

Aus dem Institut für Immunologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Charakterisierung der humoralen Immunantwort im Hund nach
Impfung mit verschiedenen Impfstoffen gegen den Erreger der Lyme-
Borreliose, *Borrelia burgdorferi*, unter Berücksichtigung zweier
verschiedener Impfstrategien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Katharina Töpfer
aus Höxter

Leipzig, 2005

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: PD Dr. habil Reinhard Straubinger, PhD

Gutachter: PD Dr. habil Reinhard Straubinger, PhD, Institut für Immunologie
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und Mykologie
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Max Wittenbrink, Institut für Veterinärbakteriologie
Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

Tag der Verteidigung: 21.06.2005

Für meine Eltern, Klaus und Mechthild Töpfer, die mir in jeder Lebenslage mit Liebe und Unterstützung zur Seite stehen.

Ohne eure beständige Hilfe wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Borrelien	2
2.1.1 Mikrobiologische Zuordnung der Borrelien.....	2
2.1.2 Epidemiologie und Pathogenese der Borrelieninfektion	3
2.2 Wirt.....	5
2.2.1 Erkrankungsbilder nach einer Infektion mit <i>B. burgdorferi</i>	5
2.2.2 Reaktionen des Immunsystems des Wirtes auf eine Borrelieninfektion	7
2.3 Diagnostik.....	9
2.3.1 Serologische Methoden zum Nachweis einer Borrelieninfektion	9
2.3.2 Weitere Methoden für die Diagnostik einer Borrelieninfektion.....	12
2.4 Impfung	13
3 Tiere, Material und Methoden	17
3.1 Hunde	17
3.2 Impfstoffe und Impfschema	18
3.3 Injektions- und Blutentnahmetechniken.....	20
3.3.1 Impfung	20
3.3.2 Blutentnahme.....	20
3.4 Serumgewinnung und –weiterverarbeitung.....	21
3.5 Seren, monoklonale Antikörper und rekombinantes OspA.....	21
3.6 Verwendete Bakterienspezies und -stämmen für die <i>in-vitro</i> Untersuchungen	22
3.7 Herstellung der Antigenpräparationen für die Verwendung in ELISA und Western Blot.....	23
3.6.1 Herstellung des Kultivierungsmediums für <i>B. burgdorferi</i> s. s.....	23
3.7.2 Herstellung des Kultivierungsmediums für <i>B. afzelii</i> und <i>B. garinii</i>	24
3.7.3 Anzucht und Weiterverarbeitung der Borrelien	24
3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration der gewonnenen Bakteriensuspension.....	26
3.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des BCA Protein Assay Kits der Firma Pierce (Rockford, Illinois, USA).....	26
3.8.2 Bestimmung der einzelnen Proteinfractionen in Coomassie- oder silbergefärbten Polyacrylamidgelen	26
3.8.2.1 Anfärbung mit Coomassie Blau Färbelösung.....	26
3.8.2.2 Anfärbung mit dem Silver Stain Kit der Firma Invitrogen	27
3.9 Serologische Methoden	27
3.9.1 Verwendete Puffer, Lösungen und Reagenzien	27
3.9.1.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien für verschiedene Anwendungen....	27
3.9.1.2 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Herstellung des ELISA	28
3.9.1.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien für die Durchführung des ELISA..	28

3.9.2 ELISA.....	29
3.9.2.1 Herstellung der ELISA-Platten.....	29
3.9.2.1 Durchführung des ELISA.....	29
3.9.3 Western Blot.....	30
3.9.3.1 Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	30
3.9.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	34
3.9.3.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran.....	34
3.9.3.4 Western Blot Durchführung.....	34
3.9.4 Untersuchung von Seren mittels ELISA und Western Blot der Firma Mikrogen.....	35
3.9.4.1 ELISA der Firma Mikrogen.....	35
3.9.4.2 Western Blot der Firma Mikrogen.....	36
3.9.5 Untersuchung der Seren mittels des C6-Antikörpernachweises der Firma IDEXX.....	37
3.9.5.1 C6-ELISA.....	37
3.9.5.2 C6-SNAP Test.....	37
4 Ergebnisse.....	38
4.1 Untersuchung der Qualität der hergestellten Antigenpräparationen.....	38
4.2 Voruntersuchungen (Screening).....	40
4.2.1 Untersuchung der Seren mittels dem Mikrogen ELISA und Western Blot Testsystem.....	40
4.2.2 Untersuchung der Seren in ELISA und Western Blot mit <i>B. burgdorferi</i> s. s. Antigenen.....	41
4.2.3 Untersuchung der Seren im C6-ELISA der Firma IDEXX.....	42
4.3 Antikörperverlauf nach Impfung.....	44
4.3.1 ELISA-Ergebnisse nach Verwendung von <i>B. burgdorferi</i> s. s. Antigenen.....	44
4.3.2 Western Blot Ergebnisse nach Verwendung von <i>B. burgdorferi</i> s. s. Antigenen.....	48
4.4 Detektion von durch Impfung induzierten OspA-Antikörpern mithilfe rekombinanten OspA.....	53
4.4.1 ELISA-Ergebnisse nach Verwendung von <i>B. burgdorferi</i> s. s. rOspA Antigen.....	53
4.5 Vergleich ausgewählter Seren auf verschiedenen Antigenpräparationen.....	55
4.5.1 Verwendung von Serum geimpfter und infizierter Hunde.....	55
4.5.2 Verwendung von monoklonalen Antikörpern und Serum eines geimpften Hundes.....	57
4.6 Kreuzreaktivität der durch die Impfung induzierten Antikörper bezogen auf <i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i> Antigene.....	59
4.6.1 ELISA-Ergebnisse nach Verwendung von <i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i> Antigenen.....	59
4.6.1.1 Verwendung von <i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i> Lysat.....	59
4.6.1.2 Verwendung von <i>B. garinii</i> rOspA.....	61
4.6.1.3 Verwendung von <i>B. afzelii</i> rOspA.....	62
4.6.2 Western Blot Ergebnisse nach Verwendung von <i>B. garinii</i> und <i>B. afzelii</i> Antigenen.....	64
4.7 Nachweis von Infektionen nach der Impfung gegen <i>B. burgdorferi</i> s. l.	73

4.7.1 ELISA-Ergebnisse	73
4.7.2 Western Blot Ergebnisse	75
4.7.3 C6-SNAP Test Ergebnisse	79
5 Diskussion	80
6 Zusammenfassung	90
7 Summary.....	92
8 Literaturverzeichnis	94

Abkürzungen

Aqua dest.	Aqua destillata
APS	Ammoniumpersulfat
BSK II	Barbour-Stoenner-Kelly Medium II
CMRL	Connaught Medical Research Laboratories
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GABA	gamma aminobutyric acid
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonische Säure
HRP	horse raddish peroxidase
ICL	Immunology Consultans Laboratory
Impf	Impfung
KPL	Kirkegaard & Perry Laboratories
M	Mol
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mAb	monoklonale Antikörper
MKP	Modified Kelly Pettenkofer
N	Normal
n.d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline solution
qs	quantum satis
R & D	research and development
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TC Yeastolate	Tissue Culture Yeastolate
USA	United States of America
Vollst.	Vollständige
v.l.n.r.	von links nach rechts
WB	Western Blot

1 Einleitung

Bei der Lyme-Borreliose, die mittlerweile die wichtigste von Vektoren übertragene Erkrankung in der nördlichen Hemisphäre darstellt, handelt es sich um eine bakterielle Infektion von Mensch und Tier. Als Erreger konnte Willy Burgdorfer 1982 einen Spirochäten identifizieren (BURGDORFER et al. 1982), der später *Borrelia burgdorferi* genannt wurde. Während im US-amerikanischen Raum *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s. s.) als das infizierende Agens angesehen wird, steht in Europa eine größere Speziesdiversität mit der Erkrankung im Zusammenhang. Neben *B. garinii* und *B. afzelii* konnten kürzlich auch *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* als infektiös beschrieben werden (BARANTON et al. 1992; COLLARES-PEREIRA et al. 2004; DIZA et al. 2004).

In den USA kam 1992 zunächst ein Impfstoff für Hunde auf den Markt, (LEVY et al. 1993b; WASMOEN et al. 1992), darauf folgte die Entwicklung eines humanmedizinischen Impfstoffes (SIGAL et al. 1998; STEERE et al. 1998). Zwei groß angelegte Studien, an der jeweils 10.000 Personen teilnahmen, wiesen eine mangelnde Schutzwirkung innerhalb des ersten Jahres nach der Grundimmunisierung auf. So führte eine zweimalige Antigenapplikation zu einer Schutzwirkung bei nur 68% der Probanden, die erst durch die Auffrischungsimpfung im zweiten Jahr auf 92% anstieg (SIGAL et al. 1998; STEERE et al. 1998). In einer dritten, sich anschließenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Impfung sechs Monate nach der Erstimpfung in der Lage war, bereits im ersten Jahr 91 - 93% der Probanden zu schützen (VAN HOECKE et al. 1999). Die Untersuchungen führten zu der Fragestellung, ob eine Veränderung des Impfreziems auch in der Veterinärmedizin angebracht sei und eine Antigenapplikation in kurzen Intervallen ebenfalls zu einer Steigerung der Schutzwirkung führen kann.

Eine Studie über die Effizienz der auf dem Markt erhältlichen veterinärmedizinischen Impfstoffe ist aber nur dann als vollständig anzusehen, wenn nicht nur die Häufigkeit der Impfungen und ihre Wirkung auf das Immunsystem analysiert wird, sondern auch die Kreuzreaktivität der im Hund gebildeten Antikörper Berücksichtigung findet. Durch die Speziesdiversität in Europa ist grade der zweite Aspekt der hier vorgelegten Studie von entscheidender Bedeutung. Die Analyse der durch eine Impfung gegen *B. burgdorferi* s. s. gebildeten Antikörper auf ihre Kreuzreaktivität bezüglich *B. afzelii* und *B. garinii* soll eine Aussage über die Effizienz dieser Vakzine gegenüber den in Europa vorherrschenden infizierenden Bakterien ermöglichen.

Unsere Studien zeigen, dass eine zusätzliche Impfung innerhalb der Grundimmunisierung nicht zu einer signifikanten Steigerung der vor der Infektion geschützten Hundepopulation führt. Durch die Verwendung von Antigenen verschiedener Borrelienspezies in den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Kreuzreaktivität der durch eine Borrelienspezies hervorgerufenen Antikörper gegenüber einer anderen Borrelienspezies gering ist. Diese Ergebnisse führen zu einer neuen, kritischeren Betrachtung der auf dem Markt befindlichen Impfstoffe und sollen eine Anregung für weiterführende Studien zum Schutz vor der Erkrankung darstellen.

2 Literaturübersicht

2.1 Borrelien

2.1.1 Mikrobiologische Zuordnung der Borrelien

In der Ordnung der *Spirochaetales* finden sich in der Familie *Spirochaetaceae* neben den Gattungen *Spirochaeta* und *Treponema* die *Borrelia* (CANALE-PAROLA 1986). Es handelt sich bei den Borrelien um eine phylogenetisch alte, eng eingegrenzte Bakterienart, die weder der gramnegativen noch der grampositiven Gruppe zugeordnet werden kann (GRAY et al. 2002; ROLLE et al. 1993; SCHWAN et al. 1995; WOESE 1987). Alle Spirochäten zeichnen sich durch kontraktile Axialfilamente als Endoflagellen unterhalb der mehrschichtigen äußeren Hülle aus, die den Bakterien dieser Ordnung den typisch spiraligen Charakter und ihre Motilität verleihen (BARBOUR et al. 1986; GRAY et al. 2002).



Abbildung 1.1



Abbildung 1.2

B. burgdorferi s. s. N40 nativ (1.1) und markiert mit fluoreszierenden Antikörpern (1.2), dargestellt in der Dunkelfeld- und Fluoreszenzmikroskopie, Institut für Immunologie 2002

Innerhalb der Gattung der *Borrelia* lassen sich viele verschiedene Spezies differenzieren, wobei bisher drei Hauptgruppen als pathogen beschrieben wurden. Die erste Gruppe wird von *B. recurrentis* und *B. duttoni* als Erreger des humanen Rückfallfiebers gebildet, die zweite Gruppe von *B. anserina*, Verursacher der Geflügelspirochätose. Der *B. burgdorferi* s. l. Komplex bildet die dritte Gruppe (CANALE-PAROLA 1986; GRAY et al. 2002; SELBITZ 1992). Alle Borrelien werden durch Vektoren in Form von Zecken oder Läusen übertragen, und bis auf *B. recurrentis* und *B. duttoni* haben alle ein Reservoir unter den Wildtieren (SCHWAN et al. 1995). Innerhalb des *B. burgdorferi* s. l. Komplexes finden sich mehrere Spezies, von denen zum Beispiel *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* in der Lage sind, sowohl im Säuger als auch innerhalb der Vogelpopulation Infektionen hervorzurufen. Andere, wie beispielsweise *B. lusitaniae*, konnten in asymptomatischen Tieren nachgewiesen werden (LE FLECHE et al. 1997), sowie mittlerweile

auch aus der Haut einer Patientin isoliert werden (COLLARES-PEREIRA et al. 2004), die seit circa zehn Jahren an einer erythematösen Veränderung der Haut im Bereich der Hüften litt. Unter den bisher entdeckten Arten gibt es zudem Borrelien, wie beispielsweise *B. andersonii*, *B. bisettii* und *B. japonica*, die nur aus Zecken isoliert wurden und deren Pathogenität unklar ist (POSTIC et al. 1998).

Die Spezies *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* und *B. garinii* werden zurzeit als alleinige Erreger der Lyme-Borreliose eingestuft (BARANTON et al. 1992), wobei auch *B. lusitaniae* und *B. valaisiana*, nach dem Nachweis dieses Erregers in der Cerebrospinalflüssigkeit eines Menschen inzwischen dazu gezählt werden (DIZA et al. 2004). Es zeigt sich eine klare Verbreitung der Erreger auf der nördlichen Hemisphäre. *B. burgdorferi* s. s. findet sich sowohl in den Vereinigten Staaten von Amerika als auch im europäischen bis hin zum asiatischen Raum, *B. afzelii* und *B. garinii*, und wie es auch bei *B. lusitaniae* der Fall zu sein scheint, verteilen sich hingegen auf das eurasische Gebiet (STEERE et al. 2004).

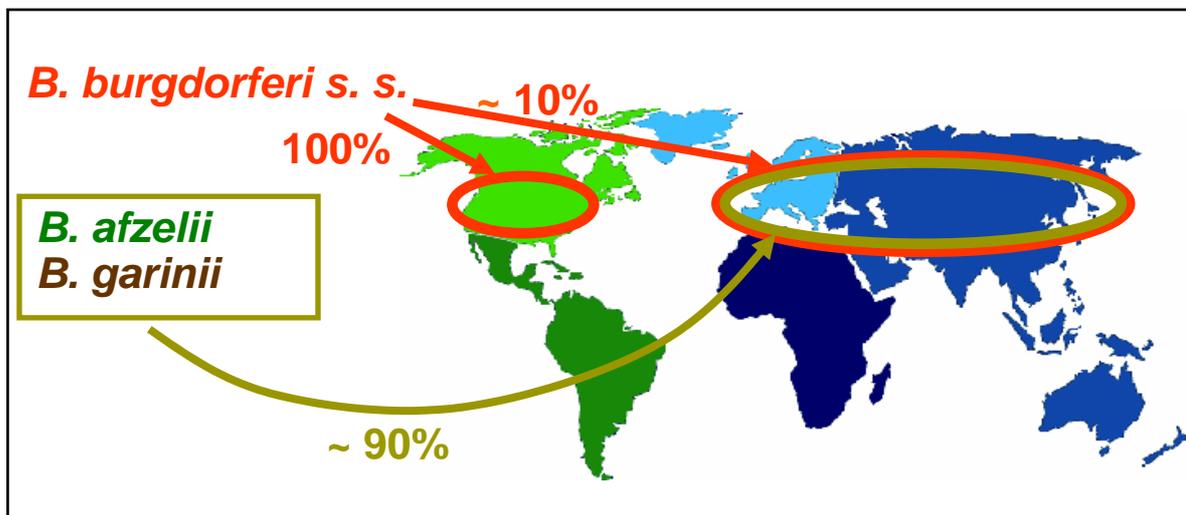


Abbildung 2

Die Verteilung der drei wichtigsten als pathogen beschriebenen *B. burgdorferi* s. l. Spezies auf der nördlichen Hemisphäre

2.1.2 Epidemiologie und Pathogenese der Borrelieninfektion

1. Zeckeninfektion: Da die transovariable Übertragung von Borrelien in der Natur keine Rolle spielt, sind Eier und Zeckenlarven zunächst nicht mit dem Erreger der Lyme-Borreliose infiziert (MAGNARELLI et al. 1987b). Bei der ersten Blutmahlzeit kann sich die Larve an Waldsäugetieren oder Vögeln, die als Reservoir für alle Spezies angesehen werden (GERN et al. 1998; RICHTER et al. 1999), mit Borrelien infizieren. Ein gewisser Prozentsatz der Nymphenpopulation gilt somit bereits als infektiös, die Infektionsrate liegt in Abhängigkeit von der geografischen Lage, in der sie sich aufhalten bei 10-25% (GREENE et al. 1998; HUBALEK et al.

2004). Durch eine weitere Blutmahlzeit sind infizierte Nymphen in der Lage, Borrelien zu übertragen, nicht infizierte als auch bereits infizierte wiederum können den Erreger aufnehmen, sodass es zur Superinfektion kommen kann. Bei adulten Zecken zeigt sich eine Durchseuchungsrate von bis zu 75%, wiederum in Abhängigkeit von der Region, in der sie sich befinden (DE MICHELIS et al. 2000; HUBALEK et al. 1998), wobei bei den Zecken sowohl eine einfache Infektion mit einer Borrelienspezies auftreten kann, als auch eine Doppel- oder sogar Tripelinfektion mit allen drei Spezies (SCHWARZOVA et al. 2004).

2. Infektion des Wirtes: Die Erreger befinden sich zunächst im Darm der Zecke, wo sie durch die Expression eines bestimmten Oberflächenmusters, dominiert von dem Oberflächenprotein A, im Englischen als *outer surface protein A* (OspA) bezeichnet, in der Lage sind, sich dauerhaft anzuheften (PAL et al. 2000). Es konnte gezeigt werden, dass OspA spezifisch an ein Proteinmuster im Mitteldarm der Zecke bindet (ANGUITA et al. 2003). Durch die Anlagerung der Zecke an die warme Haut des Wirtes und dem Einstrom von Blut in den Darm der Zecke beginnt die Borrelie mit einer Veränderung ihrer Oberflächenstruktur: Einige Membranproteine werden weniger stark oder gar nicht mehr, andere hingegen jetzt erst auf der Oberfläche des Bakteriums exprimiert. So verschwindet OspA und stattdessen wird das Oberflächenprotein C (OspC) präsentiert (GILMORE et al. 2000; PAL et al. 2001). Diese Vorgänge zeigen sich in der Zecke aber nicht bei allen Borrelien. Einige exprimieren durchgehend OspA, andere OspC, beide äußeren Membranproteine oder keines von beiden (OHNISHI et al. 2001). Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es nicht zu einer gegenseitig abhängigen Regulation der Lipoproteine kommt, da beide während der Blutmahlzeit in der Zecke zu finden sind. Dennoch wird OspC bisher als das Protein angesehen, welches dem Erreger ermöglicht, die Darmwand der Zecke zu penetrieren und sich durch die Hämolymphe bis hin zur Speicheldrüse zu bewegen (TEMPLETON 2004). Antikörper gegen OspC sind in der Lage, diese Translokation zu blockieren (GILMORE et al. 2000), aber bisher konnte noch nicht abschließend geklärt werden, wie die Blockade von statten geht. Neueste Studien zeigen sogar, dass die Expression von OspC zwar entscheidend für die initiale Phase der Infektion des Vertebraten ist, allerdings nicht für eine Translokation vom Mitteldarm der Zecke in die Speicheldrüse, wobei ein Hinweis auf weitere, nicht näher charakterisierte Oberflächenproteine erfolgt, die diese Aufgabe übernehmen (GRIMM et al. 2004). Zusätzlich zu OspC spielen Plasminogen und seine Aktivatoren, vom Wirt stammend und mit der Blutmahlzeit aufgenommen, eine große Rolle. Die Spirochäten binden diese Faktoren, welche ihnen eine Wanderung durch die Zecke ermöglichen (COLEMAN et al. 1997). Von der Speicheldrüse aus gelangt die Borrelie mit dem Speichel der Zecke letztendlich in den Wirt, wo sie anschließend beginnt, sich auszubreiten (PIESMAN 1993; PIESMAN et al. 1987). Die Veränderung der Oberflächenstruktur der Spirochäten mit der anschließenden Wanderung in die Speicheldrüse der Zecke dauert in der Regel 24 (LEUBA-GARCIA et al. 1998) bis 48 Stunden (OHNISHI et al. 2001).

2.2 Wirt

2.2.1 Erkrankungsbilder nach einer Infektion mit *B. burgdorferi*

1. Infektion des Menschen: Circa 80% der infizierten Menschen entwickeln innerhalb des ersten Monats nach Infektion eine sich ausbreitende Hautrötung, die sich kreisförmig um die Zeckenstichstelle herum entwickelt (STEERE 1989). Das so genannte *Erythema migrans* ist eine nicht schmerzhaft Hautveränderung, die innerhalb von einigen Tagen bis Wochen von selbst abklingt oder aufgrund einer Antibiose verschwindet (GRAY et al. 2002). In dieser ersten Phase der Infektion stellt sich zudem häufig eine grippeähnliche Symptomatik ein, gekennzeichnet durch Fieber, Unwohlsein, Kopf- und Gliederschmerzen. Bei der sich anschließenden zweiten Phase kann es vor allem zum Auftreten von Lahmheiten bedingt durch Arthritiden kommen. Auch neurologische Veränderungen in Form von Meningitiden stehen mit der Infektion in Verbindung, Karditiden wurden ebenfalls im Zusammenhang mit einer Borrelieninfektion beschrieben (STEERE 2001). Nach Monaten bis Jahren, in der dritten Phase der Erkrankung, werden bei einigen Patienten chronische Entwicklungen beobachtet, die sich in Gelenken, der Haut oder im Nervensystem niederschlagen (STEERE 2001). Es wird bisher davon ausgegangen, dass sich sowohl die zweite als auch die dritte Phase nur bei nicht behandelten Patienten entwickeln können. Aufgrund langer Beobachtungen gelangt man mittlerweile zu der Auffassung, dass jede der drei Spezies einen bestimmten Tropismus hat; *B. burgdorferi* s. s. wird mit den Gelenksveränderungen und *B. afzelii* mit der Haut in Verbindung gebracht, wohingegen *B. garinii* insbesondere das Nervengewebe zu schädigen scheint (VAN DAM et al. 1993). Diese Überlegungen schließen aber nicht das Vorkommen der einzelnen Spezies in anderen Geweben aus (HOVIUS et al. 1999). Da Borrelien über die bereits erwähnten kontraktile Axialfilamente verfügen, sind sie in der Lage, sich aktiv fortzubewegen. Es wurde gezeigt, dass sie dies auch im Wirtsgewebe können. Dabei binden sie mit bestimmten Oberflächenstrukturen an Plasminogen und einen Plasminogenaktivator des Wirtes und verdauen so umliegendes Gewebe (KLEMPNER et al. 1995; KLEMPNER et al. 1993). Legt man diese Erkenntnisse zugrunde, so kommt es im Laufe der Infektion zu einem sich kontinuierlichen Ausbreiten der Erreger. Ein Nachweis wird mit Fortschreiten der Zeit nach Infektion in vielen der für Borrelien typischen Gewebe möglich. Dazu zählen Haut, Gelenke, nervale Bereiche, Herz, Niere und andere innere Organe.

2. Infektionen des Hundes: Infizierte Hunde entwickeln lediglich zu 5% klinische Veränderungen (LEVY et al. 1992), wobei die experimentelle Infektion von Versuchshunden mit *B. burgdorferi* s. s. im Labor zu einer Erkrankungsrate von 75% führt (STRAUBINGER et al. 1998b). Ein *Erythema migrans* ist nur in den seltensten Fällen zu beobachten (APPEL 1990), was nicht auf der behaarten Haut des Tieres beruht. Es zeigt sich zwar eine Rötung um die Stichstelle, diese ist aber sehr klein und breitet sich nicht aus. Hierbei handelt es sich lediglich um eine Hautreizung durch die mechanische Verletzung nach dem Zeckenstich und dem Einwirken des

Zeckenspeichels, der zu lokalen Entzündungsreaktionen führt. Ähnlich dem Menschen beobachtet man beim Hund eine grippeähnliche Reaktion, die mit Fieber von bis zu 40,5°C über ein bis zwei Tage, Fressunlust und Mattigkeit einhergeht (APPEL 1990). An diese erste Phase schließt sich Wochen bis Monate später eine zweite Phase an, in der die Hunde in der Regel zum ersten Mal klinisch auffällig und dem Tierarzt vorgestellt werden. Erkrankte Tiere zeigen zu diesem Zeitpunkt eine ausgeprägte Lahmheit, die auch ohne therapeutische Maßnahmen innerhalb von zwei bis fünf Tagen wieder abklingen kann (STRAUBINGER et al. 1998b). Dabei sind die betroffenen Gelenke geschwollen, heiß und schmerzhaft, das Bein wird zuweilen gar nicht belastet (APPEL et al. 1993). Im Gelenkpunktat zeigt sich eine starke Ansammlung von Gelenkflüssigkeit sowie steigende Leukozytenzahlen, wobei die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten den Hauptteil ausmachen (STRAUBINGER et al. 1997a; STRAUBINGER et al. 1998a). Wird die Lahmheit nicht behandelt, so kann sie in mehr oder weniger großen Abständen wiederkehrend die Gliedmaßen wechselnd auftreten (APPEL et al. 1993; STRAUBINGER et al. 1998b). Neben dem von der Arthritis dominierten Erkrankungsbild wurden für den Hund auch Veränderungen des kardialen und Nervensystems beschrieben (SPECK et al. 2001), die teilweise aber nicht eindeutig einer Borreliose zugeordnet werden konnten. Auch andere Organsysteme können bei Hunden durch eine Borrelieninfektion geschädigt werden. In experimentell infizierten Hunden waren in histologischen Schnitten Perineuritiden und Meningitiden nachweisbar (STRAUBINGER et al. 1997a), Herzrhythmusstörungen hingegen wurden bisher nur in einem Fall nach einer aus einer Borrelieninfektion entstandenen Myokarditis beschrieben. Hier fehlt jedoch der direkte Erregernachweis (LEVY et al. 1988). Ein weiterer Erkrankungskomplex, der im Zusammenhang mit der Lyme-Borreliose gesehen wird, ist Nierenversagen aufgrund einer schweren Glomerulonephritis. In mehreren Fällen fielen Hunde, die überwiegend zu den Rassen Labrador und Golden Retriever zählten, durch starke Abmagerung, Erbrechen und lethargischem Verhalten auf. Bei diesen Patienten waren Azetonämie, Urämie, Proteinurie und periphere Ödeme die Leitsymptome der Erkrankung (DAMBACH et al. 1997). Teilweise war eine Lahmheit mit dem klinischen Bild assoziiert. Die Krankheit zog sich über einen Tag bis zu acht Wochen hin und endete letal. Bei den folgenden Untersuchungen war zwar ein Erregernachweis in der Niere nicht möglich, doch mittels markierter Antikörper gelang der Nachweis spezifischer Borrelienantigen-Antikörper-Immunkomplexe.

3. Infektionen bei anderen Tierarten: Anfällig für die Infektion mit Erregern aus dem *B. burgdorferi* s. l. Komplex, die auch für Mensch und Hund als pathogen beschrieben wurden, sind nahezu alle Haussäugetiere, wobei die klinische Symptomatik bei Pferden und Rindern geringgradig ist (CHANG et al. 2000; TUOMI et al. 1998). Diese Tiere zeigen lediglich ein leicht gestörtes Allgemeinbefinden und weitere unspezifische Veränderungen, die oft nicht mit einer Borrelieninfektion in Verbindung gebracht werden. Bei Pferden zählen dazu Fieber, Lahmheit mit geschwollenen Gelenken und teilweise Veränderungen an den Augen, dem Herz und dem nervalen

System (BURGESS et al. 1987; GRAY et al. 2002; LIEBISCH et al. 1999; PARKER et al. 1992). Bei Rindern hingegen sind die klinischen Anzeichen in der Regel noch schwächer ausgeprägt, ein Antikörpernachweis ist jedoch möglich (MAGNARELLI et al. 2004). Es wurden Lahmheiten und Gewichtsverlust aber auch Aborte mit der Erkrankung in Zusammenhang gebracht (BUSHMICH 1994; GRAY et al. 2002). Katzen zeigten bisher nur experimentell klinische Veränderungen in Form von Arthritiden (BURGESS 1992). Unter natürlichen Bedingungen sind viele Katzen allerdings mit dem Erreger infiziert (LINDNER et al. 1995), was sich in dem Nachweis borrelienspezifischer Antikörper niederschlägt (MAGNARELLI et al. 1990), wie sie auch im Institut für Immunologie nachgewiesen werden konnten. Labormäuse und -ratten zeigen in Abhängigkeit ihres Stammes und der Inokulationsstelle innerhalb kurzer Zeit Lahmheiten, die auch bei Hamstern zu beobachten sind (LIM et al. 1995; MOODY et al. 1990; MOODY et al. 1995; WOOTEN et al. 2001). Neben diesen Nagetieren, die als Infektionsmodelle teilweise Bedeutung haben, zählen auch die Meerschweinchen als potenziell infizierbar und geeignet als Infektionsmodell der Lyme-Borreliose (SONNESYN et al. 1993). Kaninchen entwickeln ein starkes Erythem um die Inokulationsstelle, mit dessen Verschwinden auch die Erreger eliminiert werden (FOLEY et al. 1995). Eine Borreliose bei Affen ist im klinischen Bild einer Infektion des Menschen sehr nahe. Sie zeigen im Gegensatz zu den anderen Tieren auch deutliche neurologische Veränderungen (PACHNER et al. 1995). Vögel gelten als Reservoir (GERN et al. 1998; GERN et al. 2000), sodass es daher bei diesen Tieren in der Regel nicht zu einer Erkrankung, sondern nur zu einer Infektion kommt. Ihre Bedeutung für die Enzootologie wird allerdings als gering eingestuft (SLOWIK et al. 2001).

2.2.2 Reaktionen des Immunsystems des Wirtes auf eine Borrelieninfektion

Die ersten, unspezifischen Reaktionen des Immunsystems finden an der Eintrittspforte, der Stelle des Zeckenstiches, statt und sind gekennzeichnet durch ein Einwandern von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, als auch das Vorhandensein von Dendritischen Zellen, Makrophagen und einigen Plasmazellen (STEERE et al. 2004). Diese ersten Abwehrmechanismen werden allerdings durch entzündungshemmende Stoffe, wie zum Beispiel Prostaglandine aus dem Zeckenspeichel, zunächst unterdrückt (BOWMAN et al. 1996). Bei der anschließenden aktiven Wanderung der Borrelien durch das Gewebe werden weitere neutrophile Granulozyten angelockt (HARTER et al. 1999; STRAUBINGER et al. 1997a), die durch ihre Degranulierung Entzündungsreaktionen hervorrufen (HARTER et al. 1999). Diese sind besonders in Organen mit Höhlen stark ausgeprägt. So reagieren, wie bereits beschrieben, vor allem Gelenke, Herz mit Perikard und Gehirn mit Gehirnhäuten sehr stark auf eine Borrelieninfektion. Der Grund hierfür ist bisher nicht bekannt, aber der hohe Anteil an kollagenen Fasern in diesen Geweben bietet einen Erklärungsansatz. Borrelien besitzen einen Glykosaminoglykan-Rezeptor, der an Glykosamine im

Gewebe des Wirtes binden kann (ISAACS 1994; LEONG et al. 1995; PARVEEN et al. 2000), welche in kollagenreichem Gewebe verstärkt zu erwarten sind.

An die Antwort des angeborenen Immunsystems schließt sich innerhalb der ersten Wochen nach Infektion eine spezifische Immunantwort des Wirtes an. Sie ist von der Produktion *B. burgdorferi*-spezifischer Immunglobuline der Klasse M gekennzeichnet, der sich eine Immunglobulin G-Produktion anschließt (CRAFT et al. 1984). Bei mit Hilfe von Zecken experimentell infizierten Hunden konnten die ersten Antikörper der IgG-Klasse vier bis sechs Wochen nach Infektion nachgewiesen werden, sie stiegen über einen Zeitraum von sechs bis acht Wochen weiter an und hielten ihren hohen Antikörpertiter über ein Jahr (APPEL et al. 1993) bis hin zu 560 Tagen (STRAUBINGER et al. 2000).

Die nähere Charakterisierung der nach Infektion mit Borrelien gebildeten Antikörper zeigt eine Reaktion der Hunde auf OspC und Flagellin aber auch auf andere spezifische und weniger spezifische Proteine. OspA lässt sich bei Mensch und Hund, wenn überhaupt, erst sehr spät, in der chronischen Phase der Erkrankung, nachweisen (LEVY et al. 1993a). Die vom Wirt gebildeten Antikörper können zum einen eine Fc-vermittelte Phagozytose durch polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen herbeiführen (BENACH et al. 1984). Zum anderen sind sie in der Lage über die Aktivierung des Komplements eine Lyse der Bakterien hervorzurufen (AYDINTUG et al. 1994; KOCHI et al. 1991). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass trotz der Abwehrmechanismen seitens des Wirtes Borrelien über lange Zeit im Gewebe überleben (BOCKENSTEDT et al. 2002; LEVY et al. 1993a; STRAUBINGER et al. 2000), was auf eine persistierende Infektion hindeutet. Wie es zu dieser Persistenz kommt, ist noch nicht in allen Bereichen geklärt. Es scheint auf einer Veränderung der Oberfläche zu beruhen. Verschiedene Oberflächenmoleküle wie OspC und VlsE, das *vmp-like sequence expressed* Protein, unterliegen einer recht großen Variabilität (LAGAL et al. 2002; WILSKE et al. 1996; ZHANG et al. 1997), die es den Borrelien ermöglicht, über die beständige Oberflächenveränderung Antikörper des Immunsystems unwirksam werden zu lassen, um so der Elimination durch den Wirt zu entgehen.

Das Oberflächenmolekül VlsE ähnelt dem *variable major protein* (VMP) von *B. recurrentis*, dem Erreger des Rückfallfiebers des Menschen, welches bereits als hoch variables Protein beschrieben wurde (ZHANG et al. 1997). VlsE besteht ebenfalls aus variablen Bereichen und durch seine kontinuierliche antigene Veränderung trägt es zur Immunevasion des Wirtes bei. Es hat sich bestätigt, dass größere Bereiche des VlsE eine hohe Frequenz in ihrer DNA-Sequenzänderung in den frühen Stadien einer Infektion durchlaufen (die *variable region* I – VII) (MCDOWELL et al. 2002). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass das VlsE zwischen diesen Bereichen hochkonstante, zwischen den Spezies sehr konservierte Strukturen aufweist, die IR (*invariable region*) 1 - 6. Die Kombination aus variablen und konstanten Domänen führt zu einem Oberflächenprotein, welches zum einen sehr gut bindende, früh induzierte Antikörper, zum anderen

aber auch durch die ständige Variation der variablen Regionen Antikörper hervorruft, die durch die Veränderungen keine Bindungsstelle mehr finden.

Mittlerweile sind neue Nachweissysteme auf dem Markt erhältlich, welche sich eines Peptids bedienen, das von Borrelien auf ihrer Oberfläche sehr konstant exprimiert wird. Das so genannte C6-Peptid stammt aus dem IR6 (PHILIPP et al. 2001). Antikörper gegen dieses Peptid zählen zu den früh induzierten, bindenden Antikörpern. Der Nachweis der C6-Antikörper ermöglicht es, eine Infektion von Säugern (Menschen, Affen, Hunden) schneller nachzuweisen. Sie lassen sich bereits drei Wochen nach Infektion detektieren, sind sehr aussagekräftig und treten nach Infektion mit allen drei Spezies auf. Sie fallen nach einer erfolgreichen Antibiotikatherapie im Gegensatz zu den mit Hilfe von Borrelienlysat nachgewiesenen Antikörpern auf Ausgangswerte zurück (PHILIPP et al. 2001; STRAUBINGER 2000).

2.3 Diagnostik

2.3.1 Serologische Methoden zum Nachweis einer Borrelieninfektion

1. Test der ersten Generation: Eine einfache und bereits relativ lang existierende Möglichkeit der serologischen Diagnostik der Lyme-Borreliose stellt der IFA, der Immunofluoreszenz-Assay dar. Bei diesem Test werden komplette Organismen auf einen Objektträger aufgetragen und das zu untersuchende Serum dazugegeben (MAGNARELLI et al. 1987a; SCHWAN et al. 1995; STANEK et al. 1986). Mit einem sekundären Antikörper, der fluoreszierend markiert ist, können die gebundenen Antikörper detektiert werden. Es handelt sich hierbei um ein einfach durchführbares Testsystem, bei dem die Menge an Fluoreszenz, die durch die Bindung der Antikörper hervorgerufen wird, beurteilt wird. Da die Fluoreszenzintensität durch die anwendende Person eingeschätzt werden muss, bedarf es langer und guter Erfahrung, um eine sichere und eindeutige Diagnose stellen zu können. Dieser Test gilt mittlerweile als veraltet und sollte nicht mehr als alleiniges Mittel für die Diagnostik einer Borreliose angewendet werden.

2. Tests der zweiten Generation: Mit der Weiterentwicklung der Testverfahren etablierte sich zunächst das ELISA-System (BERARDI et al. 1988; MAGNARELLI et al. 1988; MAGNARELLI et al. 2001; SHIN et al. 1993). Hier wird Borrelienantigen auf eine Plastikplatte mit Vertiefungen aufgetragen und dann mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert. Ein markierter sekundärer Antikörper ermöglicht die Bestimmung des Gesamtgehaltes an spezifisch gebundenen Antikörpern nach einem Farbumschlag mittels Substratzugabe. Als Antigen für die Beschichtung der Platten bietet sich das Lysat, welches von in Kultur gewachsenen Borrelien gewonnen wird, an. Darüber hinaus können auch rekombinant hergestellte Proteine Verwendung finden (MAGNARELLI et al. 1997). Da dieser Test bei Einsatz von Lysat als Detektionsantigen lediglich eine Gesamtantikörperbestimmung zulässt, ist eine genaue Differenzierung der Antikörper ihrer Größe

nach und somit auch der Zuordnung, gegen welches Oberflächenprotein sie gerichtet sind, nicht möglich. Antikörper, die sich nach einer Infektion bilden, werden im ELISA genauso erfasst wie jene induziert durch eine Impfung. Eine Möglichkeit der Erfassung geimpfter Tiere mithilfe der ELISA Technik ist ein mit reinem rekombinanten OspA beschichteter ELISA, der in der Lage ist OspA-Antikörper nach Impfung zu detektieren. Er wurde im Rahmen der Erstellung der hier vorgelegten Arbeit am Institut für Immunologie eingesetzt. Es hat sich gezeigt, dass der die Gesamtantikörper detektierende ELISA ein sensitiver, aber für den Einsatz in der Diagnostik nicht ausreichend spezifischer Test ist (SCHWAN et al. 1995). Von daher ist vor allem bei ELISA-Werten, die im schwach positiven Bereich liegen oder bei Seren von vorberichtlich geimpften Hunden eine genaue Charakterisierung der Antikörper von besonderer Bedeutung. Auch aufgrund kreuzreagierender Antikörper, hervorgerufen durch eine Infektion mit anderen Spirochäten, können Serumproben bei der alleinigen Verwendung des ELISA-Systems unter Umständen falsch-positiv beurteilt werden. Für diese Fälle empfiehlt sich der Anschluss eines weiteren Tests, dem Western Blot, der im Vergleich zum ELISA sehr spezifisch ist, da nun eine genaue Charakterisierung der gebildeten Antikörper möglich wird. Das so genannte Zweistufentestsystem gilt zum jetzigen Zeitpunkt als Methode der Wahl, um eine korrekte und aussagekräftige Borreliose-Diagnostik durchzuführen (BACON et al. 2003). Beim Western Blot werden Antigene in einem Gel im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt und dann auf eine Nylon- oder Nitrozellulose-Membran übertragen. Durch Inkubation des Testserums auf der Membran können Antikörper binden, durch einen markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht und der Ort der Bindung auf der Membran genau beschrieben werden. Hier hat sich gezeigt, dass in Abhängigkeit von den eingesetzten Antigenen Banden beobachtet werden können, die in Tabelle 1 gelistet sind (HAUSER et al. 1997).

Durch die Speziesdiversität in Europa sind die verwendeten Antigene bei der Auswertung eines Western Blot von großer Bedeutung. Als Standard-Antigenpräparation wird der PKo Stamm, der Spezies *B. afzelii* zugehörig, empfohlen (HAUSER et al. 1997). Verwendet man einen in Medium gewachsenen Erreger, so wird aus diesem ein Lysat hergestellt und als Antigenpräparation im Western Blot aufgetragen. Die Beschichtung der Membran kann ebenso mit rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt werden (HAUSER et al. 1998). Um eine gute Aussage über eine unter Umständen vorhandene Infektion treffen zu können, wird das entstandene Bandenmuster nach Kriterien ausgewertet, die sich aus der Spezifität der nachgewiesenen Banden ableiten. So ist die Kombination von zwei oder mehr Signalen der hoch spezifischen Proteine aussagekräftig (HAUSER et al. 1997). Des Weiteren ist die Kombination einer sehr spezifischen mit zwei oder drei nicht so spezifischen Banden ebenso als aussagekräftig anzusehen. Bei der Auswertung eines Western Blot spielt die Erfahrung eine große Rolle. Dies wird besonders deutlich bei der Beurteilung von Hunden, die vorberichtlich eine Impfung erhalten haben. Die in Deutschland erhältliche Impfung ist ein Lysatimpfstoff und induziert somit neben Antikörpern gegen OspA auch

eine Reihe weiterer Antikörper, die auch nach einer Infektion auftreten können. Die am Institut für Immunologie durchgeführte Diagnostik orientiert sich bei der Auswertung solcher Fälle an dem Vergleich immer verwendeter Kontrollseren sowohl eines infizierten als auch eines geimpften Hundes. So kann neben dem Nachweis der nach Impfung auftretenden OspA-Bande auch ein Nachweis weiterer impfspezifischer Banden erreicht werden. Die Kombination aus ELISA und Western Blot ermöglicht eine Diagnostik mit hoher Sensitivität aber auch hoher Spezifität.

Tabelle 1: im Western Blot auftretende Banden, ihre Bezeichnung und die Bedeutung

Bezeichnung	Größe	Spezifität / Funktion
p14	14 kDa	sehr spezifisch, bisher unbekannte Funktion
p17	17 kDa	sehr spezifisch, Oberflächenprotein von <i>B. burgdorferi</i> s. s.
p21	21 kDa	sehr spezifisch, bisher unbekannte Funktion
OspC	21-23 kDa	hohe Spezifität, Funktion wie beschrieben
p30	30 kDa	sehr spezifisch, Funktion bisher unbekannt
OspA	31-33 kDa	wie OspC sehr spezifisch, Funktion wie beschrieben
OspB	34-36 kDa	mittelgradige Spezifität, Oberflächenprotein
p39	39 kDa	mittelgradig spezifisch, auch als BmpA bezeichnet
p41	41 kDa	geringe Spezifität, Flagellin, wie es auch bei vielen anderen Bakterien vorkommt
p43	43 kDa	hoch spezifisch, bisher unbekannte Funktion
p58	58 kDa	hohe Spezifität, unbekannte Funktion
p66	66 kDa	hoch spezifisch, membranassoziiertes Protein
HSP60, HSP75	60 - 75 kDa	bei vielen Bakterien auftretend, daher wenig spezifisch, Hitzeschockproteine
p83 - p100	83 - 100 kDa	hoch spezifische Proteine, sehr wahrscheinlich mit dem proteoplasmatischen Zylinder oder dem Flagellum assoziiert

3. Test der dritten Generation: Durch die lange persistierenden Antikörperspiegel, die auch nach einer erfolgreichen Therapie nicht abfallen, und der Komplexität der Borreliendiagnostik wird nun an einem vereinfachten System gearbeitet. Ein ELISA beschichtet mit dem C6-Peptid ist mittlerweile entwickelt worden (LIANG et al. 1999). Seren infizierter Individuen zeigten eine im Vergleich zu dem Zwei-Stufen-Testsystem frühere und sehr spezifische Reaktion auf C6 (BACON et al. 2003; GOMES-SOLECKI et al. 2001). Durch dieses System lässt sich also eine schnelle, sichere Diagnose einer akuten Borreliose stellen. Auch zeigte sich, dass geimpfte Hunde keine C6-Antikörper produzieren und demnach in diesem ELISA negativ reagieren (LIANG et al. 2000b; O'CONNOR et al. 2004). Ein weiterer Vorteil des C6-ELISA ist vor allem in Europa von großer Bedeutung: Das Peptid ist auch zwischen den Spezies konserviert, sodass alle Infektionen in Europa erfasst werden können (LIANG et al. 2000a).

Mittlerweile ist ein SNAP-Test vorhanden, der semiquantitativ und nicht so spezifisch wie der ELISA C6-Antikörper infizierter Individuen nachweist. Aufgrund der einfachen Handhabung ist er jedoch, im Gegensatz zum C6-ELISA, kommerziell erhältlich und für die Anwendung in Praxen geeignet (LEVY et al. 2002). Bei diesem System werden die einzelnen Komponenten, also das Serum und das Konjugat, vor der Auftragung auf ein Reaktionsfeld gemischt, um dann im Falle einer Infektion als Antikörper-Konjugat-Vernetzung an spezifische Proteine, wie das C6, zu binden. Dieser Test ermöglicht einen Infektionsnachweis in zehn Minuten.

2.3.2 Weitere Methoden für die Diagnostik einer Borrelieninfection

Eine aufwendigere, aber dafür ganz eindeutige Nachweismethode ist der direkte Erregernachweis mittels Kulturanzüchtung. Es wird ein Gewebe ausgewählt, welches als möglicher Träger von Borrelien in Frage kommt. Dazu eignen sich Haut und Biopsien der Synovialmembran am besten. Die Gewebestücke müssen steril entnommen und sofort in Medium verbracht werden. Die Anzüchtung von Borrelien ist sehr schwierig, da sie mit einer Anzüchtungszeit von bis zu sechs Wochen zum einen lange dauert (STRAUBINGER et al. 1997b), zum anderen eines reichhaltigen, anspruchsvollen Mediums bedarf. Borrelien wachsen in Barbour-Stoenner-Kelly (BSK-II)-Medium, das sich durch eine Kombination verschiedenster Zutaten wie Kaninchenserum, bovines Serumalbumin, CMRL-Medium und vielen weiteren Zusätzen auszeichnet (BARBOUR 1984). Das Medium unterstützt auch das Wachstum sowohl zahlreicher anderer Bakterien als auch von Pilzen. Es ist somit von größter Notwendigkeit bei einer Kontrolle auf Borrelienwachstum die Probe steril zu entnehmen. Durch die Kontamination mit Bakterien oder Pilzen kann die Vermehrung von Borrelien behindert oder gar blockiert werden. Diese Problematik zeigt sich vor allem bei einem Nachweis von Borrelien aus Zecken. Durch die unsterile Oberfläche der Zecke ist eine Kontamination vor allem mit Pilzen kaum auszuschließen. Bei Erstellung dieser Arbeit, in der kurzzeitig auch Borrelienzüchtung aus Zecken untersucht wurde, hat sich gezeigt, dass es trotz Kontamination zu einem Borrelienwachstum kommen kann.

Ein Erregernachweis mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion, *polymerase chain reaction* (PCR), ist ebenfalls möglich (ROSA et al. 1989; ROSA et al. 1991). Bei dieser Methode werden Borreliengene mithilfe bekannter Primersequenzen (Oligonukleotide mit bekannter Sequenz, die die DNA-Vervielfältigung auslösen) vervielfältigt, um dann durch fluoreszierende Farbstoffe oder andere Marker sichtbar gemacht zu werden. Nach ihrer Entwicklung galt die PCR als zukünftiges Mittel der Wahl, um eine sichere und gute Borreliosediagnostik durchzuführen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass diese Methode durch die Auswahl geeigneter Gewebeproben und anderer Faktoren erschwert wird. So ist die PCR sehr spezifisch und auch sensitiv, wenn in dem für die Diagnostik ausgewählten Gewebestück ausreichend Borrelien vorhanden sind, die Primer optimal gewählt wurden und die Reaktionsbedingungen ideal sind. Das erste Problem, welches den Einsatz der PCR limitiert, stellt sich allerdings bereits bei der Auswahl der geeigneten Gewebeprobe. Oftmals ist vor

allem bei den Haustieren die Zeckenstichstelle nicht genau zu lokalisieren, sodass nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass sich in der ausgewählten Probe überhaupt Borrelien befinden. Gerade bei frischen Infektionen sind die Erreger häufig noch nicht über den gesamten Körper verteilt. Nach der Auswahl der Gewebeprobe zeigt sich die nächste Hürde: Die anschließende Extraktion der DNA reduziert die Menge der Probe und die daraus getroffene Auswahl einer sehr kleinen Menge für das Reaktionsgemisch führt dann zu einer Reduktion der nachweisbaren DNA um ein Hundert- bis Tausendfaches. Handelt es sich also um eine chronische Infektion, bei der zwar Erreger in vielen Geweben des Wirtes zu erwarten sind, so muss jedoch mit geringen Erregerzahlen gerechnet werden. Durch die Reduzierung der DNA-Menge kann es demnach zu einem Verlust der vorhandenen Borrelien-DNA kommen, die dann nicht mehr nachweisbar ist. Abschließend hat sich gezeigt, dass unterschiedliche Labore auch unterschiedliche Protokolle verwenden, Ergebnisse somit nicht immer einheitlich und auch nicht immer überprüfbar sind (SPARAGANO et al. 1999). Zusammenfassend zeigt sich, dass ein negatives Ergebnis ermittelt durch die PCR keinesfalls in der Lage ist, eine Borreliose sicher auszuschließen. Ein positives Ergebnis hingegen ist eindeutig beweisend für eine bestehende Infektion.

Weitere Möglichkeiten sind die direkte Darstellung des Erregers in der Dunkelfeldmikroskopie oder die indirekte mithilfe fluoreszierender Antikörper. Auch die Elektronenmikroskopie bietet die Möglichkeit, den Erreger zu charakterisieren. Der direkte Erregernachweis stellt einen Vorteil dar, da es sich um ein eindeutiges Ergebnis handelt. Allerdings ist der Einsatz von Mikroskopen, vor allem Elektronenmikroskopen, sehr begrenzt. Nicht immer besteht Zugriff zu diesen Geräten, die Anwendung ist sehr teuer und die Proben müssen ausgesprochen sorgfältig ausgewählt werden, damit ein Erregernachweis überhaupt möglich ist. Nach Anwendung der Elektronenmikroskopie in unserem Labor in Kooperation mit dem Veterinär-Anatomischen Institut, Abteilung Histologie, zeigte sich zudem, dass durch die Art des gewählten Verfahrens, so zum Beispiel die Anwendung des TEM, des Transmissionselektronenmikroskops, also die Darstellung mithilfe der Erzeugung eines Schnittbildes, eine eindeutige Charakterisierung des Erregers schwer fallen kann, da er sich nicht mehr in seinem typisch spiraligen Aussehen zeigt, sondern im Querschnitt als Kreis zu sehen ist.

2.4 Impfung

Seit einigen Jahren stehen Impfstoffe gegen den Erreger der Lyme-Borreliose zur Verfügung. Die erste auf dem Markt erhältliche Vakzine war ein für die Immunisierung von Hunden entwickelter Impfstoff, der aus ganzen, lysierten Borrelien bestand (LEVY et al. 1993b; WASMOEN et al. 1992). Im Anschluss daran kam es zur Einführung eines Humanimpfstoffes in den US-amerikanischen Markt, der sich durch die Verwendung eines rekombinanten Proteins auszeichnete (SIGAL et al. 1998; STEERE et al. 1998). Im Verlauf der Zeit wurden weitere

veterinärmedizinische Impfstoffe für die Anwendung am Hund sowohl für den amerikanischen als auch den europäischen Raum entwickelt, welche entweder aus rekombinanten Proteinen oder aus dem Lysat verschiedener Spezies hergestellt werden. Zum heutigen Zeitpunkt ist die humanmedizinische Vakzine nicht mehr erhältlich (HANSON et al. 2003), aber sechs Impfstoffe stehen weltweit für den Hund zur Verfügung: Vier stammen aus den USA, einer aus Deutschland, ein Impfstoff ist in Tschechien erhältlich.

Bei den Impfstoffen handelt es sich um:

- In Deutschland: **Merilym** der Firma Merial; bestehend aus einem französischen Stamm der Spezies *B. burgdorferi* s. s. mit Adjuvans
- In USA: **Galaxy Lyme** der Firma Schering Plough; bestehend aus zwei US-amerikanischen *B. burgdorferi* s. s. Stämmen mit Adjuvans
- LymeVax** der Firma Fort Dodge; bestehend aus einem US-amerikanischen *B. burgdorferi* s. s. Stamm mit Adjuvans
- RecombitekLyme** der Firma Merial; bestehend aus rekombinant hergestelltem OspA (*B. burgdorferi* s. s.) ohne Adjuvans
- ProLyme** der Firma Intervet; bestehend aus rekombinant hergestelltem OspA (*B. burgdorferi* s. s.) mit Adjuvans
- In Tschechien: **BiocanB** der Firma Bioveta; bestehend aus einem tschechischen *B. afzelii* und *B. garinii* Stamm mit Adjuvans

Es konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen OspA, welches in rekombinanten Impfstoffen enthalten ist, in der Lage sind, vor der Infektion mit Borrelien zu schützen (COUGHLIN et al. 1995). Bei zwei Studien in der Humanmedizin mit jeweils circa 10.000 Personen stellte sich heraus, dass die Grundimmunisierung mit dem rekombinanten Impfstoff bestehend aus zwei Immunisierungen im Abstand von einem Monat im ersten Jahr einen Schutz bei lediglich 68% beziehungsweise sogar nur 49% der Probanden hervorrief. Dieser Prozentsatz stieg im zweiten Jahr nach der Auffrischungsimpfung auf 92% beziehungsweise 76% an (SIGAL et al. 1998; STEERE et al. 1998). Das Ergebnis war der Auslöser für eine Studie mit 800 Probanden, in der bei der Hälfte der Teilnehmer eine dritte Immunisierung 6 Monate nach Erstimpfung durchgeführt wurde. Durch dieses Impfgime konnte der Schutz im ersten Jahr auf 91 – 93% gesteigert werden (VAN HOECKE et al. 1999).

Die beschriebenen Probanden reagierten auf den Impfstoff mit der Produktion von gegen OspA gerichteten Antikörpern. Bei Lysatimpfstoffen, wie sie in der Tiermedizin eingesetzt werden, kann das Spektrum allerdings noch weitere Antikörper umfassen (CHU et al. 1992; STRAUBINGER et al. 2001), da Borrelien in Kultur neben OspA auch andere Oberflächenmoleküle exprimieren. OspA wird von der Borrelie hauptsächlich im Mitteldarm der Zecke gebildet und für die

Wanderung zur Speicheldrüse herunterreguliert. Durch die Blutmahlzeit der Zecke kommt es zur Aufnahme der im Wirt nach Impfung gebildeten OspA-Antikörper, die sich an das OspA des noch im Mitteldarm befindlichen Spirochäten anlagern können. Dadurch verhindern sie zum einen die Haftung der Borrelien an die Darmwand, sodass die Penetration durch die Wand unterbunden wird, zum anderen wirken sie lysierend (PAL et al. 2000). Auf diesem Weg wird eine Erregerwanderung und somit eine Infektion des Wirtes verhindert. Allerdings müssen zum Zeitpunkt der Blutmahlzeit eine ausreichende Menge an durch die Impfung induzierten zirkulierenden Antikörpern im nicht infizierten Wirt vorhanden sein (BARTHOLD et al. 1996), um eine Translokation der Borrelien zu verhindern. Auf Grund des besonderen Impfmechanismus, der einen Erregerkontakt verhindert, da die Borrelie durch die OspA-Antikörper-vermittelte Blockade des OspA dieses nicht herunterregulieren kann, um in den Wirt zu wandern, kommt es nie zu einem natürlichen Auffrischen des Impfschutzes im Wirt. Es fehlt die Anregung des Immunsystems zur kontinuierlichen Bildung von Antikörpern. Zusätzlich unterliegt die Menge der nach Immunisierung entstandenen Antikörper dem natürlichen Prozess des Antikörperabbaus. Ein hoher, protektiver Antikörperspiegel ist demnach nur durch eine ausreichend häufige, iatrogene Antigenapplikation zu erreichen und von zentraler Bedeutung. Somit ist nicht nur die Frage nach der optimalen Antigenmenge zum Zeitpunkt der Grundimmunisierung bei diesem Impfmechanismus ausschlaggebend, sondern auch die Häufigkeit der Applikation und die jährliche Auffrischungsimpfung von besonderer Bedeutung.

Die Impfung ist zum jetzigen Zeitpunkt auf mehreren Ebenen als schwierig zu beurteilen, da der Impfschutz bereits durch leichte Proteinvariationen des OspA seitens der Borrelien durchbrochen werden kann (MARCONI et al. 1993). Zudem ist in Europa aufgrund der Borrelien-Artenvielfalt eine Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Spezies nötig, um einen umfassenden Schutz vor der Lyme-Borreliose zu erreichen. Bisherige Studien im europäischen Raum, die rekombinantes OspA als Impfantigen verwendeten, haben gezeigt, dass eine Kreuzreaktivität nur in sehr geringem Umfang existiert und rekombinantes OspA allein nicht ausreicht, um vor einer Infektion mit heterologen Spezies zu schützen (GERN et al. 1997). Ein weiteres Problem, welches sich im Zusammenhang mit der Impfung stellt, ist die durch Immunisierung erschwerte Diagnostik, da eine Unterscheidung zwischen einem geimpften und einem infizierten Tier im ELISA hergestellt aus Borrelienlysate nicht möglich ist. Bedient man sich hingegen eines ELISA ausschließlich beschichtet mit rekombinantes OspA, könnte eine Unterscheidung zwischen frisch infizierten Tieren, die keine OspA-Antikörper bilden, und geimpften Hunden mit OspA-Antikörpern ermöglicht werden. Dieses System ist jedoch nicht zuverlässig genug, da andere Wissenschaftler, die auf diesem Gebiet Untersuchungen durchgeführt haben, zeigten, dass bei chronischen Infektionen OspA-Antikörper auftreten können (LEVY et al. 1993a). Somit sind Fälle von geimpften Hunden mit einer Erkrankung, die eine Lyme-Borreliose differenzialdiagnostisch in

Erwägung zieht, nach wie vor serologisch nur schwer von ausschließlich geimpften Tieren zu unterscheiden und ist Fachleuten vorbehalten.

Aufgrund der schwierigen Beurteilung der Impfstoffe bieten derzeit nur eine tägliche Zeckenkontrolle und -entfernung sowie die Anwendung von Repellentien und Fipronil (UNGEMACH 2002) einen wirksamen Schutz vor der Infektion mit Borrelien. Über Fipronil kann ein dauerhaftes, über 24 Stunden anhaltendes Anheften von Zecken verhindert werden. Da Borrelien für eine Infektion des Wirtes zunächst vom Mitteldarm der Zecke in die Speicheldrüse wandern müssen und diese Wanderung 24 Stunden in Anspruch nimmt, kann durch Maßnahmen, die innerhalb dieses Zeitfensters nach Zeckenstich erfolgen, eine Übertragung von Borrelien aus der Zecke in den Wirt verhindert werden. Der Hund ist somit vor der Infektion mit *B. burgdorferi* s. l. geschützt.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Hunde

Bei den geimpften Hunden handelt es sich um gesunde, aus privaten oder öffentlichen Haushalten stammende Tiere, die überwiegend im familiären Bereich gehalten werden. Um diese Feldstudie durchführen zu können, wurde ein Tierversuchsantrag gestellt, der unter dem Aktenzeichen 64-9155.21/2 A 6/2001 vom Sächsischen Staatsministerium für Soziales, Gesundheit, Jugend und Familie in Dresden am 25.06.2001 genehmigt wurde. Insgesamt kamen 207 Hunde zur Untersuchung, von denen dann 108 Tiere in die Impfstudie aufgenommen wurden. Als Kriterium zur Aufnahme in die Studie galt ein negatives Ergebnis der Untersuchung auf *B. burgdorferi* s. l.-spezifische Antikörper mittels ELISA und Western Blot sowie die Zusage der Besitzer, ihre Hunde ein Jahr lang der Studie zur Verfügung zu stellen. Zu Beginn der Arbeit standen zwei kommerziell erhältliche Testsysteme der Firma Mikrogen zur Verfügung, später kam dann das hauseigene ELISA- und Western Blot System zum Einsatz. Zu den letztendlich ausgewählten Tieren zählten zwölf Hunde aus einer Hundezucht in Sausedlitz bei Bad Dübau, zehn Hunde der Polizeihundestaffel Leipzig, sieben Hunde der Polizeihundestaffel Dresden und neun Hunde der Pirnaer Polizeihundestaffel. Ein Hund des Forstamtes Leipzig sowie fünf weitere Hunde von Forstmitarbeitern nahmen an der Studie teil, weiterhin sieben Hunde der Rettungshundestaffel Naumburg sowie 20 Hunde von Studenten der veterinärmedizinischen Fakultät und 21 Hunde aus privaten Haushalten innerhalb der Leipziger und Dresdner Umgebung. Auch sechs Hunde der Klinik für Kleintiere der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig konnten für die Teilnahme an der Studie gewonnen werden, wobei ein Hund im Verlauf der Studie in einen privaten Haushalt abgegeben wurde. Des Weiteren wurden zehn Beagles, die aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig stammen, in die Studie aufgenommen.

Bis auf die zehn zu Beginn der Studie ein Jahr alte Beagles, die als Versuchshunde in den Stallungen des pharmakologisch-toxikologischen Instituts gehalten werden, und den sechs Labradoren der Kleintierklinik, zu Versuchsbeginn eineinhalb Jahre alt, waren alle weiteren in die Studie aufgenommenen Hunde verschiedener Abstammung, sowie verschiedenen Geschlechts und Alters. Es ergab sich eine Gruppe aus 49,1% männlichen und 50,9% weiblichen Tieren, von denen 32,7% kastriert waren. Bei den männlichen Tieren waren nur 20,8% kastriert. Der Geburtsmedian lag bei 1998, im Schnitt waren die Tiere also zu Beginn der Studie drei Jahre alt.

Alle Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in die unterschiedlichen Impfstoff- und Impfschemata-Gruppen eingeteilt. Bei der Gruppe der Beagles wurde jeder der zehn Hunde je mit einem Impfstoff und nach einem Impfschema geimpft. Sie wurden über den Zeitraum von zwei Jahren beobachtet

und bildeten somit eine kleine Kontrollgruppe für Analysen bezüglich des Einflusses der Auffrischungsimpfung auf das zweite Jahr nach Grundimmunisierung.

Über den Untersuchungszeitraum von 13 Monaten ging der Studie ein geringer Teil von Hunden verloren. Ein Hund starb an einem Tumor, ein weiterer, aus der Hundezucht Sausedlitz stammend, an einer Allgemeininfektion, die nicht im Zusammenhang mit der Impfung stand. Zwei Tiere wurden durch einen Umzug unerreikbaar. Die Hundezucht trennte sich innerhalb des Jahres der Untersuchung von drei Hunden, sodass sie nicht mehr für die regelmäßigen Blutentnahmen zur Verfügung standen. Demnach konnten die vollständigen Serumanalysen an 101 Hunden durchgeführt werden. Nach Beendigung der Studie waren alle untersuchten Hunde gesund; nur ein Hund litt an einer tumorösen Entartung, die circa zwei Monate nach der letzten Blutentnahme zum Tod des Tieres führte.

Tabelle 2: Übersicht über die Herkunft und Anzahl der Hunde

Herkunft	Vollst. Teilnahme an der Studie	Abbruch der Studie
Hundezucht Sausedlitz	8	4
Hunde der Polizeistaffel Leipzig, Dresden, Pirna	25	1
Forstamt Leipzig	5	1
Rettungshundestaffel Naumburg	6	1
Hunde aus privaten Haushalten, von Studenten	41	
Hunde der veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig	16	
Gesamtanzahl	101	7

3.2 Impfstoffe und Impfschema

Die Einteilung der Hunde erfolgte zunächst in eine der fünf Impfstoffgruppen, wobei jedem Hund nach dem Zufallsprinzip einer der zur Verfügung stehenden Impfstoffe, siehe Tabelle 3, zugewiesen wurde. Anschließend erfolgte eine weitere Unterteilung innerhalb dieser Impfstoffgruppen in Abhängigkeit des verwendeten Impfregimes (Tabelle 4).

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Impfstoffe und ihre Herkunft

Impfstoffe	Firma, Land	Bakterienspezies, Darreichungsform	Dosis	Verabreichung
Merilym	Merial, Deutschland	<i>B. burgdorferi</i> s. s. Lysat mit Adjuvans	1 ml	subkutan
LymeVax	Fort Dodge, USA	<i>B. burgdorferi</i> s. s. Lysat mit Adjuvans	1 ml	subkutan
Recombitek Lyme	Merial, USA	<i>B. burgdorferi</i> s. s. Rekombinantes OspA	1 ml	subkutan
ProLyme	Intervet, USA	<i>B. burgdorferi</i> s. s. Rekombinantes OspA mit Adjuvans	1 ml	subkutan
Biocan B	Bioveta, Tschechien	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> Lysat mit Adjuvans	1 ml	subkutan

Die Hunde, die die Studie innerhalb des Jahres verließen, sind hierbei in Klammern angegeben.

Tabelle 4: Übersicht über die Verteilung der Hunde auf die einzelnen Gruppen

Impfstoff	Merilym	LymeVax	ProLyme	Recombitek Lyme	Biocan
Gruppe A	10	11 (1)	10 (2)	10	10 (2)
Gruppe B	10 (1)	10	10 (1)	10	10

Gruppe A war gekennzeichnet durch eine zweimalige Immunisierung im Abstand von drei Wochen, gefolgt von einer Auffrischungsimpfung nach 376 +/- drei Tagen. Die Blutentnahmen begannen zunächst vor der ersten Immunisierung zum Zeitpunkt Tag 0. Anschließend folgte die nächste Blutentnahme mit dem Tag der zweiten Impfung sowie drei Wochen später und im weiteren Verlauf dann im monatlichen Abstand, um letztmalig einen Monat nach der Auffrischungsimpfung zu erfolgen. Gruppe B unterschied sich von Gruppe A durch drei Impfungen innerhalb der Grundimmunisierung, gefolgt von einer Auffrischungsimpfung nach 376 +/- drei Tagen. Dies ist auch in Abbildung 3 dargestellt.

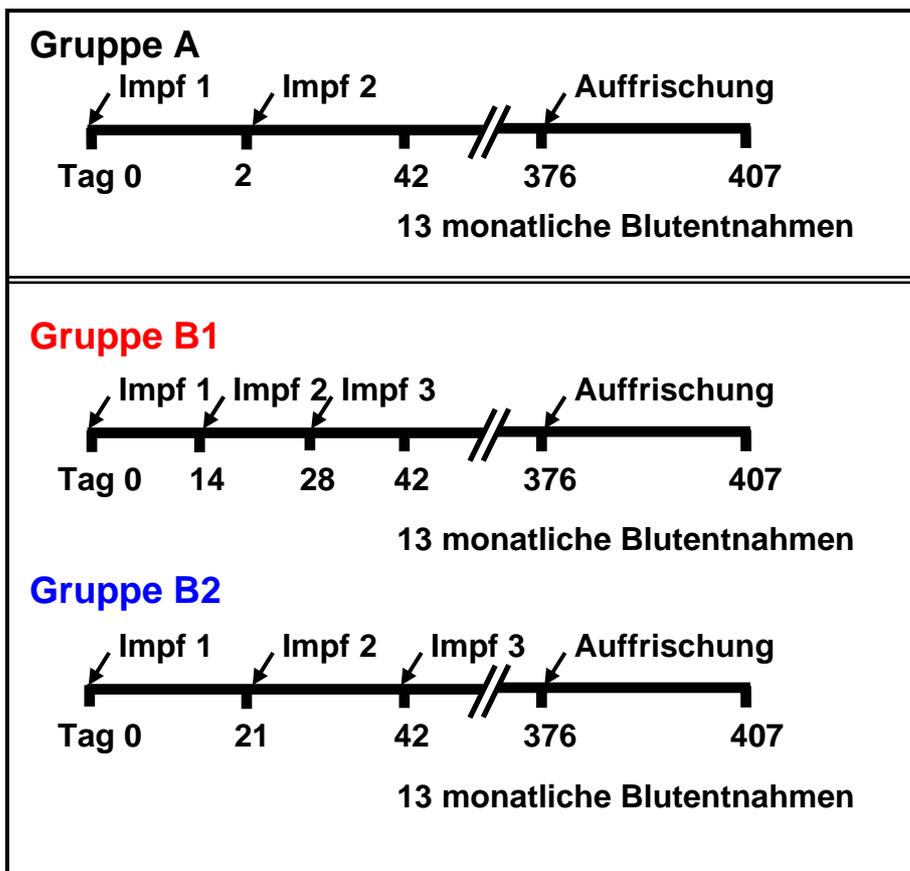


Abbildung 3

Darstellung der Zeiträume von Impfungen und Blutentnahmen bei den drei Versuchsgruppen

Hunde in Gruppe B wurden in Abhängigkeit des Impfabstandes in zwei Untergruppen unterteilt, wobei alle Tiere der Gruppe B1 die Impfungen im Abstand von zwei Wochen erhielten, Hunde der

Gruppe B2 mit einem Zeitintervall von drei Wochen. Auch hier erfolgten die ersten Blutentnahmen vor der ersten Impfung zur Bestimmung des Ausgangswertes. Anschließend wurde zum Zeitpunkt der zweiten und dritten Impfung Blut entnommen, im weiteren Verlauf dann im monatlichen Rhythmus bis einen Monat nach der Auffrischungsimpfung.

3.3 Injektions- und Blutentnahmetechniken

3.3.1 Impfung

Die Impfung erfolgte nach einer allgemeinen Untersuchung des Hundes entweder an der rechten oder linken seitlichen Bauchwand oder zwischen den Schulterblättern. An einer dieser drei Stellen wurde für die Injektion jeweils eine Hautfalte gebildet und der Impfstoff mit Hilfe von 2-ml Einmal-Spritzen und Kanülen Größe 24 G (0,55 mm Durchmesser) der Firma Terumo (Heiland Bestellnr. 710-2098 und Bestellnr. 370-695) subkutan verabreicht.

3.3.2 Blutentnahme

Für die Blutentnahme standen Monovetten-Serumröhrchen mit 9 ml Volumen und Terumo-Kanülen der Stärke 20 G (0,9 mm Durchmesser) zur Verfügung (Heiland Bestellnr. 371-385 und Bestellnr. 370-690). Die Punktion der Vene erfolgte nach gründlicher Desinfektion und gegebenenfalls vorheriger Schur des Bereiches an einer der drei aufgeführten Stellen:

Vena cephalica

Hierfür wurde entweder manuell oder mittels Stauschlauch oberhalb des Ellenbogens gestaut, anschließend erfolgte die Punktion der Vene. Nach der Blutentnahme wurde der Stau gelöst, um die Ausbildung eines Hämatoms zu verhindern, und die Stelle mit einem Tupfer gut abgedrückt, bis Nachblutungen nicht mehr erkennbar waren.

Vena saphena

Die Vene wurde entweder manuell oder mittels Stauschlauch oberhalb des Kniegelenkes gestaut. Nach Ertastung und Fixation der Vene mit dem Daumen sowie Stabilisation des Beines mit der linken Hand erfolgte die Punktion der Vene. Nach der Blutentnahme wurde wiederum der Stau gelöst und die Stelle mit einem Tupfer gut abgedrückt, bis Nachblutungen nicht mehr erkennbar waren.

Vena jugularis

Die Vene wurde mit dem linken Daumen in Höhe der Brustappertur gestaut, wobei der Halter den Hund rechts von sich im Sitzen fixierte. Der linke Arm des Halters umfasste die Schnauze des Hundes und drehte den Kopf des Tieres nach links oben, ohne dabei den Hals zu überstrecken. Der angewinkelte rechte Arm drückte währenddessen den Hundekörper an die eigene Körperseite und fixierte mit der rechten Hand die Brust des Hundes, wie in den Abbildungen 4.1 bis 4.2 ersichtlich.

Nach sicherer Ertastung der Vene wurde sie mit dem linken Zeigefinger fixiert und die Punktion konnte erfolgen, dargestellt in Abbildung 4.3. Hierbei wurde der Einstich in Richtung fixierendem Zeigefinger geführt. Nach der Blutentnahme wurde der Stau gelöst, die Stelle mit einem Tupfer gut abgedrückt, bis Nachblutungen nicht mehr erkennbar waren und die Fixation des Hundes gelöst.



Abbildungen 4.1

4.2

4.3

4.1: Vorbereitung für die Blutentnahme: Der Kopf des Hundes wird mit der linken Hand, der Rumpf mit dem rechten Arm fixiert

4.2: Stauung und Ertasten der Vene

4.3: Einstich und Blutentnahme

3.4 Serumgewinnung und –weiterverarbeitung

Die Serumgewinnung erfolgte, nachdem dem gewonnenen Blut für wenigstens 30 Minuten Zeit zur Koagulation gegeben wurde, wobei es sich in Abhängigkeit von der Entfernung des Ortes der Blutentnahme und dem zeitlichen Ablauf vor Ort um maximal acht Stunden bis zur Zentrifugation handelte. Das Blut wurde bei 15°C und $3500 \times g$ für 15 Minuten zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Hereaus), anschließend das Serum abpipettiert, in drei Portionen aufgeteilt, beschriftet und bei -25°C eingefroren. Für die sichere und luftdichte Aufbewahrung der Seren wurden 2-ml Apex Tubes (Reaktionsgefäße mit Gewinde) der Firma Alpha (Katalognr. CP5518) und mit einem Dichtungsring versehene Apex Screw Caps der gleichen Firma (Katalognr. CP5525) verwendet.

3.5 Seren, monoklonale Antikörper und rekombinantes OspA

Für alle Untersuchungen standen Seren verschiedener, experimentell infizierter oder behandelter Hunde zur Verfügung, die durch Dr. Straubinger an der Cornell University, Ithaka, New York, USA, gewonnen wurden. Dabei handelte es sich um Seren von mit Hilfe von Zecken experimentell

mit *B. burgdorferi* s. s. N40 infizierter Hunde und Seren von mit einer Mischung aus dem rOspA aller drei Spezies (Tripel-OspA) geimpfter Hunde.

Weiterhin konnten für die Analyse der hergestellten Antigenpräparationen monoklonale Antikörper von Prof. Dr. Markus Simon, Max Planck Institut, Freiburg verwendet werden. Dabei handelte es sich um ein Gemisch von monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenproteine von *B. burgdorferi* s. s. ZS7, im Einzelnen gegen OspC, OspA, p39 und p60.

Durch die Firma GlaxoSmithKline Biologicals, Belgien, wurde uns rekombinantes OspA, gewonnen aus den Spezies *B. burgdorferi* s. s. Stamm ZS7, *B. afzelii* Stamm ACA1 und *B. garinii* Stamm ZQ1, zur Verfügung gestellt. Dadurch war es uns möglich, die mit Borrelien-Lysat beschichteten ELISA-Platten zusätzlich mit reinem OspA zu beschichten, um eine vollständige Bindung der nach der Impfung gebildeten OspA-Antikörper zu erreichen. Außerdem war es möglich, ELISA-Platten ausschließlich beschichtet mit reinem rekombinanten OspA herzustellen.

3.6 Verwendete Bakterienspezies und -stämme für die *in-vitro* Untersuchungen

Für alle Analysen wurden die Borrelienspezies *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* und *B. garinii* verwendet. Die Bakterien wurden in ihrem Medium im Brutschrank bei 33°C und 5% O₂ bis zu einer Dichte von 10⁷ bis 10⁸ Borrelien/ml kultiviert und mit Glycerol (Sigma, Bestellnr. G 5150) zur Erreichung einer Endkonzentration von 15% je ml versetzt. In dieser Lösung konnten sie in Einzelvolumina à 100 oder 200 µl in 0,5-ml Eppendorf Gefäßen (Safe-Lock, Bestellnr. 0030121.023) bei -80°C eingefroren und so über Monate bis Jahre hinweg gehalten werden.

Bei den einzelnen Spezies handelt es sich um folgende Stämme:

B. burgdorferi s. s. Stamm N40

Von der Cornell University aus den USA stammend. Er stellt ein Reisolat aus einem durch Zeckenansatz experimentell infizierten Hund dar. Der Stamm gilt als virulent und liegt unserem Institut in verschiedenen Passagierungen vor. Für die Herstellung der Antigenpräparationen wurde der Stamm mit einer niedrigen Passagezahl (Passage zwei) gewählt, da durch geringe Passagen in Medium der Stamm in seinen Eigenschaften größtenteils unverändert ist.

B. afzelii Stamm PKo und *B. garinii* Stamm PBi

Beide stammen aus dem Max von Pettenkofer Institut in München und wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. Bettina Wilske zur Verfügung gestellt. Der Stamm PKo lag uns als Passage 32 vor, der Stamm PBi als Passage 16. Der *B. afzelii* Stamm PKo wurde von Frau Dr. Wilske als Referenzstamm für die Borreliendiagnostik in Europa vorgeschlagen (HAUSER et al. 1997).

3.7 Herstellung der Antigenpräparationen für die Verwendung in ELISA und Western Blot

3.7.1 Herstellung des Kultivierungsmediums für *B. burgdorferi* s. s.

Für die Anzucht von *B. burgdorferi* s. s. wird das Medium BSK II verwendet:

Tabelle 5.1 bis 5.3: Inhaltstoffe des BSK II Medium

Inhaltsstoff	Firma / Bestellnummer	Chargennummer	Menge
Destilliertes Wasser			900 ml
Bovines Serum Albumin	Sigma A 9056	070K09011	50,0 g
Neopepton	Difco 211681	0297001	5,0 g
HEPES	Sigma H 3784	119H5422	6,0 g
Natriumcitrat	Sigma S 4641	99H0075	0,7 g
Glucose	Sigma G 6152	121K0002	5,0 g
Natriumpyruvat	Sigma P 4562	092K15311	0,8 g
N-Azetyl-D-Glukosamine	Sigma A 3286	59H07146	0,4 g
Natriumbikarbonat	Sigma S 5761	85H1110	2,2 g
TC Yeastolate	Difco 255772	139850	2,6 g

Diese Bestandteile wurden drei Stunden bei Raumtemperatur gelöst, dann war hinzuzufügen:

Tabelle 5.2

CMRL Medium 1066 10 x	Gibco 21540-026	3079826	100 ml
Kaninchenserum	Sigma R 7136	21K8417	64 ml
Kanamycin 80 µl/100 ml	Sigma K 0129	52K2322	932 µl

Das Kaninchenserum wurde zuvor bei 56°C für 45 Minuten hitzeinaktiviert.

Die Lösung wurde auf pH = 7,4 eingestellt und durch 0,65 µm (Watman No5, Bestellnr. 1820047), 0,45 µm (Nalgene, Bestellnr. 296-4545) und 0,2 µm Filter (Nalgene, Bestellnr. 296-4520) filtriert.

Unter sterilen Bedingungen wurden im Anschluss daran noch zugefügt:

Tabelle 5.3

Gelatine	Sigma G 9391	112K1369	14,4 g in 100 ml H ₂ O
----------	--------------	----------	--------------------------------------

Die Gelatine war zuvor bei 121°C, 3 bar für 20 Minuten autoklaviert worden.

Mit dem vorliegenden Protokoll erhält man 1164 ml Medium.

3.7.2 Herstellung des Kultivierungsmediums für *B. afzelii* und *B. garinii*

Für die Anzucht der beiden Spezies bedarf es des Borrelia MKP Mediums, wobei uns das Protokoll freundlicherweise von Frau Dr. Wilske zur Verfügung gestellt wurde:

Tabelle 6.1 bis 6.2: Inhaltsstoffe des Borrelia MKP Medium

Inhaltsstoff	Firma / Bestellnummer	Chargennummer	Menge
CMRL Medium 1066 10 x	Gibco 21540-026	3079826	100 ml
Destilliertes Wasser			900 ml
Neopepton	Difco 211681	0297001	3,0 g
HEPES	Sigma H 3784	119H5422	6,0 g
Natriumcitrat	Sigma S 4641	99H0075	0,7 g
Glucose	Sigma G 6152	121K0002	3,0 g
Natriumpyruvat	Sigma P 4562	092K15311	0,8 g
N-Azetyl-D-Glukosamine	Sigma A 3286	59H07146	0,4 g
Natriumbikarbonat	Sigma S 5761	85H1110	2,0 g

Die Bestandteile ließ man über drei Stunden gut lösen, um die Lösung anschließend auf pH = 7,6 einzustellen und steril durch 0,65 µm, 0,45 µm und 0,2 µm Filter zu filtern.

Tabelle 6.2

Gelatine	Merck 4070	VM 010670 249	100 ml 7%ig
Kaninchenserum	Sigma R 7136	21K8417	64 ml
Bov. Serumalbumin 35%ig	Sigma A 7409	031K8932	35 ml

Die Gelatine wurde bei 121°C und 3 bar für 20 Minuten autoklaviert, das Kaninchenserum bei 56°C während 45 Minuten hitzeinaktiviert und dann gemeinsam mit dem Rinderalbumin steril der Lösung zugegeben.

Mit diesem Protokoll erhält man 1305 ml Medium.

3.7.3 Anzucht und Weiterverarbeitung der Borrelien

Für die Vermehrung von Borrelien zur Herstellung einer Antigenpräparation wurde zunächst ein Einzelvolumen (200 µl) in 6 ml Medium gegeben und innerhalb von vier bis sechs Tagen bei 33°C und 5% O₂ auf eine Dichte von 10⁷ bis 10⁸ Borrelien/ml gebracht. Die sich in der Log-Phase befindlichen Bakterien wurden anschließend in ihrem Medium einem Liter desselben zugegeben und wiederum kultiviert. Ab dem Tag Sieben der Kultivierung erfolgte eine tägliche adspektorische Kontrolle der Kultur, wobei Farbe und Flockenbildung beurteilt wurden. Eine Farbveränderung nach Gelb sowie eine dichte Flockenbildung, die nicht mit einer Trübung des Mediums einherging, waren ausschlaggebende Zeichen für ein gutes Wachstum der Bakterien mit dem Eintritt in die

stationäre Phase. Nach neun bis 15 Tagen mit deutlichen Entwicklungen der eben erwähnten Kriterien erfolgte die Verarbeitung der Borrelien zu einer Antigenpräparation.

Ein Liter Medium wurde auf sechs sterile verschließbare 80-ml Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge Zentrifugenröhrchen, Nalgene, Bestellnr. 3115) aufgeteilt und wie folgt verarbeitet:

6 × 80 ml Medium: Zentrifugation (Multifuge 3 S-R, Hereaus) für 15 min bei 10.000 × g und 20°C

Die Überstände wurden vorsichtig abgegossen und in Alkohol aufgefangen, das Medium auf das gebildete Pellet gegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis das Medium vollständig zentrifugiert war.

Mit 40 ml sterilem PBS wurden die Pellets von jeweils zwei Röhrchen aufgenommen und in eines überführt. Zwei Röhrchen wurden mit jeweils 40 ml sterilem PBS gespült und nicht zusammen geführt, sodass vier Röhrchen verblieben. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

4 × 40 ml steriles PBS mit darin gelöstem Pellet: Zentrifugation für 15 min bei 10.000 × g und 4°C

Die Überstände wurden wiederum vorsichtig abgegossen und in Alkohol aufgefangen. Mit 40 ml sterilem PBS wurden die Pellets jeweils zweier Röhrchen aufgenommen und in eines überführt, sodass zwei Röhrchen verblieben.

2 × 40 ml steriles PBS mit darin gelöstem Pellet: Zentrifugation für 15 min bei 10.000 × g und 4°C

Die Überstände wurden erneut vorsichtig abgegossen und in Alkohol aufgefangen. Jedes Röhrchen wurde dann mit 40 ml sterilem PBS gespült und erneut zentrifugiert.

2 × 40 ml steriles PBS mit darin gelöstem Pellet: Zentrifugation für 15 min bei 10.000 × g und 4°C

Nach der letzten Zentrifugation wurden die Überstände vorsichtig abgegossen, die beiden Pellets mit insgesamt 5 ml sterilem PBS aufgenommen und in einem Röhrchen (15-ml Blue Caps Greiner, Bestellnr. 188271) auf Eis gelagert. Der Aufschluss der Borrelien erfolgte mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus UW2070, Berlin) für 10 – 15 Sekunden bei 35 Watt, wobei das Röhrchen mit 5 ml sterilem PBS und den Borrelien während der ganzen Zeit auf Eis zu halten war. Das Prozedere wurde so oft wiederholt, bis keine sichtbar intakten Borrelien mehr nachweisbar waren. Die Kontrolle erfolgte im Dunkelfeldmikroskop (Axiolab, Zeiss, Jena).

Anschließend konnte die Suspension aus Bakterienlysat weiterverarbeitet werden. Es erfolgte eine Aufteilung der Suspension auf fünf 1,5-ml Eppendorf Gefäße (Safe-Lock, Bestellnr. 0030120.086) und eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 × g für 4°C (Eppendorf Tischzentrifuge 5417C, Eppendorf), wonach der entstandene Überstand wiederum in sterile 1,5-ml Eppendorf Gefäße aufgefangen und bei -80°C bis zur Weiterverwendung gelagert wurde. Das entstandene Pellet wurde verworfen.

3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration der gewonnenen Bakteriensuspension

3.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des BCA Protein Assay Kits der Firma Pierce (Rockford, Illinois, USA)

Der Kit arbeitet mit Bicinchoninischer Säure (BCA) sowie der Biuret Reaktion (kupfervermittelt) und ist geeignet für die kolorimetrische Bestimmung und Quantifizierung von Gesamtprotein. Die Messung erfolgte bei 562 nm, wenn der wasserlösliche Komplex aus BCA und Kupfer eine hohe Absorption zeigte, die linear mit der steigenden Proteinkonzentration verlief. Als Standard wurde Bovines Serum Albumin (BSA) in einer Verdünnungsreihe ausgehend von 2,0 mg BSA in der Stammlösung verwendet. Für die genaue Durchführung wird auf das Protokoll für den BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce verwiesen.

3.8.2 Bestimmung der einzelnen Proteinfractionen in Coomassie- oder silbergefärbten Polyacrylamidgelen

Für den Nachweis der einzelnen Proteinfractionen in den Antigenpräparationen von *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* wurden SDS-Polyacrylamidgele in einer Größe von 6 × 10 cm verwendet, die nach dem gleichen Rezept wie auch für den Western Blot hergestellt wurden. Um eine Aussage über die Vergleichbarkeit der gewonnenen *B. burgdorferi* s. s. Antigenpräparation treffen zu können, wurde in einem separaten Gel eine Probe einer in der Cornell University Ithaka, New York, USA gewonnen Antigenpräparation zusammen mit dem am Institut für Immunologie hergestellten Lysat in verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen. Alle Antigene wurde in einer Konzentration von 15 µg je 5-mm-Tasche eingesetzt.

Nach der Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld für 45 Minuten bei 200 Volt erfolgte die Anfärbung der einzelnen Fraktionen.

3.8.2.1 Anfärbung mit Coomassie Blau Färbelösung

Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll aus dem Buch „Molecular Cloning 3“ von Sambrook und Maniatis, Kapitel 18.55 (SAMBROOK et al. 1989) und wurde wie folgt durchgeführt:

Herstellung der Färbelösung aus	Coomassie brilliant blue R250	0,25 g
	Methanol:Wasser Gemisch 1:1	90,0 ml
	Geeiste Essigsäure	10,0 ml

Die Mischung wurde einige Zeit gerührt, um eine Lösung des Farbstoffes zu ermöglichen und anschließend durch einen 0,2 µm Filter (Nalgene) filtriert, um Fremdpartikel zu entfernen. In der fünffachen Menge des Gelvolumens wurde das Gel über sechs Stunden auf einer rotierenden Platte bei Raumtemperatur gehalten, um ein gutes Anfärben der Proteinbanden zu erreichen. Nach dem Färbevorgang folgte eine Entfärbung bei gleichen Bedingungen über 12 bis 18 Stunden, wobei die

Entfärbelösung der Färbelösung ohne Coomassie brilliant blue R250 entspricht. Ein Wechsel der Entfärbelösung erfolgte wenigstens vier, maximal sechs Mal.

Anschließend wurde das entfärbte Gel kurz in Wasser gewaschen und mithilfe eines Scanners (Hewlett Packard) bildlich festgehalten.

3.8.2.2 Anfärbung mit dem Silver Stain Kit der Firma Invitrogen

Der Kit enthält fertige Lösungen, um in Polyacrylamidgelen enthaltenes Protein mit Silberionen anzufärben, wobei die Reduktion von Silberionen zu metallischem Silber auf Proteinbanden die Grundlage der Reaktion ist. Zunächst wurden die Proteine mit der Fixierlösung im Gel fixiert, über den Einsatz einer sensitivitätssteigernden Lösung die Qualität der nachweisbaren Banden verbessert und nach einem Waschschrift die Färbelösung hinzugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Silberionen mit der Entwicklerlösung zu metallischem Silber reduziert und nach Zugabe der Stopplösung konnte das gefärbte Gel gewaschen und eingescannt werden.

Für nähere Informationen wird auf das Protokoll des SilverQuest™ Silver Staining Kit der Firma Invitrogen verwiesen.

3.9 Serologische Methoden

3.9.1 Verwendete Puffer, Lösungen und Reagenzien

3.9.1.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien für verschiedene Anwendungen

Tabelle 7: PBS 10-fach konzentriert (PBS 10 ×)

KH ₂ PO ₄		3,54 g
Na ₂ HPO ₄		14,80 g
NaCl		85,00 g
Aqua dest.	qs.	1000,00 ml

In der einfachen Arbeitslösung (PBS) wurde ein Teil des PBS 10 × mit neun Teilen destilliertem Wasser gemischt.

Für PBS-Tween (PBST) wurde dem einfachen PBS 0,05% Tween 20 zugegeben.

3.9.1.2 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Herstellung des ELISA

Tabelle 8: 1 M Natriumkarbonat Stammlösung (Na_2CO_3)

Na_2CO_3		53 g
Aqua dest.	qs.	500 ml

Tabelle 9: 1 M Natriumbikarbonat Stammlösung (NaHCO_3)

NaHCO_3		84 g
Aqua dest.	qs.	1000 ml

Tabelle 10: 0,1 M Karbonatpuffer Arbeitslösung (CO_3)

1 M Na_2CO_3		71,3 ml
1 M NaHCO_3		28,0 ml
Aqua dest.		800,0 ml
pH Wert mit NaOH und HCl auf pH = 9,6 einstellen		
Aqua dest.	qs.	1000,0 ml

Tabelle 11: CO_3 /ME/SDS (Antigen auflösende Reagenz)

CO_3	25 ml	
β -Mercaptoethanol	500 μl	
10% SDS	125 μl	Rezept siehe Western Blot

Diese Lösung musste lichtgeschützt und unter Vakuum aufbewahrt werden.

3.9.1.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien für die Durchführung des ELISA

Tabelle 12: PBST mit 2% Milch

Magermilchpulver		2 g
PBST	qs.	100 ml

Bei dem Konjugat handelte es sich um HRP-konjugiertes Ziege-anti-Hund IgG (Cappel Goat anti-dog IgG HRP, ICL, Bestellnr. 855332) mit einem Proteingehalt von 25 mg/ml, der Substratumsatz erfolgte mit dem TMB Peroxidase Substrat System (TMB 2-C Microwell Substrate, KPL, Bestellnr. 50-76-00).

3.9.2 ELISA

3.9.2.1 Herstellung der ELISA-Platten

Für die Untersuchung der Serumproben wurden ELISA-Platten nach einem Protokoll der Cornell University, Ithaca, New York, USA mit hauseigenem Antigen beschichtet. Dazu wurde eine Lösung aus Karbonatpuffer (CO_3), $\text{CO}_3/\text{ME}/\text{SDS}$, Borrelien-Antigenen in einer Konzentration von $0,34 \mu\text{g}$ pro Kavität und rekombinantes OspA (bereitgestellt durch die Firma GlaxoSmithKline Biologicals) in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}$ pro Kavität zubereitet. Drei Viertel aller Kavitäten (C96 Maxisorb, Nunc, Bestellnr. 430341) erhielt $100 \mu\text{l}$ der Antigenlösung, ein Viertel aller Kavitäten wurde lediglich mit $100 \mu\text{l}$ CO_3 beschichtet und diente als Nullwert. Bei der Verwendung von ELISA-Platten beschichtet mit reinem rekombinantes OspA war dieses zuvor in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}$ in $100 \mu\text{l}$ CO_3 pro Kavität nach dem gleichen Prinzip wie bei dem Lysat-ELISA aufgebracht worden. Beschichtete Platten wurden bei 4°C über Nacht aufbewahrt und anschließend bei -25°C luftdicht verschlossen bis zur Verwendung eingefroren. Auf diese Weise beschichtete Platten verblieben maximal zwei Monate bei -25°C , um eine Veränderung der Beschichtung aufgrund einer Verdunstung durch die Lagerung zu minimieren.

3.9.2.2 Durchführung des ELISA

Die benötigte Anzahl von Platten taute bei 37°C auf und wurde im ELISA-Washer (Ultrawash Plus IUWA1756, DYNEX) viermal mit PBST gewaschen, wobei die Platten im letzten Waschschrift feucht blieben. Die in PBST mit 2% Milch 1:100 verdünnten Serumproben wurden nach sauberem Ausklopfen der Platte in der Art aufgetragen, dass jede Probe zwei Kavitäten mit Antigenen und eine Kavität ohne Antigene belegte. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C erfolgte ein weiterer viermaliger Waschschrift mit PBST, dem sich das Auftragen des Konjugats 1:4000 verdünnt in PBST mit 2% Milch anschloss. Nach weiteren 30 Minuten und viermaligem Waschen mit PBST konnte nach Zugabe von $100 \mu\text{l}$ TMB pro Vertiefung, welches erst kurz vor dem Auftragen in einem Verhältnis von 1:1 vermischt wurde, eine Auswertung der Extinktion im ELISA-Reader (SpectraMAX340PC, Molekular Devices) bei 650 nm erfolgen. Hierbei handelte es sich um eine kinetische Bewertung der Farbentwicklung, es wurde drei Mal im Abstand von 45 Sekunden eine Extinktion erfasst und die Steigung der Farbintensität über die Zeit berechnet. Um eine Vergleichbarkeit der in unserem Hause gewonnenen Ergebnisse mit gültigen Einheiten, wie sie zum Beispiel auch an der Cornell University in den USA eingesetzt werden, zu erreichen, wurden die Werte umgerechnet. Zunächst wurde auf jede Platte das Serum eines experimentell infizierten Hundes mit hohem Titer, mit niedrigem Titer, eines mit rOspA geimpften Hundes und eines SPF-Hundes, negativ für Borreliantikörper, aufgebracht. Zu all diesen Seren lag ein standardisierter Wert vor. Auf diese Weise konnten über die Werte dieser Serumproben Korrelationen berechnet werden. Dazu wurde der bei uns je Platte erhaltene Wert mit dem vorliegenden standardisierten

Wert ins Verhältnis gesetzt und aus dem so gewonnenen Verhältnis eine Gerade berechnet. Mit der für die Regression erhaltenen Formel wurden die Werte der von uns zu untersuchenden Serumproben umgerechnet und auf diesem Weg die Ergebnisse standardisiert und vergleichbar.

3.9.3 Western Blot

3.9.3.1 Puffer und Lösungen für den Western Blot

Tabelle 13: 1,5 M Tris-CL, pH = 8,8 Stammlösung

Tris Base		181,5 g
Aqua dest.	qs.	800,0 ml
pH mit 6 N und 1 N HCl auf pH = 8,8 einstellen		
Aqua dest.	qs.	1000,0 ml

Diese Lösung wurde im Anschluss mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert.

Tabelle 14: 0,5 M Tris-Cl, pH = 6,8 Stammlösung

Tris Base		60 g
Aqua dest.	qs.	800 ml
pH mit 6N und 1N HCl auf pH = 6,8 einstellen		
Aqua dest.	qs.	1000 ml

Diese Lösung wurde im Anschluss mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert.

Tabelle 15: 0,5% Bromphenol-Blau Stammlösung

Bromphenol Blau		0,5 g
Aqua dest.	qs.	100,0 ml

Diese Lösung wurde im Anschluss mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert und vor Licht geschützt aufbewahrt.

Tabelle 16: 2 × Probenpuffer (ohne Glyzerol) Stammlösung

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

Diese Lösung wurde mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert und vor Licht geschützt aufbewahrt. 2 × bedeutet, dass der Puffer vor Gebrauch zu gleichen Teilen mit 10% SDS vermischt werden musste.

Tabelle 17: 0,1% SDS Überschichtungspuffer Stammlösung

Natriumdodecyl-Sulfat		0,4 g
Aqua dest.	qs.	400,0 ml

Tabelle 18: 10% Ammonium Persulfat Arbeitslösung

Ammonium Persulfat		0,10 g
Aqua dest.		0,95 ml

Tabelle 19: 10% SDS Arbeitslösung

Natriumdodecyl-Sulfat		0,30 g
Aqua dest.		2,85 ml

Tabelle 20: Überschichtungspuffer

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

Für die Herstellung 11,5 × 14 cm großer Gele, wie sie für Western Blot verwendet wurden, waren die angegebenen Mengen zu verdoppeln.

Tabelle 21: Waschpuffer

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

Für die Herstellung 11,5 × 14 cm großer Gele, wie sie für Western Blot verwendet wurden, waren die angegebenen Mengen zu verdoppeln.

Tabelle 22: Laufpuffer

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

Tabelle 23: Transferpuffer

Glyzin		57,6 g
Tris Base		12,08 g
Methanol		800,0 ml
Aqua dest.		3,2 l

Tabelle 24: Tris gepufferte Salzlösung, TBS pH = 7,5

Tris Base		4,84 g
NaCl		58,44 g
Aqua dest.	qs.	2,00 l

Diese Lösung wurde mit HCl auf pH = 7,5 eingestellt.

Tabelle 25: Tris gepufferte Salzlösung, TBS pH = 10

Tris Base		2,42 g
NaCl		17,00 g
Aqua dest.	qs.	2,00 l

Für die Herstellung von TBS-Tween (TBST), wurde der Lösung (entweder TBS pH = 7,5 oder TBS pH = 10) 0,05% Tween 20 zugegeben.

Tabelle 26: 1% Merthiolat Stammlösung

Thimerosal = Merthiolat		1 g
Aqua dest.	qs.	100 ml

Tabelle 27: 3% Gelatine in TBST pH = 7,5

Tris Base		1,21 g
NaCl		4,25 g
Aqua dest.	qs.	450,00 ml
mit HCl auf pH = 7,5 einstellen		
Aqua dest.	qs.	500,00 ml
Gelatine		15,00 g
bei 37°C gelöst		
Tween 20		250 µl
1% Merthiolat		5,00 ml

Bei der Gelatine handelte es sich um bovine Gelatine (Sigma, Bestellnr. G 9391).

Tabelle 28: 1% Gelatine in TBST pH = 7,5

Tris Base		1,21 g
NaCl		14,61 g
Aqua dest.	qs.	450,00 ml
mit HCl auf pH = 7,5 einstellen		
Aqua dest.	qs.	500,00 ml
Gelatine		5,00 g
bei 37°C lösen lassen		
Tween 20		250 µl
1% Merthiolat		5,00 ml

Tabelle 29: Auflösungsgel, 12%ig

Aqua dest.		5,00 ml
Acrylamid-Bisacrylamid		6,00 ml
1,5 M Tris-Cl, pH = 8,8		3,73 ml
10% SDS		0,15 ml
die Lösung für zehn Minuten entgasen, dann Zugabe von		
10% APS		20 µl
TEMED		8 µl

Für die Herstellung 11,5 × 14 cm großer Gele, wie sie für Western Blot verwendet wurden, waren die angegebenen Mengen zu verdoppeln.

Tabelle 30: Sammelgel, 5%ig

Aqua dest.		3,03 ml
Acrylamid-Bisacrylamid		625 µl
0,5 M Tris-Cl, pH = 6,8		1,25 ml
10% SDS		50 µl
die Lösung für zehn Minuten entgasen, dann Zugabe von		
10% APS		30 µl
TEMED		8 µl

Für die Herstellung 11,5 × 14 cm großer Gele, wie sie für Western Blot verwendet wurden, waren die angegebenen Mengen zu verdoppeln.

Als Konjugat wurde, wie auch im ELISA, der HRP-konjugierte Ziege-anti-Hund IgG-Antikörper verwendet, beim Einsatz der monoklonalen Antikörper hingegen der HRP-konjugierte Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper (Goat anti-mouse IgG HRP, R&D, Bestellnr. HAF007; die Verdünnung

1:1000, wie sie im Western Blot eingesetzt wurde, bezog sich auf die vom Hersteller vorgegebene Ausgangskonzentration).

3.9.3.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Je zwei Gele wurden pro Ansatz angefertigt. Die dafür benötigten Lösungen wurden in entsprechender Menge hergestellt und zwischen zwei Glasplatten bis zu einer Höhe von 6 cm (kleines Gel, 10 cm breit) oder auf eine Höhe von 11,5 cm (großes Gel, 14 cm breit) gegossen. Nach der Überschichtung mit 1%iger SDS-Lösung und einer einstündigen Polymerisierungsphase folgte nach Auftragen des Überschichtungs- und anschließend des Waschpuffers das Gießen der Sammelgele, in die je Gel ein Kamm eingesetzt wurde. Nach einer weiteren Stunde der Polymerisierung konnten die Kämmen entfernt, die Vertiefungen zunächst mit Laufpuffer überschichtet und dann je nach Experiment neben den Proteinmarkern für die Größenbestimmung (Precision Protein Standards, gefärbt, Biorad, Bestellnr. 161-0372 und Biotinylated SDS-PAGE Standard broad range, ungefärbt, Biorad, Bestellnr. 161-0319) die Antigene bei großen Gelen in einer Konzentration von 300 µg je Gel aufgeteilt auf zwei Taschen von 50 mm Länge, bei kleinen Gelen in einer Konzentration von 15 µg je Tasche von 5 mm Länge aufgetragen werden. Der gefärbte Marker wurde bei kleinen Gelen mit 13 µg eingesetzt, bei großen Gelen mit 19,5 µg. Vom ungefärbten, biotinylierten Marker wurde bei kleinen Gelen 2 µg gemischt mit 12 µl Ladepuffer, bei großen Gelen die doppelte Menge des Markers und des Ladepuffers gemischt und eingesetzt.

Die Antigengemische wurden vor dem Auftragen für zwei Minuten in kochendem Wasser erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt, der biotinylierte Marker fünf Minuten bei 95°C gehalten und anschließend ebenfalls auf Raumtemperatur gebracht.

Bei 200 Volt erfolgte die Auftrennung der Proteinfractionen im Laufpuffer, bei kleinen Gelen für 45 Minuten, bei großen für 3,5 Stunden.

3.9.3.3 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die großen Gele in Transferpuffer gewaschen und mit einer auf 15 × 15 cm zurechtgeschnittenen Nitrozellulosemembran (CN-Membran, 3 mm, 45 µm, membraPure, Bestellnr. 305-0005) zusammengelegt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte im Transferpuffer über Nacht bei 30 Volt. Dann wurden beide beschichteten Membranen entnommen und weiter verarbeitet.

3.9.3.4 Western Blot Durchführung

Nach einem Waschschrift in TBST pH = 10 wurde die Membran für 30 Minuten in 3%iger Gelatine geblockt, anschließend wiederum gewaschen und dann in eine Kammer (Miniblotter, Immunetics, Bestellnr. MN25) eingespannt, die mit 25 Kanälen versehen war. Durch die Lagerung der Membran innerhalb dieser Kammer konnten Seren in die Kanäle gegeben werden, ohne dass

sie auslaufen. Somit war eine Analyse einzelner Seren ohne die Zerschneidung der Membran möglich. Die Seren wurden mit 1%iger Gelatine-Lösung 1:10 verdünnt und dann je Kanal ein Serum aufgetragen, wobei die Bereiche der Größenmarker auf der Membran ausgespart und nur mit 1%iger Gelatine-Lösung vor Austrocknung geschützt wurden. In der Kammer inkubierten die Seren für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttelinkubator. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine dreimalige Spülung der einzelnen Kanäle mit TBST pH = 10 und ein weiterer zehnminütiger Waschschrift in TBST pH = 10.

Eine weitere Stunde der Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Konjugat 1:1000 und 18 µl Avidin-Meerrettich Peroxidase Konjugat (Avidin-Horseradish peroxidase conjugate, Biorad, Bestellnr. 170-6528) in TBST pH = 7,5 verdünnt schloss sich an, gefolgt von drei Waschschriften, zunächst einmal mit TBST pH = 10, dann zweimal mit TBS pH = 7,5. Darauf hin konnte der Substratumsatz mit Opti-4-CN (Sigma, Bestellnr. C 6788), gelöst in Methanol (AppliChem, Bestellnr. A 0688) und mit H₂O₂ (Roth, Bestellnr. 9681.1) versetzt in TBS pH = 7,5 erfolgen. Die Membran inkubierte acht bis zwölf Minuten bei Raumtemperatur im Substrat, die Reaktion wurde mittels Waschen in destilliertem Wasser gestoppt. Durch Einscannen der Membran erfolgte die Dokumentation.

3.9.4 Untersuchung von Seren mittels ELISA und Western Blot der Firma Mikrogen

Da zu Beginn der Studie keine Antigenpräparationen zur Verfügung standen, wurden die ersten Hunde zunächst mit kommerziellen Testsystemen der Firma Mikrogen München untersucht. Die Testsysteme arbeiten mit rekombinant hergestellten Proteinen, die im Falle des ELISA als Mischung in jede Kavität eingebracht, im Falle des Western Blot auf die Nitrozellulosemembran aufgesprüht werden. Es wird eine Kombination verschiedener spezifischer Antigene der drei Erregerspezies verwendet, um ein möglichst breites Spektrum infizierter Tiere zu erfassen. Der Test ist für den Einsatz in der Veterinärmedizin bestimmt und zunächst für die Untersuchung von Hundeseren gedacht.

3.9.4.1 ELISA der Firma Mikrogen

Mithilfe des *recomWell Borrelia IgG* oder *IgM Canis Kits* der Firma Mikrogen ist es möglich, Hundeseren auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* s. l. hin zu untersuchen. Im ELISA werden die Proteine OspC, p41, p100 und p18 für die Beschichtung verwendet. Im Kit waren neben der Mikrotiterplatte, dem Wasch- und Verdünnungspuffer, dem Anti-Hund IgG (oder IgM) Konjugat, dem gebrauchsfertigen TMB (Einkomponentensystem) und der Stopplösung auch eine Grenzwert-Kontrolle sowie eine negative Kontrolle enthalten.

Nach der Verdünnung der Proben, der Grenzwert- und negativen Kontrolle im Verhältnis 1:100 konnten die Proben direkt ohne vorherigen Waschschrift auf die Platte aufgebracht und eine Stunde

bei 37°C inkubieren. Nach dieser Zeit folgte ein viermaliger Waschschrift mit anschließender Konjugatzugabe und 30-minütiger Inkubation bei 37°C. Nach einem weiteren Waschgang wurde das Substrat zugegeben, eine Abstopfung der Reaktion mittels der Stoppreagenz erfolgte 30 Minuten nach Substratzugabe. Im Anschluss konnte die Platte bei 450 und 650 nm im ELISA-Reader ausgewertet werden.

Um nun eine Bestimmung des Ergebnisses vornehmen zu können, wurde der Wert der Grenzwert-Kontrolle als unterer Grenzwert gewählt, der Grenzwert multipliziert mit 1,2 als oberer Grenzwert. Alle Proben mit einem Wert oberhalb der oberen Grenze wurden positiv beurteilt, alle Werte unterhalb der unteren Grenze negativ. Werte innerhalb dieser beiden Grenzen galten als fragliche Proben und mussten zusätzlich im Western Blot untersucht werden. Für eine sichere Aussage des Status der zu vakzinierenden Hunde wurden bei dieser Studie alle Proben, sowohl die mit negativem, als auch fraglichem und positivem Ergebnis im Western Blot untersucht.

3.9.4.2 Western Blot der Firma Mikrogen

Der *recomBlot* *Borrelia* IgG oder IgM *Canis* Kit ermöglicht eine Western Blot Analyse von Hundeseren, um genaue Aussagen über die vorhandenen *B. burgdorferi* Antikörper im Hund machen zu können. Die einzelnen Teststreifen sind mit den Proteinen OspA, OspC, p100, p39, p18 sowie p41 und dem p41/interner Teil beschichtet. Im Kit enthalten sind nummerierte Teststreifen, Wasch-/Verdünnungspuffer, Anti-Hund-IgG (oder IgM) Konjugat, TMB, Inkubationsschalen und ein entwickelter Kontrollstreifen für die Auswertung.

Nach der Herstellung aller benötigter Lösungen wurde Waschpuffer in die Inkubationsschalen gegeben und 8 µl Serum in jeweils eine Vertiefung pipettiert. Nach kurzem Schütteln zur Homogenisierung der Probe im Waschpuffer erfolgte die Zugabe des Teststreifens und eine zweistündige Inkubation auf einer rotierenden Plattform bei Raumtemperatur. Nach vorsichtigem Absaugen der Flüssigkeit in den Vertiefungen, ohne es dabei zu Kreuzkontaminationen kommen zu lassen oder den Teststreifen zu beschädigen, wurden die Streifen in der Schale viermal gewaschen, anschließend die vorbereitete Konjugatlösung in jeden Kanal pipettiert und abermals bei Raumtemperatur auf einer rotierenden Plattform, diesmal für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift fügte man die Substratlösung zu und ließ die Streifen bis zur gewünschten Intensität in fünf bis 15 Minuten entwickeln. Nach dreimaligem Waschen in Wasser und zweistündigem Trocknen waren die Streifen gegenüber dem Kontrollstreifen und einer Bewertungstabelle der sichtbaren Banden auswertbar.

Die Bewertung erfolgt nach einem Punkteschema, welches auftretende Banden in ihrer Aussagekraft bewertet. Dieses System führte zu der möglichen Bewertung negativ, positiv sowie fraglich. Mithilfe des Mikrogen-Testsystems war es also nicht möglich, eine klare ja / nein Aussage zu erhalten. Für die Arbeit wurden die Seren nur auf IgG Antikörper hin getestet und die Punkteverteilung ergab sich dann wie folgt: acht Punkte für p100, p39 und p18, sechs Punkte für

OspC, vier Punkte für OspA und einen Punkt für p41, p41/int (*B. garinii*) und p41/int (*B. afzelii*). Eine Gesamtpunktzahl unter fünf ergab ein negatives Ergebnis, eine Punktzahl zwischen fünf und sechs Punkten galt als fraglich, eine Probe mit mehr als sechs Punkten wurde als positiv eingestuft.

3.9.5 Untersuchung der Seren mittels des C6-Antikörpernachweises der Firma IDEXX

3.9.5.1 C6-ELISA

Diese Untersuchungen wurden direkt in den USA durchgeführt, da der ELISA bisher nur im Zentrallabor der Firma IDEXX angewendet werden kann. Die benötigte Serummenge wurde dafür zunächst in Serumröhrchen pipettiert und bei -80°C gelagert. Vor dem Versand erfolgte die Verpackung auf Trockeneis. Die Seren erreichten innerhalb von drei Tagen das Ziel und wurden dort sofort ordnungsgemäß gelagert, beziehungsweise direkt im ELISA eingesetzt.

3.9.5.2 C6-SNAP Test

Den C6-SNAP Test stellte die Firma IDEXX dem Institut für Immunologie zur Verfügung. Vier ausgewählte Serumproben eines jeden geimpften Hundes wurden untersucht. Je $50\ \mu\text{l}$ Serum wurde mit 4 Tropfen Konjugat versetzt, geschüttelt und auf das Auftragungsfeld gegeben. Nachdem die Lösung über das Reaktionsfeld hinweg wanderte, wurde der hintere Bereich des Reaktionsgefäßes hinabgedrückt. Dadurch kam es zum Öffnen der die Spül- und Substratlösung enthaltenden Kammern. Acht Minuten danach konnte das Ergebnis im Reaktionsfeld abgelesen werden.



Abbildung 5

SNAP Test Komponenten v.l.n.r.: Pipette zum Auftragen, Röhrchen zum Mischen des Serums und des Konjugats, Reaktionskammer, Konjugatlösung

Kam es zur Entwicklung eines blauen Punktes, der Reaktionskontrolle, so war der Test ordnungsgemäß verlaufen, das untersuchte Hundeserum als negativ zu beurteilen. Erst wenn sich zusätzlich noch der für *B. burgdorferi* spezifische Punkt blau verfärbte, konnte die Probe als positiv bezeichnet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Qualität der hergestellten Antigenpräparationen

Um eine Aussage über die Qualität der mit den In-Haus-Verfahren gewonnenen Antigenpräparationen der drei Spezies treffen zu können, und somit auch eine Aussage über die Qualität der damit gewonnenen Ergebnisse, wurden die Antigensonikate auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Ein Teil des Sonikats wurde mithilfe von Coomassie Blau, ein anderer mit Silbernitrat salzen angefärbt.

Es zeigt sich in Abbildung 6, dass sich die drei Spezies deutlich unterscheiden.

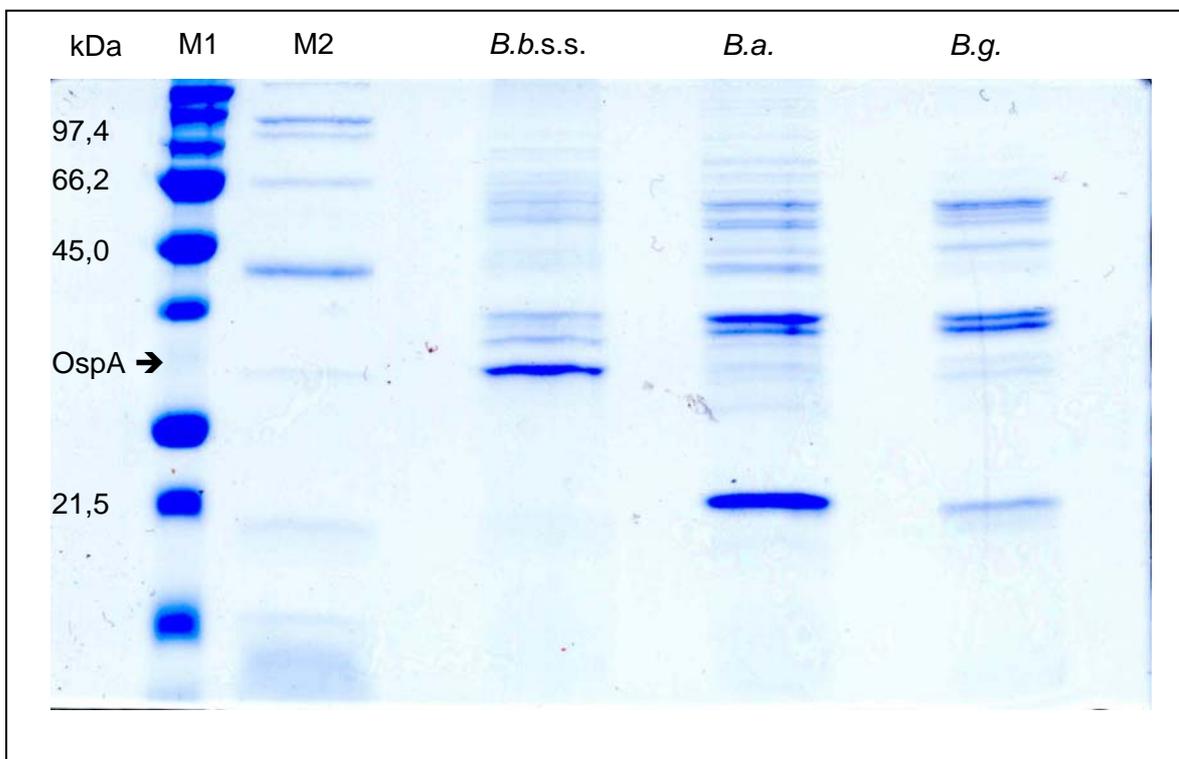


Abbildung 6

Ein mit Coomassie Blau angefärbtes Polyacrylamid-Gel

M1: vorgefärbter Marker

M2: nicht vorgefärbter, biotinylierter Marker

B.b.s.s.: *B. burgdorferi* s. s. N40 Sonikat

B.a.: *B. afzelii* PKo Sonikat

B.g.: *B. garinii* PBi Sonikat

Allerdings fällt auf, dass zwischen den nur in Europa vorkommenden Spezies *B. afzelii* und *B. garinii* eine größere Ähnlichkeit besteht als zu *B. burgdorferi* s. s., welche die sichtbaren Banden in einer ganz unterschiedlichen Intensität exprimiert. Des Weiteren zeigt sich, dass die prominente

Bande bei *B. burgdorferi* s. s. in Höhe von 31 kDa bei *B. garinii* und *B. afzelii* kaum sichtbar wird. Dafür weisen sie eine viel stärkere Reaktion in Höhe von 10 bis 20 kDa auf. Diese zeigt sich auch besonders deutlich in dem mit Silbernitrat angefärbten Gel in Abbildung 7. Hier sind wesentlich mehr angefärbte Proteine sichtbar als in der Coomassie Blau Färbung. Jedoch fällt eine genaue Charakterisierung der einzelnen Fraktionen schwer.

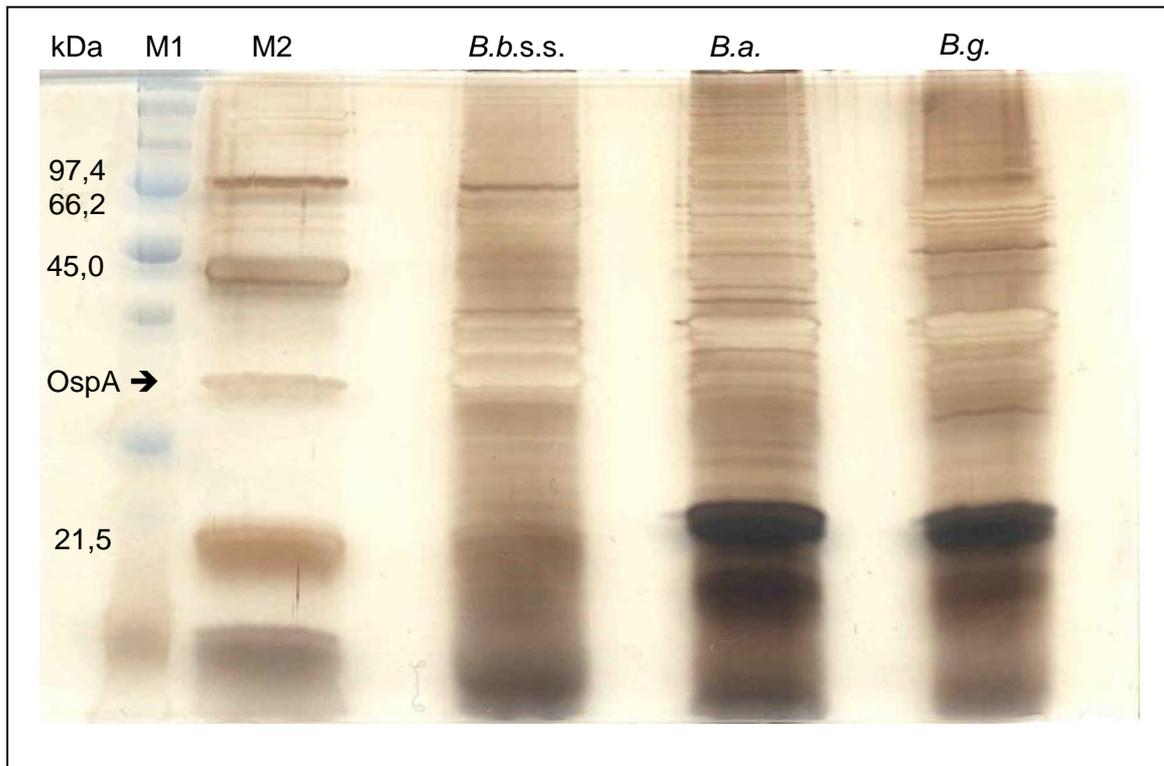


Abbildung 7

Ein mit Silbernitrat salzen angefärbtes Polyacrylamid-Gel

M1: vorgefärbter Marker

M2: nicht vorgefärbter, biotinylierter Marker

B.b.s.s.: *B. burgdorferi* s. s. N40 Sonikat

B.a.: *B. afzelii* PKo Sonikat

B.g.: *B. garinii* PBi Sonikat

Bei der Quantifizierung der in den Antigenpräparationen enthaltenen Proteinmenge zeigte sich der höchste Gehalt beim *B. burgdorferi* s. s. Lysat, dann absteigend bei den *B. afzelii* und *B. garinii* Lysaten.

Tabelle 31: Gehalt an Protein

<i>B. burgdorferi</i> s. s. N40	vom 06.05.2002	11,00 mg/ml
<i>B. afzelii</i> PKo	vom 11.04.2003	7,96 mg/ml
<i>B. garinii</i> PBi	vom 01.12.2003	7,36 mg/ml

4.2 Voruntersuchungen (Screening)

4.2.1 Untersuchung der Seren mittels dem Mikrogen ELISA und Western Blot Testsystem

Zu Beginn der Arbeit stand ein kommerziell erhältliches Testsystem der Firma Mikrogen aus München für die Voruntersuchungen zur Verfügung, welches als *recomWell* in Form eines ELISA und *recomBlot* in Form eines Western Blot auf dem Markt ist. Beide Nachweissysteme arbeiten mit rekombinant hergestellten Borrelienproteinen, die entweder auf eine Plastikplatte (ELISA) oder einen Nitrozellulose-Streifen (Western Blot) aufgebracht wurden. Die Western Blot Streifen sind in Abbildung 8 dargestellt. Da dem Institut für Immunologie nur begrenztes Material zur Verfügung stand, konnten lediglich die ersten 169 Hunde im Mikrogen-System auf eine Borrelien-Infektion beziehungsweise eine Impfung gegen die Borreliose untersucht werden. Bei den Analysen stellte sich heraus, dass das Testsystem nicht dem üblichen Vorgang in der Borreliose-Diagnostik folgt. Während in der Regel der ELISA als eine schnelle Methode der Voruntersuchung gilt, die bei einem fraglichen Ergebnis einen Western Blot nötig macht, der dann ein klares Ergebnis liefern soll, kann bei dem Mikrogensystem keine klare ja / nein Aussage erreicht werden. Nicht nur der ELISA liefert fragliche Ergebnisse im Grenzbereich, auch die Auswertung des Western Blot kann dazu führen. In unserem Labor wurden sofern möglich alle Proben mit beiden Methoden, ELISA und Western Blot untersucht. Diese Vorgehensweise hat die Anwendung des Kits erschwert und häufig zu ungeklärten Ergebnissen geführt, die dann nach strengeren Kriterien ausgewertet und oft im positiven Bereich angesiedelt wurden. Diese Art der Beurteilung der Proben spiegelt sich in der Diskrepanz der Ergebnisse zwischen ELISA und Western Blot wider: Es zeigt sich, dass im ELISA 30,1%, im Western Blot allerdings 60,9% der Hunde positiv sind. Ein fragliches Ergebnis zeigt sich im ELISA zu 13,8% und im Western Blot zu 7,1%. Diese Ergebnisse sind auch in Tabelle 31 aufgeführt. Die Tabelle stellt die drei verwendeten Untersuchungsmethoden und die daraus resultierenden Ergebnisse im Vergleich dar. Da das bereitgestellte Material der Firma Mikrogen bezüglich des ELISA nur für die ersten 123, bezüglich des Western Blot (WB) für die ersten 169 Serumproben zur Verfügung stand, ist die Hundepopulation in drei Gruppen unterteilt.

Betrachtet man nun noch einmal die Ergebnisse des Mikrogensystems und hierbei die Proben, die im ELISA fraglich und positiv getestet wurden, somit auch im Western Blot untersucht werden müssen, so handelt es sich um 43,9%. Durch unsere Vorgehensweise, alle Seren, also auch die negativ Getesteten, im Western Blot zu untersuchen, zeigt sich jedoch, dass 68% der Hunde im Western Blot fraglich oder positiv getestet wurden, sich also der Anteil infizierter Tiere stark erhöht hat. In der Borreliosediagnostik mithilfe des Zwei-Stufen-Testsystems erwartet man allerdings, dass sich dieser Anteil verringert.

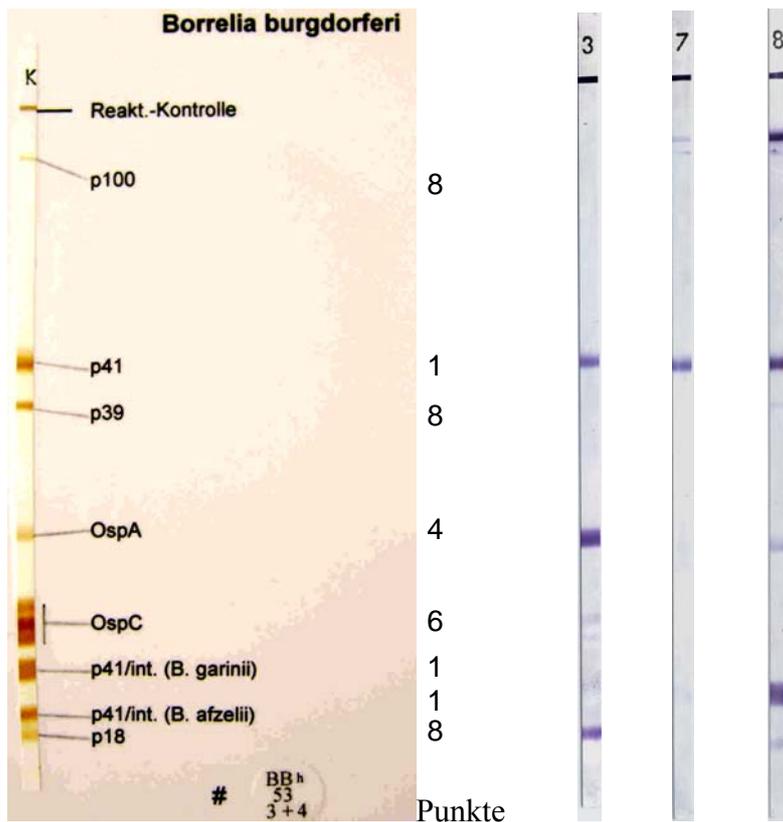


Abbildung 8

Mikrogen *recomBlot* Streifen; links Kontrollstreifen mit Definition der zu erwartenden Banden, mittig die je Bande zu verteilenden Punkte, rechts 3 Serumproben

von links nach rechts:	Nr. 3: KHT-007, Hund einer Studentin, positiv	13 Punkte
	Nr. 7: KHT-041, Hund aus der Pharmakologie, negativ	1 Punkt
	Nr. 8: KHT-059, Hund einer Studentin, positiv	10 Punkte

4.2.2 Untersuchung der Seren in ELISA und Western Blot mit *B. burgdorferi* s. s. N40

Antigenen

Nach der Herstellung einer eigenen Antigenpräparation wurde diese im ELISA und dann auch im Western Blot eingesetzt. Alle Hunde, sowohl die bereits im Mikrogensystem getesteten 169, als auch die weiteren 38 Hunde, wurden mit diesem ELISA und Western Blot auf Antikörper gegen Borrelienantigene hin untersucht. Auch bei Verwendung des eigenen Antigens kamen alle Seren, sowohl die im ELISA positiv als auch die fraglich und negativ eingestuften Proben, auf den Western Blot. Bei der Betrachtung der Ergebnisse wird ersichtlich, dass die im ELISA positiv getesteten Hunde 7,2% umfassen, im Western Blot 22,2%, wie auch in Tabelle 32 aufgeführt, wobei diese Zahl geimpfte Hunde mit einschließt. Der Anteil infizierter Hunde liegt bei 20,3%. Addiert man nun die Prozente der im ELISA fraglich und positiv getesteten Hunde, so ergeben sich 28,9%. Dieser Prozentsatz beschreibt also den Anteil der Tiere, die bei einem Zwei-Stufen-Test im

Anschluss an den ELISA im Western Blot getestet werden. Durch die Analyse im Western Blot verringert sich dieser Prozentsatz auf 22,2%, die dann tatsächlich als positiv gewertet werden. Es zeigt sich also, dass der ELISA in diesem System seine Funktion als Methode für eine schnelle Voruntersuchung erfüllt. Betrachtet man nun nur die ersten 169 Hunde, um das In-Haus-System mit dem Mikrogenkit direkt vergleichen zu können, so zeigt sich, dass bei der Verwendung des eigenen ELISA der Prozentsatz der positiv eingestuft Proben auf 26,8% sinkt, im Western Blot auf 18,9%.

4.2.3 Untersuchung der Seren im C6-ELISA der Firma IDEXX

Im Laufe der Studie ergab sich die Möglichkeit, die Seren ungeimpfter als auch geimpfter Hunde in einem C6-ELISA in den USA auf eine Borrelieninfektion hin zu testen. Dieser ELISA ist speziell für die Untersuchung infizierter Individuen, die eine Antibiose erhalten haben, entwickelt worden. Wie die folgend aufgeführte Tabelle 32 zeigt, so reagieren in diesem System wesentlich weniger Hunde positiv, von den 207 Hunden sind nur 5,3% betroffen, innerhalb der ersten 169 Tiere sogar nur 4,1%.

Tabelle 32: Übersicht über die Ergebnisse (ganze Zahlen und Prozentsätze) der Voruntersuchung

Hunde	Mikrogen Testsystem						<i>B. burgdorferi</i> s. s. N40 Antigen					C6 Antigen	
	ELISA			Western Blot			ELISA			Western Blot		ELISA	
	negativ	fraglich	positiv	negativ	fraglich	positiv	negativ	fraglich	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv
1-123	69	17	37	28	10	85	82	33	8	98	25	117	6
123-169	n.d.			26	2	18	42	3	1	39	7	45	1
Gesamt	69	17	37	54	12	103	124	36	9	137	32	162	7
Prozent	56,1%	13,8%	30,1%	32%	7,1%	60,9%	73,4%	21,3%	5,3%	81,1%	18,9%	95,9%	4,1%
169-207	n.d.						23	9	6	24	14	34	4
Gesamt							147	45	15	161	46	196	11
Prozent							71,0%	21,8%	7,2%	77,8%	22,2%	94,7%	5,3%

4.3 Antikörperverlauf nach Impfung

4.3.1 ELISA-Ergebnisse nach Verwendung von *B. burgdorferi* s. s. Antigenen

Zunächst erfolgte die Analyse der Seren bezüglich des Gehaltes an Gesamtantikörpern gerichtet gegen *B. burgdorferi* s. s., um den Antikörperverlauf dokumentieren zu können. Dafür kam der ELISA mit selbst hergestellten Antigenen gewonnen aus *B. burgdorferi* s. s. Organismen zum Einsatz. Zur besseren Übersicht der aus dieser Analyse gewonnenen Ergebnisse sind die Hunde der jeweiligen Gruppe als eine Linie zusammengefasst und als Mittelwert dargestellt. Auf der x-Achse sind die Tage nach der ersten Impfung aufgetragen, auf der y-Achse die kinetischen ELISA Einheiten (KELA), die ein gültiges Maß zur Messung der Gesamtantikörper darstellen.

Abbildung 9 zeigt den Impfstoffvergleich innerhalb der zwei großen Gruppen A (schwarz) und B (rot), um so gegebenenfalls eine Signifikanz zwischen den Gruppen darstellen zu können. Gruppe B1 und Gruppe B2 sind zu einer gemeinsamen Gruppe B zusammengefasst. Auf diese Weise lassen sich die Unterschiede zwischen einer zweifachen und einer dreifachen Antigengabe deutlicher darstellen. Es zeigt sich, dass aufgrund der geringen Probandenzahl ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Impfstrategien in Form von höheren und länger anhaltenden Antikörpertitern in Gruppe B nicht abzuleiten ist, ein deutlicher Trend zeigt sich jedoch bei drei der fünf Impfstoffe. Betrachtet man sowohl die beiden *B. burgdorferi* s. s.-Lysatimpfstoffe Merilym und LymeVax, als auch ProLyme, bestehend aus rekombinantem *B. burgdorferi* s. s. OspA mit Adjuvans, so zeigt sich, dass diese Impfstoffe nach der Impfung im Hund hohe Antikörpertiter induzieren, die dann im Falle der beiden Lysatimpfstoffe innerhalb eines halben Jahres auf unter 50% des erreichten Maximalwertes abfallen. Bei mit ProLyme geimpften Hunden hingegen halten die hohen Titer vergleichsweise lange an und fallen über den Zeitraum eines Jahres nicht unter besagte 50%. RecombitekLyme, ein aus rekombinantem OspA von *B. burgdorferi* s. s. gewonnener Impfstoff ohne Adjuvans, sowie Biocan, bestehend aus einem Lysat von *B. garinii* und *B. afzelii*, induzieren im geimpften Hund im Vergleich zu den ersten drei Impfstoffen nur mäßig hohe Spitzenwerte, die anschließend rasch und kontinuierlich abfallen, um im Laufe des Jahres fast auf 100 KELA zurückzugehen. Werte unter 100 KELA, in den Abbildungen grau unterlegt, markieren den in der diagnostischen Abteilung als negativ eingestuftem Bereich. Es zeigt sich bei diesen beiden Impfstoffen, dass Hunde nach Ablauf des ersten Jahres der Immunisierung kaum noch nachweisbare Antikörperspiegel gegen *B. burgdorferi* Organismen haben. Im Falle von Biocan ist jedoch zu beachten, dass die für die Immunisierung der Hunde verwendeten Antigene nicht den Antigenen entsprechen, welche zur Detektion der Antikörper eingesetzt wurden.

Die Auffrischungsimpfung nach einem Jahr führt bei vier der fünf Impfstoffe zu einem Wert, der innerhalb der maximal erreichten Werte nach Grundimmunisierung liegt. Nur im Falle von mit ProLyme geimpften Hunden wird durch die erneute Antigengabe ein über den Spitzenwerten des

ersten Jahres liegender Wert erreicht. Betrachtet man den Einfluss des Impfgregimes auf die Höhe des Wertes, so zeigt sich, dass die dritte Impfung zu höheren Werten führt, wenn es nicht vorher zu einem Angleich der Titerverläufe zwischen den Gruppen A und B eines jeden Impfstoffes gekommen ist, wie es bei LymeVax der Fall ist. Bei RecombitekLyme verhält es sich umgekehrt. Zwar liegen die Werte der in Gruppe B befindlichen Hunde unterhalb der aus Gruppe A stammenden, aber die Auffrischungsimpfung führt bei Gruppe B zu einem höheren Spitzenwert im zweiten Jahr als bei Gruppe A.

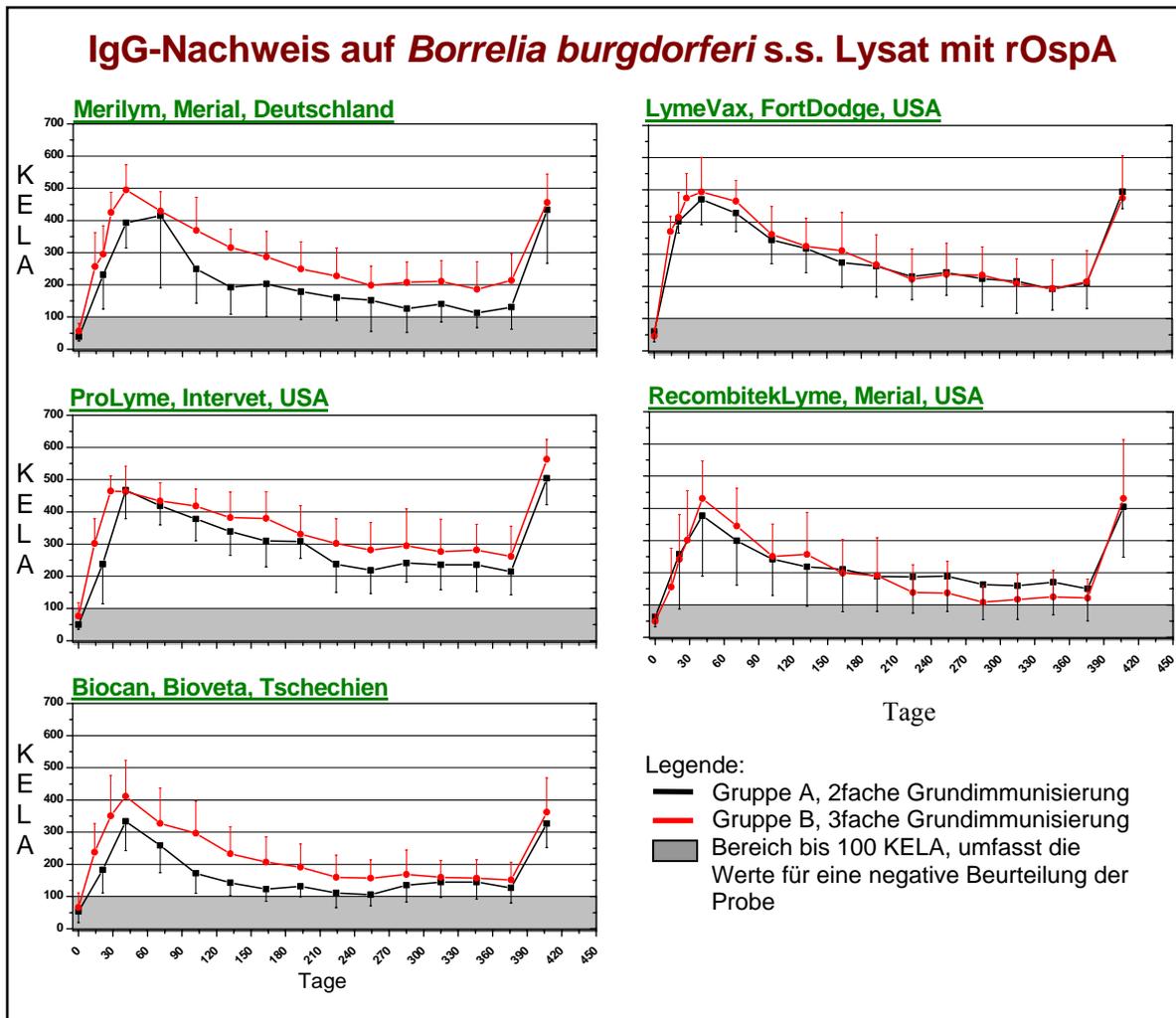


Abbildung 9

Darstellung der durch die Impfung induzierten Antikörper nachgewiesen mit *B. burgdorferi* s. s. Antigenen

Betrachtet man den Einfluss der unterschiedlichen Zeitabstände zwischen den einzelnen Antigengaben in den Impfgregimen, dargestellt in Abbildung 10 und der Übersicht halber ohne Angabe des Standardfehlers, da er sich bei einer weiteren Unterteilung im Vergleich zur Abbildung 9 vergrößert, so zeigen sich feine Unterschiede, die in Abbildung 9 nicht darstellbar waren. Bei mit Merilym geimpften Hunden tritt eine deutliche Abstufung zwischen den Gruppen A

(schwarz), B1 (rot) und B2 (blau) auf, die auch bei der Verwendung von Biocan zu beobachten ist. Bei Tieren, die mit einem dieser beiden Impfstoffe immunisiert wurden, führt eine dreimalige Impfung zu einem verzögerten Antikörperabfall, wobei es sich positiv auswirkt, wenn die Abstände zwischen den Impfungen größer sind (dreiwöchiger Abstand in Gruppe B2 erzielt bessere Werte als zweiwöchiger Abstand in Gruppe B1). ProLyme geimpfte Hunde zeigen nur im Fall von Gruppe B1 einen Unterschied im Antikörperverlauf. Eine dreimalige Antigenapplikation in kurzem Abstand (innerhalb von 2 Wochen) führt hier zu einer Verzögerung des Antikörperverlustes. Betrachtet man hingegen den Antikörperverlauf bei Hunden, die RecombitekLyme erhalten haben, so zeigt sich bei diesem Impfstoff eine konträre Auswirkung einer dreimaligen, in kurzen Abständen (zwei Wochen) erfolgenden Grundimmunisierung: Sie führt zu einem schnelleren Antikörperabfall. Wird das Antigen jedoch in weiteren Abständen (drei Wochen) gegeben, können dadurch im Bereich der Maximalwerte diese einige Wochen länger aufrecht erhalten werden, wie in Abbildung 10 ersichtlich.

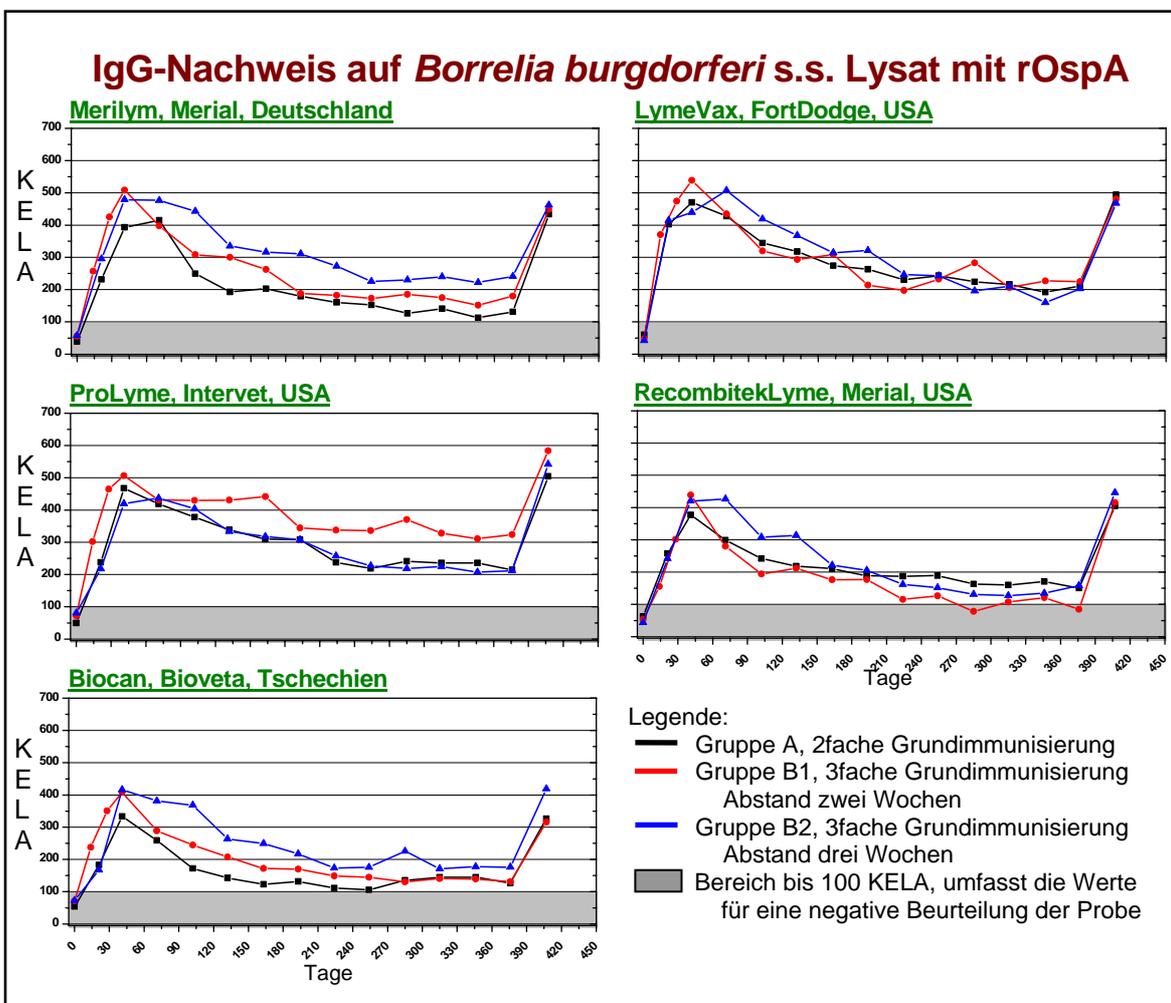


Abbildung 10

Darstellung der durch die Impfung induzierten Antikörper nachgewiesen mit *B. burgdorferi* s. s. Antigenen ohne Angabe des Standardfehlers

Die Auffrischungsimpfungen stellen sich in dieser Abbildung dar wie in der vorhergehenden. Nur mit ProLyme werden durch die Booster-Immunsierung höhere Werte erreicht als durch die Grundimmunsierung.

Die Höhe der Titer nach Auffrischungsimpfung hat einen Einfluss auf den Antikörperverlauf im zweiten Jahr der Immunsierung. Es zeigt sich bereits im ersten Jahr nach Grundimmunsierung, dass die Titer zwangsläufig langsamer abfallen, wenn die Maximalwerte sehr hoch waren.

Um den Effekt der Auffrischungsimpfung deutlich zeigen zu können, wurde die Population der Beagles aus dem pharmakologisch-toxikologischen Institut ein weiteres Jahr beobachtet. Bei diesen zehn Hunden wurde nach der Auffrischungsimpfung, zwölf Monate nach Beginn der Grundimmunsierung, über ein weiteres Jahr monatlich Blut gewonnen. 24 Monate nach der Grundimmunsierung erhielt jeder Hund wiederum eine Auffrischungsimpfung. Einen Monat danach wurde das letzte Mal von jedem Hund Blut entnommen.

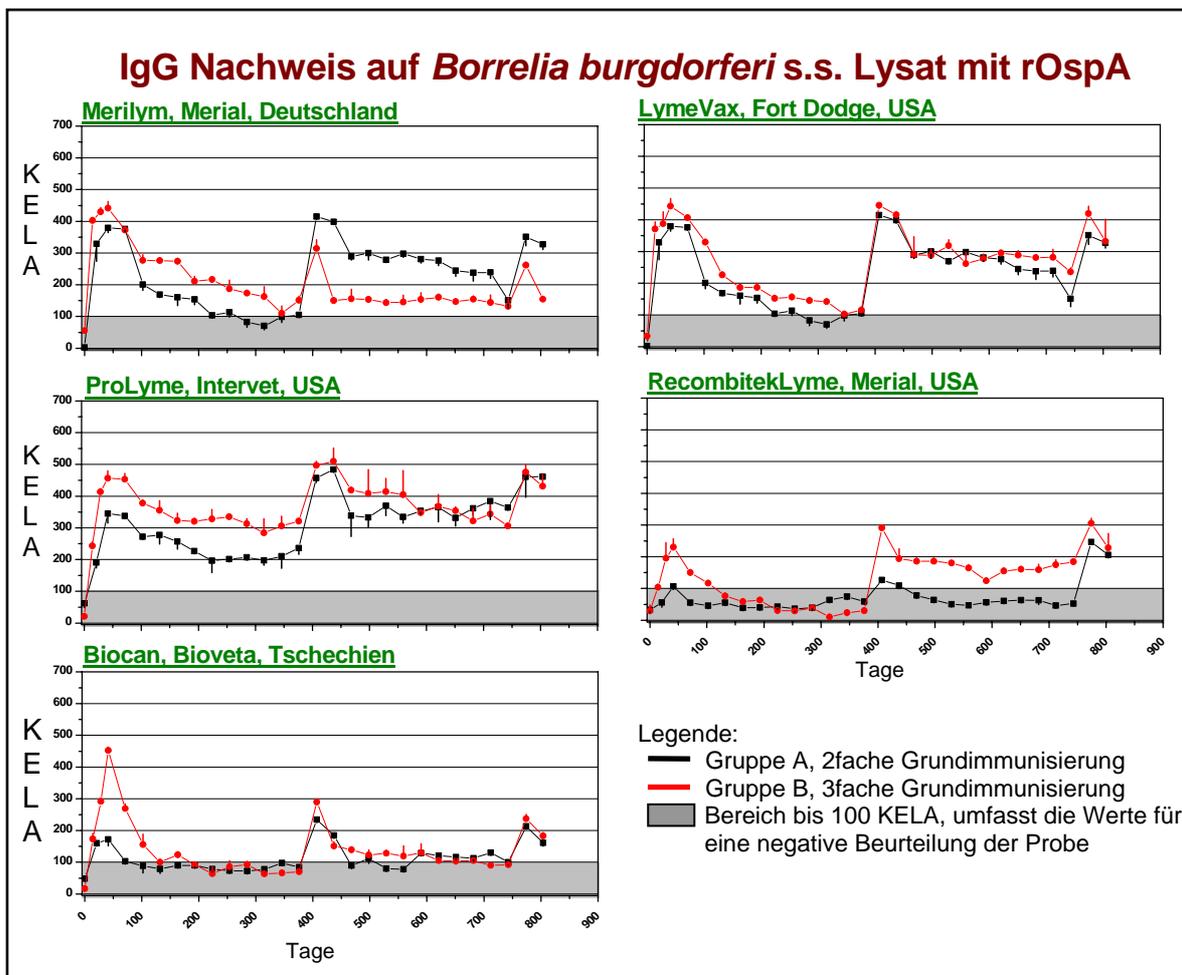


Abbildung 11

Darstellung der durch die Impfung induzierten Antikörper über zwei Jahre mit Ergebnissen einzelner Hunde unter Verwendung von *B. burgdorferi* s. s. Antigenen zum Nachweis der gebildeten Antikörper

Die Abbildung 11 zeigt den Kurvenverlauf eines jeden einzelnen Hundes, die angegebenen Standardfehler entstehen aus der Abweichung zwischen den Einzelwerten einer Doppelbestimmung.

In der Darstellung wird deutlich, dass bei den Impfstoffen, die einen im Vergleich zur Grundimmunisierung höheren Titer bei der Auffrischungsimpfung erreichen, auch der Antikörperverlauf auf höherem Niveau erfolgt und die Antikörper nicht so schnell verloren gehen. Besonders die Impfung mit Merilym verdeutlicht diesen Effekt. Während der Hund, der zwei Impfungen im Rahmen der Grundimmunisierung erhielt, durch die Auffrischungsimpfung einen wesentlich höheren Titer erreicht, der sich auf hohem Niveau hält, verhält es sich bei dem dreimal immunisierten Hund genau umgekehrt.

4.3.2 Western Blot Ergebnisse nach Verwendung von *B. burgdorferi* s. s. Antigenen

Betrachtet man nun die bereits im ELISA beschriebenen Antikörperverläufe auf einem Western Blot, so lassen sich die unterschiedlichen Antikörper, die nach der Impfung gebildet wurden, durch ihre Bindung an die der Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennten Antigenen darstellen. Diese Methode ermöglicht somit eine genaue Differenzierung der durch die verschiedenen Impfstoffe induzierten Antikörper.

Abbildung 12 zeigt die Serumproben eines zweifach mit Merilym grundimmunisierten Hundes, der nach 376 Tagen (Serumprobe 13) die Auffrischungsimpfung erhielt. Dieser Western Blot ist stellvertretend für alle mit *B. burgdorferi* s. s. Lysat-geimpften Hunde hier aufgeführt und umfasst sowohl die mit Merilym als auch die mit LymeVax geimpften Tiere. Die Probe 0, gleichbedeutend mit der Blutentnahme vor der ersten Impfung, um den Status des Hundes festzustellen, zeigt keinerlei Banden. Beginnend mit der Serumprobe 1, gewonnen am Tag der zweiten Impfung, die somit dem Status nach der ersten Impfung entspricht, zeigt sich die Entwicklung eines für eine Lysatimpfung typischen Bandenmusters, welches dominiert wird von der 31 kDa-Bande, der Reaktion auf OspA. Wie bereits beschrieben, werden diese speziellen OspA-Antikörper durch eine Impfung induziert, nicht durch eine akute Infektion. Des Weiteren werden Banden in Höhe von 21-24 kDa (OspC), 34-36 kDa (OspB), 41 kDa (Flagellin) und 66 kDa (p66) sichtbar. Vor allem bezüglich Probe 14, einen Monat nach Auffrischungsimpfung, erscheinen auch einige Banden im hochmolekularen Bereich, die nicht genau zuzuordnen sind. Nach dem Zeitpunkt der zweiten Impfung, im Western Blot zeigt sich dies an der Serumprobe 2, kommt es bereits zum Verlust der Bandenintensität. Besonders auffällig wird es am Beispiel von OspA, ist aber genauso sichtbar bei den weiteren Banden. Die Intensität schwächt immer mehr ab, bis es zu einem fast gänzlichen Verlust der Reaktion auf OspA im Bereich der Proben 5 bis 6 kommt. Hier befindet sich der Hund im Zeitraum um den 6. Monat nach der ersten Impfung, das Ergebnis im Western Blot entspricht somit dem bereits beschriebenen Antikörperverlust, wie er im ELISA zu beobachten ist.

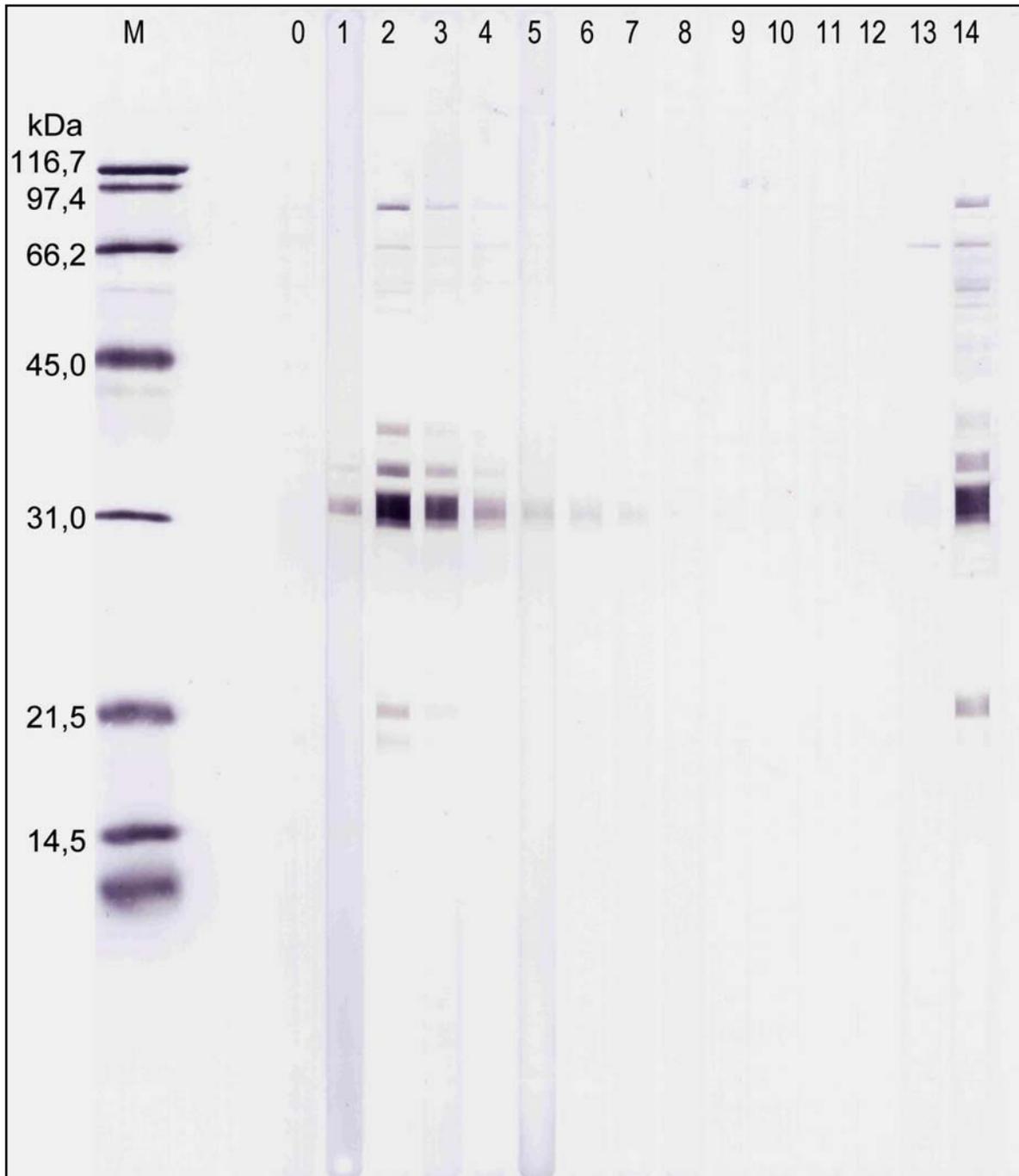


Abbildung 12

Die Antikörperproduktion eines zweifach mit Merilym geimpften Hundes dargestellt auf *B. burgdorferi* s. s. N40 Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-12: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

Erst zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme, der Probe 14 einen Monat nach der Auffrischungsimpfung, entwickelt sich wieder ein deutliches und starkes Bandenmuster, welches im Vergleich teilweise sogar stärker ausgeprägt ist als zum Zeitpunkt der Probe 2.

Abbildung 13 zeigt den Antikörperverlauf eines zwei Mal mit einem rekombinanten Impfstoff, in diesem Falle eines mit ProLyme geimpften Hundes. Auch dieser Western Blot ist stellvertretend für alle mit rekombinantem OspA geimpften Hunde hier aufgeführt. Bei mit RecombitekLyme immunisierten Hunden jedoch fällt die Intensität der Banden schwächer aus, wie es nach den ELISA-Ergebnissen auch zu erwarten ist. Im Gegensatz zu dem bisher gezeigten Lysatimpfstoff wird auf diesem Western Blot einzig die OspA-Bande sichtbar, die ebenfalls zum Zeitpunkt der Probe 2 ihre stärkste Intensität erreicht, um danach kontinuierlich schwächer zu werden. Erst gegen Ende des Jahres werden wiederum fast verschwindende OspA-Banden sichtbar. Das Ergebnis deckt sich mit der Aussage gewonnen mit dem ELISA, dass ProLyme über das ganze Jahr hinweg nicht unter 200 KELA fällt, also einen anhaltend hohen Antikörpertiter im Tier induzieren kann. Betrachtet man die Serumprobe nach der Auffrischungsimpfung, Probe 14, so spiegelt auch diese das bereits beschriebene Ergebnis des ELISA wider. Die Bande gewinnt im Vergleich zur Probe 2 stark an Intensität und zeigt zusätzlich eine Bande im Bereich von 20 kDa. Hierbei handelt es sich um ein Spaltprodukt des OspA, welches häufig im Zusammenhang mit der Impfung gesehen wird (STRAUBINGER et al. 1995).

In Abbildung 14 folgt ein Western Blot, auf dem die Serumproben eines mit Biocan geimpften Hundes aufgetragen wurden. Zunächst zeigt sich ein ähnliches Bild wie in Darstellung 12: Mehrere Banden in unterschiedlicher Intensität sind sichtbar, was auf die Art der Impfung hinweist. Ebenso wie bei Merilym handelt es sich bei Biocan um einen Lysatimpfstoff, nur wurden hierbei die Spezies *B. garinii* und *B. afzelii* für die Herstellung verwendet. Betrachtet man die Bandenintensität, so verhält sich das Serum dieses Hundes zu Beginn ebenso wie die beiden anderen, mit der Probe 2 wird die stärkste Färbung erreicht, die dann kontinuierlich abnimmt, um nach der Auffrischungsimpfung wieder zuzunehmen. Mit der Charakterisierung der Banden wird deutlich, dass sich Biocan sehr von den anderen Impfstoffen unterscheidet, da es hier nicht zur Ausbildung einer OspA-Bande in Höhe von 31 kDa kommt, beziehungsweise erst nach der Auffrischungsimpfung eine leichte Bande in dem Bereich erscheint. Stattdessen dominiert eine Bande im Bereich von 40 bis 45 kDa, die sich bei diesem Western Blot nicht näher charakterisieren lässt. Des Weiteren treten nach der Impfung mit Biocan Banden in Höhe von OspC, OspB, p39 und 60 kDa (p58) auf, wobei teilweise eine genaue Zuordnung schwer fällt. Auch zeigt sich im niedermolekularen Bereich eine Bande in Höhe von circa 10 kDa.

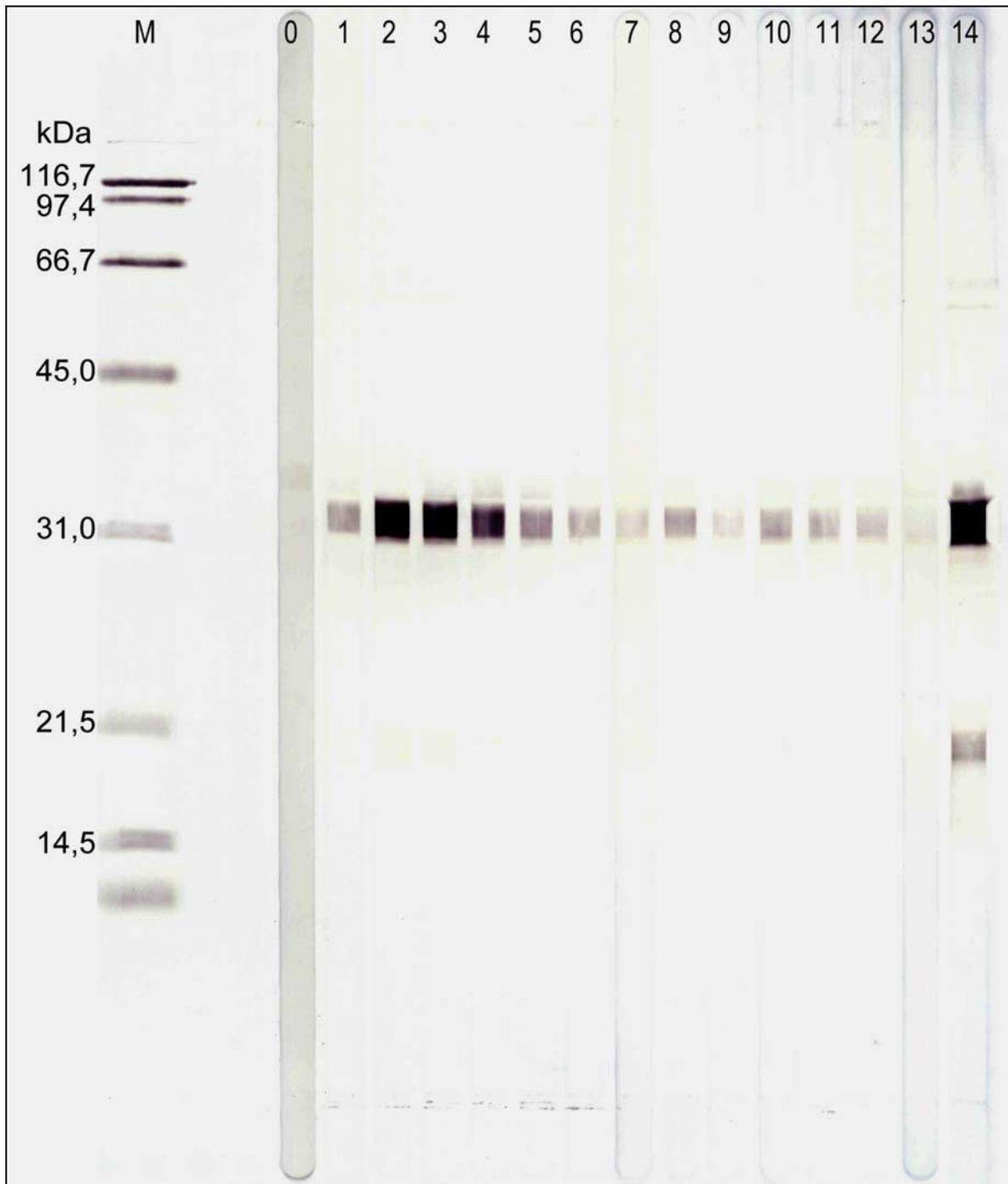


Abbildung 13

Die Antikörperproduktion eines zweifach mit ProLyme geimpften Hundes dargestellt auf *B. burgdorferi* s. s. N40 Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-12: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

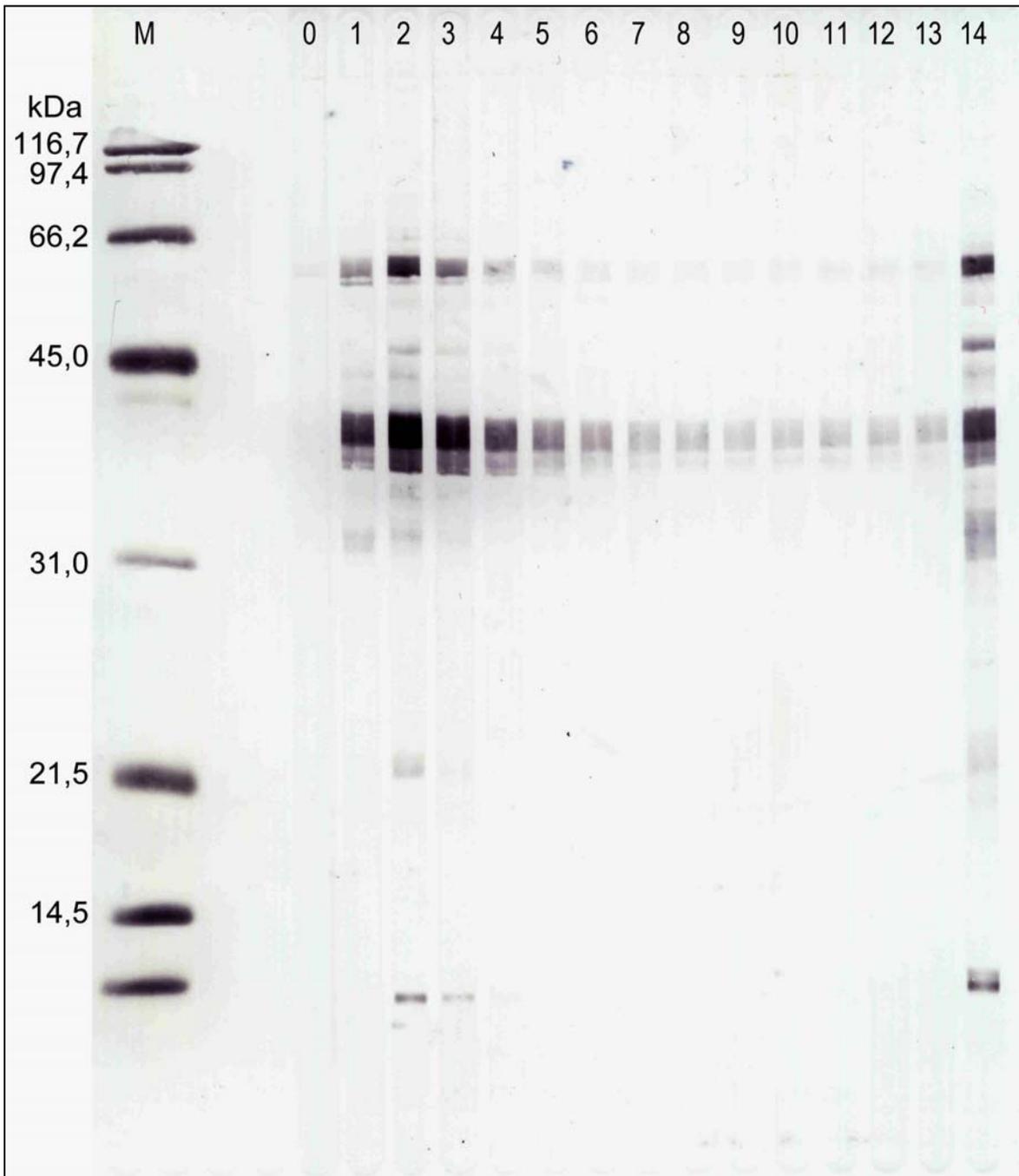


Abbildung 14

Die Antikörperproduktion eines zweifach mit Biocan geimpften Hundes dargestellt auf *B. burgdorferi* s. s. N40 Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-12: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

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

4.4.1 ELISA-Ergebnisse nach Verwendung von *B. burgdorferi* s. s. rOspA Antigen

Da der bisher bekannte Schutzmechanismus der auf dem Markt erhältlichen Impfstoffe OspA-vermittelt ist, war es von besonderer Bedeutung, die Menge an OspA-Antikörpern zu ermitteln, die im Hund nach Impfung gebildet wurden. Dies erfolgte zunächst mit Hilfe von rekombinanten OspA der Spezies *B. burgdorferi* s. s., welches im ELISA eingesetzt wurde. Die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse zeigen wiederum die Mittelwerte der zu gemeinsamen Gruppen zusammengefassten Hunde, wobei nunmehr zwei Hauptgruppen, A und B, analysiert werden. Bei diesen Untersuchungen wurden aus den 101 geimpften Hunden pro Gruppe und pro Impfstoff drei ausgewählt. Bei fünf Gruppen (fünf Impfstoffe) und zwei Impfregimen (A und B) handelte es sich also um insgesamt 30 Hunde, deren Seren unter anderem auf die spezifische OspA-Antikörperproduktion hin untersucht wurden. Da bei der Verkleinerung der Gruppengröße von einer stärkeren Streuung auszugehen ist, ist die folgende Darstellung ohne Standardfehler aufgeführt.

In der Abbildung wird sichtbar, dass sich bei vier der fünf Impfstoffe nach der Impfung hohe OspA-Antikörpertiter von 400 bis 500 KELA ausbilden, die sich mit den im Lysat-ELISA gemessenen Werten annähernd decken, die Spiegel sinken aber sehr schnell wieder ab. Mit Merilym geimpfte Hunde fallen bereits nach dreieinhalb Monaten in beiden Gruppen auf Titer von 40% der Spitzenwerte, bei LymeVax- und RecombitekLyme-geimpften Hunden erreichen die Werte zwischen den Monaten 4 bis 6 dieses Niveau. Hunde, die Biocan als Impfstoff erhielten, erreichen bei diesem ELISA nur Spitzenwerte von maximal 350 KELA, welche anschließend schnell abfallen und nach vier bis fünf Monaten nur mehr 30% der Maximalwerte erreichen. Zudem zeigt sich bei Biocan der stärkste Gruppenunterschied. Während Hunde, die dreimal den Impfstoff erhielten, überhaupt in der Lage waren, OspA-Antikörper in größeren Mengen zu bilden, kommt es bei Gruppe A zu fast keinem Anstieg der spezifischen Antikörper, es werden Werte von maximal 100 KELA erreicht. Des Weiteren lassen sich bei der Verwendung von RecombitekLyme und LymeVax geringgradige Gruppenunterschiede darstellen. Bei mit diesen beiden Impfstoffen geimpften Hunden kommt es in Gruppe B zur Ausbildung höherer Antikörpertiter, die im Vergleich zur Gruppe A ebenso mit Verzögerung abfallen. Im Falle von LymeVax erreichen die Antikörperspiegel der Hunde der Gruppe A bereits nach vier Monaten nur 40% der Spitzenwerte, während innerhalb der Gruppe B die Werte erst nach sechs Monaten auf diesen Spiegel abfallen. Bei mit Merilym geimpften Hunden wird erkennbar, dass der im Lysat-ELISA nachgewiesene Gruppenunterschied sich nicht derart deutlich in den OspA-Antikörpern wiederfinden lässt. Beide Gruppen verhalten sich annähernd gleich, doch auch hier wird sichtbar, dass Hunde der Gruppe B bezogen auf ihre Antikörper zu Beginn höhere Maximalwerte erreichen und der Kurvenverlauf der in Gruppe B befindlichen Hunde immer geringgradig oberhalb der Kurve der Gruppe A liegt.

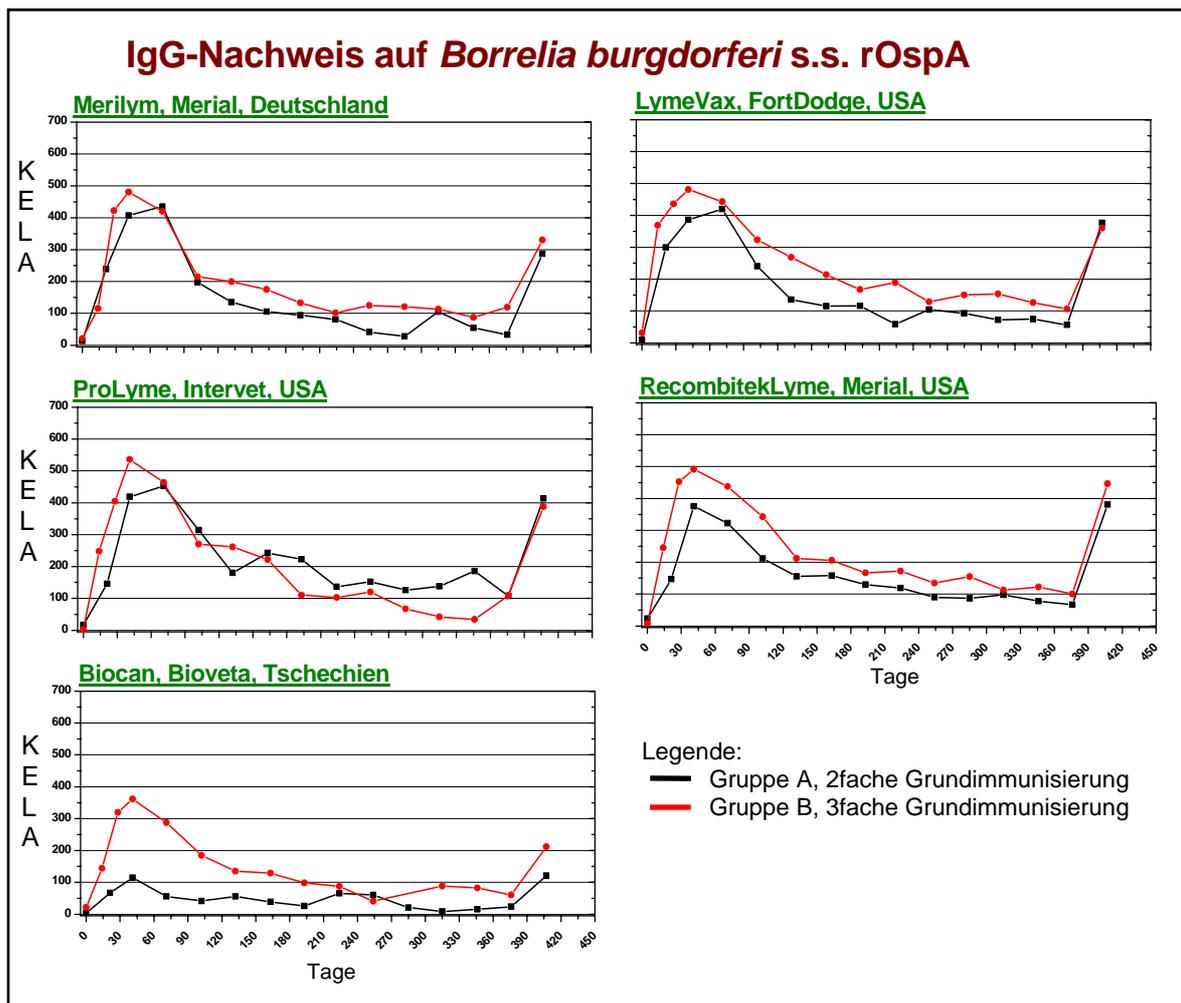


Abbildung 15

Darstellung der durch die Impfung induzierten Antikörper nachgewiesen mit *B. burgdorferi* s. s. rOspA

Hunde aus den beiden mit ProLyme geimpften Gruppen zeigen keinen Unterschied bezogen auf das verwendete Impfregime. Vergleicht man diesen Kurvenverlauf mit dem gemessen mit dem Lysat-ELISA, so sollte man annehmen, dass sich die Kurven gleichen müssten, da dieser Impfstoff nur OspA enthält und demnach ausschließlich Antikörper gegen OspA induzieren kann, die dann in beiden Systemen, sowohl im Lysat-ELISA als auch im rekombinanten OspA-ELISA gemessen werden. Dennoch kommt es durch den Einsatz von ausschließlich rekombinantem OspA als Beschichtungsantigen bei ProLyme im Anschluss an die Grundimmunisierung zu einem Verlust detektierbarer Antikörper.

Die Auffrischungsimpfung erreicht nur im Falle von RecombitekLyme einen Wert innerhalb des Maximums nach Grundimmunisierung, bei den übrigen vier Impfstoffen führt der Booster nicht, wie im Lysat-ELISA gesehen, zu gleich hohen oder höheren Werten, sondern zu niedrigeren, die

bei der Verwendung von Biocan sogar nur einen Bruchteil der Spitzenwerte erreichen. Dieses Ergebnis ist aufgrund der Gruppengröße als statistisch nicht signifikant anzusehen.

4.5 Vergleich ausgewählter Seren auf verschiedenen Antigenpräparationen

4.5.1 Verwendung von Serum geimpfter und infizierter Hunde

Die Ergebnisse der rOspA ELISA führten zu der Frage, wie sich die Impfstoffe vergleichend auf verschiedenen Antigenpräparationen verhalten. Da bei den fünf Impfstoffen zwei aus *B. burgdorferi* s. s. Lysat gewonnen wurden und zwei aus *B. burgdorferi* rOspA bestehen, wurde jeweils ein Vertreter dieser Impfstoffgruppe ausgewählt. Es ergaben sich also drei verschiedene Gruppen (Lysatimpfstoff aus *B. burgdorferi* s. s., rekombinanter OspA-Impfstoff aus *B. burgdorferi* s. s., sowie Lysatimpfstoff aus *B. garinii* und *B. afzelii*). Um nun eine Vorstellung von der Kreuzreaktivität der gebildeten Antikörper zu bekommen, wurden Western Blot angefertigt, die alle drei Spezies vereinen. Das bedeutet, dass Polyacrylamid-Gele hergestellt wurden, die drei Taschen enthielten. In jede Tasche wurden Antigene einer anderen Spezies aufgetragen. Somit entstand ein Gel, welches links *B. burgdorferi* s. s., mittig *B. afzelii* und rechts *B. garinii* Antigene enthielt. Auf die daraus hergestellte Nitrozellulosemembran konnten dann Seren von mit Merilym, mit Biocan und mit ProLyme geimpften Hunden, sowie als Kontrollen Serum eines infizierten Hundes und eines mit Tripel-OspA geimpften Hundes aufgetragen und so ihre Reaktion auf unterschiedliche Spezies direkt nebeneinander verglichen werden.

Betrachtet man in Abbildung 16 zunächst das Serum des infizierten Hundes, so zeigt sich ein bandenreiches Muster, welches eine deutliche Lücke bei OspA zeigt, wie es bei einer natürlichen Infektion auch zu erwarten ist. Vergleicht man nun dieses Muster innerhalb der drei verschiedenen Spezies, so ist zu erkennen, dass dieselbe Infektion zu einem unterschiedlichen Bandenspektrum führt. Es lässt sich zum Beispiel die Bande bei 90 kDa sowohl bei *B. burgdorferi* s. s. als auch bei *B. garinii* zeigen, nicht jedoch bei *B. afzelii*, hier erscheint eine ähnlich starke Bande auf Höhe von 80 kDa. Im Gegensatz dazu tritt eine Bande bei 14 kDa nur bei *B. afzelii* und *B. garinii*, nicht aber bei *B. burgdorferi* s. s. auf. Eine deutliche Bande bei 30 kDa zeigt sich wiederum auch nicht bei *B. burgdorferi* s. s., wohl aber bei den anderen beiden Spezies. Dieser Western Blot verdeutlicht die Unterschiede zwischen den drei Spezies, wie sie auch schon im Proteingel zu sehen waren. Lenkt man nun den Blick auf die vier geimpften Hunde, so wird zunächst sichtbar, dass die Lysatimpfstoffe wesentlich weniger, jedoch teilweise gleiche Banden wie bei der Infektion auf dem Western Blot hervorrufen. Um die Unterschiede zwischen den Spezies zu verdeutlichen, kann man sich an der OspA-Bande orientieren.

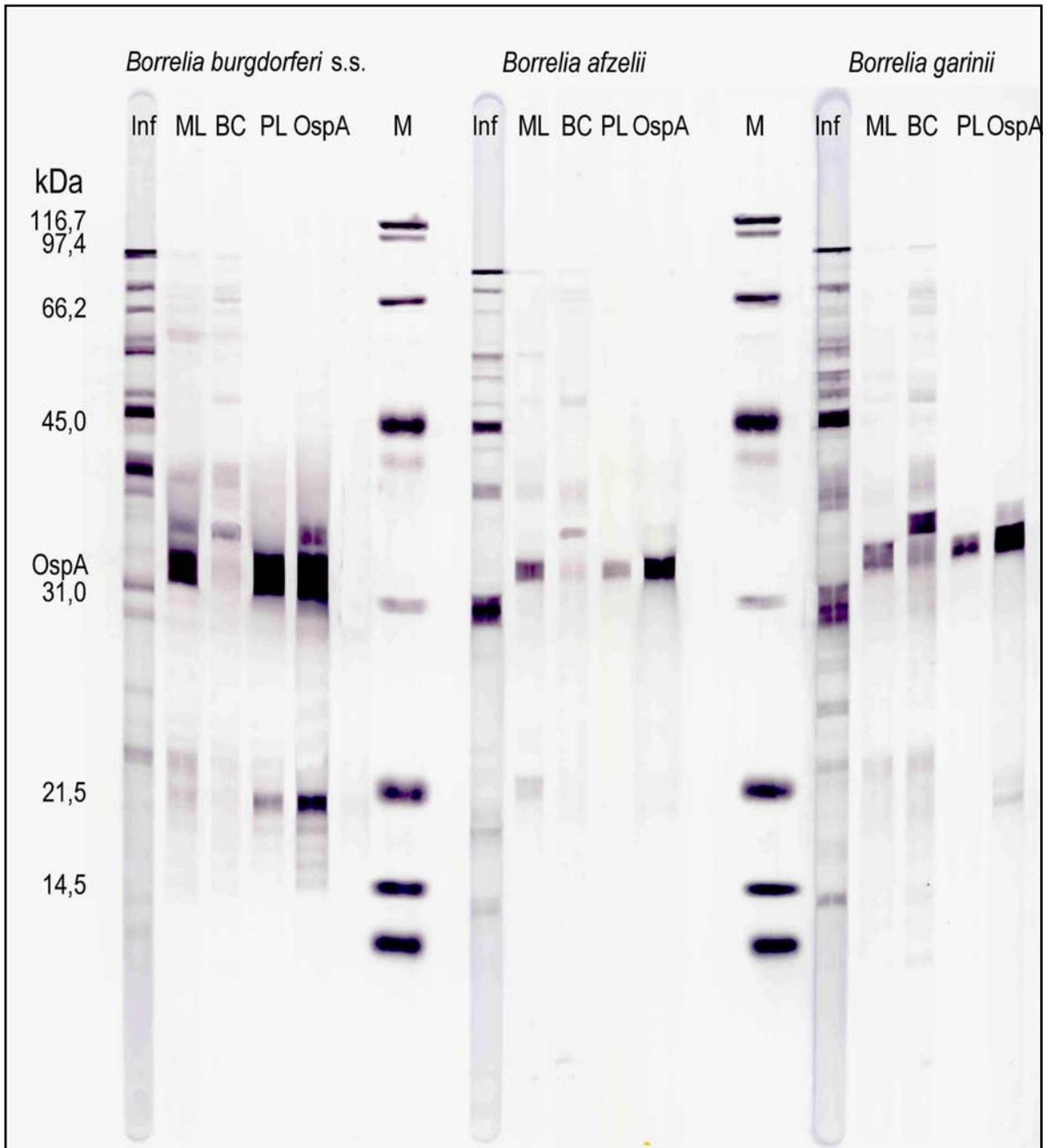


Abbildung 16

Darstellung drei verschiedener Impfstoffe sowie zweier Kontrollseren auf drei verschiedenen Antigenpräparationen, die in einem Gel aufgetrennt wurden

- M: Marker
- Inf: Serum eines experimentell mit *B. burgdorferi* s. s. infizierten Hundes
- ML: Serum eines mit Merilym geimpften Hundes
- BC: Serum eines mit Biocan geimpften Hundes
- PL: Serum eines mit ProLyme geimpften Hundes
- OspA: Serum eines experimentell mit Tripel-OspA geimpften Hundes

Betrachtet man den Lysatimpfstoff Merilym, so induziert er ein deutliches Signal bei *B. burgdorferi* s. s., welches auf *B. garinii* und *B. afzelii* Antigenen schwächer ist. Gleiches zeigt sich bei ProLyme und dem mit Tripel-OspA geimpften Hund.

Auch die durch die Impfstoffe induzierten OspA-Antikörper weisen einen Verlust ihrer Bindungsaffinität auf, wobei es den Anschein hat, als nähme die Intensität beginnend bei *B. burgdorferi* s. s. über *B. garinii* nach *B. afzelii* ab. Die zwei aus rekombinantem OspA bestehenden Impfungen hingegen zeigen nur eine dominante Bande bei OspA und einige wenige weitere Signale, vor allem im Bereich von 20 kDa. Hierbei handelt es sich um ein Spaltprodukt des OspA (STRAUBINGER et al. 2001). Der mit Biocan immunisierte Hund hingegen stellt eine Ausnahme dar. Eine OspA-Bande lässt sich kaum zeigen und sie ist generell nur schwach sichtbar. Am deutlichsten tritt sie bei Verwendung der *B. garinii* Antigene in Erscheinung. Dagegen allerdings wird bei dem mit Biocan geimpften Hund eine Bande oberhalb der OspA-Bande sichtbar, die in dieser Intensität, vor allem bei den Spezies *B. garinii* und *B. afzelii*, bei keinem anderen Impfstoff auftritt.

4.5.2 Verwendung von monoklonalen Antikörpern und Serum eines geimpften Hundes

Um die in diesem Western Blot sichtbaren Banden eindeutig zu charakterisieren, wurde ein weiterer Western Blot mit demselben Versuchsaufbau durchgeführt. Bei diesem Blot kamen neben dem Serum des mit Tripel-OspA immunisierten Hundes monoklonale Antikörper zum Einsatz.

Betrachtet man in Abbildung 17 zunächst die Spalte mit den monoklonalen Antikörpern (mAb), so sieht man vier deutliche Banden bei der Beschichtung mit *B. burgdorferi* s. s., die im Bereich von 60 kDa, 40 kDa und 31-33 kDa sowie 21,5 kDa liegen. Hierbei handelt es sich um die bereits angesprochenen Antikörper gegen p60, Flagellin, OspA und OspC. Im Vergleich dazu lässt sich bei der Beschichtung mit *B. afzelii* keine OspC Bande mehr nachweisen, bei der *B. garinii* Beschichtung geht der Nachweis von p60 verloren. Bei der Bande in der Höhe von 14,5 kDa, die bei den *B. garinii* Antigenen auftritt, konnte bisher keine Erklärung gefunden werden, welche Antikörper hier gebunden haben. Das Serum des mit Tripel-OspA geimpften Hundes verhält sich gleichermaßen wie im vorangegangenen Western Blot.

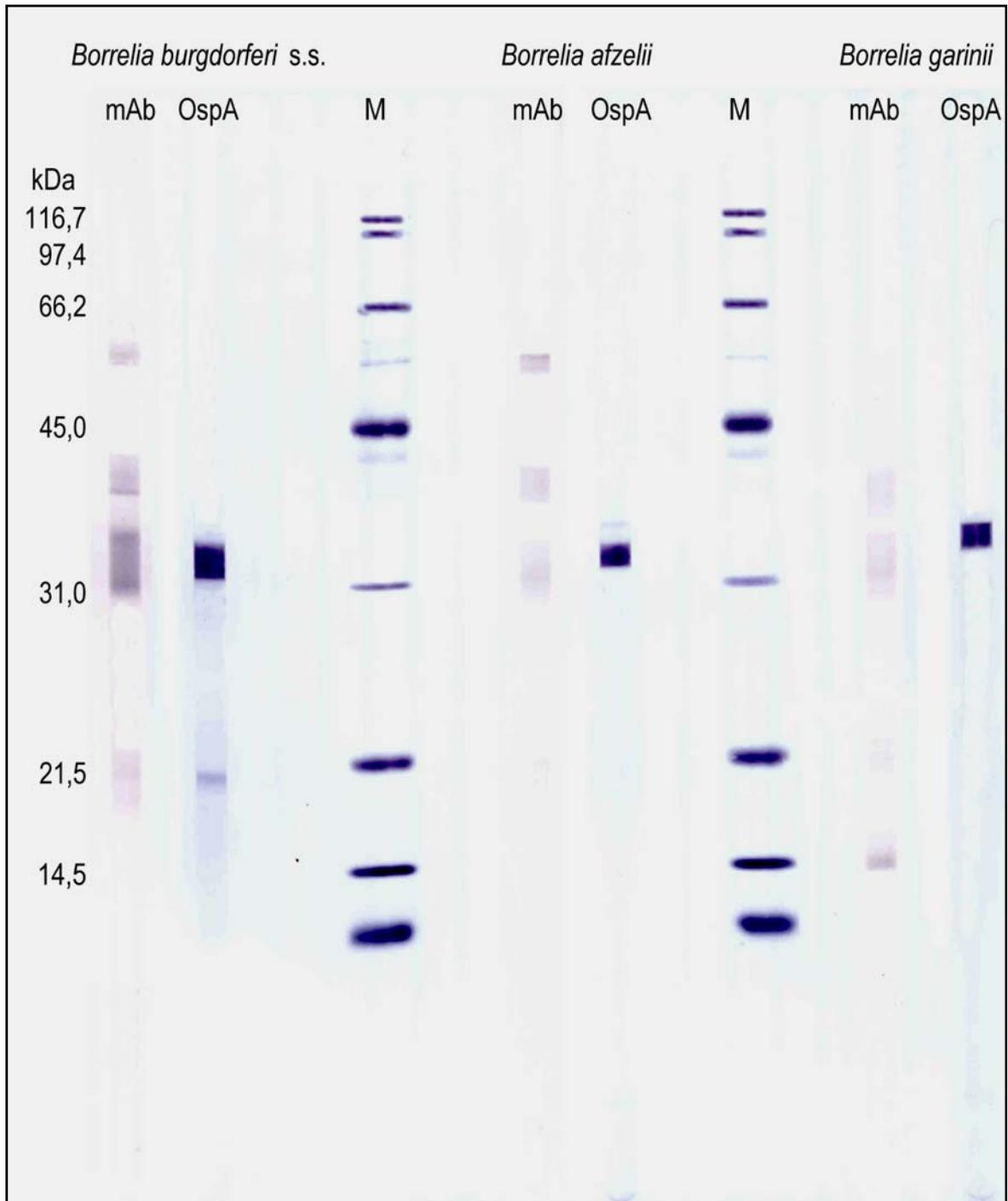


Abbildung 17

Monoklonale Antikörper und Serum eines mit Tripel-OspA geimpften Hundes aufgetragen auf drei verschiedene Antigenpräparationen, die in einem Gel aufgetrennt wurden

M: Marker

mAb: monoklonale Antikörper

OspA: Serum eines experimentell mit Tripel-OspA geimpften Hundes

4.6 Kreuzreaktivität der durch die Impfung induzierten Antikörper bezogen auf *B. garinii* und *B. afzelii* Antigene

4.6.1 ELISA-Ergebnisse nach Verwendung von *B. garinii* und *B. afzelii* Antigenen

4.6.1.1 Verwendung von *B. garinii* und *B. afzelii* Lysat

Nach dem Vergleich der Reaktion ausgewählter Seren auf Oberflächenmoleküle unterschiedlicher Borrelienspezies im vorangegangenen Versuch war es anschließend von Bedeutung, die Seren aller Hunde in ihrem Verlauf auf ihre Bindungskapazität gegenüber *B. garinii* und *B. afzelii* Antigenen zu charakterisieren.

Durch diese Vorgehensweise wurden vier der fünf verwendeten Impfstoffe nunmehr im heterologen System untersucht, während bei der Analyse der Seren von mit Biocan geimpften Hunden homologe Antigene zum Einsatz kamen. In diesem ELISA sollte es also möglich werden, die kreuzreaktiven Antikörper quantitativ zu bestimmen.

Zunächst erfolgte ein ELISA beschichtet mit Antigenen gewonnen aus *B. afzelii* und *B. garinii*. Ebenso wie bei dem *B. burgdorferi* s. s. ELISA wurde auch dieser mit homologem OspA der beiden Spezies angereichert, um in optimaler Weise die durch die Impfung induzierten Antikörper nachweisen zu können, da sowohl *B. garinii* als auch *B. afzelii* in Kultur wenig OspA exprimierten (siehe Abbildungen 6 und 7).

Bei der Messung der nachweisbaren Antikörper in Abhängigkeit von den verwendeten Antigenen, dargestellt in Abbildung 18, wird deutlich, dass bei mit Biocan geimpften Hunden durch die Verwendung der homologen Antigene eine eindeutige Anhebung der Antikörperspiegel im Vergleich zur Abbildung 9 erfolgt.

Seren der mit den vier weiteren Impfstoffen geimpften Hunde zeigen im heterologen System niedrigere Antikörperspiegel als im homologen System. Bezüglich Merilym und LymeVax fallen die Titer wesentlich schneller ab. Auch die durch die beiden rekombinanten Impfstoffe induzierten Antikörper können nur in geringen Mengen nachgewiesen werden, wobei sich in diesen beiden Impfstoffen der Effekt des heterologen rOspA als einzelnes Antigen und somit das dadurch bedingte eingeschränkte Spektrum der Antikörpervielfalt besonders bemerkbar macht.

Betrachtet man den Grafen bezüglich des verwendeten Impfregimes, so fällt auf, dass sich eine dreimalige Impfung bei vier der fünf Impfstoffe positiv auswirkt. Die stärkste Anhebung des Titers wird bei mit Biocan geimpften Hunden erreicht. Der Antikörperabfall erfolgt verzögert und führt somit zu einem über das zweite Halbjahr hinweg nahezu konstanten Antikörperspiegel bei 200 KELA. Auch bei LymeVax und Merilym lässt sich beobachten, dass die dreimalige Applikation von Antigenen innerhalb der Grundimmunisierung zu um 30% höheren Spitzenwerten führt. Bei LymeVax kann dadurch eine Anhebung des Kurvenverlaufs über das ganze Jahr hinweg induziert werden, während es bei Merilym im Verlauf des zweiten Halbjahres zu einem Angleich der Titer

beider Gruppen kommt. Bei ProLyme ist der Effekt der dritten Impfung nur schwach zu sehen, bei RecombitekLyme hat eine zusätzliche Injektion von Antigen keinen Einfluss auf den Antikörperverlauf.

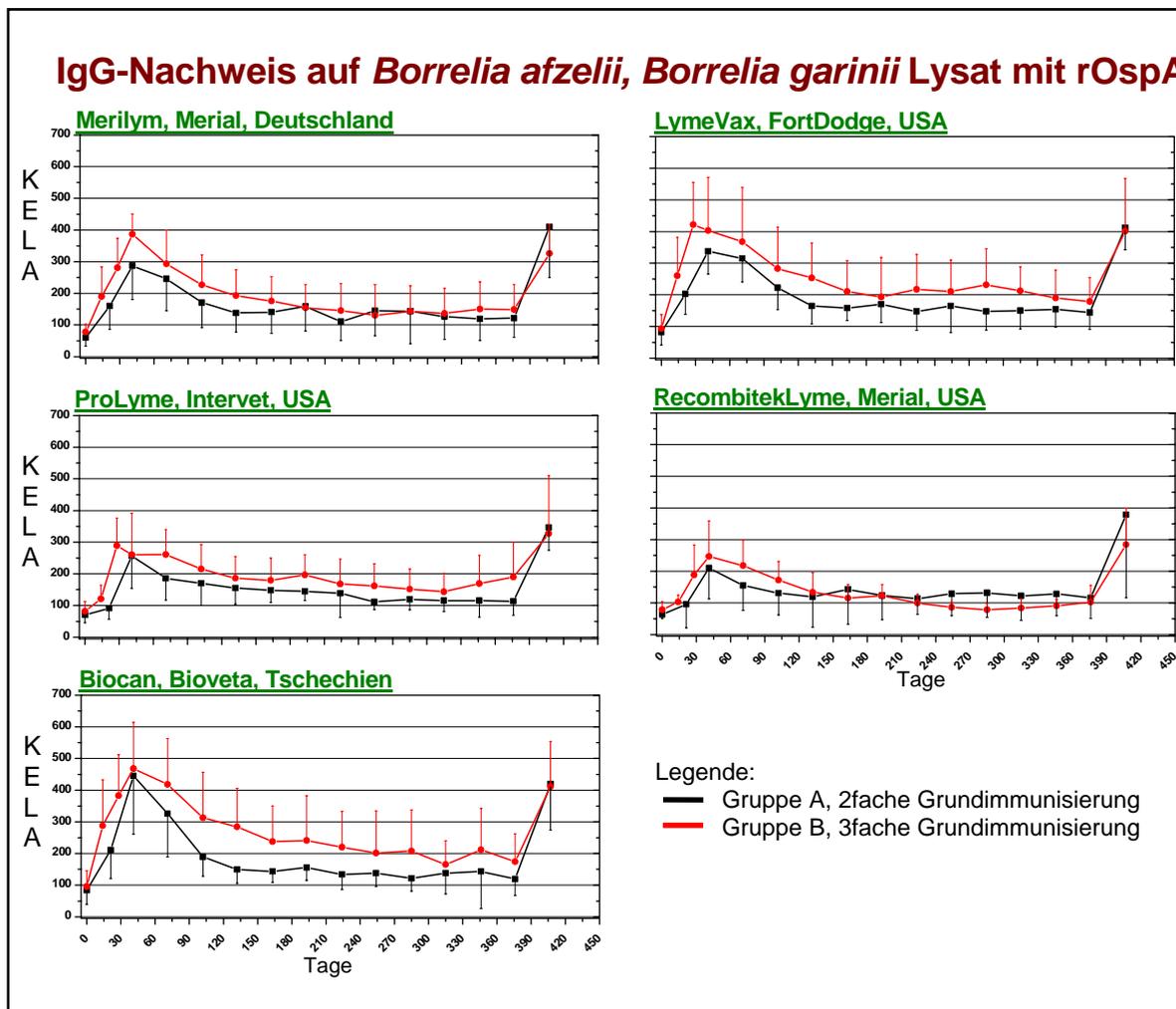


Abbildung 18

Darstellung der durch die Impfung induzierten Antikörper nachgewiesen mit *B. afzelii*, *B. garinii* Antigenen

Bei der Auswertung der Auffrischungsimpfung zeigt sich ein im Vergleich zu dem *B. burgdorferi* s. s. Lysat ELISA kaum verändertes Bild. Während vorher nur bei ProLyme durch die Auffrischungsimpfung höhere Werte erreicht werden konnten, ist beim Nachweis der kreuzreagierenden Antikörper auch bei RecombitekLyme diese Reaktion zu sehen. Hunde, die Merilym erhalten haben, zeigen in Gruppe A einen nach der Booster-Immunsierung deutlich über den nach Grundimmunisierung erreichten Spitzenwerten liegenden Wert, in Gruppe B einen Niedrigeren. Bei mit Biocan und LymeVax geimpften Hunden befindet sich der Wert nahe beziehungsweise auf Höhe des Maximums nach Grundimmunisierung.

4.6.1.2 Verwendung von *B. garinii* rOspA

Nach der Analyse der Seren bezüglich der Gesamtantikörper, die sich auf *B. garinii* und *B. afzelii* Antigenen nachweisen lassen, erfolgte nun die spezifische Charakterisierung der durch die Impfung induzierten OspA-Antikörper. Da diese bereits bezüglich *B. burgdorferi* s. s. detektiert wurden, war es nun von besonderem Interesse die Kreuzreaktivität dieser für den Schutzmechanismus so wichtigen Antikörper zu untersuchen. Dazu erfolgte zunächst ein ELISA, der ausschließlich mit rekombinantem OspA der Spezies *B. garinii* beschichtet war. Abbildung 19 zeigt Ergebnisse erzielt mit einer Teilpopulation der geimpften Hunde, wie es schon im Abschnitt 4.4.1 der Fall war. Wiederum wurden dieselben 30 Hunde gewählt.

In Abbildung 19 wird deutlich, dass, mit Ausnahme von mit Biocan geimpften Hunden der Gruppe B, die Maximalwerte 400 KELA nicht überschreiten. Es ist demnach bei vier der fünf Impfstoffe gegenüber den mit Hilfe von rekombinantem OspA der Spezies *B. burgdorferi* s. s. gewonnenen Ergebnissen zu einem deutlichen Detektionsverlust der Antikörper gekommen. Bei der Verwendung von Merilym, LymeVax, RecombitekLyme und ProLyme werden innerhalb von durchschnittlich fünf bis sechs Monaten Werte um 100 KELA erreicht. Nur die mit Biocan geimpften Hunde in Gruppe B halten über das Jahr hinweg höhere Werte. Der Einsatz des homologen OspA zur Antikörpermessung führt bei diesem Impfstoff, im Vergleich zu dem *B. burgdorferi* s. s. rOspA ELISA, zu einem wesentlich höheren Maximalwert nach Grundimmunisierung, sowohl in Gruppe B als auch in Gruppe A. Es zeigt sich bei Biocan auch wieder ein deutlicher Unterschied zwischen den verwendeten Impfschemata, wie dies bereits im heterologen System mit rOspA der Fall war. Hunde der Gruppe A erreichen nur einen niedrigen Spitzenwert, um anschließend ebenso schnell auf das Ausgangsniveau zurückzufallen.

Einen ähnlichen Antikörperverlauf bei beiden Gruppen zeigen auch Hunde geimpft mit RecombitekLyme, nur erreicht auch Gruppe B nach acht Monaten Ausgangswerte von unter 100 KELA. Bei den beiden Lysatimpfstoffen Merilym und LymeVax zeigt sich der Effekt der dritten Immunisierung in höheren Maximalwerten, die im Falle von Merilym auch zu einem deutlich verzögerten Antikörperabfall führen. Bei der Verwendung von ProLyme ist kein Unterschied zwischen den Gruppen zu sehen.

Bezüglich der Auffrischungsimpfung wird bei den drei Lysatimpfstoffen ein Bereich nahe des nach Grundimmunisierung entwickelten Maximums erreicht. Nur bei ProLyme und den Hunden der Gruppe A bei RecombitekLyme zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Maximalwerte nach der Booster-Immunisierung.

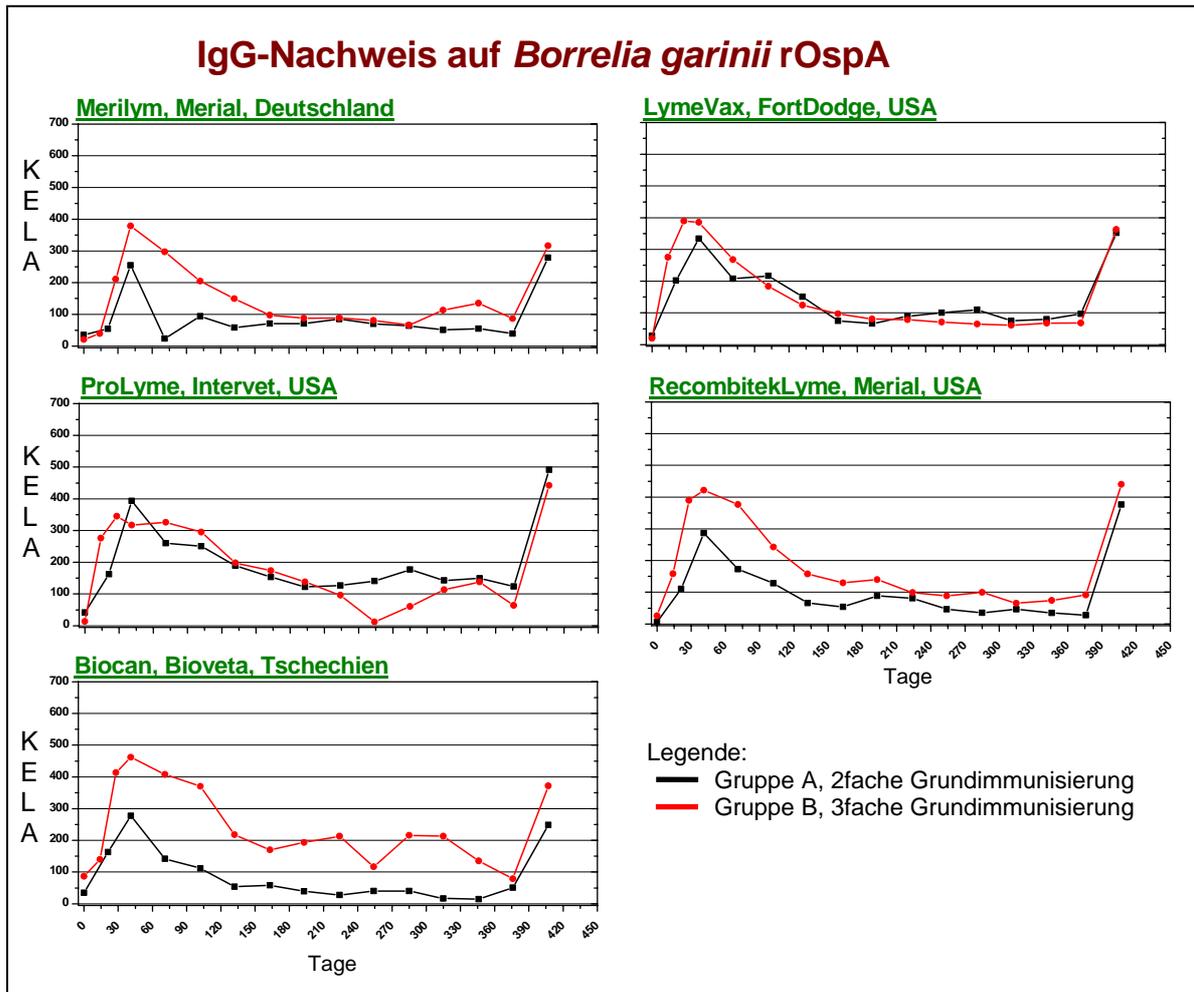


Abbildung 19

Darstellung der durch die Impfung induzierten Antikörper nachgewiesen mit *B. garinii* rOspA

4.6.1.3 Verwendung von *B. afzelii* rOspA

Um die Fragestellung nach der Kreuzreaktivität zu einem vollständigen Abschluss zu bringen, erfolgte eine Wiederholung des im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen ELISA mit einer Beschichtung ausschließlich mit rekombinantem OspA der Spezies *B. afzelii*.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse in Abbildung 20 wird ein, mit Ausnahme von mit LymeVax geimpften Hunden, niedriger Titerverlauf deutlich, der von Maximalwerten zwischen 200 und 350 KELA begleitet ist. Merilym zeigt hier bei beiden Gruppen einen kurzen Anstieg, um dann innerhalb von drei Monaten annähernd auf Ausgangswerte zurückzufallen. Ein wenig verzögert, aber durchaus dem von Merilym entsprechend, verhält sich der Kurvenverlauf bei der Anwendung von RecombitekLyme. Hier erfolgt der Abfall innerhalb von fünf Monaten. LymeVax geimpfte Hunde haben, im Vergleich zur Verwendung von rOspA stammend aus *B. garinii* als

Detektionsantigen, einen höheren Titerverlauf. Beginnend mit höheren Spitzenwerten fallen die Antikörperspiegel langsamer ab und bezüglich Gruppe B erreichen sie erst kurz vor der Auffrischungsimpfung den Bereich von etwa 100 KELA. ProLyme geimpfte Hunde verhalten sich wie auch auf dem mit *B. garinii* rOspA beschichteten ELISA, nur tendenziell etwas niedriger im Antikörpertiterverlauf, was sich auch bei der Verwendung von Biocan zeigen lässt. Die Kurvenverläufe verhalten sich gleich, der Titer verläuft niedriger.

Ebenso wie sich bei einigen Impfstoffen die Kurvenverläufe ähneln, verhält es sich auch bei der Auffrischungsimpfung. Bei den drei Lysatimpfstoffen liegen die erreichten Spitzenwerte, mit zwei Ausnahmen, auf Höhe des Maximums nach Grundimmunisierung. Bezüglich der beiden rekombinanten Impfstoffe gehen die Werte, diesmal unabhängig vom verwendeten Impfbegriff, über die Maximalwerte des ersten Jahres hinaus. Dies lässt sich auch bei mit LymeVax geimpften Hunden der Gruppe B und Hunden der Gruppe A nach Anwendung von Merilym zeigen.

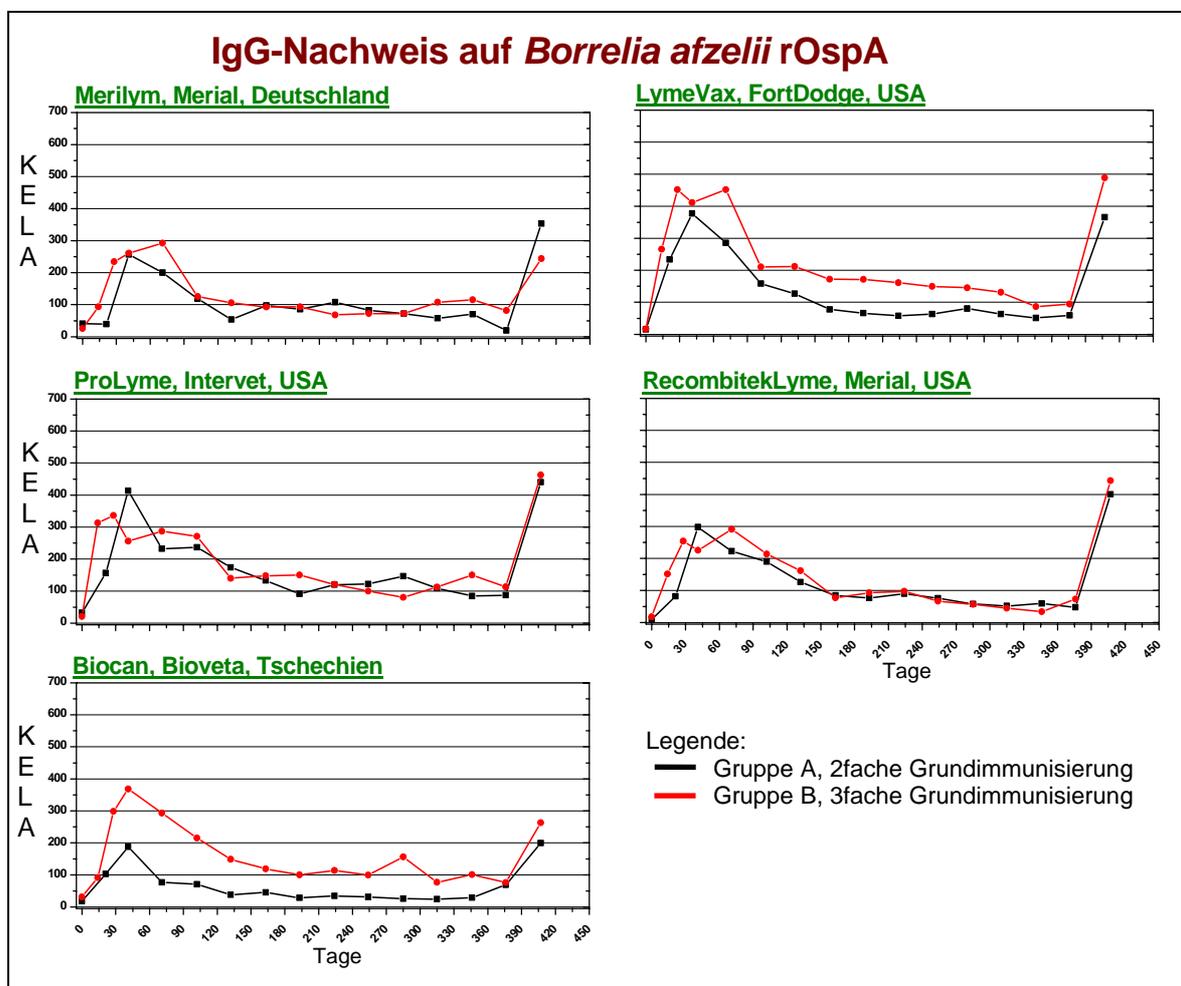


Abbildung 20

Darstellung der durch die Impfung induzierten Antikörper nachgewiesen mit *B. afzelii* rOspA

4.6.2 Western Blot Ergebnisse nach Verwendung von *B. garinii* und *B. afzelii* Antigenen

Nach der Untersuchung der drei verschiedenen Impfstoffgruppen auf jeweils einem Western Blot beschichtet mit *B. burgdorferi* s. s. Antigenen, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, erfolgte nun die Analyse der Seren im Western Blot auf *B. garinii* und *B. afzelii* Antigenen. Zunächst wurde das Serum des zweifach mit Merilym geimpften Hundes auf die Reaktion gegenüber *B. garinii* Oberflächenstrukturen (Abbildung 21), sowie *B. afzelii* Oberflächenstrukturen (Abbildung 22) hin untersucht.

Es wird deutlich, dass in Abbildung 21 mehr Banden sichtbar sind als in Abbildung 12 und auch 22. Dies zeigt sich bereits zur Voruntersuchung (Probe 0), wobei die hier nachgewiesenen Banden unspezifisch sind und somit in keinem Zusammenhang mit einer Borrelioseinfektion gesehen werden müssen. Es handelt sich unter anderem um Flagellin, welches viele Bakterien besitzen, häufig werden Antikörper gegen diese Struktur gebildet. Die durch die Impfung induzierten Antikörper erreichen eine vorläufig maximale Intensität zum Zeitpunkt der Probe 2, nach Abschluss der Grundimmunisierung, um dann sowohl in der Anzahl als auch in der Deutlichkeit abzunehmen, bis bei der Probe 14, nach der Auffrischungsimpfung, die meisten und auch farbintensivsten Banden erscheinen. Diese liegen bei p14, OspC, OspA, OspB, p39 und Flagellin. Es folgt ein nicht näher charakterisierbarer Bereich zwischen 45 und 66 kDa, eine Reaktion auf p66 und abschließend eine Bande bei p83.

Betrachtet man nun vergleichend Abbildung 22, also die Analyse desselben Serums diesmal auf *B. afzelii* Antigenen, so fällt als Erstes auf, dass sich wesentlich weniger Banden darstellen, die auch eine schwächere Färbung aufweisen. So sind bei OspC, OspA, OspB, 43 kDa, und zwischen 60 und 70 kDa einige wenige sichtbar, die zum Zeitpunkt der Probe 2 die stärkste Intensität besitzen, und anschließend innerhalb von zwei Monaten, ausgenommen einer Bande, gänzlich verschwinden. Über einen längeren Zeitraum bleibt die Reaktion gegen OspB bestehen, diese Bande ist auch zur Probe 7 und auch 8 noch schwach sichtbar. Mit der Auffrischungsimpfung, deren Effekt sich in Probe 14 widerspiegelt, wird keine Zunahme der Bandenanzahl erreicht, sondern nur eine stärkere Intensität des Signals.

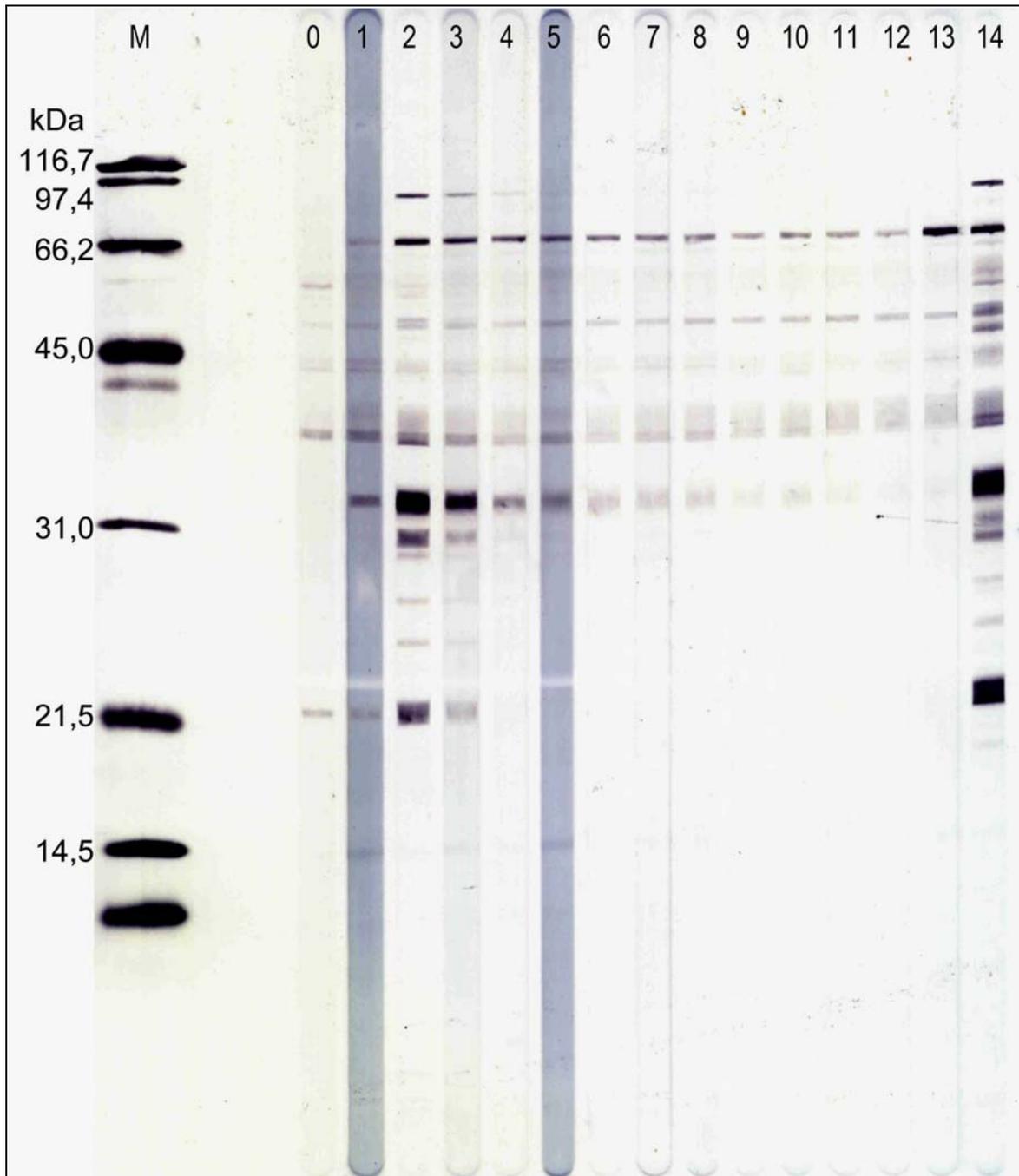


Abbildung 21

Die Antikörperproduktion eines zweifach mit Merilym geimpften Hundes dargestellt auf *B. garinii* PBi Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-12: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

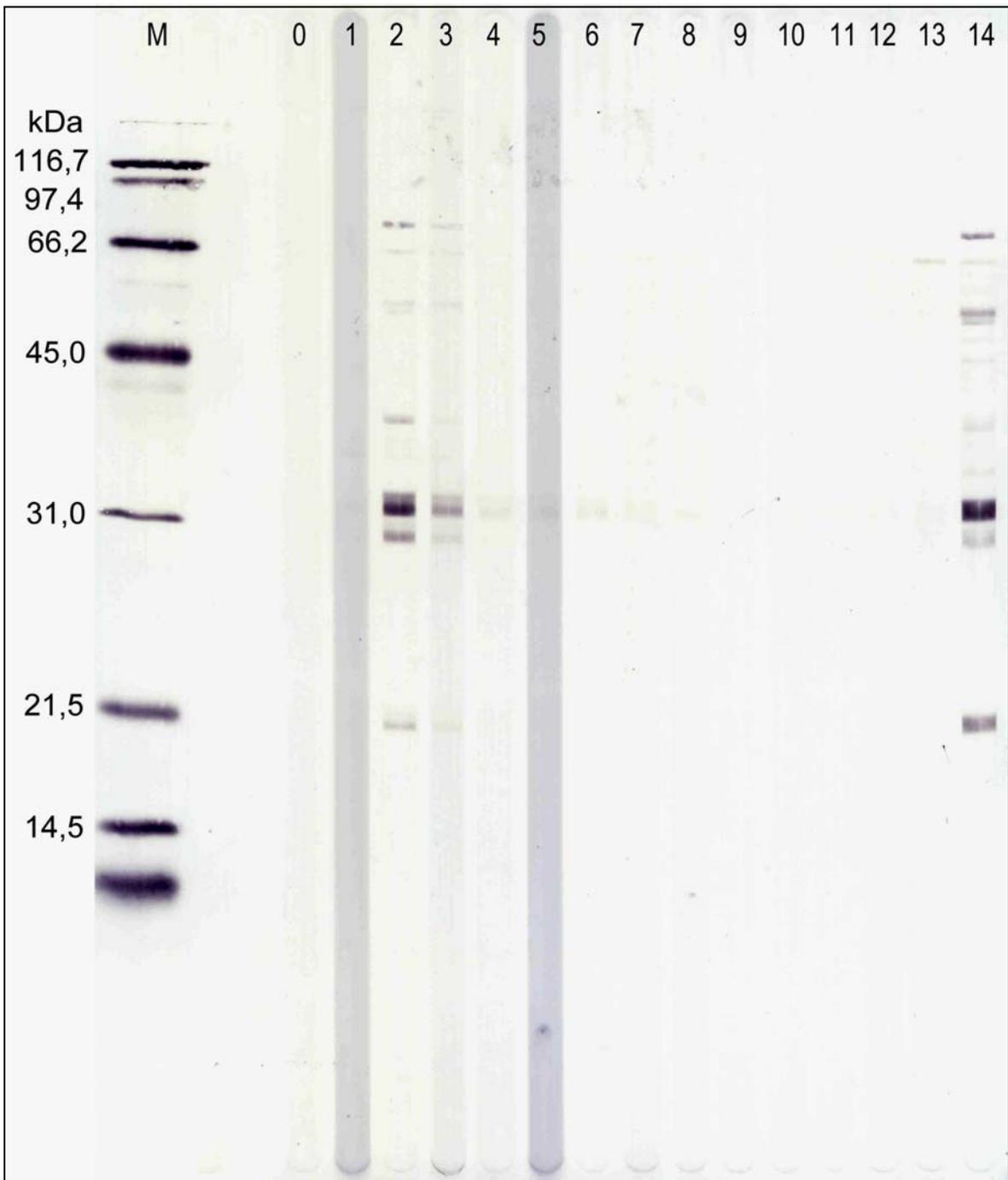


Abbildung 22

Die Antikörperproduktion eines zweifach mit Merilym geimpften Hundes dargestellt auf *B. afzelii* PKo Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-12: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

Nachdem die mithilfe eines *B. burgdorferi* s. s. Lysatimpfstoffes induzierten Antikörper auf ihre Bindungsfähigkeit gegenüber heterologen Antigenen hin untersucht wurden, schloss sich die Analyse eines mit ProLyme geimpften Hundes an. Abbildung 23 zeigt das Serum des geimpften Hundes auf *B. garinii* Antigenen, Abbildung 24 stellt die Bindungsfähigkeit der Antikörper bezüglich *B. afzelii* dar. Es zeigt sich, dass die Impfung mit einem rekombinanten OspA Impfstoff nur eine deutliche OspA-Bande induziert. Es sind jedoch sowohl bezüglich *B. garinii* als auch *B. afzelii* Antigenen bei der Probe 0, deren dunkle Färbung von einer hämolytischen Serumprobe herrührt, vor der ersten Impfung einige Banden sichtbar, die sich im Falle von *B. garinii* auch zum Teil über den Verlauf des Jahres wieder finden. Diese sind sehr schwach und können mit einem typischen Bandenmuster nach Kontakt mit Borrelienproteinen nicht in Verbindung gebracht werden. Vergleicht man die OspA-Bande, die bei der Verwendung von *B. garinii* Antigenen (Abbildung 23) entsteht mit der entstanden nach Verwendung des homologen *B. burgdorferi* s. s. Antigens in Abbildung 13, so wird der starke Verlust der Bandenintensität auffällig. Die sonst prominente, intensiv gefärbte OspA-Bande wird durch die Verwendung der heterologen Antigene zu einer schwachen, schmalen Reaktion auf dem Western Blot. Diese schwache Anfärbung wird noch um ein Vielfaches deutlicher bei der Verwendung von *B. afzelii* Antigenen (Abbildung 24). Es zeigt sich, dass die Banden wesentlich deutlicher auf *B. garinii* Antigenen hervortreten als bei *B. afzelii*. Während in Abbildung 23 zum Zeitpunkt der Probe 2 eine deutlich sichtbare OspA-Bande erscheint, die über den Verlauf des ganzen Jahres erhalten bleibt und nach Auffrischungsimpfung bei Probe 14 wesentlich an Intensität zunimmt, verhält es sich bei Abbildung 24 nicht so. Hier wird während des Jahres kaum eine Bande deutlich, erst nach der Auffrischungsimpfung erreicht die OspA-Bande eine stärkere Färbung. Die stärkere Reaktion der durch die Impfung induzierten Antikörper auf den *B. garinii* Antigenen zeigt sich auch im Nachweis der entstandenen Antikörper gegen Spaltprodukte von OspA, sichtbar an den weiteren Banden unter anderem im Bereich von 20 kDa.

Zum Abschluss der Serumanalysen kamen zwei Western Blot zum Einsatz, die die Bindungsfähigkeit von durch Biocan induzierte Antikörper gegenüber homologen Antigenen zeigen sollten. Wiederum wurden beide Spezies als Antigenpräparation verwendet, in Abbildung 25 sieht man die Reaktion eines mit Biocan geimpften Hundes auf *B. garinii* Antigenen, in Abbildung 26 das gleiche Serum untersucht mit *B. afzelii* Antigenen.

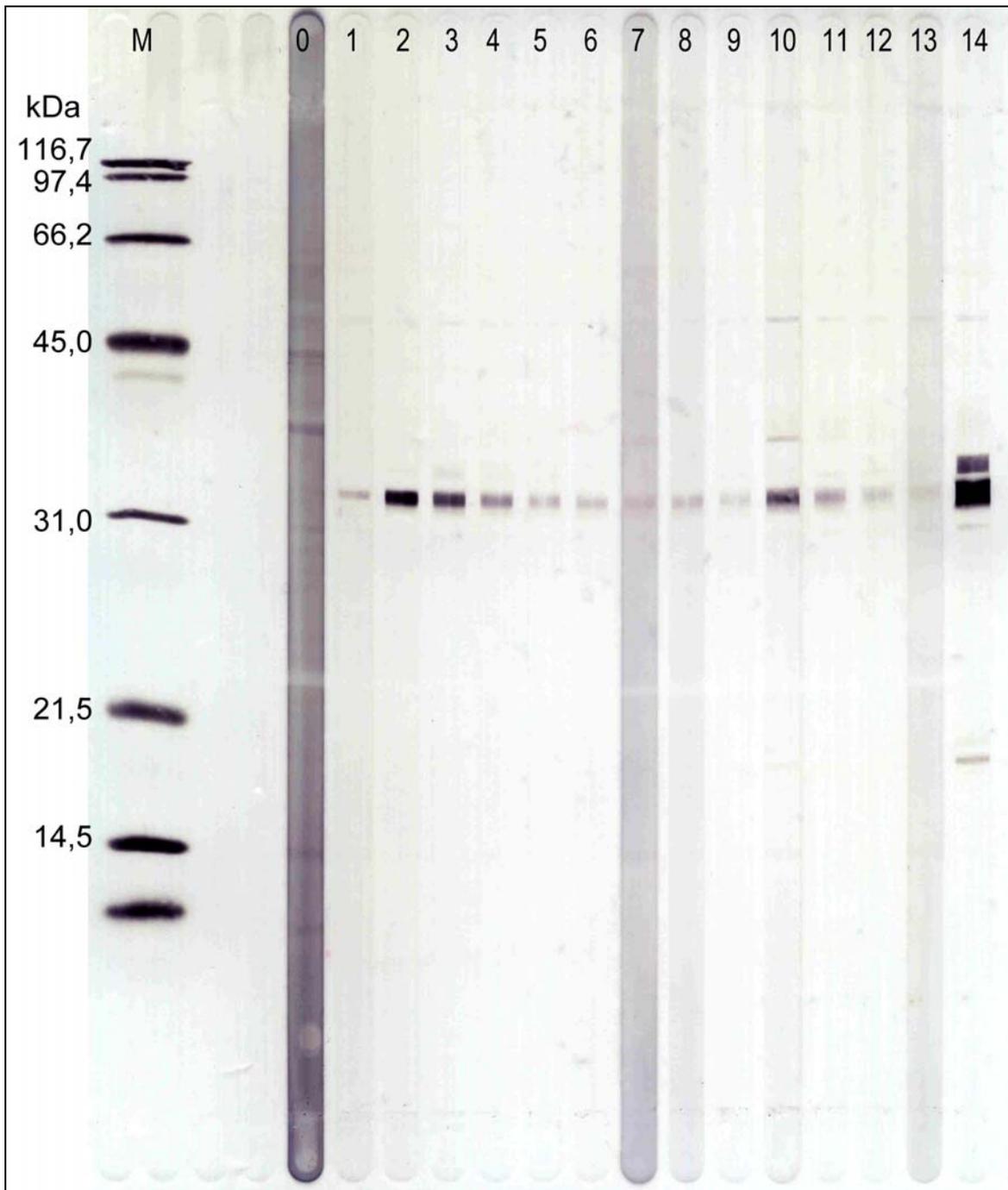


Abbildung 23

Die Antikörperproduktion eines zweifach mit ProLyme geimpften Hundes dargestellt auf *B. garinii* PBi Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-12: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

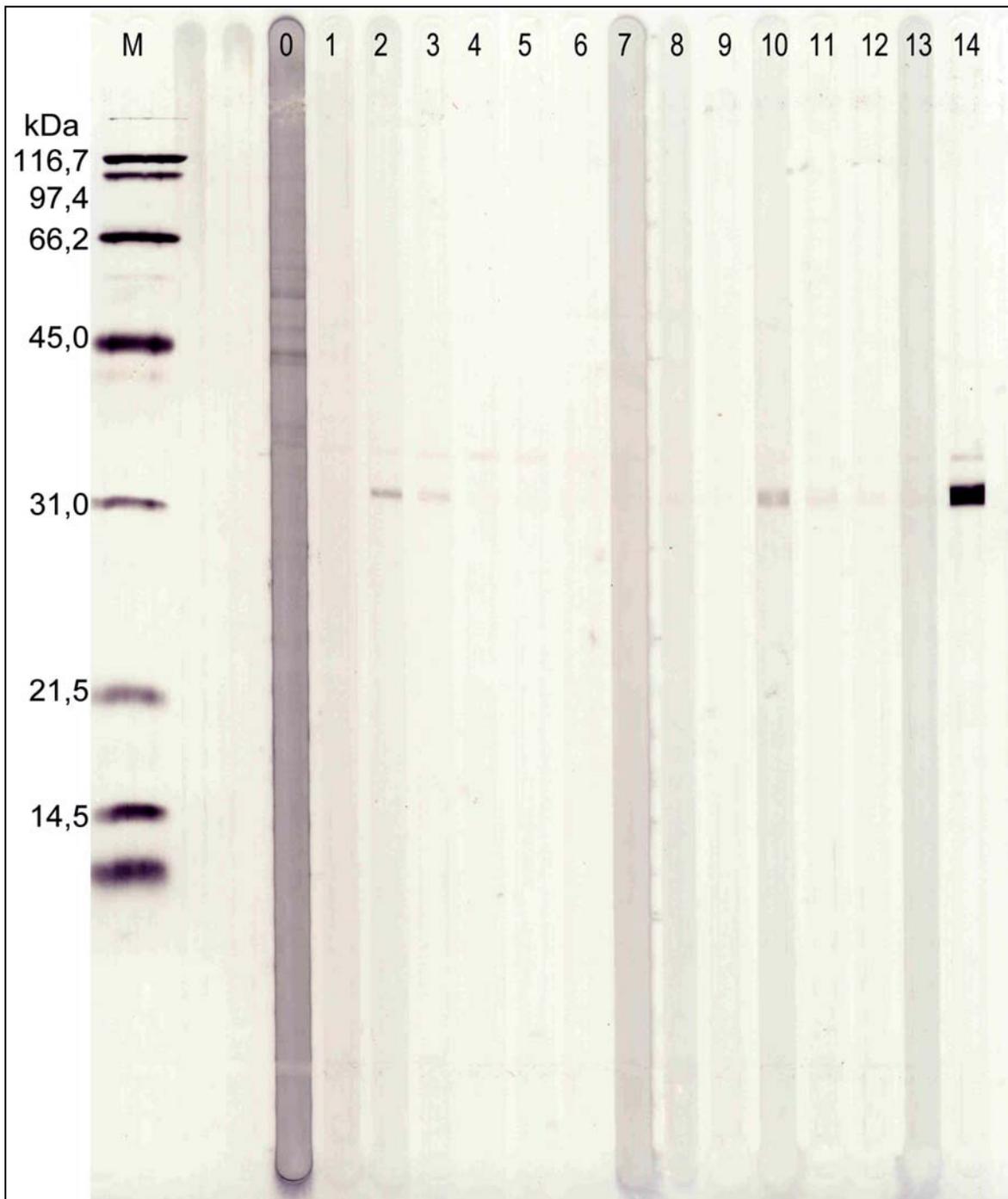


Abbildung 24

Die Antikörperproduktion eines zweifach mit ProLyme geimpften Hundes dargestellt auf *B. afzelii* PKo Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-12: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

Bei der Betrachtung der Darstellung 25 zeigt sich ein bandenreiches, intensiv gefärbtes Muster, welches Antikörperbindungen im Bereich von 10 kDa, OspC, 30-36 kDa, p39 und Flagellin, 45-66 kDa und p83 nachweist. Auffällig wird hierbei jedoch, dass keine eindeutige OspA-Bande sichtbar wird. Betrachtet man im Vergleich dazu noch mal Abbildung 14, so zeigt sich zwar die deutliche Zunahme nachweisbarer Banden, aber OspA kann auch durch die Verwendung des homologen Antigens nicht gezeigt werden. Wie bereits bei den vorangegangenen Western Blot tritt die stärkste Färbung einen Monat nach der Grundimmunisierung (Probe 2) auf, nimmt kontinuierlich ab, um nach der Auffrischungsimpfung wieder zuzunehmen.

Die Intensität der Probe 2 wird durch die Booster-Immunsierung nicht erreicht, Probe 14 reagiert schwächer. In den Serumproben stellt sich die Bande in Höhe von 41 bis 43 kDa dominant dar, sie bleibt auch über den Zeitraum des gesamten Jahres erhalten, während andere teilweise gänzlich verschwinden. Ein weit weniger bandenreiches und dunkles Muster tritt bei *B. afzelii* (Abbildung 26) auf, es lassen sich nunmehr im Bereich von 10 kDa, OspC, 31-33 kDa, OspB, p39 und Flagellin, 45 kDa und circa 60 kDa Antikörperbindungen anfärben. Wie auch schon im vorangegangenen Blot dominiert die Bande bei 41 bis 43 kDa, die auch als Einzige das Jahr über erhalten bleibt. Eine Reaktion auf OspA kann, wie bereits bei den beiden anderen Antigenpräparationen, nicht gezeigt werden. Alle Banden bis auf die Reaktion bei 41 bis 43 kDa verschwinden mit der Zeit. Die Auffrischungsimpfung bewirkt zwar eine Zunahme der Färbung, allerdings wird die Intensität zum Zeitpunkt nach der Grundimmunisierung nicht mehr erreicht.

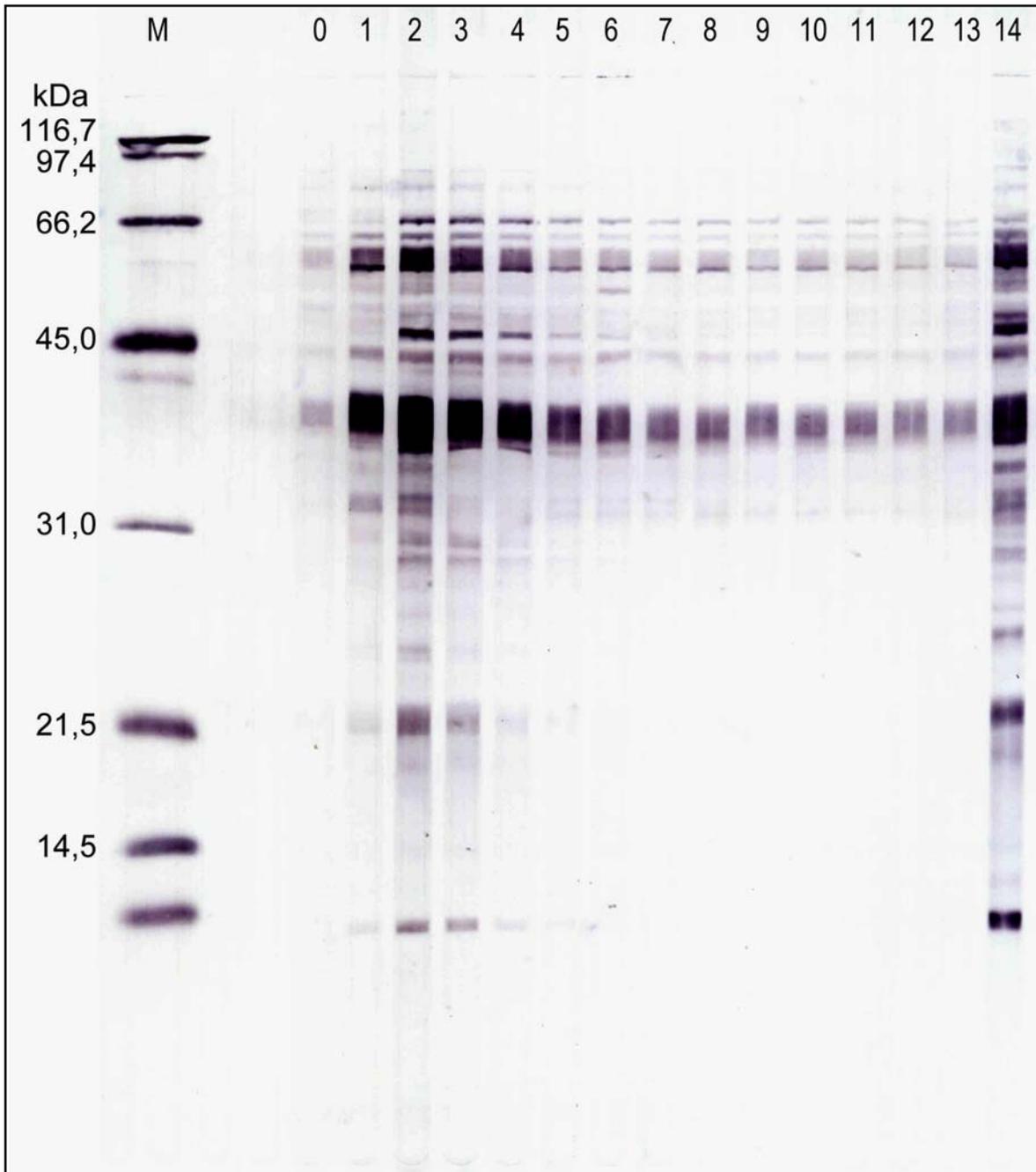


Abbildung 25

Die Antikörperproduktion eines zweifach mit Biocan geimpften Hundes dargestellt auf *B. garinii* PBi Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-12: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

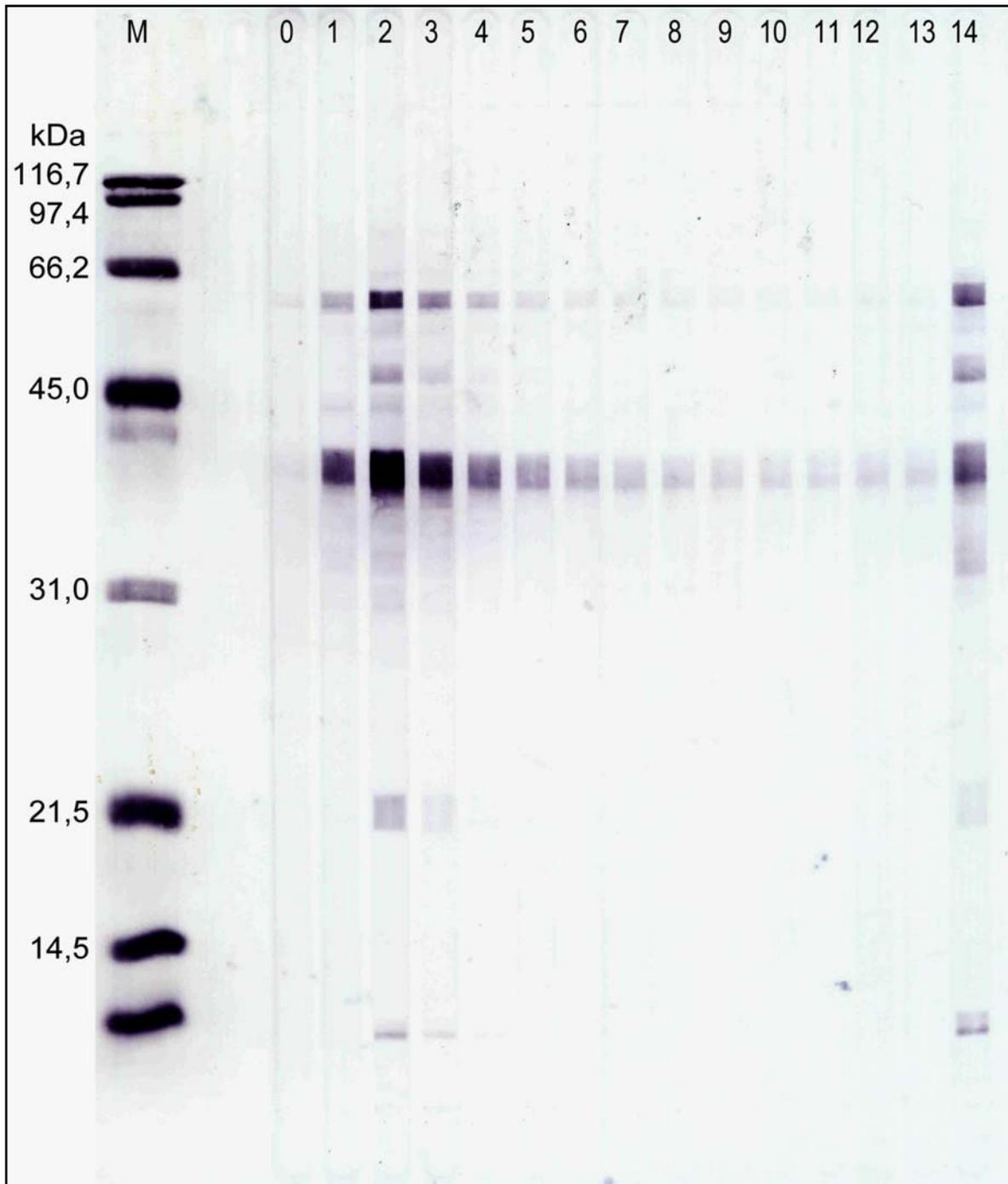


Abbildung 26

Die Antikörperproduktion eines zweifach mit Biocan geimpften Hundes dargestellt auf *B. afzelii* PKo Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-12: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

4.7 Nachweis von Infektionen nach der Impfung gegen *B. burgdorferi* s. l.

4.7.1 ELISA-Ergebnisse

Erste Hinweise auf eine Infektion, die sich nach der Impfung ereignet hat, lieferte der ELISA auf *B. burgdorferi* s. s. Antigenen. Wie in Abbildung 27 deutlich wird, zeigte ein Hund einen atypischen Antikörperverlauf. In der folgenden Darstellung sind drei Hundeseren im Verlauf eines Jahres aufgezeigt, die alle dreimal mit dem rekombinant hergestellten OspA-Impfstoff RecombitekLyme vakziniert wurden.

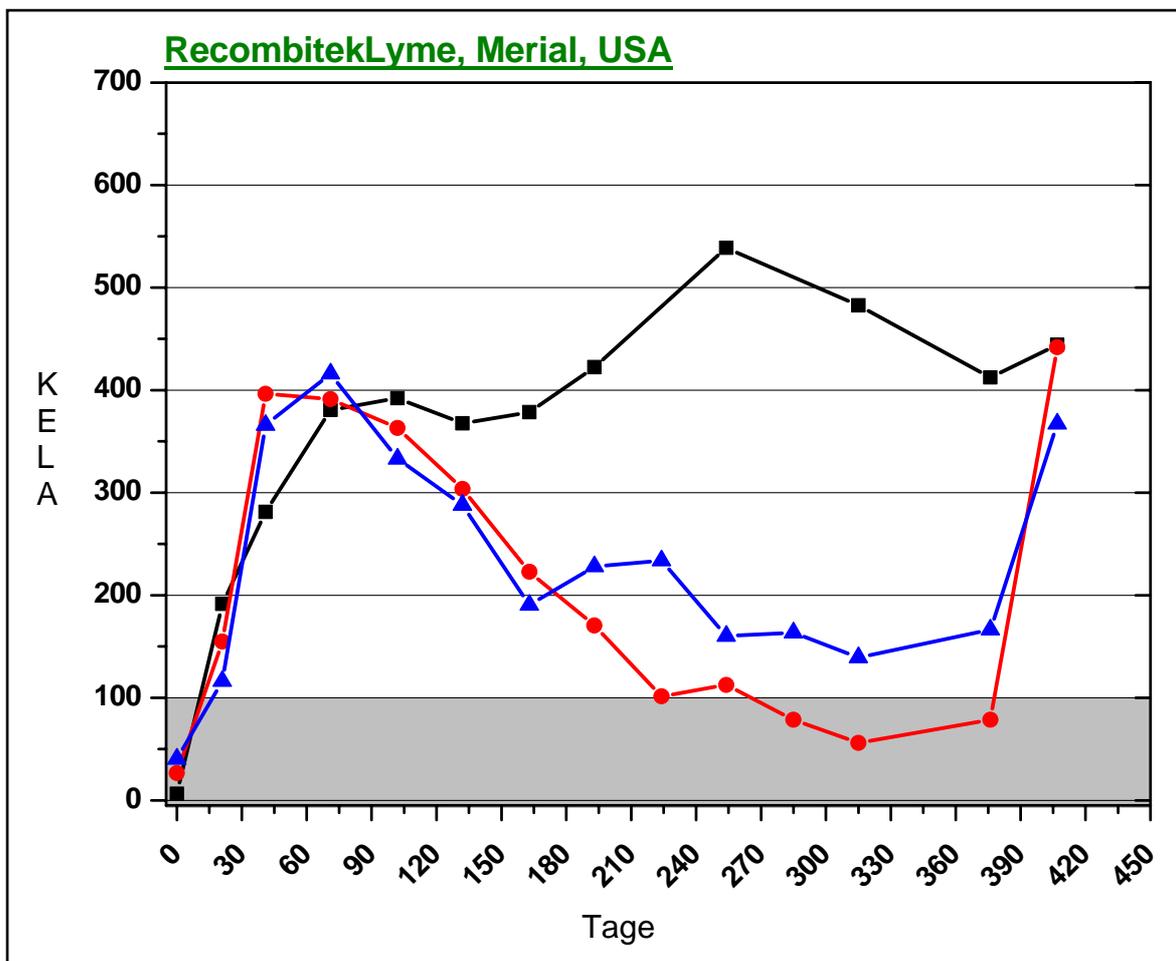


Abbildung 27

Darstellung dreier Antikörperverläufe nach Impfung mit RecombitekLyme nachgewiesen mit *B. burgdorferi* s. s. Antigenen

- Serum des Hundes KHT-156
- Serum des Hundes KHT-183
- Serum des Hundes KHT-185
- Bereich bis 100 KEL A, umfasst die Werte für eine negative Beurteilung der Probe

Während die Hunde KHT-183 und KHT-185 den für den Impfstoff typischen Antikörperverlauf zeigen, charakterisiert durch einen Anstieg der borrelienspezifischen Antikörper nach Grundimmunisierung mit darauf folgendem raschem Abfall, verhält sich der Hund KHT-156 anders. Bei diesem Tier kommt es nach Grundimmunisierung zu einem ganz leichten Rückgang des Antikörperspiegels, was sich im Laufe der nächsten zwei Monate umkehrt und zu einem steten Anstieg führt, bis ein Wert von über 500 KELA erreicht wird. Daran wiederum schließt sich ein leichter Rückgang an, wobei der Spiegel jedoch nicht unter 400 KELA fällt. Durch die Auffrischungsimpfung kommt es anschließend zu einem erneuten ganz leichten Anstieg.

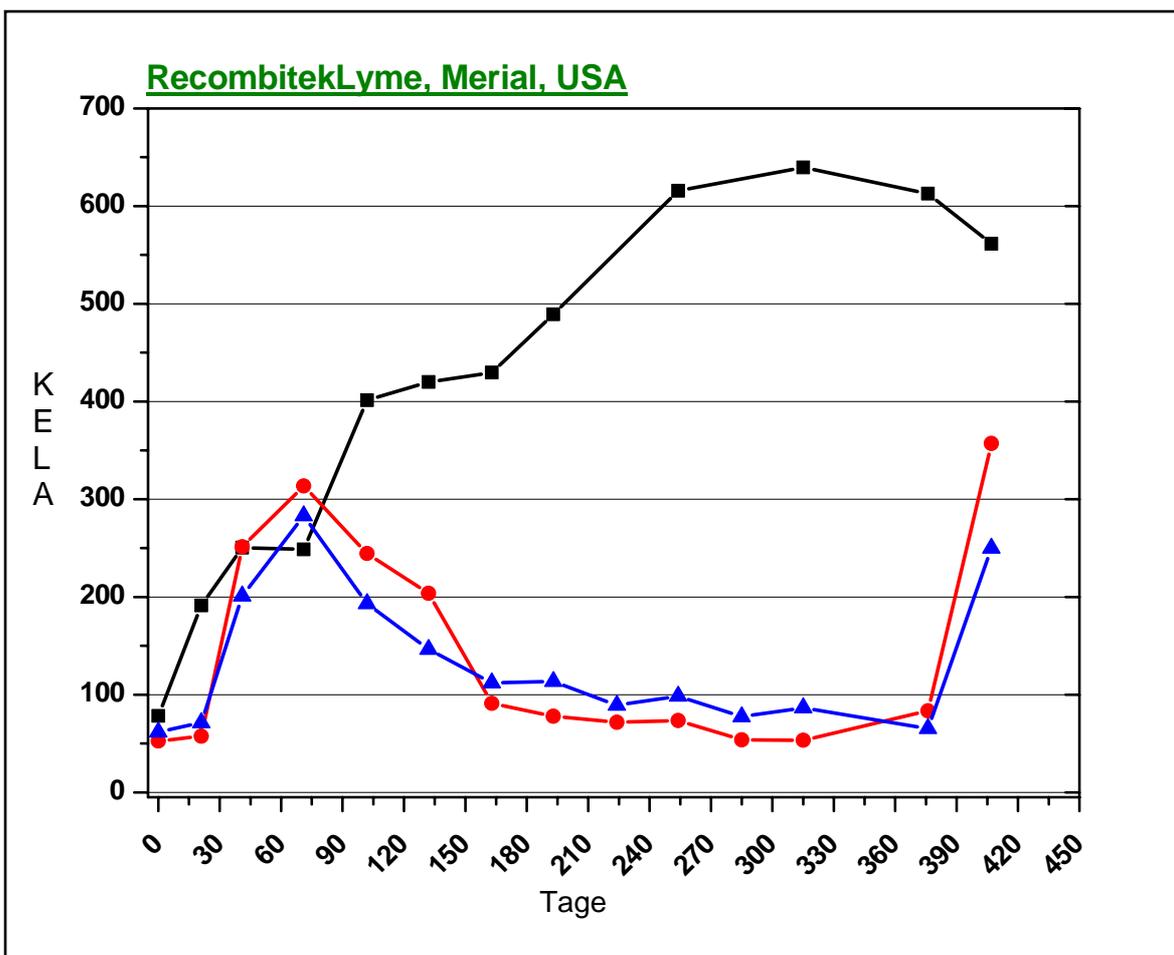


Abbildung 28

Darstellung dreier Antikörperverläufe nach Impfung mit RecombitekLyme nachgewiesen mit *B. garinii* und *B. afzelii* Antigenen

- Serum des Hundes KHT-156
- Serum des Hundes KHT-183
- Serum des Hundes KHT-185

Der Hund war während der Impfstudie klinisch unauffällig, daher gab es bis zur Analyse der Serumproben keinen Anlass, eine Borrelieninfection zu vermuten. Nach diesem überraschenden Ergebnis wurde das Serum des Hundes in einem aus *B. garinii* und *B. afzelii* Lysat bestehenden ELISA wiederholt untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 28 aufgezeigt. Wiederum sind die Seren der Hunde KHT-183 und KHT-185 als Referenz mit aufgetragen. In diesem Grafen zeigt sich bereits 2 Monate früher, zum Zeitpunkt der 5. Blutentnahme, ein rasanter Anstieg des Antikörperspiegels, der sogar über 600 KELA hinausgeht. Es kommt auch erst im Monat der Auffrischungsimpfung zu einem Abfall der Antikörper, der durch die Impfung nicht beeinflusst wird, sondern sich stattdessen fortsetzt.

Bei keinem weiteren Hund gab es aufgrund eines atypischen Kurvenverlaufs Hinweise auf eine Infektion.

4.7.2 Western Blot Ergebnisse

Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen führten zur Durchführung von drei Western Blot, in denen durch die Verwendung aller drei Spezies eine genaue Charakterisierung der durch die Infektion gebildeten Antikörper möglich werden sollte. Zunächst kam ein Western Blot beschichtet mit *B. burgdorferi* s. s. Antigenen zum Einsatz, dargestellt in Abbildung 29. Diese Vorgehensweise war essenziell, denn nur über den Western Blot lässt sich eine Infektion zweifelsfrei nachweisen.

Bis zur Probe 2 zeigt sich ein Bild, wie es auch bereits in Abbildung 13 beschrieben wurde. Neben zwei uncharakteristischen Banden, die beginnend mit der Probe 0 auftreten, entwickeln sich nur die OspA-Bande und eine Schwache im Bereich von 20 kDa, die Reaktion auf ein OspA-Spaltprodukt. Zum Zeitpunkt der Probe 3 jedoch entwickeln sich bereits weitere Banden, die im Verlauf in ihrer Zahl weiter zunehmen und auch stärker in ihrer Färbung werden. Dazu zählen die Banden im Bereich von OspC, p30, OspB, 45 kDa, p39 und Flagellin sowie mehrere Banden zwischen 55 und 90 kDa. Die Bandenintensität nimmt ab und bis auf die für die Impfung charakteristische OspA-Bande in Höhe von 31-33 kDa, die in ihrer Intensität stark zunimmt, bleiben die Banden auch nach der Auffrischungsimpfung schwächer gefärbt. Ebenso verhält es sich bei der Verwendung von *B. garinii* Antigenen, dargestellt in Abbildung 30. Hier treten die ersten zusätzlichen Banden zum Zeitpunkt der Probe 4 auf, was sich mit den ELISA-Ergebnissen deckt. Zu den Banden zählen OspC, p30, p39 und Flagellin bei 41 kDa, eine Bande bei 45 kDa und im Bereich 50 bis 80 kDa. Die Bandenintensität nimmt zu, um im Bereich der Proben 9 und 11 ein Maximum zu erreichen. Anschließend wird die Intensität aller Banden, bis auf die OspA-Bande, welche nach der Auffrischungsimpfung wieder deutlich sichtbar ist, schwächer. Diese Intensitätsschwankungen entsprechen denen des ELISA.

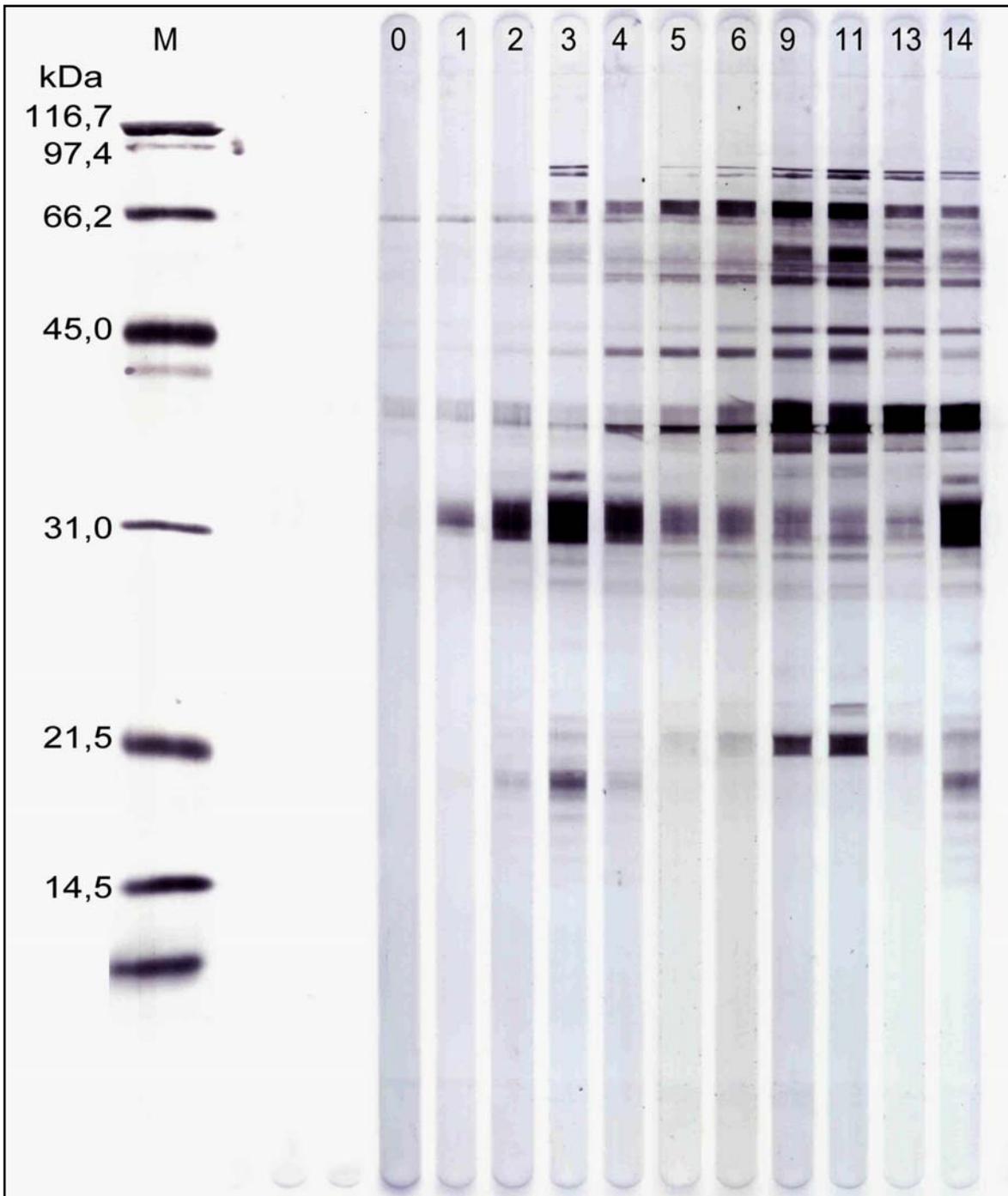


Abbildung 29

Die Antikörperproduktion des dreifach mit RecombitekLyme geimpften Hundes KHT-156 dargestellt auf *B. burgdorferi* s. s. N40 Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-11: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

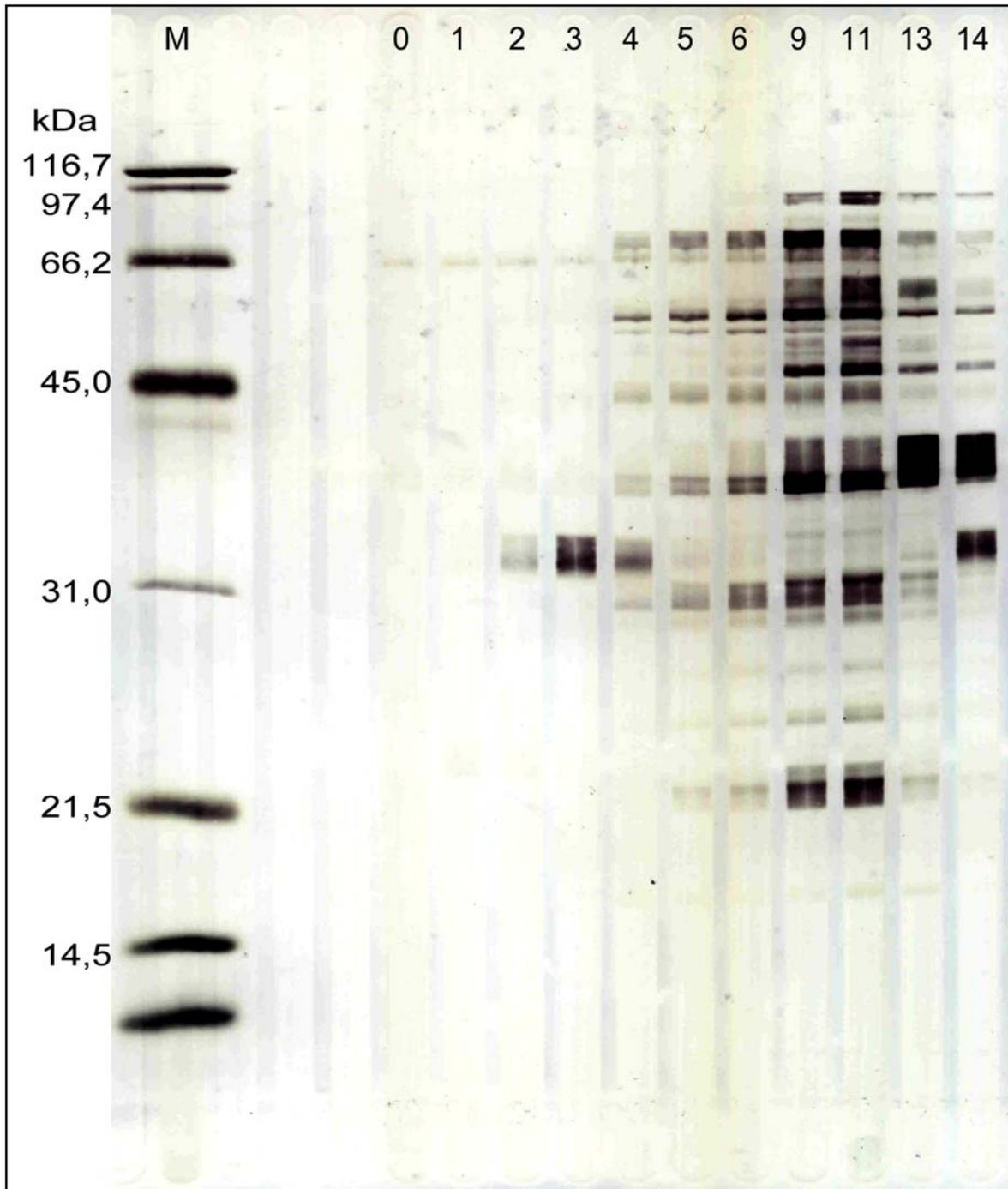


Abbildung 30

Die Antikörperproduktion des dreifach mit RecombitekLyme geimpften Hundes KHT-156 dargestellt auf *B. garinii* PBi Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-11: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

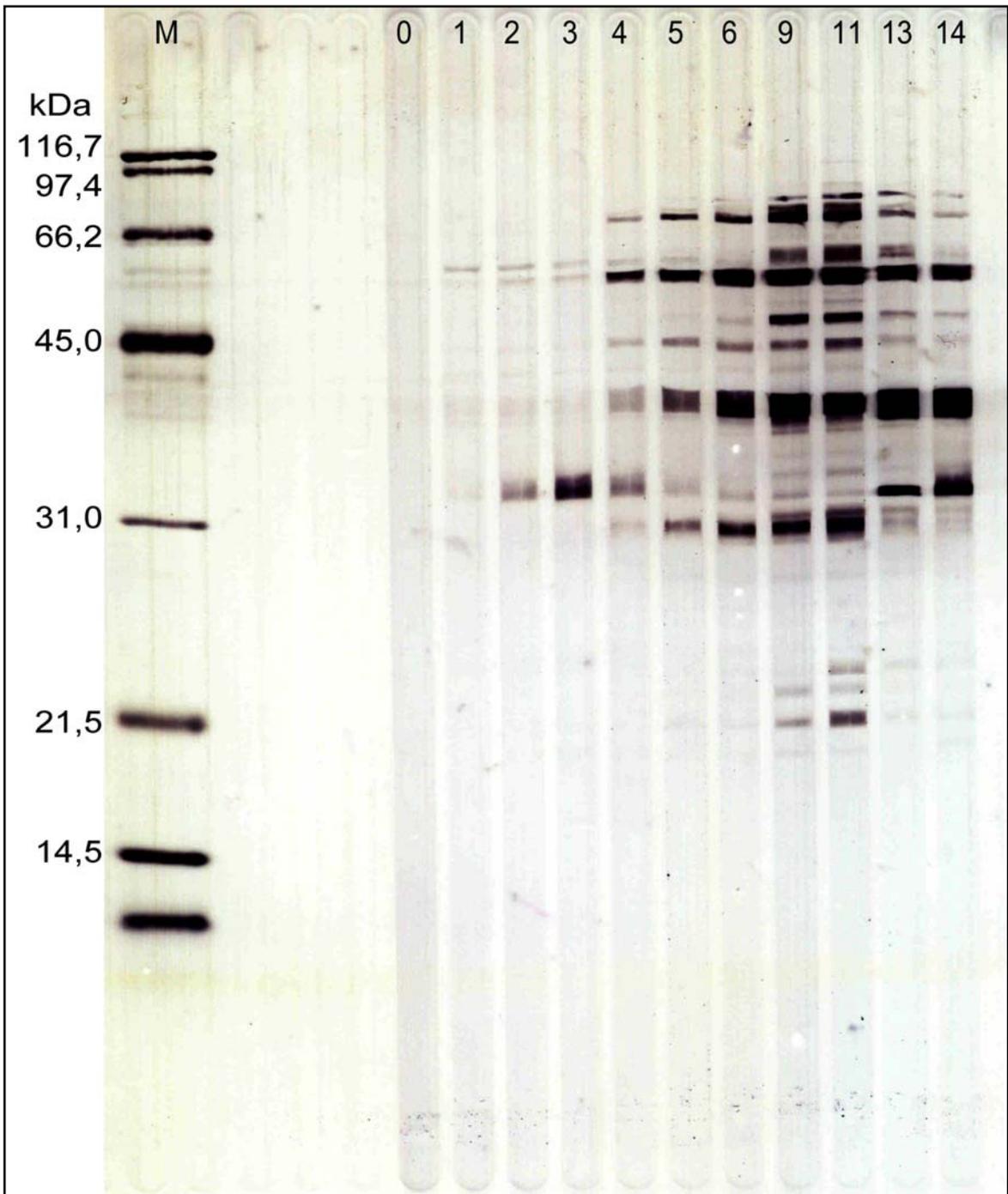


Abbildung 31

Die Antikörperproduktion des dreifach mit RecombitekLyme geimpften Hundes KHT-156 dargestellt auf *B. afzelii* PKo Antigenen

- M: Marker
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: Zeitpunkt der zweiten Impfung
- 2: einen Monat nach der zweiten Impfung
- 3-11: monatliche Blutentnahmen
- 13: Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung
- 14: letzte Blutentnahme, einen Monat nach Auffrischungsimpfung

Betrachtet man nun denselben Hund auf einem Western Blot beschichtet mit *B. afzelii* Antigenen, so wiederholt sich das Bild. Dargestellt in Abbildung 31 zeigt sich ab Probe 4 eine Zunahme der Anzahl und der Färbung der Banden, mit Ausnahme der 31-33 kDa Bande, OspA, um im Bereich der Proben 9 und 11 die stärkste Intensität zu erreichen. Dazu zählt OspC sowie p30, p39, Flagellin, Banden bei 45 kDa und 50 bis 80 kDa. Bei dieser Spezies jedoch kommt es zum Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung (Probe 13) nicht bei allen Banden zu einem Nachlassen der Intensität, und die Auffrischungsimpfung ruft auch keine so starke Reaktion des OspA bei 31-33 kDa hervor.

4.7.3 C6-SNAP Test Ergebnisse

Bei der Betrachtung der ELISA-Kurvenverläufe der einzelnen Hunde ergab sich kein weiterer Verdacht auf eine nach Impfung aufgetretene Infektion. Allerdings ist eine ausschließliche Analyse der Antikörperverläufe im ELISA nicht ausreichend, um dies zweifelsfrei belegen zu können. Eine neue Methode, um Zeit sparend alle geimpften Hunde auf eine Infektion mit *B. burgdorferi* s. l. Organismen hin zu untersuchen, stellt der SNAP-Test dar, der uns durch die Firma IDEXX Laboratories, USA zur Verfügung gestellt wurde. Bei diesem Test ist es möglich, innerhalb von nur zehn Minuten spezifische Antikörper, die nach einer Infektion gebildet werden, nachzuweisen. Durch Impfung induzierte Antikörper werden bei Verwendung dieser Methode nicht erfasst, sodass nicht mit falsch positiven Ergebnissen durch kreuzreagierende Impfantikörper gerechnet werden musste. Durch den Einsatz von einem kleinen Peptid, dem so genannten C6, als Zielantigen für die im Hund gegebenenfalls gebildeten Antikörper, reagiert der Test nur bei infizierten Seren. Es konnte gezeigt werden, dass in Kultur lebende Borrelien kein C6 exprimieren. Demnach enthalten auch Lysatimpfstoffe kein C6 und können somit keine Antikörper gegen dieses Peptid induzieren. Auf diese Weise konnten vier Zeitpunkte eines jeden geimpften Hundes auf C6-Antikörper hin analysiert werden. Ausgewählt wurden die Probe 0, also der Status vor der ersten Impfung, des Weiteren Probe 3, da hier der höchste Titer nach Impfung erreicht wurde, Probe 12 oder 13, als Probe mit niedrigstem Antikörperspiegel und Probe 14 nach der Auffrischungsimpfung um eine abschließende Beurteilung durchführen zu können.

Es zeigt sich, dass von den 101 geimpften Hunden nur der bereits beschriebene Hund KHT-156 sich nach Impfung infizierte und bereits zum Zeitpunkt der Probe 3 positiv im SNAP-Test reagiert. Er wurde darauf hin aus der Gesamtbeurteilung der Impfverläufe heraus genommen.

5 Diskussion

VAN HOECKE *et al.* zeigten 1999 in einer groß angelegten Studie mit 800 Personen, dass durch eine dritte Gabe von rOspA im Rahmen einer Immunisierung gegen den Erreger der Lyme-Borreliose sechs Monate nach Beginn einer zweifachen Grundimmunisierung eine deutliche Steigerung des Anteils der geschützten Probandengruppe von 53 – 55% nach der zweiten Immunisierung auf 91 – 93% nach der dritten Immunisierung erzielt werden konnte. Aufgrund dieser Ergebnisse entwickelte sich die Fragestellung, ob auch in der Veterinärmedizin ein verändertes Impfschema angewendet werden sollte, um über eine dritte Antigengabe eine verlängerte Schutzwirkung in den geimpften Hunden zu erzielen. Durch die Verkürzung des Zeitintervalls zwischen der zweiten und dritten Antigengabe von fünf Monaten auf zwei bis drei Wochen sollte zudem ein Impfbegriff erprobt werden, welches die Anwendung der Impfstoffe in der Praxis erleichtert und so unter Umständen eine Akzeptanzsteigerung erreicht werden könnte. Aus diesen Überlegungen heraus entwickelte sich der Ansatz, die Immunreaktion der Hunde nach einer Impfung mit verschiedenen Impfstoffen gegen die canine Lyme-Borreliose verschiedenen Impfschemata folgend zu charakterisieren.

Die erste überraschende Schlussfolgerung der Studie ergab sich aus der Beurteilung der Ergebnisse der Voruntersuchungen. Der Infektionsstatus innerhalb der Hundepopulation kann regional abhängig bis zu 52% der Hunde betreffen (so gezeigt auf Rhode Island, USA) (HINRICHSSEN *et al.* 2001). Das Problem der Borreliose ist in Deutschland bisher jedoch als eher gering eingeschätzt worden. Mithilfe des In-Haus ELISA und Western Blot konnte für die Region Sachsen jetzt eine Infektionsrate von 20,3% ermittelt werden. Dieser Prozentsatz ist höher als erwartet und führt zu der Schlussfolgerung, dass in Sachsen eine Infektion mit *B. burgdorferi* s. l. häufig erfolgt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass nicht jeder seropositive Hund eine Lyme-Borreliose entwickelt. Andere Wissenschaftler haben gezeigt, dass nur 5% der seropositiven Hunde eine klinische Symptomatik entwickeln (LEVY *et al.* 1992).

Weiterhin zeigte sich bei den Voruntersuchungen eine deutliche Diskrepanz zwischen den verwendeten Testsystemen. Betrachtet man das Mikrogen Testsystem, so reagieren 60% der Hundeseren positiv auf Borrelienantigene. Bei Verwendung des In-Haus-Verfahrens sinkt der Prozentsatz allerdings auf 22,2%, während der C6-ELISA, beruhend auf einem Nachweis einer Subpopulation von Antikörper spezifisch für akute Infektionen (PHILIPP *et al.* 2001), aus den 207 untersuchten Seren nur noch 5,3% für *B. burgdorferi* s. l. Antikörper positive Seren detektiert. Diese Differenz beruht zum Teil darauf, dass mit dem Mikrogen Testsystem und dem In-Haus-Verfahren auch geimpfte Tiere erfasst werden, die im C6-ELISA nicht nachgewiesen werden können. Dies bestätigte sich bei der Anwendung des C6-SNAP Testes bei 424 Seren von im Rahmen dieser Studie geimpften Hunden im Institut für Immunologie. Alle Serumproben nicht infizierter Hunde reagierten negativ. Werden die für Impfantikörper positiven Seren aus den

Berechnungen herausgenommen, so verbleiben im In-Haus-Verfahren die bereits erwähnten 20,3% der Hundeseren positiv. Eine Unterscheidung in geimpfte und infizierte Tiere ist mit dem Mikrogen Testsystem bei einzelnen Fällen nicht ohne weiteres möglich. Zwar sind rekombinante Proteine auf den Streifen aufgetragen, die eine Bindungsstelle für nach Impfung induzierte Antikörper darstellen, so zum Beispiel rekombinantes OspA. Jedoch sind die aufgetragenen Antigene allein nicht aussagekräftig, um die Diagnose einer vorliegenden Impfung stellen zu können. Vor allem für OspA-Antikörper wurde beschrieben, dass sie auch im Rahmen einer chronischen Borrelieninfektion nachweisbar sein können, ihre Detektion also nicht immer im Zusammenhang mit einer Impfung steht (LEVY et al. 1993a). Das im Institut für Immunologie eingesetzte Zwei-Stufen-System ermöglicht durch den Einsatz eines Lysats den Nachweis eines ganzen Bandenspektrums, welches in seiner Gesamtheit typische Muster ergibt. Anhand dieser Muster lassen sich dann Infektionen, Impfungen, sowie Infektionen in Kombination mit Impfungen nachweisen. Durch die zusätzliche Analyse der Seren im In-Haus-Verfahren konnten rückwirkend bei den 169 mit Mikrogen untersuchten Hunden zwei geimpfte Hunde nachgewiesen werden. Somit verringert sich der Prozentsatz auf 59,8%, dennoch bleibt die Zahl positiv getesteter Hunde sehr hoch. Dies begründet sich des Weiteren in der hohen Reaktivität des Testes, der bei der Anwendung mit einer raschen Entwicklung von zahlreichen Banden einhergeht. Zudem können mit diesem Testkit fragliche Ergebnisse erzielt werden, was den Einsatz zusätzlich erschwerte.

Die starke Reduktion der positiv reagierenden Seren durch die Anwendung des C6-ELISA wiederum begründet sich in den für den Test vorgesehenen Anwendungsgebieten. Dieser C6-ELISA wurde speziell für die Untersuchung antibiotisch versorgter, mit Borreliose infizierter Individuen entwickelt, um den Erfolg einer Antibiotikatherapie durch den Abfall der C6-Antikörper dokumentieren zu können (PHILIPP et al. 2001). So werden die durch dieses System nachgewiesenen Antikörper durch eine vor Testdurchführung zurückliegende Antibiose beeinflusst. Da zu Beginn der Studie noch keine Möglichkeiten für die Nutzung des C6-ELISA bestand, wurde auch kein Protokoll über kürzlich verabreichte Antibiotika geführt. Bei 207 untersuchten Hunden kann aber davon ausgegangen werden, dass das eine oder andere Tier vor der Blutentnahme mit Antibiotika behandelt wurde und demnach nur im Western Blot und nicht im C6-ELISA eine positive Reaktion aufweist. Da dieser besondere ELISA nicht für den Einsatz einer Diagnostik von Infektionen entwickelt wurde, ist das System nicht sehr sensitiv eingestellt. Durch die Anwendung im Bereich der Diagnostik werden durch die im Vergleich zum C6-SNAP Test niedrigere Sensitivität positive Proben nicht mehr vollständig erfasst, falsch-negative Ergebnisse sind die Folge. Demnach liegt die Zahl tatsächlich infizierter Tiere bei über 5,3%. Da es sich bei dem im Test verwendeten synthetischen C6 um eine hochkonservierte Struktur des VlsE handelt, welches auch zwischen den Spezies unverändert ist, scheint eine Kreuzreaktivität der durch verschiedene Borrelienspezies hervorgerufenen C6-Antikörper möglich. Demnach hat bei der Anwendung des Tests in Deutschland im Rahmen dieser Studie möglicherweise kein

Sensitivitätsverlust aufgrund verschiedener pathogener Spezies stattgefunden (LIANG et al. 2000a; MARQUES et al. 2002; ZHANG et al. 1997). Auch andere Studien konnten eine Seroprävalenz von um die 20% zeigen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Ergebnisse gewonnen mit dem In-Haus Zwei-Stufen-Test die reale Infektionsrate wiedergeben (CINCO et al. 2004; GOOSSENS et al. 2001).

Nach den Voruntersuchungen wurden 108 Hunde ausgewählt, die im Zwei-Stufen-Test seronegativ getestet worden waren und deren Besitzer bereit waren, ihre Hunde über die Dauer eines Jahres für die Blutentnahmen zur Verfügung zu stellen. Die Durchführung der folgenden Untersuchungen erfolgte mit dem In-Haus Verfahren, da sich dieses als zuverlässig und auch flexibel gezeigt hatte. Durch die Möglichkeit des Einsatzes von am Institut für Immunologie hergestellter Antigenpräparationen verschiedener Spezies konnte das Spektrum der Analysen erweitert werden und neben *B. burgdorferi* s. s. auch *B. garinii* und *B. afzelii* sowohl als Lysat als auch als rekombinantes OspA Antigen in die Studie mit aufgenommen werden. Dies wäre bei der Verwendung von Testkits nicht möglich gewesen. Die Seren der an der Studie teilgenommenen, geimpften Hunde wurden zunächst im ELISA untersucht, um die Gesamtantikörper messen zu können. Die anschließende Western Blot Analyse sollte das durch die Immunisierung im Hund induzierte Antikörperspektrum aufzeigen.

Die Seren zeigen zunächst Antikörpervläufe, die nach einer Impfung gegen Borreliose zu erwarten waren: Während der Impfungen kommt es zu einem Anstieg des Antikörperspiegels, der nach Abschluss der Grundimmunisierung ein Maximum erreicht, welches dann abfällt, um zum Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung wieder anzusteigen. Für die Beurteilung einer Borrelioseimpfung ist jedoch die genaue Charakterisierung der im Serum vorhandenen Antikörpermengen und deren Spezifität von Bedeutung. Dies begründet sich in der Einmaligkeit des Schutzmechanismus der Impfung.

Da Borrelien auf dem Weg vom Darm der Zecke zur Speicheldrüse und in das Gewebe des Wirtes eine Änderung ihrer Oberfläche vornehmen, sind durch Infektion gebildete Antikörper nicht gegen die in der Zecke vorhandenen Borrelien wirksam. Diese Antikörper allerdings sind auch nicht in der Lage, der Infektion Herr zu werden und die Erreger im Wirtsgewebe vollständig zu eliminieren (LEVY et al. 1993a). Durch die Impfung hingegen werden OspA-Antikörper im Wirt induziert, die gegen das von der in der Zecke befindlichen Borrelie exprimierte OspA wirksam sind. OspA ermöglicht es dem Erreger, sich an der Darmwand zu fixieren, dagegen gerichtete Antikörper blockieren die Wanderung von Borrelien in den Wirt und werden derzeit mit einem Schutz vor Infektion gleichgesetzt (CHU et al. 1992). Es ist also von größter Bedeutung, dass zu jedem Zeitpunkt eines Zeckenstiches eine ausreichende Menge an OspA-Antikörpern im Wirt zirkulieren. Dies stellt eine hohe Anforderung an die Impfung dar, da eine natürliche Auffrischung der Antikörperspiegel über den Kontakt des Wirtes mit dem Erreger nicht möglich ist. Für eine Aussage über die Wirksamkeit einer Borrelioseimpfung ist es demnach unerlässlich, die Menge an

Antikörpern zu evaluieren, die die Impfung über den Zeitraum eines Jahres induziert und welcher Art diese Antikörper sind.

Betrachtet man zunächst den Impfstoff Merilym, ein Lysatimpfstoff gewonnen aus *B. burgdorferi* s. s. mit Zugabe von Adjuvans, so lässt sich die positive Wirkung einer dritten Immunisierung zeigen. Durch eine zusätzliche Impfung im Rahmen der Grundimmunisierung können sowohl die maximalen Antikörperspiegel angehoben, als auch ein verzögerter Antikörperabfall herbeigeführt werden. Somit induziert Merilym durch die dritte Impfung in Gruppe B eine deutlich verlängerte Schutzwirkung gegenüber der nach dem Schema der zweifachen Grundimmunisierung behandelten Gruppe A. Betrachtet man nun noch die Auffrischungsimpfung, so erreichen Hunde der Gruppe B2 den höchsten Wert, was für eine im zweiten Jahr andauernde Schutzwirkung des Impfstoffes spricht. Einen Hinweis über den Einfluss der nach Auffrischungsimpfung erreichten Titerhöhe auf den Antikörperverlauf im zweiten Jahr liefert die Auswertung der über zwei Jahre beobachteten Beagles. Es zeigt sich, dass die beiden mit Merilym geimpften Hunde sich in Abhängigkeit des Impfregimes unterschiedlich verhalten und es durch die höheren Werte zum Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung in Gruppe B zu einem verzögerten Antikörperabfall über das Jahr hinweg kommt.

Die Analyse eines mit Merilym geimpften Hundes auf einem Western Blot verdeutlicht, dass die gebildeten Antikörper hier als Vertreter eines Lysatimpfstoffes eine Hauptfraktion von Antikörpern gegen OspA enthalten. Des Weiteren können Antikörper gegen OspC, OspB, Flagellin und im hochmolekularen Bereich p66 nachgewiesen werden, ein typisches Muster, welches nach der Impfung mit einem Lysatimpfstoff beobachtet werden kann (STRAUBINGER et al. 2001). Obwohl Antikörper gegen OspC vor allem nach Infektionen auftreten, da diese Oberflächenstruktur den Borrelien die Fortbewegung innerhalb der Zecke und auch den Übertritt in den Wirt ermöglicht, können sie auch nach einer Impfung beobachtet werden, wie es im Institut für Immunologie mehrfach festgestellt wurde.

Es zeigt sich bei Merilym, dass durch eine dritte Antigengabe im Rahmen der Grundimmunisierung, die in einem Abstand von wenigstens drei Wochen erfolgt, sowohl im ersten als auch im zweiten Jahr aufgrund der hohen Spitzenwerte ein verlängerter speziesspezifischer Schutz zu erwarten ist. Die Hauptfraktion der Antikörper induziert durch eine auf Borrelienlysate beruhende Impfung umfasst OspA.

Im Vergleich zu Merilym nimmt eine dritte Immunisierung bei LymeVax, dem zweiten aus *B. burgdorferi* s. s. und Adjuvans hergestellten Impfstoff, nicht derart Einfluss auf die Antikörpertiter und den Antikörperverlauf. Es zeigt sich kein Unterschied bezüglich der Antikörperspiegel zwischen den verschiedenen Impfstrategien. Auch im zweiten Jahr verhalten sich beide Gruppen annähernd gleich. Die Analyse eines mit LymeVax geimpften Hundes im Western Blot ergab ein dem Impfstoff Merilym entsprechendes Bild.

Bei dem dritten Lysatimpfstoff dieser Studie, gewonnen aus einer Mischung von *B. garinii* und *B. afzelii* Antigenen mit Adjuvans im Impfstoff Biocan, zeigt sich, wie auch bei Merilym, ein sehr deutlicher Einfluss der dritten Impfung innerhalb der Grundimmunisierung auf die Entwicklung der Antikörperspiegel und -verläufe. Betrachtet man die Kurven der einzelnen Gruppen, so zeigen nur die Hunde in der Gruppe B2 Antikörperwerte, die in ihrer Größenordnung mit den anderen vier untersuchten Impfstoffe vergleichbar sind. Auch in der Auffrischungsimpfung spiegelt sich der Einfluss der zusätzlichen Antigengabe wider: Nur die Hunde der Gruppe B2 erreichen Werte, die hoch genug sind, um einen Schutz über das zweite Jahr hinweg erwarten zu lassen, wenn nur die Schutzwirkung von OspA-Antikörpern zugrunde gelegt wird. Allerdings zeigt sich bei der Betrachtung der Ergebnisse über zwei Jahre, dass sich hier die Antikörperverläufe auch im zweiten Jahr nach der Auffrischungsimpfung nicht entscheidend verbessern. Dennoch lässt sich feststellen, dass bei Biocan drei Impfungen im Mindestabstand von drei Wochen einen entscheidenden Einfluss auf die Leistung des Impfstoffes innerhalb des ersten Jahres haben.

Bei Analyse des Lysatimpfstoffes Biocan im Western Blot fällt zunächst eine Bande ins Auge, die bei Merilym in dieser Stärke nicht nachweisbar ist. Sie erscheint auf Höhe von 41 bis 43 kDa. Eine Reaktion gegen OspA hingegen fällt nur ausgesprochen schwach aus und wird erst nach der Auffrischungsimpfung etwas deutlicher. Des Weiteren ruft eine Impfung mit Biocan Antikörper gegen ein Protein in Höhe von 10 kDa hervor, welches bisher nicht näher charakterisiert ist. Es werden zudem Antikörper gegen p14, OspC, OspB, p39 und eine Reaktion im Bereich von 50 – 60 kDa, welche die Proteine p58 und HSP60 einschließt, durch eine Immunisierung mit Biocan induziert. Zusammenfassend ist auch bei Biocan eine Vielzahl von Proteinen nachweisbar, wie es bei einem Lysatimpfstoff zu erwarten war. Da jedoch nur wenige OspA-Antikörper auf dem Western Blot nachweisbar sind, stellt sich nun die Frage nach dem zugrunde liegenden Schutzmechanismus von Biocan.

Um eine Quantifizierung des gebildeten OspA durchführen zu können, schloss sich den Analysen im Western Blot nun ein mit rekombinantem OspA beschichteter ELISA an, der in der Lage ist, die Quantität der OspA-Antikörper wiederzugeben. Zunächst wurden die Untersuchungen mit rekombinantem OspA der Spezies *B. burgdorferi* s. s. durchgeführt. Dabei wurde die Gruppengröße auf 30 Tiere reduziert, die als charakteristische Vertreter der einzelnen Versuchsgruppen ausgewählt wurden.

Es zeigt sich bei mit Biocan geimpften Hunden, dass dieser ELISA die Ergebnisse des Western Blot bestätigt. Der Kurvenverlauf ist im Vergleich zu den anderen Impfstoffen niedrig und nur in Gruppe B mit drei Immunisierungen kommt es zu einem nachweisbaren OspA-Antikörperspiegel, der dann innerhalb eines halben Jahres auf Ausgangswerte zurückfällt. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass ein Schutz basierend auf OspA-Antikörpern unwahrscheinlich ist. Hunde der Gruppe A haben kaum OspA-Antikörper gebildet, es kommt zu einem minimalen Antikörperanstieg auf 100 KELA, um dann auf Ausgangswerte zurückzufallen. Hier zeigt sich also

ein dem Western Blot entsprechender ELISA-Verlauf. Der Einfluss einer dritten Immunisierung ist deutlich: Die Tiere haben nach Erhalt einer dritten Impfung angehobene, langsamer abfallende OspA-Antikörpertiter, was sich auch beim Titeranstieg nach Auffrischungsimpfung widerspiegelt, wobei die dritte Immunisierung zu höheren Werten führt.

Im Vergleich dazu zeigen die Ergebnisse der beiden weiteren Lysatimpfstoffe Merilym und LymeVax, dass es im Rahmen der Immunisierung hauptsächlich zur Bildung von OspA-Antikörpern kommt. Der Antikörperverlauf gleicht in den ersten drei Monaten dem Verlauf dargestellt im Lysat-ELISA. Dies bestätigt die Erkenntnisse gewonnen im Western Blot. Auch hier wird deutlich, dass die OspA-Bande zu Beginn die stärkste Bande darstellt. Im Laufe des Jahres jedoch fallen die Antikörperspiegel und in rasanter Weise vor allem die OspA-Antikörper ab, um dann zum Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung wieder anzusteigen.

ProLyme, ein aus rekombinantem OspA mit Adjuvans hergestellter Impfstoff zeigt sowohl bei dem rOspA-ELISA als auch bei dem Lysat-ELISA den günstigsten Antikörperverlauf. Im Lysat-ELISA werden zum einen sehr hohe Spitzenwerte erreicht, zum anderen fallen die Antikörpertiter in allen drei Gruppen sehr langsam ab. Drei Antigengaben in kurzen Intervallen sind bei diesem Impfstoff in der Lage den Antikörpertiter noch höher zu halten. Bei der Analyse der über zwei Jahre gewonnenen Ergebnisse ist kein Hinweis auf einen Einfluss der zusätzlichen Antigengabe auf das Verhalten der Antikörperspiegel im zweiten Jahr zu sehen. Die Hunde entwickeln in beiden Gruppen auch im Folgejahr anhaltend hohe Titer. Bei der Betrachtung von mit ProLyme geimpften Hunden untersucht im rekombinanten OspA ELISA zeigt sich ein völlig anderer Kurvenverlauf im Vergleich zur Analyse der Seren im Lysat-ELISA, obwohl auch im Lysat-ELISA durch ProLyme induzierte Antikörper nur an OspA binden können. Man könnte also eine identische oder sogar im Titerverlauf angehobene Kurve erwarten. Es ist jedoch zu beachten, dass aufgrund der Reduktion der Probandenzahl von zehn Hunden pro Gruppe auf drei individuelle Schwankungen mehr ins Gewicht fallen. Die hier beschriebenen ELISA-Ergebnisse werden auch durch den Western Blot bestätigt. ProLyme induziert OspA-Antikörper, die im Verlauf des Jahres in ihrer Quantität zwar abnehmen, aber zu jeder Blutentnahme nachweisbar sind. Zusammenfassend zeigt sich bei ProLyme ein günstiger Antikörperverlauf zum Schutz vor Infektionen mit der homologen *Borrelia sensu lato*.

Die Untersuchungen des Impfstoffes RecombitekLyme, hergestellt aus rekombinantem OspA ohne die Zugabe von Adjuvans, zeigen bei der Analyse der Seren im Lysat-ELISA keinerlei Einfluss einer zusätzlichen Immunisierung im ersten Jahr. Der rOspA-ELISA weist einen geringgradig höheren Titerverlauf bei dreifach immunisierten Hunden auf, auch hier ist ein positiver Effekt einer dritten Antigengabe gering. Betrachtet man hingegen die Ergebnisse der über zwei Jahre beobachteten Beagles, so zeigt sich ein Trend: Die zusätzliche Impfung führt im zweiten Jahr bei der Gruppe B zu angehobenen Antikörpertitern, die über den Verlauf des zweiten Jahres gehalten werden können.

RecombitekLyme schneidet in der hier vorgelegten Studie am schlechtesten ab. Einer der Gründe dafür beruht sicherlich auf dem fehlenden Adjuvans in RecombitekLyme. Der Mangel an Immunstimulans kann zu einem niedrigen Antikörperverlauf mit schnellem Antikörperverlust führen. Eine dreimalige Impfung in ausreichend großen Zeitintervallen sollte bei der Verwendung des Impfstoffes Berücksichtigung finden, um die Chancen auf eine speziesspezifisch schützende Immunisierung vor allem auch im Hinblick auf die folgenden Jahre zu steigern.

Um die Analysen der Seren weiter zu führen, schlossen sich Untersuchungen an, bei denen die beiden europäischen Spezies *B. garinii* und *B. afzelii* als Detektionsantigen eingesetzt wurden, um die Impfstoffe Merilym, LymeVax, ProLyme und RecombitekLyme im heterologen, Biocan jedoch im homologen System zu evaluieren. Um eine Aussage über die Qualität der gewonnenen Ergebnisse treffen zu können, wurden die verwendeten Antigenpräparationen zunächst genauer charakterisiert. Es wird deutlich, dass die beiden europäischen Spezies wenig OspA-Protein produziert haben, ein Hinweis auf eine eventuell generell mangelnde OspA-Produktion dieser Spezies *in-vitro*, die sich dann auch in der Impfstoffherstellung widerspiegeln und somit einen Erklärungsansatz für das kaum nachweisbare OspA in Biocan liefern könnte.

Um nach der Antigenanalyse eine Vorstellung über das Bindungsverhalten der durch die verschiedenen Impfungen induzierten Antikörper zu erhalten, wurden ein Serum je Impfstoffklasse (*B. burgdorferi* s. s. Lysat, *B. burgdorferi* s. s. rOspA, *B. garinii/B. afzelii* Lysat) und zwei Kontrollseren (Serum eines mit *B. burgdorferi* s. s. experimentell infizierten Hundes und eines mit dem rOspA (Tripel-OspA) aller drei Spezies experimentell geimpften Hundes) eingesetzt. Bei diesem Experiment wird vor allem deutlich, dass die durch eine *B. burgdorferi* s. s. Infektion induzierten Antikörper sehr viele Antigene gewonnen aus *B. garinii* Kulturen binden können, die jedoch teilweise im Bereich anderer molekularer Größen liegen. Ähnlich verhält es sich beim Nachweis der durch *B. afzelii* gewonnenen Antigene, auch hier ist der Nachweis gebundener Antikörper groß, jedoch teilweise schwächer ausgeprägt und auf Höhe unterschiedlicher Molekulargewichte. Es fehlt eine Reaktion gegen OspC, die bei *B. garinii* und *B. burgdorferi* s. s. nachweisbar ist. Der Reaktion des Serums auf allen Antigenpräparationen ist die deutliche Lücke bei OspA gemein, wie es typisch für akute Infektionen ist. Die in den Wirt eintretende Borrelie exprimiert in der Regel kein OspA mehr (OHNISHI et al. 2001). Zusammenfassend zeigt sich im Western Blot eine scheinbar größere Bindungsfähigkeit der durch eine Infektion mit *B. burgdorferi* s. s. induzierten Antikörper gegen *B. burgdorferi* s. s. und *B. garinii* im Vergleich zu *B. afzelii*. Dieses Ergebnis ist überraschend, da die Analyse der Proteinfractionen im Polyacrylamidgel eine nähere Verwandtschaft zwischen *B. garinii* und *B. afzelii* nahe legt. *B. garinii* scheint bezüglich der drei Spezies eine Zwischenstellung einzunehmen. Während auf der Basis der Proteine die Ähnlichkeit zwischen den beiden europäischen Spezies sehr deutlich ist, ist dagegen eine Kreuzreaktivität der *B. garinii* Antikörper gegen *B. burgdorferi* s. s. Antigene größer.

Vergleicht man dazu die starke Reaktion des mit Tripel-OspA geimpften Hundes, so zeigt sich, dass dieser Hund OspA-Antikörper gegen alle drei Spezies gebildet hat. Das Ergebnis beweist, dass alle drei Spezies in Kultur nachweisbares OspA-Protein gebildet haben. Des Weiteren bestätigt sich, dass der Impfstoff Biocan tatsächlich nicht in der Lage war, OspA-Antikörper im Hund zu induzieren. Die schwache Reaktion der *B. burgdorferi* s. s. Impfstoffe gegen *B. garinii* und *B. afzelii* Antigene, wie sie sich in diesem Western Blot (Abbildung 16), aber auch in den folgenden Western Blot darstellt, ist wahrscheinlich auf eine mangelhafte Bindungsaffinität der Antikörper zurückzuführen. Die Anwendung monoklonaler Antikörper bestätigt die bisher durchgeführte Zuordnung der borrelienspezifischen Oberflächenmoleküle im Western Blot.

Die geringe Bindungsaffinität der Impfantikörper gegenüber verwandten Borrelienspezies zeigt sich auch in den Analysen durchgeführt mit Antigenen von *B. garinii* und *B. afzelii*. Nachdem vier der fünf Impfstoffe bisher im homologen System untersucht wurden und nur Biocan auf heterologem Antigen evaluiert wurde, können in mit *B. garinii* und *B. afzelii* beschichteten serologischen Untersuchungsmethoden die homologen, gut bindenden, durch Biocan induzierten Antikörper gemessen werden. Die mit Biocan geimpften Hunde erreichen höhere Titer, es zeigt sich sowohl im Lysat, als auch im rOspA ELISA eine gesteigerte Bindungsaffinität der induzierten Antikörper durch Verwendung der homologen Antigene. Dies wird durch die Ergebnisse des Western Blot noch verdeutlicht. Bei den vier anderen Impfstoffen hingegen tritt ein Detektionsverlust in ELISA und Western Blot auf. Bei den rekombinanten Impfstoffen ProLyme und RecombitekLyme ist dieser sehr hoch und vermittelt den Eindruck einer schwachen Bindungsfähigkeit der OspA-Antikörper an heterologes OspA.

Zusammenfassend weisen die *in-vitro* durchgeführten Analysen auf eine mangelnde Kreuzreaktivität der durch die Impfung induzierten Antikörper hin, worauf sich im Anschluss die Frage nach der Möglichkeit eines Impfdurchbruches stellt. Bei der Untersuchung des Hundes KHT-156 zeigt sich ein auffälliger Antikörperverlauf, der für eine stattgefundenen Infektion spricht. Nach einem durch die Impfung induzierten Antikörpermaximums kommt es nicht zum Titerabfall, sondern einem andauernden Anstieg, der erst gegen Ende des ersten Jahres einen leichten Rückgang aufweist. Dies steht im Zusammenhang mit dem für eine Infektion typischen Antikörperverlauf, gekennzeichnet durch einen Antikörperanstieg, der nach Erreichen eines Maximums dieses hohe Niveau über Monate hinweg hält (STRAUBINGER et al. 2000). Durch die Auffrischungsimpfung jedoch, die bei diesem Hund durchgeführt wurde, kommt es zu einem erneuten Titeranstieg. Die Analyse des Serums auf *B. garinii* und *B. afzelii* Antigenen mit der noch stärkeren Reaktion auf diese lässt unter Umständen vermuten, dass eine Infektion mit einem dieser beiden Spezies stattgefunden hat. Genaue Aussagen darüber lassen aber nur ein direkter Erregernachweis mit Speziesbestimmung aus einem Gewebe des infizierten Hundes zu, der ELISA ermöglicht dies nicht. Die Untersuchung des Tieres im Western Blot bestätigt den Verdacht einer

Infektion. Es treten neben der OspA-Bande kurz nach der ersten Impfung bereits Antikörperbindungen an OspC, p30, OspB, p83, Flagellin und andere auf. Der Hund zeigt also eine deutliche Reaktion, die nur nach Infektion oder Lysatimpfung, die in diesem Fall auszuschließen ist, erwartet werden kann.

Durch die Analyse der Bandenintensität nach der Auffrischungsimpfung sowie dem Wissen, dass der Hund nach der Auffrischungsimpfung weiterhin klinisch unauffällig blieb, kann davon ausgegangen werden, dass die Auffrischungsimpfung keinen Einfluss auf die bestehende Infektion genommen hat. Die Bandenintensität hat sich nur bei der OspA-Bande verstärkt, alle anderen Banden zeigen keine gesteigerte Immunreaktion durch die Gabe des rekombinanten OspA, was durch eine Zunahme der Bandenintensität deutlich würde. Fraglich ist, ob eine Immunisierung des Hundes mit einem Lysatimpfstoff ebenfalls keine Beeinflussung der Infektion nach sich gezogen hätte.

Um eine letztendliche Bestätigung der nach Impfung eingetretenen Infektion zu erhalten, wurde ein C6-SNAP Test angeschlossen. Die erste Probe des Hundes KHT-156, die Voruntersuchung, fiel negativ aus, die Proben 3, 13 und 14 als Vertreter je eines sehr hohen Antikörperspiegels, eines niedrigen Antikörperspiegels und dem Titer erreicht nach der Auffrischungsimpfung hingegen positiv. Dieses Ergebnis spricht für einen Impfdurchbruch, wobei nicht endgültig geklärt werden kann, ob es an der geringen Menge an OspA-Antikörpern lag, die im Hund induziert wurden, oder aber an der mangelhaften Kreuzreaktivität der vorhandenen Antikörper gegenüber *B. garinii* und *B. afzelii*. Da die infizierende Spezies nicht bekannt ist, kann diese Fragestellung derzeit nicht gelöst werden. Eine Speziesisolierung und -identifikation aus Geweben des Hundes hingegen hätte einen Hinweis auf die Ursache der Infektion liefern können. Alle weiteren geimpften Hunde reagierten in jeder der vier untersuchten Serumproben negativ.

Die hier vorgelegte Studie hat gezeigt, dass durch eine dreifache Antigengabe im Rahmen der Grundimmunisierung nur bei zwei der untersuchten Impfstoffe (Merilym und Biocan) eine deutliche Erhöhung der Antikörpertiter erreicht werden konnte, die aber statistisch nicht signifikant ist. Somit ist eine Umsetzung dieses Impfregimes in die Praxis derzeit nicht zu empfehlen. Es zeigt sich im Verlauf des Jahres bei allen Impfstoffen aber ein Titerabfall, sowohl bei den Gesamt-, als auch bei den OspA-Antikörpern. Diesen Ergebnissen zufolge sind die geimpften Hunde nach mehreren Monaten durch den Antikörpertiterabfall gegenüber der Infektion mit Borrelien empfänglich, wie es auch andere Studien bereits gezeigt haben (STRAUBINGER et al. 1995). Demnach empfiehlt sich eine dritte Immunisierung nach sechs Monaten, um auch in der zweiten Jahreshälfte schützende Antikörperspiegel aufrecht zu erhalten. Untersuchungen der Kreuzreaktivität *in-vitro* sprechen für eine mangelhafte Bindungsfähigkeit induzierter Antikörper gegenüber verwandten Borrelienspezies (heterologe Spezies). Somit ist ein rein speziesspezifischer Impfschutz wahrscheinlich. Da vor allem in Europa eine große Borrelien-Artenvielfalt vorherrscht, deuten die hier vorgestellten Ergebnisse eine nur gegen eine Spezies gerichtete Immunität bei

geimpften Hunden an. Vor allem die durch die Impfung induzierten OspA-Antikörper sind nur in sehr geringem Umfang in der Lage, kreuzreaktiv zu binden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse werden durch unabhängige Studien unterstützt, die zeigen konnten, dass OspA nicht in der Lage ist, vor einer Infektion mit einer heterologen Spezies zu schützen (GERN et al. 1997). Diese Untersuchungen belegen die Notwendigkeit der Entwicklung eines neuen Impfstoffes, basierend auf einem OspA-Gemisch wenigstens gewonnen aus *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* in Kombination mit weiteren Antigenen, da der Schutzmechanismus beruhend auf OspA bereits durch eine OspA-Variation seitens der Borrelien durchbrochen werden kann (MARCONI et al. 1993).

Da ein solcher Impfstoff bisher nicht erhältlich ist und die Schutzwirkung der erhältlichen Impfung als partiell angesehen werden kann, rücken einfache, aber in der Regel zuverlässigere Methoden in den Vordergrund. Die tägliche Entfernung von Zecken ist eine wirksame Vorgehensweise, um das Infektionsrisiko zu minimieren. Durch die seitens der Borrelien notwendige Wanderung von der Zecke in den Wirt, die wenigstens 24 Stunden dauert, ergibt sich ein ausreichend großes Zeitfenster, um einen Schutz durch die Zeckenentfernung zu gewährleisten (LEUBA-GARCIA et al. 1998). Da das Absuchen des Hundes nach möglichen Zecken jedoch durch das Fell häufig erschwert wird, ist der zusätzliche Einsatz von Repellentien oder akariziden Substanzen zu empfehlen. Fipronil, ein für den Schutz des Hundes vor Zecken zugelassenes Mittel, führt innerhalb von 24 bis 48 Stunden über die Blockade der GABA-gesteuerten Chlorid-Kanäle im Nervensystem der Zecke zu deren Tod (UNGEMACH 2002). Auf diesem Weg kann eine Übertragung der Borrelien und weiterer durch Zecken übertragene Erreger unterbunden werden.

6 Zusammenfassung

Katharina Töpfer

Charakterisierung der humoralen Immunantwort im Hund nach Impfung mit verschiedenen Impfstoffen gegen den Erreger der Lyme-Borreliose, *Borrelia burgdorferi*, unter Berücksichtigung zweier verschiedener Impfstrategien

Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig
Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum, Leipzig

Eingereicht im Februar 2005

105 Seiten, 31 Abbildungen, 32 Tabellen, 125 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Lyme-Borreliose, Impfung, Hund, Antikörpernachweis, ELISA, Western Blot, C6

Lyme-Borreliose, die mittlerweile in der nördlichen Hemisphäre wichtigste durch Vektoren übertragene Erkrankung, wird durch Spirochäten aus der *Borrelia burgdorferi* sensu lato Gruppe hervorgerufen. Viele der in letzter Zeit veröffentlichten Studien haben darauf hingewiesen, dass durch Antibiotikagaben eine vollständige Erregerelimination nach Infektion nicht erreicht werden kann. Eine prophylaktische Versorgung rückt somit immer weiter in den Vordergrund des Interesses. Eine Impfung ist jedoch auch nicht unproblematisch: Untersuchungen beim Menschen haben gezeigt, dass nach zweimaliger Immunisierung im ersten Jahr lediglich 68% der Probanden geschützt waren und mit einer weiteren, sich anschließenden Immunisierung der Schutz gesteigert werden konnte. Deshalb sollte die hier an Hunden durchgeführte Studie aufzeigen, ob durch eine dreimalige Impfstoffapplikation im Verlauf der Grundimmunisierung mit kommerziell erhältlichen Impfstoffen die im Hund gebildeten Antikörperspiegel zu steigern. Ein höheres Antikörperniveau führt zu einem verzögerten Antikörperabfall und somit zu einem verlängerten Schutz. Weiterhin sollte zusätzlich das induzierte Antikörperprofil näher charakterisiert und somit auch eine Aussage über die Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Borrelienspezies ermöglicht werden.

Die im Verlauf dieser Studie durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass zunächst eine höher als erwartete Infektionsrate für die Lyme-Borreliose in Sachsen innerhalb der Hundepopulation auftritt. Der prozentuale Anteil seropositiver Tiere beträgt 20,3%. Eine serologisch nachgewiesene Infektion steht allerdings nicht in direktem Zusammenhang mit einem Ausbruch der Erkrankung und darf demnach nicht mit der Erkrankungsrate innerhalb der Hundepopulation gleichgesetzt werden.

Die bisher auf dem Markt erhältlichen und hier untersuchten Impfstoffe Merilym (*B. burgdorferi* s. s. Lysatimpfstoff, Merial, Deutschland), LymeVax (*B. burgdorferi* s. s. Lysatimpfstoff, Fort Doge, USA), Biocan (*B. garinii*, *B. afzelii* Lysatimpfstoff, Bioveta, Tschechien), ProLyme (rekombinanter Outer surface protein A (OspA) Impfstoff, Intervet, USA) und RecombitekLyme (rekombinanter OspA Impfstoff, Merial, USA) wurden in seronegativen Tieren bezüglich der induzierten Gesamtantikörper, der spezifisch gegen OspA gerichteten Antikörper und ihrer Kreuzreaktivität gegenüber heterologen Spezies untersucht, wobei der Einfluss von zwei verschiedenen Impfstrategien von besonderem Interesse war.

Durch eine dreifache Antigengabe im Rahmen der Grundimmunisierung konnte nur bei zwei der untersuchten Impfstoffe (Merilym und Biocan) eine deutliche Erhöhung der Antikörperspiegel erreicht werden, die sich aber statistisch nicht signifikant von den anderen unterscheidet. Somit ist eine Umsetzung dieses Impfgregimes in die Praxis nicht zu empfehlen. Es zeigt im Verlauf des Jahres bei allen Impfstoffen ein Titerabfall, sowohl bei den Gesamtantikörpern, als auch bei den OspA-Antikörpern. Mit Ausnahme von Biocan, hier sind kaum OspA-Antikörper nachweisbar, induzieren alle Impfstoffe nach der Impfung vor allem OspA-Antikörper, die jedoch sehr schnell wieder abfallen und nach einem halben Jahr nur mehr in geringem Maße nachweisbar sind. Diese OspA-Antikörper sind speziesspezifisch und nur in sehr geringem Umfang kreuzreaktiv. Diese Ergebnisse weisen auf eine Suszeptibilität der geimpften Tiere bezüglich einer Borrelioseinfektion innerhalb mehrerer Monate nach Impfung hin. Es empfiehlt sich eine dritte Immunisierung nach sechs Monaten, um auch in der zweiten Jahreshälfte schützende Antikörperspiegel zu ermöglichen. Untersuchungen der Kreuzreaktivität *in-vitro* sprechen für eine mangelhafte Bindungsfähigkeit induzierter Impfantikörper gegenüber anderen Borrelienspezies, die in Zusammenhang mit einem geringen Schutz *in-vivo* gesehen werden könnten. Somit ist ein rein speziesspezifischer Impfschutz wahrscheinlich. Da vor allem in Europa eine große Borreliose-Artenvielfalt vorherrscht, deuten die hier vorgestellten Ergebnisse eine nur gegen eine Spezies gerichtete Immunität bei geimpften Hunden an. Die Notwendigkeit der Entwicklung eines neuen Impfstoffes, basierend auf einer Mischung speziesspezifischer OspA-Antigene gewonnen aus *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* in Kombination mit weiteren Antigenen, da der Schutzmechanismus beruhend auf OspA bereits durch eine OspA-Variation seitens der Borreliose durchbrochen werden kann, wird durch die hier vorgelegten Resultate gestützt.

Da ein solcher Impfstoff bisher nicht erhältlich ist und die Schutzwirkung der erhältlichen Impfung als partiell angesehen werden kann, rücken einfache, aber in der Regel zuverlässigere Methoden in den Vordergrund. Die tägliche Entfernung von Zecken ist eine wirksame Vorgehensweise, um das Infektionsrisiko zu minimieren. Auch der Einsatz akarizider Substanzen und Repellentien bietet sich an, um die Übertragung der Borreliose und weiterer, von Zecken übertragene Erreger zu unterbinden.

7 Summary

Katharina Töpfer

Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the causative agent of the Lyme Borreliosis, *Borrelia burgdorferi*, with different vaccines using two different vaccination schedules

Institute of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig
Biotechnical-biomedical Center, Leipzig

Submitted in February 2005

105 pages, 31 figures, 32 tables, 125 references

Keywords: Lyme borreliosis, vaccination, dog, antibody detection, ELISA, Western Blot, C6

Lyme-Borreliose, currently the most important vector-borne disease in the northern hemisphere, is caused by spirochetes from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. Recently published studies have indicated that a complete eradication of the bacterium from the host's tissue by antibiotic treatment is not possible. Therefore prophylactic measures become more important. However, vaccines are not unproblematic: studies in humans have shown that only 68% of the participants were protected after two immunizations applied during the first year, while the level of protection rose when an additional immunization was given. Therefore, the study presented here was designed to reveal whether three initial immunizations with commercial vaccines are able to raise the antibody levels in dogs. Higher antibody levels are the basis for a delayed disappearance of antibodies due to natural decay and therefore provide an extended protection from infection. Furthermore, the induced antibody profile was subject of a more precise characterization in order to draw possible conclusions about their efficacy against other *Borrelia* species.

The results presented in this study show a higher than expected prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato seropositivity in dogs from Saxony. The percentage of seropositive dogs was 20.3%. Since seropositivity is not necessarily linked with the onset of the disease, this result does not describe the disease incident in the dog population.

In the course of the study, commercially available vaccines, Merilym (*B. burgdorferi* s. s. lysate, Merial, Germany), LymeVax (*B. burgdorferi* s. s. lysate, Fort Dodge, USA), Biocan (*B. afzelii*, *B. garinii* lysate, Bioveta, Czech Republic), ProLyme (recombinant Outer surface protein A (OspA) with adjuvant, Intervet, USA) and RecombitekLyme (recombinant OspA without adjuvant,

Merial, USA) were evaluated for induced antibody levels and the amount of OspA antibodies in seronegative dogs, in which two different vaccination schedules were of special interest. In addition the cross reaction of antibodies on heterologous antigens was analyzed.

Three immunizations during the first year with two (Merilym and Biocan) of the five vaccines tested increase the vaccinal antibody levels, but this increase of antibody levels is not statistically significant. Therefore a recommendation for a third antigen application within the first six weeks after basic immunisation can not be given. All vaccine-induced antibody levels show a decrease within the first year concerning total antibody titers as well as OspA antibody titers. Except for Biocan the specificity of the initially induced antibodies by vaccination are directed mainly against OspA. These antibody titers decrease quickly resulting in minimum amounts of detectable antibodies within the period of six months. These OspA antibodies are species-specific and show only a minor cross reactivity. The results presented here suggest that vaccinated animals are susceptible for a borrelia infection within months after immunization. Therefore a third vaccination six months after the basic immunization is advisable in order to induce a long lasting protective antibody level during the period of one year.

These data generated with *in-vitro* systems suggest that only a species-specific protection can be expected *in-vivo*. The species heterogeneity within Europe suggests that the vaccine available in Europe only protects from infection with the species used for vaccine preparation. These results underline the necessity to develop a new vaccine consistent of a mixture of OspA derived from at least *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* and *B. afzelii* in combination with other antigens, since protection from infection via OspA can be circumvented by minor OspA variations on the part of the borrelia.

Since such a vaccine is not yet available, and therefore other methods that provide protection are necessary. Daily control of the dog and the removal of adherent ticks can help to prevent a possible infection since borrelia take at least 24 hours to migrate from the midgut of the tick to the salivary gland where they can infect the host. In addition, the use of repellent or acarizides might be helpful to avoid attachment or achieve the death of adherent ticks and therefore minimize the risk of infection with borrelia as well as other tick-borne diseases.

8 Literaturverzeichnis

Anguita J, Hedrick MN, Fikrig E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. FEMS Microbiol Rev. 2003 Oct;27(4):493-504.

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

Appel MJG, Allen S, Jacobson RH, Lauderdale T-L, Chang Y-F, Shin SJ, et al. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. JID. 1993;167:651-64.

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

Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schriefer ME, Gilmore RD, Jr., Philipp MT, Steere AC, et al. 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 Apr 15;187(8):1187-99.

Baranton G, Postic D, Saint Girons G, Boerlin P, Piffaretti J-C, Assous M, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme disease. Int J Syst Bacteriol. 1992;42:378-83.

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

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

Barthold SW, DeSouza MS, Feng S. Serum-mediated resolution of Lyme arthritis in mice. Lab Inv. 1996;74:57-67.

Benach JL, Fleit HB, Habicht GS, Coleman JL, Bosler EM, Lane BP. Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor. J Infect Dis. 1984 Oct;150(4):497-507.

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 Oct;158(4):754-60.

Bockenstedt LK, Mao J, Hodzic E, Barthold SW, Fish D. Detection of attenuated, noninfectious spirochetes in *Borrelia burgdorferi*-infected mice after antibiotic treatment. *J Infect Dis.* 2002 Nov 15;186(10):1430-7.

Bowman AS, Dillwith JW, Sauer JR. Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. *Parasitol Today.* 1996;12(10):388-95.

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. Experimentally induced infection of cats with *Borrelia burgdorferi*. *Am J Vet Res.* 1992 Sep;53(9):1507-11.

Burgess EC, Mattison M. Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *JAVMA.* 1987;191:1457-8.

Bushmich SL. Lyme Borreliosis in Domestic Animals. *Journal of Spirochetal and Tick-Borne Disease.* 1994;1:24-8.

Canale-Parola E. Section 1: The spirochetes. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* 9 ed. Baltimor/London: Williams & Wilkins; 1986. p. 38-70.

Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers T, et al. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to *Ixodid* ticks. *Vet Pathol.* 2000 Jan;37(1):68-76.

Chu HJ, Chavez LG, Jr., Blumer BM, Sebring RW, Wasmoen TL, Acree WM. Immunogenicity and efficacy study of a commercial *Borrelia burgdorferi* bacterin. *J Am Vet Med Assoc.* 1992 Aug 1;201(3):403-11.

Cinco M, Barbone F, Grazia CM, Mascioli M, Anguero RM, Stefanel P, et al. Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Dec;10(12):1056-61.

Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH, Benach JL. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*. 1997 Jun 27;89(7):1111-9.

Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schafer SM, Vitorino L, et al. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1316-8.

Coughlin RT, Fish D, Mather TN, Ma J, Pavia C, Bulger P. Protection of dogs from Lyme disease with a vaccine containing outer surface protein (Osp) A, OspB, and the saponin adjuvant QS21. *J Infect Dis*. 1995 Apr;171(4):1049-52.

Craft JE, Grodzicki RL, Shrestha M, Fischer DK, Garcia-Blanco M, Steere AC. The antibody response in Lyme disease. *Yale J Biol Med*. 1984 Jul;57(4):561-5.

Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ. Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). *Vet Pathol*. 1997 Mar;34(2):85-96.

De Michelis S, Sewell HS, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Schouls LM, Benes V, et al. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol*. 2000 Jun;38(6):2128-33.

Diza E, Papa A, Vezyri E, Tsounis S, Milonas I, Antoniadis A. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg Infect Dis*. 2004 Sep;10(9):1692-3.

Foley DM, Gayek RJ, Skare JT, Wagar EA, Champion CI, Blanco DR, et al. Rabbit model of Lyme borreliosis: erythema migrans, infection-derived immunity, and identification of *Borrelia burgdorferi* proteins associated with virulence and protective immunity. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):965-75.

Gern L, Estrada-Pena A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TG, Jongejan F, et al. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralbl Bakteriol*. 1998 Mar;287(3):196-204.

Gern L, Falco RC. Lyme disease. *Rev Sci Tech*. 2000 Apr;19(1):121-35.

- 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 Oct;15(14):1551-7.
- Gilmore RD, Piesman A. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. II. 2000;68(1):411-4.
- Gomes-Solecki MJ, Wormser GP, Persing DH, Berger BW, Glass JD, Yang X, et al. A first-tier rapid assay for the serodiagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection. *Arch Intern Med*. 2001 Sep 10;161(16):2015-20.
- Goossens HA, van den Bogaard AE, Nohlmans MK. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2001 Mar;39(3):844-8.
- Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G. Lyme Borreliosis - biology, epidemiology and control. New York: CABI Publishing; 2002.
- Greene CE, Appel MJG, Straubinger RK. Lyme borreliosis. In: Greene CE, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998. p. 282-93.
- Grimm D, Tilly K, Byram R, Stewart PE, Krum JG, Bueschel DM, et al. 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 Mar 2;101(9):3142-7.
- Hanson MS, Edelman R. Progress and controversy surrounding vaccines against Lyme disease. *Expert Rev Vaccines*. 2003 Oct;2(5):683-703.
- Harter L, Straubinger RK, Summers BA, Erb HN, Appel MJ. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in dogs experimentally infected with *Borrelia burgdorferi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999 Feb 22;67(3):271-84.
- 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 Jun;35(6):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. Clin Diagn Lab Immunol. 1998 Jul;5(4):456-62.

Hinrichsen VL, Whitworth UG, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Mather TN. Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organisms in dogs. J Am Vet Med Assoc. 2001 Apr 1;218(7):1092-7.

Hovius KE, Stark LA, Bleumink-Pluym NM, van dP, I, Verbeek-de Kruif N, Rijpkema SG, et al. Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction. Vet Q. 1999 Apr;21(2):54-8.

Hubalek Z, Halouzka J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasitol Res. 1998;84(3):167-72.

Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z. *Borreliae* in *Ixodes ricinus* ticks feeding on humans. Med Vet Entomol. 2004 Sep;18(3):228-31.

Isaacs R. *Borrelia burgdorferi* bind to epithelial cell proteoglycans. J Clin Invest. 1994;93:809-19.

Klempner MS, Noring R, Epstein MP, McCloud B, Hu R, Limentani SA, et al. Binding of human plasminogen and urokinase-type plasminogen activator to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. JID. 1995;171:1258-65.

Klempner MS, Noring R, Rogers RA. Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. JID. 1993;167:1074-81.

Kochi SK, Johnson RC, Dalmaso AP. Complement-mediated killing of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Journal of Immunology. 1991;146:3964-70.

Lagal V, Postic D, Baranton G. Molecular diversity of the ospC gene in *Borrelia*. Impact on phylogeny, epidemiology and pathology. Wien Klin Wochenschr. 2002 Jul 31;114(13-14):562-7.

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 Oct;47(4):921-5.

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

Leuba-Garcia S, Martinez R, Gern L. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and in the skin of mice. Zentralbl Bakteriologie. 1998 May;287(4):475-84.

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

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

Levy SA, Duray PH. Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. Similarity to human Lyme carditis. J Vet Intern Med. 1988 Jul;2(3):138-44.

Levy SA, Lissman BA, Ficke CM. Performance of a *Borrelia burgdorferi* bacterin in borreliosis-endemic areas. J Am Vet Med Assoc. 1993 Jun 1b;202(11):1834-8.

Levy SA, Magnarelli LA. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. J Am Vet Med Assoc. 1992 Feb 1;200(3):344-7.

Liang FT, Aberer E, Cinco M, Gern L, Hu CM, Lobet YN, et al. Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* s.l. J Infect Dis. 2000 Nov;182(5):1455-62.

Liang FT, Jacobson RH, Straubinger RK, Grooters A, Philipp MT. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 2000 Nov;38(11):4160-6.

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 Dec;37(12):3990-6.

Liebisch G, Assmann G, Liebisch A. Infektion mit *Borrelia burgdorferi* s.l. als Krankheitsursache der Lyme-Borreliose bei Pferden in Deutschland. *Prakt Tierarzt*. 1999;80(6):498-516.

Lim LCL, England DM, DuChateau BK, Glowacki NJ, Schell RF. *Borrelia burgdorferi*-specific T lymphocytes induce severe destructive Lyme arthritis. *Infection and Immunity*. 1995;63(4):1400-8.

Lindner A, Böckel K. Serologische Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* bei Hunden und Katzen. *Prakt Tierarzt*. 1995;(3):177-85.

Magnarelli LA, Anderson JF. Early detection and persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in persons with Lyme disease. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. 1987 Feb;263(3):392-9.

Magnarelli LA, Anderson JF. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. *Am J Epidemiol*. 1988 Apr;127(4):818-25.

Magnarelli LA, Anderson JF, Fish D. Transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes dammini* (Acari:Ixodidae). *J Infect Dis*. 1987 Jul;156(1):234-6.

Magnarelli LA, Anderson JF, Levine HR, Levy SA. Tick parasitism and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cats. *JAVMA*. 1990;197:63-6.

Magnarelli LA, Bushmich SL, Sherman BA, Fikrig E. A comparison of serologic tests for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle. *Can Vet J*. 2004 Aug;45(8):667-73.

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 Jan;35(1):169-73.

Magnarelli LA, Levy SA, Ijdo JW, Wu C, Padula SJ, Fikrig E. Reactivity of dog sera to whole-cell or recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* by ELISA and immunoblot analysis. *J Med Microbiol*. 2001 Oct;50(10):889-95.

Marconi RT, Konkel ME, Garon CF. Variability of osp genes and gene products among species of Lyme disease spirochetes. *Infect Immun*. 1993 Jun;61(6):2611-7.

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 Jul;40(7):2591-3.

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 Aug;70(8):4196-203.

Moody K, Barthold SW, Terwilliger GA, Beck DS, Hansen GM, Jacoby RO. Experimental chronic Lyme borreliosis in Lewis rats. *Amer J Trop Med Hyg* 1990;42:165-74.

Moody KD, Barthold SW. Animal models of human disease: Lyme borreliosis in laboratory mice. *Comp Pathol Bull.* 1995;4-6.

O'Connor TP, Esty KJ, Hanscom JL, Shields P, Philipp MT. Dogs vaccinated with common Lyme disease vaccines do not respond to IR₆, the conserved immunodominant region of the VlsE surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 May;11(3):458-62.

Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(2):670-5.

Pachner AR, Delaney E, O'Neill T, Major E. Inoculation of nonhuman primates with the N40 strain of *Borrelia burgdorferi* leads to a model of Lyme neuroborreliosis faithful to the human disease. *Neurology.* 1995 Jan;45(1):165-72.

Pal U, de Silva AM, Montgomery RR, Fish D, Anguita J, Anderson JF, et al. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J Clin Invest.* 2000 Aug;106(4):561-9.

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 Jun 15;166(12):7398-403.

Parker JL, White KK. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Vet.* 1992;82:253-74.

Schwarzova K, Ciznar I. Combined infection of *Ixodes ricinus* with three *Borrelia burgdorferi* sensu lato genotypes. Folia Microbiol (Praha). 2004;49(3):297-300.

Selbitz H-J. Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1992.

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 Jul;36(1-2):161-74.

Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, et al. 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 Jul 23;339(4):216-22.

Slowik TJ, Lane RS. Birds and their ticks in northwestern California: minimal contribution to *Borrelia burgdorferi* enzootiology. J Parasitol. 2001 Aug;87(4):755-61.

Sonnesyn SW, Manivel C, Johnson RC, Goodman JL. A guinea pig model for Lyme disease. Infection and Immunity. 1993;61:4777-84.

Sparagano OA, Allsopp MT, Mank RA, Rijpkema SG, Figueroa JV, Jongejan F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: *Ixodidae*): a review. Exp Appl Acarol. 1999 Dec;23(12):929-60.

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

Stanek G, Burger I, Hirschl A, Wewalka G, Radda A. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]. 1986 Dec;263(1-2):29-33.

Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med. 1989 Aug 31;321(9):586-96.

Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med. 2001 Jul 12;345(2):115-25.

Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. J Clin Invest. 2004 Apr;113(8):1093-101.

Steere AC, Sikand VK, Meurice F, Parenti DL, Fikrig E, Schoen RT, et al. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. N Engl J Med. 1998 Jul 23;339(4):209-15.

Straubinger RK. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. J Clin Microbiol. 2000 Jun;38(6):2191-9.

Straubinger RK, Chang YF, Jacobson RH, Appel MJ. Sera from OspA-vaccinated dogs, but not those from tick-infected dogs, inhibit in vitro growth of *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol. 1995 Oct;33(10):2745-51.

Straubinger RK, Dharma RT, Davidson E, Summers BA, Jacobson RH, Frey AB. Protection against tick-transmitted Lyme disease in dogs vaccinated with a multiantigenic vaccine. Vaccine. 2001 Oct 12;20(1-2):181-93.

Straubinger RK, Straubinger AF, Harter L, Jacobson RH, Chang YF, Summers BA, et al. *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. Infect Immun. 1997 Apr;65(4):1273-85.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Erb HN, Harter L, Appel MJ. *Borrelia burgdorferi* induces the production and release of proinflammatory cytokines in canine synovial explant cultures. Infect Immun. 1998 Jan;66(1):247-58.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH. Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: An experimental study. J Infect Dis. 2000 Mar;181(3):1069-81.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH, Erb HN. Clinical manifestation, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. Wien Klin Wochenschr. 1998b;110(24):874-81.

Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, Appel MJ. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. J Clin Microbiol. 1997 Jan;35(1):111-6.

Templeton TJ. *Borrelia* outer membrane surface proteins and transmission through the tick. *J Exp Med*. 2004 Mar 1;199(5):603-6.

Tuomi J, Rantamaki LK, Tanskanen R. Experimental infection of cattle with several *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains; immunological heterogeneity of strains as revealed in serological tests. *Vet Microbiol*. 1998 Feb 15;60(1):27-43.

Ungemach FR. Antiparasitika. In: Löscher W, Ungemach FR, Kroker R, editors. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 5 ed. Berlin: Blackwell Verlag; 2002. p. 275-89.

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

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

Wasmoen TL, Sebring RW, Blumer BM, Chavez LG, Jr., Chu HJ, Acree WM. Examination of Koch's postulates for *Borrelia burgdorferi* as the causative agent of limb/joint dysfunction in dogs with borreliosis. *J Am Vet Med Assoc*. 1992 Aug 1;201(3):412-8.

Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac M, V, Rössler D, et al. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection*. 1996 Mar;24(2):208-12.

Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. 1987 Jun;51(2):221-71.

Wooten RM, Weis JJ. Host-pathogen interactions promoting inflammatory Lyme arthritis: use of mouse models for dissection of disease processes. *Curr Opin Microbiol*. 2001 Jun;4(3):274-9.

Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell*. 1997;89:275-85.

Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit war neben dem Abschluss des Studiums einer der wichtigsten Abschnitte meines bisherigen Lebens. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich sowohl während des Studiums, als auch vor allem während der Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben. Ich weiß, dass es nicht immer leicht war mit mir ...

Ich danke meinem Betreuer, Chef, größtem Kritiker und Unterstützer Reinhard Straubinger für seine unermüdlichen Bemühungen, aus mir doch noch eine vernünftige Wissenschaftlerin zu machen und dabei eine sinnvolle Doktorarbeit zu erstellen. Dies wäre ohne ihn undenkbar gewesen. Nicht nur beruflich, auch psychologisch und bei all den großen und kleinen Dingen des Lebens, vom Computerabsturz bis hin zum Umzug, war er immer für mich da – vielen Dank für die jahrelange Geduld und Hilfe!

Ein sehr herzliches Dankeschön möchte ich der H. Wilhelm Schaumann Stiftung aussprechen, die mich drei Jahre lang finanziell unterstützt und auf diesem Wege die Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat. Ich danke Ihnen für Ihr Vertrauen in diese Arbeit und meine Fähigkeiten!

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Prof. Alber und den Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, Juliane, Rowina, Jens, Sami, Nicole, Uwe, allen anderen sowie auch den Praktikanten. Sie hatten immer ein offenes Ohr für Probleme und Lösungsvorschläge. Vieles wäre ohne sie nicht möglich gewesen und manch ELISA sicher immer noch nicht fertig.

Ein recht herzlicher Dank gilt dem pharmakologisch-toxikologischen Institut, besonders Herrn Prof. Ungemach, Getu Abraham, Frau Lorenz und Frau Hochheim für die Zusage und Organisation der Teilnahme der Beagles. Auch Herrn Prof. Oechtering und der Kleintierklinik möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Unterstützung sowie die Bereitstellung von Räumlichkeiten und die Zusage der Teilnahme der Labradore danken.

An dieser Stelle noch mal ein ganz großes Dankeschön allen Hundebesitzern, ohne die sowieso keine Studie möglich gewesen wäre. Sie haben mir ein Jahr lang die Treue gehalten und sind nie ungeduldig geworden, wenn es leider auch mal wieder etwas länger dauerte.

Ich danke meinen Freunden, vor allem aber Denise, Eva, Inke und Maja, die nicht nur immer mit Rat und Tat zur Seite standen, sondern auch die Höhen und Tiefen der letzten Jahre mit mir durchlebt haben. Die Unterstützung, die sie mir immer wieder gegeben haben war und ist für mich eine Quelle der Kraft. Danke auch an Jörn, der sich vor allem in der letzten Phase der Dissertation durch ein ihm völlig fremdes Wissensgebiet gequält hat, in der Hoffnung, den ein oder anderen (Schreib)Fehler zu entdecken.

Zwar an letzter Stelle aber eigentlich allen voran danke ich meiner Familie. Sie hat mir beständig Mut und Vertrauen geschenkt, mich und meine Pläne, so unerreichbar sie auch schienen mögen, unterstützt und nie den Glauben an mich verloren. Ihre Motivation und ihr Vertrauen in mich und mein Können hat mich bis hier hin gebracht und ich weiß, dass ich immer auf jeden Einzelnen zählen kann. Ihr seid das Wichtigste in meinem Leben. Danke für alles.