadium. Das Krankheitsbild ist dabei oft unspezifisch und nicht einheitlich. Bei Equiden verläuft eine Infektion meistens klinisch inapparent, jedoch existieren auch klinische Fallberichte, in welchen man einen Zusammenhang mit der eLB aufgrund eines positiven Erregernachweises herstellen konnte (LISSMAN et al., 1984; COHEN et al., 1988; APPEL et al., 1993; STRAUBINGER et al., 1998; BUTLER et al., 2005; SWINEBROAD, 2018; GEHLEN et al., 2022; GEHLEN et al., 2023; KASPARKOVA et al., 2023). Beschriebene klinische Anzeichen einer LB beim Pferd sind vielfältig und sollen sich als Störung des Allgemeinbefindens, Fieber, Steifheit und intermittierende Lahmheit, Leistungsabfall, infektiöse Polyarthrit, Augenerkrankungen (Uveitis, Konjunktivitis, Keratokonjunktivitis, Retinitis), Verhaltensauffälligkeiten, neurologische Erkrankungserscheinungen, Meningitis, Encephalitis, kutanes Pseudolymphom und Gewichtsverlust zeigen (VAN HEERDEN&REYERS, 1984; BURGESS et al., 1986; BURGESS&MATTISON, 1987; BURGESS, 1988; MAGNARELLI et al., 1988; PARKER&WHITE, 1992; BROWNING et al., 1993; HAHN et al., 1996; LIEBISCH et al., 1999; CHANG et al., 2000; BUTLER et al., 2005; JAMES et al., 2010; IMAI et al., 2011; PRIEST et al., 2012; SEARS et al., 2012; DIVERS, 2013; PASSAMONTI et al., 2015; JOHNSTONE et al., 2016; SWINEBROAD, 2018; PECORARO et al., 2019; SCHERRER et al., 2020; GUARINO et al., 2021; GEHLEN et al., 2022; PEARSON et al., 2024). Allerdings sind diese Fallberichte überwiegend kritisch zu betrachten, denn bei einem Großteil der Pferde wurde die klinische LB-Verdachtsdiagnose mit dem Nachweis der *Bbsl*-Seropositivität untermauert. Erregerexposition und Serokonversion allein sind jedoch nicht zwingend mit einer klinisch apparenten LB-Erkrankung assoziiert. Ein Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *Bbsl*-spezifische Antigene ist nur ein Indiz dafür, dass in der Vergangenheit ein Erregerkontakt stattgefunden hat – in Form einer natürlichen Exposition oder einer Impfung gegen eLB (HAMMERS-BERGGREN et al., 1994; MULLER et al., 2002; SCHÖNERT et al., 2002; BARTH et al., 2014; GEHLEN et al., 2023). Daher sollten generell nur klinisch auffällige Pferde – im Anschluss an eine umfassende Differentialdiagnostik – einer *Bbsl*-spezifischen Labordiagnostik, zur Substitution einer primär

klinisch gestellten Verdachtsdiagnose, unterzogen werden (MAY, 2009; LEHMANN et al., 2017). Entsprechend ist es wichtig, für die *Bbsl*-Serodiagnostik existierende Methoden weiter zu verbessern und zu standardisieren, um aussagekräftige und reproduzierbare Laborergebnisse zu erhalten. Gleichzeitig sollte ein positives Laborergebnis stets kritisch und nur in Zusammenhang mit klinischen Anzeichen des equinen Patienten betrachtet werden, insbesondere in Hinblick auf eine möglicherweise kontraproduktive antibiotische Behandlung (COSTA et al., 2015; LEHMANN et al., 2017; ALVAREZ-NARVAEZ et al., 2020; ARNOLD et al., 2021; JIMENEZ et al., 2021; KHUSRO et al., 2021).

Das Ziel dieser Arbeit war es, drei kommerziell verfügbare Immunoblots (Line Immunoassays, LIA) zu evaluieren und zu vergleichen, die für die Detektion spezifischer Antikörper gegen *Bbsl*-Antigene in equinen Serumproben erhältlich sind und im Rahmen der Zweistufendiagnostik Anwendung finden. Diese Arbeit beschreibt die diagnostische Qualität von erhältlichen serologischen Nachweistests, erläutert Stärken und Schwächen der Tests und zeigt Fallstricke in der Labordiagnostik der eLB auf. Damit leistet sie einen wertvollen wissenschaftlichen Beitrag hinsichtlich der fortlaufenden Bestrebungen, veterinärdiagnostische Labormethoden zum Nachweis einer *Bbsl*-Infektion zu verbessern, zu standardisieren und zu validieren, um reproduzierbare und verlässliche Ergebnisse hinsichtlich der Labordiagnostik und zur Untermauerung einer klinischen Verdachtsdiagnose zu erhalten.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die equine Lyme-Borreliose

Namensgebend für die LB war die Stadt Old-Lyme in Connecticut, U.S.A., wo im Jahre 1975 eine Häufung von akuten Arthritis-Fällen bei Kindern auftrat (STEERE et al., 1977a). Der Erreger selbst konnte jedoch erst 1982 erstmals aus einem an LB erkrankten humanen Patienten und 1984 aus einem Hund isoliert werden (BURGDORFER et al., 1982; LISSMAN et al., 1984). Bei Pferden wurde die Erkrankung 1984 erstmals beschrieben; der erste serologische Nachweis von spezifischen Antikörpern (AK) gegen Antigene (AG) von LB-Erregern wurde im Jahre 1985 erbracht (VAN HEERDEN&REYERS, 1984; MARCUS et al., 1985).

1.1. Erreger der Lyme-Borreliose

Borrelien sind spiralförmige Bakterien der Familie Borreliaceae, die der Ordnung Spirochaetales angehört (MARGOS et al., 2018). Die medizinisch bedeutsamen Borrelienspezies werden unter der Gattung *Borrelia* geführt, welche nach dem französischen Bakteriologen Amédée Borrel (1867-1936) benannt wurde (BRADE&HUNFELD, 2009; MARGOS et al., 2020c). Diese nahezu weltweit vorkommende Gattung wird unterteilt in die Gruppe der Rückfallfieber-Borrelien, sowie die Gruppe der LB-Spirochäten (*Borrelia-burgdorferi-sensu-lato*-Komplex, *Bbsl*), deren zugehörige Spezies zum Teil mit der LB assoziiert sind (RADOLF et al., 2012; ADEOLU&GUPTA, 2014; MARGOS et al., 2017b). Die Unterteilung in Gruppen innerhalb der *Borrelia*-Gattung basiert auf divergenten klinischen, biologischen und epidemiologischen Merkmalen der phylogenetisch ähnlichen *Borrelia*-Spezies. Nach neustem Kenntnisstand ist dazwischen eine weitere, noch weitgehend unerforschte Gruppe einzuordnen, die *Echidna*-Reptilien-Gruppe (TAKANO et al., 2010; TREVISAN et al., 2021).

Die Namensgebung für den LB-Erreger *Borrelia burgdorferi* (*Bb*) geht auf den schweizer-amerikanischen Wissenschaftler William Burgdorfer zurück. Diesem gelang im Jahre 1982 erstmals die Isolierung und Identifikation von LB-Erregern, der serologische Nachweis von AK gegen den Erreger, sowie der Beweis für die krankmachenden Eigenschaften der LB-Spirochäten (BURGDORFER et al., 1982; JOHNSON et al., 1984). Im Jahre 1984 konnten diese Spirochäten auch aus einem Hund isoliert werden, der LB-typische klinische Anzeichen in Form einer Spirochäten-assoziierten Arthritis aufwies (LISSMAN et al., 1984). In darauffolgenden Studien konnte die Pathogenität von *Bb* sowohl für Hunde als auch für Pferde und Katzen demonstriert werden (BOSLER et al., 1988; APPEL, 1990).

Nachdem man in den frühen 1990er feststellte, dass neben dem ursprünglichen *Bb*-Isolat mehrere *Borrelia*-Spezies eine LB verursachen können, fasste man die mit der LB assoziierten Borrelienspezies, sowie phylogenetisch Verwandte, unter dem *Borrelia-burgdorferi*-sensu-lato-Komplex (*Bbsl*) zusammen, welcher das ursprüngliche Isolat unter dem Spezies-Name *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Bbss*) einschließt. Es sind jedoch nicht alle Borrelienspezies des LB-Komplexes auch als Verursacher der LB zu identifizieren, weshalb Uneinigkeit über die Borrelien-Taxonomie herrscht. Laut einer Studie von Adelou und Gupta (2014) sollte die Gattung *Borrelia* in zwei Gattungen aufgeteilt werden, wobei die LB-verursachenden Borrelien aufgrund gemeinsamer phylogenetischer Merkmale der neuen Gattung *Borreliella* zuzuordnen sind, während die Rückfallfieber-Borrelien die emendierte Gattung *Borrelia* bilden. Die Richtigkeit und Notwendigkeit dieser Einordnung wird allerdings hinsichtlich verschiedener Aspekte kritisch diskutiert (ADEOLU&GUPTA, 2014; MARGOS et al., 2018; STEVENSON et al., 2019; MARGOS et al., 2020a; MARGOS et al., 2020d).

Dem human- und veterinärmedizinisch bedeutsamen *Bbsl*-Komplex gehören mittlerweile weltweit mehr als zwanzig beschriebene Borrelienspezies an (Tabelle 1) (VAN DAM et al., 1993; MARGOS et al., 2011; RADOLF et al., 2012; CUTLER et al., 2017). Davon werden derzeit die neun Genospezies *B. burgdorferi* sensu stricto (*Bbss*), *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia spielmanii*, *B. mayonii*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia lusitaniae* und *Borrelia valaisiana* als klinisch relevant betrachtet (JOHNSON et al., 1984; BARANTON et al., 1992; CANICA et al., 1993; WANG et al., 1997; DIZA et al., 2004; RICHTER et al., 2006; DE CARVALHO et al., 2008; FINGERLE et al., 2008; RUDENKO et al., 2008; MARGOS et al., 2009; MARKOWICZ et al., 2015; PRITT et al., 2016; MARGOS et al., 2017c; VIEIRA et al., 2019; RADOLF et al., 2021; BURN et al., 2023). Die LB-Erreger unterscheiden sich in ihrer geographischen Verbreitung, Wirtsspezifität, sowie der Fähigkeit, eine Erkrankung beim Wirt auszulösen (WOLCOTT et al., 2021). In Nordamerika prädominiert die primär gelenkassoziierte Genospezies *Bbss*, in Europa hingegen sind hauptsächlich die hautassoziierte Genospezies *B. afzelii*, die tendenziell neurotrophe Genospezies *B. garinii* sowie *B. bavariensis* als Erreger der LB vertreten (Abb. 1) (PIESMAN&GERN, 2008; STANEK&STRLE, 2018; BOBE et al., 2021; MARQUES et al., 2021).

Tabelle 1: Aktuell beschriebene Genospezies des *Borrelia-burgdorferi*-sensu-lato-Komplexes.

<i>Borrelia</i> Genospezies	Geographische Verbreitung	Reservoirwirte	(Human-) Pathogenität	Referenzen
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (<i>Bbss</i>)	Nordamerika, Europa	Nagetiere, Kleinsäuger, Wild, größere Säuger	Ja	(JOHNSON et al., 1984; BARANTON et al., 1992)

II. LITERATURÜBERSICHT

<i>B. garinii (Bg)</i>	Eurasien	Vögel, Kleinsäuger	Ja	BARANTON et al., 1992
<i>B. afzelii (Ba)</i>	Eurasien	Nagetiere, Kleinsäuger	Ja	(CANICA et al., 1993)
<i>B. japonica</i>	Asien	Nagetiere	unbekannt	(KAWABATA et al., 1993)
<i>B. andersonii</i>	Nordamerika	Kaninchen, Vögel	unbekannt	(MARCONI et al., 1995)
<i>B. tanukii</i>	Asien	Nagetiere	unbekannt	(FUKUNAGA et al., 1996)
<i>B. turdi</i>	Eurasien	Vögel	unbekannt	(FUKUNAGA et al., 1996)
<i>B. lusitaniae</i>	Europa, Nordamerika	Eidechsen, Vögel	potenziell	(LE FLECHE et al., 1997)
<i>B. valaisiana</i>	Euroasien	Vögel	potenziell	(WANG et al., 1997)
<i>B. bissetii</i>	Europa, Nordamerika	Nagetiere	potenziell	(BISSETT&HILL, 1987; POSTIC et al., 1998; MARGOS et al., 2016)
<i>B. sinica</i>	Asien	Nagetiere	unbekannt	(MASUZAWA et al., 2001)
<i>B. spielmanii</i>	Europa	Nagetiere, Vögel?	Ja	(RICHTER et al., 2004; RICHTER et al., 2006)
<i>B. californiensis</i>	Nordamerika	Nagetiere, Maultierhirsche	unbekannt	(POSTIC et al., 2007; MARGOS et al., 2016)
<i>B. americana</i>	Nordamerika	Nagetiere, Vögel	unbekannt	(POSTIC et al., 2007; RUDENKO et al., 2009b)
<i>B. yangtzensis</i>	Asien	Nagetiere	potenziell	(CHU et al., 2008; MARGOS et al., 2015)
<i>B. carolinensis</i>	Nordamerika	Nagetiere, Vögel	unbekannt	(RUDENKO et al., 2009a, 2011a)
<i>B. bavariensis</i>	Eurasien	Nagetiere, Vögel	Ja	(MARGOS et al., 2009; MARGOS et al., 2013)
<i>B. kurtenbachii</i>	Nordamerika	Nagetiere	potenziell	(MARGOS et al., 2010; MARGOS et al., 2014)
<i>B. chilensis</i>	Südamerika	Nagetiere	unbekannt	(IVANOVA et al., 2014)
<i>B. mayonii</i>	Nordamerika	Nagetiere?	Ja	(PRITT et al., 2016)
<i>B. lanei</i>	Nordamerika	Lagomorphe?	unbekannt	(POSTIC et al., 2007; MARGOS et al., 2017a)
<i>B. maritima</i>	Nordamerika	unbekannt	unbekannt	(MARGOS et al., 2020b)
<i>Candidatus B. aligera</i>	Unbekannt	unbekannt	unbekannt	(NORTE et al., 2020)

(RUDENKO et al., 2011b; STANEK&REITER, 2011; STEINBRINK et al., 2022; LITTMAN et al., 2023)

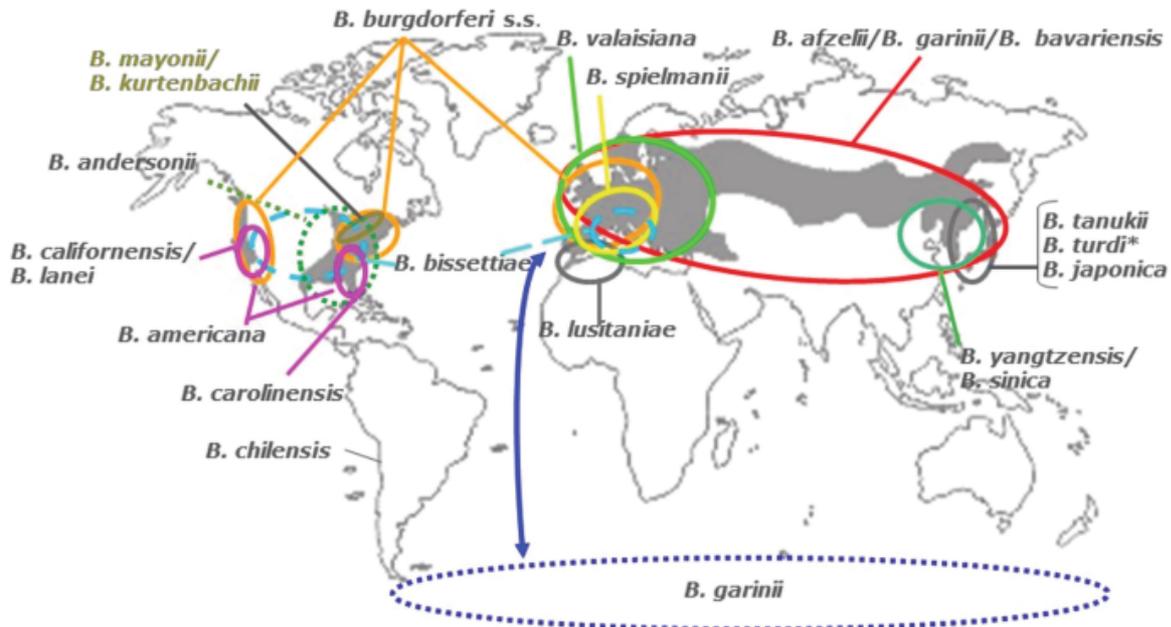


Abbildung 1: Verbreitung von Bakterien des *Borrelia-burgdorferi-sensu-lato*-Komplexes (MARGOS et al., 2024).

Die Genospezies *B. valaisiana*, die neben *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. bavariensis* am häufigsten in europäischen Zecken vorkommt, wird bisher nur selten mit der LB assoziiert (DIZA et al., 2004; STRNAD et al., 2017; WAINDOK et al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass diese Genospezies abweichende Muster in Resistenz oder Sensitivität gegenüber dem Komplementsystem verschiedener Wirbeltiere aufweist. Diese Eigenschaften könnten der Grund dafür sein, dass das Immunsystem des Wirtes sensitiver auf diesen Erreger reagiert und ihn dadurch effizienter bereinigen kann (KURTENBACH et al., 2002).

Im veterinärmedizinischen Bereich – insbesondere bei Haus- und Stalltieren – sind vor allem die Genospezies *B. afzelii*, *B. garinii* und *Bbss* prävalent, aber auch *B. spielmanii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* (STEFANCIKOVÁ et al., 2008; CLAEREBOUET et al., 2013; PANTCHEV et al., 2015; GEURDEN et al., 2018; SOMMERAUER et al., 2019; PROBST et al., 2024).

1.2. Klinische Manifestation der Lyme-Borreliose

Spezifische klinische Anzeichen einer durch *Bbsl* verursachten Infektion sind vor allem bei Primaten zu beobachten (PACHNER et al., 1995). Die LB ist eine multisystemische Erkrankung, wobei man beim Menschen drei klinische LB-Erkrankungsstadien unterscheidet: das frühe lokalisierte Stadium (Stadium I), das frühe disseminierte Stadium (Stadium II), das späte (chronische) Stadium der LB (Stadium III) (STANEK et al., 2012; CARDENAS-DE LA GARZA

et al., 2019; SKAR et al., 2025). Die Ausprägung der LB-Symptomatik ist teilweise abhängig vom Genotyp des Erregers (VAN DAM et al., 1993; BALMELLI&PIFFARETTI, 1995).

Im frühen lokalisierten Stadium der LB, das Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich andauert, sind die Erreger zunächst lokal um die Einstichstelle der Zecke lokalisiert. Beim Menschen ist dieses kutane LB-Stadium durch das *Erythema migrans* (Wanderröte) gekennzeichnet, ein von der Einstichstelle kreisförmig ausgehender, sich zentrifugal ausbreitender Ausschlag, der ein bis zwei Wochen *post infectionem* beginnt, in Erscheinung zu treten (STEERE et al., 2016). Zusätzlich können Allgemeinsymptome auftreten (STRLE et al., 1999).

Bleibt die Infektion unbehandelt, breiten sich die Erreger weiter in periphere Regionen des Körpers aus, man spricht dabei vom früh disseminierten Stadium, das sich üblicherweise drei bis zwölf Wochen *post infectionem* manifestiert. Dieses Stadium kann u. a. von Muskelschwäche, sekundären Hautausschlägen, Nackensteifheit, Fieber, und einem ausgeprägten Krankheitsgefühl gekennzeichnet sein. Nach mehreren Wochen bis Monaten der Erkrankung können weitere Symptome wie Arthritis und neurologische Abnormalitäten (Meningitis, Enzephalitis, kraniale Neuritis, Neuropathien, Ataxie, Myelitis) hinzukommen, in manchen Fällen auch Herzproblematiken (atrioventrikuläre Blockaden, Myoperikarditis, Kardiomegalie) (WORMSER et al., 2006; STEERE et al., 2016).

Im späten Stadium, das erst viele Monate *post infectionem* auftritt, sind vor allem das Nervensystem und Skelettmuskeln betroffen (z. B. Polyneuropathie, Encephalomyelitis) und es kann dabei zu neurologischen Defiziten kommen (z. B. Ataxie, Hemiparese, Hörverlust). Auch Gelenke (Ellbogen, Knie) können aufgrund von Entzündungen (z. B. Arthritis, Bursitis) symptomatisch sein. Die Symptome treten meist intermittierend auf, allerdings kann es auch zu chronischen Entzündungen kommen (z. B. postinfektiöse Lyme-Arthritis, Neuroborreliose, *Acrodermatitis chronica atrophicans*) (STEERE et al., 1977b; MÜLLEGGER&GLATZ, 2008; CARDENAS-DE LA GARZA et al., 2019).

Obwohl auch Haussäugetiere mit *Bbsl* infiziert werden und an der LB erkranken können, ist – anders als beim Menschen – die Pathogenese und Prävalenz noch wenig erforscht. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass klinische Anzeichen einer *Bbsl*-Infektion beim Haussäugetier eher selten und oft unspezifisch auftreten, und wenn dann manifestiert sich die Erkrankung meist erst im späten Krankheitsstadium (LISSMAN et al., 1984; BURGESS&GENDRON-FITZPATRICK, 1990; BURGESS, 1992; APPEL et al., 1993; MOODY et al., 1994; STRAUBINGER et al., 1997b; STRAUBINGER et al., 1998; CHANG et al., 2000).

Auch Pferde können (wiederholt) einer *Bbsl*-Infektion ausgesetzt sein und serokonvertieren, jedoch verläuft eine *Bbsl*-Infektion meist subklinisch, was die LB beim Pferd zu einem sehr kontrovers diskutierten Thema macht (CHANG et al., 2000; CHANG et al., 2005; DEVILBISS et al., 2009;

DIVERS et al., 2018). Dokumentierte klinische Anzeichen einer eLB sind sporadisch, vielfältig und eher unspezifisch, weshalb bisher kein einheitliches Krankheitsbild beschrieben und auch keine Krankheitsstadien wie beim Menschen differenziert werden konnten (VENNER&DEEGEN, 1996; MULLER et al., 2002; DIVERS, 2013). Eine durch Erregerexposition induzierte Serokonversion ist jedoch kein alleiniger Beweis für eine LB-Erkrankung beim Pferd, sondern lediglich ein Indiz für einen aktuellen oder vergangenen Erregerkontakt (MAGNARELLI&ANDERSON, 1989; CHANG et al., 2000; MULLER et al., 2002; DIVERS et al., 2018; GEHLEN et al., 2023).

Im Zusammenhang mit einem positiven Antikörpernachweis wurden bisher unter anderem die Neuroborreliose (Meningitis, Encephalitis, Neuritis, Radikulitis), Polyarthrit, das kutane Pseudolymphom, die Uveitis sowie Polysynovitis, Bursitis, Steifheit, intermittierende Lahmheit, Leistungsabfall und generell Verhaltensauffälligkeiten als klinische Anzeichen der eLB beschrieben (VAN HEERDEN&REYERS, 1984; BURGESS et al., 1986; BURGESS&MATTISON, 1987; BURGESS, 1988; MAGNARELLI et al., 1988; PARKER&WHITE, 1992; BROWNING et al., 1993; HAHN et al., 1996; LIEBISCH et al., 1999; CHANG et al., 2000; BUTLER et al., 2005; JAMES et al., 2010; IMAI et al., 2011; PRIEST et al., 2012; SEARS et al., 2012; DIVERS, 2013; PASSAMONTI et al., 2015; JOHNSTONE et al., 2016; SWINEBROAD, 2018; PECORARO et al., 2019; SCHERRER et al., 2020; GUARINO et al., 2021; GEHLEN et al., 2022; PEARSON et al., 2024).

1.3.Morphologie des Erregers

Borrelien haben eine flexible, schraubenförmige und langgestreckte Gestalt mit einer Länge des Organismus von 7 - 30 μm und einem Durchmesser von 0,2 - 0,5 μm (JOHNSON et al., 1984; NEUMEISTER B. et al., 2009). Der Körper der motilen Spirochäten besteht aus einem zentralen protoplasmatischen Zylinder, welcher von einer trilaminären Zellhülle ummantelt wird. Die Zellhülle setzt sich aus drei Kompartimenten zusammen: einer inneren, doppelschichtigen Zytoplasmamembran, einem zwischen den Membranen liegenden periplasmatischen Raum, und einer äußeren bakteriellen Lipidzellmembran, die nach außen hin von einer wasserlöslichen Mukosa-Schicht (engl. *surface layer*, S-layer) abgegrenzt wird (Abb. 2 und 3) (JOHNSON et al., 1984; BARBOUR&HAYES, 1986). Der periplasmatische Raum zwischen der inneren und äußeren Membran beinhaltet eine Peptidoglykanschicht sowie flagelläre Filamente, die gebündelt und verdrillt einen starren periplasmatischen Endoflagellenstab bilden, welcher subterminal an beiden Enden des Protoplasmazyinders inseriert (KELLY, 1981; KUDRYASHEV et al., 2009). Durch diese kontraktilen periplasmatischen Endoflagellen können sich Schraubenbakterien durch Rotation um ihre Längsachse schraubenförmig rotierend aktiv im Gewebe des Wirtes fortbewegen (BARBOUR&HAYES, 1986; MOTALEB et al., 2000; CHANG et al., 2019).

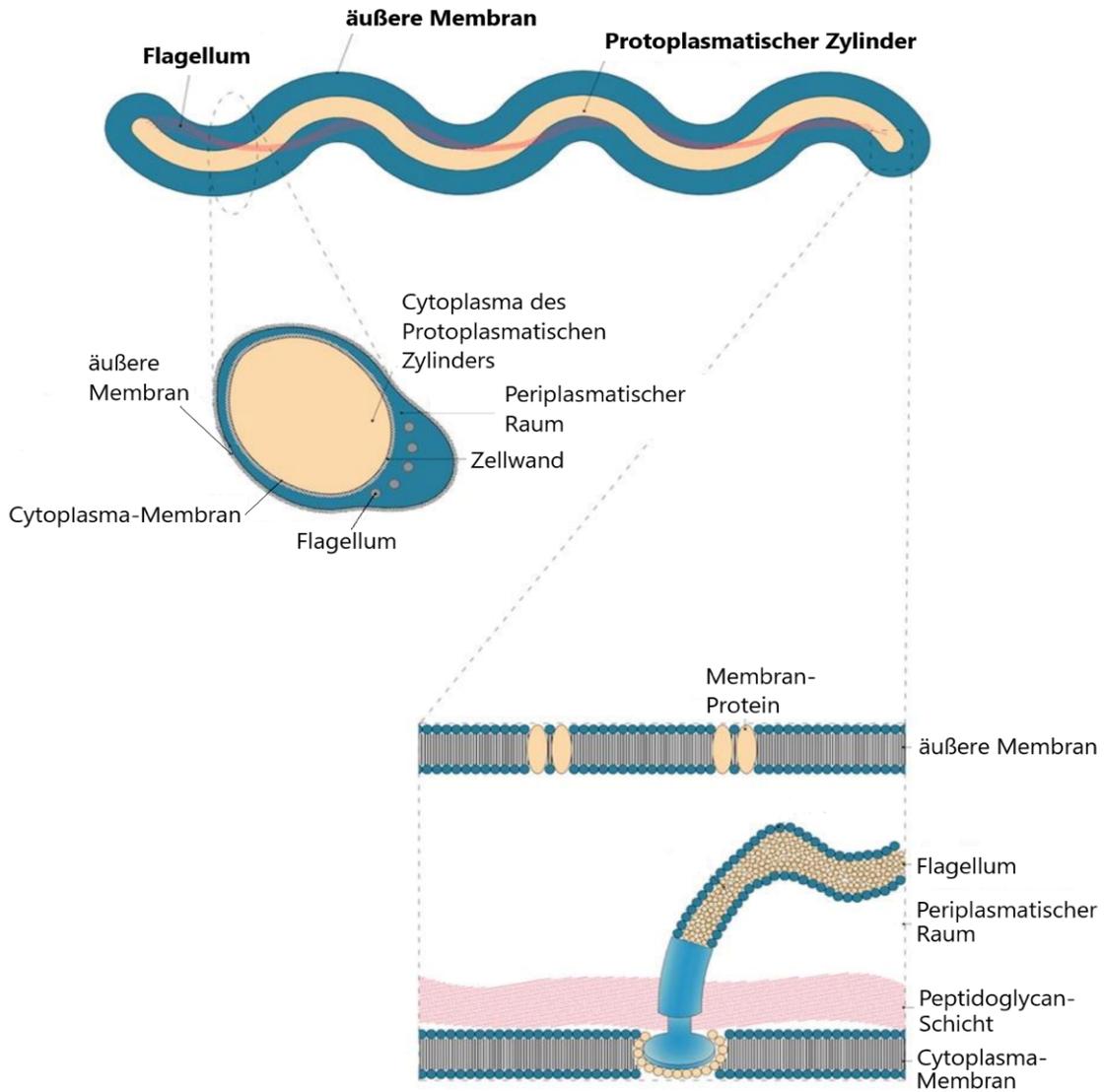


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellanatomie und des Querschnittes von *Borrelia burgdorferi* (TREVISAN et al., 2021).



Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung von *Borrelia burgdorferi* in BSK-Kulturmedium (TREVISAN et al., 2021).

In ihrer Zellhülle weisen Borrelien anstatt Lipopolysacchariden (LPS) immunreaktive Phospho- und Glykolipide auf, was für Gram-negative Bakterien untypisch ist (TAKAYAMA et al., 1987; BEN-MENACHEM et al., 2003; STUBS et al., 2009). Diese Antigenstrukturen spielen eine essenzielle Rolle bei der Etablierung, Vermehrung und Ausbreitung des Erregers im infizierten Organismus sowie der Entstehung der LB-Erkrankung im Wirt. Neben der Pathogenität spielt ihre Morphologie auch eine Rolle hinsichtlich der Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika (STEERE, 2001). Hier ist einerseits ihre besondere Zellwandstruktur von Bedeutung (z. B. Unwirksamkeit von auf die Zellwandsynthese wirkenden Antibiotika (z. B. Beta-Laktame)) als auch ihre langgestreckte Form und Motilität, wodurch Borrelien viskose Gewebe durchdringen, tief in diese eindringen und auch schwer zugängliche Bereiche des Körpers besiedeln können (z. B. Gelenke, Nerven). Dort können sie geschützt persistieren, sich langsam vermehren und chronische Infektionen etablieren. Auch können sie ihren Phänotyp in Anpassung an die Umwelt verändern (z. B. L-Form). Diese Schutzmechanismen können die Zugänglichkeit für Antibiotika erschweren, Resistenzen hervorbringen und die antibiotische Wirksamkeit mindern, insbesondere bei einer persistierenden Infektion (SMITH et al., 2014; RUDENKO et al., 2019).

Borrelien gedeihen unter anaeroben und mikroaerophilen Bedingungen, sie sind jedoch schwer zu kultivieren und benötigen anspruchsvolle Nährböden. Das ist dadurch begründet, dass im Genom dieser obligat parasitären Bakterien die meisten Gene für eigene zelluläre biosynthetische Stoffwechselwege fehlen und sie daher zahlreiche essenzielle Komponenten aus der Umgebung beziehungsweise dem Anzuchtmedium beziehen müssen. Im Gegenzug besitzen Borrelien eine Vielzahl an proteincodierenden Genen. Während ihres enzootischen Zyklus zirkulieren die obligat-parasitären LB-Borrelien zwischen Zeckenvektor, Reservoirwirtstieren und zufälligen Vertebratenwirten. Um sich dabei an wechselnde Bedingungen ideal anpassen zu können, besitzen LB-Borrelien die Fähigkeit, die Genexpression der äußeren Oberflächenproteine zu modulieren. Dies ermöglicht ihnen unter anderem Wirtswechsel, Adaptionsprozesse im Säugerwirt sowie 'Immune Escape'-Mechanismen (SCHWAN et al., 1995; SCHWAN&PIESMAN, 2000; YANG et al., 2000; GRAY JS et al., 2002; NEUMEISTER B. et al., 2009; ASLAM et al., 2017).

Grundsätzlich umfassen die genetischen Virulenzdeterminanten von *Bbsl* dabei Gene, die 1) an regulatorischen und grundlegenden Stoffwechselprozessen von Borrelien beteiligt sind, die ein generelles Überleben im Wirtsorganismus gewährleisten (die den Wirtsorganismus aber nicht unbedingt direkt oder aktiv einbeziehen), die 2) für Funktionen enkodieren, die *Bbsl* zur Wirtsinvasion und Dissemination befähigen, und die 3) eine LB-Erkrankung beim Wirt auslösen (STEWART et al., 2005; COBURN et al., 2021).

Die den Infektionsprozess beeinflussenden Gene von *Bbsl* sind sowohl auf einem linearen Chromosom (950 Kilobasen) als auch auf mindestens 21 extrachromosomalen DNA-Elementen bzw. Plasmiden (9 lineare und 12 zirkuläre Plasmide mit insgesamt 620 Kilobasen) lokalisiert. Das

segmentierte Genom von *Bbsl* ist einzigartig, denn es beinhaltet das derzeit größte bekannte Plasmid-Komplement der Bakterienwelt. Die Anzahl und Sequenz der Plasmide sind innerhalb der Spezies und Stämme heterogen, sowohl auf Nukleotid- als auch Aminosäureebene, wodurch eine hohe Bandbreite an möglichen exprimierten Proteinen entsteht (WILSKE et al., 1992; JAURIS-HEIPKE et al., 1993; ROBERTS et al., 1998; CASJENS et al., 2000; DERDÁKOVÁ&LENCÁKOVÁ, 2005; STRNAD®O, 2020). Die genetische und immunologische Diversität innerhalb des *Bbsl*-Komplexes stellt eine große Herausforderung in der LB-Diagnostik sowie in der Entwicklung von Impfstoffen dar (BARBOUR, 1990).

1.3.1. Oberflächenantigene von *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Die exprimierten, immunogenen Oberflächenlipoproteine befähigen den Erreger zur Adhäsion (z. B. an Thrombozyten, Lymphozyten, Fibroblasten, Epi- und Endothelien), Invasion, Persistenz (z. B. in Gelenken, ZNS, Augen) und Immunevasion, und dienen damit der Etablierung, Vermehrung und Dissemination des Erregers im infizierten Organismus. Die Genexpression und das Antigenrepertoire kann je nach Entwicklungs- und Infektionszyklus, Wirt und Umweltbedingungen adaptiert werden (SCHWAN et al., 1995; CARROLL et al., 1999; PAL&FIKRIG, 2003). Das heißt, die „lipid raft“-ähnliche Mikrodomänen bildenden Glykolipide in der äußeren Bakterien-Membran können sich in Reaktion auf externe Stimuli – wie Umgebungstemperatur, pH, Zelldichte und Säugetierwirt-spezifische Signale – in ihrer Anordnung und Größe signifikant verändern (SCHWAN et al., 1995; STEVENSON et al., 1995; INDEST et al., 1997; LIANG et al., 2002; REVEL et al., 2002; HYDE et al., 2007). Dabei korrespondieren diverse Gene miteinander (z. B. jene, die durch Temperatur oder Säugetierwirt-spezifische Signale reguliert werden), und es erfolgt eine entsprechend spezifische Hoch- oder Herunterregulierung der Expression einzelner Gene bzw. der enkodierten Proteine (BROOKS et al., 2003; OJAIMI et al., 2003; TOKARZ et al., 2004).

Die immunogenen Oberflächenproteine der Borrelien können mittels SDS-Page anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt und durch einen Größenmarker bestimmt werden. Die Bezeichnung der Oberflächen-AG beziehungsweise -proteine (p) erfolgt entsprechend nach ihrem Molekulargewicht in Kilodalton (z. B. p41). Darüber hinaus können sie aufgrund ihrer Lokalisation oder Funktion Eigennamen haben (z. B. *Flagellin* für p41, BmpA (engl. *Borrelia membrane binding protein*) für p39) (WILSKE et al., 1992; ZÜCKERT et al., 1999).

Bbsl exprimiert im Zeckenvektor Oberflächenlipoproteine, die den Spirochäten eine Besiedlung des Zeckenvektors (im Mitteldarm) sowie Schutz vor Eliminierungsmechanismen des Vektors gewährleisten. Dazu zählen unter anderem das äußere Oberflächenprotein (engl. *Outer surface protein*) A (OspA), OspB und OspC (Tabelle 2) (PAL et al., 2000; PAL&FIKRIG, 2003; FIKRIG et al., 2004; TILLY et al., 2016). Bahnt sich ein Wechsel von Zeckenvektor auf einen Säugerwirt

an, wird ebenso OspA, verstärkt OspC sowie OspD und Flagellin exprimiert, wodurch *Bbsl* befähigt wird, zum Übertragungsort, den Speicheldrüsen der Zecke, zu migrieren, möglichst ohne Eliminierung auf den Wirt übertragen zu werden und sich im Wirtsgewebe auszubreiten (Oberflächenlipoproteine der frühen Infektionsphase) (FUCHS et al., 1994; DE SILVA et al., 1999; GILMORE&PIESMAN, 2000; SCHWAN&PIESMAN, 2000, 2002; RAMAMOORTHY et al., 2005; DE SILVA et al., 2009; DUNHAM-EMS et al., 2009; ÖNDER et al., 2012; COOK, 2015; TRACY&BAUMGARTH, 2017; STANEK&STRLE, 2018; CAIMANO et al., 2019)). Zu einem späteren Zeitpunkt werden AG exprimiert, die insbesondere der Besiedlung des Säugewirtes, der Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtes, der Immunmodulation und -evasion sowie der Persistenz im Wirt dienen (u. a. Oberflächenlipoproteine der späten Infektionsphase). Dazu zählen unter anderem DbpA (engl. *Decorine binding protein A*), BmpA, VlsE (engl. *Variable major protein like sequence Expressed*) mit C₆ (engl. *6th invariant region of VlsE*), sowie CspA alias CRASP (engl. *Cold shock protein A/ Complement regulator-acquiring surface protein*), p58 und p66 (RÖSSLER et al., 1995; ZHANG et al., 1997a; GUO et al., 1998; COBURN&CUGINI, 2003; BEHERA et al., 2008; BLEVINS et al., 2008; MARANGONI et al., 2008; YANG et al., 2008; VERMA et al., 2009; SALO et al., 2011; KENEDY et al., 2012; HALLSTROM et al., 2013; NORRIS, 2014; ZHANG et al., 2020; CURTIS et al., 2022).

Insbesondere die Oberflächen-AG DbpA, OspC, OspA, VlsE, BmpA, aber auch *Flagellin*, p58 und p83 finden Anwendung in Serotests zum Nachweis von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG im Serum des Patienten (HAUSER et al., 1998b; GOETTNER et al., 2005). Im Idealfall ermöglicht ein entsprechender Nachweis es, eine Aussage hinsichtlich einem stattgefundenen Erregerkontakt bzw. einer *Bbsl*-Infektion, sowie dem Infektionsstadium (früh oder spät), zu treffen.

Tabelle 2: Zusammenfassung wichtiger Oberflächen-AG von *Bbsl*, die in der Diagnostik der equinen Lyme-Borreliose Anwendung finden. Die AG sind nach ihrem Molekulargewicht aufsteigend geordnet.

Bezeichnung Lipoprotein/Oberflächen-AG	Alternative Bezeichnung	Ort der Expression	Funktion	Infektionsstadium	Serodiagnostische Aussage	Literaturquellen
DbpA	Osp17, p18	Säugewirt	Bindung an Bindegewebe, Kolonisierung und Persistenz in Geweben des Wirtes	früh/spät	aktive/ persistierende Infektion/ Erregerkontakt in der Vergangenheit/ Impfung	(GUO et al., 1998; CARROLL et al., 1999; JAURISHEIPKE et al., 1999; REVEL et al., 2002; SALO et al., 2011)
C₆-Peptid	6 th invariant region of VlsE	Säugewirt	invariabler Bestandteil von VlsE	früh/spät	aktive/ persistierende Infektion	(KRUPKA et al., 2009; WAGNER et al., 2013)
OspC	p23-25	Zeckenvektor/Säugewirt	Migration zu Speicheldrüsen des Vektors, Übertragung auf Wirt, Etablierung der Infektion, Hemmung Komplementsystem	früh	frühes Infektionsstadium/ Impfung	(SCHWAN et al., 1995; SCHWAN & PIESMAN, 2000; GRIMM et al., 2004; PAL et al., 2004b; TILLY et al., 2016; CAINE et al., 2017)
CspA	CRASP	Säugewirt	Inhibition des Wirtskomplementsystem; Invasion und Persistenz	spät?	aktive/ persistierende Infektion	(KRAICZY et al., 2004; KENEDY et al., 2009; HALLSTROM et al., 2013)

OspD		Zecken-vektor/ Säuger- wirt	Adhäsion im Mitteldarm des Zecken- vektors, tem- peratursensi- tiv, (Bindung an Wirts- zelle)	früh	frühes Infekti- onsstadium	(NORRIS et al., 1992; OJAIMI et al., 2003; LI et al., 2007)
OspA	p30	Zecken- vektor	Adhäsion im Mitteldarm des Zecken- vektors, Ko- lonisierung, Persistenz	früh	Impfung	(FINGERL E et al., 1995; SCHWAN et al., 1995; PAL et al., 2000; SCHWAN &PIESMA N, 2000; TILLY et al., 2016)
OspB		Zecken- vektor	Adhäsion im Mitteldarm des Zecken- vektors, Ko- lonisierung, Persistenz	früh		(FIKRIG et al., 2004; BECKER et al., 2005; TILLY et al., 2016)
VlsE		Säuger- wirt	Immunmo- dulation und -evasion; AG-Varia- tion möglich	früh/ spät	aktive/ persis- tierende Infek- tion, nur <i>in</i> <i>vivo</i> exprimiert	(ZHANG et al., 1997a; BYKOWS KI et al., 2006; NORRIS, 2014)
BmpA	p39	Säuger- wirt	Gewebead- härenz und - kolonisation	früh/ spät	aktive Infek- tion/ Erreger- kontakt in der Vergangen- heit/ Impfung	(SIMPSON et al., 1990; ROESSLE R et al., 1997; VERMA et al., 2009)
Flagellin	p41	Säuger- wirt	Flagellen- Bestandteil; Mobilität	früh	frühes Infekti- onsstadium	(HAUSER& WILSKE, 1997)
p58		Zecken- vektor (v.a.)	Übertragung auf Vektor, Adhäsion	früh		

p66		Säuger- wirt	Kolonisie- rung, Etab- lierung der Infektion; Mole- kültransport durch Zell- membran, Interaktion mit Wirtsimmun- system	früh/ spät	frühes Infekti- onsstadium	(BARBOU R et al., 1984; BROOKS et al., 2003; CURTIS et al., 2022)
p83	p100	Zecken- vektor/ Säuger- wirt	Wirtswech- sel, Beteili- gung bei Im- munevasion (?)	früh/ spät	unspezifisch	(DITTON et al., 1992; RÖSSLER et al., 1995)

p, Protein; AG, Antigen; DbpA, engl. *Decorine binding protein A*; Osp, engl. *Outer surface protein*; CspA, engl. *cold shock protein A*; VlsE, engl. *variable major protein like sequence Expressed*; BmpA, engl. *Borrelia membrane binding protein*. Fett markierte Proteine sind von diagnostischer Relevanz und finden Anwendung in der Serodiagnostik.

1.4. Ätiologie & Übertragung der Lyme-Borreliose-Erreger

Um überlebensfähig zu sein, sind Borrelien als obligat-parasitäre Bakterien auf Wirtsmechanismen angewiesen. *Bbsl* existiert innerhalb eines komplexen enzootischen Zyklus, wobei der Erreger zwischen Vektor und Wirtstieren zirkuliert (TILLY et al., 2008). Ihre Biologie ist entsprechend stark an jene ihrer Vektoren und Wirte angepasst (KURTENBACH et al., 2002; MARGOS et al., 2022). Die horizontale Übertragung der organotrophen Erreger auf Wirbeltierwirte (v.a. Wildtiere wie Kleinsäuger, Vögel, Hasen, Füchse, Schalenwild, aber auch größere Vertebraten wie Menschen oder Haussäugetiere) erfolgt hämatogen über Zeckenvektoren (LISSMAN et al., 1984; BURGESS, 1988; COHEN et al., 1988; APPEL, 1990; MAGNARELLI et al., 1990; HUMAIR&GERN, 2000; COMSTEDT et al., 2006; STANEK&STRLE, 2018). Vertebratenwirte können dabei eine Doppelrolle einnehmen: sie können sowohl als Wirt für parasitäre Zecken als auch als Wirt für Spirochäten dienen. Hier gilt es, zwischen für *Bbsl* kompetenten Reservoirwirten (üblicherweise Kleinsäuger und Vögel) und Nicht-Reservoirwirten beziehungsweise zufälligen Wirten (z. B. Menschen und Haussäugetiere) zu unterscheiden. Erstere können durch die Blutmahlzeit des Vektors mit Borrelien infiziert werden, sie tragen signifikant zur Zirkulation der Spirochäten in der Natur bei und die Spirochäten sind auf deren Präsenz angewiesen. Nicht-Reservoirwirte und zufällige Wirte hingegen sind kein essenzieller Bestandteil des enzootischen Zyklus, das heißt, eine *Bbsl*-Übertragung kann zwar stattfinden, aber in der Regel findet keine Weiterverbreitung des

Erregers durch diesen Wirt statt (z. B. für *Bbsl* inkompetente Wirte wie das Rotwild; engl. *dead-end hosts*) (ASHFORD, 2003; RADOLF et al., 2012).

1.4.1. Zecken & Reservoirwirte

Der Vektor von *Bbsl* sind hämatophage Schildzecken der Gattung *Ixodes*. Mit Borrelien infizierte Zecken sind meist nur mit einer *Bbsl*-Spezies infiziert, eine Koinfektion mit verschiedenen Erregern des *Bbsl*-Komplexes ist jedoch nicht ausgeschlossen (PIESMAN&GERN, 2008; WAINDOK et al., 2017; CHEN et al., 2022). In Europa ist die Spezies *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock) aufgrund ihrer ausgedehnten geographischen Verbreitung der Hauptvektor für LB-Erreger (RADOLF et al., 2012; STANEK&STRLE, 2018). Die obligaten Dreiwirts-Zecken durchlaufen einen mehrjährigen Entwicklungszyklus, dessen Länge jedoch unter dem Einfluss von Klima und Nahrungsangebot steht (MANNELLI et al., 2012; SONENSHINE&ROE, 2014; ALKISHE et al., 2017; DUMIC&SEVERNINI, 2018; GETHMANN et al., 2020). *Ixodes*-Zecken haben ihre Hauptaktivitätsphasen im Frühjahr und im Herbst, bei kalten Temperaturen im Winter verbringen sie eine Ruhephase (GRAY, 1991). Ihr üblicherweise zwei bis drei Jahre andauernder Entwicklungszyklus beinhaltet drei Entwicklungsstadien: das Larven-, Nymphen- und Adultstadium. Um sich weiterentwickeln zu können, nehmen sie üblicherweise drei Blutmahlzeiten zu sich (eine Blutmahlzeit pro Stadium) und parasitieren dabei eine Vielzahl an verschiedenen Vertebratenwirten (Abb. 4). Eine spezifische Wirtsassoziation von Borrelien wird hierbei diskutiert (z. B. Nagetiere und *B. afzelii* bzw. *Bbss*, Vögel und *B. garinii* bzw. *B. valaisiana*), wobei eine lose Wirtsassoziation im enzootischen Zyklus wohl häufiger vorzukommen scheint (KURTENBACH et al., 2002; GERN, 2008; WOLCOTT et al., 2021; STRNAD et al., 2023).

Zunächst schlüpfen die noch nicht infizierten Zeckenlarven aus Eiern, die ein adultes Weibchen im natürlichen Habitat abgelegt hat. Dann parasitieren die sechsbeinigen Larven ihren ersten Wirt (meist kompetente Reservoirwirte wie Kleinsäuger und Vögel). Sobald eine Larve vollgesogen vom Wirt abfällt, findet in geschützter Umgebung die Häutung und Entwicklung zur achtbeinigen Nymphe statt (Abb. 5) (RADOLF et al., 2012; RIZZOLI et al., 2014). Dabei kann eine initiale Infektion der Zecke mit Borrelien stattfinden, wenn der Wirt infiziert ist. Für die darauffolgende Blutmahlzeit werden üblicherweise größere Wirtstiere aufgesucht (Hasen, Wildkarnivoren; aber auch Menschen oder Haussäugetiere). Die Übertragung von Borrelien auf Wirtsvertebraten findet überwiegend während des Nymphenstadiums statt. Im Anschluss erfolgt die Weiterentwicklung der Nymphen zu weiblichen oder männlichen Adulten, diese parasitieren während einer zur Paarung benötigten dritten Blutmahlzeit vor allem Großtiere wie Schalenwild, aber auch Menschen und Haussäuger (RAGAGLI et al., 2011; SONENSHINE&ROE, 2014; STANEK&STRLE, 2018; STEINBRINK et al., 2022). Allerdings stellt Rotwild kein kompetentes Reservoir für Borrelien dar

(TELFORD et al., 1988; JAENSON&TÄLLEKLINT, 1992). Im Anschluss an die Paarung der Imagines legt das Zeckenweibchen tausende Eier auf dem Laubboden ab und verstirbt.

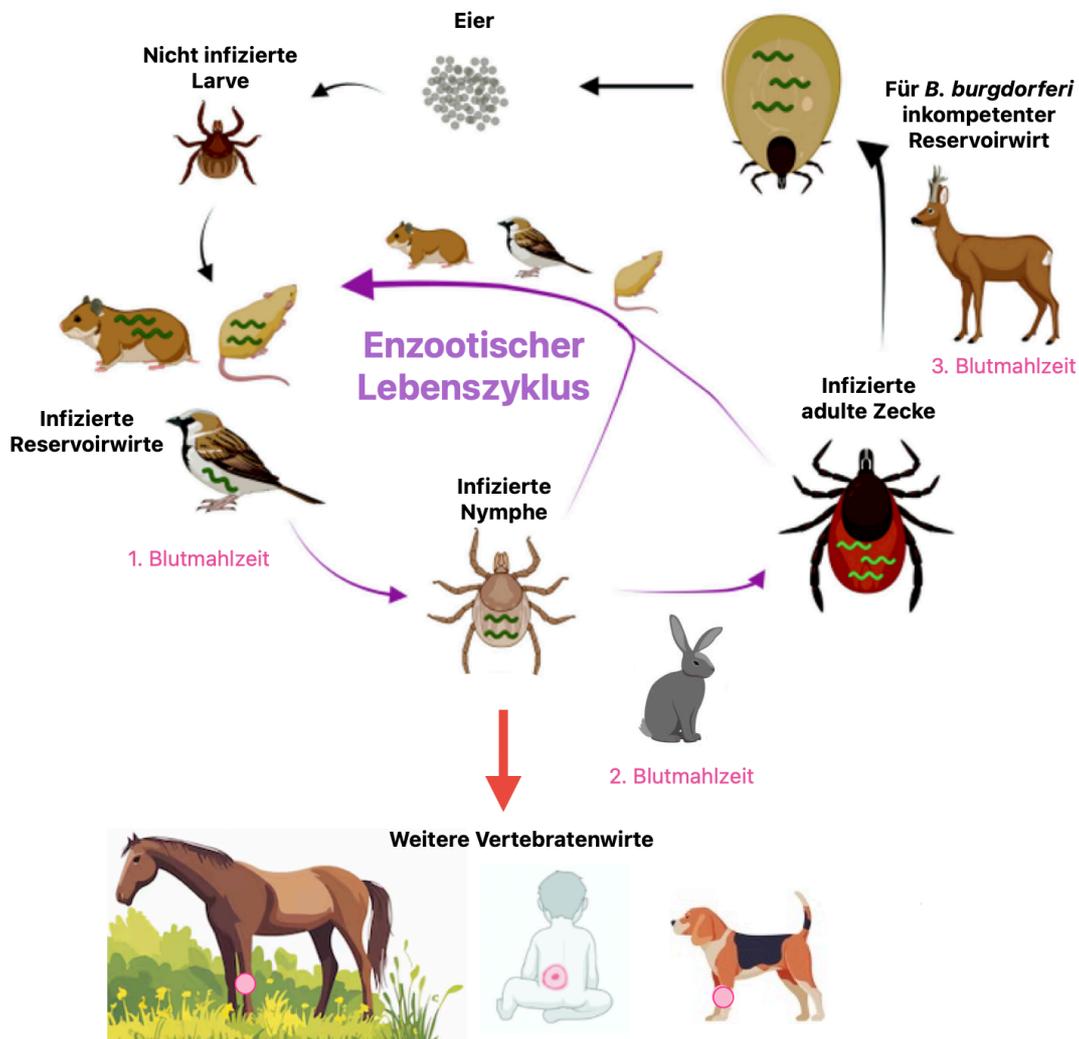


Abbildung 4: Enzootischer Lebenszyklus, der dafür verantwortlich ist, dass *Borrelia burgdorferi sensu lato* in der Zecken- und Reservoirwirtpopulation verbleibt.

Der Vektor *Ixodes ricinus* durchläuft einen dreiphasigen Lebenszyklus (Larve, Nymphe, Imago) und nimmt jeweils eine Blutmahlzeit pro Stadium zu sich. Zunächst schlüpft eine nicht infizierte Larve aus einem Ei. Die Larve parasitiert dann ihren ersten Wirtsvertebraten und entwickelt sich zur Nymphe. Dieser erste Wirt kann Träger von *Bbsl* sein und die Nymphe internalisiert somit den Erreger. Bei einer zweiten Blutmahlzeit, wobei die infizierte Nymphe in das adulte Zeckenstadium übergeht, findet eine Übertragung der Borrelien auf einen weiteren Wirtsvertebraten statt. Diese können erneut als Infektionsquelle für naive Zeckenlarven fungieren. Zur Paarung der weiblichen und männlichen Imagines wird eine dritte Blutmahlzeit konsumiert, danach legt das Zeckenweibchen tausende befruchtete, nicht-infizierte Eier ab, wodurch der Zyklus von vorne beginnt. Auf diese Weise zirkulieren die Spirochäten zwischen Vektor und Wirtstieren. Am häufigsten findet eine Übertragung von Borrelien durch Nymphen statt. Für adulte Zecken sind Hirsche beliebte Wirte, jedoch stellen sie keine kompetenten Reservoirs für die Spirochäten dar (STRNAD et al., 2023).



Abbildung 5: Entwicklungsstadien von *Ixodes ricinus*.

A: Larvenstadium (3 Beinpaare), B: Nymphenstadium (4 Beinpaare), C: Weibliches Imago, D: Männliches Imago (STRNAD et al., 2023).

Die Prävalenz von *Bbsl* in Zecken ist geographisch und saisonal variabel. In endemischen Gebieten variiert sie zwischen 10% und 50%, mancherorts kann sie sogar höher sein (z. B. in Gebieten mit hoher Zeckenpopulation, hoher Dichte an Reservoirwirten und günstigen Bedingungen). Insbesondere im Frühling und Herbst ist die Prävalenz am höchsten (MEDLOCK et al., 2013; STRNAD et al., 2017; ESTRADA-PENA et al., 2018). Günstigere Klimabedingungen (z. B. erhöhte Temperaturen und eine Luftfeuchte > 85%) fördern beispielsweise kürzere Abstände zwischen effektiven Buchenmastdurchgängen, dadurch gibt es größere Nagetierpopulationen und somit mehr Wirte für Zecken (IMHOLT et al., 2015). Zudem beeinflussen sie die Aktivität, Entwicklungsdauer, Diapause, Überwinterung und Überlebensrate von Zecken positiv (ZÄHLER&GOTHE, 1995b, 1995a; PERRET et al., 2004; ANDERSON&MAGNARELLI, 2008). Eine mittelhohe Vegetation wie man sie in Laub- oder Mischwäldern, auf offenen Grasflächen und Heidelandschaften sowie in urban und suburban gestalteten Flächen vorfindet, wirkt sich ebenso förderlich auf die Zecken- und somit auf die *Bbsl*-Prävalenz aus (MEDLOCK et al., 2013; KRÓL et al., 2022; HANSFORD et al., 2023). Zu feuchte Witterungen hingegen reduzieren die Zeit der aktiven Suchphase und somit die Wirtfindungswahrscheinlichkeit (PERRET et al., 2000; ANDERSON&MAGNARELLI, 2008).

1.4.2. Wirtsfindung

Während ihres Entwicklungszyklus benötigen Zecken mehrere Blutmahlzeiten, um sich weiterentwickeln und reproduzieren zu können (RANDOLPH, 2004). Das Ausbleiben der Wirtfindung bedeutet für die obligaten Parasiten, dass sich ihr Lebenszyklus verlängert oder sie gar sterben (ANDERSON&MAGNARELLI, 2008). Bei geeigneter Witterung lauern Zecken während ihrer aktiven Suchphase geeigneten Wirten in der Vegetation auf. Sie können sich dabei horizontal

und vertikal entlang der Vegetation fortbewegen (MILNE, 1950). Beim sogenannten *Questing*, einem Suchverhalten, wobei sie auf Gräser, Büsche oder andere Pflanzen klettern und ihre Vorderbeine ausstrecken, können sie potenzielle Wirte anhand von chemosensorischen Signalen (chemische Botenstoffe, Vibration, Wärme, Veränderung von Licht- und Schattenverhältnis) ausfindig machen (SONENSHINE&ROE, 2014). Das spezialisierte Haller-Organ (olfaktorisches Sinnesorgan) am vordersten Beinpaar der Zecke spielt dabei eine wichtige Rolle (CARR et al., 2017). Sie können damit Umweltreize bzw. Botenstoffe registrieren (z. B. Kohlenstoffdioxid, Ammoniak, Aceton), die der Wirt durch die Atmung, das Haarkleid sowie die Schweiß- und Urinsekretion absondert (GARCIA, 1962; CARROLL, 1999; SONENSHINE, 2004). Sobald ein Wirt vorbeistreift, bleiben sie an dessen Haut oder Fell hängen und suchen sich dann eine geeignete Stelle (gut durchblutete, dünne Hautareale), wo sie sich mit ihren Mundwerkzeugen festsetzen, bevor sie mit ihrem Blutsaugakt beginnen (HADDAD et al., 2018).

Schildzecken der Gattung *Ixodes* parasitieren ihre Wirte mehrere Tage lang und können dabei das Hundertfache ihres Körpergewichts an Blut aufnehmen. Die Blutaufnahme variiert mit dem Entwicklungsstadium und dem Geschlecht (ESTRADA-PEÑA&DE LA FUENTE, 2014; GULIANUSS et al., 2016). Dabei kann eine potenzielle Übertragung von Borrelien stattfinden. Es konnte gezeigt werden, dass mit der Dauer der Blutmahlzeit (≥ 2 Tage) die Wahrscheinlichkeit für die Übertragung von Borrelien steigt (HOJGAARD et al., 2008).

1.4.3. Stechakt und Übertragung von *Bbsl* auf den Säugwirt

Während der Blutmahlzeit schneidet die Zecke mit ihren paarig angelegten Mundwerkzeugen (Beißklauen, *Cheliceren*) in die Epidermis des Wirtes, penetriert die Hautschichten mit ihrem mit Widerhaken versehenen Hypostom (zungenartiger Fortsatz des Mundapparates) und verankert dieses fest im Stichkanal. Im Anschluss sekretiert die Zecke ihren Speichel über die paarigen Speicheldrüsen in den Stichkanal und beginnt, Blut zu saugen (RICHTER et al., 2013; VANCOVÁ et al., 2020). Der Speichel verhindert dabei unter anderem eine Blutgerinnung des Wirtsblutes, ermöglicht den Verdau von Wirtsgewebe sowie die Übertragung von Pathogenen (KEMP et al., 1982).

Die Spirochäten dringen in die Zecke (Larven-/ Nymphenstadium) während der Blutmahlzeit an einem infizierten Wirtstier ein und besiedeln anschließend den Mitteldarm der Zecke. Die Borrelien haben dabei die Herausforderung zu bewältigen, dass im Blut des Reservoirwirtes ein anderes Milieu herrscht als im Mitteldarm des Zeckenvektors (BALASHOV, 1967; NARASIMHAN et al., 2017). Borrelien adaptieren sich an diese Milieuänderung, indem sie die Genexpression ihrer äußeren Oberflächenproteine anpassen (SCHWAN et al., 1995; SCHWAN&PIESMAN, 2000; YANG et al., 2000; PAL&FIKRIG, 2003). Zudem schützen sie sich auf diese Weise davor, durch

das Immunsystem der Zecke erkannt und eliminiert zu werden (GULIA-NUSS et al., 2016; SONENSHINE&MACALUSO, 2017). Die Expression des Oberflächenlipoproteins A (OspA, engl. *Outer surface protein A*) zum Zeitpunkt der Aufnahme in den Mitteldarm der nüchternen Zecke ermöglicht *Bbsl* eine Adhäsion an die luminale Oberfläche von Mitteldarmepithelzellen und ein Verweilen bis zur nächsten Blutmahlzeit (PAL et al., 2000; PAL&FIKRIG, 2003; KUROKAWA et al., 2020). *Bbsl* exprimiert OspA primär während der Kolonisierung des Zeckenvektors (SCHWAN et al., 1995; DE SILVA et al., 1996; SCHWAN&PIESMAN, 2000; STROTHER et al., 2007; WOODMAN et al., 2008). Neben OspA erleichtert *Bbsl* die Expression von OspB die Adhäsion und Kolonisation des Mitteldarms (PAL et al., 2000; HU et al., 2001; YANG et al., 2004; TILLY et al., 2016). Neben OspA trägt das Oberflächenlipoprotein OspC durch die Bindung an Plasminogen dazu bei, dass die Borrelien vor Abwehrmolekülen geschützt sind, die während einer weiteren Blutmahlzeit der Zecke im Mitteldarm eintreffen (FUCHS et al., 1994; ÖNDER et al., 2012). Die dabei im Mitteldarm ankommenden Blutbestandteile, und die damit einhergehenden Veränderungen in Temperatur, pH-Wert und Kohlenstoffdioxidgehalt im Mitteldarm der Zecke, veranlassen die dort lokalisierten Borrelien dazu, ihre Genexpression anzupassen; sie lösen sich vom Darmepithel, vermehren sich und migrieren mithilfe einer erhöhten Expression des Oberflächenproteins OspC in die Speicheldrüsen der Zecke (STEVENSON et al., 1995; CARROLL et al., 1999; DE SILVA et al., 1999; GILMORE&PIESMAN, 2000; HYDE et al., 2007; CAIMANO et al., 2019; KUROKAWA et al., 2020). Dabei penetrieren sie die peritrophische Membran des Mitteldarms und disseminieren in das Hämözöl der Zecke, um anschließend über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen der Zecke zu gelangen (Abb. 6). Dort bedienen sich Borrelien zahlreicher *Escape*- und Schutzmechanismen, um Speicheldrüsenproteinen zu entgehen (VANCOVÁ et al., 2020). Die Autoren Pal et al. (2004) konnten am murinen LB-Modell mit OspC-Knockout-*Bb* zeigen, dass OspC essenziell für eine Übertragung von Borrelien aus dem Vektor auf einen Wirt zu sein scheint (PAL et al., 2004b). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass OspC das Komplementsystem des Wirtes in der frühen Infektionsphase hemmt, was den Erregern ein Überleben im Wirt ermöglicht (CAINE et al., 2017).

Schlussendlich werden die in die Zeckenspeicheldrüsen eingewanderten Borrelien im Verlauf der Blutmahlzeit auf das nächste Wirtstier übertragen. Durch die Penetration der Haut und des Blutgefäßes durch die Zecke während ihrer Blutmahlzeit können die Erreger ihre erste Hürde überwinden und in den Wirt gelangen, um sich anschließend lokal über die Blutgefäße in der Haut und später in Geweben im gesamten Organismus auszubreiten (DUNHAM-EMS et al., 2009; STANEK&STRLE, 2018). Die Übertragung der Spirochäten erfolgt meist erst 24 bis 48 Stunden nach Beginn des Blutsaugaktes, kürzere Übertragungsperioden (< 16 Stunden) werden jedoch diskutiert, ebenso wie Einflussfaktoren wie Borrelien- und Zecken-Genospezies (COOK, 2015). Je

länger die Blutmahlzeit andauert, desto wahrscheinlicher ist eine Transmission der Erreger (EISEN, 2018).

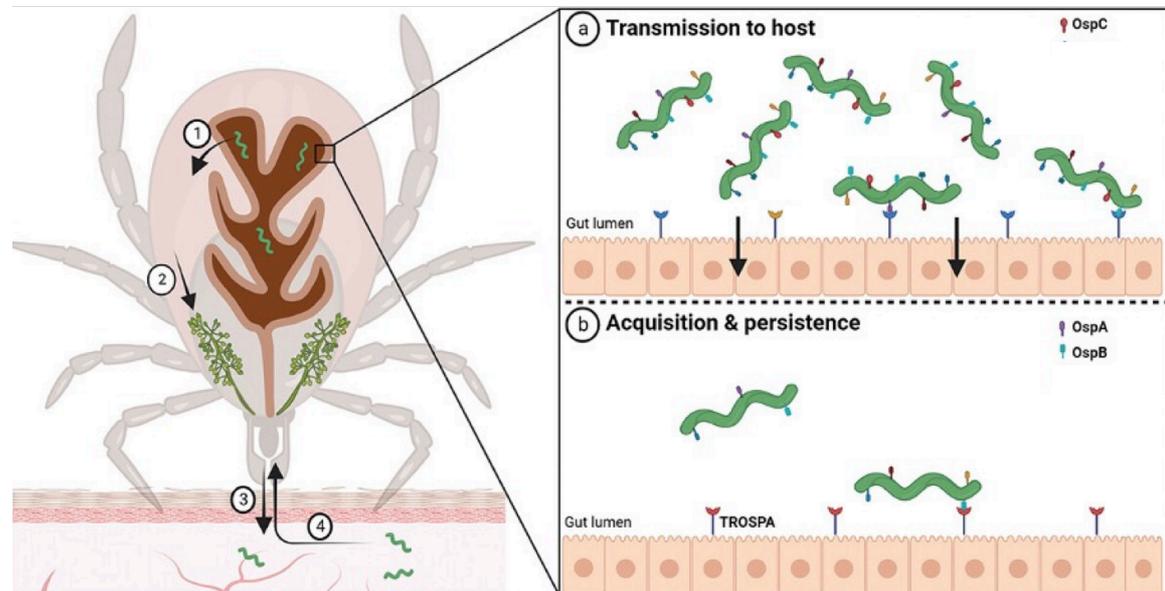


Abbildung 6: Molekulare Interaktionen während der Übertragung von im Mitteldarm der infizierten Zecke persistierenden Borrelien auf einen Wirt als auch der initialen Aufnahme von Spirochäten in den Zeckenvektor.

(a) Während der Blutmahlzeit der infizierten Zecke werden im Mitteldarm persistierende Borrelien durch das ankommende Blut dazu veranlasst, sich vom Darmepithel zu lösen, zu vermehren und die Expression von OspC hochzuregulieren. OspC schützt *B. burgdorferi* vor bakteriziden Bestandteilen des ankommenden Blutes und ermöglicht eine Migration zu den Speicheldrüsen der Zecke. Anschließend (1) verlassen sie den Darm durch Penetration der Darmschranke in das Hämocoel. (2) Über die Hämolymphe migrieren sie zu den Speicheldrüsen der Zecke. Dort erfolgt (3) eine Übertragung der Borrelien auf den Säugerwirt (engl. *Transmission to host*) sowie (4) eine erneute Aufnahme von Borrelien aus dem infizierten Wirt, welche die Zecke bis zur nächsten Blutmahlzeit wieder besiedeln (engl. *Acquisition & persistence*). (b) Die im Mitteldarm ankommenden Borrelien exprimieren Lipoproteine wie OspA und OspB, die den Spirochäten eine Adhäsion an das Darmepithel ermöglichen, sie schützen und die Persistenz im Mitteldarm der Zecke möglich machen (durch Bindung von OspA an TROSPA (engl. *tick receptor for OspA*)) (STRNAD et al., 2023).

1.5. Pathogenese der *Bbsl*-Infektion

Borrelien können in der freien Umwelt nicht selbstständig überleben, sie sind auf Wirte angewiesen (ESTRADA-PEÑA et al., 2016). Um zu überleben und sich nicht nur im Zeckenvektor, sondern auch in unterschiedlichen Säugetierwirten ausbreiten, etablieren und persistieren zu können, haben sie verschiedenste Virulenzmechanismen entwickelt (KENEDY et al., 2012; RADOLF et al., 2012). *Bbsl* besitzt zwar keine bei anderen Bakterien oder Mikroben üblichen Virulenzfaktoren (z. B. spezialisierte Sekretionssysteme, Toxine (z. B. Lipopolysaccharide, LPS), extrazelluläre

Proteasen (außer der temperatursensitiven Serin-Protease HtrA, die an der Etablierung der Infektion im Säuger beteiligt ist)), dafür bedient sich der Erreger gezielt anderen Mechanismen, die sein Überleben im Enzootischen Zyklus sichern (FRASER et al., 1997; COLEMAN et al., 2013; YE et al., 2016). Dazu zählen, neben einer strukturell auffälligen äußeren Membran, dynamischer Genregulation und Antigenvariation, auch das Ausnutzen von wirtseigenen Proteinen zur Vermittlung der Interaktion mit Zielgeweben, die Komplementevasion durch Manipulation der Wirtsimmunantwort, sowie die Besiedelung von immunprivilegierten Nischen (RADOLF et al., 2012; TRACY&BAUMGARTH, 2017; COBURN et al., 2021). Darüber hinaus nutzen die Erreger potenziell weitere Virulenzmechanismen wie den Pleomorphismus, die Intrazellularität in wirtseigenen Makrophagen und die mechanische Transformation von Wirtszellen (MERILÄINEN et al., 2015; KARVONEN et al., 2021; KLOSE et al., 2021; YUSTE et al., 2022). Obwohl es mittlerweile ein umfangreiches Wissen zu den LB-Erregern gibt, konnten bis heute nicht alle Pathogenitätsmechanismen von *Bbsl* vollständig ergründet werden (STRNAD et al., 2023).

1.6. Immunantwort des Wirtes nach einer *Bbsl*-Infektion

Während der Übertragung über den Zeckenspeichel machen sich die Borrelien zunächst die Wirkung der Speichelbestandteile zu Nutze (antikoagulativ, antiinflammatorisch, immunmodulierend, Bindung von OspC an Salp15). Dabei wird das Komplementsystem des Wirtes inhibiert. Somit können die Borrelien während der Transmission und einer lokalen hämatogenen Infektion um die Eintrittspforte in der Haut (frühes lokales Infektionsstadium) den Immunmechanismen des Wirtes und der damit einhergehenden AK-induzierten Eliminierung entkommen (RAMAMOORTHY et al., 2005; STANEK&STRLE, 2018; KUROKAWA et al., 2020). Sobald die Erreger mithilfe ihrer Membran-assoziierten Oberflächenlipoproteine entlang von Kollagenfasern der Haut lokal disseminieren (innerhalb von 48 Stunden *post infectionem*) wird durch das Immunsystem des Wirtes eine angeborene und eine adaptive Immunantwort ausgelöst (STEERE et al., 2004). In einer ersten unspezifischen Immunreaktion des angeborenen Immunsystems wandern Makrophagen und neutrophile Granulozyten in das infizierte Gewebe ein. Diese erkennen die Oberfläche der Borrelien als Pathogen-assoziiert, sodass eine AK-vermittelte Immunreaktion eingeleitet wird, die einer Eliminierung der Erreger dient (STRAUBINGER et al., 1997a; STEERE et al., 2004; XU et al., 2007; NESTLE et al., 2009). Die Immunzellen können einen Teil der Erreger durch Phagozytose abfangen und eliminieren, dennoch kann die Infektion nicht allumfassend bereinigt sowie ein Fortschreiten verhindert werden (MONTGOMERY et al., 2002; PARK et al., 2018). Die übrigen Erreger, die sich der Immunantwort des Wirtes durch Immunevasion entziehen konnten, breiten sich weiter im Gewebe aus (frühe disseminierte Phase; Tage bis Wochen *post infectionem*). Dabei bleiben die Borrelien überwiegend im extrazellulären Raum, wo sie mit residierenden Immunzellen interagieren (CRAFT et al., 1984; STRAUBINGER

et al., 1997a; HÄRTER et al., 1999; HYDE, 2017; LIN et al., 2020). Dies lockt weitere immunologische Effektorzellen (Granulozyten) an, die durch ihre Degranulation eine Entzündung im Gewebe hervorrufen (STRAUBINGER et al., 1997a; BROWN et al., 1999; YANG et al., 2008). Vor allem kollagenreiche Gewebe (z. B. Herzmuskel, Gelenke, Nervensystem) sind aufgrund einer hohen Glykosaminoglykan (GAG)-Rezeptordichte von Entzündungen durch persistierende *Bbsl* betroffen, da die Erreger über ihre Oberflächenproteine (z. B. Adhäsine wie DbpA/B) an die Moleküle der wirtseigene Extrazellulären Matrix (z. B. Proteoglykane wie Decorin oder Glykane) binden können (GUO et al., 1995; PARVEEN&LEONG, 2000; COBURN et al., 2002; ZAMBRANO et al., 2004; FISCHER et al., 2006; BEHERA et al., 2008; LI et al., 2012; COBURN et al., 2013).

Im weiteren Verlauf der Infektion leitet das humorale Immunsystem eine spezifische Abwehr ein, dabei wird die adaptive Immunantwort aktiviert und es kommt zur Bildung von spezifischen AK gegen Oberflächen-AG des Erregers (nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip). Zunächst ist die Immunantwort gekennzeichnet durch eine massive Bildung von Immunglobulinen M (IgM) (frühe/akute Infektion; beginnend nach ein bis zwei Wochen *post infectionem*), die meist in einem Zeitraum von vier bis sechs Wochen *post infectionem* im Serum des Wirtes nachgewiesen werden können, bevor sie allmählich wieder abnehmen und die Bildung von Immunglobulinen G (IgG) ansteigt (CRAFT et al., 1984; SCHAIBLE et al., 1991; CHANG et al., 2000; STRAUBINGER et al., 2000; WILSKE, 2003). IgG sind ein Indiz für ein spätes bzw. chronisches Infektionsstadium als auch für eine latente oder ausgeheilte Infektion, wobei diese AK-Klasse teils lebenslang konstant im Wirt nachgewiesen werden kann, da sich diese AK nur sehr langsam zurückbilden (STRAUBINGER et al., 1997b; DONTA et al., 2021). Nichtsdestotrotz ist bei der LB nicht von einer lebenslangen protektiven Immunität durch das angeborene oder adaptive Immunsystem auszugehen. Im Falle eines ausschließlichen Nachweises von IgM kann davon ausgegangen werden, dass es sich um keine chronische LB-handelt (CHANG et al., 2005; ELSNER et al., 2015). Ist ein andauernder niedriger IgG-Titer vorhanden, kann dies sowohl für eine früher überwundene Infektion als auch eine frühe Reinfektion sprechen (LOHR et al., 2018; WOUDEBERG et al., 2020).

Das immunologische Ziel der Bildung von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG ist es, gezielt an die Oberflächenlipoproteine des Erregers binden und diesen möglichst frühzeitig eliminieren zu können. Wenn die Erreger nicht vollständig eliminiert werden können und sich dem Wirtssystem durch Immunevasion, z. B. mithilfe von VlsE-Variation, entziehen, sind die spezifischen AK unwirksam (KABAT, 1980; CRAFT et al., 1984). Dies kann zu einer persistierenden Infektion und chronischen bzw. intermittierenden Symptomen führen (APPEL et al., 1993; STRAUBINGER et al., 1997b; KRUPKA&STRAUBINGER, 2010). Dabei kommt es zu einer massiven Infiltration von Immunzellen, vor allem T-Lymphozyten, sowie einem vermehrten

Einwandern von Leukozyten in betroffene Gewebe (BURGESS&GENDRON-FITZPATRICK, 1990; HU&KLEMPNER, 1997; STRAUBINGER et al., 1997a).

1.7. Therapie

Die Therapie einer verifizierten eLB mit klinischer Manifestation erfolgt üblicherweise durch eine antibiotische Behandlung über vier Wochen mit Penicillinen oder Tetracyklin (z. B. Doxycyclin), welche eine bakterio-statische Wirkung zeigen (CHANG et al., 2005; WORMSER&SCHWARTZ, 2009; DIVERS et al., 2018). Zusätzlich können entzündungshemmende und schmerzlindernde Medikamente verabreicht werden.

Eine Behandlung von klinisch unauffälligen, seropositiven Pferden ist kontraindiziert, hier birgt ein unangemessener Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen nur unnötige Kosten sowie das Risiko von nachteiligen Auswirkungen auf den Patienten. Insbesondere bei Herbivoren, wie Pferden, ist die mögliche gastrointestinale Problematik (z. B. Kolik, Durchfall) ein nicht zu vernachlässigender Aspekt, weshalb die Sinnhaftigkeit eines Antibiotikaeinsatzes stets kritisch abzuwägen ist (DIVERS et al., 2018; ALVAREZ-NARVAEZ et al., 2020; ARNOLD et al., 2021; JIMENEZ et al., 2021; KHUSRO et al., 2021).

Eine antibiotische Behandlung von klinisch auffälligen Pferde kann indiziert sein, wenn das Pferd 1) eine Zecken- und mögliche LB-Erregerexposition hatte, 2) klinische Anzeichen einer eLB manifestiert, 3) vorab einer umfassende Differentialdiagnostik unterzogen wurde, die zu einer entsprechenden klinischen Verdachtsdiagnose führte, und 4) wenn für das Pferd zur Substitution der klinisch gestellten Verdachtsdiagnose ein infektionstypischer, positiver Nachweis von *Bbsl* in Form einer spezifischen Labordiagnostik erbracht werden konnte (z. B. serologischer Nachweis von spezifischen AK gegen VlsE-AG) (SWINEBROAD, 2018). Eine grundsätzliche Voraussetzung dafür ist u. a. ein zuverlässiges und aussagekräftiges labordiagnostisches Ergebnis (MAY, 2009; COSTA et al., 2015; LEHMANN et al., 2017; ALVAREZ-NARVAEZ et al., 2020; ARNOLD et al., 2021; JIMENEZ et al., 2021; KHUSRO et al., 2021).

2. Labordiagnostik der *Bbsl*-Infektion bei Pferden

Für die mikrobiologische Labordiagnostik der LB stehen sowohl indirekte Erregernachweismethoden mittels Nachweis *Bbsl*-spezifischer AK (IFT, ELISA, Immunoblot) als auch Direktnachweismethoden (Mikroskopie, Erreger-Kultivierung, *Polymerase chain reaction* (PCR)) zur Verfügung (FINGERLE&SING, 2020; BRANDA&STEERE, 2021).

Je nach mikrobiologischem Verfahren finden verschiedene Untersuchungsmaterialien Anwendung (Tab. 3). Für den direkten Erregernachweis wird geeignetes Probenmaterial in Form von Biopaten

(Haut, Myokard, Synovia) verwendet, bei indirekten Nachweismethoden hingegen wird Liquor, Synovia oder Blut hinsichtlich spezifischer AK untersucht (WILSKE&FINGERLE, 2000; AGUERO-ROSENFELD et al., 2005; ESHOO et al., 2013). Während in der Humanmedizin das zu verwendende Probenmaterial und die Labordiagnostikmethode von der klinischen Manifestation der LB und dem Infektionsstadium des Patienten abhängig sind, erfolgt der LB-Erregernachweis in der Veterinärmedizin fast ausschließlich serologisch über den Nachweis von *Bbsl*-spezifischen AK im Serum oder Plasma des Tieres (KRUPKA&STRAUBINGER, 2010; BARTH et al., 2014). Hier wird die sogenannte Zweistufendiagnostik empfohlen, die aus einem quantitativen AK-Suchtest (ELISA, IFT/ IFAT) und einem anschließenden, qualitativen AK-Bestätigungstest (Immunoblot) besteht und derzeit den Goldstandard der LB-Diagnostik darstellt (WILSKE et al., 2007; KRUPKA&STRAUBINGER, 2010; DIVERS, 2013; CHOMEL, 2015).

Darüber hinaus stehen Schnelltests zur Verfügung, die spezifische AK ausschließlich gegen die infektionsspezifische IR6-Einheit von *Bbsl* mittels des rekombinanten C₆-Peptids detektieren (C₆ SNAP), sowie Multiplex-Assays, wobei infektions- und impfspezifische AK (OspB, OspF und OspA) quantifiziert werden können (CHANDRASHEKAR et al., 2008; JOHNSON et al., 2008; WAGNER&FREER, 2009; WAGNER et al., 2011).

Tabelle 3: Übersicht über gängigste serologische Diagnostikmethoden zum indirekten Nachweis einer Immunantwort auf *Bbsl*-AG im Pferd (DIVERS et al., 2018).

Diagnostikverfahren	Herkunft der Ziel-AG	Interpretation	Vorteile	Nachteile
IFAT, ELISA (Serum, Liquor, Synovia)	Vollerregersat aus <i>in vitro</i> <i>Bbsl</i> -Stämmen oder rekombinante <i>Bbsl</i> -AG	<ul style="list-style-type: none"> ▪ quantitatives Ergebnis in Form von AK-Titer ▪ positives Ergebnis muss mit WB verifiziert werden ▪ keine Differenzierung möglich zwischen Impf-AK und AK durch natürliche Exposition 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ breites Nachweisspektrum von AK gegen <i>Bbsl</i>-AG ▪ quantitativ: ansteigender AK-Titer kann indikativ für eine aktive Infektion sein 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ zweiter Bestätigungstest nötig (WB) ▪ mögliche Kreuzreaktionen sind problematisch ▪ keine Aussage über Infektionsstadium oder Impfstatus möglich ▪ Ergebnisse können durch LB-Impfung verfälscht werden
Immunoblot (WB, LIA) (Serum, Liquor, Synovia)	Vollerregersat aus <i>in vitro</i> <i>Bbsl</i> -Stämmen oder rekombinante <i>Bbsl</i> -AG	<ul style="list-style-type: none"> ▪ qualitatives Ergebnis in Form von Bandenmuster, teilweise 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ breites Nachweisspektrum von AK gegen <i>Bbsl</i>-AG ▪ qualitativ: Identifikation 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nicht-quantitativ ▪ teilweise subjektive Interpretation, wenn visuell interpretiert

		<ul style="list-style-type: none"> ▪ visuell interpretiert (subjektiv) ▪ qualitative Information hinsichtlich Impfstatus und Infektionsstadium möglich 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ von Impfstatus und Infektionsstadium möglich 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ und nicht mit automatisierter Software ▪ teilweise nicht validiert ▪ nicht standardisiert ▪ technisch aufwendig
<p>C₆-Schnelltest (SNAP 4Dx, Idexx) (Serum, Plasma, Vollblut)</p>	<p>synthetisches C₆-Peptid äquivalent zu IR6-Region von <i>Bbsl</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ qualitatives Ergebnis in Form von Farbumschlag ▪ visuelle Interpretation ▪ positives Ergebnis zeigt natürliche Infektion an, nicht Impfung 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ günstig, praktisch, zeitsparend ▪ zuverlässig und gute Übereinstimmung mit Immunoblot und Multiplex Assay ▪ Impfung beeinflusst Ergebnis eher nicht 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ subjektive Interpretation ▪ nicht-quantitative Befunde (in Pferden)
<p>Equine Multiplex Assay (Serum, Liquor)</p>	<p>rekombinante <i>Bbsl</i>-AG (OspA, OspC, OspF)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ quantitatives Ergebnis in Form von MFI (mediane Fluoreszenzintensität) ▪ Anti-OspA-AK: Impfung bzw. Impfung u./o. Infektion ▪ Anti-OspC-AK: frühe Infektion ▪ Anti-OspF-AK: chronische Infektion 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ sehr sensitiv, geringe AK-Titer messbar ▪ quantitativ: potenziell Aussage über Infektionsstadium und Impfstatus möglich, ansteigender AK-Titer kann indikativ für eine aktive Infektion sein 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ falsch-negative Befunde aufgrund genetischer Variabilität von OspC möglich ▪ fehlende experimentelle Studienlage zu AK-Kinetik bei eLB

2.1. Methoden zum Direktnachweis von Borrelien

Direktnachweisverfahren wie die Mikroskopie (Dunkelfeld-, Phasenkontrastmikroskopie) und die Erregerkultivierung in BSK-II Medium (modifiziertes Barbour-Stoener-Kelly-Medium), welche früher den Goldstandard der LB-Diagnostik darstellten, finden heute nur noch selten Anwendung (BURGDORFER, 1984; BARBOUR, 1988). Ein direkter Nachweis von lebenden Borrelien in infizierten Geweben und Körperflüssigkeiten ist zwar eine sehr spezifische Nachweismethode,

jedoch keine sehr sensitive, denn die Anzahl der Borrelien ist dort meist nur sehr gering und liegt unter der Nachweisgrenze ($< 10^4 - 10^5$ Borrelien/ ml). Eine Erregeranzucht vorab ist möglich, ist aber kosten- und arbeitsintensiv, sie kann bis zu sechs Wochen dauern und eine Differenzierung auf Speziesniveau ist nicht möglich (BARBOUR, 1988; MARQUES, 2015; BRANDA&STEERE, 2021). Die Kultivierung erfolgt bei 30-34 C unter mikroaerophilen Bedingungen, was über einen längeren Kultivierungszeitraum auch das Wachstum von Begleitkeimen begünstigt und zur Überwucherung der nachzuweisenden Borrelien in Kultur führen kann.

Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit des molekularbiologischen Direktnachweises von Erreger-DNA mittels PCR (engl. *polymerase chain reaction*) (STEERE et al., 1983; PRIEST et al., 2012; ESHOO et al., 2013). In der PCR kann genetisches Material sowohl von lebenden als auch toten Borrelien nachgewiesen werden. Obwohl diese sehr spezifische *in-vitro*-Methode sensitiver ist als andere Direktnachweismethoden, besteht hier ebenso die Hürde einer zu geringen Erregermenge im Probenmaterial, was zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann (NIELSEN et al., 1990; STRAUBINGER, 2000; LEBECH, 2002). Daher ist diese Methode allein nicht aussagekräftig. Ferner wurde die PCR bisher als klinisch-diagnostisches Verfahren weder unter standardisierten Studienbedingungen validiert, noch aus verschiedenen Probenmaterialien standardisiert, d.h. die verschiedenen Laborprotokolle der durchführenden Diagnostiklabore variieren und sind nicht vergleichbar (FINGERLE et al., 2017).

2.2. Indirekte Nachweismethoden

2.2.1. Zweistufentest

Zum indirekten Nachweis einer aktiven oder vergangenen *Bbsl*-Infektion stehen zahlreiche Verfahren und Einzeltests zur Verfügung, jedoch gibt es keinen optimalen Einzeltest für die serologische LB-Diagnostik. Daher wird empfohlen, verschiedene Verfahren neuester Generation in Form einer Stufendiagnostik zu kombinieren, um somit eine möglichst hohe diagnostische Effizienz zu erzielen (TREVEJO et al., 1999; BUTLER et al., 2005; FINGERLE&SING, 2020). Daher steht die Zweistufendiagnostik in der LB-Diagnostik im Vordergrund, in der Veterinärmedizin erfolgt die LB-Diagnostik fast ausschließlich auf diesem Wege. Der Zweistufentest setzt sich zusammen aus einem ersten hochsensitiven AK-Suchtest, üblicherweise in Form eines indirekten IFT/ IFAT (Immunofluoreszenztest/ Immunofluoreszenzantikörpertest) oder EIA/ ELISA (engl. *Enzyme immunoassay/ Enzym-linked immunosorbent assay*), und einem zweiten qualitativen AK-Bestätigungstest, wobei Immunoblots (z. B. WB (Westernblot), LIA (engl. *Line immunoassay*) verwendet werden (WILSKE et al., 2007; LEHMANN et al., 2017; DIVERS et al., 2018). Der zweite Test ist durchzuführen, falls der erste positiv ausfällt. Indirekte Nachweismethoden zielen darauf ab, eine Immunantwort auf Borrelien im Organismus

nachzuweisen, d.h. spezifische IgM und IgG zu detektieren, die gegen immunogene *Bbsl*-AG gerichtet sind.

Die Stufendiagnostik ist sehr sensitiv und hochspezifisch hinsichtlich der Detektion einer Immunreaktion auf *Bbsl*-AG. Allerdings besteht dennoch die Herausforderung, von einem positiven Nachweis spezifischer AK gegen *Bbsl*-AG abzuleiten, ob einerseits eine aktive oder vergangenen Exposition bzw. Infektion vorliegt, und andererseits, ob die *Bbsl*-Infektion tatsächlich auch der Grund für die beobachtete klinische Erkrankung des Pferdes ist (DIVERS, 2013).

Grundsätzlich ist die eLB primär eine klinische Verdachtsdiagnose. Nach erfolgter anamnestischer Befunderhebung und klinischer Differentialdiagnostik kann unterstützend dazu der Nachweis einer Borrelieninfektion auf labordiagnostischem Wege erfolgen. Weiterführende mikrobiologische und labormedizinische Untersuchungen sind allerdings nur als zusätzlicher diagnostischer Schritt zur Substantiierung einer klinisch gestellten LB-Verdachtsdiagnose indiziert – nach Abklärung einer möglichen Vektorexposition und antibiotischen Vorbehandlung, dem Impfstatus, sowie dem Ausschluss möglicher Differentialdiagnosen. Entsprechend sollte ein positiver Erregernachweis stets in Zusammenhang mit der Anamnese sowie persistierenden und spezifischen klinischen Anzeichen, die indikativ für eine LB sind, interpretiert werden (STRAUBINGER et al., 1997b; FINGERLE&SING, 2020). Denn ein direkter oder *in-situ*-Nachweis von *Bbsl* in Pferden ist sowohl in klinisch auffälligen als auch in subklinischen Pferden möglich (GERHARDS&WOLLANKE, 1996; MANION et al., 1998; CHANG et al., 2000; MANION et al., 2001). Ein positiver serologischer Test allein bestätigt also nur, dass eine Erregerexposition stattgefunden hat (MAGNARELLI&ANDERSON, 1989; VENNER&DEEGEN, 1996). Sind die klinischen Anzeichen eines erkrankten Pferdes jedoch mit der LB assoziiert, ist es erstrebenswert, die *Bbsl*-Infektion möglichst in einem frühen Infektionsstadium zu diagnostizieren, um den Erfolg der antibiotischen Behandlung zu steigern, und die Gewebeschädigung durch die Spirochäten möglichst gering zu halten.

2.2.1.1. IFAT/ IFT & ELISA/ EIA

Der als erste indirekte LB-Nachweismethode etablierte indirekte IFAT und der etwas später entwickelte ELISA sind zwei indirekte Nachweistechiken, die in der Tier- und Humanmedizin verwendet werden, um die Präsenz von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG im Serum des Patienten zu detektieren und zu quantifizieren (BURGDORFER et al., 1982; RUSSELL et al., 1984; BOSLER et al., 1988; MAGNARELLI&ANDERSON, 1988; MAGNARELLI et al., 1988; WILSKE, 1988; MAGNARELLI&ANDERSON, 1989). Dabei kann ein breites Spektrum an spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG nachgewiesen werden (RUSSELL et al., 1984; WILSKE et al., 2007). Der Nachweis von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG mit diesen Testverfahren ist ab einem Zeitpunkt von fünf bis sechs Wochen *post infectionem* möglich (CHANG et al., 2000).

Bei der ersten Generation dieser quantitativen Tests wurde das gesamte Borrelien-AG-Spektrum (ganze Zellen oder Borrelien-Ultrasonikate) verwendet, daher kam es zu hoher Kreuzreaktivität verursacht durch Oberflächen-AG anderer Infektionserreger im Blut der Patienten. Entsprechend wurden nicht nur *Bb*-spezifische AK nachgewiesen, sondern auch jene von kreuzreaktiven Determinanten von *Borrelia burgdorferi* (z. B. Rückfallfieber-Borrelien sowie spirochätale Erreger der Leptospirose (*Leptospira* sp.) und *Treponema pallidum* (Syphilis) (BURGDORFER et al., 1982; RUSSELL et al., 1984; MAGNARELLI et al., 1987; BRUCKBAUER et al., 1992; SHIN et al., 1993). Trotz eher entfernter Verwandtschaft zu *Bbsl* beinhalten die kreuzreaktiven Spirochäten dennoch gemeinsame, konservierte Proteineinheiten in ihren Oberflächen-AG, die zu Kreuzreaktivitäten in serologischen LB-Assays führen können und dadurch eine mangelhafte Spezifität begründen (MAGNARELLI et al., 2000a; BUNIKIS&BARBOUR, 2002; ESHOO et al., 2013). In diesem Kontext birgt ebenso die Heterogenität der verschiedenen *Bbsl*-Genospezies, die mit der LB assoziiert sind, eine Herausforderung in der serologischen Diagnostik (HAUSER et al., 1998a; FINGERLE&SING, 2020).

In aktuellen IFATs und ELISAs werden als Ziel-AG rekombinante AG (z. B. C₆-Peptid) sowie *Bbsl*-Vollerregerysate aus der *in-vitro*-Kultur oder aufgereinigte *Bbsl*-AG auf der Testmatrix verwendet und auf definierten Feldern fixiert (MAGNARELLI et al., 1988; GERHARDS&WOLLANKE, 1996; MAGNARELLI et al., 2000b; NEELY et al., 2021). Auch wenn seit Etablierung dieser AK-Suchtests die Sensitivität und Spezifität deutlich verbessert werden konnte, sind sie dennoch anfällig für Kreuzreaktionen und bergen das Potenzial für falsch-positive Ergebnisse (MAGNARELLI et al., 2000b; DZIERZECKA&KITA, 2002b). Und obwohl IFATs und ELISAs im Allgemeinen eine sehr hohe Sensitivität demonstrieren, insbesondere in späten LB-Stadien mit Serokonversion, ist diese Form der Diagnostik in der Frühphase der Infektion ungeeignet, da die Sensitivität dafür meist nicht ausreicht und mangelhafte Ergebnisse liefert (MAGNARELLI et al., 1984; BERARDI et al., 1988). Dies ist unter anderem durch die biologisch verzögerte immunologische Reaktion in den ersten Wochen nach der initialen Infektion begründet; während im frühen Stadium einer Infektion nur wenige immunologisch relevante AG durch das Immunsystem des Wirtes erkannt werden und eine frühe Immunantwort auslösen (v.a. IgM), expandiert die Immunantwort mit fortschreitender Infektion und der spezifische AK-Spiegel steigt an. Im Zuge der adaptiven Immunantwort wird im Spätstadium der *Bbsl*-Infektion ein breiteres AG-Spektrum erkannt, weshalb eine breitere und stärkere Immunreaktion (IgG) im Patienten zu beobachten ist. Dies spiegelt sich entsprechend in den AK-Detektionsraten und begründet ein oft negatives Testergebnis im Frühstadium der LB (BERARDI et al., 1988; WILSKE, 1988; MARQUES, 2015).

Darüber hinaus ermöglichen diese beiden nicht-automatisierten Testverfahren keine Unterscheidung zwischen einer aktiven und vergangenen *Bbsl*-Infektion, sowie impf- und

infektionsinduzierten AK (BUNIKIS&BARBOUR, 2002; GOMES-SOLECKI et al., 2002). Entsprechend kann keine Aussage zum Impfstatus oder dem Infektionsstadium getroffen werden. Jedoch kann ein gradueller AK-Anstieg über einen gewissen Zeitraum ein Indiz für eine *Bbsl*-Infektion sein, wenn keine Immunisierung stattgefunden hat. Gleichmaßen kann eine Impfung gegen LB einen Nachweis von infektionsinduzierten spezifischen AK verfälschen (AGUERO-ROSENFELD et al., 1999; DIVERS et al., 2018).

Beim IFAT unterscheidet man den direkten IFT zum Nachweis spezifischer intrazellulärer oder oberflächengebundener AG sowie den indirekten IFT für den spezifischen AK-Nachweis, welcher in der LB-Diagnostik Anwendung findet.

Das Prinzip des indirekten IFAT basiert darauf, dass spezifische AK (Primär-AK im Serum), die gegen den Erreger gerichtet sind, an Ziel-AG (Test-AG) auf einer Testmatrix jeweils an einer fixierten Position spezifisch binden (RUSSELL et al., 1984). Diese AG-AK-Komplexe werden dann durch Zugabe eines sekundären Test-AK (z. B. anti-Pferd-IgG), welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorchrom) markiert ist, erkannt und gebunden und anschließend sichtbar gemacht. Dabei werden die Fluorchrommoleküle zunächst energetisch angeregt, um in einem weiteren Schritt in den ursprünglichen Zustand zu wechseln, wobei sie Strahlung einer Wellenlänge im sichtbaren Bereich aussenden. Diese Strahlungsintensität kann fluoreszenzmikroskopisch gemessen werden. Dadurch kann ein Rückschluss auf die Menge der Serum-AK (IgG) gezogen werden, nicht aber auf deren Qualität (RUSSELL et al., 1984). Ein starkes Fluoreszenzsignal zeigt an, dass die Probe spezifische AK gegen den Erreger aufweist und dass im Patienten entsprechend eine spezifische Immunantwort auf die Test-AG vorhanden ist (SELBITZ, 2011).

Im ELISA wird ein vergleichbares Prinzip zur AK-Detektion gegen Borrelien-AG angewendet wie beim IFAT, jedoch wird hier, anstelle eines mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundär-AK, ein enzymgekoppelter Sekundär-AK verwendet (CRAFT et al., 1984; MAGNARELLI et al., 1984; MAGNARELLI&ANDERSON, 1988; MAGNARELLI&FIKRIG, 2005). Bei diesem hochsensitiven AK-Suchtest werden mit *Bbsl*-AG beschichtete Mikrotiterplatten eingesetzt. In der Probe vorhandene AK gegen *Bbsl* binden spezifisch an Ziel-AG auf der Platte, während unspezifische Bindungen durch wiederholte Waschvorgänge entfernt werden. Durch anschließende Zugabe eines passenden Substrates reagiert das Enzym und es entsteht ein Farbumschlag, dessen Intensität gemessen werden kann und Rückschluss auf die Anzahl der gebundenen AG-AK-Komplexe liefert, und somit auf die Anzahl der spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG in der Patientenprobe (CRAFT et al., 1984). Der ELISA hat sich als der am häufigsten verwendete AK-Suchtest in der human- und veterinärmedizinischen LB-Diagnostik etabliert. Unter anderem, weil dieser weniger aufwendig und einfacher ist als der IFAT, und keine entsprechend spezialisierte, kostenintensive Ausrüstung (Fluoreszenzmikroskop) benötigt. Außerdem ist der ELISA im Vergleich zum IFAT zwar weniger spezifisch, jedoch stärker standardisiert und liefert daher

zuverlässigere und reproduzierbarere Ergebnisse (MAGNARELLI&ANDERSON, 1988; DZIERZECKA&KITA, 2002b; MAGNARELLI&FIKRIG, 2005; NEELY et al., 2021).

Um die Spezifität zu steigern und falsch-positiven Ergebnissen entgegenzuwirken, wird ein zweiter Stufentest in Form eines Immunoblots (WB oder LIA) angeschlossen, um das positive oder grenzwertig positive Ergebnis des ersten Tests zu bestätigen (DZIERZECKA&KITA, 2002a). Der Bestätigungstest ermöglicht einen semiquantitativen und qualitativen Nachweis von spezifischen Proteinen bzw. AK gegen *Bbsl*-AG in der Patientenprobe, wobei die humorale Immunantwort genauer differenziert werden kann (JOHNSON et al., 1996; HAUSER et al., 1997; WILSKE et al., 2000; DZIERZECKA&KITA, 2002a).

2.2.1.2. Immunoblots: Westernblot & LIA

Immunoblots weisen ein breites Nachweisspektrum an spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG auf, sind hochspezifisch, und ermöglichen potenziell eine Unterscheidung von Impf-AK und durch Infektion induzierte AK (MAGNARELLI et al., 1984; GAUTHIER&MANSFIELD, 1999; BARTH et al., 2014). Geeignete Ziel-AG für Immunoblots stellen u. a. das DbpA (p18), OspC (p23), OspA (p30), BmpA (p39), p66, p83, Flagellin und VlsE dar (DRESSLER et al., 1993; ZÖLLER et al., 1993; ENGSTROM et al., 1995). Immunoblots haben sich nur kurze Zeit nach dem IFAT und ELISA etabliert und zeigten anfänglich gleichermaßen Defizite in Sensitivität und Spezifität (WILSKE et al., 1993; HAUSER et al., 1998b; WILSKE et al., 1999; DZIERZECKA&KITA, 2002a). Trotz bekannter Fallstricke wurden Immunoblots weiterhin in der Labordiagnostik der LB angewendet, jedoch adressierte man die Schwachpunkte der Tests in folgenden Testgenerationen sukzessive, indem man zunächst aufgereinigte oder angereicherte *Bb*-AG verwendete (z. B. gereinigte Flagellen als AG) und schlussendlich rekombinante Proteine in den Tests einsetzte, die immundominante spezifische AG-Determinanten trugen (FIKRIG et al., 1992b; WILSKE et al., 1994; HAUSER&WILSKE, 1997; GOMES-SOLECKI et al., 2002; MAGNARELLI&FIKRIG, 2005). Dadurch konnte man eine Selektion spezifischer AG erreichen (z. B. infektiions- und impfspezifische Detektions-AG (z. B. VlsE, C₆-Peptid und OspA)) sowie eine Kombination aus homologen AG verschiedener relevanter *Bbsl*-Stämme), was potenziell eine Unterscheidung von geimpften und infizierten Tieren ermöglicht und die Spezifität der Tests deutlich verbesserte. Zudem ermöglicht der Einsatz von rekombinanten Ziel-AG eine erleichterte Standardisierung und Reproduzierbarkeit von Testergebnissen (WILSKE et al., 1993; HAUSER&WILSKE, 1997; HAUSER et al., 1998b; WILSKE et al., 1999; SCHULTE-SPECHTEL et al., 2004; GOETTNER et al., 2005; BARTH et al., 2014).

Mittlerweile gibt es zahlreiche kommerziell verfügbare Immunoblots zur Messung der Reaktivität der *Bbsl*-spezifischen AK im Blut des Patienten, auch speziell für equine Patienten. Die Sensitivität und Spezifität dieser Tests ist jedoch unterschiedlich, nicht alle sind ausreichend evaluiert und

validiert worden, und es gibt für die LB-Diagnostik nach wie vor keine standardisierten serologischen Assays mit einheitlichen Interpretationskriterien, was die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen oft schwierig macht (WILSKE, 2003; KRUPKA&STRAUBINGER, 2010; DOFF et al., 2022).

Im WB erfolgt im ersten Schritt eine Auftrennung von Proteinen bzw. Ziel-AG (*Bbsl*-AG) mittels SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach ihrer Größe und Ladung (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005). Dabei wandern kleinere Moleküle schneller durch das Gel als größere. Im Anschluss werden die aufgetrennten Proteine auf eine feste Trägermembran (z. B. Nitrozellulosemembran) übertragen und fixiert (engl. *blotting*). Dann wird die Serumprobe des Patienten aufgetragen. Befinden sich AK gegen *Bbsl*-AG in der Probe, binden diese spezifisch und es entstehen AG-AK-Komplexe. Nach einem Waschvorgang werden speziesspezifische, Enzymgekoppelte (z. B. Peroxidase, Alkalische Phosphatase) Sekundär-AK aufgetragen, welche die AG-AK-Komplexe erkennen und binden. Durch Substratzugabe findet eine Enzymreaktion statt, wodurch die AG-AK-Komplexe sichtbar gemacht werden können (HULINSKA, 1997). Die Intensität der Lichtemission bzw. des Farbumschlages ist analog zur Anzahl der vorhandenen AK im Serum. Als Resultat entsteht ein Bandenmuster, welches anhand eines Größenmarkers interpretiert werden kann. Somit können spezifische Banden den jeweiligen Borrelien-AG zugeordnet werden und einen Rückschluss auf vorhandene, spezifische AK geben (DRESSLER et al., 1993; ZÖLLER et al., 1993; ENGSTROM et al., 1995).

Der semiquantitative LIA stellt eine Weiterentwicklung des WB dar, wobei die Sensitivität und Spezifität deutlich gesteigert werden konnte (BARTH et al., 2014). Im LIA erfolgt die Beschichtung der Testmatrix (Nitrozellulose-Trägermembran) durch Aufsprühen von Erreger-AG mittels spezieller Verfahren. Die Trägermembran wird dann in einzelne Teststreifen geschnitten. Die Testdurchführung erfolgt analog zum WB. Wie beim WB binden die in der Serumprobe des Patienten vorhandenen AK gegen *Bbsl*-AG spezifisch an die Ziel-AG auf der Testmatrix, unspezifische Bindungen werden im Waschschritt ausgewaschen. Durch Zugabe von speziesspezifischen, enzymmarkierten Sekundär-AK (z. B. Anti-Pferd AK) werden die AG-AK-Komplexe gebunden und sichtbar gemacht (HULINSKA, 1997). Im LIA kann die Immunreaktion für jedes einzelne getestete AG separat beurteilt werden. Ebenso können verschiedene Proteine, die ein gleiches Molekulargewicht aufweisen, simultan getestet werden (WILSKE et al., 2007). Durch den Einsatz rekombinanter Proteine können im LIA unter anderem auch AG unterschiedlicher Borrelienspezies simultan analysiert werden, sowie AG, die nur von Borrelien *in vivo* exprimiert werden (z. B. VlsE), was die Sensitivität und Spezifität deutlich erhöht (GOETTNER et al., 2005). Im Allgemeinen weisen Immunoblots mit rekombinanten Ziel-AG eine höhere Sensitivität auf als jene, bei welchen Ganzzelllysate verwendet werden (WILSKE et al., 1993;

MAGNARELLI&FIKRIG, 2005). Nachteilig an LIAs ist, dass die Beurteilung der Testergebnisse bisher noch überwiegend visuell durch die den Test durchführende Person erfolgt, das heißt, die Farbintensität der Banden auf einem Teststreifen erfolgt subjektiv, was eine gewisse Fehleranfälligkeit mit sich bringt. Diese Vorgehensweise wird jedoch zunehmend durch eine automatisierte, computergestützte Beurteilung und Ergebnisinterpretation abgelöst (z. B. MegaLINE® BORRELIA IgG mit MegaLine® Software, Megacor Diagnostik (Austria)), was die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich verbessert.

Für den labordiagnostischen Nachweis von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG im Pferdeserum stehen in Deutschland derzeit zwei speziesspezifische, nicht-standardisierte und für equine Seren nicht-validierte LIAs zur Verfügung (VIROTECH® Borrelia Vet. + OspA IgG LINE Immunoblot (Germany) und MEGACOR MegaLINE® BORRELIA IgG *ad.us.vet.* LINE Immunoassay (Austria)), ein dritter kommerziell erhältlicher LIA (EUROIMMUN Anti-Borrelia-EUROLINE horse (IgG) (Germany)) wurde aufgrund zu geringer Nachfrage kürzlich vom Markt genommen.

In Hinblick auf die Interpretationskriterien zur Auswertung der Bandenmuster unterscheiden sich die drei Tests teilweise gravierend. Während das Ergebnisinterpretationsprotokoll des VIROTECH®-LIAs keinerlei Unterscheidung zwischen geimpften und ungeimpften Pferden anhand von OspA vornimmt (obwohl der Test technisch in der Lage ist, OspA-AK zu detektieren), enthält das Evaluierungsprotokoll der beiden anderen Tests einen entsprechenden Interpretationshinweis, dass ein Nachweis von spezifischen AK gegen OspA-AG (und eine entsprechende Bande im LIA (Abb. 7)) als Indikator für eine Impfung in Betracht zu ziehen und entsprechend zu bewerten ist.

In einer vergleichenden LB-Studie mit Hunde- und Pferdeseren mit bekanntem Serostatus wurde von Doff et al. eine Evaluierung von zwei derzeit für die *Bbsl*-Serodiagnostik erhältlichen LIAs durchgeführt, wobei man zu der Erkenntnis kam, dass mit den beiden getesteten LIAs für Hundeseren einheitliche Ergebnisse erzielt werden können (Übereinstimmungsrate der Testergebnisse: 94,0%). Für die Serodiagnostik von *Bbsl* in Pferdeseren hingegen war die Übereinstimmung der Testergebnisse der beiden evaluierten LIAs signifikant schlechter (Übereinstimmungsrate der Testergebnisse: 65,5%) (DOFF et al., 2022). Kritikpunkte waren dabei u. a. Unterschiede in der Interpretation von AG-Signalen, die Verwendung von unspezifischen Ziel-AG (z. B. p100/ p83), eine visuelle und damit subjektive Interpretation von Testergebnissen sowie eine zu hohe Sensitivität einzelner Ziel-AG, was zu einer Fehlinterpretation und falsch-positiven Ergebnissen im LIA führen kann.

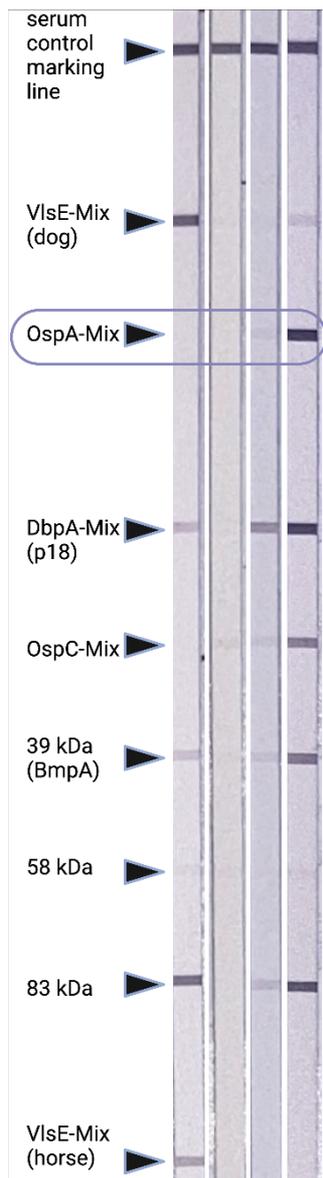


Abbildung 7: LIA-Teststreifen für die serologische LB-Diagnostik bei Pferden – nach Testdurchführung. Betrachtung der impfspezifischen OspA-Bande.

In den beiden oberen Streifen ist eine leichte bzw. starke OspA-Bande („positiv“, da stärker als die Referenzbande) sichtbar sowie weitere Banden, exklusive der Pferd-spezifischen (*horse*) VlsE-Bande; diese beiden Bandenmuster sprechen für eine erfolgte Immunisierung der getesteten Pferde, und nicht für eine aktive *Bbsl*-Infektion. Der unterste Teststreifen hingegen weist keine OspA-Bande auf, jedoch eine deutliche, positive VlsE-Bande sowie weitere positive Banden; dieses Bandenmuster spricht für eine aktive *Bbsl*-Infektion des getesteten Pferdes.

2.2.2. C₆-Peptid ELISA Schnelltest (SNAP® 4Dx Plus®)

Neben dem klassischen ELISA gibt es den kommerziell erhältlichen, modifizierten C₆ ELISA-Schnelltest (SNAP® 4Dx Plus; IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA), der sich sehr gut für den Praxisalltag eignet, da er sich leicht und zügig vor Ort durchführen lässt, sehr sensitiv und hochspezifisch ist sowie reproduzierbare Ergebnisse liefert (CHANDRASHEKAR et al., 2008; JOHNSON et al., 2008; HANSEN et al., 2010).

Dieser validierte Schnelltest detektiert spezifische AK gegen das synthetische C₆-Testpeptid, welches der hochkonservierten, invariablen Oberflächenproteineinheit IR6 (engl. *invariant region 6*) des antigenetisch variablen VlsE-AG von *Bbsl* gleichkommt (LIANG et al., 1999). Der Nachweis von AK gegen das infektionsspezifische VlsE-AG bzw. C₆-Peptid ist ein Indiz für eine aktuelle oder wiederkehrende *Bbsl*-Exposition und -infektion (LIANG et al., 2000a; PHILIPP et al., 2001;

WAGNER et al., 2013). C₆-basierte Tests lassen außerdem eine Unterscheidung zwischen auf natürliche Weise *Bbsl*-exponierten und gegen LB geimpften Tieren zu, da es zu keinen Kreuzreaktionen mit impfinduzierten OspA-AK kommt (MARQUES et al., 2002).

2.2.3. Equine Lyme Multiplex Assay

Daneben gibt es als neuere Methode qualitative Lyme Multiplex Assays für die Diagnostik der eLB, welche vom Animal Health Diagnostic Center der Cornell University (Ithaca, New York, USA) entwickelt wurde. Dieses Verfahren kombiniert die Vorteile von Immunoblot und ELISA und verspricht dadurch eine bessere analytische und diagnostische Sensitivität (WAGNER et al., 2011; WAGNER et al., 2013). Mit dieser Testmethode soll ein Nachweis von bereits geringen Mengen spezifischer AK gegen die drei *Bbsl*-spezifischen AG OspA, OspC und OspF ab einem Zeitpunkt von drei bis fünf Wochen *post infectionem* möglich sein. Der Test basiert auf der Verwendung von rekombinanten *Bbsl*-Proteinen, welche an fluoreszierende Kügelchen (engl. *Multiplex beads*) gebunden sind und von spezifischen AK gegen die drei *Bbsl*-AG im Serum des Patienten gebunden werden (Abb. 8). Durch Zugabe eines fluoreszierenden AK-Konjugats (Biotin-konjugierte Anti-Pferd AK mit gebundenen Streptavidin-Phycoerythrin-Molekülen) können AG-AK-Komplexe im Anschluss spezifisch gebunden und sichtbar gemacht werden. Die dabei entstehenden Signalintensitäten können mittels Multiplex-Lesegerät quantifiziert werden. Der Test liefert somit eine numerische AK-Angabe für jedes getestete AG in Form eines MFI (Mediane Fluoreszenzintensität) (WAGNER et al., 2011).

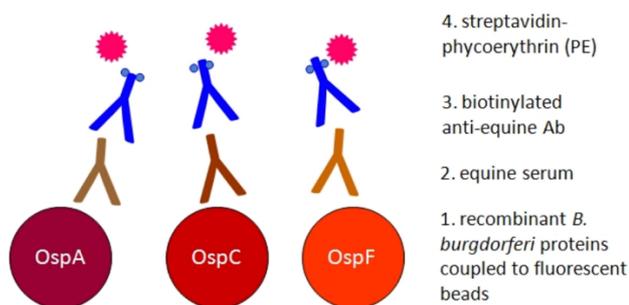


Abbildung 8: Funktionsweise des Equine Lyme Multiplex Assays für die serologische LB-Diagnostik bei Pferden (WAGNER et al., 2011; WAGNER et al., 2012; WAGNER et al., 2013).

Ein Vorteil des Lyme Multiplex Assays ist, dass eine simultane Messung von spezifischen AK gegen drei spezifische *Bbsl*-AG möglich ist, welche Information zum Infektions- und Impfstatus des getesteten Pferdes liefern können und es erfolgt eine Quantifizierung der vorhandenen AK.

Dabei ist OspA als Impfmarker zu interpretieren, OspC als Indikator für eine frühe Infektion und OspF wird von den Autoren bzw. Entwicklern des Tests als Indikator für eine chronische *Bbsl*-Infektion bewertet (WAGNER et al., 2012; WAGNER et al., 2013). Durch die Verwendung von nur wenigen und ausschließlich rekombinanten AG wird die Anfälligkeit für Kreuzreaktivität geringgehalten, allerdings kann es dadurch zu falsch-negativen Befunden aufgrund der genetischen Variabilität von OspC kommen (WAGNER et al., 2011). Vorhandene Serum-AK können relativ früh nachgewiesen werden (drei bis fünf Wochen *post infectionem versus* fünf bis sechs Wochen *post infectionem* mittels ELISA und WB) (CHANG et al., 2000).

2.3. Aktuelle Herausforderungen der LB-Diagnostik

2.3.1. Impfantikörper gegen *Bbsl* in der serologischen Diagnostik

2.3.1.1. Impfung als Prophylaxe gegen die *Bbsl*-Infektion

Die Oberfläche von *Bbsl* ist die Schnittstelle zwischen Pathogen und Wirt während einer Infektion, daher werden die Oberflächenmembranproteine des Erregers als wichtige Virulenzfaktoren bei der *Bbsl*-Infektion angesehen. Das Vorhandensein spezifischen AK im Wirt, die sich gegen die Oberflächen-AG der LB-Borrelien richten, können einen effektiven Schutz vor einer Infektion mit *Bbsl* bieten (SCHAIBLE et al., 1990; FIKRIG et al., 1991; SIGAL et al., 1998; STEERE et al., 1998; CHANG et al., 1999; TÖPFER&STRAUBINGER, 2007; KNODLSEDER et al., 2019; WILCZEK et al., 2022). Der erste und bislang einzige Impfstoff gegen die Lyme-Borreliose beim Menschen war der 1998 für Erwachsene freigegebene Impfstoff LYMERix® (Anonymous, 1999). Dieser wurde jedoch nur vier Jahre später aufgrund einer angeblich limitierten Akzeptanz der Impfung in der Bevölkerung und einer zu geringen Nachfrage wieder vom Markt genommen. Grundlegend hierfür sollen u. a. eine eingeschränkte Effizienz der Impfung, zu hohe Kosten, die Notwendigkeit, die Impfung regelmäßig aufzufrischen, sowie die Angst vor Begleiterscheinungen der Impfung gewesen sein. Seither ist keine LB-Impfung für den humanen Gebrauch verfügbar, jedoch wird rege an neuen Ansätzen geforscht. Für Pferde gibt es seit 2015 den Lysat-Impfstoff Equilyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH), der bei entsprechender, wiederholter Anwendung einen Schutz gegen *Bbss*, *B.garinii* und *B.afzelii* verspricht (CHANG et al., 1999; KNODLSEDER et al., 2019; STIKOVET et al., 2023). Die Marktzulassung wurde jedoch kürzlich vom Zulassungsinhaber zurückgezogen. Eine identische Zusammensetzung wie der Pferdeimpfstoff Equilyme® hat der für Hunde zugelassene und verfügbare Impfstoff Merylym3® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH). Dabei besteht die Möglichkeit der Umwidmung des Arzneimittels auf die Tierart Pferd (nach EU Verordnung 06/2019, Artikel 10 (TAM-Verordnung)) (STIKOVET et al., 2023). Neben Merylym3® sind in Deutschland auch die LB-Impfstoffe

Virbagen® canis B (Virbac Tierarzneimittel GmbH) und RIVAC® Borrelia (Ecuphar NV) für Hunde zugelassen (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2025). Die Impfung gegen LB wird von der Ständigen Impfkommision Veterinärmedizin (StIKo Vet) für Hunde mit erhöhter Zeckenexposition empfohlen (STIKOVET et al., 2023).

2.3.1.2. Wirkungsweise & Schutzmechanismus der LB-Vakzine

Das Ziel der Immunisierung ist eine Induktion von protektiven, spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG, insbesondere gegen das Oberflächenprotein A (OspA, engl. *Outer surface protein A*), die im Rahmen der Immunisierung verabreicht werden (SCHAIBLE et al., 1990; FIKRIG et al., 1991; DE SILVA et al., 1996). Die Impfstoff-AG bestehen entweder aus einem Lysat inaktivierter Vollerreger (z. B. Merylym3® oder Equilyme®) oder aus rekombinanten OspA-AG (z. B. der in USA vermarktete Recombitek Lyme Impfstoff) (CONLON et al., 2000).

Die Auswahl der in Inaktivatimpfstoffen enthaltenen AG-Aufbereitungen orientiert sich an den regional prävalenten LB-Borrelienspezies (entweder von *Bbss* oder ein Gemisch aus mehreren Borrelienspezies (z. B. *Bbss*, *B.afzelii* und *B.garinii*)), denn spezifische Vakzine gegen LB bieten keinen Schutz gegen heterologe Borrelienspezies und können daher nicht pauschalisiert weltweit eingesetzt werden (WILSKE et al., 1996; GERN et al., 1997; TÖPFER&STRAUBINGER, 2007; CHOMEL, 2015).

Das für den Impfschutz relevante OspA ist ein immunogenes Oberflächenlipoprotein, das von *Bbsl* in großer Menge im Vektor zum Zeitpunkt der Aufnahme in den Mitteldarm der nüchternen Zecke exprimiert wird (SCHWAN et al., 1995; PAL et al., 2000; PAL&FIKRIG, 2003; KENEDY et al., 2012; CAIMANO et al., 2019; KUROKAWA et al., 2020). Dort bindet OspA an den Rezeptor TROSPA (engl. *Tick receptor for OspA*), welcher im Mitteldarm während der Blutmahlzeit ebenfalls verstärkt exprimiert wird (PAL et al., 2004a). Dadurch wird *Bbsl* eine Adhäsion an die luminal Oberfläche von Mitteldarmepithelzellen und ein Verweilen bis zur nächsten Blutmahlzeit ermöglicht (YANG et al., 2004). Die Autoren Yang et al. konnten anhand von infektiösen, OspA-mutanten *Bb*-Isolaten zeigen, dass OspA essenziell für eine Kolonisierung und Persistenz der Erreger im Mitteldarm einer Zecke ist, aber nicht für eine *Bbsl*-Übertragung auf den Wirt und dessen Infektion (PAL et al., 2000; SCHWAN&PIESMAN, 2000; YANG et al., 2004; STROTHER et al., 2007). Nach aktuellem Stand der Wissenschaft werden OspA-AG während der Übertragung auf den Säuger nicht oder nur noch in so geringer Menge auf der Borrelien-Oberfläche exprimiert, dass die Produktion nicht ausreicht, um eine Serokonversion beim Wirt hinsichtlich OspA zu induzieren (ZHONG et al., 1997; WOODMAN et al., 2008).

In experimentellen Versuchen am murinen LB-Modell konnte gezeigt werden, dass impfinduzierte spezifische OspA-AK die Mäuse vor einer Infektion mit *Bbsl* schützen (SCHAIBLE et al., 1990;

FIKRIG et al., 1991; TSAO et al., 2001). Chang et *al.* konnte nachweisen, dass eine Impfung mit einem rekombinanten OspA (rOspA) Vakzin ebenso Ponys vor einer *Bbsl*-Infektion und klinischen LB-Erkrankung schützt, indem die Infektion direkt nach Exposition mit infizierten Zecken blockiert wird (CHANG et al., 2000). Auch in Hunden konnte dieser Beweis erbracht werden, weshalb sich OspA als Haupt-AG in LB-Vakzinen sehr gut eignet und Anwendung findet (CHANG et al., 1995; CHANG et al., 1999; CONLON et al., 2000; TÖPFER&STRAUBINGER, 2007; KNODLSEDER et al., 2019; WILCZEK et al., 2022).

Durch die Applikation von rekombinantem OspA, oder inaktivierten nicht-infektiösen Borrelien, die OspA auf ihrer Oberfläche tragen, wird die Bildung von spezifischen, protektiven AK gegen das OspA-AG im Säuger induziert. Diese AK werden durch Zecken während der Blutmahlzeit am immunisierten Wirt aufgenommen und gelangen in den Mitteldarm der Zecke, wo sie direkt an OspA binden, welches sich auf der Oberfläche der dort lokalisierten Borrelien befindet. Dadurch werden die Spirochäten direkt in der Zecke immobilisiert und unschädlich gemacht, und es wird somit eine Übertragung in den Wirt verhindert (FIKRIG et al., 1992c; PAL et al., 2001; GIPSON&DE SILVA, 2005).

Ein Impfstoff, welcher auf dem Wirkprinzip von OspA basiert, eignet sich zur Vorbeugung einer Infektion, nicht aber als Therapie bei einer bereits erfolgten *Bbsl*-Infektion (ZHONG et al., 1997). Ebenso ist der potenziell schützende Effekt einer LB-Impfung nur nach erfolgreicher Grundimmunisierung und regelmäßiger Auffrischung des Impfschutzes zu erwarten, wobei die AK-Bildung erneut stimuliert wird (KNODLSEDER et al., 2019; WILCZEK et al., 2022). Ein hoher AK-Titer korreliert positiv mit dem Schutz vor einer *Bbsl*-Infektion, wird jedoch keine regelmäßige Auffrischung des Impfschutzes durchgeführt, werden die OspA-AK mit der Zeit langsam abgebaut und die Protektivität verfällt (GOLDE et al., 1997; CHANG et al., 1999).

In einer Impfstudie mit Pferden von Knödlseeder et *al.* wurde gezeigt, dass eine Grundimmunisierung (GI) bestehend aus zwei Impfungen im Abstand von zwei Wochen sowie zwei Auffrischungsimpfungen (AI) nach sechs und zwölf Monaten einen besseren Impfschutz bieten, als wenn nur eine AI nach zwölf Monaten nach GI verabreicht wird (KNODLSEDER et al., 2019). Denn nach fünf Monaten nach GI fallen impfinduzierte protektive AK bereits deutlich ab, eine AI zu diesem Zeitpunkt kann den AK-Titer hingegen signifikant erhöhen und die protektive Immunantwort somit deutlich verbessern (Abb. 9). Selbes konnte in humanmedizinischen Impfstudien und einer Impfstudie mit Hunden demonstriert werden (SIGAL et al., 1998; WRESSNIGG et al., 2014; WILCZEK et al., 2022). Für Pferde, die sich im Freiland in Endemiegebieten mit besonders hohem Infektionsdruck aufhalten, wird empfohlen, die LB-Impfung nach Grundimmunisierung plus zwei Auffrischungsimpfungen (sechs und zwölf Monate nach Grundimmunisierung) jährlich zu wiederholen, optimalerweise im Frühjahr, vor Beginn der Zeckensaison (KNODLSEDER et al., 2019; STIKOVET et al., 2023).

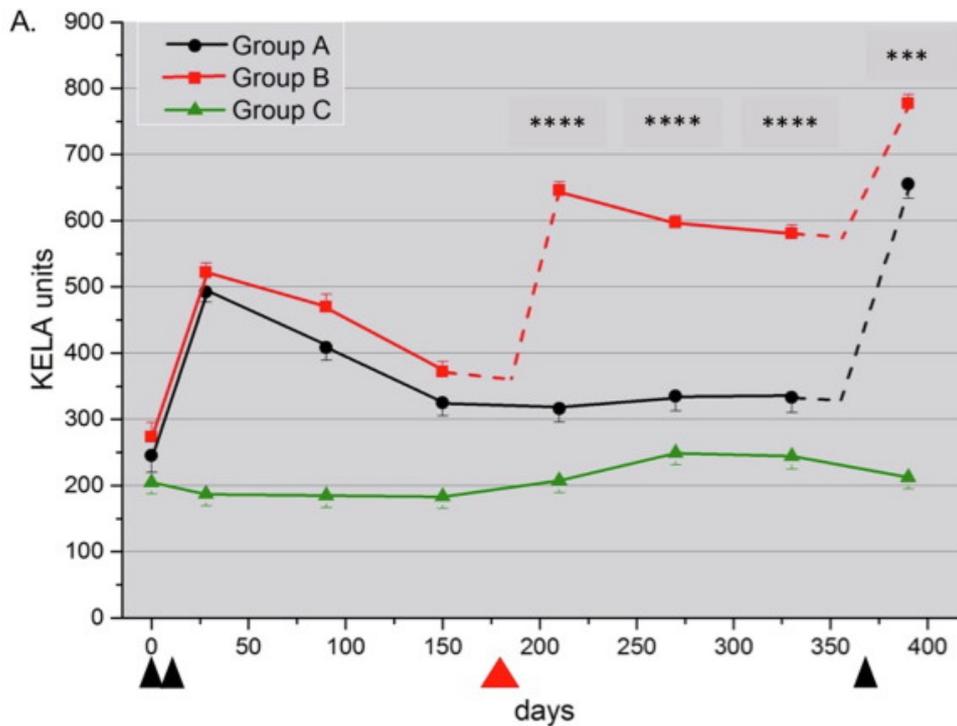


Abbildung 9: Serologische eLB-Impfstudie mit Pferden: Verlauf der impfinduzierten, spezifischen AK-Spiegel gegen *Bbsl*-AG in drei Studiengruppen (A, B und C) während eines Studienzeitraumes von 13 Monaten.

Pferde der Studiengruppe A (schwarz) wurden während des Studienzeitraumes von 13 Monaten an Tag 0, 14 und 365 ± 3 gegen LB geimpft (\blacktriangle), Pferde der Studiengruppe B (rot) wurden gleichermaßen geimpft wie Studiengruppe A, erhielten jedoch eine zusätzliche AI an Tag 180 (\blacktriangle). Studiengruppe C (grün) fungierte als Negativkontrollgruppe und wurde nicht geimpft. Zur Beurteilung des Impferfolges fanden Blutprobenentnahmen in zweimonatigen Intervallen und deren serologische Untersuchung auf impfinduzierte, spezifische AK gegen *Bbsl*-AG mittels Zweistufentest (KELA und LIA) statt. Pferde der Studiengruppe A zeigten einen deutlichen Anstieg des protektiven AK-Titers (gemessen in KELA-Einheiten (engl. *units*)) nach GI sowie einen graduellen Abfall des Titers (beginnend nach 1 Monat nach GI) bis zur nächsten AI. Gleiches war für Gruppe B zu beobachten, die AI an Tag 180 induzierte jedoch einen erneuten, signifikanten Anstieg des protektiven AK-Titers und somit einen verbesserten Impfschutz bis zur nächsten AI. Bei der Kontrollgruppe war keine signifikante Veränderung des AK-Titers zu beobachten (KNODLSEDER et al., 2019).

LB, Lyme-Borreliose; GI, Grundimmunisierung; AI, Auffrischungsimpfung; AK, Antikörper; KELA, engl. *Kinetic Enzyme-linked immunosorbent assay*; LIA, engl. *Line immunoassay*.

2.3.1.3. Serologischer Nachweis von impfinduzierten spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG

Spezifische AK gegen *Bbsl*-AG im Serum von Patienten können sowohl durch einen natürlichen Erregerkontakt als auch durch eine LB-Impfung induziert werden. Entsprechend ist Vorsicht bei der Interpretation von serologischen Laborergebnissen geboten, wenn bekannt ist, dass dem Patienten in der Vergangenheit Lysatimpfstoffe zum Schutz vor einer *Bbsl*-Infektion verabreicht

wurden. Die Unterscheidung von Impf-AK und jenen AK, die durch eine natürliche *Bbsl*-Exposition induziert wurden, stellen in der veterinärmedizinischen Serodiagnostik nach wie vor eine Hürde dar und machen eine Ergebnisinterpretation oft schwierig, vor allem wenn der Impfstatus des Tieres nicht bekannt ist (CRAFT et al., 1984; GAUTHIER&MANSFIELD, 1999). Nach derzeitigem Wissenstand sind spezifische AK gegen OspA-AG im Serum von tierischen Patienten ein weitgehend zuverlässiges Indiz für eine erfolgte Immunisierung gegen *Bbsl*, da OspA-AG nicht oder nur in sehr geringem Maße von LB-Borrelien *in vivo* im Säugerwirt exprimiert werden, wobei die Menge nicht ausreichend ist, um eine Produktion von OspA-spezifischen AK im Wirt auszulösen (GERN et al., 1993; BRUNET et al., 1995; DE SILVA et al., 1996; HODZIC et al., 2003; LIANG et al., 2004a; WOODMAN et al., 2008). Entsprechend ist ein Nachweis von OspA-AK im Serum von Patienten fast ausschließlich einer erfolgten Immunisierung zuzuordnen und nicht einer natürlichen Exposition und Infektion (FIKRIG et al., 1998). Ein zuverlässiges Indiz für eine *Bbsl*-Infektion ist hingegen der Nachweis von spezifischen AK gegen VlsE-AG oder gegen C₆-AG (LIANG et al., 2004b; MARANGONI et al., 2008; KRUPKA et al., 2009; WAGNER et al., 2013). Das durch Rekombination antigenetisch variable Immunogen VlsE wird durch den Saugakt der Zecke reguliert, bei der Übertragung auf den Säugerwirt aktiviert, und nur von aktiven LB-Borrelien *in vivo* im Säugerwirt exprimiert (ZHANG et al., 1997a; LIANG et al., 2000b). Es dient der Immunevasion während einer aktiven oder persistierenden *Bbsl*-Infektion (ZHANG&NORRIS, 1998; CROTHER et al., 2004; BYKOWSKI et al., 2006; ROGOVSKYY et al., 2015; BANKHEAD, 2016; ZHANG et al., 2020). Dieser wichtige Virulenzfaktor kann bereits wenige Tage nach Infektion im Serum des Wirtes nachgewiesen werden (KENEDY et al., 2012).

2.3.2. Fehlende Standardisierung und Validierung von Diagnostikverfahren zum serologischen Nachweis von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG in equinen Seren

Es ist von großer Wichtigkeit, verfügbare serologische Nachweisverfahren zur Diagnose einer *Bbsl*-Infektion zu evaluieren und hinsichtlich der Sensitivität, Spezifität und den Ergebnisinterpretationskriterien mittels einem einheitlichen Interpretationsprotokoll zu standardisieren, um zuverlässige, reproduzierbare und aussagekräftige Ergebnisse in der serologischen *Bbsl*-Diagnostik zu erhalten. Dabei sollte eine Validierung anhand von Testgruppen mit sowohl ungeimpften als auch geimpften Pferden erfolgen und die Kriterien der Ergebnisinterpretation sollten entsprechend eine impfspezifische Immunantwort miteinbeziehen. Für die in dieser vergleichenden Studie eingesetzten, semiquantitativen LIAs zum Nachweis von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG blieb die erstrebenswerte Testvalidierung und -standardisierung hinsichtlich der Untersuchung von Pferdeseren bisher aus. Für die Untersuchung von Pferdeseren auf *Bbsl*-spezifische AK erfolgte bereits durch Doff et al. eine Evaluierung für zwei der drei in

Deutschland erhältlichen LIA-Test-Kits hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität, Labortauglichkeit und der Übereinstimmung der produzierten Ergebnisse der angewendeten Tests (65,5%). Jedoch wurde kein standardisiertes Ergebnisinterpretationsprotokoll für die *Bbsl*-Serodiagnostik mit equinen Seren mittels LIA zur Verfügung gestellt sowie keine detaillierten technischen Verbesserungshinweise für verfügbare LIAs gegeben. Daher werden in dieser vergleichenden Studie drei verschiedene LIAs für die *Bbsl*-Diagnostik in equinen Seren hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität einzelner Ziel-AG, sowie dem Gesamttestergebnis verglichen und evaluiert. Zudem wird ein einheitliches Interpretationsprotokoll vorgestellt, in welchem eine Unterscheidung von geimpften und ungeimpften Pferden, und eine entsprechende Interpretation der Bandenergebnisse im LIA, erfolgt.

III. PUBLIKATION

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

A comparative study evaluating three line immunoassays available for serodiagnosis of equine Lyme borreliosis: Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-specific antibodies in serum samples of vaccinated and non-vaccinated horses

Cornelia V. Broeckl, Stephanie Hiereth, Reinhard K. Straubinger^{1*}

Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Sciences, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Chair of Bacteriology and Mycology, Ludwig-Maximilians-Universität Munich, Oberschleißheim, Bavaria, Germany

* r.straubinger@lmu.de

OPEN ACCESS

Citation: Broeckl CV, Hiereth S, Straubinger RK (2024) A comparative study evaluating three line immunoassays available for serodiagnosis of equine Lyme borreliosis: Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-specific antibodies in serum samples of vaccinated and non-vaccinated horses. PLoS ONE 19(12): e0316170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316170>

Editor: Saswat Sourav Mohapatra, Berhampur University, INDIA

Received: August 9, 2024

Accepted: December 8, 2024

Published: December 23, 2024

Copyright: © 2024 Broeckl et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Diagnosis of equine Lyme borreliosis (LB), an infection caused by members of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex (*Bbsl*), is challenging due to the nonspecific clinical signs of the disease and due to the variety of non-standardized serological tests. Specific vaccine-induced antibodies against LB, providing an effective protection against the infection, complicate the issue further. The standard for the detection of specific antibodies against *Bbsl* is a two-tier test system based on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or indirect fluorescent antibody test (IFA) for antibody screening combined with a qualitative, highly specific immunoassay (e. g. line immunoassay (LIA)) for confirmation. In this study, three LIAs available for detection of antibodies in equine serum samples were evaluated and compared. A total of 393 serum samples of 131 horses with known serostatus were used. It included groups of non-vaccinated horses, immunized horses (vaccinations against LB on days 0 and 14), and horses that had received an initial immunization plus an additional booster on day 180. Sera were collected on days 0, 135 and 210 of the study. Results were compared considering the tests' sensitivity, specificity, diagnostic outcome, and the operability of each test. Agreements of the diagnostic results among the LIAs were calculated for overall test results and single antigen-antibody-complex signal results. They are presented as inter-rater agreement and statistic reliability, represented by the Fleiss' kappa coefficient. Agreement scores ranged from poor to moderate depending on group and time-point of blood sample collection. Depending on LIA used, deficiencies were observed in the form of non-sufficient sensitivity of antigen signals on the LIA strips (especially for outer surface protein A (OspA) or variable major protein like sequence expressed (VlsE)) or as an inappropriate test interpretation of the OspA signal. Operability of the three LIAs was equally user-friendly with minor variations. In two LIAs, test-evaluation was simplified by a supplied scanner and evaluation software. To improve functionality of available LIAs for equine serum

samples it is advisable to adjust sensitivity and specificity of single test antigen signals and establish appropriate evaluation protocols.

1. Introduction

Due to more favorable climate conditions the likely geographic range, the distribution and abundance of ticks of the *Ixodes* family, the vector of borreliae from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex (*Bbsl*), is increasing [1]. Especially rural areas with large natural and semi-natural greenspaces, a low field vegetation height and a high vertebrate host spectrum bear risk for an increased density of tick populations, particularly during summer months [2, 3].

Regarding tick-borne diseases (TBD) such as Lyme borreliosis (LB), or Lyme disease (LD), an increasing emergence and a shift in seasonality can be observed [4, 5]. Although there is sparse data available on the seroprevalence and clinical presentation of LB in horses in Europe, horses are potentially at extended risk of tick encounter, transmission and infection with TBD [6, 7].

Focusing on equine LB, the pathogenesis is not well elucidated, however, infection and clinical disease are two different entities. Seropositivity itself is not associated with clinical disease and, accordingly, a single positive serologic test is not enough for a confirmation of LB in horses.

Yet, a serum sample with *Bbsl*-specific antibodies might be evidence of a current or past exposure to borrelia antigens (AG). Documented clinical signs in horses are manifold, but generally unspecific, and include fever, stiffness, intermittent lameness, decreased performance, and behavioral changes due to encephalitis, uveitis, infectious arthritis, neurological disease or cutaneous pseudolymphoma [8–10]. The diagnosis of LB should only be confirmed if differential diagnoses have been eliminated and the criteria of tick exposure, the manifestation of clinical signs and the detection of the pathogen in the patient, or a specific antibody response, apply [11].

To prevent an infection with *Bbsl*, vaccines are available for horses, yet, to ensure a protective effect it is necessary and recommended to perform two initial immunizations within 2–3 weeks, a third immunization 6 month later, a fourth immunization one year after the first immunization, and then repeat the vaccination on an annual basis prior to the peak of tick activity [12, 13]. The lysate vaccines available contain inactivated borreliae antigens, including the outer surface protein A (OspA). Vaccination-induced immunoglobulins are taken up by the tick during its blood meal. In the tick's midgut, antibodies bind to the expressed OspA antigen on the borreliae. Antigen-antibody binding results in the immobilization of the spirochetes, inhibiting the spirochetes' migration to the tick's salivary glands and their injection into the host's skin [14, 15].

To confirm *Bbsl* infection and strengthen clinical diagnosis, it is essential to have operable and reliable serodiagnostic tests for the detection of antibodies (AB) specific for an ongoing infection with *Bbsl*. In this context, it is of great importance that tests allow the differentiation of vaccination-induced AB from those induced by past, natural exposure and active infection. Only horses with clinical signs consistent with LB and infection-specific antibodies against *Bbsl* need antibiotic treatment; while a false-negative serodiagnostic result may entail the omission of appropriate on-time treatment, a false-positive result may evoke unnecessary antibiotic treatments with detrimental effects on the horses' health (e.g. effects of drug intolerance, colitis, diarrhea, increased risk for additional infections) and the risk of antibiotic-resistance development in bystander bacteria [16]. However, diagnosis of LB in horses is challenging; recommended serological standard methods often fail at this challenge impeding clinical

decision-making and potentially leading to misdiagnosis and mistreatment of the herbivorous patient.

Today's method of choice are non-standardized indirect tests detecting *Bbsl*-specific AB in serum; it is a two-tier test system based on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or indirect fluorescent antibody test (IFA) for screening for reactive antibodies combined with a qualitative and highly specific immunoassay (e. g. line immunoassay (LIA)) for confirmation. Test strips of immunoblots are coated with antigens specific for member species of the *Bbsl* complex. Suitable and commonly used antigens for immunoblotting are decorine binding protein A (DbpA, p18), outer surface protein C (OspC), outer surface protein A (OspA, p30), *Borrelia* membrane protein A (BmpA, p39), protein 100 (p100, p83), protein 58 (p58), peptid C6 and variable major protein-like sequence expressed (VlsE). If specific AB are present in the sample, they bind to its specific AG on the test strip resulting in AG-AB immunocomplexes which are visualized by color reaction signals on the strip [17, 18]. Semi-quantitative LIAs are highly specific potentially allowing a differentiation between naturally infected and vaccinated animals. Due to the vaccination with LB lysate vaccines, animals develop a humoral OspA-specific IgG-response with antibody levels depending on the vaccination schedule and time of testing [12, 19]. Thus, reactions to OspA antigen is a consistent marker for immunization against LB [20]. Yet, although a reaction to OspA AG in LIA is considered as indicative for vaccination—also in equine serum samples—and most test kit manufacturers supply instruction manuals accordingly, informative LIA evaluation protocols for serum samples of vaccinated horses covering this state of knowledge have not officially been published to this date. Additionally, it needs to be considered that the use of lysate vaccines against LB in horses might result in the development of antibodies against diverse other borrelial outer surface proteins that are expressed by borreliae *in vitro* (i. e., OspC, DbpA, BmpA, p58, or p100). That is, the appearance of respective immunocomplex reaction signals on LIA strips in combination with a positive reaction to OspA AG commonly occur in vaccinated animals and need to be considered as vaccination-induced and not be counted as infection-specific signals. In contrast, VlsE and C6 AG signals are considered as highly specific markers for a *Bbsl*-infection since those are only expressed by viable borreliae *in vivo* [21–23].

In this project we compared and evaluated three LIAs available for detection of AB against *Bbsl* in equine serum samples with focus on their ability to differentiate antibody responses initiated by immunization and natural infection. A total of 393 serum samples of 131 clinically healthy horses with known serostatus were used. The sample-pool originated from a vaccination study and included groups of non-vaccinated horses, basic-immunized horses (vaccinations against LB on days 0 and 14), and horses that had received immunizations against LB plus an additional booster on day 180 [12]. Sera were collected on day 0 (prior to first vaccination), as well as on days 135 and 210 in the vaccination schedule since differences in diagnostic results (specific antibody levels) are expected between experimental groups at these time-points. Tests were compared regarding their sensitivity, specificity and diagnostic outcome, and were evaluated for handling, operability and evaluation procedure to identify individual benefits and deficiencies of a test. Moreover, with the aim to refine serodiagnostic accuracy, a recommended overall evaluation protocol (ROEP) for serodiagnosis of LB was established as an up-to-date reference protocol for the evaluation of equine serum samples when LIAs are used.

2. Material and methods

All procedures for this study were carried out in accordance with the guidelines approved by the Animal Welfare Committee of the Government of Upper Bavaria, Munich, Germany (Az.

55.2.1.54–2532.0-91-16) and the protocols adhered to the German “Tierschutzgesetz” (§ 8a Abs. 1 Nr. 3b TierSchG).

2.1. Serum samples

A total of 393 equine serum samples were analyzed for the presence of specific antibodies against *Bbsl* using LIAs produced by three different manufacturers (S2 Table). The sera were originated from a previous vaccination study with horses using the vaccine EquiLyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany [12]) and were stored at -80°C. All equine serum samples described in this study have been tested in advance for quantitative and qualitative antibody levels with in-house kinetic ELISA (KELA) and LIA and therefore had known serostatus [12].

The collection of sera consisted of samples collected from a total of 131 clinically healthy horses at three time-points in the vaccination schedule and included one group of non-vaccinated and two groups of vaccinated horses that underwent variant vaccination schedules (S1 Table). Horses in group Non-Vac ($n = 42$) received no vaccination and functioned as the negative control group. Horses assigned to group Vac-Basic ($n = 45$) were vaccinated following a basic vaccination schedule which included two vaccinations: on day 0 (first immunization) and day 14. Horses belonging to group Vac-Plus ($n = 44$) were vaccinated equally to study group Vac-Basic, yet, had received an extra booster on day 180. For this study we used sera collected from each participating horse on sampling time-point day 0 (d0), day 135 (d135) and day 210 (d210) in the vaccination period. We chose this specific selection of study groups and blood sampling time-points to demonstrate that, depending on the time-point of the latest performed vaccination, there may be significant differences in equine immune responses. This comprises a major pitfall in the serodiagnosis of equine LB, particularly with regard to differentiating vaccinated and naturally infected horses.

Additionally, a serum sample of a *Bbsl*-infected and LB-vaccinated horse with known, high seropositivity was included as positive control (RKS-B/9940-E) in every single test run.

For the serologic testing, the sera were thawed twice and either stored at +4°C for a maximum of five hours between two tests or refrozen right after usage.

2.2. Antibody detection in the serum samples

Serum samples were tested each with three different line immunoassays further named LIA A, LIA B and LIA C (S2 Table).

The LIA strips are coated with antigens specific for *Borrelia* species of the *Bbsl* complex. The detection of *Bbsl*-specific antibodies in equine serum with the supplied LIAs was carried out according to manufacturer’s instructions as described in the following section (and S1 Fig). Only test kits with one and the same LOT number per manufacturer were applied to test all samples in order to exclude the possibility that the use of different LOTs may have influence on test results. Samples were not tested according to the study groups but were processed randomly.

Depending on the technical instruction manual of the LIA applied, the evaluation of the LIA strips was conducted either visually by the examiner (i. e. LIA A) or automatically by a scanning and evaluation software (i. e. LIA B and LIA C).

Evaluation results written in small letters (i. e. “negative” (neg), “equivocal positive” (equivoc), “positive” (pos)) refer to a result of a single AG line (single color reaction signal result) on a test strip. Evaluation results written in capital letters (i. e. “NEGATIVE” (NEG), “EQUIVOCAL” (EQUIVOC), “POSITIVE” (POS), “VACCINATED” (VAC), “VACCINATED AND POSITIVE” (VAC+POS)) refer to the cumulative diagnostic outcome (overall test result) of an

entire test strip or serum sample. Yet, the expressions “false-positive” or “false-negative”, as used several times in this publication, refer to the misdiagnosed or misclassified, cumulative diagnostic outcome of a test.

2.2.1. LIA A. LIA A is a line immunoassay developed for semi-quantitative detection of IgG antibody response against antigens that are specific for *Borrelia* species of the *Bbsl* complex. It was designed for testing of equine and canine sera. To test equine serum samples, though, it is required to acquire both, the canine test kit plus the supplemental equine set, to have all necessary test components available. The serological testing was conducted according to manufacturer’s [instructions](#) with supplied nitrocellulose strips coated with *Bbsl*-specific antigens and provided reagents. Antigens present on the strips are listed in [Table 1](#). For every test kit one equine IgG cut off control (COC), a serum sample supplied as concentrate by the manufacturer, needs to be included in every single LIA run. COC were generally handled like every other serum sample but were always placed in the first reaction well of the incubation tray and, later, on a separate evaluation sheet. The COC was developed to function as coloration reference for the signal intensity of AG-AB immunocomplex reactions. During the evaluation process it is compared to signals on the test strips evoked by serum samples tested.

As instructed by the manufacturer’s manual, all chemical components utilized for antibody detection with LIA A were brought to room temperature before use.

Then, the washing and incubation buffer (WB) was prepared in a ratio of 1:10 by mixing concentrated buffer with a respective volume of distilled water (*Aqua destillata* (*Aq. dest.*)). For each serum sample to be tested one nitrocellulose test strip was placed in a reaction well of an 8-well incubation tray. Then, 1.5 ml of WB were pipetted into each well used and the incubation tray was swayed gently to fully moisten the test strips. This step was followed by the addition of test samples: in the first reaction well 100 µl of COC was added, in the second and further wells 15 µl of an equine serum sample were added to an assigned well and test strip. The incubation was performed at room temperature for 30 min on a rocking shaker.

Table 1. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto-specific antigens applied on nitrocellulose strips of three LIAs used.

Antigen	LIA A	LIA B	LIA C
VlsE	+	np	+
VlsE-Bb*	np	+	np
VlsE-Ba**	np	+	np
C ₆ -Peptid	np	np	+
OspA	+	+	+
DbpA (p18)	+	+	+
ErpA-p18***	np	+	np
OspC	+	+	+
BmpA (p39)	+	+	+
p58	+	+	+
p100 (p83)	+	+	+
p41	np	np	+
L-Bb*	np	+	np

LIA, line immunoassay; Ba, *Borrelia afzelii*; Bb, *Borrelia burgdorferi*; VlsE, variable major protein-like sequence expressed; C₆, peptide referring to 6th invariant region of VlsE; Osp, outer surface protein; DbpA, decorine binding protein A; ErpA, A-type iron sulfur protein essential for respiratory metabolism in *Escherichia coli*; BmpA, *Borrelia* membrane protein A; p, protein; L, lipid; antigens present (+) and not present (np) on the assay; *antigen on strip originated from Bb; **antigen on strip originated from Ba; ***according to the manufacturer the recombinant protein ErpA-p18 is of different origin than DbpA (p18) on their LIA strip and therefore unequal.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316170.t001>

Subsequently, the fluid was gently poured off while test strips remain in the well, replaced by another 1.5 ml of WB and incubated for 5 min on the rocking shaker; this 5-minute washing-and-draining-step was repeated two more times. Meanwhile, the anti-horse IgG-conjugate-dilution was prepared in a ratio of 1:100 by mixing equine conjugate concentrate with a respective volume of WB. Then, 1.5 ml of conjugate-dilution was added to each drained well with a test strip, followed by an incubation period of 30 min on the rocking shaker and, after the removal of all fluids, three further 5-minute washing-steps with 1.5 ml WB each. After finishing the washing-and-draining process, 1.5 ml of *Aq. dest.* was added to each well for 1 min, then poured off, replaced by 1.5 ml of substrate per well and incubated for exactly 12 min on the incubation shaker. The test was finalized by one last draining-step and three rinsing-steps with 1.5 ml *Aq. dest.* each without incubation. At the end, all fluids were removed, the strips carefully transferred from the wells to a clean absorbent tissue and left to dry for at least 20 min away from sunlight. For evaluation, the LIA strips were first arranged and attached one below the other on an evaluation sheet—with an extra sheet for the COC.

Evaluation of the strips was conducted visually by the examiner. Color reactions on single antigen lines were categorized with values 1 (negative (neg); no signal), 2 (negative (neg); weak signal fainter than COC), 3 (equivocal positive (equivoc); signal equal to COC), and 4 (positive (pos); signal stronger than COC). The overall rating of an entire test strip or serum sample in LIA A and its assignment to an overall test result allocation category is explained in Table 2. Hereby, the manufacturer of LIA A distinguishes between the allocation categories “NEGATIVE” (NEG)—no evidence of relevant contact with pathogen, “EQUIVOCAL”—evidence of contact with pathogen, “POSITIVE” (POS) (infection)—evidence of infection with pathogen. The OspA AG line was not considered as a specific AG signal in equine immunoreactions. Thus, there is no differentiation and specification as vaccination or both as vaccination and infection.

Table 2. LIA A—overall rating of a test strip or equine serum sample and its assignment to an overall test result allocation category according to manufacturers’ instructions.

Allocation categories (overall test result)	Antigen line evaluation—Equine sera
NEG	0 AG lines or AG lines < COC or 0–2 AG lines \geq COC (except VlsE)
EQUIVOC	VlsE AG line and 0–2 AG lines \geq COC or 3 AG lines (except VlsE) \geq COC
POS	VlsE AG line and \geq 3 AG lines \geq COC or VlsE AG line and DbpA AG line and \geq 1 AG line \geq COC or \geq 4 AG lines \geq COC (except VlsE)
VAC	-
VAC+POS	-

Overall rating and allocation are based on the AG line results obtained with LIA A and its evaluation according to LIA A’s evaluation protocol for horses supplied by the manufacturer. The OspA AG line was not considered as a specific AG line for an equine immunoreaction. Hence, in this protocol there is no differentiation in terms of a vaccination (VAC) or vaccination and infection (VAC+POS) regarding an overall test result.

AG line, antigen line; NEG, negative overall test result; EQUIVOC, equivocal overall test result; POS, positive overall test result (infection); COC, cut off control; OspA, outer surface protein A; VlsE, variable major protein-like sequence expressed; DbpA, decorine binding protein A; COC, cut off control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316170.t002>

2.2.2. LIA B. Other than LIA A, LIA B was designed for testing equine serum samples only. Antigens present on the strips are listed in [Table 1](#). Antibody detection was performed according to the manufacturer's instructions. Evaluation of the strips was conducted with the software and scanner system supplied by the manufacturer. In case of this LIA, the COC was already included on the test strip and no additional procedure was needed in this context.

LIA B was prepared and conducted alike LIA A with the following differences: in LIA B 30 μ l of serum samples were used, incubation trays held 30 wells, and strips were required to be incubated in advance for 15 min in 1.5 ml of WB-dilution before adding serum samples. The subsequent steps of incubation of serum samples and conjugate (30 min each) as well as the two washing steps in between (3 x 5 min each) were equal to LIA A. However, in LIA B the anti-horse enzyme-conjugate-dilution was prepared in a ratio of 1:10. After finalizing the second washing process with WB, no further washing step with *Aq. dest.* was conducted, but the substrate was applied immediately, and incubation was performed for only 10 minutes. To stop the color reaction fluids were poured off and strips were washed-off with 1.5 ml *Aq. dest.* three times for 1 min each. After finishing the test, transferring strips to a prepared sticky evaluation sheet and air-drying them for at least 20 min away from sunlight, evaluation was performed using a flatbed scanner and evaluation software (version 3.4.36) supplied by the manufacturer.

Color reactions on single AG lines were evaluated and categorized automatically by the software with values from 0 to 11 (negative (neg); no signal), 12 to 18 (equivocal positive (equivoc); very weak signal or equal to COC), and ≥ 19 to 255 (positive (pos); medium to strong signal greater than COC). The overall rating of an entire test strip or serum sample in LIA B and its assignment to an overall test result allocation category is explained in [Table 3](#). Hereby, the manufacturer of LIA B distinguishes between allocation categories "NEGATIVE (NEG)—no evidence of relevant contact with pathogen", "EQUIVOCAL (EQUIVOC)—serological evidence of contact with pathogen", "POSITIVE (POS)—serological evidence of infection" and "VACCINATED (VAC)—serological evidence of immunization". Thus, the OspA AG signal is considered as specific AG signal in equine immunoreactions. In the software there is an additional allocation category for the case of both, a vaccination and an infection, classified as "VACCINATED OR POSITIVE (VAC +POS)—Positive—serological evidence of infection or immunization", but with no further explanation for the type and number of AG lines.

2.2.3. LIA C. Alike LIA A, LIA C was developed to test equine and canine serum and plasma. Yet, a kit included components for testing sera of both species. All antigens present on the strips of LIA C are listed in [Table 1](#). Antibody detection was performed according to manufacturer's instructions. Evaluation of the strips was conducted with the software and scanner system supplied by the manufacturer. In this LIA the COC was already included on the test strip.

LIA C was prepared and conducted like LIA A and LIA B with the following differences: the WB-dilution was prepared in a ratio of 1:5, incubation trays held 10 wells each and pre-incubation of strips in WB was performed for 5 min before adding 15 μ l of an equine serum sample. Further, subsequent steps of incubation of serum samples and conjugate were conducted for 45 min each. The anti-horse enzyme-conjugate came as a ready-to use component. Equal to LIA B, the second washing process with WB (3 x 5 min. each) was followed by immediate application of the substrate and its incubation for 10 min. To stop the color reaction, fluids were poured off and strips were rinsed with 1.5 ml *Aq. dest.* three times without incubation. After finishing the test, air-drying the strips for at least 20 min away from sunlight and attaching them to an evaluation sheet, evaluation was performed using a flatbed scanner and evaluation software (version 6.0.0) supplied by the manufacturer.

Serodiagnosis of equine Lyme borreliosis with line immunoassays

Table 3. LIA B—overall rating of a test strip or equine serum sample and its assignment to an overall test result allocation category according to manufacturers' instructions.

Allocation categories (overall test result)	Antigen line evaluation—Equine sera
NEG	0 AG lines or AG lines < COC or 1 AG line > COC or p100 AG line and 1 AG line > COC
EQUIVOC	2 AG lines > COC (except p100) or 2 AG lines > COC and \geq 1 AG line equivoc or 1 AG line > COC and \geq 2 AG lines equivoc or \geq 3 AG lines equivoc
POS	\geq 3 AG lines > COC (except OspA)
VAC	OspA AG line and other possibly positive AG lines
VAC+POS	- *

Overall rating and allocation are based on the AG line results obtained with LIA B and its evaluation according to LIA B's evaluation protocol for horses supplied by the manufacturer. VlsE-Ba and VlsE-Bb were always considered as one AG line albeit both AG lines might appear as "positive" or "equivocal positive". The OspA AG line was considered as specific AG line in equine immunoreaction. Hence, there was an overall test result allocation category for vaccinated animals (VAC, vaccinated). *Only in the manufacturer's evaluation software there is an additional allocation category for the case of both—a vaccination and an infection (VAC+POS)—classified as "Positive—serological evidence of infection or immunization", but with no further specification regarding the type and number of AG lines.

AG line, antigen line; NEG, negative overall test result; EQUIVOC, equivocal overall test result; POS, positive overall test result (infection); equivoc, equivocal positive AG signal result on single AG line COC, cut off control; OspA, outer surface protein A; p100, protein 100.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316170.t003>

Color reactions on single AG lines were evaluated and categorized automatically by the software with values from 0 to 0.9 (negative (neg); no signal or signal fainter than COC), 1.0 (equivocal positive (equivoc); signal equal to COC), and greater than 1.0 (positive (pos); strong signal greater than COC). The overall rating of an entire test strip or serum sample in LIA C and its assignment to an overall test result allocation category is explained in Table 4. Hereby, the manufacturer of LIA C distinguishes between allocation categories "NEGATIVE (NEG)—no evidence of relevant contact with pathogen", "EQUIVOCAL (EQUIVOC)—evidence of contact with pathogen", "POSITIVE (POS) (infection)—evidence of infection", "VACCINATED (VAC)—evidence of vaccination", and "VACCINATED AND POSITIVE (VAC+POS)—evidence of vaccination and infection". The OspA AG signal was considered as specific AG signal in equine immunoreactions and considered accordingly in the evaluation of a test.

2.3. Statistical methods

For each serum sample and LIA strip the signal intensity results on single Bbsl-specific antigen lines and the overall test result were recorded, organized, and analyzed with Microsoft Excel Office 365 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Results were grouped and charted by experimental group, LIA and sampling time-point (d0, d135 and d210).

To assess the agreement of results between the three independent raters (named LIA A, LIA B and LIA C), single AG-AB immunocomplex signal intensity results and overall test results were statistically analyzed for each serum sample using the Fleiss' kappa test [24, 25].

Table 4. LIA C—overall rating of a test strip or equine serum sample and its assignment to an overall test result allocation category according to manufacturers' instructions.

Allocation categories (overall test result)	Antigen line evaluation—Equine sera
NEG	0 AG lines or AG lines < COC or 0–2 AG lines \geq COC (except OspA or VlsE / C6 AG line)
EQUIVOC	VlsE / C6 AG line and 0–2 AG lines \geq COC (except OspA or p18 AG line) or 3 AG lines \geq COC (except OspA or VlsE / C6 AG line)
POS	VlsE / C6 AG line and \geq 3 AG lines \geq COC (except OspA or p18 AG line) or \geq 4 AG lines \geq COC (except OspA or VlsE / C6 AG line) or VlsE / C6 AG line, p18 AG line and \geq 1 AG line \geq COC (except OspA AG line)
VAC	OspA AG line and \geq 0–2 AG lines \geq COC or OspA AG line and 0–3 AG lines \geq COC (except VlsE / C6 AG line)
VAC+POS	OspA AG line, VlsE / C6 AG line and \geq 3 AG lines \geq COC (except p18 AG line) or OspA AG line and \geq 4 AG lines \geq COC (except VlsE / C6 AG line) or OspA AG line, VlsE / C6 AG line, p18 AG line and \geq 1 AG lines \geq COC

Overall rating and allocation are based on the AG line results obtained with LIA C and its evaluation according to LIA C's evaluation protocol for horses supplied by the manufacturer. VlsE and C6 were considered as one AG line albeit both AG lines might appear \geq cut off control AG line (COC). The appearance of one of those two lines alone was **not** sufficient to allocate samples to the categories "EQUIVOC", "POS" as well as "VAC+POS".

AG line, antigen line; NEG, negative overall test result; EQUIVOC, equivocal overall test result; POS, positive overall test result (infection); VAC, vaccinated overall test result (vaccination); VAC+POS, vaccinated and positive overall test result (vaccination and infection); COC, cut off control; OspA, outer surface protein A; VlsE, variable major protein-like sequence expressed; C6, peptide referring to 6th invariant region of VlsE; p18, protein 18 (synonymous with decorine binding protein A (DbpA)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316170.t004>

The observed inter-rater agreement (P_o) and the statistic [inter-rater reliability](#) (IRR), represented by the Fleiss' kappa coefficient (κ), were calculated per sampling time-point; once without and second with additional subdivision into experimental groups (Non-Vac, Vac-Basic, Vac-Plus). The IRR was categorized into "poor" ($\kappa = < 0.0$), "slight" ($\kappa = 0.0$ to 0.2), "fair" ($\kappa = 0.21$ to 0.40), "moderate" ($\kappa = 0.41$ to 0.60), "substantial" ($\kappa = 0.61$ to 0.80), and "almost perfect" ($\kappa = 0.81$ to 1.00). A high value for κ represents a high agreement of the three tests or raters regarding a sample's overall result, or its coloration of single AG signals respectively [26].

3. Results

The study was conducted with, in total 393 equine sera of 131 clinically healthy horses priorly diagnosed as LB-negative or equivocal with an in-house KELA and a commercial LIA. Each horse was assigned to one of three experimental groups—non-vaccinated group Non-Vac ($n = 42$), which served as negative control group or vaccinated group Vac-Basic ($n = 45$) or Vac-Plus ($n = 44$) (S1 Table). Serum samples collected at three different sampling time-points in the vaccination schedule (d0, d135 and d210) were analyzed for their antibody contents each with LIA A, LIA B and LIA C.

3.1. Results after evaluation and allocation according to manufacturers' instructions

All three LIAs were tested with 393 equine serum samples each and handling was without any issues. Visual evaluation of test strips in LIA A, and automatic scan and interpretation of results on test strips in LIA B was entirely successful. However, for LIA C the automatic scan and evaluation was not successful for three strips incubated with serum samples from one and the same horse at three time-points (ZP0-28, ZP3-28, ZP4-28) as its COCs were above the maximum level the scanner was able to process. Subsequently, the evaluation was performed visually by the examiner in this case.

3.1.1. Results pertaining to specific antigen signals. Results for single AG lines of every LIA strip and serum sample were analyzed by signal intensity and recorded by experimental group, sampling time-point and LIA. To contrast results between LIAs, the number of samples with a signal intensity result of “no signal“, “signal intensity fainter than COC“, “signal intensity equal to COC” and “signal intensity greater than COC” was calculated for each *Borrelia*-specific AG tested. Results were charted by experimental group, sampling time-point and LIA. Additionally, the observed inter-rater agreement (P_o) and IRR (κ) were calculated for signal intensity results of single antigens tested. Special attention was put on results for vaccination-specific OspA AG signal, as well as VlsE AG signal as the leading parameter indicating an infection with pathogens of the *Bbsl*-complex.

A. OspA antigen signal. None of the three LIAs displayed “positive” OspA signal intensity results (equal to or greater than the COC) for samples of group Non-Vac at any time-point in the observational period. In other words, there was no color reaction signal on the OspA AG line or it was fainter than the COC and, therefore, was considered as “negative” for all samples of group Non-Vac at d0, d135 and d210 (Fig 1A–1C). Likewise, none of the three LIAs displayed a positive OspA AG signal result at d0 for none of the samples in the vaccinated groups Vac-Basic and Vac-Plus.

The observed inter-rater agreement (P_o) for OspA signal intensity results at d0 ranged from 69% to 63% depending on group, the calculated IRR (κ) was slight for all three groups at d0 (S3 Table). For group Non-Vac at d135 the P_o was 56% while the kappa was poor ($\kappa = -0.04$), yet, it increased at d210 ($P_o = 70%$, $\kappa = 0.10$ (slight)). In LIA A at d135, the antibody level of only a fraction of vaccinated horses of groups Vac-Basic and Vac-Plus was sufficient to induce a positive result for OspA AG signal ($n_{\text{Vac-Basic}} = 12/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 15/44$). Similarly, at d210 and group Vac-Basic only 27% of the vaccinated horses ($n_{\text{Vac-Basic}} = 12/45$) got identified as such by LIA A; yet, in group Vac-Plus OspA-specific AB got detected with highly positive signal intensity results in 100% of the samples ($n_{\text{Vac-Plus}} = 44/44$).

In LIA B at d135, none of the vaccinated horses displayed a positive result for OspA at d135 ($n_{\text{Vac-Basic}} = 0/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 0/44$). At d210, repeatedly none of the basic-vaccinated horses was identified as such by LIA B ($n_{\text{Vac-Basic}} = 0/45$); in group Vac-Plus, though, LIA B positively detected OspA-specific AB in 98% of the samples ($n_{\text{Vac-Plus}} = 43/44$).

In LIA C, the antibody level was sufficient to induce a positive OspA signal in 36% of the samples of group Vac-Basic ($n_{\text{Vac-Basic}} = 16/45$) and 27% of the samples of group Vac-Plus ($n_{\text{Vac-Plus}} = 12/44$) at d135, and, in 36% of the samples of group Vac-Basic ($n_{\text{Vac-Basic}} = 16/45$) at d210. In group Vac-Plus, LIA C identified all vaccinated horses by highly positive OspA signal intensity results in 100% of the samples ($n_{\text{Vac-Plus}} = 44/44$).

In summary, at d135 only LIA A and LIA C positively detected OspA-specific antibodies in samples of the two vaccinated groups, but not LIA B. At d210 and group Vac-Basic, again, only LIA A and LIA C did so, but not LIA B; yet, in group Vac-Plus at d210 all three LIAs displayed highly positive results for OspA AG signal. In general, LIA C reacted the most

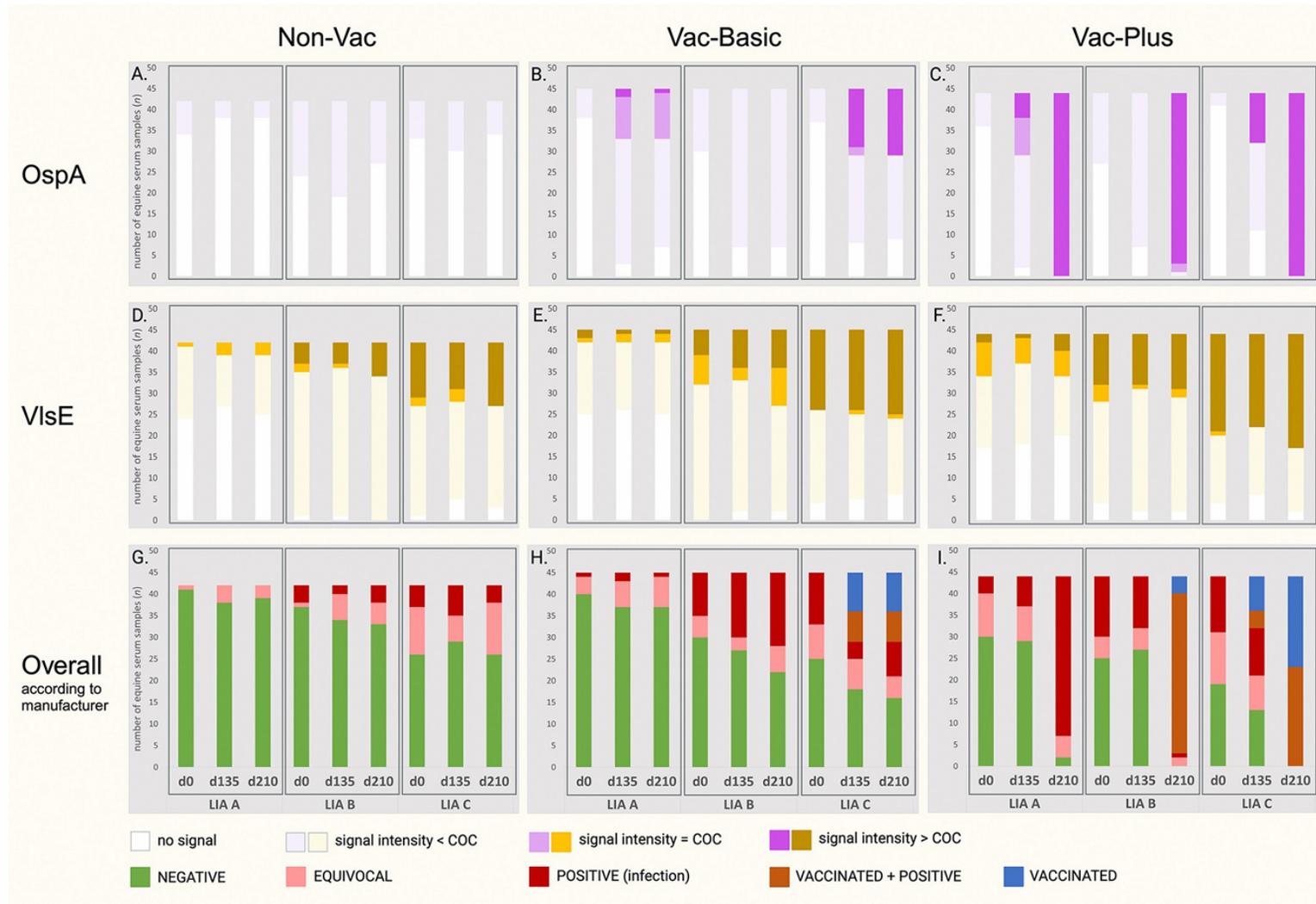


Fig 1. (A)-(I). Comparison of test results obtained by three LIAs used for *Bbsl*-serodiagnosis with equine serum samples. Evaluation was performed according to the three manufacturers' instruction manuals. Test results are charted by experimental group (Non-Vac ($n = 42$), Vac-Basic ($n = 45$), Vac-Plus ($n = 44$)), LIA (LIA A, LIA B and LIA C) and time-point of blood sample collection (d0, d135, d210). **(A)-(C).** Comparison of OspA AG-AB immunocomplex signal intensity results. The number of serum samples with a "negative" OspA signal intensity result are displayed in white (no signal) and lilac (signal fainter than COC), the number of samples with a "positive" OspA signal intensity result are illustrated in light purple (signal equal to COC) and bright purple (signal greater than COC). **(D)-(F).** Comparison of VlsE AG-AB immunocomplex signal intensity results. The number of serum samples with a "negative" VlsE signal intensity result are represented by white color (no signal) and vanilla (signal fainter than COC), number of samples with a "positive" VlsE signal intensity result are displayed in yellow (signal equal to COC) and ocher (signal greater than COC). **(G)-(I).** Comparison of overall test results. The number of serum samples with an overall test result of "NEGATIVE" (green), "EQUIVOCAL" (salmon), "POSITIVE (infection)" (red), "VACCINATED AND POSITIVE" (light brown) and "VACCINATED" (blue) are illustrated. In LIA A, vaccination-specific OspA is not considered as evidence for immunization and, therefore, there is no allocation in terms of "VACCINATED" and "VACCINATED AND POSITIVE" in this test. *Bbsl*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato; Non-Vac, non-vaccinated horses; Vac-Basic, horses vaccinated on d0 and d14; Vac-Plus, horses vaccinated on d0, d14 and d180; d, day of blood sample collection during the vaccination schedule; AG, antigen; AB, antibody; OspA, outer surface protein A; VlsE, variable major protein-like sequence expressed; COC, cut off control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316170.g001>

sensitive—closely followed by LIA A—by displaying the highest number of samples with an OspA signal intensity result greater than the COC, while LIA B clearly demonstrated the lowest sensitivity in regard to OspA-specific AB. Alike for group Non-Vac at d135, the observed inter-rater agreement in regard to OspA AG signal results dropped to a low for groups Vac-Basic ($P_o = 50\%$) and Vac-Plus ($P_o = 53\%$), too, at a slight IRR. At d210, P_o significantly increased again to a high ($P_o = 61\%$ for group Vac-Basic, $P_o = 95\%$ for group Vac-Plus). Nevertheless, the calculated IRR at d210 dropped to poor for group Vac-Plus ($\kappa = -0.02$), while in group Vac-Basic it increased to fair ($\kappa = 0.30$).

B. VlsE antigen signal. When comparing results of LIA A, LIA B and LIA C in regard to signal intensity results for VlsE AG signal, LIA C generally reacted the strongest followed by LIA B and LIA A.

LIA A displayed the lowest number of VlsE-positive samples (signal intensity result \geq COC) at all three time-points and groups (d0: $n_{\text{Non-Vac}} = 1/42$, $n_{\text{Vac-Basic}} = 3/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 10/44$; d135: $n_{\text{Non-Vac}} = 3/42$, $n_{\text{Vac-Basic}} = 3/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 7/44$; d210: $n_{\text{Non-Vac}} = 3/42$, $n_{\text{Vac-Basic}} = 3/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 10/44$), yet, overall with a high in group Vac-Plus.

LIA B showed a higher number of VlsE-positive samples in comparison to LIA A in all three groups at three time-points (d0: $n_{\text{Non-Vac}} = 7/42$, $n_{\text{Vac-Basic}} = 13/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 16/44$; d135: $n_{\text{Non-Vac}} = 6/42$, $n_{\text{Vac-Basic}} = 12/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 13/44$; d210: $n_{\text{Non-Vac}} = 8/42$, $n_{\text{Vac-Basic}} = 18/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 15/44$), yet, overall with a low in group Non-Vac.

LIA C presented by far the most VlsE-positive samples in all three groups at three time-points (d0: $n_{\text{Non-Vac}} = 15/42$, $n_{\text{Vac-Basic}} = 19/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 24/44$; d135: $n_{\text{Non-Vac}} = 14/42$, $n_{\text{Vac-Basic}} = 20/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 22/44$; d210: $n_{\text{Non-Vac}} = 15/42$, $n_{\text{Vac-Basic}} = 21/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 27/44$).

Independent of the experimental group and LIA, there was no significant increase apparent in the number of VlsE-positive samples over the progressing sampling time-points in the vaccination schedule (Fig 1D–1F). In general, all three LIAs detected VlsE-specific AB (\geq COC) most frequently in serum samples of horses belonging to group Vac-Plus—independent of the time-point of blood sample collection.

In summary, LIA C reacted very sensitive for VlsE-specific antibodies with up to 61% of VlsE-positive samples in group Vac-Plus, while LIA A clearly was least sensitive in this aspect. In consequence, there's a high discrepancy between the three LIAs regarding the detection of VlsE-specific antibodies. Accordingly, the calculated IRR was poor to slight at d0 at an observed inter-rater agreement of 38% in group Non-Vac, 36% in group Vac-Basic and 39% in group Vac-Plus. At d135, the P_o and IRR mostly remained unchanged for all three groups (Non-Vac: $P_o = 31\%$, $\kappa =$

-0.15 ; Vac-Basic: $P_o = 33\%$, $\kappa = -0.05$; Vac-Plus: $P_o = 40\%$, $\kappa = 0.09$). At d210, the poor agreement of results between the three LIAs did not improve either (Non-Vac: $P_o = 34\%$, $\kappa = -0.09$; Vac-Basic: $P_o = 31\%$, $\kappa = -0.07$; Vac-Plus: $P_o = 32\%$, $\kappa = -0.01$) (S3 Table).

3.1.2. Overall test results. The number of samples with an overall evaluation result of “NEGATIVE” (NEG), “EQUIVOCAL” (EQUIVOC), “POSITIVE” (POS), “VACCINATED AND POSITIVE” (VAC+POS) as well as “VACCINATED” (VAC) was calculated and charted by experimental group, LIA and sampling time-point. Overall, LIA C reacted the strongest at all three time-points and groups, followed by LIA B and LIA A (Fig 1G–1I).

At d0 and d135, LIA A displayed the highest number of “NEG” samples in all three groups, as well as at d210 in groups Non-Vac and Vac-Basic. In contrast, in group Vac-Plus at d210, LIA A assessed the greatest number of samples as POS in comparison to LIA B and LIA C due to the fact that OspA was not considered as vaccination-specific and, consequently, the absence of allocation categories pertaining to vaccinated or vaccinated and infected horses in LIA A's technical manual. Therefore, at d210 none of the samples of vaccinated horses were allocated as VAC, or VAC+POS, which resulted in many false-positive overall test results in vaccinated groups in LIA A.

In comparison to LIA A, more sensitive LIA B rated a higher number of samples as POS and a lower number of samples as NEG in all three groups at d0 and d135, as well as in groups Non-Vac and Vac-Basic at d210. At d210, LIA B identified 84% of the vaccinees in group Vac-Plus as VAC+POS ($n = 37/44$) while only four samples were allocated as VAC.

In contrast, most sensitive LIA C showed the lowest number of “NEG” samples at three time-points and groups. Yet, based on the detection of OspA-specific antibodies, LIA C detected the highest number of vaccinees at d135 and d210 in the two vaccinated groups.

Here, in comparison to LIA B, LIA C allocated a significantly lower number of horses as VAC +POS ($n = 23/44$) and, instead, more horses as VAC ($n = 21/44$).

For the overall test results of 131 equine sera at three classified time-points (d0, d135, d210)–without subdivision of results into groups–the observed inter-rater agreement (P_o) and the statistical inter-rater reliability (IRR, κ) were 66% and fair ($\kappa = 0.28$) at d0, 55% and slight ($\kappa = 0.18$) at d135, as well as 41% and slight ($\kappa = 0.18$) at d210. With additional classification of results into experimental groups, the IRR did not improve despite a partly increased observed inter-rater agreement. That is, group Non-Vac ($n = 42$) displayed a slight IRR at all three time-points, yet, in combination with the highest observed inter-rater agreement (d0: $P_o = 71\%$, d135: $P_o = 70\%$, d210: $P_o = 63\%$) (S4 Table). For group Vac-Basic ($n = 45$) the IRR was fair at d0 ($\kappa = 0.28$, $P_o = 67\%$), slight at d135 ($\kappa = 0.15$, $P_o = 50\%$), and slight at d210 ($\kappa = 0.11$, $P_o = 44\%$), too. The highest discrepancy in the accordance of overall results between LIAs was observed in group Vac-Plus ($n = 44$), in particular in allocation categories “POS”, “VAC” and “VAC+POS”; for group Vac-Plus the IRR was fair at d0 ($\kappa = 0.32$, $P_o = 60\%$), dropped to slight at d135 ($\kappa = 0.18$, $P_o = 47\%$) and further dropped to poor ($\kappa = -0.23$) at d210 at a low of P_o of 17%.

In summary, LIA C displayed the highest sensitivity, particularly in terms of the detection of VlsE-specific AB, while it was equally sensitive to LIA A regarding the detection of OspA-specific AB. LIA B showed the lowest sensitivity towards OspA-specific AB, while LIA A did so in regard to VlsE-specific AB. In consequence, LIA C demonstrated the highest specificity at the identification of vaccinated horses, followed by LIA A. In this context, LIA B demonstrated the lowest specificity.

3.2. Results after evaluation and allocation according to an alternative recommended overall evaluation protocol (ROEP) for LIAs and equine serum samples

In addition to the evaluation of LIA strips according to manufacturers’ evaluation protocols all LIA strips in this study were reevaluated with an alternative, uniform and recommended overall evaluation protocol (ROEP) for equine serum samples. This protocol is in accordance with instruction manuals for sera of vaccinated and vaccinated and infected dogs. It was established to counteract shortcomings of non-standardized LIA evaluation protocols for equine sera supplied by manufacturers, and to refine and standardize the interpretation of LIA results in order to improve serodiagnostic accuracy for equine LB.

The application of ROEP solely had influence on the overall test results, that is, evaluation of single AG-AB immunocomplex signal results remained unchanged and was performed according to the respective manual or computer software of a LIA. In the overall evaluation process ROEP considered the OspA signal as vaccination-specific in all three LIAs. In this context, the appearance of positive color reaction signals (\geq COC) on additional antigen lines–except VlsE–that are known to occur in LIA of vaccinated dogs, are considered as reaction to the various antigens provided with the lysate vaccine applied, respectively.

According to the ROEP a differentiation between the five allocation categories “NEGATIVE” (NEG), “EQUIVOCAL” (EQUIVOC), “POSITIVE (infection)” (POS), “VACCINATED” (VAC) and “VACCINATED AND POSITIVE” (VAC+POS) was performed (Table 5).

3.2.1. Overall test results. Reassessed, the number of samples with an overall evaluation and allocation result of “NEGATIVE” (NEG), “EQUIVOCAL” (EQUIVOC), “POSITIVE (infection)” (POS), “VACCINATED AND POSITIVE” (VAC+POS) as well as “VACCINATED” (VAC) was calculated and charted by experimental group, LIA and sampling time-point.

Table 5. Recommended overall evaluation protocol (ROEP)–overall rating of a test strip or equine serum sample and its assignment to an overall test result allocation category according the ROEP.

Allocation categories (overall test result)	Antigen signal evaluation—Equine sera
NEG	0 AG signals or AG signals < COC or 0–2 AG signals ≥ COC (except OspA or VlsE / C6* AG signal)
EQUIVOC	VlsE / C6* AG signal and 0–2 AG signals ≥ COC (except OspA or DbpA** AG signal) or VlsE / C6* AG signal, DbpA** AG signal and 0 AG signals ≥ COC or VlsE / C6* AG signal, OspA AG signal and 2 AG signals ≥ COC (except DbpA** AG signal) or 3 AG signals ≥ COC (except OspA or VlsE / C6* AG signal)
POS	VlsE / C6* AG signal and ≥ 3 AG signals ≥ COC (except OspA** AG signal) or ≥ 4 AG signals ≥ COC (except OspA or VlsE / C6* AG signal) or VlsE / C6* AG signal, DbpA** AG signal and ≥ 1 AG signal ≥ COC (except OspA AG signal)
VAC	OspA AG signal and ≥ 0–2 AG signals ≥ COC or OspA AG signal and 0–5 AG signals ≥ COC (except VlsE / C6* AG signal)
VAC+POS	OspA AG signal, VlsE / C6* AG signal and ≥ 3 AG signals ≥ COC or OspA AG signal, VlsE / C6* AG signal, DbpA** AG signal and ≥ 1 AG signals ≥ COC

Overall rating and allocation are based on the AG-AB immunocomplex signal intensity results obtained with LIA and its evaluation according to an alternative ROEP for equine serum samples. VlsE and C6 (*if present) are considered as one AG signal albeit both signals might appear equal to or greater than the cut off control AG signal (COC). **DbpA protein is considered as synonymous with p18 protein.

AG, antigen; AB, antibody; NEG, negative overall test result; EQUIVOC, equivocal overall test result; POS, positive overall test result (infection); VAC, vaccinated overall test result (vaccination); VAC+POS, vaccinated and positive overall test result (vaccination and infection); COC, cut off control; OspA, outer surface protein A; VlsE, variable major protein-like sequence expressed; C6, peptide referring to 6th invariant region of VlsE; DbpA, decorine binding protein A.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316170.t005>

After application of ROEP, in LIA A there is neither a divergence in test results in group Non-Vac at no point, nor in groups Vac-Basic and Vac-Plus at d0. Yet, the effect of ROEP becomes apparent in the two vaccinated groups at d135 and d210: the former number of “NEG” and “EQUIVOC” samples slightly decreased, the number of “POS” samples decreased to none, and the samples recognized as vaccinated significantly increased (VAC_{d135}: $n_{\text{Vac-Basic}} = 11/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 12/44$; VAC_{d210}: $n_{\text{Vac-Basic}} = 11/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 34/44$; VAC+POS_{d135}: $n_{\text{Vac-Basic}} = 1/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 2/44$; VAC+POS_{d210}: $n_{\text{Vac-Basic}} = 1/45$, $n_{\text{Vac-Plus}} = 10/44$), since the immunization-induced positive OspA signal is now assessed as specific for vaccination (Fig 2A–2C).

In LIA B, similarly, the application of ROEP resulted in a significant increase in the number of “VAC” horses and a decrease in the amount of “VAC+POS” horses, yet, only in group Vac-Plus at d210. That is, formerly 9% of “Vac-Plus” samples were allocated as VAC ($n = 4/44$) and 84% as VAC+POS ($n = 37/44$), while with application of ROEP 64% of “Vac-Plus” samples were then allocated as VAC ($n = 28/44$) and 25% as VAC+POS ($n = 12/44$) at d210. In group Vac-Plus at d0 and d135, as well as in group Vac-Basic at all three time-points, there’s no significant alteration in overall allocation results of samples since the alternate overall evaluation

Serodiagnosis of equine Lyme borreliosis with line immunoassays

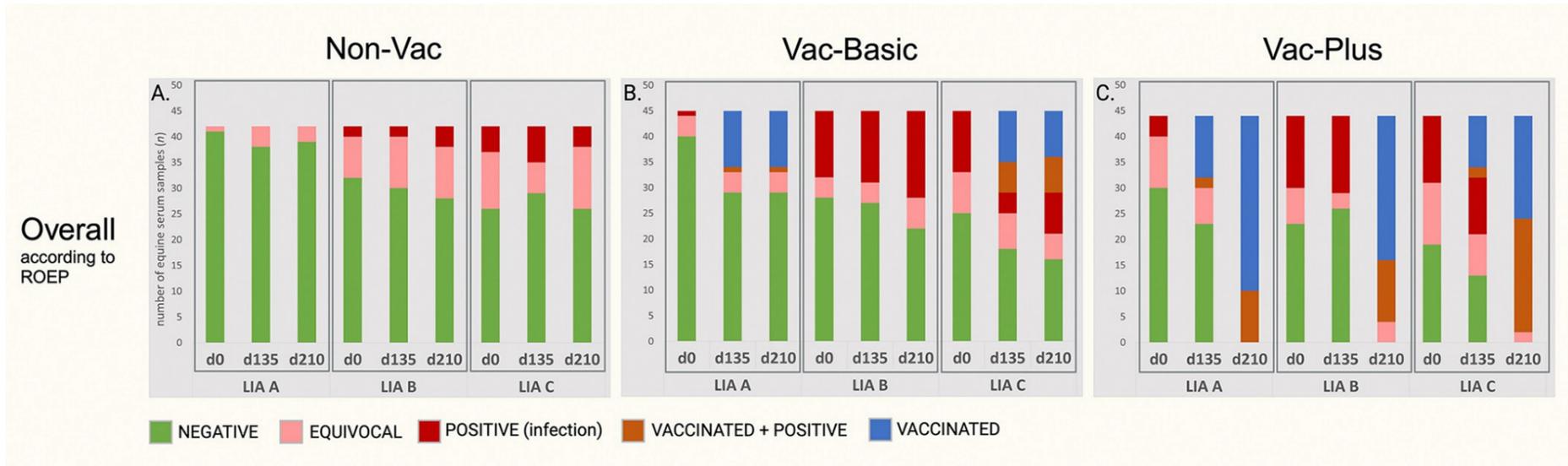


Fig 2. (A)-(C). Overall test results after application of the ROEP–comparison of overall test results obtained by three LIAs used for LB serodiagnosis in horses. Evaluation and allocation were performed according to an alternative recommended overall evaluation protocol for equine serum samples which considered OspA signal as specific for equine immunoreaction. The number of serum samples with an overall test result of “NEGATIVE” (green), “EQUIVOCAL”(salmon), “POSITIVE”(red), “VACCINATED AND POSITIVE” (light brown) and “VACCINATED” (blue) after evaluation with the ROEP are illustrated. Results are charted by experimental group (Non-Vac (n = 42), Vac-Basic (n = 45), Vac-Plus (n = 44)), LIA (LIA A, LIA B, LIA C) and time-point of blood sample collection (d0, d135 and d210). ROEP, recommended overall evaluation protocol; d, day of blood sample collection during the vaccination schedule; Non-Vac, non-vaccinated horses; Vac-Basic, horses vaccinated on d0 and d14; Vac-Plus, horses vaccinated on d0, d14 and d180.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0316170.g002>

protocol has no influence on the detection rate of OspA-specific AB in LIA B. Also, in the non-vaccinated group the application of ROEP produced divergent overall test results in LIA B (S5 Table). It resulted in an increase of “EQUIVOC” samples combined with a decrease of “NEG” samples at three time-points; at d0, five samples’ allocation result changed from NEG to EQUIVOC and two from POS to EQUIVOC, at d135 four got altered NEG to EQUIVOC, one from POS to EQUIVOC and one from EQUIVOC to POS, and at d210 one sample shifted from POS to EQUIVOC, one from POS to EQUIVOC and one sample from EQUIVOC to POS.

In LIA C there is no alteration in the overall evaluation and allocation results neither in group Non-Vac at any time-point, nor in the vaccinated group at d0. In the groups of vaccinated horses at d135 and d210, there is no significant disagreement in results after application of ROEP; at d135, one sample’s allocation result in group Vac-Basic changed from VAC+POS to VAC, while in group Vac-Plus two samples moved from VAC+POS to VAC. At d210, two samples’ overall result in group Vac-Plus changed from VAC to EQUIVOC, and one changed from VAC+POS to VAC.

In view of the inter-rater agreement, the calculated IRR (κ) partially improved after application of ROEP. When comparing the inter-rater agreement results after application of manufacturers’ evaluation protocols with those after application of the ROEP, the IRR for overall results for 131 equine serum samples—without subdivision into experimental groups—at first, remained fair at d0 ($\kappa = 0.35$, $P_o = 68\%$), yet, increased at d135 ($\kappa = 0.24$ (fair), $P_o = 54\%$) and d210 ($\kappa = 0.43$ (moderate), $P_o = 59\%$) with application of ROEP (S4 Table).

With additional subdivision of results into experimental groups, the agreement of results in group Non-Vac ($n = 42$) increased at all three time-points (d0: $\kappa = 0.22$ (fair), $P_o = 72\%$; d135: $\kappa = 0.22$ (fair), $P_o = 71\%$; d210: $\kappa = 0.17$ (slight), $P_o = 66\%$). For group Vac-Basic ($n = 45$) the inter-rater agreement negligibly improved at all three time-points (d0: $\kappa = 0.33$ (fair), $P_o = 68\%$; d135: $\kappa = 0.19$ (slight), $P_o = 48\%$; d210: $\kappa = 0.18$ (slight), $P_o = 44\%$). The assets of ROEP mainly become apparent in group Vac-Plus ($n = 44$): while the agreement between raters remained fair at d0 ($\kappa = 0.38$, $P_o = 63\%$) and d135 ($\kappa = 0.20$, $P_o = 45\%$), it considerably climbed from poor to fair at d210 ($\kappa = 0.33$, $P_o = 67\%$).

4. Discussion

An increased risk of transmission and subsequent infection with members of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex is expected due to an increase in tick activity and georgical spread. Following the infection with organisms of the *Bbsl*-complex the host responds with the production of specific antibodies against the infectious agent. Some individuals may also develop clinical signs. Consequently, infection and clinical disease are two different entities. Seropositivity itself is an indicator for a past or active exposure to borreliae antigens, yet, not necessarily associated with clinical disease. Although there are clinical case reports, in which an association between antibody positivity and disease in horses was suggested, *Bbsl* infection in animals often remains clinically inapparent or clinical signs are vague [27–33]. In consequence, only horses with occurrence of clinical signs delineated for a LB (i. a. intermittent lameness, encephalitis, uveitis, infectious arthritis, cutaneous pseudolymphoma [8–10]), supported by a positive serodiagnostic test result should receive antibiotic treatment.

Thereby, it is essential to have highly sensitive and specific serodiagnostic tools available that produce accurate, reliable and reproducible test results to confirm a *Bbsl* infection in order to support the suspected diagnosis. Misdiagnosis or misclassification of a diagnostic outcome impedes clinical decision-making and potentially prevents appropriate treatment or results in mistreatment of the patient. A false-negative diagnostic outcome on the one hand may lead to an undiscovered or late detected infection and the omission of appropriate on-time antibiotic treatment potentially causing persisting clinical signs. A false-positive test result on the other hand is just as problematical due to unnecessary antibiotic treatment with its detrimental effects on the horses' health (i. a. effects of drug intolerance, diarrhea due to colitis, increased risk of additional infections) and the risk of antibiotic-resistance development in bystander bacteria [16].

In regard to LIAs used for the detection and confirmation of equine LB, it should feature a suitable sensitivity and a high specificity to be able to accurately detect *Bbsl*-specific AB. Subsequently, the diagnostic outcome must be adequately interpreted and classified according to a LIA evaluation protocol for equine sera validated and standardized across various tests. Here, the differentiation of a vaccination-induced immune response from those initiated by a past or active infection due to natural exposure must be performed by interpreting vaccination- and infection-specific markers (i. e. OspA and VlsE/ C6 AG line) appropriately. In addition, a LIA should be easy to apply and offer a user-friendly operability.

To make headway in the challenging diagnosis of LB in horses with non-standardized serodiagnostic tests, we qualitatively assessed three LIAs available for serodiagnosis of LB in equine serum samples. Tests were evaluated and compared regarding their sensitivity, specificity, diagnostic outcome and the operability of a test using serum samples of non-vaccinated and vaccinated horses. Herby, special attention was put on the sensitivity and specificity of vaccination-specific OspA AG line and infection-specific VlsE AG line. In addition, AG signals of all three LIAs were again interpreted and classified using a uniform recommended overall evaluation protocol (ROEP) with the aim to refine and standardize serodiagnosis of equine LB across LIAs available in this study.

4.1. Sensitivity, specificity, and overall results

In terms of identifying non-vaccinated and vaccinated horses, the three assessed tests varied in their accuracy in detecting vaccination-induced specific antibodies against OspA AG. Thereby, the inter-rater-agreement for OspA AG signal intensity results and overall test results ranged from fair to poor depending on time-point of blood sample collection and group, representing an unsatisfying agreement of results of the three LIAs in this aspect.

Generally, serum samples of non-vaccinated horses, as well as samples of horses from groups Vac-Basic and Vac-Plus at d0, which had received their first vaccination after the first blood sample collection, should not display a positive OspA color reaction signal at any time-point, since OspA AG is not expressed by active borreliae during an ongoing infection. In contrast, LB inactivated lysate vaccines available for horses contain OspA, thus, specific antibodies against OspA AG in serum are a consistent marker for immunization against LB. At sampling time-point d135, 121 days after the second immunization of group Vac-Basic and Vac-Plus, and at sampling time-point d210, 196 days after the last immunization of group Vac-Basic and 30 days after the third immunization of group Vac-Plus, a vaccination-specific positive OspA signal is expected for horses belonging to these two groups. Taking the humoral immune response of horses after immunization with commercial vaccines against LB into account, the OspA signal intensity result at d210 is expected to be stronger for samples of group Vac-Plus than those of Vac-Basic due to a more recent vaccination and, therefore, a higher antibody level in horses of group Vac-Plus [12]. It also needs to be considered that the application of lysate vaccines against LB in horses may result in the development of antibodies against a variety of other borreliae proteins that are expressed by borreliae *in vitro* (i. e., OspC, DbpA, BmpA, p58, or p100). That is, the appearance of respective immunocomplex reaction signals on LIA strips in combination with a positive reaction to OspA AG can occur in vaccinated animals. Thus, it should not be counted as infection-specific, yet be considered as vaccination-induced, and evaluation and allocation should be exercised accordingly. Only VlsE and C6 AG signals are highly specific markers for a *Bbsl*-infection, since those are only expressed by active borreliae *in vivo* [21].

Correspondingly to expected OspA-specific AB reactions in non-vaccinated horses, none of the three LIAs displayed a signal result for OspA equal to or greater than COC for none of the samples of non-vaccinated horses at any time-point. None of the three LIAs falsely identified non-vaccinated horses (horses of group Non-Vac at d0, d135, d210 and groups Vac-Basic and Vac-Plus at d0) as vaccinated. Nevertheless, the observed inter-rater agreement and IRR for OspA AG signal in this group was not greater than 70% and slight ($\kappa \leq 0,10$) at no point. Despite uniformly negatively rated OspA AG signal results for non-vaccinated horses, the sensitivity and specificity of tests in regard to OspA and, therefore, signal intensity results within the below-COC-range significantly varied between LIAs resulting in a low agreement of tests. While LIA A and LIA C demonstrated a high specificity in non-vaccinated horses in this context, LIA B by far displayed the lowest.

In contrast to a correct identification of non-vaccinated horses, none of the three tests correctly identified all vaccinated horses (Vac-Basic and Vac-Plus, $n = 89$). LIA B completely failed to positively detect OspA-specific AB in serum of all vaccinated horses at d135 and all Vac-Basic horses at d210, revealing a severe lack of sensitivity and specificity in this aspect. Although LIA A and LIA C demonstrated a significantly higher sensitivity and specificity towards OspA-specific AB, it was not satisfying in regard to Vac-Basic horses, either.

Next to a lack of sensitivity of tests, an additional explanation for the limited OspA detection rate in Vac-Basic horses may be an insufficient OspA AB titer in the vaccinated horses' blood samples. Besides an appropriate sensitivity of AG signals on a test, a sufficient OspA AB titer in vaccinated horses is essential for the correct detection of LB in horses and a successful differentiation from a vaccination, respectively. In this context, the high OspA detection rate in additionally vaccinated horses at d210 demonstrates that a gap in the vaccination schedule is disadvantageous while a tight vaccination schedule and a sufficient vaccination-induced AB titer (especially OspA-specific AB) are highly beneficial. On the one hand, it enables the highest possible protective effect against natural LB infection and disease. On the other hand, it facilitates the identification of vaccinated animals via OspA-specific AB, and their

differentiation from naturally infected animals. In other words, a sufficient OspA AB titer against *Bbsl* indicates a general vaccination-induced immunoreaction allowing a correct demarcation of vaccinated horses against naturally infected horses, and thus, limits the risk of possibly false-positive overall test results for vaccinated horses and its side effects.

Another issue concerning the correct identification of vaccinated horses was the interpretation of single AG lines and its overall evaluation and allocation in both, LIA A and LIA B.

In LIA A's evaluation manual supplied by the manufacturer, the OspA AG line was not at all considered as specific AG line in equine immunoreactions. Correspondingly, no allocation categories pertaining to a vaccination or both, a vaccination and an infection, were included in LIA A's basic evaluation manual. In consequence, despite that LIA A was technically capable of detecting OspA-specific AB at a high extent and simultaneously demonstrated a high sensitivity and reliable specificity in regard to OspA-specific AB, the positive OspA AG line results were not interpreted appropriately, resulting in many false-positive overall test results for vaccinated horses.

Similarly, in LIA B's evaluation manual supplied by the manufacturer—despite its consideration of the OspA AG line as vaccination-specific—the interpretation and allocation of single AG lines was fragmentary, too, resulting in misinterpretation of results of vaccinated horses. In comparison to the well-thought-out evaluation manual of LIA C, LIA B's technical manual did not further specify the case of a vaccination combined with an infection, thus, did not include an allocation category in the manual pertaining to this case. However, in the software respective samples were allocated to an additional allocation category termed “Positive—serological evidence of infection *or* immunization”. Being aware of the incorrect specification and terminology, pertinent samples were allocated to LIA C's VAC+POS allocation category in the statistical analysis performed. In this context, there was also no further specification regarding the interpretation of AG lines such as infection-specific VlsE AG line, clearly demonstrating a deficit in the evaluation and allocation protocol of LIA B, as well as a dubiety of the test's value pertaining to overall results for vaccinated horses.

Despite that the application of the alternative consistent evaluation protocol for equine serum samples as recommended above (ROEP) cannot compensate for different sensitivities of antigen-coats on LIA strips of the different manufacturers. The consistent evaluation protocol improved inter-rater agreement in group Vac-Plus at d210, when all three LIAs detected OspA-specific AB to an equal extent and subsequent interpretation of AG lines was exercised alike.

Regarding the identification of naturally infected horses (POS), or vaccinated and infected (VAC+POS), the VlsE (and C6) AG signal should be considered and evaluated as highly specific marker for a *Bbsl*-infection [21, 22]. Hereby, it is important that the sensitivity of a test's VlsE AG signal is sufficient to reliably detect VlsE-specific AB. Yet, its specificity in this aspect is of paramount importance since a positive VlsE AG signal result—in combination with possibly further positive AG lines (except OspA)—is highly indicative for an ongoing infection and the necessity of a prompt antibiotic treatment of the *Bbsl*-infected horse with clinical signs. Similarly, a too high sensitivity as well as a lack of specificity of the VlsE AG signal are equally precarious since it might entail a false-positive overall test result. Here, it needs to be deliberated on whether it is beneficial to have a very high sensitivity of VlsE AG signal on test strips and, in consequence, potentially a lack of specificity and a questionable significance of a test's “POS” overall test result. A down-regulation of sensitivity for VlsE AG signals might be advisable; that is, in case of doubt of an EQUIVOC test result determined by a less sensitive VlsE AG line, a test can always be repeated to dispel doubts regarding an infection—before starting a potentially unrequired antibiotic treatment triggered by an excessive sensitivity and false-positive diagnostic outcome.

In terms of the detection of VlsE-specific AB, LIA C demonstrated the highest sensitivity overall; it rated the greatest number of samples as “VlsE-positive” (signal \geq COC) followed by LIA B and LIA A. It stands out that in all three LIAs the Non-Vac-group continuously displayed the lowest number of samples rated as “VlsE-positive” in comparison to the vaccinated groups, while group Vac-Plus displayed the greatest number of samples with a VlsE signal intensity result above COC—at a considerably high extent in LIA C (up to 61% at d210). The inter-rater agreement regarding the detection of VlsE was poor to slight depending on time-point of sample collection and group, representing an unsatisfying agreement of tests on the one hand, and displaying a significant divergence in sensitivity and specificity of the three tests on the other hand. Considering that only equine sera have been used that formerly had been tested and rated as NEG or EQUIVOC with an in-house KELA and LIA, suggests that VlsE AG signal results of LIA A more likely picture reality than those of LIA B and LIA C. Nevertheless, the elevated detection rates in terms of VlsE-specific AB and, in this context, the high divergences in sensitivity and specificity of the three LIAs used, on the one hand portray the predicament considering the lack of replicability and reliability of diagnostic results across non-standardized serodiagnostic tests, and on the other hand, pose the question of its source.

Since none of the three LIAs displayed a significant increase in the number of VlsE-positive samples in any of the three study groups over the progressing sampling time-points in the observational period, it is unlikely that excessive VlsE-AB detection rates are linked to the application of lysate vaccines against *Bbsl*. Further, the possibility that the application of different LIA test kit LOTs per manufacturer may have had an impact on signal intensity results can be excluded as well, since only one LOT number per manufacturer has been applied for all samples tested. Our explanations for the disagreement of results pertaining to the detection of VlsE-specific AB and the comparatively high detection rate in group Vac-Plus are based on multiple reasons. Firstly, it seems that the Vac-Plus study group unknowingly compromised a higher number of naturally infected horses than study groups Non-Vac and Vac-Basic. Secondly, a rather small sample size per study group has been used in this project, hence, divergences in results are more striking; therefore, a greater sample size is preferable for several reasons. Thirdly, the cutoff control in LIA C seems to be poorly adjusted and too sensitive regarding the detection of VlsE-AB resulting in an unlikely high number of VlsE-positive samples. Thus, we highly recommend a revision and adjustment of LIA C in this aspect.

However, for dogs and humans it has been described that in patients with confirmed bacterial or viral infections (i. a. *Leptospira interrogans*, Epstein–Barr virus, Cytomegalovirus) certain borreliae test antigens commonly used in serodiagnostic assays for diagnosis of LB are the cause for cross-reactions to antibodies induced by other infectious agents not belonging to the genus *Borrelia* [34–38]. Hence, *Bbsl* antigens such as FlaB, but also OspC and BmpA are recognized nonspecifically by antibodies directed against other pathogens [36, 39]. Cross-reacting antibodies involve a high potential to generate false-positive test results and lead to a limited diagnostic value of a test. In consequence, a greater number of AG signal lines on a strip, particularly error-prone AGs such as p41 (FlaB), may have a negative impact on the effectiveness of a serotest. In view of the p41, only LIA C does contain it within its nine AG signal lines, while strips of LIA A, comprising seven AG signal lines, and LIA B, containing ten AG signal lines, excluded the p41 AG.

In view of overall test results of non-vaccinated and vaccinated horses, again, we recognize previously mentioned deficits of tests regarding sensitivity and specificity of single AG signals, as well as divergent interpretation of single AG lines. Those LIA-specific deficiencies resulted in a high number of false-positive overall test results, especially in vaccinated groups, and thus, in a low inter-rater agreement. Overall, by comparison of the three LIAs, LIA C demonstrated the utmost accuracy in terms of the overall diagnostic outcome.

The application of the ROEP achieved an improvement in the diagnostic accuracy, to an especially high extent in LIA A and LIA B. Next to the refined interpretation of infection- and vaccination-specific immunoreactions in equine sera, this standardized reference protocol covered borderline cases and cases that have not been specified before in LIA protocols supplied by manufacturers.

As emphasized earlier, the application of the ROEP also had influence on overall test results in the Non-Vac-group, yet only in LIA B. Application of the ROEP mainly resulted in a greater number of “EQUIVOC” samples. It suggests that these samples possibly were rated false-positive or false-negative in the first place. Hereby, an allocation to the “EQUIVOC” category is beneficial, since sample testing may be repeated and thus avoids inadequate treatment of the horse.

Since group Non-Vac functioned as non-vaccinated negative control group and was not influenced by possible effects of a vaccination, a high inter-rater agreement was expected. Yet, despite that group Non-Vac displayed the highest observed inter-rater agreement (d0: 71%, d135: 70%, d210: 63%) for overall test results at three time-points, its IRR was only slight with a low kappa ranging between 0.00 and 0.10 depending on time-point of sample collection. With application of the ROEP, the kappa significantly improved to fair at d0 and d135 ($\kappa = 0.22$), while the observed inter-rater agreement only slightly improved. Here it needs to be emphasized that the Fleiss' kappa, computing the inter-rater reliability of several raters rating the same thing by calculating the ratio between observed agreement (P_o) and agreement expected by chance (P_e), sometimes is difficult to interpret. At times, a paradox situation may be created, where a high level of observed raters' agreement might be represented by a low kappa value. This might be the case in group Non-Vac when displaying a high discrepancy between a high P_o and a low IRR. Taking this paradox into account, overall, group Non-Vac displays the highest observed agreement of the three experimental groups at all three time-points. Nevertheless, the agreement of results between raters is in need for improvement as well.

4.2. Handling, operability and evaluation procedure of LIAs

Handling and implementation of the three tests in the laboratory were similar with minor variations. While incubation trays of LIA A and LIA B have visibly numbered slots, LIA C's incubation trays lack this beneficial feature. Additionally, in LIA B it is advantageous that the washing buffer develops little bubbles when serum samples are added into slots of a well; it facilitates keeping track visually during the consecutive addition of samples to slots, particularly, since LIA B's strip numbers in a test-kit are often non-consecutive. In terms of preparing reagents for use, LIA A and LIA B require preparation of the conjugate by mixing conjugate concentrate with washing buffer; LIA C offers ready-to-use conjugate. Here, the instruction manual of LIA B seems to not have included any spare volume for the conjugate when calculating the necessary reaction volume per strip. In LIA B, the shape and the small size of the reagents' bottles and the bottles' mouth are disadvantageous; it is complicated and time-consuming to remove the full liquid volume of a bottle, a time-critical attribute when handling a high number of samples. Further, LIA A and LIA B feature shorter incubation times for serum and conjugate than LIA C (30 min versus 45 min). Further, the substrate incubation time is two minutes longer for LIA A compared to LIA B and LIA C (12 min versus 10 min).

LIA C offers a multi-species conjugate for both, canine and equine serum samples—a positive feature when the test is used in diagnostic laboratory receiving a variety of field samples; in contrast, test kits from LIA A and LIA B contain conjugate for only one species. In LIA A it is necessary to order the canine test kit (incl. test strips, buffer concentrate, canine COC, canine conjugate concentrate, substrate) in addition to the supplementary equine set (incl. equine COC and equine conjugate concentrate) in order to be able to test equine serum samples.

LIA strips need to be attached to an evaluation sheet. LIA B solves this issue elegantly, because the sheet surface becomes sticky when the wet LIA-strips are placed onto it. In LIA A and LIA C strips are attached to the evaluation sheet using a glue roller. In LIA A strips are evaluated visually by the examiner by comparing single AG signals on the test strip with the COC line on a separate sheet, and results are recorded manually. Thus, it is prone to human error; depending on the experience of the evaluator and light conditions the assessment might vary, and evaluation results are not equally precise and comparable as when performed with an automatic scanning and evaluation system as used in LIA B and LIA C. Here, though, evaluation sheets must be prepared in advance requiring specific software and a printer. In LIA C an individual barcode must be created for every single evaluation sheet containing up to 20 samples and test strips; the scanning and evaluation process is not feasible without functioning barcode on the sample sheet. In the case of LIA B it is advantageous that multiple evaluation sheets with up to 32 samples and test strips per sheet can be scanned, attached to each other, and evaluated by the software. After scanning, the color reaction for each AG line is displayed as a number from 0 to 255 in LIA B, and 0 to 9 in LIA C, and the sample is assessed overall by the software and allocated to an allocation category. Results can be stored in the program folder or exported as image or PDF file to an external folder. Additionally, LIA C's results can be exported as a Microsoft Excel file, which facilitates statistical analysis.

In the authors' opinion, the evaluation via a computerized scanning and evaluation system seems to be most suitable for the scientific field due to precise evaluation of samples and thus comparability. Also, result sheets can digitally and directly be sent to commissioning veterinarians as medical report. On the other hand, if technique fails, the personnel in the diagnostic laboratory must rely on visual evaluation, which can be challenging with strips of LIA B and LIA C since the COC line is located on the same strip as the sample AG signals.

In summary, all three LIAs showed positive and negative features in their handling and operability. In our view, LIA A and C are equally user-friendly in the laboratory use, while LIA B is preferable regarding the scanning and evaluation process.

5. Conclusions

Diagnosis of equine LB is a challenging venture. Serodiagnosis of LB in horses should only be applied to confirm infection with *Bbsl* in order to support clinical diagnosis. To avoid misdiagnosis of LB and mistreatment of the equine patient, it is of major importance to have practical, well applicable, reliable, highly specific serodiagnostic tests available. It should feature test strips with suitable AG signals with optimal sensitivity, high specificity, and the ability to accurately detect *Bbsl*-specific AB in serum samples of horses. Moreover, it should be able to distinguish between AB generated by a past or active natural infection as well as an immune response due to immunization. To address these key challenges and enhance diagnostic accuracy, validation and standardization of tests used for serodiagnosis of equine LB are required. In any case, practicing veterinarians and horse owners must be able to rely on the diagnostic outcome of a serodiagnostic test in order to initiate an appropriate treatment of an infected horse with a clinically apparent LB, only.

By assessing three commercial LIAs for LB diagnostics in equine serum we were able to demonstrate that the available LIAs are suitable for the purpose mentioned, yet, displayed deficiencies in sensitivity, specificity and interpretation of results leading to a limited diagnostic accuracy. Consequently, adjustments are required on several levels.

Firstly, sensitivity and specificity of single AG signals need refinement, in particular those of vaccination-specific OspA and infection-specific VlsE, and potentially other AG signals present on strips as well.

This is of major importance, because in regard to OspA a false-negative AG-AB immunocomplex signal result for OspA for vaccinated and non-infected horses may result in a false-positive diagnostic outcome. That is, possibly a certain amount of other, vaccination-induced AG-AB signals (except VlsE / C6) might appear positive, and such samples are then falsely classified as infected with LB, if the OspA signal is negative. In this context, we were able to demonstrate again, that OspA is vaccination-specific; it is not detectable in non-vaccinated horses and potentially not in some basic-vaccinated horses due to a low AB titer, yet, it is reliably detectable at a high extent at d210 in vaccinated horses undergoing a strict vaccination schedule with repeated vaccinations. In the case of VlsE AG, which are expressed by viable borreliae, only, misdiagnosis is just as dangerous for the patient. From this perspective, a readjustment and revision of LIA C is recommended due to the comparatively high detection rate of VlsE-specific AB across samples.

Secondly, it is essential to correctly interpret the OspA signal as vaccination-specific, as well as an additional variety of other AG-AB signals potentially induced by the application of lysate vaccines against LB in horses. That is, additional positive AG-AB signals (next to OspA) are possibly not indicative for an LB infection, unless VlsE / C6 signal is positive. Hereby, a revision of the technical manual of LIA A and LIA B is urgently expected and required.

With the established ROEP we provide a standard sample protocol as guideline for the evaluation and classification of equine serum samples in LIA in order to improve the diagnostic accuracy of LIAs, avoid over-diagnosis of equine LB and mistreatment of the equine patient.

Another desirable adjustment for all modern LIAs in the scientific field is the application of a computerized and automatic scanning and evaluation software as already supplied by LIA B and LIA C, but not LIA A. It speeds up the process, it is user-friendly and, most importantly, it is less prone to human error, allowing a precise evaluation of samples and thus comparability.

Supporting information

S1 Fig. Flowchart on the conduction of three line immunoassays (*LIA A, **LIA B, *LIA C) used for semi-quantitative detection of IgG antibody response against antigens that are specific for Borrelia species of the Bbsl. complex.** WB, washing and incubation buffer; *Aq. dest.*, *Aqua destillata*.

(TIF)

S2 Fig. LIA strips representative for vaccinated horses of group Vac-Plus displaying semi-quantitative antibody reactions against Bbsl-specific antigens during the observational period. Tested antigens are displayed on the left. The first LIA strip shows the COC which functions as coloration reference for the signal intensity of AG-AB immunocomplex reactions; during the evaluation process it is compared to the degree of color reaction intensity of signals on the test strips produced by serum samples tested. The following LIA strips on the right were incubated with equine sera from vaccinated horses in chronological order from d0 to d135 to d210. The color reaction intensity of the vaccination-specific OspA signal on the LIA strips is increasing over the observational period with a high at d210–30 days after the third vaccination of horses in group Vac-Plus. Vac-Plus, horses vaccinated on d0, d14 and d180; d, day; COC, cutoff control; VlsE, variable major protein-like sequence expressed; Osp, outer surface protein; DbpA, decorine binding protein A; BmpA, *Borrelia* membrane protein A; kDa, kilodalton; AG, antigen; AB, antibody.

(TIF)

S1 Table. Serostatus of horses used in this study.

(DOCX)

S2 Table. Line immunoassays used in this study.

(DOCX)

S3 Table. Inter-rater agreement in OspA and VlsE AG-AB immunocomplex signal intensity results at three time-points of blood collection—calculation of observed inter-rater agreement (P_o) and statistic inter-rater reliability (IRR), represented by Fleiss' kappa coefficient (κ).

(DOCX)

S4 Table. Inter-rater agreement in overall test results at three time-points of blood collection—calculation of observed inter-rater agreement (P_o) and statistic inter-rater reliability (IRR), represented by Fleiss' kappa coefficient (κ).

(DOCX)

S5 Table. LIA B—group Non-Vac—divergent allocation results for equine serum samples in the non-vaccinated group due to application of the alternative recommended overall evaluation protocol (ROEP).

(DOCX)

S6 Table. Abbreviations.

(DOCX)

Author Contributions**Conceptualization:** Cornelia V. Broeckl, Reinhard K. Straubinger.**Data curation:** Cornelia V. Broeckl.**Formal analysis:** Cornelia V. Broeckl.**Investigation:** Cornelia V. Broeckl, Stephanie Hiereth.**Methodology:** Cornelia V. Broeckl.**Project administration:** Reinhard K. Straubinger.**Resources:** Reinhard K. Straubinger.**Supervision:** Reinhard K. Straubinger.**Validation:** Cornelia V. Broeckl, Stephanie Hiereth, Reinhard K. Straubinger.**Visualization:** Cornelia V. Broeckl.**Writing – original draft:** Cornelia V. Broeckl.**Writing – review & editing:** Cornelia V. Broeckl, Reinhard K. Straubinger.**References**

1. Alkiske AA, Peterson AT, Samy AM. Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. *PLoS One*. 2017; 12(12):e0189092.
2. Janzen T, Hammer M, Petersson M, Dinnetz P. Factors responsible for *Ixodes ricinus* presence and abundance across a natural-urban gradient. *PLoS One*. 2023; 18(5):e0285841.
3. Asghar N, Petersson M, Johansson M, Dinnetz P. Local landscape effects on population dynamics of *Ixodes ricinus*. *Geospat Health*. 2016; 11(3):487.
4. Burn L, Tran TMP, Pilz A, Vyse A, Fletcher MA, Angulo FJ, et al. Incidence of Lyme Borreliosis in Europe from National Surveillance Systems (2005–2020). *Vector-Borne Zoonot*. 2023; 23(4):156–71. <https://doi.org/10.1089/vbz.2022.0071> PMID: 37071405

5. Goren A, Viljugrein H, Rivrud IM, Jore S, Bakka H, Vindenes Y, et al. The emergence and shift in seasonality of Lyme borreliosis in Northern Europe. *P Roy Soc B-Biol Sci.* 2023; 290(1993). <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.2420> PMID: 36809802
6. Gehlen H, Inerle K, Bartel A, Stöckle SD, Ulrich S, Briese B, et al. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* Infections in German Horses. *Animals (Basel).* 2023; 13(12).
7. Kasparkova N, Bartova E, Zakovska A, Budikova M, Sedlak K. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Clinically Healthy and Sick Horses: First Report from the Czech Republic. *Microorganisms.* 2023; 11(7).
8. Swinebroad EL. Borreliosis in Sport Horse Practice. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2018; 34(2):313–43. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2018.04.011> PMID: 30007449
9. Scherrer NM, Knickelbein KE, Engiles JB, Johnstone LK, Tewari D, Johnson AL. Ocular disease in horses with confirmed ocular or central nervous system *Borrelia* infection: Case series and review of literature. *Vet Ophthalmol.* 2020; 23(6):1014–24.
10. Butler CM, Houwers DJ, Jongejan F, van der Kolk JH. *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. *Vet Q.* 2005; 27(4):146–56.
11. Gehlen H, Inerle KS, Ulrich S, Briese B, Straubinger RK. Equine Lyme borreliosis and equine granulocytic anaplasmosis Part 2-Clinical relevance (Vet survey). *Pferdeheilkunde.* 2022; 38(6):544–53.
12. Knodlseder 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(49):7207–12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.087> PMID: 31635975
13. StIKoVet, Feige K, Lohmann K, Köhler M, Mueller S, Straubinger RK, et al. Leitlinie zur Impfung von Pferden—Ständige Impfkommision Veterinärmedizin (StIKo Vet) am FLI—Stand 01.03.2023. Leitlinie zur Impfung von Pferden. Friedrich-Loeffler-Institut (FLI); 2023.
14. Gipson CL, de Silva AM. Interactions of OspA monoclonal antibody C3.78 with *Borrelia burgdorferi* within ticks. *Infect Immun.* 2005; 73(3):1644–7.
15. Pal U, Montgomery RR, Lusitani D, Voet P, Weynants V, Malawista SE, et al. Inhibition of *Borrelia burgdorferi*-tick interactions in vivo by outer surface protein A antibody. *J Immunol.* 2001; 166(12):7398–403.
16. Khusro A, Aarti C, Buendia-Rodríguez G, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Barbabosa-Pliego A. Adverse Effect of Antibiotics Administration on Horse Health: An Overview. *J Equine Vet Sci.* 2021; 97:103339. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103339> PMID: 33478757
17. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis.* 1993; 167(2):392–400. <https://doi.org/10.1093/infdis/167.2.392> PMID: 8380611
18. Hulinska D. [Diagnosis of Lyme borreliosis with western blotting]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 1997; 46(1):3–8.
19. 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(1). <https://doi.org/10.3390/vaccines11010043> PMID: 36679888
20. Gauthier DT, Mansfield LS. Western immunoblot analysis for distinguishing vaccination and infection status with *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) in dogs. *J Vet Diagn Invest.* 1999; 11(3):259–65.
21. 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(5):349–54.
22. Philipp MT, Bowers LC, Fawcett PT, Jacobs MB, Liang FT, Marques AR, et al. Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. *J Infect Dis.* 2001; 184(7):870–8. <https://doi.org/10.1086/323392> PMID: 11550127
23. Smismans A, Goossens VJ, Nulens E, Bruggeman CA. Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(7):648–55. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01448.x> PMID: 16774561
24. Fleiss JL. Measuring Nominal Scale Agreement among Many Raters. *Psychol Bull.* 1971; 76(5):378–8.
25. Fleiss JLaC J. The equivalence of weighted kappa and the intraclass correlation coefficient as measures of reliability" in Educational and Psychological Measurement. 1973.
26. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33(1):159–74. PMID: 843571
27. Bosler EM, Cohen DP, Schulze TL, Olsen C, Bernard W, Lissman B. Host responses to *Borrelia burgdorferi* in dogs and horses. *Ann N Y Acad Sci.* 1988; 539:221–34.

28. Burgess EC, Gillette D, Pickett JP. Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. *J Am Vet Med Assoc.* 1986; 189(10):1340–2.
29. Burgess EC, Mattison M. Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *J Am Vet Med Assoc.* 1987; 191(11):1457–8.
30. Burgess EC, Gendron-Fitzpatrick A, editors. Experimental infection of equines with *Borrelia burgdorferi*. Lyme Borreliosis 1990, Stockholm (Sweden), 18–21 Jun 1990; 1990.
31. Browning A, Carter SD, Barnes A, May C, Bennett D. Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. *Vet Rec.* 1993; 132(24):610–1.
32. Priest HL, Irby NL, Schlafer DH, Divers TJ, Wagner B, Glaser AL, et al. Diagnosis of *Borrelia*-associated uveitis in two horses. *Vet Ophthalmol.* 2012; 15(6):398–405.
33. Passamonti F, Veronesi F, Cappelli K, Capomaccio S, Reginato A, Miglio A, et al. Polysynovitis in a horse due to *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection -Case study. *Ann Agric Environ Med.* 2015; 22(2):247–50.
34. Luft BJ, Dunn JJ, Dattwyler RJ, Gorgone G, Gorevic PD, Schubach WH. Cross-reactive antigenic domains of the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*. *Res Microbiol.* 1993; 144(4):251–7.
35. Shin SJ, Chang YF, Jacobson RH, Shaw E, Lauderdale TL, Appel MJ, et al. 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(1–2):161–74.
36. Grazlewska W, Holec-Gasior L. Antibody Cross-Reactivity in Serodiagnosis of Lyme Disease. *Antibodies (Basel).* 2023; 12(4). <https://doi.org/10.3390/antib12040063> PMID: 37873860
37. Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1992; 11(3):224–32.
38. Wojciechowska-Koszko I, Kwiatkowski P, Sienkiewicz M, Kowalczyk M, Kowalczyk E, Dolegowska B. Cross-Reactive Results in Serological Tests for Borreliosis in Patients with Active Viral Infections. *Pathogens.* 2022; 11(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens11020203> PMID: 35215146
39. Magnarelli LA, Lawrenz M, Norris SJ, Fikrig E. Comparative reactivity of human sera to recombinant VisE and other *Borrelia burgdorferi* antigens in class-specific enzyme-linked immunosorbent assays for Lyme borreliosis. *J Med Microbiol.* 2002; 51(8):649–55. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-8-649> PMID: 12171295

IV. DISKUSSION

1. Grundlage für diese Studie & Zielsetzung

Sowohl beim Menschen als auch bei Haussäugetieren wie Pferden wurden bei klinisch Gesunden, die in erhöhtem Maße mit *Bbsl*-infizierten Zecken in Berührung kommen (z. B. häufiger Aufenthalt im Freien), mit einem hohen Prozentsatz deutlich positive AK-Spiegel gegen LB-Borrelien nachgewiesen. Diverse Studien aus Europa und nichteuropäischen Ländern zeigen, dass die Prävalenz subklinisch *Bbsl*-Infizierter hoch ist (MÜNCHHOFF et al., 1987; VENNER&DEEGEN, 1996; MAGNARELLI et al., 2000a; MULLER et al., 2002; MARKOWICZ et al., 2021; GEHLEN et al., 2023; KASPARKOVA et al., 2023). Vor allem Pferde, die sich viel im Freiland aufhalten und in Endemiegebieten einem hohen Infektionsdruck ausgesetzt sind, sind prädestiniert für die *Bbsl*-Seropositivität (MULLER et al., 2002; GEHLEN et al., 2023).

Dabei gibt es eine Alterskomponente, wobei die Wahrscheinlichkeit einer *Bbsl*-Seropositivität mit dem Alter der Tiere zunimmt (MULLER et al., 2002; FUNK et al., 2016). Nach einer Erstinfektion mit *Bbsl* erfolgen wiederholte Reinfektionen im Laufe der Zeit, wobei diese im Immunoblot durch das Erscheinen zusätzlicher AG-AK-Komplex-Banden charakterisiert sind. Dauerhaft exponierte Pferde zeigen dabei ein stabil verlaufendes Bandenmuster über die Jahre, während nach Erstinfektion nicht mehr exponierte Pferde eine Reduktion der Bandenanzahl und Bandenstärke im Immunoblot zeigen (MULLER et al., 2002).

Eine *Bbsl*-Infektion ist beim Pferd eher von geringer klinischer Relevanz (DIVERS et al, 2018). In der Praxis wird die LB bei Pferden jedoch oft überdiagnostiziert (BARTOL, 2013; STRAUBINGER, 2017). Grundsätzlich sollten nur Pferde mit klinischen Anzeichen, die auf eine LB hindeuten (u. a. intermittierende Lahmheit), und einem positiven serodiagnostischen Testergebnis eine antibiotische Behandlung erhalten (DIVERS, 2013). Ein positiver AK-Spiegel gegen spezifische *Bbsl*-AG allein ist jedenfalls kein ausreichender Beweis für eine eLB-Erkrankung, sondern nur ein Indiz dafür, dass ein Erregerkontakt stattgefunden hat, entweder durch eine vergangene Exposition oder aber auch durch eine Impfung gegen die eLB (VENNER&DEEGEN, 1996; CHANG et al., 2000; MULLER et al., 2002; MARKOWICZ et al., 2021; GEHLEN et al., 2023; KASPARKOVA et al., 2023). Folglich sind eine *Bbsl*-Infektion und eine LB-Erkrankung bei Pferden zwei völlig verschiedene Entitäten.

Vor allem bei Pferden aus *Bbsl*-Endemiegebieten mit hohem natürlichen Infektionsdruck muss dieses Wissen bei der Diagnosestellung einer eLB mit in Betracht gezogen werden, ebenso wie eine möglicherweise erfolgte Immunisierung gegen eLB und deren Auswirkungen auf den Serostatus des geimpften Pferdes (KNODLSEDER et al., 2019; GEHLEN et al., 2023; STIKOVET et al., 2023). Ist der Impfstatus zum Zeitpunkt der Durchführung einer AK-Diagnostik nicht bekannt, oder

wurde die Immunisierung nicht regelmäßig aufgefrischt, kann dies eine potenzielle Fehlerquelle in der *Bbsl*-spezifischen AK-Diagnostik darstellen und zu falsch-positiven Ergebnissen für Geimpfte und nachteiligen Folgen führen (ZHANG et al., 1997b; AGUERO-ROSENFELD et al., 1999; FAWCETT et al., 2004; WORMSER, 2022).

Neben dem Bekanntsein von Exposition und Impfstatus sowie dem Vorhandensein eines ausreichenden protektiven Impftiters, ist für die akkurate *Bbsl*-spezifische AK-Diagnostik ebenso essenziell, dass hochsensitive und hochspezifische labordiagnostische Nachweisverfahren zur Verfügung stehen, die eine zuverlässige Differenzierung von impf- und infektionsspezifischen AK zulassen und reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse produzieren.

Derzeit werden nur spezifische AK-Bestimmungen im equinen Serum mittels ELISA und Immunoblot (WB, LIA) in Form eines Zweistufentestes für die LB-Diagnosefindung als aussagekräftig erachtet (JOHNSON&HALPERIN, 2011; LEHMANN et al., 2017; DIVERS et al., 2018). Jedoch sind diese indirekten Nachweisverfahren noch nicht ausgereift. Die Anwendung von teilweise nicht für Pferde validierten und nicht-standardisierten Testverfahren, die eine eingeschränkte Sensitivität und Spezifität sowie Defizite in der Ergebnisinterpretation aufweisen und dadurch falsch-negative und falsch-positive Ergebnissen produzieren können, erschweren die Diagnostik der eLB sehr (JOHNSON et al., 2008; WAGNER et al., 2013; SCHVARTZ et al., 2015; DOFF et al., 2022; BROECKL et al., 2024). Die Übereinstimmung von Testergebnissen äquivalenter Tests von unterschiedlichen Herstellern für ein und dasselbe untersuchte Pferdeserum ist oft nicht gegeben, was die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der Testergebnisse mindert, die klinische Entscheidungsfindung erschwert und in einer Fehlbehandlung des Patienten resultieren kann (MULLER et al., 2002; SCHVARTZ et al., 2015; PALM, 2016; DOFF et al., 2022; BROECKL et al., 2024). Einerseits kann ein falsch-negatives Testergebnis zu einer unentdeckten oder spät diagnostizierten Infektion und das Ausbleiben einer angemessenen antibiotischen Behandlung führen, was potenziell persistierende klinische Anzeichen nach sich ziehen kann. Andererseits ist ein falsch-positives Testergebnis gleichermaßen problematisch, da eine unnötige antibiotische Behandlung gravierende Auswirkungen auf die Gesundheit des Pferdes haben (Effekte einer Überempfindlichkeit gegenüber Antibiotika, Diarrhöe aufgrund einer Colitis, erhöhtes Risiko für zusätzliche Infektionen) sowie das Risiko der Entwicklung einer Antibiotikaresistenz in anderen, vorhandenen Bakterien steigern kann.

Um den Ansprüchen einer Diagnostik im Sinne eines Goldstandardtests zu genügen und um aussagekräftig zu sein, müssen Testverfahren wie der LIA zur *Bbsl*-AK-Diagnostik sehr sensitiv, hochspezifisch, validiert und standardisiert sein (BROECKL et al., 2024). Auch müssen sie in der Lage sein, spezifische impf- und infektionsinduzierte AK gegen *Bbsl*-AG zu detektieren und zu differenzieren – sowohl technisch als auch bei der Ergebnisklassifizierung und Ergebnisinterpretation –, um fehlerhaften Ergebnissen sowie einer Fehldiagnose und

Fehlbehandlung des Pferdes vorzubeugen (ALVAREZ-NARVAEZ et al., 2020; ARNOLD et al., 2021). Diesbezüglich wichtige Detektions-AG, die in Testverfahren zum Nachweis spezifischer AK gegen *Bbsl* inkludiert sein sollten, und eine Differenzierung von geimpften und infizierten Pferden erlauben, sind VlsE/ C₆ (infektionsspezifisch) und OspA (impfspezifisch) (MARQUES et al., 2002; LEHMANN et al., 2017; BROECKL et al., 2024). Rekombinante Detektions-AG sind dabei jenen aus Vollerregerlysate zu bevorzugen, da sie eine höhere Sensitivität und Spezifität gegenüber den AG der verschiedenen Genospezies des *Bbsl*-Komplexes demonstrieren (SCHÖNERT et al., 2002; WILSKE et al., 2007). Darüber hinaus muss ein LIA einfach und benutzerfreundlich in der Anwendung und Durchführung sein.

Bisher erfolgte eine erforderliche Evaluierung und Validierung der verfügbaren indirekten *Bbsl*-Nachweisverfahren für die equine Serodiagnostik nur in sehr eingeschränktem Maße, eine Standardisierung hingegen blieb aus (MAGNARELLI&ANDERSON, 1989; MULLER et al., 2002; CHANDRASHEKAR et al., 2008; JOHNSON et al., 2008; WAGNER et al., 2011; SCHVARTZ et al., 2015; PALM, 2016; NEELY et al., 2021; DOFF et al., 2022; KASPARKOVA et al., 2023).

Die Anwender dieser Arbeit haben sich deshalb zum Ziel gesetzt, drei verschiedene für die speziesspezifische eLB-Serodiagnostik in Deutschland zur Verfügung stehende, nicht-standardisierte IgG-AK-Bestätigungstests in Form von LIAs detailliert zu analysieren, Stärken und Schwächen der einzelnen Tests herauszuarbeiten, die LIAs im Gesamten zu evaluieren sowie ein einheitliches LIA-Ergebnisinterpretationsprotokoll für equine Seren zu etablieren, um eine Standardisierung und verbesserte Reproduzierbarkeit in der Serodiagnostik der eLB mittels LIA zu erreichen. Neben ihrer technischen Funktionalität wurden die drei LIAs verschiedener Hersteller hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität gegenüber spezifischen AK gegen rekombinante, aufgereinigte *Bbsl*-Detektions-AG analysiert und es erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse und eine statistische Analyse der Übereinstimmung der Testergebnisse der drei LIAs. Dabei wurde gezielt ein besonderes Augenmerk auf geimpfte und ungeimpfte Pferde gerichtet und die Fähigkeit der einzelnen Tests, impf- und infektionsspezifische AK (OspA und VlsE) zu detektieren und angemessen zu interpretieren. Zusätzlich wurden die AG-Signale aller drei LIAs mittels eines einheitlichen und empfohlenen Ergebnisinterpretationsprotokolls (ROEP, engl. *recommended overall evaluation protocol*) erneut interpretiert und klassifiziert, mit dem Ziel, die Serodiagnose der eLB über verschiedene LIAs hinweg auszufeuern und zu standardisieren.

2. Auswahl der Studiengruppen

Für diese Studie wurden 393 equine Serumproben von 131 verschiedenen, klinisch gesunden Pferden mit unterschiedlichem, jedoch bekanntem Impf- und Serostatus verwendet. Die Proben

entstammten einer vorangegangenen Impfstudie mit Pferden, die intramuskulär mit dem Impfstoff EquiLyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Germany) gegen eLB geimpft worden waren (KNODLSEDER et al., 2019). Eine Dosis (1 ml) der Lysatvakzine enthielt die Erreger *Bbss*, *B. afzelii* und *B. garinii* in inaktivierter Form, als Adjuvans fungierte Aluminiumhydroxid. In der Studie wurde die Pferdepopulation in drei Impfgruppen unterteilt: eine im Studienzeitraum (13 Monate) dreifach gegen eLB geimpfte Gruppe A (Vac-Basic), eine vierfach geimpfte Gruppe B (Vac-Plus) und eine ungeimpfte Kontrollgruppe C (Non-Vac).

Die Pferde in Gruppe A wurden, der derzeitigen Impfempfehlung entsprechend, zweimal im Abstand von vierzehn Tagen grundimmunisiert und erhielten zwölf Monate später eine Auffrischungsimpfung (AI). Die Tiere in Gruppe B erhielten, neben der zweimaligen Grundimmunisierung (GI) im Abstand von zwei Wochen und der AI nach zwölf Monaten, eine zusätzliche AG-Applikation nach bereits sechs Monate nach GI (Abb. 10). Bei der Gruppe C hingegen handelte es sich um eine Kontrollgruppe, die nicht geimpft wurde. Zur Beurteilung des Impferfolges fanden in zweimonatigen Intervallen serologische Untersuchungen statt (KNODLSEDER et al., 2019). Die entnommenen Seren wurden von Knödlseeder et al. jeweils mit einem institutseigenen, validierten Zweistufentest, bestehend aus einem quantitativen Kinetischen ELISA (KELA) und einem qualitativen LIA, auf impfinduzierte, spezifische AK gegen *Bbsl*-AG untersucht und der Verlauf der Veränderungen im AK-Spiegel über den Studienzeitraum statistisch analysiert und gruppenweise grafisch dargestellt (Abb. 9) (KNODLSEDER et al., 2019).

Für die Studie von Bröckl et al. wurden ausschließlich Seren von Pferden verwendet, die vorab von Knödlseeder et al. im institutseigenen Zweistufentest hinsichtlich einer *Bbsl*-Infektion als seronegativ oder schwach grenzwertig, also als „nicht-infiziert“ evaluiert worden waren (Gruppe A (Vac-Basic), $n = 45$; Gruppe B (Vac-Plus), $n = 44$; Gruppe C (Non-Vac), $n = 42$). Außerdem wurden nur jene Seren dieser 131 ausgewählten Pferde getestet, die von Knödlseeder et al. während des Studienzeitraumes an Tag 0 (d0; vor der ersten Immunisierung), Tag 135 (d135; vor der AI von Gruppe B) und Tag 210 (d210; 30 Tage nach der AI von Gruppe B) den Pferden entnommen worden waren (Abb. 10).

Der Hintergrund der Serenselektion war, zu demonstrieren, dass, abhängig vom Zeitpunkt der letzten Immunisierung, signifikante Unterschiede in der spezifischen Immunantwort zu beobachten sind. Das heißt, an Tag 0 war kein Nachweis von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG in nicht-infizierten Pferden in keiner der drei Gruppen zu erwarten, da die erste Impfung erst nach der ersten Blutentnahme erfolgte. An Tag 135 sollte jedoch ein positiver Impf-AK-Titer (insbesondere positives OspA-Farbreaktionssignal) sowohl in Gruppe A als auch Gruppe B zu verzeichnen sein, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen zu erwarten war, da beide Gruppen in gleicher Weise grundimmunisiert worden waren. An Tag 210 hingegen war mit einem signifikanten Unterschied im Impf-AK-Titer der beiden immunisierten Gruppen zu rechnen, da zu

diesem Zeitpunkt bei Pferden, die keine AI an Tag 180 erhalten hatten, der protektive AK-Titer bereits signifikant abgefallen sein sollte, während an Tag 180 geboosterte Pferde der Gruppe B einen vergleichsweise hohen protektiven AK-Titer aufweisen sollten (Abb. 9) (KNODLSEDER et al., 2019).

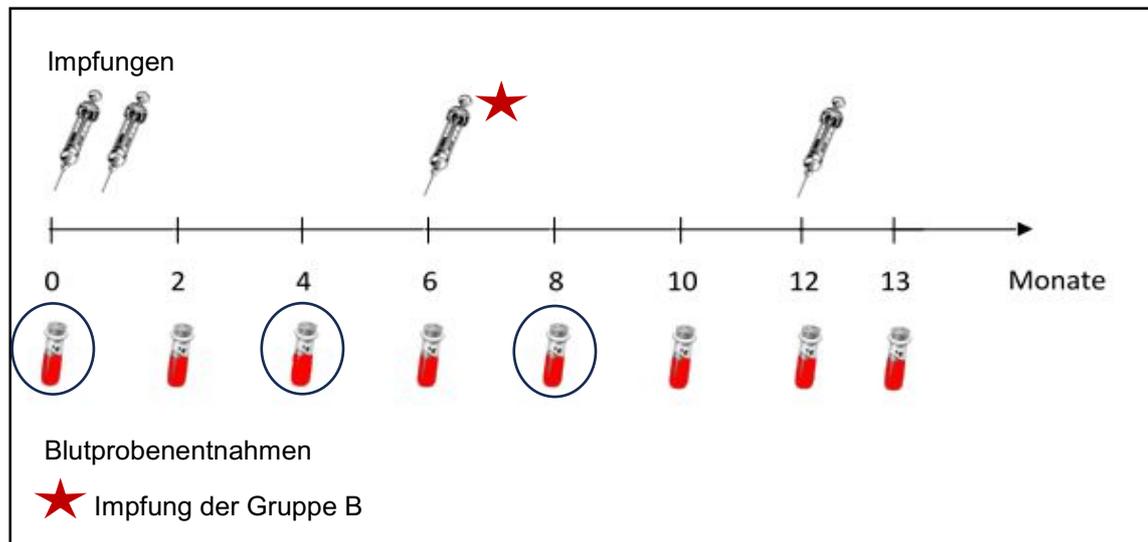
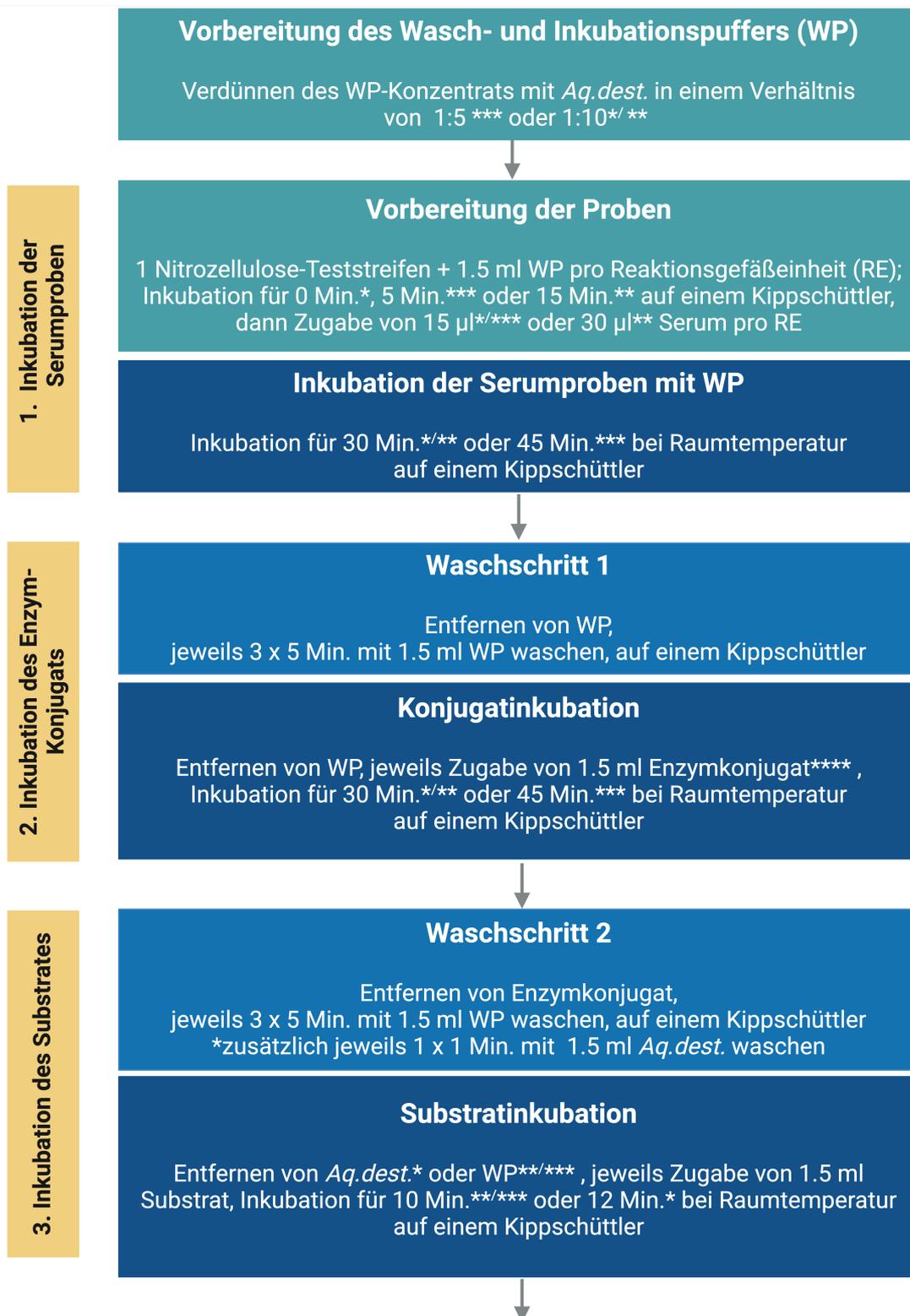


Abbildung 10: Immunisierungsschema in einer Impfstudie mit EquiLyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Germany) (KNODLSEDER et al., 2019).

Pferde der Studiengruppe A wurden während des Studienzeitraumes von 13 Monaten an Tag 0, 14 und 365 ± 3 geimpft, Pferde der Studiengruppe B wurden gleichermaßen geimpft wie Studiengruppe A, erhielten jedoch eine zusätzliche Auffrischungsimpfung an Tag 180 (★). Zur Beurteilung des Impferfolges erfolgten Blutprobenentnahmen in zweimonatigen Intervallen. Für die Studie von Bröckl et al. wurden Seren von Pferden verwendet, die im Studienzeitraum an Tag 0, 135 und 210 entnommen worden waren (○) (BROECKL et al., 2024).

3. Vor- und Nachteile in der technischen Durchführung

Die drei in der Studie analysierten semi-quantitativen LIAs wurden jeweils mit 393 ausgewählten Pferdeseren (131 Seren pro Probenentnahme-Zeitpunkt (ZP) d0, d135 und d210) getestet. Die Durchführung der serologischen Untersuchungen mit dem speziesspezifischen LIA A (VIROTECH® Borrelia Vet. + OspA IgG LINE Immunoblot (Germany); kurz: Virotech LIA), LIA B (EUROIMMUN Anti-Borrelia-EUROLINE horse (IgG) (Germany); kurz: Euroimmun LIA) und LIA C (MEGACOR MegaLINE® BORRELIA IgG ad. us. vet. LINE immunoassay (Austria); kurz: Megacor LIA) erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Die Anwendung aller drei LIAs war benutzerfreundlich und einfach, die labordiagnostische Durchführung war ähnlich, wobei sich nur vereinzelt Unterschiede zwischen den Tests ergaben (Abb. 11).



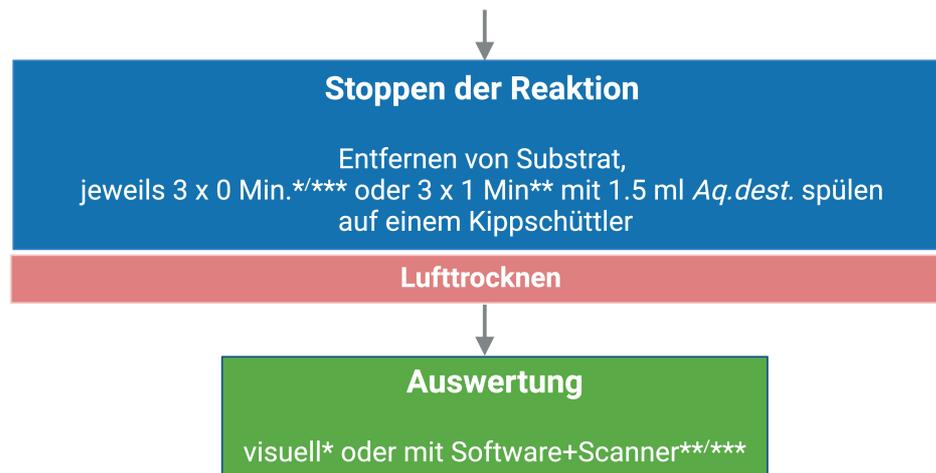


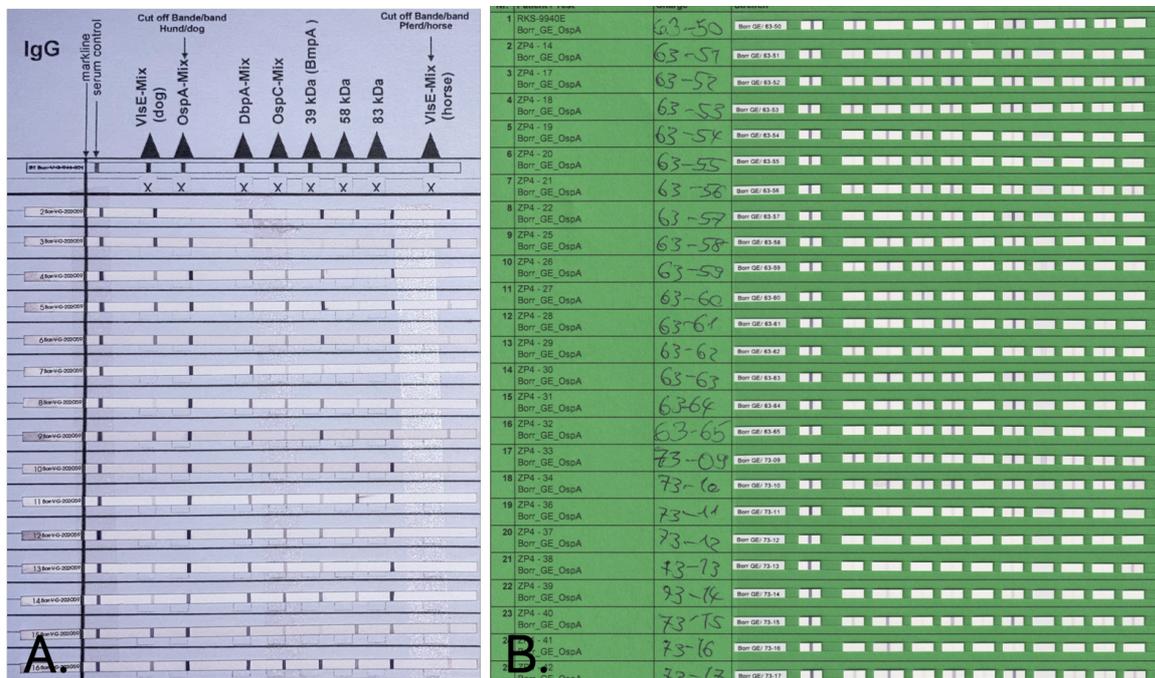
Abbildung 11: Fließdiagramm zur labordiagnostischen Durchführung von LIA A*, LIA B** und LIA C***, die dem semi-quantitativen Nachweis von spezifischen IgG-AK gegen *Bbsl*-AG in Pferdeserum dienen (BROECKL et al., 2024).

WP, Wasch- und Inkubationspuffer; *Aq. dest.*, *Aqua destillata*; RE, Reaktionsgefäßeinheit (engl. *well*).

Beim Pipettieren der Serumproben war es vorteilhaft und der Übersicht dienlich, dass die Reaktionsgefäßeinheiten eine fortlaufende, sichtbare Nummerierung aufwiesen (LIA A und LIA B). Ein weiterer Vorteil ergab sich aus einem gebrauchsfertigen, zügig zu verwendenden Konjugat (LIA C), welches keiner vorausgehenden Vorbereitung bedurfte. Zeitsparend waren außerdem kürzere Inkubationszeiten bei der Serum- und Konjugatinkubation (LIA A, LIA B) bzw. der Substratinkubation (LIA B, LIA C). Von LIA C bestand ein weiterer Vorzug darin, dass ein Multi-Spezies-Konjugat zur Verfügung stand, also sowohl Hunde- als auch Pferdeseren gleichermaßen damit getestet werden können. Vor allem in Diagnostiklaboren, die Seren von mehr als einer Tierart untersuchen, ist dies erwünscht. In diesem Zusammenhang war es nachteilig, dass man für die Durchführung von LIA A mit equinen Seren ein extra „Pferde-Kit“ bestellen musste, das mit dem „Hunde-Kit“ zu kombinieren ist. Ersteres enthält dabei nur das pferdespezifische AK-Konjugat-Konzentrat und die Referenzprobe (engl. *cutoff control*, COC) für Pferde, während das Hunde-Kit die benötigten Teststreifen, das Waschpufferkonzentrat, die Hunde-COC und das hundespezifische AK-Konjugat-Konzentrat sowie das Substrat enthält. Folglich ist eine Untersuchung von Pferdeseren ohne das Hunde-Kit nicht möglich, und wenn im Labor keine Hundeseren untersucht werden, sind die hundespezifischen Bestandteile des Kits zu verwerfen, was einen zusätzlichen finanziellen Aufwand sowie eine Verschwendung von Labormaterial darstellt. Bei LIA B war nachteilig, dass die Teststreifen keine fortlaufende Nummerierung hatten, was zu Verwirrung führen kann. Außerdem wurden für die zu verwendenden Flüssigkeiten keine Reservevolumina einberechnet (z. B. Benetzung der Flascheninnenfläche, Totraumvolumen beim Pipettieren), weshalb diese meist für die letzte kalkulierte Probe nicht ausreichten (Kit für 32 zu testende Seren

reichte nur für 31 Seren). Außerdem wiesen die Reagenzienfläschchen eine sehr geringe Größe sowie eine benutzerunfreundliche Form auf, wobei man das Restvolumen nur sehr umständlich und zeitaufwendig aus den Gefäßen herausbekam. Dies ist nachteilig, wenn viele Proben hintereinander und zügig pipettiert werden müssen.

Schlussendlich zeigten sich, nach Beendigung der technischen Durchführung, Unterschiede in der Applikation der Teststreifen auf Auswertebögen, sowie in der Auswertung, Evaluierung der einzelnen LIA-Banden und Interpretation der Ergebnisse (Abb. 12). Vor allem im wissenschaftlichen Bereich ist es erstrebenswert, eine computergestützte, automatisierte Auswertung und Interpretation der Ergebnisse mittels Scanner und spezieller Software (LIA B, LIA C) zu nutzen, da eine visuelle Auswertung (LIA A) durch die durchführende Person stets subjektiv, weniger präzise, nicht einheitlich und fehleranfällig ist und daher eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit mit sich bringt. Darüber hinaus können Ergebnisse digital dokumentiert und daher ohne Qualitätsverlust aufbewahrt werden, im Vergleich zu händisch dokumentierten und aufbewahrten Ergebnissen, die anfällig für Umwelteinflüsse sind. Die statistische Analyse wird durch einen Export als Excel-Datei (LIA C) erleichtert. Allerdings sind technische Geräte notwendig, was einen finanziellen Mehraufwand und den Bedarf an technisch geschultem Personal bedeutet.



StripID	FC	LabID	Test	Lot-Nr.
1		RKS-9940-E	BORRELIA IgG	ML-B-012
2		ZP4 - 192	BORRELIA IgG	ML-B-012
3		ZP4 - 193	BORRELIA IgG	ML-B-012
4		ZP4 - 194	BORRELIA IgG	ML-B-012
5		ZP0 - 28	BORRELIA IgG	ML-B-012
6		ZP3 - 28	BORRELIA IgG	ML-B-012
7		ZP3 - 51	BORRELIA IgG	ML-B-012
8		ZP3 - 95	BORRELIA IgG	ML-B-012
9		ZP3 - 165	BORRELIA IgG	ML-B-012
10		ZP4 - 28	BORRELIA IgG	ML-B-012
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

C.

Abbildung 12: Auswertebögen von LIA A, LIA B und LIA C mit manuell applizierten LIA-Teststreifen.

(A.) Auswertebogen von LIA A; die Evaluierung und Interpretation der Ergebnisse erfolgen visuell und subjektiv, die Ergebnisdokumentation findet manuell statt. (B.) Auswertebogen von LIA B; die Evaluierung und Interpretation der Ergebnisse erfolgen computerbasiert mittels Scanner und Software, die Aufbewahrung findet digital statt. (C.) Auswertebogen von LIA C; die Erstellung des Auswertebogens (inklusive individuellem Barcode pro Testlauf) sowie die Evaluierung und Interpretation der Ergebnisse erfolgen komplett computerbasiert mittels Scanner und Software. Die Aufbewahrung findet digital statt.

4. Labordiagnostische Ergebnisse: Unterschiede in Sensitivität, Spezifität und der Interpretation von LIA-Banden

Die equine Seren wurden auf ihren spezifischen AK-Gehalt gegen *Bbsl*-AG jeweils mittels drei semiquantitativen LIAs untersucht. Pro untersuchtes Pferdeserum wurden die Ergebnisse für einzelne Signalbanden bzw. Farbreaktionssignale (Farbintensität der AG-AK-Immunokomplex-Signale) auf einem LIA-Streifen analysiert und per Studiengruppe, Probennahme-ZP und LIA aufgeschlüsselt. Außerdem wurden die Bandenergebnisse für individuelle Ziel-AG nach Herstellervorgaben des jeweiligen LIAs ausgewertet, interpretiert, kategorisiert und schlussendlich wurden die Endergebnisse für jedes getestete Serum zwischen den drei LIAs verglichen und statistisch aufgearbeitet.

Die nicht-standardisierten Tests unterschieden sich in der Anzahl ihrer Ziel-AG auf den Teststreifen. Während der Virotech LIA (LIA A) nur sieben verschiedene Test-AG auf einem Streifen verwendet (VlsE-Mix, OspA, DbpA, OspC, BmpA, p58, p83/ p100), wurden auf den Teststreifen des Megacor LIAs (LIA C) neun Ziel-AG (VlsE-Mix, C₆-Peptid, OspA, DbpA, OspC, BmpA, p58, p83/ p100, p41) und auf Teststreifen des Euroimmun LIAs (LIA B) zehn Ziel-AG untersucht (VlsE-Bb, VlsE-Ba, OspA, DbpA, ErpA-p18, OspC, BmpA, p58, p83/ p100, L-Bb).

Während LIA A ein rekombinantes VlsE (Mix)-Ziel-AG (von *Bbss* und *Bg*) verwendet, sind auf Streifen von LIA C sowohl ein rekombinantes VlsE (von *Bbss*, *Ba* und *Bg*) als auch das synthetische C₆-Peptid vorhanden. Bei equinen Seren werden sie bei der Ergebnisinterpretation als eine Einheit betrachtet, das heißt, nur wenn beide Banden positiv sind, erfolgt eine „positive“ Bandenbewertung, eine der beiden Banden allein hingegen reicht dafür nicht aus (bei der Bewertung von Hundeseren aber schon). Bei LIA B existieren zwei separate rekombinante VlsE-AG (VlsE-Ba und VlsE-Bb) auf den Streifen, die bei der Testauswertung getrennt voneinander betrachten werden. Das heißt, wenn eine der beiden Banden positiv ist, wird VlsE bereits als „positiv“ gewertet. Hier stellt sich die Frage, ob eine Separation dieser AG einen diagnostischen Mehrwert hat oder eher irreführend und fehleranfällig ist. Eine statistische Analyse, einen Vergleich von LIAs im Zuge einer Evaluierung sowie eine Standardisierung erschwert es jedenfalls.

Die Anwendung einer hohen Anzahl an Ziel-AG auf LIA-Teststreifen ist grundsätzlich kritisch zu betrachten, da mit der Anzahl der Ziel-AG auch die Wahrscheinlichkeit für unspezifische AK-Bindungen, Kreuzreaktionen und falsch-positive Ergebnisse steigt. Insbesondere die Ziel-AG Flagellin, BmpA und OspC werden mit gelegentlichen falsch-positiven Reaktionen assoziiert, aber auch OspA und das stark immunogene VlsE stehen diesbezüglich in Verdacht (MAGNARELLI et al., 1987; BRUCKBAUER et al., 1992; DRESSLER et al., 1993; SHIN et al., 1993; MAGNARELLI et al., 1996; STEERE et al., 2011; KENEDY et al., 2012; GRAZLEWSKA&HOLEC-GASIOR, 2023). Auch einem AK-Nachweis gegen unspezifische Ziel-AG wie p83/ p100 sollte eine nicht zu große diagnostische Aussagekraft zugemessen werden bzw. sollten solche Ziel-AG exkludiert werden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden (DOFF et al., 2022). Generell ist die Anwendung einer reduzierten Anzahl von Ziel-AG, jedoch hochspezifischer rekombinanter Detektions-AG (wie C₆-Peptid, VlsE oder OspA), in der LB-Serodiagnostik zielführender (MARQUES et al., 2002; BACON et al., 2003; LESCHNIK et al., 2010; WAGNER et al., 2012; WAGNER et al., 2013). Darüber hinaus sollten über die verschiedenen LIAs hinweg einheitliche Ziel-AG, die die drei relevanten Genospezies *Bbss*, *B. garinii* und *B. afzelii* enthalten, eingesetzt werden, um eine Standardisierung zu erreichen.

Im Allgemeinen demonstrierten die drei untersuchten LIAs eine hohe Sensitivität und Spezifität hinsichtlich der Detektion von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG im Pferdeserum, daher sind die als

semiquantitative Bestätigungstests in der eLB-Diagnostik geeignet und erlauben potenziell eine Unterscheidung zwischen Geimpften und Infizierten (BROECKL et al., 2024).

Aus human- und veterinärwissenschaftlichen Studien ist bekannt, dass durch Erregerkontakt oder Infektion induzierte *Bbsl*-spezifische AK über einen längeren Zeitraum (möglicherweise mehrere Jahre) nachgewiesen werden können, auch wenn keine aktive (Re-) Infektion vorliegt (VENNER&DEEGEN, 1996; CHANG et al., 2000; MULLER et al., 2002; MARKOWICZ et al., 2021; GEHLEN et al., 2023; KASPARKOVA et al., 2023). Gleichermaßen können impfinduzierte spezifische OspA-AK, abhängig vom verabreichten Impfstoff, mehrere Jahre serologisch nachweisbar sein, wobei allerdings eine graduelle Abnahme des AK-Spiegels und der protektiven Immunantwort zu erwarten ist, falls keine regelmäßige Auffrischung des Impfschutzes und somit eine wiederholte Stimulation der Bildung von spezifischen AK gegen *Bbsl*-AG erfolgt (FIKRIG et al., 1992a; GUARINO et al., 2017; KNODLSEDER et al., 2019; WILCZEK et al., 2022).

Bei Pferden, die in der Vergangenheit (≥ 1 Jahr) geimpft wurden, sind spezifische AK gegen OspA-AG daher möglicherweise nur noch in sehr geringem Maße und unter der serologischen Nachweisgrenze im Serum vorhanden, nichtsdestotrotz können spezifische AK gegen weitere impfinduzierte, *Bbsl*-spezifische AG noch nachweisbar sein, was serodiagnostische Ergebnisse für in der Vergangenheit geimpfte Pferde verfälschen und zu einem falsch-positiven Ergebnis sowie einer Fehlbehandlung des Pferdes führen kann. Daher ist einerseits eine regelmäßige AI sehr wichtig (v.a. auch für den protektiven Effekt), und andererseits eine hohe Sensitivität und Spezifität gegenüber OspA in qualitativen Serodiagnostikverfahren sowie eine angemessene Interpretation von OspA als impfinduzierte AK (KNODLSEDER et al., 2019; BROECKL et al., 2024).

4.1. Impfspezifische AK gegen OspA-AG

Um die Ergebnisse für einzelne AG-Signalbanden der drei LIAs vergleichen zu können, wurde jeweils die Anzahl der Serumproben, deren Signalintensität des AG-AK-Komplex-Signals für ein bestimmtes AG mit „kein Signal“, „Signal schwächer als COC“, „Signal entspricht COC“ und „Signal stärker als COC“ bewertet wurde, berechnet. Die Ergebnisse für die einzelnen getesteten AG wurden nach Studiengruppe, Probenentnahme-Zeitpunkt (ZP) und LIA aufgezeichnet und es erfolgte eine statistische Auswertung, wobei die beobachtete Interrater-Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen den LIAs (engl. *observed inter-rater reliability*, Po) sowie die statistische Interrater-Reliabilität (engl. *inter-rater reliability*, IRR) berechnet wurden. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf das OspA- und VlsE-Signal gelegt.

Bei der Identifizierung ungeimpfter und geimpfter Pferde variierte die Genauigkeit der drei bewerteten Tests beim Nachweis impfinduzierter spezifischer AK gegen OspA. Die Interrater-Übereinstimmung der OspA-Signalintensitätsergebnisse sowie der Testendergebnisse variierte je

nach Zeitpunkt der Blutprobenentnahme und Studiengruppe zwischen mäßig und mangelhaft, was eine unbefriedigende Übereinstimmung der Ergebnisse der drei LIAs in diesem Aspekt darstellt (BROECKL et al., 2024).

Serumproben von ungeimpften Pferden sowie Proben von Pferden der Gruppen Vac-Basic und Vac-Plus zum ZP d0, die ihre erste Impfung nach der ersten Blutentnahme erhalten hatten, sollten grundsätzlich zu keinem ZP ein positives OspA-Farbreaktionssignal aufzeigen, da OspA-AG während einer aktiven Infektion im Säugwirt nicht von viablen Borrelien exprimiert wird. Im Gegensatz dazu enthalten die für Pferde erhältlichen LB-inaktivierten Lysatimpfstoffe OspA, sodass spezifische AK gegen OspA im Serum ein zuverlässiger Marker für eine Immunisierung gegen LB sind. Zum ZP d135, also 121 Tage nach der zweiten Immunisierung der Gruppen Vac-Basic und Vac-Plus, sowie zum ZP d210, 196 Tage nach der letzten Immunisierung der Gruppe Vac-Basic sowie 30 Tage nach der dritten Immunisierung der Gruppe Vac-Plus, wird für Pferde dieser beiden Gruppen ein impfspezifisches positives OspA-Signal erwartet. Unter Berücksichtigung der humoralen Immunantwort von Pferden nach Immunisierung mit kommerziellen Impfstoffen gegen LB ist zu erwarten, dass die OspA-Signalintensität zum ZP d210 für Proben der Gruppe Vac-Plus stärker ist als für Proben der Gruppe Vac-Basic, da die Impfung erst kürzlich erfolgt ist und die Pferde der Gruppe Vac-Plus daher einen höheren AK-Spiegel aufweisen (KNODLSEDER et al., 2019).

Es muss auch berücksichtigt werden, dass die Anwendung von Lysatimpfstoffen gegen LB bei Pferden zur Entwicklung von spezifischen AK gegen eine Vielzahl anderer Borrelienproteine führen kann, die von Borrelien *in vitro* exprimiert werden (z. B. OspC, DbpA, BmpA, p58 oder p100). Das bedeutet, dass bei geimpften Tieren entsprechende AG-AK-Immunkomplex-Signale auf LIA-Streifen in Kombination mit einer positiven Reaktion auf OspA-AG auftreten können. Daher sollte dies nicht als infektionsspezifisch, sondern als impfinduziert angesehen werden, und es sollte eine entsprechende Interpretation der Signale erfolgen. Lediglich VlsE- und C₆-AG-Signale sind hochspezifische Marker für eine *Bbsl*-Infektion, da diese nur von aktiven Borrelien *in vivo* exprimiert werden. Eine unzureichende Sensitivität und Spezifität von serologischen Nachweisverfahren gegenüber OspA-AK birgt ein großes Risiko für falsch-positive Ergebnisse bei mit Lysatimpfstoffen immunisierten Pferden mit unbekanntem Impfstatus oder langer Impfkarenz, insbesondere wenn die Sensitivität und Spezifität für mehrere andere impfinduzierte spezifische AK gegen *Bbsl*, die auch für eine Infektion sprechen könnten, höher ist als jene für OspA-AK (AGUERO-ROSENFELD et al., 1999). Das Vermeiden von Impflücken in einmal gegen LB geimpften Pferden ist daher sowohl hinsichtlich des Impfschutzes als auch des serodiagnostischen Aspektes zu empfehlen (KNODLSEDER et al., 2019).

Entsprechend den erwarteten OspA-spezifischen AK-Reaktionen in ungeimpften Pferden zeigte keiner der drei LIAs zu keinem ZP für keine der Proben der ungeimpften Pferde eine Signalintensität für OspA, die identisch mit oder stärker als die Signalintensität der Referenzbande (COC) war. Das heißt, keiner der drei LIAs identifizierte ungeimpfte Pferde (Pferde der Gruppe Non-Vac zu ZP d0, d135, d210 sowie der Gruppen Vac-Basic und Vac-Plus zum ZP d0) fälschlicherweise als geimpft. Trotzdem war die beobachtete P_0 und IRR für das OspA-AG-Signal in dieser Gruppe zu keinem Zeitpunkt größer als 70% beziehungsweise „gering“ ($\kappa \leq 0,10$). Obwohl die drei Tests das OspA-AG-Signal für ungeimpfte Pferde ($n = 42$) übereinstimmend als „negativ“ ($< \text{COC}$) bewertet hatten, variierte die Sensitivität und Spezifität der Tests in Bezug auf OspA. Daher wichen die Signalintensitätsergebnisse im Bereich unterhalb des COC zwischen den LIAs erheblich voneinander ab, was zu einer geringen Übereinstimmung der Tests führte. Während LIA A und LIA C in diesem Zusammenhang eine vergleichbare und hohe Spezifität bei ungeimpften Pferden zeigten, offenbarte LIA B die mit Abstand geringste Spezifität (Abb. 13/ A-C).

Im Gegensatz zur korrekten Identifizierung ungeimpfter Pferde identifizierte keiner der drei Tests alle geimpften Pferde (Vac-Basic und Vac-Plus, $n = 89$) als solche. LIA B konnte bei keinem der geimpften Pferde zum ZP d135, und bei keinem der Vac-Basic-Pferde zum ZP d210, einen positiven ($\geq \text{COC}$) OspA-spezifischen AK-Spiegel im Serum nachweisen, was einen erheblichen Mangel an Sensitivität und Spezifität in dieser Hinsicht offenbarte. Obwohl LIA A und LIA C eine signifikant höhere Sensitivität und Spezifität gegenüber OspA-spezifischen AK zeigten, war diese bei Vac-Basic-Pferden auch nicht zufriedenstellend. Nur in Gruppe Vac-Plus zum ZP d210, als ein maximaler Impftiter aufgrund einer kürzlich applizierten AI (an d180) vorhanden war, waren alle drei LIAs in der Lage, spezifische AK gegen OspA zu detektieren. Folglich könnte neben einer mangelnden Sensitivität der Tests auch ein unzureichender OspA-AK-Spiegel in den Blutproben der geimpften Pferde eine weitere Erklärung für die eingeschränkte OspA-Detektionsrate bei Vac-Basic-Pferden sein. Das heißt, neben einer ausreichenden Sensitivität der AG-Signale im Test ist ein ausreichender OspA-AK-Titer bei geimpften Pferden entscheidend für den korrekten Nachweis einer *Bbsl*-Infektion bei Pferden und deren erfolgreiche Abgrenzung zu einer Impfung. Die hohe OspA-Nachweisrate bei zusätzlich geimpften Pferden zum ZP d210 demonstriert, dass eine Lücke im Impfplan nachteilig ist, während ein straffer Impfplan und ein ausreichender impfbedingter AK-Spiegel (insbesondere OspA-spezifische AK) von großem Nutzen sind. Einerseits ermöglicht es einen höchstmöglichen Schutz vor einer natürlichen *Bbsl*-Infektion und -Erkrankung. Andererseits erleichtert es die Identifizierung geimpfter Tiere über OspA-spezifische AK und deren Differenzierung von natürlich infizierten Tieren. Das heißt, ein ausreichender OspA-AK-Spiegel gegen *Bbsl* deutet auf eine allgemeine, durch die Impfung induzierte Immunreaktion hin, die eine korrekte Abgrenzung geimpfter Pferde von natürlich infizierten Pferden ermöglicht und somit das

Risiko von falsch-positiven Testergebnissen für geimpfte Pferde, und deren Nebenwirkungen, reduziert.

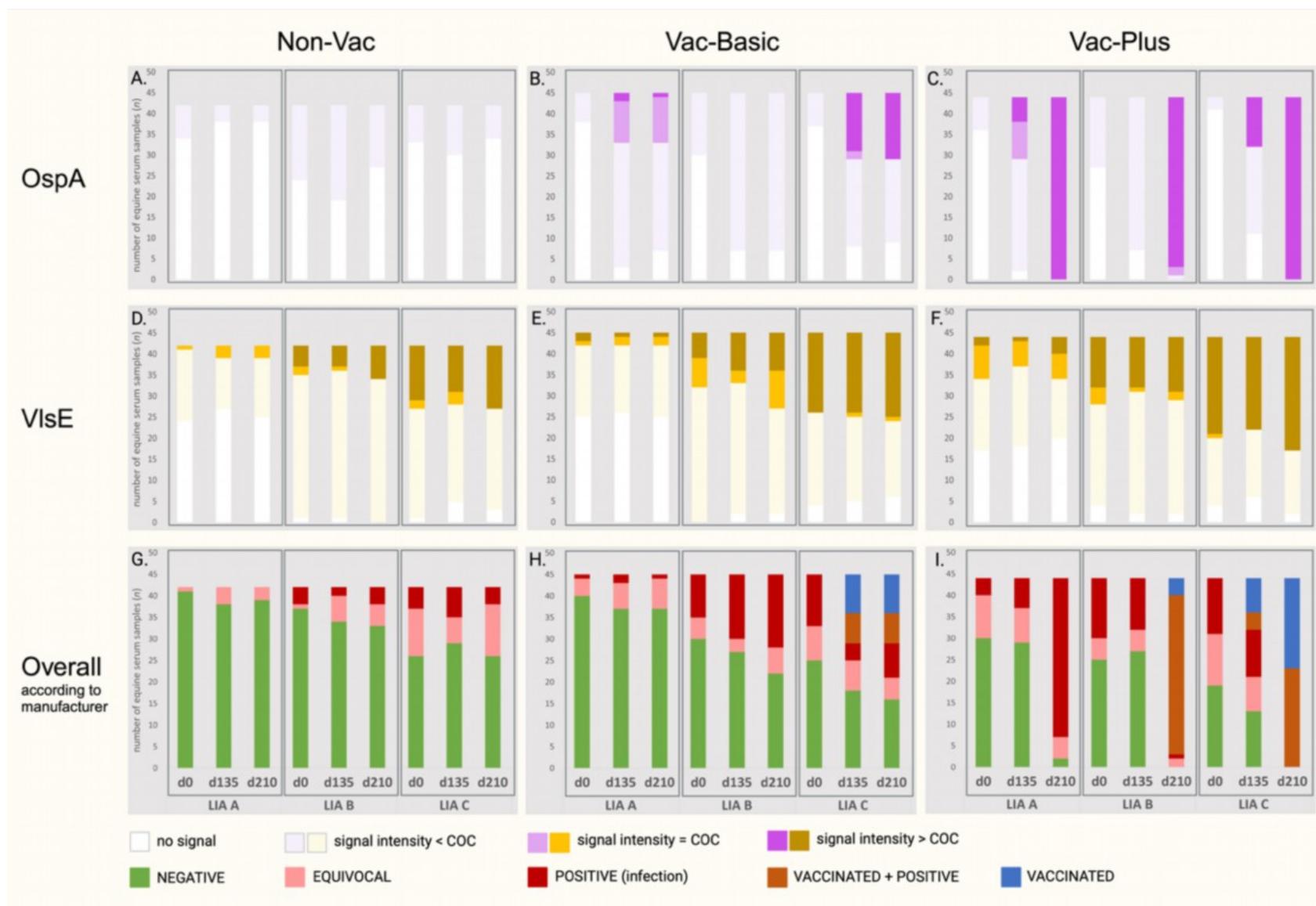


Abbildung 13: Vergleich von Testergebnissen, die mit drei verschiedenen LIAs erzielt wurden, die in der *Bbsl*-Diagnostik mit Pferdeserum verwendet werden. Die Auswertung der LIA-Ergebnisse erfolgte individuell nach Herstellervorgaben (BROECKL et al., 2024).

Die Ergebnisse sind aufgliedert nach Studiengruppen (Non-Vac, Vac-Basic, Vac-Plus), LIA (A,B,C) und Zeitpunkt der Probenentnahme (d0, d135, d210). Es erfolgt ein Vergleich der AG-AK-Immunkomplex-Signalintensität-Ergebnisse zwischen den drei LIAs für **A-C**, das impfinduzierte OspA, **D-F**, das infektionsspezifische VlsE sowie daraus resultierende **G-I**, diagnostische Endergebnisse für untersuchte Seren (*Overall*).

A-C. Die Anzahl der Seren mit einem negativen ($< \text{COC}$) Signalintensität-Ergebnis für OspA sind in weiß (kein Signal) und flüchtig (vorhandenes Signal $< \text{COC}$) dargestellt, jene mit positivem ($\geq \text{COC}$) Signalintensität-Ergebnis in helllila (Signalintensität = COC) und dunkellila (Signal $> \text{COC}$). **D-F**. Die Anzahl der Seren mit einem negativen ($< \text{COC}$) Signalintensität-Ergebnis für VlsE sind in weiß (kein Signal) und hellgelb (vorhandenes Signal $< \text{COC}$) dargestellt, jene mit positivem ($\geq \text{COC}$) Signalintensität-Ergebnis in dunkelgelb (Signalintensität = COC) und ocker (Signal $> \text{COC}$). **G-I**. Die Anzahl der getesteten Seren, die im finalen Testergebnis (Beurteilung der Banden des gesamten LIA-Streifens) als „Negativ“ (NEGATIV, NEG) evaluiert wurden, sind in grün dargestellt, die „Grenzwertigen“ (EQUIVOCAL, EQUIVOC) in lachs, die „Positiven (Infektion)“ (POSITIVE (infection), POS) in rot, die „Geimpften“ (VACCINATED, VAC) in blau und die, die gleichzeitig als geimpft und infiziert evaluiert wurden (VACCINATED+POSITIVE, VAC+POS), in braun.

Non-Vac, Seren von ungeimpften Pferden; Vac-Basic, Seren von grundimmunisierten Pferden; Vac-Plus, Seren von grundimmunisierten und geboosterten Pferden; d, Tag der Serumprobenentnahme im Studienzeitraum; OspA, *outer surface protein A*; VlsE, *variable major protein-like sequence Expressed*; COC, *cutoff control*, Intensität der Referenzbande.

Ein weiteres Problem hinsichtlich der korrekten Identifizierung geimpfter Pferde war sowohl in LIA A als auch LIA B die angemessene Interpretation und Klassifizierung einzelner AG-Signale. Im Evaluationsprotokoll des Herstellers von LIA A wurde das OspA-AG-Signal überhaupt nicht als spezifisches AG-Signal indikativ für eine Immunreaktionen in Pferden berücksichtigt. Dementsprechend waren im Evaluationsprotokoll von LIA A keine Bewertungskategorien vorhanden, die eine Impfung oder beides, eine Impfung und Infektion, miteinbezogen haben. Obwohl LIA A technisch in der Lage war, OspA-spezifische AK in hohem Maße zu detektieren, und gleichzeitig eine hohe Sensitivität und zuverlässige Spezifität in Bezug auf OspA-spezifische AK aufwies, wurden die positiven Ergebnisse des OspA-AG-Signals nicht angemessen interpretiert, was zu vielen falsch-positiven Endergebnissen für geimpfte Pferde in diesem Test führte. Ähnliches war im Evaluationsprotokoll des Herstellers von LIA B zu verzeichnen. Auch hier war die Interpretation und Klassifizierung der einzelnen AG-Signale – obwohl dort das OspA-AG-Signal als impfspezifisch erläutert und eingestuft wurde – nur lückenhaft, was zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse geimpfter Pferde führte. Im Vergleich zum sehr durchdachten und präzise ausgearbeiteten Evaluationsprotokoll von LIA C spezifizierte das technische Handbuch von LIA B den Fall einer Impfung in Kombination mit einer Infektion nicht näher und enthielt daher auch keine entsprechende Klassifizierungskategorie. In der Software wurden die entsprechenden Proben jedoch einer zusätzlichen Kategorie mit der Bezeichnung „Positiv – serologischer Nachweis einer Infektion oder Immunisierung“ zugeordnet. In Kenntnis der falschen Spezifikation und Terminologie wurden die entsprechenden Proben in der durchgeführten statistischen Analyse der Kategorie VAC+POS (Impfung und Infektion) von LIA C zugeordnet. In diesem Zusammenhang fehlten in LIA B auch weitere Angaben zur Interpretation von AG-Signalen, wie des infektionsspezifischen VlsE-AG-Signals. Dies verdeutlicht ein Defizit im Evaluierungs- und Klassifizierungsprotokoll von LIA B und hegt Zweifel an der Aussagekraft des Tests im Hinblick auf die Testergebnisse für geimpfte Pferde.

Auch die Anwendung eines standardisierten und empfohlenen alternativen Evaluierungsprotokolls für Pferdeserumproben (ROEP) kann nicht kompensieren, was unterschiedliche Sensitivitäten der AG-Beschichtungen auf den LIA-Streifen verschiedener Hersteller ausmachen. Jedoch verbesserte die Anwendung von ROEP die Interrater-Übereinstimmung hinsichtlich der Testendenergebnisse in der geimpften Gruppe Vac-Plus zum ZP d210, da alle drei LIAs OspA-spezifische AK in nahezu gleichem Maße detektierten und die anschließende Interpretation des AG-Signals einheitlich erfolgte.

4.2. Infektionsspezifische AK gegen VlsE-AG

In Hinblick auf die Identifizierung von infizierten Pferden (POS), oder geimpften und infizierten Pferde (VAC+POS), sollte das VlsE- (und C₆-) AG-Signal als hochspezifischer Marker für eine *Bbsl*-Infektion betrachtet und interpretiert werden.

Rekombinante VlsE-Detektions-AG eignen sich generell sehr gut als diagnostischer Marker für eine Infektion mit *Bbsl*, da VlsE-AG von Borrelien fast ausschließlich *in vivo* im Säugerwirt während einer Infektion exprimiert wird (ZHANG&NORRIS, 1998; LIANG et al., 2000a; MAGNARELLI et al., 2002; MARQUES et al., 2002; LIANG et al., 2004b; BANKHEAD, 2016). Allerdings unterliegt VlsE einer hohen antigenetischen Sequenzvariabilität, die dem Erreger eine Immunevasion im Wirt ermöglicht (MCDOWELL et al., 2002). Dies stellt eine große Herausforderung in der Serodiagnostik dar. In Hinblick auf eine Standardisierung von kommerziell verfügbaren LIAs wäre es wünschenswert, dass rekombinante VlsE-Detektions-AG verwendet werden, die gleichermaßen alle regional prävalenten LB- Genospezies (*Bbss*, *B. garinii* und *B. afzelii*) abdecken, jedoch zeigen verwendete Lysat-AG überwiegend ein hohes Maß an Kreuzreaktivität innerhalb der drei Borrelienspezies (POLJAK et al., 2012).

Neben dem VlsE-AG als Ganzes findet auch eine der antigenetisch konstanten, konservierten Regionen (IR, engl. *invariant region*) von VlsE Anwendung in der Serodiagnostik, nämlich die IR6 (ZHANG et al., 1997a; LIANG et al., 2000b). Spezifische AK im Serum des Patienten, die sich gegen diese Einheit des VlsE richten, können durch spezifische Bindung an das synthetische C₆-Detektions-AG nachgewiesen werden, was die IR6 bzw. das C₆-Peptid zu einem zuverlässigen diagnostischen Marker für eine aktive Infektion macht (PHILIPP et al., 2001; WORMSER et al., 2008; WAGNER et al., 2013). LIA C beinhaltet sowohl VlsE- als auch das hochspezifische C₆-AG im LIA, wobei diese Einheit nur eine „positiv“-Bewertung erhielt, wenn Signalintensitäten für beide Detektions-AG auf dem LIA-Streifen simultan positiv waren. Meist ist eine gute Korrelation dieser beiden Testparameter gegeben, das heißt, dass nur selten AK gegen nur eines der beiden Ziel-AG vorhanden sind (GEHLEN et al., 2022). Nichtsdestotrotz ist es möglich, dass im Patienten während einer Infektion nur spezifische AK gegen eines der beiden AG gebildet werden (EMBERS et al., 2007). Daher ist in Erwägung zu ziehen, ob es nicht sinnvoller wäre, nur eines der beiden Ziel-AG zur Detektion einer *Bbsl*-Infektion im LIA zu integrieren, beziehungsweise, eine getrennte Bewertung durchzuführen.

Es erfolgte kein Vergleich der drei getesteten LIAs hinsichtlich des C₆-Peptids, da nur LIA C als einziger der drei Tests dieses AG auf Teststreifen enthält.

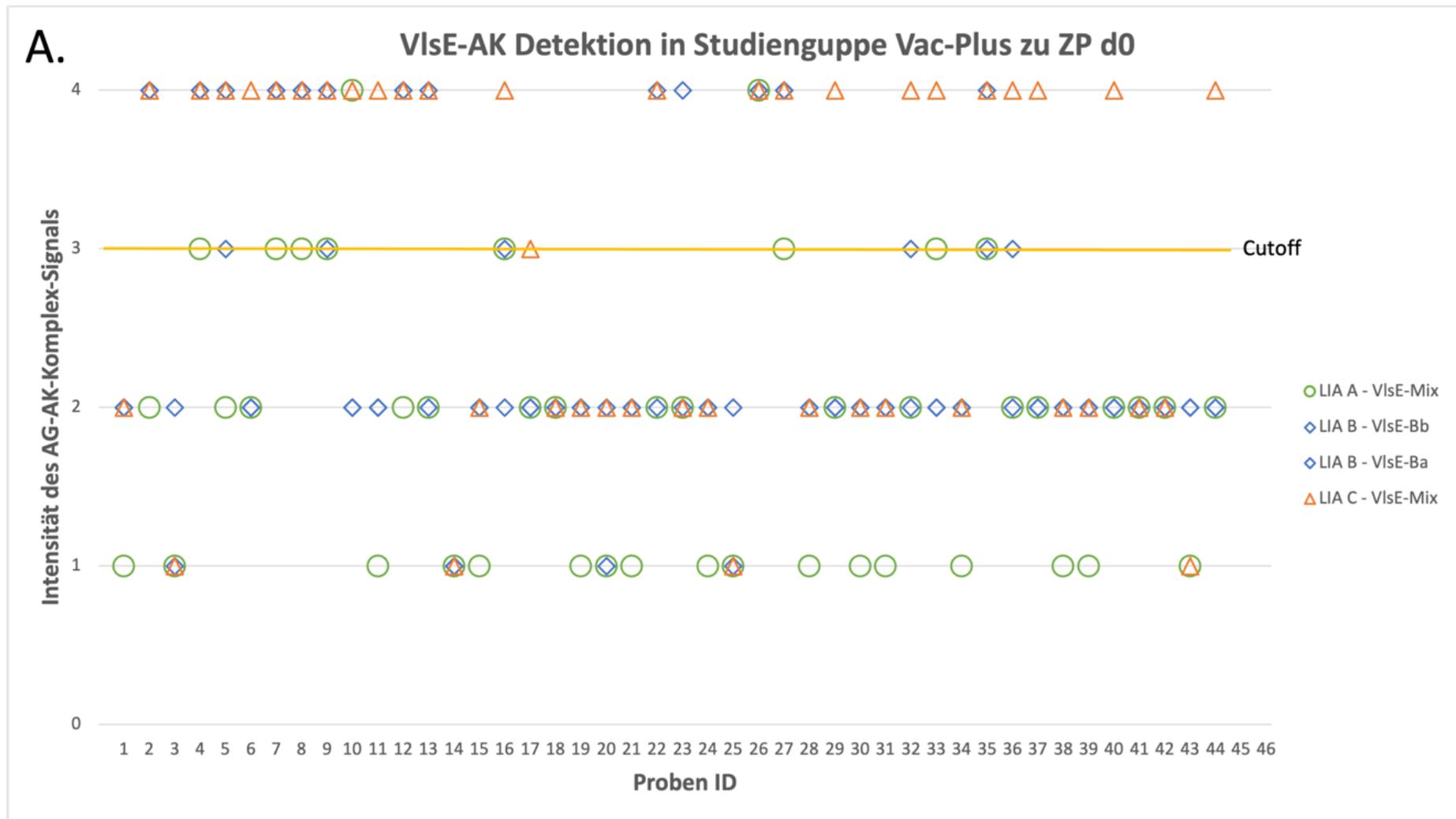
In Anbetracht des VlsE-AG-Signals eines Tests ist es generell wichtig, dass die Sensitivität ausreichend ist, um VlsE-spezifische AK zuverlässig zu detektieren. Nichtsdestotrotz ist die Spezifität dieser Infektionsmarker von noch größerer Bedeutung, da ein positives Ergebnis für das VlsE-/ C₆-AG-Signal – in Kombination mit möglicherweise weiteren positiven AG-Signalen (außer

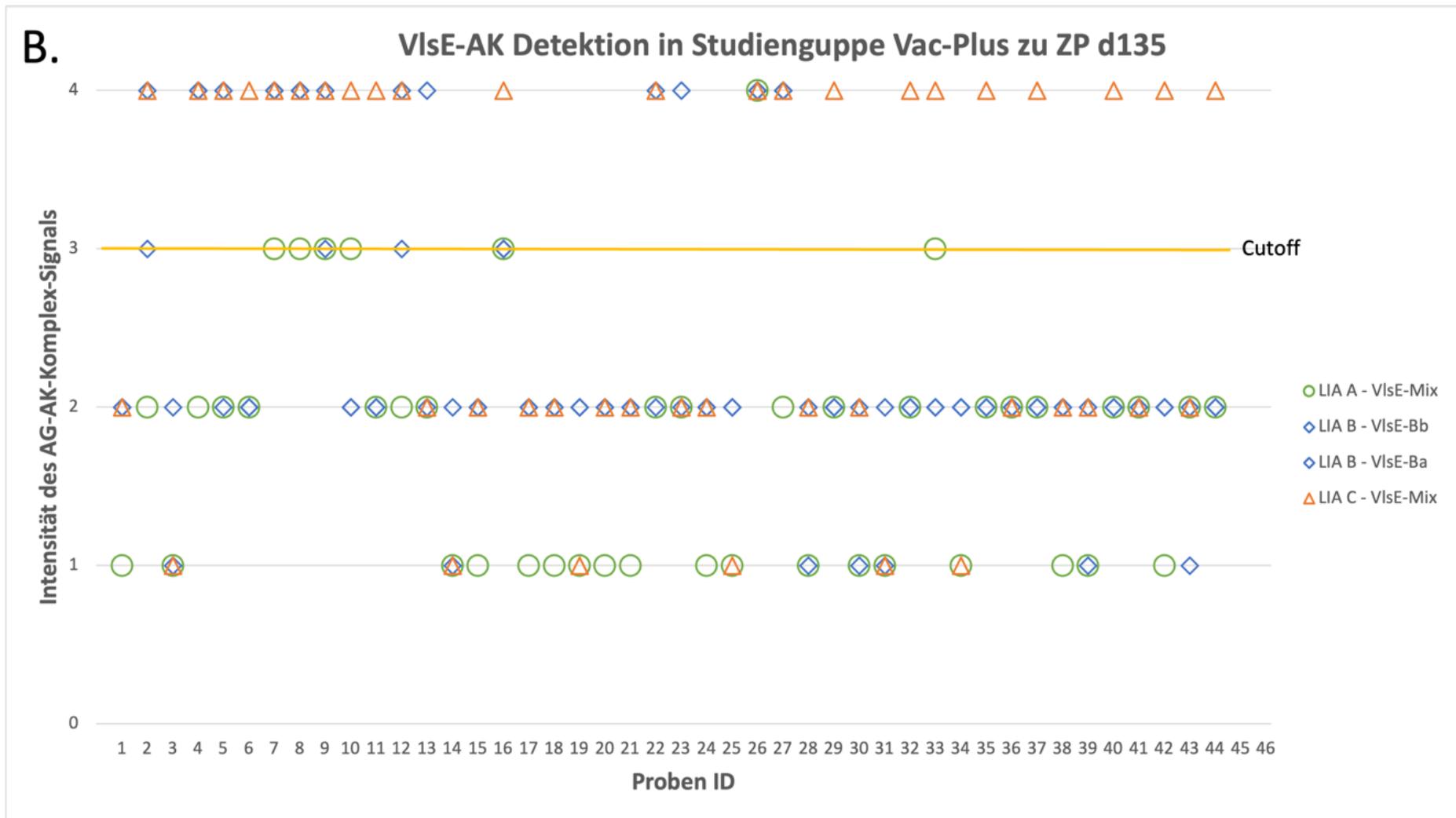
OspA) – stark auf eine bestehende *Bbsl*-Infektion sowie die Notwendigkeit einer umgehenden antibiotischen Behandlung des infizierten Pferdes mit klinischen Anzeichen hindeuten. Ebenso sind eine zu hohe Sensitivität sowie eine mangelnde Spezifität des VlsE-AG-Signals prekär, da sie zu einem falsch-positiven Endergebnis im Test führen können. Hier muss abgewogen werden, ob eine sehr hohe Sensitivität des VlsE-AG-Signals auf Teststreifen von Vorteil ist, und infolgedessen möglicherweise eine mangelnde Spezifität und fragwürdige Signifikanz eines positiven (POS) Testendergebnisses. Eine Herunterregulierung der Sensitivität für VlsE-AG-Signale könnte ratsam sein. Das heißt, im Falle eines grenzwertigen (EQUIVOC) Testendergebnisses, das durch ein weniger sensitives VlsE-AG-Signal ermittelt wurde, kann ein Test jederzeit wiederholt werden, um Zweifel hinsichtlich einer Infektion auszuräumen – bevor eine möglicherweise unnötige antibiotische Behandlung aufgrund einer übermäßigen Sensitivität und eines falsch-positiven Endergebnisses im Test eingeleitet würde.

Hinsichtlich der Detektion VlsE-spezifischer AK zeigte LIA C insgesamt die höchste Sensitivität. LIA C bewertete die meisten Proben als „VlsE-positiv“ (Signal \geq COC), gefolgt von LIA B und LIA A. Es fällt auf, dass in allen drei LIAs die ungeimpfte Non-Vac-Gruppe im Vergleich zu den geimpften Studiengruppen durchgehend die geringste Anzahl an als „VlsE-positiv“ bewerteten Proben aufwies, während die Studiengruppe Vac-Plus die meisten Proben mit einem VlsE-Signalintensitätsergebnis über dem COC aufwies – in beträchtlichem Ausmaß in LIA C (bis zu 61% zum ZP d210; Abb. 13/ D-F). Die Übereinstimmung zwischen den Tests hinsichtlich der Detektion von VlsE war, je nach Probenentnahme-ZP und Studiengruppe, mangelhaft bis gering. Dies demonstriert einerseits eine unbefriedigende Übereinstimmung der Tests, und andererseits eine signifikante Divergenz in Hinblick auf die Sensitivität und Spezifität der drei Tests.

Da keiner der drei LIAs im Verlauf des Beobachtungszeitraums einen signifikanten Anstieg der Anzahl VlsE-positiver Proben in einer der drei Untersuchungsgruppen über die fortschreitenden Probenentnahme-ZP hinweg zeigte, ist es unwahrscheinlich, dass die übermäßigen VlsE-AK-Nachweisraten mit der Anwendung von Lysatimpfstoffen gegen *Bbsl* zusammenhängen (LIANG et al., 2004b; BROECKL et al., 2024). Darüber hinaus kann die Möglichkeit, dass die Verwendung unterschiedlicher LIA-Testkit-LOTs pro Hersteller die Signalintensitätsergebnisse beeinflusst hat, ausgeschlossen werden, da für alle getesteten Proben nur eine LOT-Nummer pro Hersteller verwendet wurde. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass bei vereinzelten Pferden des Pools eine natürliche *Bbsl*-Infektion vorlag oder während des Studienzeitraumes erfolgte, was eine VlsE-Seropositivität bei diesen Tieren erklären würde (KNODLSEDER et al., 2019). Unsere Erklärungen für die abweichenden Ergebnisse beim Nachweis VlsE-spezifischer AK und die vergleichsweise hohe Nachweisrate in der Gruppe Vac-Plus haben daher folgende Gründe: Erstens scheint die Vac-Plus-Studiengruppe unwissentlich eine höhere Anzahl natürlich infizierter Pferde zu haben als die Studiengruppen Non-Vac und Vac-Basic. Zweitens wurde in diesem Projekt eine geringe

Stichprobengröße pro Studiengruppe verwendet, wodurch die Ergebnisabweichungen deutlicher ausfallen; eine größere Stichprobengröße ist daher aus mehreren Gründen vorzuziehen. Drittens scheint die cutoff-Kontrolle in LIA C hinsichtlich des Nachweises von VlsE-AK schlecht eingestellt und zu sensitiv zu sein, was zu einer unwahrscheinlich hohen Anzahl VlsE-positiver Proben zu allen drei ZP in allen Gruppen führte. Dies wird deutlich, wenn man die Ergebnisse für die VlsE-AK-Detektion der drei Tests für Gruppe Vac-Plus zu drei ZP auf Pferdeebene einzeln betrachtet (Abb. 14/ A-C). Daher empfehlen wir dringend eine Überarbeitung und Anpassung von LIA C in dieser Hinsicht.





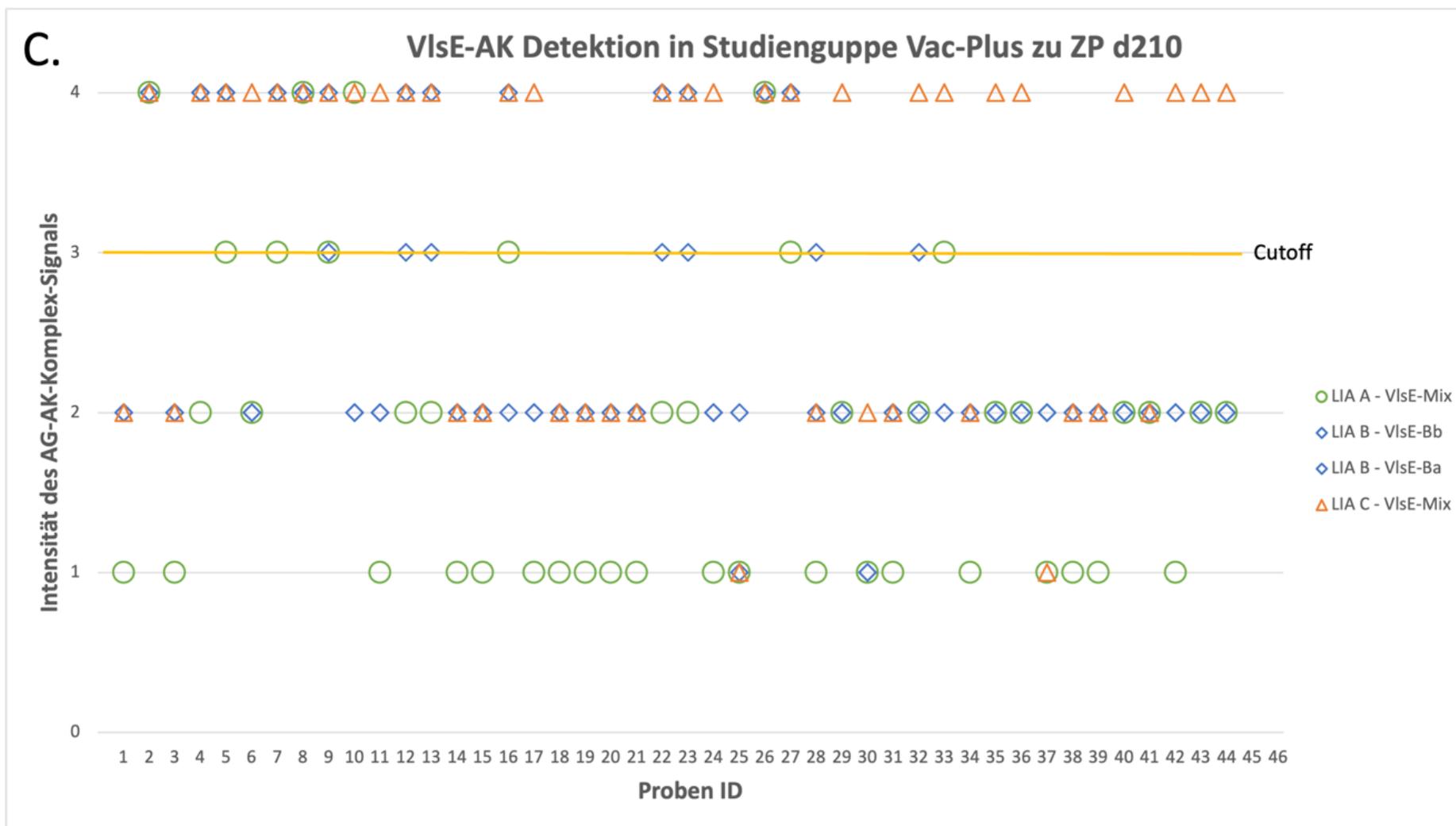


Abbildung 14: Detektion von spezifischen AK gegen VlsE-AG von *Bbsl* in Serum von geimpften Pferden der Studiengruppe Vac-Plus ($n = 44$) zum ZP (A.) d0, (B.) d135 und (C.) d210 im Studienzeitraum mittels LIA A, LIA B und LIA C.

Die Betrachtung der Signalintensität-Ergebnisse für AG-AK-Komplex-Signale erfolgt für 45 Pferde individuell (Proben ID 1 – 45). Es sind vier AG-AK-Immunokomplex-Signalintensitäten dargestellt: 1 (kein Signal), 2 (schwaches Signal, < COC), 3 (Signal entspricht COC), 4 (Signal > COC). Die mittels LIA A (grün), LIA B (blau) und LIA C (orange) ermittelten Ergebnisse für die spezifische VlsE-AK-Detektion zum (A.) ZP d0, (B.) ZP d135 und (C.) ZP d210 sind pro Pferd dargestellt.

COC, *cutoff control*, Referenzsignal; ZP, Probenentnahme-Zeitpunkt im Studienzeitraum; LIA, Line Immunoassay; AG, Antigen; AK, Antikörper; VlsE, *Variable major protein like sequence Expressed*; Bb, *Borrelia burgdorferi*; Ba, *Borrelia afzelii*.

Darüber hinaus wurde bei Hunden und Menschen beschrieben, dass bei Patienten mit nachgewiesenen bakteriellen oder viralen Infektionen (u. a. *Leptospira interrogans*, Epstein-Barr-Virus, Cytomegalovirus) bestimmte Borrelien-Test-AG, die üblicherweise in serodiagnostischen Tests zur Diagnose einer LB verwendet werden, Kreuzreaktionen mit AK auslösen können, die durch andere Infektionserreger als *Borrelia* induziert werden. Daher werden *Bbsl*-AG wie FlaB, aber auch OspC und BmpA unspezifisch von AK gegen andere Erreger erkannt (MAGNARELLI et al., 1987; BRUCKBAUER et al., 1992; LUFT et al., 1993; SHIN et al., 1993; MAGNARELLI et al., 2002; WOJCIECHOWSKA-KOSZKO et al., 2022; GRAZLEWSKA&HOLEC-GASIOR, 2023). (MAGNARELLI et al., 2002). Nur LIA C enthält p41, während auf Streifen von LIA A und LIA B das p41-AG keine Anwendung findet. Kreuzreagierende AK bergen ein hohes Potenzial für falsch-positive Testergebnisse und führen zu einem eingeschränkten diagnostischen Wert eines Tests. Folglich kann eine größere Anzahl von AG-Signalen auf einem Teststreifen, insbesondere fehleranfällige AG wie p41 (FlaB), die Effektivität eines Serotests beeinträchtigen.

Wenn man in Erinnerung ruft, dass für diese Studie ausschließlich Pferdeseren verwendet wurden, die zuvor mit einem hauseigenen Zweistufentest (KELA und LIA) untersucht und als NEG oder EQUIVOC klassifiziert wurden, betrachtet, liegt es nahe, dass LIA A's Ergebnisse für das VlsE-AG-Signal eher die Realität abbilden als jene von LIA B und LIA C. Nichtsdestotrotz verdeutlichen die erhöhten Detektionsraten für VlsE-spezifische AK, und die in diesem Zusammenhang ersichtlichen hohen Diskrepanzen in der Sensitivität und Spezifität der drei verwendeten LIAs, vor allem die schwierige Lage der mangelnden Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse bei nicht-standardisierten serodiagnostischen Tests. Es verdeutlicht die Notwendigkeit einer Überarbeitung und Validierung und vor allem Standardisierung von kommerziell für die *Bbsl*-Diagnostik verfügbaren LIAs.

4.3. Diagnostische Endergebnisse für untersuchte Seren

Um die serodiagnostischen Endergebnisse (engl. *overall test results*) für getestete Seren zwischen den drei LIAs vergleichen zu können, wurde auch hier jeweils die Anzahl der Seren, die ein Gesamtergebnis von „Negativ“ (NEG), „Grenzwertig“ (EQUIVOC), „Positiv (Infektion)“ (POS), „Geimpft“ (VAC) sowie „Geimpft+Infektion“ (VAC+POS) berechnet und anhand der Studiengruppe, dem Probenentnahme-ZP sowie des LIAs aufgeschlüsselt.

Angesichts der Testendergebnisse von ungeimpften und geimpften Pferden stellen wir erneut die bereits erwähnten Testdefizite hinsichtlich der Sensitivität und Spezifität sowie eine unterschiedliche Interpretation einzelner AG-Signale fest. Diese LIA-spezifischen Defizite führten zu einer hohen Anzahl an falsch-positiven Endergebnissen, insbesondere in geimpften Gruppen, und damit zu einer geringen Interrater-Übereinstimmung. Beim Vergleich der drei LIAs zeigte LIA C insgesamt die höchste Genauigkeit hinsichtlich der diagnostischen Endergebnisse (Abb. 13/ G-

I). Zu den ZP d0 und d135 evaluierte LIA A in allen drei Gruppen die meisten Seren als NEG, gleiches war zum ZP d210 in Gruppe Non-Vac und Vac-Basic zu beobachten. Im Gegensatz dazu bewertete LIA A, im Vergleich zu LIA B und LIA C, zum ZP d210 am meisten Seren als POS, und keine der geimpften Pferde als VAC oder VAC+POS. Der Grund dafür ist, dass LIA A das OspA nicht als impfspezifisch miteinbezieht und es daher keine entsprechenden Bewertungskategorien im Evaluationsprotokoll gibt. Dies resultierte in einer großen Anzahl an falsch-positiven Ergebnissen in geimpften Studiengruppen. Demzufolge wurde auch die schlechteste Ergebnisübereinstimmung der drei LIAs für untersuchte Pferdeseren in der geimpften Studiengruppe Vac-Plus zum ZP d210 (17%) beobachtet, und die höchste in der ungeimpften Kontrollgruppe (bis zu 71% zum ZP d0).

Unsere Erklärung für das nicht angemessene und nicht mehr dem aktuellen Wissensstand entsprechende Ergebnisinterpretationsprotokoll von LIA A ist, dass dieser LIA einer der ersten LIAs war, der für die *Bbsl*-Diagnostik mit equinen Seren zur Verfügung stand. Damals war das Wissen zu OspA noch eingeschränkter, eine Impfung gegen LB für Pferde (seit 2015) war noch nicht verfügbar und die Überarbeitung des Ergebnisinterpretationsprotokolls scheint seither nicht oder nur sehr geringfügig durchgeführt worden zu sein. Daher wird für LIA A eine Aktualisierung des Protokolls auf den neusten wissenschaftlichen Stand empfohlen, wobei der Nachweis von spezifischen AK gegen OspA als impfspezifisch interpretiert werden muss.

In Gegensatz zu LIA A bewertete der sensitivere LIA B eine größere Anzahl der Proben als POS und weniger als NEG in allen drei Gruppen zu den ZP d0 und d135, sowie in den Gruppen Non-Vac und Vac-Basic zum ZP d210. Zum ZP d210 identifizierte LIA B 84% aller geimpften Pferde in Gruppe Vac-Plus als VAC+POS, und nur drei der Seren in dieser Gruppe wurden als VAC eingestuft. In LIA B erfolgte die Interpretation von impf- und infektionsspezifischen AK nur lückenhaft und erschien nicht wohl durchdacht. Neben der technischen Unzulänglichkeit, OspA-AK in geimpften Pferden angemessen zu detektieren, führte zusätzlich die fehlerhafte Interpretation von spezifischen AG-Signalen zu falsch-positiven Ergebnissen in LIA B. So wird VlsE in keiner Weise als infektionsspezifisch erwähnt, auch wird es nicht explizit im Ergebnisevaluationsprotokoll des Herstellers als solches deklariert. Als indikativ für eine Infektion werden hier ≥ 3 Banden positiv (außer OspA) gewertet. Dies ist problematisch und anfällig für falsch-positive Testergebnisse, vor allem auch für geimpfte Pferde, wenn das OspA-Ziel-AG des LIAs zu wenig sensitiv gegenüber OspA-AK ist, jedoch die Sensitivität gegenüber weiteren, impfinduzierten spezifischen AK höher ist. Daher wird eine Überarbeitung der Sensitivität und Spezifität sowie des Bandeninterpretationsprotokolls von LIA B empfohlen.

In LIA C war ebenso eine hohe Anzahl an VAC+POS-Ergebnissen, insbesondere in Studiengruppe Vac-Plus zum ZP d210, zu verzeichnen, was in Zusammenhang mit den hohen Detektionsraten von spezifischen AK gegen VlsE-AG in dieser Gruppe steht. Gleichzeitig identifizierte LIA C am

meisten geimpfte Pferde korrekterweise als solche. Im Bandenergebnisinterpretationsprotokoll des Herstellers von LIA C wurde ein Nachweis von spezifischen AK gegen OspA-AG angemessen berücksichtigt und sehr wohlgedacht sowie präzise formuliert. Dieser LIA wurde bereits im Jahre 2022 einer Evaluierung im Rahmen einer Studie unterzogen, wobei im Anschluss eine Aktualisierung des Tests und des Bewertungsprotokolls durchgeführt wurde, sodass dieser Test auf einem aktuellen Stand zu sein scheint (DOFF et al., 2022). Allerdings wird dennoch eine Anpassung von einzelnen AG empfohlen.

Diese Diskrepanzen in der Interrater-Übereinstimmung, die unter anderem aufgrund der Interpretation von einzelnen AG-Signalen anhand von Evaluationsprotokollen entstanden, die von den Herstellern der drei LIAs zur Verfügung gestellt wurden, veranlassten die Autoren dieser Studie dazu, ein einheitliches und empfohlenes Ergebnisinterpretationsprotokoll (ROEP) für LIAs zur Diagnostik der LB in Pferdeserum zu entwickeln und anzuwenden.

5. Anwendung eines standardisierten Ergebnisinterpretationsprotokolls für equine Seren in LIAs

Die einzelnen LIA-Bandenergebnisse für alle untersuchten Seren wurden mit einem standardisierten und empfohlenen Evaluations- und Interpretationsprotokoll für equine Seren erneut ausgewertet und klassifiziert sowie die Übereinstimmung der LIA-Endergebnisse im Anschluss statistisch analysiert. Die Anwendung des ROEP verbesserte die diagnostische Genauigkeit, insbesondere in LIA A und LIA B. Neben der verfeinerten Interpretation infektiöser- und impfspezifischer Immunreaktionen in Pferdeseren deckte dieses standardisierte Referenzprotokoll auch Grenzfälle und Fälle ab, die in den LIA-Protokollen der Hersteller bisher nicht spezifiziert waren. Wie bereits erwähnt, beeinflusste die Anwendung des ROEP auch die Testendergebnisse (*overall*) in der Non-Vac-Gruppe, allerdings nur in LIA B. Die Anwendung des ROEP führte insbesondere zu einer höheren Anzahl von „EQUIVOC“-Proben (Abb. 15). Dies deutet darauf hin, dass diese Proben möglicherweise zunächst als falsch-positiv oder falsch-negativ bewertet wurden. Eine Zuordnung zur Kategorie „EQUIVOC“ ist daher vorteilhaft, da die Probenuntersuchung wiederholt werden kann und so eine unzureichende Behandlung des Pferdes vermieden wird.

Overall
according to
ROEP

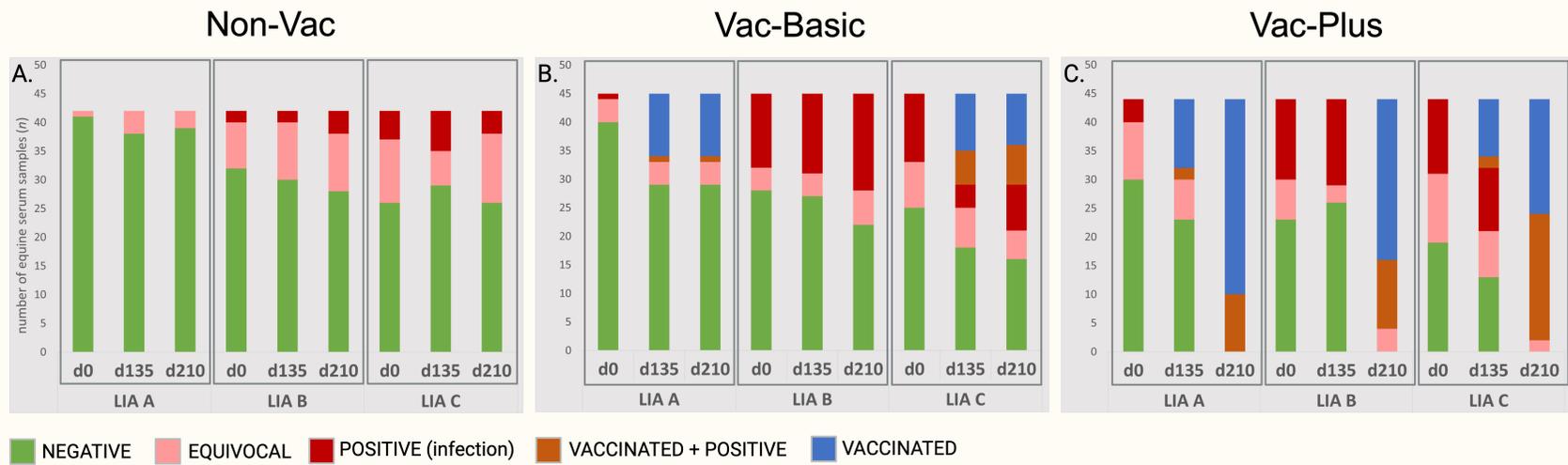


Abbildung 15: Vergleich von Testergebnissen, die mit drei verschiedenen LIAs erzielt wurden, die in der *Bbsl*-Diagnostik mit Pferdeserum verwendet werden.

Die Interpretation der LIA AG-AK-Immunkomplex-Signalintensität-Ergebnisse und deren Klassifizierung erfolgte anhand eines empfohlenen und standardisierten Ergebnisinterpretationsprotokoll für Pferdeseren in LIAs (ROEP) (BROECKL et al., 2024). Die Ergebnisse sind aufgegliedert nach Studiengruppen (Non-Vac, Vac-Basic, Vac-Plus), LIA (A, B, C) und Zeitpunkt der Probenentnahme (d0, d135, d210). Die Anzahl der getesteten Seren, die im finalen Testergebnis (Beurteilung der Banden des gesamten LIA-Streifens) als „Negativ“ (NEGATIV, NEG) evaluiert wurden, sind in grün dargestellt, die „Grenzwertigen“ (EQUIVOCAL, EQUIVOC) in lachs, die „Positiven (Infektion)“ (POSITIVE (infection), POS) in rot, die „Geimpften“ (VACCINATED, VAC) in blau und die, die gleichzeitig als geimpft und infiziert evaluiert wurden (VACCINATED+POSITIVE, VAC+POS), in braun.

Non-Vac, Seren von ungeimpften Pferden; Vac-Basic, Seren von grundimmunisierten Pferden; Vac-Plus, Seren von grundimmunisierten und geboosterten Pferden; d, Tag der Serumprobenentnahme im Studienzeitraum.

Da die Non-Vac-Gruppe als ungeimpfte Negativkontrollgruppe fungierte und nicht von möglichen Impfeffekten beeinflusst wurde, war eine hohe Übereinstimmung zwischen den LIAs in dieser Studiengruppe zu erwarten. Obwohl die Gruppe Non-Vac die höchste beobachtete Übereinstimmung zwischen den Bewertenden für Endergebnisse zu drei ZP aufwies (d0: 71%, d135: 70%, d210: 63%), war die IRR nur gering mit einem niedrigen Kappa zwischen 0,00 und 0,10, je nach ZP der Probenentnahme. Durch Anwendung des ROEP verbesserte sich das Kappa signifikant auf „mäßig“ zu den ZP d0 und d135 ($\kappa = 0,22$), während sich die beobachtete Übereinstimmung zwischen den Bewertern nur leicht verbesserte. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass der Fleiss-Kappa Koeffizient, der die statistische Interrater-Reliabilität mehrerer Bewertender, die dasselbe bewerten, wiedergibt, indem er das Verhältnis zwischen der beobachteten Übereinstimmung (P_o) und der zufällig erwarteten Übereinstimmung (P_e) berechnet, manchmal schwer zu interpretieren ist. Gelegentlich kann die paradoxe Situation eintreten, dass ein hohes Maß an einer beobachteten Übereinstimmung der Bewertenden durch einen niedrigen Kappa-Wert dargestellt sein kann. Dies könnte in der Gruppe „Non-Vac“ der Fall sein, da hier eine hohe Diskrepanz zwischen einer hohen beobachteten Übereinstimmung und einer niedrigen IRR besteht. Unter Berücksichtigung dieses Paradoxons weist die Gruppe „Non-Vac“ insgesamt zu allen drei ZP die höchste beobachtete Übereinstimmung der drei Studiengruppen auf. Dennoch besteht auch hier Verbesserungsbedarf hinsichtlich der Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen den Beurteilenden, beziehungsweise LIAs.

6. Fazit: Notwendigkeit der Anpassung und Standardisierung von LIAs zur Serodiagnostik der eLB

Die Diagnosestellung einer eLB ist anspruchsvoll. Die Serodiagnostik sollte bei Pferden nur zur Bestätigung einer *Bbsl*-Infektion und zur Unterstützung der klinischen Verdachtsdiagnose eingesetzt werden. Um Fehldiagnosen einer eLB und Fehlbehandlungen von Pferden zu vermeiden, ist es äußerst wichtig, dass man praktikable, gut anwendbare, und vor allem zuverlässige und hochspezifische serodiagnostische Testverfahren zur Verfügung hat.

Durch die Bewertung von drei kommerziell verfügbaren LIAs für die LB-Diagnostik in Pferdeserum konnten wir einerseits zeigen, dass OspA impfspezifisch ist; es ist bei ungeimpften Pferden nicht nachweisbar, und möglicherweise auch nicht bei einigen nur grundimmunisierten Pferden aufgrund eines niedrigen AK-Spiegels. Jedoch ist es bei geimpften Pferden, die einem strengen Impfplan mit wiederholten Impfungen unterliegen, zum ZP d210 in hohem Maße zuverlässig nachweisbar. Andererseits konnten wir zeigen, dass die verfügbaren LIAs für den genannten Zweck geeignet sind, jedoch Defizite in Sensitivität, Spezifität und der Ergebnisinterpretation aufweisen, was zu einer eingeschränkten diagnostischen Genauigkeit und

Aussagekraft der Testergebnisse führt und eine Reproduzierbarkeit von Ergebnissen zwischen verschiedenen LIAs schwierig gestaltet. Um diese zentralen Herausforderungen zu bewältigen und die diagnostische Genauigkeit zu verbessern, sind eine Validierung und Standardisierung der Tests zur Serodiagnostik der equinen LB erforderlich. Auf jeden Fall müssen sich praktizierende Tierärzte und Pferdebesitzer auf das diagnostische Ergebnis eines serodiagnostischen Tests verlassen können, um eine angemessene Behandlung eines infizierten Pferdes mit einer klinisch manifesten LB einleiten zu können.

Um eine Standardisierung zu erreichen, sollten LIA-Teststreifen einheitliche und geeignete AG-Signale enthalten, die eine optimale Sensitivität und hohe Spezifität aufweisen, damit *Bbsl*-spezifische AK in Serumproben von Pferden akkurat detektiert werden können. Darüber hinaus sollten sie zwischen AK unterscheiden können, die einerseits durch eine zurückliegende oder aktive Infektion aufgrund einer natürlichen Erregerexposition entstanden sind und, andererseits, durch eine Immunreaktion infolge einer Immunisierung gegen LB induziert wurden. Folglich ist es wichtig, das OspA-Signal als impfspezifisch zu interpretieren, ebenso wie eine Vielzahl weiterer AG-AB-Signale, die möglicherweise durch die Anwendung von Lysatimpfstoffen gegen LB bei Pferden induziert werden. Das heißt, zusätzliche positive AG-AK-Signale (neben OspA) sind möglicherweise nicht indikativ für eine *Bbsl*-Infektion, es sei denn, das VlsE/ C₆-Signal ist positiv. Im Falle von VlsE-AG, welche von lebenden, aktiven Borrelien exprimiert werden, ist es wichtig, diese als infektionsspezifisch zu interpretieren, eine Fehldiagnose hierbei ist für den Patienten ebenso risikobehaftet.

Daher sind Anpassungen von LIAs auf mehreren Ebenen erforderlich. Erstens müssen Sensitivität und Spezifität einzelner AG-Signale verbessert werden, insbesondere die des impfspezifischen OspA und infektionsspezifischen VlsE sowie möglicherweise auch anderer auf den Teststreifen vorhandene AG-Signale. Dies ist von großer Wichtigkeit, da ein falsch-negatives Ergebnis für die AG-AK-Immunkomplex-Signalintensität im Hinblick auf OspA bei geimpften und nicht-infizierten Pferden zu einem falsch-positiven Diagnoseergebnis führen kann. Das heißt, dass möglicherweise eine gewisse Anzahl anderer, impfbedingter AG-AK-Signale (außer VlsE/ C₆) positiv erscheinen könnten, und solche Proben werden dann fälschlicherweise als „mit LB infiziert“ klassifiziert, wenn das OspA-Signal falsch-negativ ist. Diesbezüglich muss in LIA A und LIA B eine Überarbeitung der Ergebnisinterpretationsprotokolle stattfinden. Da LIA B im Vergleich zu den anderen beiden LIAs eine eher geringe Nachweisrate gegenüber OspA-spezifischen AK in Proben geimpfter Pferde demonstrierte, wird zudem eine Neujustierung und Überarbeitung des OspA-AG-Signals empfohlen. Entsprechendes wird für LIA C hinsichtlich des VlsE-AG-Signals auf Teststreifen angeraten.

Mit dem etablierten ROEP stellen wir ein standardisiertes Ergebnisinterpretationsprotokoll als Leitfaden für die Auswertung und Klassifizierung von Pferdeserumproben im LIA bereit, um die

diagnostische Genauigkeit von LIAs zu verbessern, Überdiagnosen von LB bei Pferden sowie Fehlbehandlungen von Pferdepatienten zu vermeiden.

Eine weitere wünschenswerte Anpassung für alle modernen LIAs im wissenschaftlichen Bereich ist die Anwendung einer computergestützten und automatischen Scan- und Auswertesoftware, wie sie bereits von LIA B und LIA C, aber nicht von LIA A bereitgestellt wird. Sie beschleunigt den Prozess, ist benutzerfreundlich und, was am wichtigsten ist, sie ist weniger anfällig für menschliche Fehler, was eine präzise Auswertung der Proben und eine entsprechend verbesserte Reproduzierbarkeit ermöglicht.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Diagnose der equinen Lyme-Borreliose (eLB), eine bakterielle Infektionskrankheit, welche durch Vertreter des *Borrelia-burgdorferi-sensu-lato*-Komplexes (*Bbsl*) verursacht wird, ist aufgrund ihrer unspezifischen klinischen Anzeichen beim Pferd und der Vielzahl an verfügbaren, nicht-standardisierten serologischen Tests eine Herausforderung.

Spezifische, durch Impfstoffe induzierte AK gegen *Bbsl*-spezifische AG, die einen effektiven Schutz vor einer *Bbsl*-Infektion bieten, erschweren die Diagnose zusätzlich.

Der Goldstandard für den Nachweis spezifischer AK gegen *Bbsl* stellt ein zweistufiges Testverfahren dar, welches auf einem AK-Suchtest in Form eines quantitativen *Enzym-linked immunoassay* (ELISA) oder einem indirekten Fluoreszenzantikörpertest (IFA), kombiniert mit einem AK-Bestätigungstest in Form eines qualitativen, hochspezifischen Immunoassays (z. B. LIA) basiert.

In dieser Studie wurden drei LIAs evaluiert und verglichen, die zum Nachweis spezifischer AK gegen *Bbsl*-spezifische AG in Serumproben von Pferden zur Verfügung stehen. Insgesamt wurden 393 Serumproben von 131 Pferden mit bekanntem Serostatus verwendet. Die Studie umfasste Gruppen von ungeimpften ($n = 42$) sowie grundimmunisierten Pferden (Impfungen gegen LB an den Tagen d0 und d14; $n = 45$) und Pferden, die sowohl eine Grundimmunisierung als auch eine Auffrischimpfung am Tag d180 erhalten hatten ($n = 44$). Die Seren wurden an den Tagen d0, d135 und d210 des Studienzeitraums entnommen. Die drei LIAs wurden anhand ihrer Sensitivität, Spezifität sowie den diagnostischen Endergebnissen und der Durchführbarkeit der Tests verglichen. Es wurde die Übereinstimmungen der drei LIAs hinsichtlich ihrer einzelner AG-AK-Komplex-Signalintensität-Ergebnisse sowie ihrer diagnostischen Endergebnisse für Serumproben berechnet. Diese wird als die Interrater-Übereinstimmung und die statistische Reliabilität dargestellt, welche durch den Fleiss-Kappa-Koeffizienten verdeutlicht wird. Die Übereinstimmung der LIAs in ihren serodiagnostischen Ergebnissen reichte von mangelhaft bis mäßig, je nach Gruppe und Zeitpunkt der Blutprobenentnahme. Abhängig vom verwendeten LIA wurden Defizite in Form einer unzureichenden Sensitivität der AG-Signale auf den LIA-Streifen (insbesondere für *Outer surface protein A* (OspA) oder *Variable major protein like sequence Expression* (VlsE)) oder einer unangemessenen Interpretation der Ergebnisse für das OspA-Signal beobachtet. Die technische Anwendbarkeit der drei LIAs war bis auf geringfügige Abweichungen gleichermaßen benutzerfreundlich. Bei zwei LIAs wurde die Testauswertung durch einen mitgelieferten Scanner und eine Evaluationssoftware erleichtert. Um die Funktionalität zu verbessern, eine Standardisierung zu erreichen und die diagnostische Aussagekraft der für Pferdeserumproben verfügbaren LIAs zu präzisieren, ist es ratsam, die Sensitivität und Spezifität einzelner Test-AG-

Signale anzupassen sowie geeignete und einheitliche Evaluationsprotokolle für LIAs zu etablieren. Nur Pferde mit klinischen Anzeichen, die für eine eLB sprechen, und einem positiven Nachweis infektionsspezifischer AK gegen *Bbsl* benötigen eine antibiotische Behandlung. Während ein falsch-negatives serodiagnostisches Ergebnis dazu führen kann, dass eine angemessene und rechtzeitige Behandlung ausbleibt, kann ein falsch-positives Ergebnis unnötige Antibiotikabehandlungen des Pferdes bedeuten. Dies kann nachteilige Effekte auf die Gesundheit des Pferdes haben (z. B. Auswirkungen von Arzneimittelunverträglichkeit, Kolitis, Diarrhö, erhöhtes Risiko für weitere Infektionen), sowie das Risiko der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei umstehenden Bakterien nach sich ziehen.

SUMMARY

Diagnosis of equine Lyme borreliosis (eLB), an infection caused by members of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex (*Bbsl*), is challenging due to the nonspecific clinical signs of the disease and due to the variety of non-standardized serological tests. Specific vaccine-induced antibodies against *Bbsl*-specific antigens, providing an effective protection against the infection, complicate the issue further. The standard for the detection of specific antibodies against *Bbsl* is a two-tier test system based on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or indirect fluorescent antibody test (IFA) for antibody screening combined with a qualitative, highly specific immunoassay (e. g. line immunoassay (LIA)) for confirmation.

In this study, three LIAs available for detection of antibodies in equine serum samples were evaluated and compared. A total of 393 serum samples of 131 horses with known serostatus were used. It included groups of non-vaccinated horses ($n = 42$), immunized horses (vaccinations against LB on days 0 and 14; $n = 45$), and horses that had received an initial immunization plus an additional booster on day 180 ($n = 44$). Sera were collected on days 0, 135 and 210 of the study. Results were compared considering the tests' sensitivity, specificity, diagnostic outcome, and the operability of each test. Agreements of the diagnostic results among the LIAs were calculated for overall test results and single antigen-antibody-complex signal results. They are presented as inter-rater agreement and statistic reliability, represented by the Fleiss' kappa coefficient. Agreement scores ranged from poor to moderate depending on group and timepoint of blood sample collection. Depending on LIA used, deficiencies were observed in the form of nonsufficient sensitivity of antigen signals on the LIA strips (especially for *outer surface protein A* (OspA) or variable *major protein like sequence expressed* (VlsE)) or as an inappropriate test interpretation of the OspA signal. Operability of the three LIAs was equally user-friendly with minor variations. In two LIAs, test-evaluation was simplified by a supplied scanner and evaluation software. To improve functionality, reach standardization and improve the diagnostic value of available LIAs for equine serum samples it is advisable to adjust sensitivity and specificity of single test antigen signals and establish appropriate evaluation protocols across LIAs.

Only horses with clinical signs consistent with eLB and infection-specific antibodies against *Bbsl* need antibiotic treatment; while a false-negative serodiagnostic result may entail the omission of appropriate on-time treatment, a false-positive result may evoke unnecessary antibiotic treatments with detrimental effects on the horses' health (e.g. effects of drug intolerance, colitis, diarrhea, increased risk for additional infections) and the risk of antibiotic-resistance development in bystander bacteria.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Adeolu M, Gupta RS. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014; 105: 1049-72.
- Aguero-Rosenfeld ME, Roberge J, Carbonaro CA, Nowakowski J, Nadelman RB, Wormser GP. Effects of OspA Vaccination on Lyme Disease Serologic Testing. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 3718-3721.
- Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 484-509.
- Alkishe AA, Peterson AT, Samy AM. Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. *PLoS One* 2017; 12: e0189092.
- Alvarez-Narvaez S, Berghaus LJ, Morris ERA, Willingham-Lane JM, Slovis NM, Giguere S, Cohen ND. A Common Practice of Widespread Antimicrobial Use in Horse Production Promotes Multi-Drug Resistance. *Sci Rep* 2020; 10: 911.
- Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22: 195-215, v.
- Anonymous. Recommendations for the use of Lyme disease vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 1999; 48: 1-17, 21-5.
- 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. *J Infect Dis* 1993; 167: 651-64.
- Appel MJG. Lyme-Disease in Dogs and Cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1990; 12: 617-626.
- Arnold C, Pilla R, Chaffin K, Lidbury J, Steiner J, Suchodolski J. Alterations in the Fecal Microbiome and Metabolome of Horses with Antimicrobial-Associated Diarrhea Compared to Antibiotic-Treated and Non-Treated Healthy Case Controls. *Animals (Basel)* 2021; 11
- Asghar N, Petersson M, Johansson M, Dinnetz P. Local landscape effects on population dynamics of *Ixodes ricinus*. *Geospat Health* 2016; 11: 487.
- Ashford RW. When is a reservoir not a reservoir? *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1495-6.

- Aslam B, Nisar MA, Khurshid M, Farooq Salamat MK. Immune escape strategies of *Borrelia burgdorferi*. *Future Microbiol* 2017; 12: 1219-1237.
- 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.
- Balashov YS (1967) Blood-sucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals. 319 pp.
- Balmelli T, Piffaretti JC. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Research in Microbiology* 1995; 146: 329-340.
- Bankhead T. Role of the VlsE Lipoprotein in Immune Avoidance by the Lyme Disease Spirochete *Borrelia burgdorferi*. *For Immunopathol Dis Therap* 2016; 7: 191-204.
- 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. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42: 378-83.
- Barbour AG. Laboratory aspects of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 399-414.
- Barbour AG. Antigenic variation of a relapsing fever *Borrelia* species. *Annu Rev Microbiol* 1990; 44: 155-71.
- Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 1986; 50: 381-400.
- Barbour AG, Tessier SL, Hayes SF. Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. *Infect Immun* 1984; 45: 94-100.
- Barth C, Straubinger RK, Krupka I, Muller 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.
- Bartol J. Is Lyme disease overdiagnosed in horses? *Equine veterinary journal* 2013; 45 5: 529-30.
- Becker M, Bunikis J, Lade BD, Dunn JJ, Barbour AG, Lawson CL. Structural investigation of *Borrelia burgdorferi* OspB, a bactericidal Fab target. *J Biol Chem* 2005; 280: 17363-70.
- Beermann S, Dobler G, Faber M, Frank C, Habedank B, Hagedorn P, Kampen H, Kuhn C, Nygren T, Schmidt-Chanasit J, Schmolz E, Stark K, Ulrich RG, Weiss S, Wilking H. Auswirkungen von Klimaveränderungen auf Vektor- und Nagetier-assoziierte Infektionskrankheiten. *Journal of Health Monitoring* 2023;

- Behera AK, Durand E, Cugini C, Antonara S, Bourassa L, Hildebrand E, Hu LT, Coburn J. *Borrelia burgdorferi* BBB07 interaction with integrin alpha3beta1 stimulates production of pro-inflammatory mediators in primary human chondrocytes. *Cell Microbiol* 2008; 10: 320-31.
- Ben-Menachem G, Kubler-Kielb J, Coxon B, Yergey A, Schneerson R. A newly discovered cholesteryl galactoside from *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7913-8.
- Berardi VP, Weeks KE, Steere AC. Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody responses by using an antibody-capture enzyme immunoassay. *J Infect Dis* 1988; 158: 754-60.
- Bissett ML, Hill W. Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2296-301.
- Blevins JS, Hagman KE, Norgard MV. Assessment of decorin-binding protein A to the infectivity of *Borrelia burgdorferi* in the murine models of needle and tick infection. *BMC Microbiol* 2008; 8: 82.
- Bohe JR, Jutras BL, Horn EJ, Embers ME, Bailey A, Moritz RL, Zhang Y, Soloski MJ, Ostfeld RS, Marconi RT, Aucott J, Ma'ayan A, Keesing F, Lewis K, Ben Mamoun C, Rebman AW, McClune ME, Breitschwerdt EB, Reddy PJ, Maggi R, Yang F, Nemser B, Ozcan A, Garner O, Di Carlo D, Ballard Z, Joung HA, Garcia-Romeu A, Griffiths RR, Baumgarth N, Fallon BA. Recent Progress in Lyme Disease and Remaining Challenges. *Front Med (Lausanne)* 2021; 8: 666554.
- Bosler EM, Cohen DP, Schulze TL, Olsen C, Bernard W, Lissman B. Host responses to *Borrelia burgdorferi* in dogs and horses. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 539: 221-34.
- Brade V, Hunfeld K-P. Borrelien. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: Springer 2009: 383-389.
- Branda JA, Steere AC. Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 2021; 34
- Broeckl CV, Hiereth S, Straubinger RK. A comparative study evaluating three line immunoassays available for serodiagnosis of equine Lyme borreliosis: Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-specific antibodies in serum samples of vaccinated and non-vaccinated horses. *PLoS One* 2024; 19: e0316170.
- Brooks CS, Hefty PS, Jolliff SE, Akins DR. Global analysis of *Borrelia burgdorferi* genes regulated by mammalian host-specific signals. *Infect Immun* 2003; 71: 3371-83.

- Brown JP, Zachary JF, Teuscher C, Weis JJ, Wooten RM. Dual role of interleukin-10 in murine Lyme disease: regulation of arthritis severity and host defense. *Infect Immun* 1999; 67: 5142-50.
- Browning A, Carter SD, Barnes A, May C, Bennett D. Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. *Vet Rec* 1993; 132: 610-1.
- Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 224-32.
- Brunet LR, Sellitto C, Spielman A, Telford SR, 3rd. Antibody response of the mouse reservoir of *Borrelia burgdorferi* in nature. *Infect Immun* 1995; 63: 3030-6.
- Bunikis J, Barbour AG. Laboratory testing for suspected Lyme disease. *Med Clin North Am* 2002; 86: 311-40.
- Burgdorfer W. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med* 1984; 57: 515-20.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 1982; 216: 1317-9.
- Burgess EC. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 539: 235-43.
- Burgess EC. Experimentally induced infection of cats with *Borrelia burgdorferi*. *American Journal of Veterinary Research* 1992; 53: 1507-1511.
- Burgess EC, Gendron-Fitzpatrick A (1990) Experimental infection of equines with *Borrelia burgdorferi*. Lyme Borreliosis 1990, Stockholm (Sweden), 18-21 Jun 1990
- Burgess EC, Gillette D, Pickett JP. Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189: 1340-2.
- Burgess EC, Mattison M. Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 191: 1457-8.
- Burn L, Tran TMP, Pilz A, Vyse A, Fletcher MA, Angulo FJ, Gessner BD, Moïsi JC, Jodar L, Stark JH. Incidence of Lyme Borreliosis in Europe from National Surveillance Systems (2005-2020). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2023; 23: 156-171.
- Butler CM, Houwers DJ, Jongejan F, van der Kolk JH. *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. *Vet Q* 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. *J Bacteriol* 2006; 188: 4879-89.
- Caimano MJ, Groshong AM, Belperron A, Mao J, Hawley KL, Luthra A, Graham DE, Earnhart CG, Marconi RT, Bockenstedt LK, Blevins JS, Radolf JD. The RpoS Gatekeeper in *Borrelia burgdorferi*: An Invariant Regulatory Scheme That Promotes Spirochete Persistence in Reservoir Hosts and Niche Diversity. *Front Microbiol* 2019; 10: 1923.
- Caine JA, Lin YP, Kessler JR, Sato H, Leong JM, Coburn J. *Borrelia burgdorferi* outer surface protein C (OspC) binds complement component C4b and confers bloodstream survival. *Cell Microbiol* 2017; 19
- 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. *Scand J Infect Dis* 1993; 25: 441-8.
- Cardenas-de la Garza JA, De la Cruz-Valadez E, Ocampo-Candiani J, Welsh O. Clinical spectrum of Lyme disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019; 38: 201-208.
- Carr AL, Mitchell RD, III, Dhammi A, Bissinger BW, Sonenshine DE, Roe RM. Tick Haller's Organ, a New Paradigm for Arthropod Olfaction: How Ticks Differ from Insects. *Int J Mol Sci* 2017; 18
- Carroll JA, Garon CF, Schwan TG. Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1999; 67: 3181-7.
- Carroll JF. Responses of Three Species of Adult Ticks (Acari: Ixodidae) to Chemicals in the Coats of Principal and Minor Hosts. *Journal of Medical Entomology* 1999; 36: 238-242.
- Casjens S, Palmer N, Van Vugt R, Mun Huang W, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Sutton G, Peterson J, Dodson RJ. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology* 2000; 35: 490-516.
- 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® 4Dx®). *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 2008; 6: 145–150.
- Chang Y, Moon KH, Zhao X, Norris SJ, Motaleb MA, Liu J. Structural insights into flagellar stator-rotor interactions. *Elife* 2019; 8

- 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: 540-548.
- 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*. *Infect Immun* 1995; 63: 3543-9.
- 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.
- 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* 2000; 37: 68-76.
- Chen WH, Strych U, Bottazzi ME, Lin YP. Past, present, and future of Lyme disease vaccines: antigen engineering approaches and mechanistic insights. *Expert Rev Vaccines* 2022; 21: 1405-1417.
- Chomel B. Lyme disease. *Rev Sci Tech* 2015; 34: 569-76.
- Chu CY, Liu W, Jiang BG, Wang DM, Jiang WJ, Zhao QM, Zhang PH, Wang ZX, Tang GP, Yang H, Cao WC. Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3130-3.
- Claerebout E, Losson B, Cochez C, Casaert S, Dalemans AC, De Cat A, Madder M, Saegerman C, Heyman P, Lempereur L. Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasit Vectors* 2013; 6: 183.
- Coburn J, Cugini C. Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin α v β 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7301-6.
- Coburn J, Garcia B, Hu LT, Jewett MW, Kraiczy P, Norris SJ, Skare J. Lyme Disease Pathogenesis. *Curr Issues Mol Biol* 2021; 42: 473-518.
- Coburn J, Leong J, Chaconas G. Illuminating the roles of the *Borrelia burgdorferi* adhesins. *Trends Microbiol* 2013; 21: 372-9.
- Coburn J, Medrano M, Cugini C. *Borrelia burgdorferi* and its tropisms for adhesion molecules in the joint. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 394-8.

- Cohen D, Bosler EM, Bernard W, Meirs D, 2nd, Eisner R, Schulze TL. Epidemiologic studies of Lyme disease in horses and their public health significance. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 539: 244-57.
- Coleman JL, Crowley JT, Toledo AM, Benach JL. The HtrA protease of *Borrelia burgdorferi* degrades outer membrane protein BmpD and chemotaxis phosphatase CheX. *Mol Microbiol* 2013; 88: 619-33.
- Comstedt P, Bergström S, Olsen B, Garpmo U, Marjavaara L, Mejlom H, Barbour AG, Bunikis J. Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12: 1087-1095.
- Conlon JA, Mather TN, Tanner P, Gallo G, Jacobson RH. Efficacy of a nonadjuvanted, outer surface protein A, recombinant vaccine in dogs after challenge by ticks naturally infected with *Borrelia burgdorferi*. *Vet Ther* 2000; 1: 96-107.
- Cook MJ. Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *Int J Gen Med* 2015; 8: 1-8.
- Costa MC, Stampfli HR, Arroyo LG, Allen-Vercoe E, Gomes RG, Weese JS. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. *BMC Vet Res* 2015; 11: 19.
- Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. *J Infect Dis* 1984; 149: 789-95.
- Crother TR, Champion CI, Whitelegge JP, Aguilera R, Wu XY, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA. Temporal analysis of the antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection in rabbit skin. *Infect Immun* 2004; 72: 5063-72.
- Curtis MW, Fierros CH, Hahn BL, Surdel MC, Kessler J, Anderson PN, Vandewalle-Capo M, Bonde M, Zhu J, Bergstrom S, Coburn J. Identification of amino acid domains of *Borrelia burgdorferi* P66 that are surface exposed and important for localization, oligomerization, and porin function of the protein. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12: 991689.
- Cutler SJ, Ruzic-Sabljić E, Potkonjak A. Emerging borreliae - Expanding beyond Lyme borreliosis. *Mol Cell Probes* 2017; 31: 22-27.
- de Carvalho IL, Fonseca JE, Marques JG, Ullmann A, Hojgaard A, Zeidner N, Nuncio MS. Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. *Clin Rheumatol* 2008; 27: 1587-91.

- de la Fuente J, Estrada-Peña A, Rafael M, Almazán C, Bermúdez S, Abdelbaset AE, Kasaija PD, Kabi F, Akande FA, Ajagbe DO, Bamgbose T, Ghosh S, Palavesam A, Hamid PH, Oskam CL, Egan SL, Duarte-Barbosa A, Hekimoglu O, Szabó MPJ, Labruna MB, Dahal A. Perception of Ticks and Tick-Borne Diseases Worldwide. *Pathogens* 2023; 12
- de Silva AM, Telford SR, 3rd, Brunet LR, Barthold SW, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *J Exp Med* 1996; 183: 271-5.
- de Silva AM, Tyson KR, Pal U. Molecular characterization of the tick-*Borrelia* interface. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; 14: 3051-63.
- de Silva AM, Zeidner NS, Zhang Y, Dolan MC, Piesman J, Fikrig E. Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infect Immun* 1999; 67: 30-5.
- Derdáková M, Lencáková D. Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Ann Agric Environ Med* 2005; 12: 165-72.
- DeVilbiss BA, Mohammed HO, Divers TJ. Perception of Equine Practitioners Regarding the Occurrence of Selected Equine Neurologic Diseases in the Northeast Over a 10-Year Period. *Journal of Equine Veterinary Science* 2009; 29: 237-246.
- Ditton HJ, Neuss M, Zoller L. Evidence that *Borrelia burgdorferi* immunodominant proteins p100, p94 and p83 are identical. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 73: 217-20.
- Divers TJ. Equine Lyme Disease. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013; 33: 488-492.
- 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. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 617-632.
- Diza E, Papa A, Vezyri E, Tsounis S, Milonas I, Antoniadis A. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg Infect Dis* 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. *Vet Sci* 2022; 9
- Dong Y, Zhou G, Cao W, Xu X, Zhang Y, Ji Z, Yang J, Chen J, Liu M, Fan Y, Kong J, Wen S, Li B, Yue P, Liu A, Bao F. Global seroprevalence and sociodemographic characteristics of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in human populations: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Glob Health* 2022; 7

- Donta ST, States LJ, Adams WA, Bankhead T, Baumgarth N, Embers ME, Lochhead RB, Stevenson B. Report of the Pathogenesis and Pathophysiology of Lyme Disease Subcommittee of the HHS Tick Borne Disease Working Group. *Front Med (Lausanne)* 2021; 8: 643235.
- Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993; 167: 392-400.
- Dumic I, Severnini E. "Ticking Bomb": The Impact of Climate Change on the Incidence of Lyme Disease. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology* 2018; 2018
- Dunham-Ems SM, Caimano MJ, Pal U, Wolgemuth CW, Eggers CH, Balic A, Radolf JD. Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. *J Clin Invest* 2009; 119: 3652-65.
- Dzierzecka M, Kita J. The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part II. Western blot. *Pol J Vet Sci* 2002a; 5: 79-84.
- Dzierzecka M, Kita J. The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part I. Indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Pol J Vet Sci* 2002b; 5: 71-7.
- Eisen L. Pathogen transmission in relation to duration of attachment by *Ixodes scapularis* ticks. *Ticks Tick Borne Dis* 2018; 9: 535-542.
- Elsner RA, Hastey CJ, Olsen KJ, Baumgarth N. Suppression of Long-Lived Humoral Immunity Following *Borrelia burgdorferi* Infection. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1004976.
- Embers ME, Jacobs MB, Johnson BJ, Philipp MT. 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: 931-6.
- Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 419-27.
- Enkelmann J, Böhmer M, Fingerle V, Sifczyk C, Werber D, Littmann M, Merbecks SS, Helmeke C, Schroeder S, Hell S, Schlotthauer U, Burckhardt F, Stark K, Schielke A, Wilking H. Incidence of notified Lyme borreliosis in Germany, 2013-2017. *Sci Rep* 2018; 8: 14976.
- Eshoo MW, Schutzer SE, Crowder CD, Carolan HE, Ecker DJ. Achieving molecular diagnostics for Lyme disease. *Expert Rev Mol Diagn* 2013; 13: 875-83.
- Estrada-Pena A. Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitol Res* 2008; 103 Suppl 1: S87-95.

- Estrada-Pena 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. *Int J Health Geogr* 2018; 17: 41.
- Estrada-Peña A, de la Fuente J. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Research* 2014; 108: 104-128.
- Estrada-Peña A, Sprong H, Cabezas-Cruz A, de la Fuente J, Ramo A, Coipan EC. Nested coevolutionary networks shape the ecological relationships of ticks, hosts, and the Lyme disease bacteria of the *Borrelia burgdorferi* (s.l.) complex. *Parasites & Vectors* 2016; 9: 517.
- Fawcett PT, Rose CD, Maduskuie V. Long-term effects of immunization with recombinant lipoprotein outer surface protein a on serologic test for lyme disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 808-10.
- Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, Flavell RA. Protection of mice from Lyme borreliosis by oral vaccination with *Escherichia coli* expressing OspA. *J Infect Dis* 1991; 164: 1224-7.
- Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, Flavell RA. Long-term protection of mice from Lyme disease by vaccination with OspA. *Infect Immun* 1992a; 60: 773-7.
- Fikrig E, Feng W, Aversa J, Schoen RT, Flavell RA. Differential expression of *Borrelia burgdorferi* genes during erythema migrans and Lyme arthritis. *J Infect Dis* 1998; 178: 1198-201.
- Fikrig E, Huguenel ED, Berland R, Rahn DW, Hardin JA, Flavell RA. Serologic diagnosis of Lyme disease using recombinant outer surface proteins A and B and flagellin. *J Infect Dis* 1992b; 165: 1127-32.
- Fikrig E, Pal U, Chen M, Anderson JF, Flavell RA. OspB antibody prevents *Borrelia burgdorferi* colonization of *Ixodes scapularis*. *Infect Immun* 2004; 72: 1755-9.
- Fikrig E, Telford SR, 3rd, Barthold SW, Kantor FS, Spielman A, Flavell RA. Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vector ticks feeding on OspA-immunized mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992c; 89: 5418-21.
- Fingerle V, Eiffert H, Gessner A, Göbel U, Hofmann H, Hunfeld k-p, Krause A, Pfister HW, Reischl U, Sing A, Stanek G, Wilske B, Zöller L. MiQ12 Lyme-Borreliose: 2017: 1-68.
- 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*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1867-9.

- 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. *Int J Med Microbiol* 2008; 298: 279-90.
- Fingerle V, Sing A. [Lyme Borreliosis: Serological and Microbiological Diagnostics and Differential Diagnosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 2020; 145: 29-34.
- Fischer JR, LeBlanc KT, Leong JM. Fibronectin binding protein BBK32 of the Lyme disease spirochete promotes bacterial attachment to glycosaminoglycans. *Infect Immun* 2006; 74: 435-41.
- 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.
- Fuchs H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12594-8.
- 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. *Microbiol Immunol* 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.
- Garcia R. Carbon Dioxide as an Attractant for Certain Ticks (Acarina: Argasidae and Ixodidae). *Annals of The Entomological Society of America* 1962; 55: 605-606.
- Gauthier DT, Mansfield LS. Western immunoblot analysis for distinguishing vaccination and infection status with *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) in dogs. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 259-65.
- 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

- Gehlen H, Inerle KS, Ulrich S, Briese B, Straubinger RK. Equine Lyme borreliosis and equine granulocytic anaplasmosis Part 2-Clinical relevance (Vet survey). *Pferdeheilkunde* 2022; 38: 544-553.
- 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: 273-278.
- Gern L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: life in the wilds. *Parasite* 2008; 15: 244-7.
- Gern L, Hu CM, Voet P, Hauser P, Lobet Y. Immunization with a polyvalent OspA vaccine protects mice against *Ixodes ricinus* tick bites infected by *Borrelia burgdorferi* ss, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii*. *Vaccine* 1997; 15: 1551-7.
- Gern L, Schaible UE, Simon MM. Mode of inoculation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* influences infection and immune responses in inbred strains of mice. *J Infect Dis* 1993; 167: 971-5.
- Gethmann J, Hoffmann B, Kasbohm E, Suss J, Habedank B, Conraths FJ, Beer M, Klaus C. Research paper on abiotic factors and their influence on *Ixodes ricinus* activity-observations over a two-year period at several tick collection sites in Germany. *Parasitol Res* 2020; 119: 1455-1466.
- Geurden T, Becskei C, Six RH, Maeder S, Latrofa MS, Otranto D, Farkas R. Detection of tick-borne pathogens in ticks from dogs and cats in different European countries. *Ticks Tick Borne Dis* 2018; 9: 1431-1436.
- 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. *Infect Immun* 2000; 68: 411-4.
- Gipson CL, de Silva AM. Interactions of OspA monoclonal antibody C3.78 with *Borrelia burgdorferi* within ticks. *Infect Immun* 2005; 73: 1644-7.
- Goettner G, Schulte-Spechtel U, Hillermann R, Liegl G, Wilske B, Fingerle V. Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3602-9.

- Golde WT, Piesman J, Dolan MC, Kramer M, Hauser P, Lobet Y, Capiou C, Desmons P, Voet P, Dearwester D, Frantz JC. Reactivity with a specific epitope of outer surface protein A predicts protection from infection with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1997; 65: 882-9.
- 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.
- Goren A, Viljugrein H, Rivrud IM, Jore S, Bakka H, Vindenes Y, Mysterud A. The emergence and shift in seasonality of Lyme borreliosis in Northern Europe. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 2023; 290
- Gray J. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Review of Medical and Veterinary Entomology* 1991; 79: 323–333.
- Gray JS, Kahl O, Lane RS, G S (2002) *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. New York: CABI-Publishing
- Gray JS, Dautel H, Estrada-Pena A, Kahl O, Lindgren E. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 2009: 593232.
- Grazlewska W, Holec-Gasior L. Antibody Cross-Reactivity in Serodiagnosis of Lyme Disease. *Antibodies (Basel)* 2023; 12
- Grimm D, Tilly K, Byram R, Stewart PE, Krum JG, Bueschel DM, Schwan TG, Policastro PF, Elias AF, Rosa PA. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3142-7.
- Guarino C, Asbie S, Rohde J, Glaser A, Wagner B. Vaccination of horses with Lyme vaccines for dogs induces short-lasting antibody responses. *Vaccine* 2017; 35: 4140-4147.
- Guarino C, Pinn-Woodcock T, Levine DG, Miller J, Johnson AL. Case Report: Nuchal Bursitis Associated With *Borrelia burgdorferi* Infection in a Horse. *Front Vet Sci* 2021; 8: 743067.

- Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, Sattelle DB, de la Fuente J, Ribeiro JM, Megy K, Thimmapuram J, Miller JR, Walenz BP, Koren S, Hostetler JB, Thiagarajan M, Joardar VS, Hannick LI, Bidwell S, Hammond MP, Young S, Zeng Q, Abrudan JL, Almeida FC, Ayllón N, Bhide K, Bissinger BW, Bonzon-Kulichenko E, Buckingham SD, Caffrey DR, Caimano MJ, Croset V, Driscoll T, Gilbert D, Gillespie JJ, Giraldo-Calderón GI, Grabowski JM, Jiang D, Khalil SMS, Kim D, Kocan KM, Koči J, Kuhn RJ, Kurti TJ, Lees K, Lang EG, Kennedy RC, Kwon H, Perera R, Qi Y, Radolf JD, Sakamoto JM, Sánchez-Gracia A, Severo MS, Silverman N, Šimo L, Tojo M, Tornador C, Van Zee JP, Vázquez J, Vieira FG, Villar M, Wespiser AR, Yang Y, Zhu J, Arensburger P, Pietrantonio PV, Barker SC, Shao R, Zdobnov EM, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJP, Park Y, Rozas J, Benton R, Pedra JHF, Nelson DR, Unger MF, Tubio JMC, Tu Z, Robertson HM, Shumway M, Sutton G, Wortman JR, Lawson D, Wikel SK, Nene VM, Fraser CM, Collins FH, Birren B, Nelson KE, Caler E, Hill CA. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature Communications* 2016; 7: 10507.
- Guo BP, Brown EL, Dorward DW, Rosenberg LC, Hook M. Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 1998; 30: 711-23.
- Guo BP, Norris SJ, Rosenberg LC, Höök M. Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan decorin. *Infect Immun* 1995; 63: 3467-72.
- Haddad V, Jr., Haddad MR, Santos M, Cardoso JLC. Skin manifestations of tick bites in humans. *An Bras Dermatol* 2018; 93: 251-255.
- 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 Vet J* 1996; 28: 84-8.
- Hallstrom T, Siegel C, Morgelin M, Kraiczy P, Skerka C, Zipfel PF. CspA from *Borrelia burgdorferi* inhibits the terminal complement pathway. *mBio* 2013; 4
- Hammers-Berggren S, Lebech AM, Karlsson M, Svenungsson B, Hansen K, Stiernstedt G. Serological follow-up after treatment of patients with erythema migrans and neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1519-25.
- 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.
- Hansford KM, Gillingham EL, Vaux AGC, Cull B, McGinley L, Catton M, Wheeler BW, Tschirren B, Medlock JM. Impact of green space connectivity on urban tick presence, density and *Borrelia* infected ticks in different habitats and seasons in three cities in southern England. *Ticks Tick Borne Dis* 2023; 14: 102103.

- Härter L, Straubinger RK, Summers BA, Erb HN, Appel MJG. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in dogs experimentally infected with *Borrelia burgdorferi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999; 67: 271-284.
- Hauser U, Krahl H, Peters H, Fingerle V, Wilske B. Impact of strain heterogeneity on Lyme disease serology in Europe: comparison of enzyme-linked immunosorbent assays using different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* 1998a; 36: 427-36.
- Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1433-44.
- 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* 1998b; 5: 456-462.
- 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: 145-51.
- Heylen D, Matthysen E, Fonville M, Sprong H. Songbirds as general transmitters but selective amplifiers of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genotypes in *Ixodes ricinus* ticks. *Environmental Microbiology* 2014; 16: 2859-2868.
- Hodzic E, Feng S, Freet KJ, Barthold SW. *Borrelia burgdorferi* population dynamics and prototype gene expression during infection of immunocompetent and immunodeficient mice. *Infect Immun* 2003; 71: 5042-55.
- Hojgaard A, Eisen RJ, Piesman J. Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.s. during the key third day of feeding by nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2008; 45: 732-6.
- Hu CM, Wilske B, Fingerle V, Lobet Y, Gern L. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1169-71.
- Hu LT, Klempner MS. Host-pathogen interactions in the immunopathogenesis of Lyme disease. *Journal of Clinical Immunology* 1997; 17: 354-365.
- Hulinska D. [Diagnosis of Lyme borreliosis with western blotting]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1997; 46: 3-8.

- Humair PF, Gern L. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes and Infection* 2000; 2: 915-922.
- Hyde JA. *Borrelia burgdorferi* Keeps Moving and Carries on: A Review of Borrelial Dissemination and Invasion. *Front Immunol* 2017; 8: 114.
- Hyde JA, Trzeciakowski JP, Skare JT. *Borrelia burgdorferi* alters its gene expression and antigenic profile in response to CO₂ levels. *J Bacteriol* 2007; 189: 437-45.
- Imai DM, Barr BC, Daft B, Bertone JJ, Feng S, Hodzic E, Johnston JM, Olsen KJ, Barthold SW. Lyme neuroborreliosis in 2 horses. *Vet Pathol* 2011; 48: 1151-7.
- Imholt C, Reil D, Eccard JA, Jacob D, Hempelmann N, Jacob J. Quantifying the past and future impact of climate on outbreak patterns of bank voles (*Myodes glareolus*). *Pest Manag Sci* 2015; 71: 166-72.
- Indest KJ, Ramamoorthy R, Solé M, Gilmore RD, Johnson B, Philipp MT. Cell-density-dependent expression of *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in vitro. *Infection and immunity* 1997; 65: 1165-1171.
- Ivanova LB, Tomova A, González-Acuña D, Murúa R, Moreno CX, Hernández C, Cabello J, Cabello C, Daniels TJ, Godfrey HP, Cabello FC. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ Microbiol* 2014; 16: 1069-80.
- Jaenson TG, Tälleklint L. Incompetence of roe deer as reservoirs of the Lyme borreliosis spirochete. *J Med Entomol* 1992; 29: 813-7.
- James FM, Engiles JB, Beech J. Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 237: 1180-5.
- Janzén T, Choudhury F, Hammer M, Petersson M, Dinnétz P. Ticks - public health risks in urban green spaces. *BMC Public Health* 2024; 24: 1031.
- Janzen T, Hammer M, Petersson M, Dinnetz P. Factors responsible for *Ixodes ricinus* presence and abundance across a natural-urban gradient. *PLoS One* 2023; 18: e0285841.
- Jauris-Heipke S, Fuchs R, Motz M, Preac-Mursic V, Schwab E, Soutschek E, Will G, Wilske B. Genetic heterogeneity of the genes coding for the outer surface protein C (OspC) and the flagellin of *Borrelia burgdorferi*. *Medical Microbiology and Immunology* 1993; 182: 37-50.

- Jauris-Heipke S, Rössle B, Wanner G, Habermann C, Rössler D, Fingerle V, Lehnert G, Lobentanzer R, Pradel I, Hillenbrand B, Schulte-Spechtel U, Wilske 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. *Med Microbiol Immunol* 1999; 187: 213-9.
- Jennett AL, Smith FD, Wall R. Tick infestation risk for dogs in a peri-urban park. *Parasit Vectors* 2013; 6: 358.
- Jimenez BLM, Elghandour M, Adegbeye MJ, Tirado Gonzalez DN, Tirado Estrada G, Salem AZM, Pacheco EBF, Pliego AB. Use of Antibiotics in Equines and Their Effect on Metabolic Health and Cecal Microflora Activities. *J Equine Vet Sci* 2021; 105: 103717.
- Johnson AL, Divers TJ, Chang YF. Validation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection in horses. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 321-4.
- Johnson B, Halperin J. Lyme disease: an evidence-based approach. CAB International 2011: 73-88.
- Johnson BJ, Robbins KE, Bailey RE, Cao BL, Sviat SL, Craven RB, Mayer LW, Dennis DT. Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. *J Infect Dis* 1996; 174: 346-53.
- 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* 1984; 34: 496-497.
- Johnstone LK, Engiles JB, Aceto H, Buechner-Maxwell V, Divers T, Gardner R, Levine R, Scherrer N, Tewari D, Tomlinson J, Johnson AL. Retrospective Evaluation of Horses Diagnosed with Neuroborreliosis on Postmortem Examination: 16 Cases (2004-2015). *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1305-12.
- Kabat EA. [1] Basic principles of antigen-antibody reactions. In: *Methods in Enzymology*: Academic Press 1980: 3-49.
- Kahl O, Dautel H, Mackenstedt U, Oehme R, Pfeffer M, Schaub GA, Rubel F, Brugger K, tick-radar GmbH B (2016) Auswirkungen des Klimawandels auf das Vorkommen, die Aktivität und Verbreitung von als Überträger von Krankheitserregern bedeutenden Schildzecken. Fortführung von Vorhaben FKZ 3711 48 402 - Forschungsbericht FB 002708 im Auftrag des Umwelt-bundesamtes

- Karvonen K, Nykky J, Marjomäki V, Gilbert L. Distinctive Evasion Mechanisms to Allow Persistence of *Borrelia burgdorferi* in Different Human Cell Lines. *Front Microbiol* 2021; 12: 711291.
- Kasparkova N, Bartova E, Zakovska A, Budikova M, Sedlak K. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Clinically Healthy and Sick Horses: First Report from the Czech Republic. *Microorganisms* 2023; 11
- Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 843-8.
- Kelly RT (1981) *The Genus Borrelia*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Kemp DH, Stone BF, Binnington KC. CHAPTER 4 - Tick Attachment and Feeding: Role of the Mouthparts, Feeding Apparatus, Salivary Gland Secretions and the Host Response. In: *Physiology of Ticks*. Obenchain FD, Galun R, eds.: Pergamon 1982: 119-168.
- Kenedy MR, Lenhart TR, Akins DR. The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2012; 66: 1-19.
- Kenedy MR, Vuppala SR, Siegel C, Kraiczy P, Akins DR. CspA-mediated binding of human factor H inhibits complement deposition and confers serum resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 2009; 77: 2773-82.
- Khusro A, Aarti C, Buendia-Rodriguez G, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Barbabosa-Pliego A. Adverse Effect of Antibiotics Administration on Horse Health: An Overview. *J Equine Vet Sci* 2021; 97: 103339.
- Klose M, Scheungrab M, Luckner M, Wanner G, Linder S. FIB-SEM-based analysis of *Borrelia* intracellular processing by human macrophages. *J Cell Sci* 2021; 134
- Knodlseder 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: 7207-7212.
- Knuf M, von Both U, von Both U, Grundhewer H, Heininger U, Huppertz HI, Iseke A, Knuf M, Korenke GC, Müller A, Kommission für Infektionskrankheiten und Impffragen im Bündnis Kinder- und Jugendgesundheit e. V. Klinisch gesteuerte rationale Borreliose-Diagnostik. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2023; 171: 630-637.
- Kraiczy P, Hellwage J, Skerka C, Becker H, Kirschfink M, Simon MM, Brade V, Zipfel PF, Wallich R. Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of BbCRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp proteins. *J Biol Chem* 2004; 279: 2421-9.

- Król N, Obiegala A, Imholt C, Arz C, Schmidt E, Jeske K, Ulrich RG, Rentería-Solís Z, Jacob J, Pfeffer M. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks and small mammals from different habitats. *Parasit Vectors* 2022; 15: 195.
- 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. *Clin Vaccine Immunol* 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. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 1103-19.
- Kudryashev M, Cyrklaff M, Baumeister W, Simon MM, Wallich R, Frischknecht F. Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes. *Mol Microbiol* 2009; 71: 1415-34.
- Kugeler KJ, Schwartz AM, Delorey MJ, Mead PS, Hinckley AF. Estimating the Frequency of Lyme Disease Diagnoses, United States, 2010-2018. *Emerg Infect Dis* 2021; 27: 616-619.
- Kurokawa C, Lynn GE, Pedra JHF, Pal U, Narasimhan S, Fikrig E. Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks. *Nat Rev Microbiol* 2020; 18: 587-600.
- Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schäfer SM, Sewell HS, Brade V, Kraiczy P. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato—the key role of host complement. *Trends Microbiol* 2002; 10: 74-9.
- Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 921-5.
- Lebech AM. Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. *APMIS Suppl* 2002: 1-40.
- Leeftang MMG, Ang CW, Berkhout J, Bijlmer HA, Van Bortel W, Brandenburg AH, Van Burgel ND, Van Dam AP, Dessau RB, Fingerle V, Hovius JWR, Jaulhac B, Meijer B, Van Pelt W, Schellekens JFP, Spijker R, Stelma FF, Stanek G, Verduyn-Lunel F, Zeller H, Sprong H. The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Bmc Infectious Diseases* 2016; 16
- Lehmann B, Straubinger RK, Gehlen H. Lyme Disease in the Horse: A current literature study considering methods of diagnosis and treatment, as well as preventive measures. *Pferdeheilkunde* 2017; 33: 363-370.

- Leschnik MW, Kirtz G, Khanakah G, Duscher G, Leidinger E, Thalhammer JG, Joachim A, Stanek G. Humoral immune response in dogs naturally infected with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and in dogs after immunization with a *Borrelia* vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 828-35.
- Li L, Ly M, Linhardt RJ. Proteoglycan sequence. *Mol Biosyst* 2012; 8: 1613-25.
- Li X, Neelakanta G, Liu X, Beck DS, Kantor FS, Fish D, Anderson JF, Fikrig E. Role of outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle. *Infect Immun* 2007; 75: 4237-44.
- Liang FT, Caimano MJ, Radolf JD, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* outer surface protein (osp) B expression independent of ospA. *Microbial Pathogenesis* 2004a; 37: 35-40.
- 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* 2000a; 38: 4160-6.
- Liang FT, Nelson FK, Fikrig E. Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *The Journal of experimental medicine* 2002; 196: 275-280.
- Liang FT, Nowling JM, Philipp MT. Cryptic and exposed invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi* s.l. *J Bacteriol* 2000b; 182: 3597-601.
- 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. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3990-6.
- 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. *Infect Immun* 2004b; 72: 5759-67.
- Liebisch G, Assmann G, Liebisch A. Infection with *Borrelia burgdorferi* s.l. causes disease (Lyme borreliosis) in horses in Germany. *Praktische Tierarzt* 1999; 80: 498-+.
- Liguori G, Costagliola A, Lombardi R, Paciello O, Giordano A. Human-Animal Interaction in Animal-Assisted Interventions (AAI)s: Zoonosis Risks, Benefits, and Future Directions—A One Health Approach. *Animals : an Open Access Journal from MDPI* 2023; 13
- Lin YP, Diuk-Wasser MA, Stevenson B, Kraiczy P. Complement Evasion Contributes to Lyme *Borreliae*-Host Associations. *Trends Parasitol* 2020; 36: 634-645.
- Lissman BA, Bosler EM, Camay H, Ormiston BG, Benach JL. Spirochete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 185: 219-20.

- Littman M, Straubinger R, Sykes J (2023) *Borreliosis*, 5 edn. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri
- Lohr B, Fingerle V, Norris DE, Hunfeld KP. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Current state of the art and future perspectives. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2018; 55: 219-245.
- Luft BJ, Dunn JJ, Dattwyler RJ, Gorgone G, Gorevic PD, Schubach WH. Cross-reactive antigenic domains of the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*. *Res Microbiol* 1993; 144: 251-7.
- Magnarelli L, Fikrig E. Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in naturally infected horses in the USA by enzyme-linked immunosorbent assay using whole-cell and recombinant antigens. *Research in Veterinary Science* 2005; 79: 99-103.
- Magnarelli LA, Anderson JF. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. *Am J Epidemiol* 1988; 127: 818-25.
- Magnarelli LA, Anderson JF. Class-specific and polyvalent enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in equids. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 1365-8.
- Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J Infect Dis* 1987; 156: 183-8.
- Magnarelli LA, Anderson JF, Levine HR, Levy SA. Tick parasitism and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 197: 63-6.
- Magnarelli LA, Anderson JF, Shaw E, Post JE, Palka FC. Borreliosis in equids in northeastern United States. *Am J Vet Res* 1988; 49: 359-62.
- Magnarelli LA, Fikrig E, Padula SJ, Anderson JF, Flavell RA. Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 237-40.
- Magnarelli LA, Flavell RA, Padula SJ, Anderson JF, Fikrig E. Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 169-73.
- 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* 2000a; 217: 1045-1050.
- Magnarelli LA, Ijdo JW, Padula SJ, Flavell RA, Fikrig E. Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. *Journal of Clinical Microbiology* 2000b; 38: 1735-1739.

- Magnarelli LA, Lawrenz M, Norris SJ, Fikrig E. Comparative reactivity of human sera to recombinant VlsE and other *Borrelia burgdorferi* antigens in class-specific enzyme-linked immunosorbent assays for Lyme borreliosis. *J Med Microbiol* 2002; 51: 649-655.
- Magnarelli LA, Meegan JM, Anderson JF, Chappell WA. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 181-4.
- Manion TB, Bushmich SL, Khan MI, Dinger J, Werner H, Mittel L, Laurendeau M, Reilly M. Suspected clinical Lyme disease in horses: Serological and antigen testing differences between clinically ill and clinically normal horses from an endemic region. *Journal of Equine Veterinary Science* 2001; 21: 229-234.
- Manion TB, Khan MI, Dinger J, Bushmich SL. Viable *Borrelia burgdorferi* in the urine of two clinically normal horses. *J Vet Diagn Invest* 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 Microbiol Rev* 2012; 36: 837-61.
- 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: 349-54.
- 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. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2427-34.
- Marcus LC, Patterson MM, Gilfillan RE, Urband PH. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses: serologic survey. *Am J Vet Res* 1985; 46: 2570-1.
- Margos G, Castillo-Ramirez S, Cutler S, Dessau RB, Eikeland R, Estrada-Peña A, Gofton A, Graña-Miraglia L, Hunfeld KP, Krause A, Lienhard R, Lindgren PE, Oskam C, Rudolf I, Schwartz I, Sing A, Stevenson B, Wormser GP, Fingerle V. Rejection of the name *Borrelia* and all proposed species comb. nov. placed therein. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020a; 70: 3577-3581.
- Margos G, Chu CY, Takano A, Jiang BG, Liu W, Kurtenbach K, Masuzawa T, Fingerle V, Cao WC, Kawabata H. *Borrelia yangtzensis* sp. nov., a rodent-associated species in Asia, is related to *Borrelia valaisiana*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65: 3836-3840.

- Margos G, Fedorova N, Becker NS, Kleinjan JE, Marosevic D, Krebs S, Hui L, Fingerle V, Lane RS. *Borrelia maritima* sp. nov., a novel species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, occupying a basal position to North American species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020b; 70: 849-856.
- Margos G, Fedorova N, Kleinjan JE, Hartberger C, Schwan TG, Sing A, Fingerle V. *Borrelia lanei* sp. nov. extends the diversity of *Borrelia* species in California. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017a; 67: 3872-3876.
- Margos G, Fingerle V, Cutler S, Gofton A, Stevenson B, Estrada-Peña A. Controversies in bacterial taxonomy: The example of the genus *Borrelia*. *Ticks Tick Borne Dis* 2020c; 11: 101335.
- Margos G, Fingerle V, Oskam C, Stevenson B, Gofton A. Comment on: Gupta, 2019, distinction between *Borrelia* and *Borreliella* is more robustly supported by molecular and phenotypic characteristics than all other neighbouring prokaryotic genera: Response to Margos' et al. "The genus *Borrelia* reloaded" (*PLoS One* 13(12): e0208432). *PLoS One* 14(8):e0221397. *Ticks Tick Borne Dis* 2020d; 11: 101320.
- Margos G, Gofton A, Wibberg D, Dangel A, Marosevic D, Loh SM, Oskam C, Fingerle V. The genus *Borrelia* reloaded. *PLoS One* 2018; 13: e0208432.
- Margos G, Henningsson AJ, Markowicz M, Fingerle V. *Borrelia* Ecology and Evolution: Ticks and Hosts and the Environment. *Microorganisms* 2022; 10
- Margos G, Hepner S, Fingerle V. Bakterien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Spezieskomplexes. In: Lyme-Borreliose. Hunfeld K-P, Gray J, eds. Cham: Springer International Publishing 2024: 1-31.
- 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 Tick Borne Dis* 2010; 1: 151-8.
- Margos G, Lane RS, Fedorova N, Koloczec J, Piesman J, Hojgaard A, Sing A, Fingerle V. *Borrelia bissettiae* sp. nov. and *Borrelia californiensis* sp. nov. prevail in diverse enzootic transmission cycles. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66: 1447-1452.
- Margos G, Marosevic D, Cutler S, Derdakova M, Diuk-Wasser M, Emler S, Fish D, Gray J, Hunfeldt KP, Jaulhac B, Kahl O, Kovalev S, Kraiczy P, Lane RS, Lienhard R, Lindgren PE, Ogden N, Ornstein K, Rupprecht T, Schwartz I, Sing A, Straubinger RK, Strle F, Voordouw M, Rizzoli A, Stevenson B, Fingerle V. There is inadequate evidence to support the division of the genus *Borrelia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017b; 67: 1081-1084.

- Margos G, Piesman J, Lane RS, Ogden NH, Sing A, Straubinger RK, Fingerle V. *Borrelia kurtenbachii* sp. nov., a widely distributed member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato species complex in North America. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64: 128-130.
- Margos G, Sing A, Fingerle V. Published data do not support the notion that *Borrelia valaisiana* is human pathogenic. *Infection* 2017c; 45: 567-569.
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 5410-6.
- Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol* 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63: 4284-4288.
- Markowicz M, Ladstätter S, Schotta AM, Reiter M, Pomberger G, Stanek G. Oligoarthritis caused by *Borrelia bavariensis*, Austria, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 1052-4.
- Markowicz M, Reiter M, Gamper J, Stanek G, Stockinger H. Persistent Anti-Borrelia IgM Antibodies without Lyme Borreliosis in the Clinical and Immunological Context. *Microbiol Spectr* 2021; 9: e0102021.
- Marques AR. Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. *Infect Dis Clin North Am* 2015; 29: 295-307.
- Marques AR, Martin DS, Philipp MT. Evaluation of the C6 peptide enzyme-linked immunosorbent assay for individuals vaccinated with the recombinant OspA vaccine. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2591-3.
- Marques AR, Strle F, Wormser GP. Comparison of Lyme Disease in the United States and Europe. *Emerg Infect Dis* 2021; 27: 2017-2024.
- Masuzawa T, Takada N, Kudaken 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1817-1824.
- Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, Richter D, Spielman A. Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. *J Infect Dis* 1992; 165: 479-83.
- May K (2009) Enzym-Immunoassay und Western Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato bei gesunden Pferden

- McDowell JV, Sung SY, Hu LT, Marconi RT. Evidence that the variable regions of the central domain of VlsE are antigenic during infection with Lyme disease spirochetes. *Infect Immun* 2002; 70: 4196-203.
- Mead P. Epidemiology of Lyme Disease. *Infect Dis Clin North Am* 2022; 36: 495-521.
- Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Pena A, George JC, Golovljova I, Jaenson TG, Jensen JK, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo JA, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph SE, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors* 2013; 6: 1.
- Meriläinen L, Herranen A, Schwarzbach A, Gilbert L. Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology* 2015; 161: 516-527.
- Milne A. The ecology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L.: Microhabitat economy of the adult tick. *Parasitology* 1950; 40: 14-34.
- 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: 1773-1779.
- Moody KD, Terwilliger GA, Hansen GM, Barthold SW. Experimental *Borrelia burgdorferi* infection in *Peromyscus leucopus*. *Journal of Wildlife Diseases* 1994; 30: 155-61.
- Motaleb MA, Corum L, Bono JL, Elias AF, Rosa P, Samuels DS, Charon NW. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10899-904.
- Müllegger RR, Glatz M. Skin manifestations of Lyme borreliosis: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2008; 9: 355-68.
- Muller 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. *Int J Med Microbiol* 2002; 291 Suppl 33: 80-7.
- Münchhoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G. Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 1987; 263: 412-9.
- Narasimhan S, Schuijt TJ, Abraham NM, Rajeevan N, Coumou J, Graham M, Robson A, Wu MJ, Daffre S, Hovius JW, Fikrig E. Modulation of the tick gut milieu by a secreted tick protein favors *Borrelia burgdorferi* colonization. *Nat Commun* 2017; 8: 184.

- Neely M, Arroyo L, Jardine C, Clow K, Moore A, Hazlett M, Weese JS. Evaluation of 2 ELISAs to determine *Borrelia burgdorferi* seropositivity in horses over a 12-month period. *J Vet Diagn Invest* 2021; 33: 736-739.
- Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 679-91.
- Neumeister B., Geiss H. K., Braun R., P. K (2009) *Mikrobiologische Diagnostik , Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*. Thieme. 1216
- Nielsen SL, Young KK, Barbour AG. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1990; 4: 73-9.
- Norris SJ. vls Antigenic Variation Systems of Lyme Disease *Borrelia*: Eluding Host Immunity through both Random, Segmental Gene Conversion and Framework Heterogeneity. *Microbiol Spectr* 2014; 2
- Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, Barbour AG. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun* 1992; 60: 4662-72.
- Norte AC, Margos G, Becker NS, Albino Ramos J, Nuncio MS, Fingerle V, Araújo PM, Adamík P, Alivizatos H, Barba E, Barrientos R, Cauchard L, Csörgő T, Diakou A, Dingemans NJ, Doligez B, Dubiec A, Eeva T, Flaisz B, Grim T, Hau M, Heylen D, Hornok S, Kazantzidis S, Kováts D, Krause F, Literak I, Mänd R, Montesana L, Morinay J, Mutanen M, Neto JM, Nováková M, Sanz JJ, Pascoal da Silva L, Sprong H, Tirri IS, Török J, Trilar T, Tyller Z, Visser ME, Lopes de Carvalho I. Host dispersal shapes the population structure of a tick-borne bacterial pathogen. *Mol Ecol* 2020; 29: 485-501.
- Ojaimi C, Brooks C, Casjens S, Rosa P, Elias A, Barbour A, Jasinskas A, Benach J, Katona L, Radolf J, Caimano M, Skare J, Swingle K, Akins D, Schwartz I. Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect Immun* 2003; 71: 1689-705.
- Önder Ö, Humphrey PT, McOmber B, Korobova F, Francella N, Greenbaum DC, Brisson D. OspC is potent plasminogen receptor on surface of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* 2012; 287: 16860-8.
- 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.

- 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. *The Journal of clinical investigation* 2000; 106: 561-569.
- Pal U, Fikrig E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. *Microbes Infect* 2003; 5: 659-66.
- 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, Montgomery RR, Lusitani D, Voet P, Weynants V, Malawista SE, Lobet Y, Fikrig E. Inhibition of *Borrelia burgdorferi*-tick interactions in vivo by outer surface protein A antibody. *J Immunol* 2001; 166: 7398-403.
- Pal U, Yang X, Chen M, Bockenstedt LK, Anderson JF, Flavell RA, Norgard MV, Fikrig E. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J Clin Invest* 2004b; 113: 220-30.
- Palm K (2016) Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* in equinen Serumproben aus dem Bayerischen Haupt- und Landgestüt Schwaiganger unter Berücksichtigung aktueller Kriterien der Diagnostik. LMU München
- 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. *Parasitol Res* 2015; 114 Suppl 1: S19-54.
- Park SA, Choe YH, Park E, Hyun YM. Real-time dynamics of neutrophil clustering in response to phototoxicity-induced cell death and tissue damage in mouse ear dermis. *Cell Adh Migr* 2018; 12: 424-431.
- Parker JL, White KK. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Vet* 1992; 82: 253-74.
- Parveen N, Leong JM. Identification of a candidate glycosaminoglycan-binding adhesin of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 2000; 35: 1220-34.
- Passamonti F, Veronesi F, Cappelli K, Capomaccio S, Reginato A, Miglio A, Vardi DM, Stefanetti V, Coletti M, Bazzica C, Pepe M. Polysynovitis in a horse due to *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection - Case study. *Ann Agric Environ Med* 2015; 22: 247-50.

- Paul-Ehrlich-Institut. Immunologische Arzneimittel für Hunde. 2025: https://www.pei.de/DE/arzneimittel/tierarzneimittel/hunde/hunde-node.html?cms_gts=173820_list%253Dheader_text_sort%252Basc&cms_tabcounter=0#anchor.
- Pearson EK, Guarino C, Cercone M, Divers T, Lambert J, García-López J, Johnson AL, Engiles JB, Marconi R, Smith J, Brown K, Pinn-Woodcock T. Association of *Borrelia burgdorferi* with nuchal bursitis and elevated outer surface protein A-specific serum antibodies in horses of the northeastern United States. *J Am Vet Med Assoc* 2024; 262: 1476-1484.
- 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: 241-245.
- Perret JL, Guigoz E, Rais O, Gern L. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol Res* 2000; 86: 554-7.
- Perret JL, Rais O, Gern L. Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. *J Med Entomol* 2004; 41: 361-5.
- 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. *J Infect Dis* 2001; 184: 870-8.
- Piesman J, Gern L. Lyme borreliosis in Europe and North America. *Ticks: Biology, Disease and Control* 2008: 220-252.
- Poljak A, Comstedt P, Hanner M, Schüler W, Meinke A, Wizel B, Lundberg U. Identification and characterization of *Borrelia* antigens as potential vaccine candidates against Lyme borreliosis. *Vaccine* 2012; 30: 4398-406.
- 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. *Int J Med Microbiol* 2007; 297: 263-71.
- Postic D, Ras NM, Lane RS, Henderson M, Baranton G. Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3497-504.
- Priest HL, Irby NL, Schlafer DH, Divers TJ, Wagner B, Glaser AL, Chang YF, Smith MC. Diagnosis of *Borrelia*-associated uveitis in two horses. *Vet Ophthalmol* 2012; 15: 398-405.

- Pritt BS, Respicio-Kingry LB, Sloan LM, Schriefer ME, Replogle AJ, Bjork J, Liu G, Kingry LC, Mead PS, Neitzel DF, Schiffman E, Hoang Johnson DK, Davis JP, Paskewitz SM, Boxrud D, Deedon A, Lee X, Miller TK, Feist MA, Steward CR, Theel ES, Patel R, Irish CL, Petersen JM. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66: 4878-4880.
- Probst J, Springer A, Fingerle V, Strube C. Frequency of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia* spp., and coinfections in *Ixodes ricinus* ticks collected from dogs and cats in Germany. *Parasit Vectors* 2024; 17: 87.
- Pustijanac E, Buršić M, Millotti G, Paliaga P, Iveša N, Cvek M. Tick-Borne Bacterial Diseases in Europe: Threats to public health. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2024;
- Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 87-99.
- Radolf JD, Strle K, Lemieux JE, Strle F. Lyme Disease in Humans. *Curr Issues Mol Biol* 2021; 42: 333-384.
- Ragagli C, Bertolotti L, Giacobini M, Mannelli A, Bisanzio D, Amore G, Tomassone L. Transmission dynamics of *Borrelia lusitaniae* and *Borrelia afzelii* among *Ixodes ricinus*, lizards, and mice in Tuscany, central Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 21-8.
- Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, Anguita J, Norgard MV, Kantor FS, Anderson JF, Koski RA, Fikrig E. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 2005; 436: 573-7.
- Randolph SE. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology* 2004; 129 Suppl: S37-65.
- Revel AT, Talaat AM, Norgard MV. DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1562-7.
- Richter D, Matuschka FR, Spielman A, Mahadevan L. How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proc Biol Sci* 2013; 280: 20131758.
- 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 873-881.

- Richter D, Schlee DB, Allgöwer R, Matuschka FR. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 6414-9.
- Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubalek Z, Foldvari G, Plantard O, Vayssier-Taussat M, Bonnet S, Spitalaska E, Kazimirova M. Ixodes ricinus and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front Public Health* 2014; 2: 251.
- 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. *Infect Immun* 1998; 66: 5275-85.
- Roessler D, Hauser U, Wilske B. Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2752-8.
- 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.
- Roome A, Gouli S, Yodsuwan R, Victory J, Collins C, Jenkins P, Scribani M, Krupa N, Freilich D, Gadomski A. Tick magnets: The occupational risk of tick-borne disease exposure in forestry workers in New York. *Health Science Reports* 2022a; 5
- Roome A, Wander K, Garruto RM. Cat Ownership and Rural Residence Are Associated with Lyme Disease Prevalence in the Northeastern United States. *Int J Environ Res Public Health* 2022b; 19
- 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.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a novel species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex isolated from rodents and a tick from the south-eastern USA. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011a; 61: 381-383.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2011b; 2: 123-128.
- 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. *J Clin Microbiol* 2009a; 47: 134-41.

- Rudenko N, Golovchenko M, Kybicova K, Vancova M. Metamorphoses of Lyme disease spirochetes: phenomenon of *Borrelia* persists. *Parasites & Vectors* 2019; 12: 237.
- 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. *J Clin Microbiol* 2009b; 47: 3875-80.
- Rudenko N, Golovchenko M, Mokráček A, Piskunová N, Ruzek D, Mallatová N, Grubhoffer L. Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3540-3.
- Russell H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, Plikaytis B. Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J Infect Dis* 1984; 149: 465-70.
- Salo J, Loimaranta V, Lahdenne P, Viljanen MK, Hytonen J. Decorin binding by DbpA and B of *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu Stricto. *J Infect Dis* 2011; 204: 65-73.
- Schaible UE, Kramer MD, Eichmann K, Modolell M, Museteanu C, Simon MM. Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* prevent Lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (scid) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 3768-72.
- Schaible UE, Kramer MD, Wallich R, Tran T, Simon MM. Experimental *Borrelia burgdorferi* infection in inbred mouse strains: antibody response and association of H-2 genes with resistance and susceptibility to development of arthritis. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2397-405.
- Scherrer NM, Knickelbein KE, Engiles JB, Johnstone LK, Tewari D, Johnson AL. Ocular disease in horses with confirmed ocular or central nervous system *Borrelia* infection: Case series and review of literature. *Vet Ophthalmol* 2020; 23: 1014-1024.
- Schönert S, Gall Y, Grabner A. Lyme-Borreliose beim Pferd – vergleichende Diagnostik und Fallbeispiel eines Ponys mit Meningitis. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere* 2008; 36: S49-S53.
- Schönert S, Grabner A, Heidrich J, Schönberg A, Nöckler K, Bahn P, Luge E, Brem S, Müller W. Lyme disease in the horse?: Comparative studies of direct and indirect testing for *Borrelia burgdorferi*. *Praktische Tierarzt* 2002; 83: 1064-1068.

- Schulte-Spechtel U, Lehnert G, Liegl G, Fingerle V, Heimerl C, Johnson B, Wilske B. Significant improvement of the recombinant *Borrelia* IgG immunoblot for serodiagnosis of early neuroborreliosis. *International Journal of Medical Microbiology Supplements* 2004; 293: 158-160.
- Schwartz G, Epp T, Burgess HJ, Chilton NB, Lohmann KL. Comparison between available serologic tests for detecting antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in horses in Canada. *J Vet Diagn Invest* 2015; 27: 540-6.
- Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 382-8.
- Schwan TG, Piesman J. Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 115-21.
- Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2909-13.
- Sears KP, Divers TJ, Neff RT, Miller WH, Jr., McDonough SP. A case of *Borrelia*-associated cutaneous pseudolymphoma in a horse. *Vet Dermatol* 2012; 23: 153-6.
- Selbitz H-JT, Uwe; Valentin-Weigand, Peter (2011) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9., vollständig überarbeitete Auflage edn. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- Semenza JC, Rocklöv J, Ebi KL. Climate Change and Cascading Risks from Infectious Disease. *Infect Dis Ther* 2022; 11: 1371-1390.
- Septfonds A, Rigaud E, Bénézet L, Velay A, Zilliox L, Baldinger L, Gonzalez G, Fignon J, de Valk H, Deffontaines G, Desenclos JC, Jaulhac B. Seroprevalence for *Borrelia burgdorferi* sensu lato and tick-borne encephalitis virus antibodies and associated risk factors among forestry workers in northern France, 2019 to 2020. *Euro Surveill* 2023; 28
- Shin SJ, Chang YF, Jacobson RH, Shaw E, Lauderdale TL, 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. *Vet Microbiol* 1993; 36: 161-74.
- Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, Hilton E, Kunkel M, Adler-Klein D, Doherty T, Evans J, Molloy PJ, Seidner AL, Sabetta JR, Simon HJ, Klempner MS, Mays J, Marks D, Malawista SE. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. *N Engl J Med* 1998; 339: 216-22.

- Simpson WJ, Schrupf ME, Schwan TG. Reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol 1990; 28: 1329-37.
- Skar G, Blum M, Simonsen K. Lyme Disease. Treasure Island (FL): StatPearls: StatPearls [Internet] 2025; January 2025: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431066/#>.
- Skufca J, Tran TMP, Brestrich G, Pilz A, Vyse A, Malerczyk C, Dzingina M, Begier E, Blum M, Riera-Montes M, Gessner BD, Stark JH. Incidence of Lyme Borreliosis in Germany: Exploring Observed Trends Over Time Using Public Surveillance Data, 2016-2020. Vector Borne Zoonotic Dis 2023; 23: 237-246.
- Smith J, Oertle J, Prato D. *Borrelia burgdorferi* : Cell Biology and Clinical Manifestations in Latent Chronic Lyme. Open Journal of Medical Microbiology 2014; 04: 210-223.
- Sommerauer S, Blohm K-O, Spergser J, Buchner HHF. Arthritis, panuveitis and hyperaesthesia associated with *Borrelia afzelii* infection in a warmblood gelding. Veterinary Record Case Reports 2019; 7
- Sonenshine DE. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. Parasitology 2004; 129 Suppl: S405-25.
- Sonenshine DE, Macaluso KR. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2017; 7
- Sonenshine E, Roe R (2014) Biology of Ticks, 2 edn. Oxford University Press
- Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex--clinical significance of genomic species? Clin Microbiol Infect 2011; 17: 487-93.
- Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis--from tick bite to diagnosis and treatment. FEMS Microbiol Rev 2018; 42: 233-258.
- Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. The Lancet 2012; 379: 461-73.
- Stark JH, Pilz A, Jodar L, Moisi JC. The Epidemiology of Lyme Borreliosis in Europe: An Updated Review on a Growing Public Health Issue. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2023; 23: 139-141.
- 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. J Clin Invest 2004; 113: 1093-101.
- Steere AC, Drouin EE, Glickstein LJ. Relationship between immunity to *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (OspA) and Lyme arthritis. Clin Infect Dis 2011; 52 Suppl 3: s259-65.

- Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, Malawista SE. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 1983; 308: 733-40.
- Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase W, Andiman WA. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med* 1977a; 86: 685-98.
- Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum* 1977b; 20: 7-17.
- Steere AC, McHugh GA, Damle NS, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for lyme disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008; 47 2: 188-95.
- Steere AC, Sikand VK, Meurice F, Parenti DL, Fikrig E, Schoen RT, Nowakowski J, Schmid CH, Laukamp S, Buscarino C, Krause DS. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 209-15.
- Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JW, Li X, Mead PS. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16090.
- Stefanciková A, Adaszek Ł, Pet'ko B, Winiarczyk S, Dudinák V. Serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis. *Ann Agric Environ Med* 2008; 15: 37-43.
- Steinbrink A, Brugger K, Margos G, Kraiczy P, Klimpel S. The evolving story of *Borrelia burgdorferi* sensu lato transmission in Europe. *Parasitol Res* 2022; 121: 781-803.
- Stelma FF, Berende A, Ter Hofstede H, Vrijmoeth HD, Vos F, Kullberg BJ. Classical *Borrelia* Serology Does Not Aid in the Diagnosis of Persistent Symptoms Attributed to Lyme Borreliosis: A Retrospective Cohort Study. *Life (Basel)* 2023; 13
- Stevenson B, Fingerle V, Wormser GP, Margos G. Public health and patient safety concerns merit retention of Lyme borreliosis-associated spirochetes within the genus *Borrelia*, and rejection of the genus novum *Borrelia*. *Ticks Tick Borne Dis* 2019; 10: 1-4.
- Stevenson B, Schwan TG, Rosa PA. Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* 1995; 63: 4535-4539.
- 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.

- StIKoVet, Feige K, Lohmann K, Köhler M, Mueller S, Straubinger R, Truyen U, Venner M, Volz A (2023) Leitlinie zur Impfung von Pferden - Ständige Impfkommision Veterinärmedizin (StIKo Vet) am FLI - Stand 01.03.2023. In: Leitlinie zur Impfung von Pferden - Ständige Impfkommision Veterinärmedizin (StIKo Vet) am FLI - Stand 01.03.2023, 5. Auflage edn. Ed (FLI) F-L-I. Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Greifswald - Insel Riems. 51-54
- Straubinger R. „Nicht jede unerklärbare Lahmheit ist eine Borreliose“. *Pferdespiegel* 2017; 20: 15-17.
- Straubinger RK. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2191-9.
- Straubinger RK, Straubinger AF, 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* 1997a; 65: 1273-1285.
- 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, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH, Erb HN. Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110: 874-81.
- Straubinger RK, Summers BA, Chang Y-F, Appel MJ. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *Journal of Clinical Microbiology* 1997b; 35: 111-116.
- Strle F, Nadelman RB, Cimperman J, Nowakowski J, Picken RN, Schwartz I, Maraspin V, Aguero-Rosenfeld ME, Varde S, Lotric-Furlan S, Wormser GP. Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. *Ann Intern Med* 1999; 130: 32-6.
- Strnad M, Honig V, Ruzek D, Grubhoffer L, Rego ROM. Europe-Wide Meta-Analysis of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Prevalence in Questing *Ixodes ricinus* Ticks. *Appl Environ Microbiol* 2017; 83
- Strnad M, Rego ROM. The need to unravel the twisted nature of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex across Europe. *Microbiology (Reading)* 2020; 166: 428-435.
- Strnad M, Rudenko N, Rego ROM. Pathogenicity and virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Virulence* 2023; 14: 2265015.

- Strother KO, Hodzic E, Barthold SW, de Silva AM. Infection of mice with lyme disease spirochetes constitutively producing outer surface proteins a and B. *Infect Immun* 2007; 75: 2786-94.
- Stubs G, Fingerle V, Wilske B, Gobel UB, Zahringer U, Schumann RR, Schroder NWJ. Acylated cholesteryl galactosides are specific antigens of borrelia causing lyme disease and frequently induce antibodies in late stages of disease. *J Biol Chem* 2009; 284: 13326-13334.
- Swinebroad EL. Borreliosis in Sport Horse Practice. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2018; 34: 313-343.
- Takano A, Goka K, Une Y, Shimada Y, Fujita H, Shiino T, Watanabe H, Kawabata H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. *Environmental Microbiology* 2010; 12: 134-146.
- Takayama K, Rothenberg RJ, Barbour AG. Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1987; 55: 2311-3.
- Telford SR, 3rd, Mather TN, Moore SI, Wilson ML, Spielman A. Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 39: 105-9.
- Tilly K, Bestor A, Rosa PA. Functional Equivalence of OspA and OspB, but Not OspC, in Tick Colonization by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 2016; 84: 1565-1573.
- Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22: 217-34, v.
- Tokarz R, Anderton JM, Katona LI, Benach JL. Combined effects of blood and temperature shift on *Borrelia burgdorferi* gene expression as determined by whole genome DNA array. *Infect Immun* 2004; 72: 5419-32.
- Töpfer 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.
- Tracy KE, Baumgarth N. *Borrelia burgdorferi* Manipulates Innate and Adaptive Immunity to Establish Persistence in Rodent Reservoir Hosts. *Front Immunol* 2017; 8: 116.
- Trevejo RT, Krause PJ, Sikand VK, Schriefer ME, Ryan R, Lepore T, Porter W, Dennis DT. Evaluation of two-test serodiagnostic method for early Lyme disease in clinical practice. *J Infect Dis* 1999; 179: 931-8.
- Trevisan G, Cinco M, Trevisini S, di Meo N, Chersi K, Ruscio M, Forgiione P, Bonin S. Borreliae Part 1: *Borrelia* Lyme Group and *Echidna*-Reptile Group. *Biology (Basel)* 2021; 10: 1036.

- Tsao J, Barbour AG, Luke CJ, Fikrig E, Fish D. OspA immunization decreases transmission of *Borrelia burgdorferi* spirochetes from infected *Peromyscus leucopus* mice to larval *Ixodes scapularis* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2001; 1: 65-74.
- van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Dankert J. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 708-17.
- Van Heerden J, Reyers F. *Borrelia* sp. infection in a horse. *J S Afr Vet Assoc* 1984; 55: 41-3.
- Vancová M, Bílý T, Šimo L, Touš J, Horodyský P, Růžek D, Novobilský A, Salát J, Strnad M, Sonenshine DE, Grubhoffer L, Nebesářová J. Three-dimensional reconstruction of the feeding apparatus of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae): a new insight into the mechanism of blood-feeding. *Sci Rep* 2020; 10: 165.
- Venner M, Deegen E. Interpretation of antibody titers against *Borrelia Burgdorferi* in the horse considering the knowledge about it in the human being - Overview. *Pferdeheilkunde* 1996; 12: 865-873.
- Verma A, Brissette CA, Bowman A, Stevenson B. *Borrelia burgdorferi* BmpA is a laminin-binding protein. *Infect Immun* 2009; 77: 4940-6.
- Vieira JP, Brito MJ, de Carvalho IL. *Borrelia lusitaniae* Infection Mimicking Headache, Neurologic Deficits, and Cerebrospinal Fluid Lymphocytosis. *J Child Neurol* 2019; 34: 748-750.
- Wagner B, Freer H. Development of a bead-based multiplex assay for simultaneous quantification of cytokines in horses. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 127: 242-8.
- 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. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 374-81.
- Wagner B, Freer H, Rollins A, Garcia-Tapia D, Erb HN, Earnhart C, Marconi R, Meeus P. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19: 527-35.
- Wagner B, Goodman LB, Rollins A, Freer HS. Antibodies to OspC, OspF and C6 antigens as indicators for infection with *Borrelia burgdorferi* in horses. *Equine Vet J* 2013; 45: 533-7.
- Waindok P, Schicht S, Fingerle V, Strube C. Lyme borreliosis prevalence and genospecies distribution in ticks removed from humans. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2017; 8: 709-714.
- 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). *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 926-32.

- Wilczek CK, Wenderlein J, Hiereth S, Straubinger RK. A Retrospective Study with a Commercial Vaccine against Lyme Borreliosis in Dogs Using Two Different Vaccination Schedules: Characterization of the Humoral Immune Response. *Vaccines (Basel)* 2022; 11
- Wilske B. [Serodiagnosis of Lyme borreliosis]. *Z Hautkr* 1988; 63: 511-4.
- Wilske B. Diagnosis of lyme borreliosis in europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003; 3: 215-27.
- 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. *Res Microbiol* 1992; 143: 583-96.
- Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac Mursic V, Rossler D, Will G. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* 1996; 24: 208-12.
- Wilske B, Fingerle V. [Diagnosis of Lyme borreliosis. How to corroborate suspected borreliosis]. *MMW Fortschr Med* 2000; 142: 28-31.
- 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* 1993; 182: 255-70.
- Wilske B, Fingerle V, Preac-Mursic V, Jauris-Heipke S, Hofmann A, Loy H, Pfister HW, Rössler D, Soutschek E. Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Med Microbiol Immunol* 1994; 183: 43-59.
- Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2007; 49: 13-21.
- Wilske B, Habermann C, Fingerle V, Hillenbrand B, Jauris-Heipke S, Lehnert G, Pradel I, Rossler D, Schulte-Spechtel U. An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med Microbiol Immunol* 1999; 188: 139-44.
- Wilske B, Zöller L, Brade V, Eiffert H, Göbel U, Stanek G, Pfister H (2000) MIQ 12 Lyme-Borreliose. Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Urban & Fischer Verlag, München Jena
- Wojciechowska-Koszko I, Kwiatkowski P, Sienkiewicz M, Kowalczyk M, Kowalczyk E, Dolegowska B. Cross-Reactive Results in Serological Tests for Borreliosis in Patients with Active Viral Infections. *Pathogens* 2022; 11
- Wolcott KA, Margos G, Fingerle V, Becker NS. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: A review. *Ticks Tick Borne Dis* 2021; 12: 101766.

- Woodman ME, Cooley AE,Stevenson B. Production of outer surface protein A by *Borrelia burgdorferi* during transmission from infected mammals to feeding ticks is insufficient to trigger OspA seroconversion. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 54: 277-82.
- Wormser GP. A brief history of OspA vaccines including their impact on diagnostic testing for Lyme disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2022; 102: 115572.
- Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klemmner MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS,Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1089-134.
- Wormser GP, Liveris D, Hanincová K, Brisson D, Ludin S, Stracuzzi VJ, Embers ME, Philipp MT, Levin A, Aguero-Rosenfeld M,Schwartz I. Effect of *Borrelia burgdorferi* genotype on the sensitivity of C6 and 2-tier testing in North American patients with culture-confirmed Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 910-4.
- Wormser GP,Schwartz I. Antibiotic treatment of animals infected with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 387-95.
- Woudenberg T, Böhm S, Böhmer M, Katz K, Willrich N, Stark K, Kuhnert R, Fingerle V,Wilking H. Dynamics of *Borrelia burgdorferi*-Specific Antibodies: Seroconversion and Seroreversion between Two Population-Based, Cross-Sectional Surveys among Adults in Germany. *Microorganisms* 2020; 8
- Wressnigg N, Barrett PN, Pöllabauer EM, O'Rourke M, Portsmouth D, Schwendinger MG, Crowe BA, Livey I, Dvorak T, Schmitt B, Zeitlinger M, Kollaritsch H, Esen M, Kreamsner PG, Jelinek T, Aschoff R, Weisser R, Naudts IF,Aichinger G. A Novel multivalent OspA vaccine against Lyme borreliosis is safe and immunogenic in an adult population previously infected with *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21: 1490-9.
- Wright SD,Nielsen SW. Experimental infection of the white-footed mouse with *Borrelia burgdorferi*. *Am J Vet Res* 1990; 51: 1980-7.
- Xu Q, Seemanapalli SV, Reif KE, Brown CR,Liang FT. Increasing the recruitment of neutrophils to the site of infection dramatically attenuates *Borrelia burgdorferi* infectivity. *J Immunol* 2007; 178: 5109-15.
- 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 X, Izadi H, Coleman AS, Wang P, Ma Y, Fikrig E, Anguita J, Pal U. *Borrelia burgdorferi* lipoprotein BmpA activates pro-inflammatory responses in human synovial cells through a protein moiety. *Microbes Infect* 2008; 10: 1300-8.
- 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.
- Ye M, Sharma K, Thakur M, Smith AA, Buyuktanir O, Xiang X, Yang X, Promnares K, Lou Y, Yang XF, Pal U. HtrA, a Temperature- and Stationary Phase-Activated Protease Involved in Maturation of a Key Microbial Virulence Determinant, Facilitates *Borrelia burgdorferi* Infection in Mammalian Hosts. *Infect Immun* 2016; 84: 2372-2381.
- Yuste RA, Muenkel M, Axarlis K, Gómez Benito MJ, Reuss A, Blacker G, Tal MC, Kraiczy P, Bastounis EE. *Borrelia burgdorferi* modulates the physical forces and immunity signaling in endothelial cells. *iScience* 2022; 25: 104793.
- Zahler M, Gothe R. Effect of temperature and humidity on egg hatch, moulting and longevity of larvae and nymphs of *Dermacentor reticulatus* (Ixodidae). *Appl Parasitol* 1995a; 36: 53-65.
- Zahler M, Gothe R. Effect of temperature and humidity on longevity of unfed adults and on oviposition of engorged females of *Dermacentor reticulatus* (Ixodidae). *Appl Parasitol* 1995b; 36: 200-11.
- Zambrano MC, Beklemisheva AA, Bryksin AV, Newman SA, Cabello FC. *Borrelia burgdorferi* binds to, invades, and colonizes native type I collagen lattices. *Infect Immun* 2004; 72: 3138-46.
- Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell* 1997a; 89: 275-85.
- Zhang JR, Norris SJ. Kinetics and in vivo induction of genetic variation of vlsE in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1998; 66: 3689-97.
- Zhang Y, Chen T, Raghunandan S, Xiang X, Yang J, Liu Q, Edmondson DG, Norris SJ, Yang XF, Lou Y. YebC regulates variable surface antigen VlsE expression and is required for host immune evasion in *Borrelia burgdorferi*. *PLoS Pathog* 2020; 16: e1008953.
- Zhang YQ, Mathiesen D, Kolbert CP, Anderson J, Schoen RT, Fikrig E, Persing DH. *Borrelia burgdorferi* enzyme-linked immunosorbent assay for discrimination of OspA vaccination from spirochete infection. *J Clin Microbiol* 1997b; 35: 233-8.
- Zhong W, Gern L, Kramer M, Wallich R, Simon MM. T helper cell priming of mice to *Borrelia burgdorferi* OspA leads to induction of protective antibodies following experimental but not tick-borne infection. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2942-7.

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

Zückert WR, Meyer J, Barbour AG. Comparative analysis and immunological characterization of the *Borrelia* Bdr protein family. *Infect Immun* 1999; 67: 3257-66.

VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Verbreitung von Bakterien des <i>Borrelia-burgdorferi-sensu-lato</i> -Komplexes (MARGOS et al., 2024).	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellanatomie und des Querschnittes von <i>Borrelia burgdorferi</i> (TREVISAN et al., 2021).....	11
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung von <i>Borrelia burgdorferi</i> in BSK-Kulturmedium (TREVISAN et al., 2021).....	11
Abbildung 4: Enzootischer Lebenszyklus, der dafür verantwortlich ist, dass <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> in der Zecken- und Reservoirwirtpopulation verbleibt.	19
Abbildung 5: Entwicklungsstadien von <i>Ixodes ricinus</i>	20
Abbildung 6: Molekulare Interaktionen während der Übertragung von im Mitteldarm der infizierten Zecke persistierenden Borrelien auf einen Wirt als auch der initialen Aufnahme von Spirochäten in den Zeckenvektor.	23
Abbildung 7: LIA-Teststreifen für die serologische LB-Diagnostik bei Pferden – nach Testdurchführung. Betrachtung der impfspezifischen OspA-Bande.	36
Abbildung 8: Funktionsweise des Equine Lyme Multiplex Assays für die serologische LB-Diagnostik bei Pferden (WAGNER et al., 2011; WAGNER et al., 2012; WAGNER et al., 2013).	37
Abbildung 9: Serologische eLB-Impfstudie mit Pferden: Verlauf der impfinduzierten, spezifischen AK-Spiegel gegen <i>Bbsl</i> -AG in drei Studiengruppen (A, B und C) während eines Studienzeitraumes von 13 Monaten.	41
Abbildung 10: Immunisierungsschema in einer Impfstudie mit EquiLyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Germany) (KNODLSEDER et al., 2019).....	77
Abbildung 11: Fließdiagramm zur labordiagnostischen Durchführung von LIA A*, LIA B** und LIA C***, die dem semi-quantitativen Nachweis von spezifischen IgG-AK gegen <i>Bbsl</i> -AG in Pferdeserum dienen (BROECKL et al., 2024).	79
Abbildung 12: Auswertebögen von LIA A, LIA B und LIA C mit manuell applizierten LIA-Teststreifen.	81

Abbildung 13: Vergleich von Testergebnissen, die mit drei verschiedenen LIAs erzielt wurden, die in der *Bbsl*-Diagnostik mit Pferdeserum verwendet werden. Die Auswertung der LIA-Ergebnisse erfolgte individuell nach Herstellervorgaben (BROECKL et al., 2024).....88

Abbildung 14: Detektion von spezifischen AK gegen VlsE-AG von *Bbsl* in Serum von geimpften Pferden der Studiengruppe Vac-Plus ($n = 44$) zum ZP (A.) d0, (B.) d135 und (C.) d210 im Studienzeitraum mittels LIA A, LIA B und LIA C. .96

Abbildung 15: Vergleich von Testendergebnissen, die mit drei verschiedenen LIAs erzielt wurden, die in der *Bbsl*-Diagnostik mit Pferdeserum verwendet werden...101

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 1:** Aktuell beschriebene Genospezies des *Borrelia-burgdorferi-sensu-lato*-Komplexes..... 6
- Tabelle 2:** Zusammenfassung von wichtigen Oberflächen-AG von *Bbsl*, die in der Diagnostik der equinen Lyme-Borreliose Anwendung finden. Die AG sind nach ihrem Molekulargewicht aufsteigend geordnet..... 15
- Tabelle 3:** Übersicht über gängigste serologische Diagnostikmethoden zum indirekten Nachweis einer Immunantwort auf *Bbsl*-AG im Pferd (DIVERS et al., 2018) .. 27

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AG	Antigen
AI	Auffrischungsimpfung
AK	Antikörper
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
<i>Ba</i>	<i>Borrelia afzelii</i>
<i>Bb</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>BbsI</i>	<i>Borrelia-burgdorferi-sensu-lato</i> -Komplex
<i>Bbss</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>
<i>Bg</i>	<i>Borrelia garinii</i>
<i>BmpA</i>	<i>Borrelia membrane protein A</i>
bp	<i>basepair</i>
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
C_6	<i>Complement component 6, 6th invariant region of VlsE</i>
<i>CspA</i>	<i>complement regulator acquiring surface protein A</i>
<i>DbpA</i>	<i>Decorin binding protein A</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ect.	<i>et cetera</i>
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eLB	equine Lyme-Borreliose
engl.	englisch
et al.	<i>et alii</i>
Euroimmun LIA	EUROIMMUN Anti-Borrelia-EUROLINE horse (IgG)

FlaB	bakterielles Flagellin B
GAG	Glykosaminoglykan
GI	Grundimmunisierung
gen. nov.	<i>genus novum</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HtrA	<i>high temperature requirement A</i>
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
IFAT	Immunfluoreszenzantikörpertest
IFN	Interferon
IFT	Immunofluoreszenztest
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IR	<i>invariant region</i>
IRR	Interrater-Reliabilität; <i>inter rater reliability</i>
<i>in vitro</i>	in Glas, außerhalb des Lebenden
<i>in vivo</i>	im Lebenden
KELA	Kinetischer Enzyme-linked immunosorbent assay
LB	Lyme-Borreliose; <i>Lyme borreliosis, Lyme disease</i>
LIA	Line Immunoassay
LPS	Lipopolysacharid
Megacor LIA	MEGACORMegaLINE® BORRELIA IgG ad.us.vet. LIA
min	Minuten
<i>n</i>	<i>natural number</i>
Osp	<i>Outer surface protein</i>
p	Protein
Po	Interrater-Übereinstimmung; <i>observed inter-rater reliability</i>

<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i> , nach der Infektion
Salp	ribosomale Ribonukleinsäure
sp.	<i>species pluralis</i>
ssp.	<i>subspecies pluralis</i>
sp. nov.	<i>nova species</i>
u. a.	unter anderem
VBD	<i>Vector-borne disease</i>
TROSPA	<i>tick receptor for OspA</i>
Virotech LIA	VIROTECH Borrelia Vert. + OspA IgG LINE Immunoblot
VlsE	<i>Variable major protein like sequence Expressed</i>
VR	<i>variable region</i>
vs.	<i>versus</i>
WB	Westernblot
WP	Waschpuffer
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter

X. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen aussprechen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Straubinger für die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Die zahlreichen lehrreichen und persönlichen Gespräche mit mannigfaltiger Ideengebung und konstruktivem Austausch waren für mich stets bereichernd.

Ich bedanke mich ebenso bei all meinen Kollegen am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie für die Zusammenarbeit und die schöne und lehrreiche Zeit. Insbesondere möchte ich mich bei Stephanie Hiereth für die äußerst gewissenhafte und exakte Einarbeitung im Labor, und ihre zuverlässige, fachliche sowie menschliche Betreuung während meiner Labortätigkeiten und der Anfertigung der Dissertation bedanken.

Bei Christoph Kleinemeier möchte ich mich bedanken für die sehr kompetente, geduldige und humorgeschmückte Unterstützung in jeglicher Hinsicht, vor allem bei EDV-basierten Hindernissen. Auch den früheren Doktoranden und Freunden Katharina T., Anna und Katharina K., sowie meinen Kollegen Sebastian S., Frank, Schorsch, André, Roberta, Dani, Astrid, Anke, Lejla, Sebastian U. und Jasmin möchte ich für den wissenschaftlichen Austausch und ihre Unterstützung einen Dank aussprechen.

Ein weiterer Dank gebührt meinem Partner Christian und meiner Familie für ihre Unterstützung während meiner Doktorarbeit und ihren immerwährenden Rückhalt und Ansporn.

Ein großer Dank gilt auch meinen langjährigen Freunden Ron und Katja für ihren stetigen Rückhalt, ihre wertvollen Ratschläge, Ermutigungen, die mentale Unterstützung und ihren sanften Appell an meine Disziplin, wenn es von Nöten war.