

2. Literatur

2.1. Geschichte der Lyme-Borreliose

Die Bezeichnung „Lyme-Borreliose“ geht auf den Ort „Old Lyme“ im US-Bundesstaat Connecticut zurück. Dort wurde Mitte der 70er Jahre von STEERE und Mitarbeiter (1977a) eine Arthritisendemie beschrieben, die vor allem bei Kindern auftrat. Durch eingehende epidemiologische Studien vermutete man bald, dass Arthropoden, insbesondere Zecken, als Überträger der Krankheit fungierten (STEERE et al., 1978). Durch Verlaufsuntersuchungen von Patienten mit Erythema migrans über mehrere Jahre konnten zahlreiche klinische Organmanifestationen beobachtet werden. Somit gelang es STEERE und Mitarbeiter (1977b), 1975 in den USA ein einheitliches klinisches Krankheitsbild zu definieren.

Dies waren nicht die ersten Beschreibungen von klinischen Symptomen einer Lyme-Borreliose. Bereits 1883 berichteten BUCHWALD sowie 1902 HERXHEIMER und HARTMANN von einer idiopathischen Hautveränderung beim Menschen und bezeichneten sie als Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA). Ein Zusammenhang zwischen Zeckenstich und Erkrankung wurde jedoch noch nicht erkannt.

1909 beschrieb AFZELIUS eine ringförmig wandernde Hautrötung, das Erythema migrans (EM), das nach Zeckenstich auftrat. Somit wurde erstmals die Übertragung des krankmachenden Agens durch Zecken angenommen.

Weitere Fallberichte folgten. Im Jahre 1922 berichteten GARIN und BUJADOUX von einer schmerzhaften Meningopolyneuritis, die nach Zeckenstich mit einhergehendem EM auftrat. Diese Manifestation wurde von BANNWARTH (1941) als chronische lymphozytäre Meningitis beschrieben. BÄVERSTEDT beobachtete 1943 eine Lymphadenosis cutis benigna (LCB) im Zusammenhang mit Zeckenexposition.

Den Beweis der Wirksamkeit von Antibiotika erbrachten 1946 SVARTZ und 1951 HOLLSTRÖM, den 1955 auch BINDER und Mitarbeiter bestätigten. Somit konnte eine infektiöse Ursache der Erkrankung zugrunde gelegt werden.

Die Entdeckung des Erregers der Lyme-Borreliose gelang jedoch erst 1981 eher zufällig durch BURGDORFER und Mitarbeiter (1982). Auf der Suche nach Rickettsien isolierten sie eine bis dahin nicht klassifizierte Spirochäte aus dem Mitteldarm adulter *Ixodes (I.) scapularis*. Diese wurde 1984 nach ihrem Entdecker benannt: *Borrelia (B.) burgdorferi* (HYDE and JOHNSON, 1984; JOHNSON et al., 1984).

Daraufhin erfolgten Anzüchtungen aus *I. ricinus* in der Schweiz (BARBOUR et al., 1983) und aus Blut, Liquor cerebrospinalis und Hautbiopsien von Patienten mit Lyme-Borreliose sowohl

in den USA (STEERE et al., 1984) als auch in Europa (ACKERMANN et al., 1984; PREAC-MURSIC et al., 1984; OTT und SCHÖNBERG, 1988; SCHÖNBERG et al., 1988). Bereits 1985 waren aus mindestens 19 Ländern von 3 Kontinenten Fälle von EM berichtet worden (SCHMID, 1985).

Nach langer Uneinigkeit hinsichtlich der Bezeichnung der Erkrankung (Erythema migrans-Borreliose, Lyme disease, Lyme-Krankheit, Zeckenborreliose u.a.) konnte man sich anlässlich des 2. Internationalen Symposiums über die Lyme-Krankheit und verwandte Erkrankungen 1985 in Wien auf den international akzeptierten Terminus „Lyme-Borreliose“ einigen (STANEK et al., 1987).

2.2. Erreger der Lyme-Borreliose

2.2.1. Taxonomie

B. burgdorferi gehört taxonomisch zur Ordnung Spirochaetales. Innerhalb dieser Ordnung können zwei Familien unterschieden werden: Spirochaetaceae und Leptospiraceae, wobei der Genus *Borrelia* der Familie der Spirochaetaceae (Tab. 1) zuzuordnen ist (MASUZAWA und YANAGIHARA, 1998).

Tab. 1: Taxonomie der Spirochaetales

Ordnung	Spirochaetales	
Familie	I Spirochaetaceae	II Leptospiraceae
Genus	1. Spirochaeta	1. Leptospira
	2. Cristispira	2. Leptonema
	3. Treponema	3. Turneria
	4. <i>Borrelia</i>	
	5. Serpulina	
	6. Brachyspira	
	7. Brevinema	

Es wurde ursprünglich angenommen, dass *B. burgdorferi* eine einheitliche Art darstellt (JOHNSON et al., 1984). Diese Theorie wurde 1988 allerdings von STANEK und Mitarbeitern sowie von WILSKE und Mitarbeitern widerlegt. Sie entdeckten durch immunologische

Analysen eine große Heterogenität bei europäischen Isolaten. Daraufhin erfolgte die Differenzierung von *B. burgdorferi*-Stämmen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wobei die Sequenzunterschiede in der chromosomalen DNA sowie der 16S rRNA genutzt wurden (ADAM et al., 1991; ROSA et al., 1991; MARCONI and GARON, 1992; PICKEN, 1992; MATUSCHKA et al., 1996).

Somit gelang es, die in Europa isolierten Stämme der Spezies *B. burgdorferi sensu lato* (s.l.) aufgrund ihrer geno- und phänotypischen Unterschiede in die in der Tabelle 2 aufgeführten genomischen Gruppen (Genospezies) zu unterteilen (BARANTON et al., 1992; BELFAIZA et al., 1993; CANICA et al., 1993; SCHÖNBERG et al., 1995; KURTENBACH et al., 1999; OSCHMANN et al., 1999; SIMON et al., 1999; CUTLER and WOODWARD, 2001; BERGSTRÖM et al., 2002).

Tab. 2: Genospezies des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes nach CUTLER und WOODWARD (2001), BERGSTRÖM and Mitarbeiter (2002)

Genospezies	Pathogenität	Vorkommen
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (s.s.)	ja	USA, Eurasia
<i>B. garinii</i>	ja	Eurasia
<i>B. afzelii</i> (Gruppe VS461)	ja	Eurasia
<i>B. valaisiana</i> (Gruppe VS 116)	fraglich	Eurasia
<i>B. lusitaniae</i> (Gruppe PotiB2)	nein	Zentraleuropa
<i>B. andersonii</i>	nein	USA, Kanada
<i>B. bissettii</i>	fraglich	USA, Europa
<i>B. japonica</i>	nein	Japan
<i>B. tanukii</i>	nein	Japan
<i>B. turdii</i>	nein	Japan
<i>B. lonestari</i>	fraglich	USA
<i>B. miyamotoi</i>	nein	Japan
<i>B. sinica</i>	nein	China

Die drei erstgenannten Genospezies sind humanpathogen, wobei *B. burgdorferi* s.s. meist mit Arthritis und Synovitis (Lyme-Arthritis), *B. garinii* mit der sogenannten Neuroborreliose und *B. afzelii* mit Hautmanifestationen assoziiert werden (VAN DAM et al., 1993; BALMELLI and PIFFARETTI, 1995; OSCHMANN et al., 1999). Die Frage der Humanpathogenität von *B. valaisiana*, *B. bissettii* sowie *B. lonestari* bleibt noch offen, obwohl eine Isolierung aus der Haut des Menschen sowie der PCR-Nachweis im Patientenmaterial zum Teil gelang. Da die

anderen Genospezies bisher nur aus Zecken isoliert wurden, fehlt der Beweis für ihre Pathogenität (RIJPKEMA et al., 1997; MASUZAWA und YANAGIHARA, 1998; OEHME und KIMMIG, 1999; MAGNARELLI et al., 2001).

In Amerika konnten die Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. andersonii*, *B. bissettii* und *B. lonestari* nachgewiesen werden, wobei die am häufigsten auftretende Art *B. burgdorferi* s.s. darstellt.

B. garinii, *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* sind vor allem in Europa und Asien anzutreffen.

B. japonica, *B. tanukii*, *B. turdi* und *B. miyamotoi* wurden nur in Japan isoliert, wobei *B. miyamotoi* jetzt auch in Schweden beschrieben wurde (FRAENKEL et al., 2002). Aufgrund ihrer genetischen Ähnlichkeit mit der Spezies *B. burgdorferi* s.l. konnten sie dieser zugeordnet werden (BARANTON et al., 1992; DEMAERSCHALCK et al., 1995; LE FLECHE et al., 1997; FUKUNAGA et al., 1998; SAINT GIRONS et al., 1998).

B. sinica wurde 2001 von MAGNARELLI und Mitarbeitern in China aus Zecken sowie Kleinnagern isoliert.

2.2.2. Morphologie

B. burgdorferi ist ein spiralförmiges, aktiv bewegliches Bakterium mit einer Länge von 8-30 μm und einem Zelldurchmesser von 0,18-0,25 μm . Borrelien sind damit dicker als Treponemen und Leptospiren. Die 4 bis 20 Windungen des Zelleibs sind meist unregelmäßig und inkonstant. Sie können sowohl in der Anzahl als auch in der Regelmäßigkeit je nach Alter der Kultur stark variieren (HAYES and BURGDORFER, 1993; MASUZAWA und YANAGIHARA, 1998; OSCHMANN et al., 1999). Befinden sich die Borrelien in der stationären Wachstumsphase, nimmt ihre Zelllänge zu. Hingegen reduziert eine Erhöhung des Glukoseanteils im Medium die Länge des Bakteriums (MÖNCHENBERG, 1998). Borrelien besitzen einen helikalen Protoplasmazyylinder, der neben Zytoplasma ein lineares, 935 - 955 kb großes Chromosom und bis zu 20 lineare sowie zirkuläre Plasmide beinhaltet (Abb. 1). Den Protoplasmazyylinder umgibt eine Zytoplasmamembran, die sogenannte innere Membran, der sich eine äußere Membran anschließt. Der dabei entstandene periplasmatische Raum enthält 3 bis 18 Endoflagellen, die subterminal am jeweiligen Zellende inserieren und parallel der Längsachse verlaufen (HOVIND-HOUGEN, 1984; JOHNSON et al., 1984). Diese ermöglichen die schraubenförmige Bewegung des Bakteriums. Des weiteren umgibt das Bakterium eine mukoide Schicht („Surface layer“ oder „S-layer“), welche sich leicht von der äußeren Membran lösen kann (KRAICZY et al., 1998).

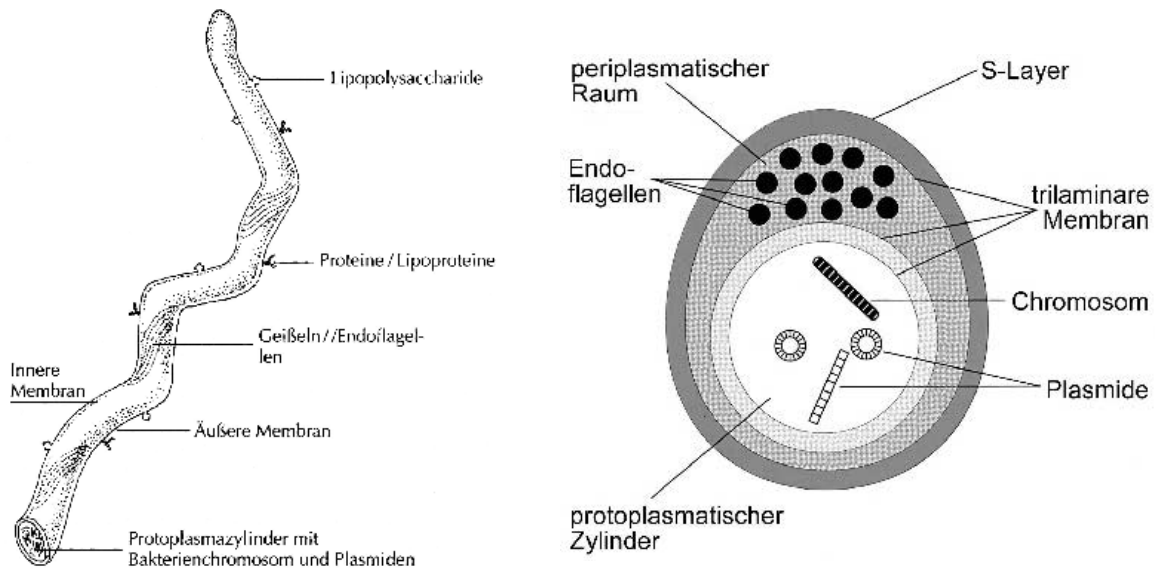


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Borrelie; links: Übersicht, rechts: im Querschnitt (KRAICZY et al., 1998)

Die Motilität von Borrelien entsteht durch Knickung, Streckung und Rotation des Zelleibs. Somit können sie sich in viskösen Medien wie der extrazellulären Matrix fortbewegen, wobei mit steigender Viskosität eine Zunahme der Beweglichkeit registriert werden kann (KIMSEY and SPIELMAN, 1990; WILSKE et al., 1997).

Zwischen den Borreliensarten bestehen morphologische Unterschiede, die nicht nur von ihrer geographischen Herkunft, sondern vermutlich auch von den Kulturbedingungen, der Länge der Inkubationszeiten und der Anzahl der Passagen abhängen (HOVIND-HOUGEN, 1984; JOHNSON et al., 1984; SCHÖNBERG et al., 1988). So beobachtete man bei verschiedenen Borreliensstämmen kleine, extrazelluläre, membrangebundene oder freiliegende Vesikel oder „Blebs“, wie in Abbildung 2 dargestellt (SCHULZE et al., 1995). Diese Bläschenbildung wurde bei Borrelien vor allem nach Kontakt mit Penicillin, spezifischen Antikörpern oder hypotonen Lösungen sichtbar. Auch konnten sie in gefrorenen und aufgetauten sowie in überalterten Kulturen nachgewiesen werden (STANEK, 1997b). Nach Enderleins Theorie ist diese Vesikelbildung ein Stadium in der Borreliensentwicklung (SCHNEIDER, 2002).

MURGIA und Mitarbeiter (2002) untersuchten die durch veränderte Umweltbedingungen hervorgerufene Transformation der mobilen Spirochäte zu der immobilen zystischen Form unter der Annahme, dass ein Transformationsfaktor RpoS, ein sogenannter alternativer Sigmafaktor, eine Rolle spielen könnte. Die Ergebnisse gaben keinen Hinweis auf die

Beteiligung des RpoS-Faktors. Scheinbar sind physikalisch-chemische Neuarrangements der äußeren Membran von *B. burgdorferi* s.l., die durch Umweltfaktoren hervorgerufen werden, verantwortlich für das Entstehen von zystischen immobilen Spirochäten.



Abb. 2: „Blebs“ von *B. burgdorferi* rasterelektronenmikroskopisch (SCHNEIDER, 2002)

Borrelien besitzen verschiedene lineare und zirkuläre Plasmide, die bis zu 17% der kodierten Kapazität ausmachen können (SAINT GIRONS et al., 1994). Zwischen den einzelnen Isolaten besteht eine erhebliche Variation in der Anzahl und Größe der Plasmide. Da sich auf ihnen nicht nur die Gene für die Oberflächenproteine, sondern auch für die Zellwand befinden, ist eine hohe Antigenvariation gegeben. Somit besteht eine große Anzahl von Anpassungs- und Schutzmechanismen in der Borrelienpopulation (DEL RIO et al., 1997).

2.2.3. Stoffwechsel

Der Erreger der Lyme-Borreliose vermehrt sich unter mikroaerophilen Bedingungen sehr gut und sein pH-Optimum liegt bei 7,6. Die optimale Wachstumstemperatur bewegt sich zwischen 30 und 34°C (BARBOUR, 1984). Borrelien sind Katalase-negativ und gegen Rifampicin, Sulfonamide, Fosfomycin sowie Flourouracil resistent (STANEK, 1997b). Schon BOERNER (1994) konnte bei seinen Untersuchungen eine Resistenz bei *B. burgdorferi*

gegenüber den antimikrobiell wirksamen Substanzen Actidion, Amphotericin B, Cotrimoxazol, Nalidixinsäure, Nystatin und Polymyxin B beobachten.

Im Gegensatz zu den obligat anaeroben Treponemen wurde eine Unempfindlichkeit gegenüber Metronidazol beschrieben. Dies erklärt sich aus dem Vorhandensein einer eisen-abhängigen Superoxid-Dismutase, die Borrelien anstatt einer Katalase oder Peroxidase besitzen (JOHNSON et al., 1984).

Die wichtigste Energiequelle ist Glukose, die durch anaerobe Glykolyse hauptsächlich zu Laktat, in geringen Mengen zu Pyruvat, abgebaut wird. Durch Zusatz von kleinen Mengen Pyruvat wird die Glykolyse offenbar stimuliert (BARBOUR and HAYES, 1986). Weiterhin können Maltose, Trehalose, Dextrin und Glycogen fermentiert werden. Raffinose wird dagegen nicht verstoffwechselt (KELLY, 1984).

Zum Wachstum benötigen Borrelien langkettige Fettsäuren, wie Methyl-Tetradecanoat, Methyl-Hexadecanoat und Methyl-cis-octadec-9-enoat. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass diese ohne weitere Modifikation aufgenommen werden (BARBOUR and HAYES, 1986). Jedoch konnten LIVESLEY und Mitarbeiter (1993) eine Modifikation im geringen Umfang beweisen. Hydroxylierte Fettsäuren, die z.B. mit dem Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien assoziiert sind, wurden in *B. burgdorferi* allerdings nicht nachgewiesen.

Die genannten Anforderungen für ein optimales Wachstum lassen darauf schließen, dass Borrelien einen hohen Anspruch an die Kulturbedingungen hinsichtlich der Zusammensetzung und Qualität des Mediums stellen. Die heute verwendeten Kulturmedien basieren auf dem von BARBOUR (1984) beschriebenen Barbour-Stoenner-Kelly-Medium (BSK), wobei auf dessen Grundlage Flüssigmedien sowie feste Nährböden verwendet werden (MUNDERLOH et al., 1988; PREAC-MURSIC et al., 1991; BERGER et al., 1992; POLLACK et al., 1993; SCHÖNBERG et al., 1995; GUPTA et al., 1995; GRAY et al., 1996; KAHL et al., 1998). Um ein mikroaerophiles Milieu im Flüssigmedium zu schaffen, werden die Kulturgefäße zu 75-95% mit dem BSK-Medium gefüllt und nach Beimpfung mit dem entsprechenden Untersuchungsmaterial luftdicht verschlossen (SCHÖNBERG et al., 1988). Unter diesen Kulturbedingungen verlieren die Borrelien allerdings schon nach wenigen Passagen ihre Infektiosität für kleine Labornager. Um eine Infektiosität beizubehalten, muss bei der Passagierung ein konstanter niedriger Sauerstoff-Partialdruck aufrecht erhalten werden, der jedoch nur durch eine aufwendige permanente Durchsetzung der Kultur mit einem Gasgemisch aus 4% O₂ – 5% CO₂ – 91% N₂ zu erreichen ist (AUSTIN, 1993). Für eine Vermehrung der Borrelien auf festem Nährboden ist ebenfalls eine Inkubation unter

reduziertem O₂- und erhöhtem CO₂-Partialdruck erforderlich, wobei schon nach 14 Tagen farblose runde Kolonien mit dem bloßen Auge erkennbar werden (KURTTI et al., 1987).

Eine Abwandlung des BSK-Mediums stellt das MKP-Medium (Modifiziertes Kelly-Medium nach PREAC-MURSIC und WILSKE, 1992) dar, das eiweiß- und kohlenhydratärmer und bei der Anzucht von Borrelien aus Humanproben erfolgreicher ist.

Die Mischung von BSK-Medium und Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) im Verhältnis von 1:1 wurde von SPECK und Mitarbeiter beschrieben (2002). Sie konnten mit dieser Variante eine höhere Isolationsrate von Borrelien aus Zecken registrieren als im einfachen BSK-Medium. Durch Zugabe von BGM-Zellen (engl. Buffalo-Green-Monkey) zum BSK-EMEM-1:1-Medium gelang in einer Blutprobe vom Hund der Nachweis von *B. burgdorferi* s.l.

Borrelien vermehren sich durch Querteilung bei einer Generationszeit von 7 bis 20 Stunden. Somit muss mit einer hohen Kultivierungsdauer von mehreren Wochen bis Monate gerechnet werden. Durch das langsame Wachstum können sich evtl. vorhandene Begleitkeime stark vermehren und zum Absterben des Erregers führen (SCHÖNBERG et al., 1989). Um das Wachstum der bakteriellen Kontaminationskeime zu verringern, wurden Antibiotika, gegen die *B. burgdorferi* resistent ist, dem Kulturmedium zugegeben. Damit konnte die Nachweisrate von Borrelien deutlich gesteigert werden.

2.2.4. Antigenstruktur

OSCHMANN und Mitarbeiter (1999) beobachteten, dass ein Verlust von Plasmiden, z.B. durch wiederholtes Passagieren, zu einer verminderten Infektiosität führen kann. Daraus lässt sich schließen, dass plasmidkodierte Proteine wesentliche Virulenzfaktoren darstellen.

Als wichtige Antigene fungieren die vom Erreger exprimierten, plasmidkodierten Oberflächenproteine ("outer surface"-Proteine, OspA), die möglicherweise auch biologische Funktionen besitzen. Derzeit werden sechs Oberflächenproteine (OspA-F) unterschieden, wobei vor allem OspA (31-33 kDa), OspB (34-35 kDa) und OspC (22-24 kDa) eine große Rolle spielen. Die Gene von OspA und OspB befinden sich in Form eines Operons auf einem linearen 49 kb großen Plasmid. OspC hingegen ist auf einem zirkulären Plasmid (27 kb) kodiert (SALYERS and WHITT, 1994).

OspA und OspC unterliegen einer temperaturabhängigen Genregulation. So wird bei steigender Temperatur weniger OspA, jedoch vermehrt OspC exprimiert. Dies erklärt die

starke Immunantwort des Wirtes gegenüber OspC im Gegensatz zu OspA bei einer natürlichen Infektion (BERGSTRÖM, 1999; OSCHMANN et al., 1999).

Bei allen bisher analysierten *B. burgdorferi*-Stämmen konnten zwei weitere Protein-Antigene nachgewiesen werden: ein Strukturprotein des Endoflagellin (Flagellin) mit einem Molekulargewicht von 41 kDa, dessen Gen auf dem linearen Chromosom lokalisiert ist, und ein als "Common Antigen" (CA) bezeichnetes hochkonserviertes 60 kDa-Protein (PREAC-MURSIC and WILSKE, 1993). Des Weiteren wurde die Existenz eines hochspezifischen immundominanten, wahrscheinlich protoplasmaassoziierten Proteins p 83/100 (83-100 kDa) sowie eines membranassoziierten, hochimmunogenen Proteins p 39 (39 kDa) erbracht (ROESSLER et al., 1995, SIMPSON et al., 1991). CHAMPION und Mitarbeiter (1994) isolierten nach Klonierung und Sequenzierung des virulenten B31-Stammes ein 18 kD Protein, das „Exported Plasmid Protein A“ (EppA, p18). Dieses weist eine hohe Immunglobulin (Ig) G-Spezifität und -Sensitivität auf und eignet sich als zusätzliches Antigen für einen rekombinanten ELISA und für den Western Blot (MÜLLER, 1999).

Über die Lipid- oder Carbohydrat-Antigene ist derzeit wenig bekannt. WHEELER und Mitarbeiter (1993) wiesen zwei lipidhaltige, hydrophobe Antigene nach, die als F1 und F2 bezeichnet wurden. Beide induzieren die Bildung von IgM- und IgG-Antikörpern.

2.2.5. Pathogenese

Die Pathogenese der Lyme-Borreliose konnte bis zum heutigen Tage aufgrund ihrer verschiedenen klinischen Manifestationen und Verläufe nicht vollständig aufgeklärt werden. Es ist allerdings bekannt, dass die große Anzahl an unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt wichtige Pathogenitätsmechanismen darstellen (BENACH et al., 1991).

Nach Zeckenstich wird eine **lokale Infektion** mit eventuell einhergehender Hautläsion beobachtet, die meist spontan ausheilt. Darin besteht auch die Gefahr des Nichterkennens einer Borrelieninfektion. Gelingt es dem Körper nicht, die Borrelien zu eliminieren, können diese in die Blutbahn eintreten und disseminieren. Die bakteriämische Phase gestaltet sich jedoch relativ kurz, da Borrelien eine ausgesprochene Affinität zu Zelloberflächen besitzen. Somit erklärt sich auch die geringe Nachweisquote von *B. burgdorferi* in Körperflüssigkeiten wie Blut, Liquor und Synovia. Für die Infiltration und Dissemination verwenden die Bakterien möglicherweise wirtseigene Enzymsysteme, wie z.B. das proteolytische Enzym Plasmin, das

von verschiedenen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen während des Entzündungsprozesses gebildet wird (KRAMER et al., 1996).

Wird der Erreger über die Blutbahn in die einzelnen Organe transportiert, bewirkt er dort innerhalb von Wochen oder Monaten klinische Symptome, die sogenannte **akute Organmanifestation**. Monate oder Jahre nach Verschwinden dieser Anzeichen können sich **späte oder chronische Organmanifestationen** entwickeln (SATZ, 1993; OSCHMANN et al., 1999). Diese drei Stadien bilden den klassischen Verlauf einer Lyme-Borreliose. Allerdings ist ein Durchlaufen aller drei Stadien eher selten, vielmehr kann jedes Stadium einzeln für sich auftreten.

Einige Autoren nehmen an, dass die hämatogene Ausbreitung des Erregers ein zufälliges Ereignis darstellt. Sie postulieren eher die Ausbreitung der Borrelien vom Ort der Inokulation entlang des Bindegewebes in verschiedene Richtungen und das zufällige Penetrieren der Blutgefäße während dieser Körperwanderung (CHANG, 1996; STRAUBINGER et al., 1998). Allerdings konnte durch experimentelle Infektionen von Labortieren eine Spirochaetämie bei Ratten, Hamstern, Kaninchen sowie Mäusen erzeugt werden (PHILIPP and JOHNSON, 1994). Auch beim Hund wies man vermehrungsfähige Borrelien noch mehrere Wochen nach der Infektion im Blut nach (STRAUBINGER et al., 1998).

SIMON und Mitarbeiter (1994) beschrieben eine Persistenz der Borrelien im Wirt trotz spezifischer Antikörper-Titer oder wiederholter Antibiotikatherapie. Somit müssen Borrelien die Fähigkeit besitzen, sich dem Immunsystem zu entziehen. Diese Tatsache führte HERZER (1990) auf die hohe Antigenvariabilität bzw. auf den Antigen drift des Erregers zurück. Hingegen nehmen SCOTT HEFTY und Mitarbeiter (2002) an, dass die Verschiedenartigkeit der Oberflächenproteine nicht nur auf die Änderungen des Antigenpools, sondern auch auf Modulationen der Oberflächenlipoproteine zurückzuführen ist. Nach ihrer Aussage besitzen Borrelien die Fähigkeit, die zeitlichen und räumlichen Muster der Lipoproteine während der Infektion zu regulieren und damit persistierende Infektionen zu verursachen.

Eine weitere Variante der Wolf-im-Schafspelz-Methode postulierten ZIPFEL und Mitarbeiter (2002). Aus ihren Untersuchungen geht hervor, dass Borrelien vermutlich in der Lage sind, die wirtseigenen Komplementregulatoren auf der Bakterienoberfläche zu binden. Somit können sie sich im Wirt verbreiten, ohne vom Immunsystem erkannt zu werden.

KLEMPNER und Mitarbeiter (1993) konnten, trotz Abwesenheit von Spirochaeten auf der Zelloberfläche, lebende Borrelien aus dem Lysat des Fibroblastenmonolayers isolieren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Borrelien in der Lage sind, menschliche Fibroblasten zu penetrieren und somit der Zerstörung durch Antikörper und Komplement vermittelter Lyse und Phagozytose sowie auch der Wirkung bakterizider Antibiotika entgehen

zu können. Daraus resultiert eine weitere Möglichkeit der Erklärung der persistierenden Infektionen.

Von weiterem Interesse ist, dass selbst kleine Mengen des Erregers im befallenen Gewebe erhebliche histopathologische Veränderungen verursachen können, was eine Beteiligung von Entzündungsmediatoren wie Interleukine, Tumor-Nekrose-Faktor α und Zytokine vermuten lässt (GARCIA-MONCO and BENACH, 1989).

Borrelien können auch direkte Schädigungen bewirken. GARCIA-MONCO (1995) zeigte, dass durch Anheftung des Erregers an Oligodendrogliazellen eine Verminderung der Myelinbildung erfolgt, was wiederum zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke und des neuronalen Stoffwechsels führt.

Auch Autoimmunreaktionen spielen bei der Pathogenese der Lyme-Borreliose eine wichtige Rolle. So beobachteten ABERER und Mitarbeiter (1989) und SIGAL (1993) eine Reaktion zwischen Patientenserum, die seropositiv auf *B. burgdorferi* reagierte, und peripheren Nerven, Synovia und Myokard. STEERE (1989) konnte nachweisen, dass genetisch empfängliche Patienten mit chronischer Lyme-Arthritis eine gewebsspezifische Autoimmunität im betroffenen Gelenk aufgrund „molecular mimicry“ zwischen einem Epitop von OspA und einem körpereigenen Antigen entwickelten.

2.2.6. Immunantwort

B. burgdorferi induziert sowohl zelluläre als auch humorale Abwehrmechanismen, wobei letztere erst während der ersten Krankheitswochen zum Tragen kommen. Nach erfolgter Infektion wird zuerst IgM, später IgG gebildet. Es können beide Formen, IgM seltener als IgG, über Jahre persistieren (SATZ, 1993). Dieses erschwert die Beurteilung der Protektivität von Antikörper (AK) -Titern. Selbst Reinfektionen sind jederzeit möglich und erzeugen damit erneut einen Titer.

IgM reagiert überwiegend mit OspC und Flagellin, IgG zu Beginn der Infektion nur mit Flagellin, im späteren Krankheitsverlauf mit einem breiten Spektrum von Borrelien-Antigenen (SCHÖNBERG et al., 1995).

In der Humanmedizin wurden in der letzten Zeit Patienten mit apparenter LB beobachtet, bei denen keine AK gegen *B. burgdorferi* s.l. nachweisbar waren. So berichteten DEJMKOVA und Mitarbeiter (2002) von einer Patientin mit klassischen Symptomen einer Lyme-Arthritis, bei

der zwar mit Hilfe der PCR der DNA-Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. gelang, jedoch ein seronegativer Befund vorlag.

Titerverlaufsuntersuchungen bei Mensch und Tier zeigen voneinander abweichende Ergebnisse.

Beim Menschen werden bei einer Borrelioseninfektion sowohl zelluläre als auch humorale Abwehrmechanismen induziert, letztere beginnen allmählich während der ersten Krankheitswochen (SATZ, 1993). Somit sind erst nach 1 bis 1,5 Monaten erhöhte IgG-Werte zu beobachten, wobei der Titer langsam ansteigt und mit fortschreitender Erkrankung erst nach Monaten, sogar Jahre später seinen Höhepunkt erreicht.

Beim Tier werden bereits 4 Wochen post infectionem (p. inf.) AK (IgG) gegen *B. burgdorferi* s.l. gebildet, wonach die humorale Immunantwort schneller zu erfolgen scheint als beim Menschen (LIEBISCH, 1993). Eine Bestimmung von IgM-AK ist für den Nachweis einer akuten Borrelioseninfektion beim Tier nicht hilfreich, da im Gegensatz zu anderen Infektionen IgM-AK bei einer LB sehr lange in hohen Konzentrationen im Serum persistieren können (HARTMANN, 2002).

In der Regel geht dem Auftreten von klinischen Zeichen einer LB die humorale AK-Bildung voraus. Jedoch kann auch beim gesunden Tier eine Titerdynamik beobachtet werden, die in manchen Fällen sogar spontanen Schwankungen unterliegt und damit die Diagnose einer LB erschwert (BAUMEISTER, 1999).

Nach einer experimentellen Infektion von **Hunden** durch Injektion borrelienhaltigen Zeckenmaterials konnte nach 14-21 Tagen ein Titeranstieg beobachtet werden. Nachdem am 21.-28. Tag ein Titermaximum registriert wurde, fiel der AK-Titer konstant ab, um nach 10-12 Wochen wieder den Ausgangswert zu erreichen (BURGESS, 1986; KOPP, 1990). Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Immunantwort künstlich infizierter Hunde nicht dem natürlichen Infektionsverlauf entspricht. APPEL und Mitarbeiter (1993) infizierten 38 Hunde durch Ansetzen von *B. burgdorferi* s.l.-haltigen Zecken (vorrangig Nymphen und Adulte). 28 der 38 Hunde entwickelten 4 bis 6 Wochen nach Zeckenexposition AK gegen *B. burgdorferi* s.l. Ein Titermaximum konnte 3 Monate p.inf. registriert werden, danach sank der AK-Spiegel kontinuierlich. 1 Jahr nach Zeckenexposition waren jedoch noch erhöhte Titer nachweisbar, was auf eine gewisse AK-Persistenz schließen lässt. Untersuchungen von MAGNARELLI und Mitarbeitern (1990b) an Hunden aus Endemiegebieten belegten ebenfalls, dass AK-Titer über Wochen (IgM) oder Monate (IgG) unabhängig von apparenten Infektionen persistieren können.

Experimentell infizierte **Katzen** entwickelten in Abhängigkeit vom Infektionsweg am 10.-21. Tag p.inf. erhöhte AK-Titer, wobei die Maxima in der 2.-21. Woche zu beobachten waren (BURGESS, 1992).

KOPP (1990) führte intravenöse Infektionsversuche an einem seronegativen **Kalb** durch. 2 Wochen p.inf. zeigte es eine erste Serokonversion, jedoch fiel der AK-Titer nach Erreichen des Titermaximums in der 7. Woche rasch ab.

Vergleichende Infektionsversuche zu Verlaufsuntersuchungen beim **Pferd** liegen nicht vor. Somit ist eine Einschätzung der humoralen Immunantwort bei einer Borrelieninfektion hinsichtlich Zeit und Verlauf erschwert. CHANG und Mitarbeiter (1999) konnten bei Infektionsversuchen mittels Zeckenansatz im Rahmen einer Vakzinationsstudie an Ponys eine Antikörperbildung nach 2-3 Monaten bei der ungeimpften Kontrollgruppe registrieren. Dieser Titer wurde bis zum Versuchsende immer noch beobachtet. DIVERS und Mitarbeiter (2003) detektierten mit Hilfe des ELISA schon nach 5-6 Wochen AK im Serum der experimentell infizierten Ponys. Ein hoher AK-Titer wurde jedoch erst ab dem 3. Monat p. inf. beobachtet, der bis zur Euthanasie der Tiere, die nach 9 Monaten erfolgte, konstant blieb.

Seroepidemiologische Studien lassen erkennen, dass Pferde sich oft mit dem Erreger auseinandersetzen müssen. Die Interpretation der AK-Titer gestaltet sich jedoch schwierig, da allein mit seropositiven Ergebnissen nicht zwischen dem Vorliegen einer Lyme-Borreliose, einer klinisch inapparenten Infektion und residualen AK-Titern sicher unterschieden werden kann (MAGNARELLI et al., 1988; LINDENMAYER et al., 1989; MAGNARELLI and ANDERSON, 1989; BERNARD et al., 1990; COHEN and COHEN, 1990; KÄSBOHRER und SCHÖNBERG, 1990; COHEN et al., 1992; MALONEY and LINDENMAYER, 1992; BROWNING et al., 1993; TASAI et al., 1993; CARTER et al., 1994; GERHARDS und WOLLANKE, 1996; LIEBISCH et al., 1999; MAGNARELLI et al., 2000; EGENVALL et al., 2001; DZIERZECKA and KITA, 2002a).

2.2.7. Kreuzreaktionen

B. burgdorferi-AK können mit den Oberflächenantigenen vieler Bakterien kreuzreagieren.

In der Humanmedizin werden vor allem Kreuzreaktionen mit *Treponema pallidum* und Leptospiren, in den USA auch mit *B. hermsii*, *B. parkeri* und *B. recurrentis* beobachtet. Selbst bei Virusinfektionen, z.B. Epstein-Barr-Virus, oder Rheuma-Faktor positiven Patienten können falsch-positive Ergebnisse auftreten (HORST, 1997; MAGNARELLI et al., 1987a, PANELIUS et al., 2002).

In der Veterinärmedizin muss in Abhängigkeit von der Tierart mit möglichen Kreuzreaktionen durch Leptospiren, gramnegative Enterobakterien sowie apathogene Spirochäten aus dem Magen-Darm-Trakt gerechnet werden (MAGNARELLI et al., 1987a; KÄSBOHRER and SCHÖNBERG, 1990b; TALASKA, 1998a).

Da in den letzten Jahren der Einsatz von Ganzzell-Sonifikaten in der Diagnostik reduziert wurde, spielen die o.g. Kreuzreaktionen nur noch eine untergeordnete Rolle (BRUCKBAUER et al., 1992; GERHARDS und WOLLANKE, 1996). Mit Hilfe des Western Blots oder Immunoblots wurde eine höhere Spezifität in der diagnostischen Beurteilung einer Borrelieninfektion erreicht (WILSKE et al., 1993). Der Einsatz von Testverfahren der 2. oder 3. Generation, wie z.B. der IFT mit Absorption, der Flagellin-ELISA oder der Rekombinante ELISA, verhalf ebenfalls zu einer Steigerung der Spezifität (WILSKE et al., 2000)

2.3. Epidemiologie

Die Lyme-Borreliose gilt weltweit als die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit (SCHMID, 1985; SATZ, 1993; DORN and SÜNDER, 1997; KAHL et al., 1998) und ist vor allem in Nordamerika, Asien sowie in Europa verbreitet. Zu den enzootisch durchseuchten Gebieten zählen die USA, Kanada, die britischen Inseln, West- und Mitteleuropa, Skandinavien, die Balkanstaaten, Nordasien (China, Japan) und die Staaten der früheren UdSSR (DENNIS, 1997; SCHÖNBERG, 1997). Als borreliosefrei gelten noch Island, Teile Südeuropas und der Norden Skandinaviens (Deutsches Grünes Kreuz – DGK und Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin – BgVV, 1997).

In Deutschland stellt die Lyme-Borreliose nach der Salmonellose die zweithäufigste Zoonose dar. Mit einer geschätzten Inzidenz von 22 Fällen pro 100.000 Einwohner und einer Seroprävalenz von 3-17% ist es verwunderlich, dass bis zum heutigen Tage keine einheitliche Regelung hinsichtlich der Meldepflicht in Deutschland besteht (OSCHMANN et al., 1999). In Berlin und Brandenburg ist die humane Lyme-Borreliose meldepflichtig.

2.3.1. Vektoren

Die Lyme-Borreliose (LB) ist eine typische Naturherdinfektion, die durch das Zirkulieren des Krankheitserregers *B. burgdorferi* s.l. zwischen Arthropoden als Vektor (Zecken),

freilebenden Wirbeltierwirten (Reservoir) und empfänglichen Wirten (Mensch und Tier), für die der Erreger als pathogen gilt, gekennzeichnet ist.

Borrelien werden vorwiegend durch den Stich von infizierten Zecken der Gattung *Ixodes*, in Mitteleuropa vor allem *I. ricinus*, auch Holzbock genannt, übertragen. Da sich sämtliche Entwicklungsstadien der Zecke (Larve, Nymphe und männliche sowie weibliche Adulte) durch Saugen am Wirtstier ernähren, gelten sie alle als potentielle Überträger des Erregers (Abb. 3).

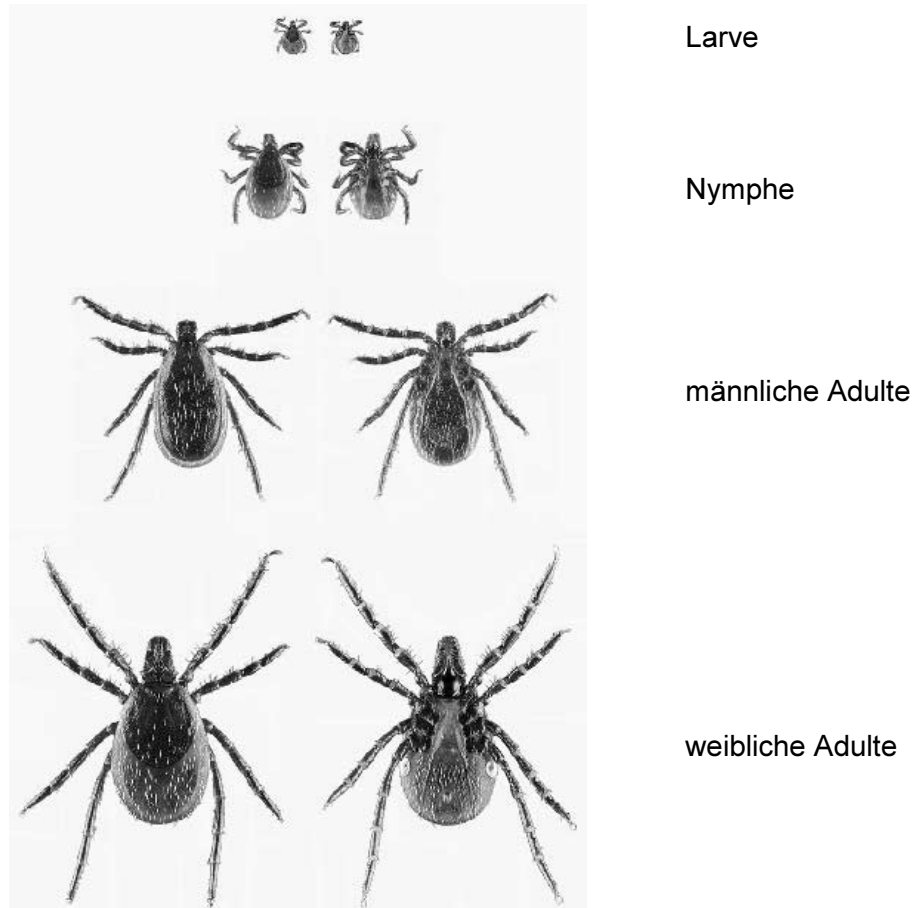


Abb. 3: Gemeiner Holzbock (*I. ricinus*), Entwicklungsstadien (BgVV*, 2004)

B. burgdorferi persistiert im Mitteldarm der Zecke, bevorzugt im Bereich des Mikrovillisaumes des Darmepithels, und vermehrt sich dort. Nach Beginn des Saugens der Zecke am Wirt passiert der Erreger die Darmwand und reichert sich in der Speicheldrüse an. Durch den Rückfluss der aus der Eindickung des aufgenommenen Blutes stammenden Flüssigkeit über die Speicheldrüse wird *B. burgdorferi* in die Einstichstelle abgegeben. Daraus kann geschlossen werden, dass das Risiko einer Infektion mit der Dauer des Saugaktes steigt.

* seit dem 01.11.2002 Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

OSCHMANN und Mitarbeiter (1999) ermittelten einen Infektionsdruck zwischen 7% bei einem 36 h- und 75% bei 48 h-Saugakt.

Neben dieser horizontalen Übertragung des Erregers von der Zecke zum Wirt konnte innerhalb der Zeckenpopulation eine transstadiale und transovariale Übertragung nachgewiesen werden (KAHL, 1991; ZHIOUA et al., 1994; WOLF, 1996).

Der Holzbock ist ein temporär stationärer Ektoparasit mit einer Entwicklungsdauer von 2-6 Jahren (GRAY, 1991). Er verbringt lediglich 1-2% seines Lebens mit Blutsaugen am Wirt und ist außerhalb dieser Zeit auf bestimmte mikroklimatische Verhältnisse angewiesen. Von großer Bedeutung ist die relative Luftfeuchtigkeit von 80-95%. Länger anhaltende Trockenheit wirkt sich nachteilig auf seine Entwicklung aus.

Die saisonale Wirtssuchaktivität von *I. ricinus* beginnt bei Tagestemperaturen um die 10°C, die ca. ab März erreicht werden, und endet im Oktober/November. Aktivitätsspitzen wurden im Frühsommer (April bis Juni) und Herbst (September bis Oktober) beobachtet. Somit erklärt sich die vielfach zweigipflige Saisondynamik, die jedoch in Abhängigkeit von den mikroklimatischen Bedingungen auch unimodal verlaufen kann (KAHL, 1994).

Die ungesogenen Zecken positionieren sich vorwiegend auf Grashalme, krautige Pflanzen und andere Objekte bis zu 1,5 m Höhe. Larven und Nymphen sind eher im Laub anzutreffen. Nach Registrierung eines potentiellen Wirtes durch Geruch, Wärmestrahlung sowie durch Fortbewegung hervorgerufene Vibration lassen sie sich auf diesen fallen und versuchen, sich festzuklammern (KAHL, 1996).

Zecken befallen in Abhängigkeit ihrer Entwicklungsstadien eine große Anzahl verschiedener Tierarten, allein in Deutschland sind bislang mindestens 35 Säugetier- sowie 45 Vogel- und Reptilienarten als Wirte bekannt (BEDER, 1988). Für *I. ricinus* wurden bis zu 300 Arten, darunter terrestrische Kleinsäuger, Karnivoren, Huftiere, Eidechsen und Vögel dokumentiert (ANDERSON, 1991; KAHL, 1994).

Die Befallshäufigkeit von *I. ricinus* mit *B. burgdorferi* variiert stark in Abhängigkeit von Region und Entwicklungsstadium. Für Mitteleuropa werden durchschnittliche Infektionsraten von ca. 1-3% (Larven), 10% (Nymphen) bzw. 20-30% (Adulte) angegeben (Deutsches Grünes Kreuz – DGK und Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin – BgVV, 1997). Somit gestaltet sich auch das Infektionsrisiko unterschiedlich. OEHME und KIMMIG (1999) ermittelten in Süddeutschland einen Infektionsdruck von 1,5%, bezogen auf alle und 23%, bezogen auf infizierte Zecken. Eine Studie über den Durchseuchungsgrad von Zecken mit *B. burgdorferi* s.l. in Sachsen belegte einen Erregernachweis bei 23,7% der Zecken, dabei wurden auch Mehrfachinfektionen registriert (KLAPPER, 1999). In der Schweiz

beträgt die Prävalenz von Borrelien in Zecken mindestens 20% (WICKI et al., 2000). Studien aus Irland zeigten, dass 14,9% der Zecken (20,1% Adulte und 13,1% Nymphen) erregerhaltig sind (KIRSTEIN et al., 1997). Auch in Frankreich wurden Untersuchungen hinsichtlich Infektionsrate und Erregerart in Zecken durchgeführt, die zu ähnlichen Ergebnissen führten (PICHON et al., 1999).

Ein großes Problem stellt die Mehrfachinfektion von Zecken mit verschiedenen pathogenen Erregern dar. Diese Tatsache erschwert massiv die Diagnosestellung und damit die therapeutischen Maßnahmen (MITCHELL et al., 1996; KIRSTEIN et al., 1997; WEBER et al., 1998; LEUTENEGGER et al., 1999; PICHON et al., 1999; LAYFIELD and GUILFOILE, 2002).

Hauptvektor für *B. burgdorferi* s.l. stellt in Deutschland *I. ricinus* dar, obwohl in den letzten Jahren auch andere Überträger erwähnt wurden. So konnten TOUTOUNGI und GERN (1993) die Vektorkompetenz von *I. hexagonus* nachweisen. Weitere Borrelienisolierungen aus Zecken und selbst hämatophagen Arthropoden folgten, jedoch besteht noch Uneinigkeit hinsichtlich der Übertragungskompetenz der einzelnen Vektoren (GERN et al., 1997; HALOUZKA et al., 1998; ZEMAN, 1998).

2.3.2. Erregerreservoir

Das Hauptreservoir für *B. burgdorferi* stellen Kleinnager dar, wobei in Deutschland die Gelbhals-, Wald-, Brand- und Rötelmaus sowie andere Maus- und Spitzmausarten die größte Bedeutung besitzen. Sie sind ubiquitär vorhanden und hoch empfänglich. Weiterhin können Igel, Eichhörnchen, Siebenschläfer und Feldhasen als Borrelienträger fungieren.

Vögel, insbesondere Zugvögel, besitzen zwar eine gewisse Reservoirkompetenz, dienen jedoch vorrangig als Transportwirte und können somit die Endemiegebiete verlagern. Dies trifft auch für Rehe, Rot- und Dammhirsche zu, die allerdings keine Reservoirfunktion ausüben. Fraglich bleibt auch die epidemiologische Bedeutung des Rotfuchses als möglicher Träger von *B. burgdorferi* (GRAY et al., 1994; MATUSCHKA et al., 1994; KLICH et al., 1996; GERN et al., 1998; HEIDRICH, 2000).

2.4. Klinik der Lyme-Borreliose

2.4.1. Humanmedizin

Die Lyme-Borreliose (LB) ist eine chronisch verlaufende Multisystemerkrankung und äußert sich beim Menschen in verschiedenen Krankheitsbildern, wobei allgemeine, dermatologische und arthritische bzw. rheumatische Symptome im Vordergrund stehen. Es konnten auch Manifestationen am Herzkreislaufsystem und am Auge, seltener an Leber und Niere, beobachtet werden. Einige Fallbeispiele berichteten über Halsentzündung und Hodenschwellung (STANEK, 1998; BURMESTER, 1999; OSCHMANN et al., 1999).

Der komplexe klinische Verlauf der LB lässt sich anhand zeitlicher Abläufe in drei Stadien gliedern, wobei fließende Übergänge, symptomfreie Intervalle wie auch das Überspringen von Stadien möglich sind. Die Einteilung der Krankheitsstadien erfolgt in Anlehnung an die vom Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in den USA und vom EUCALB-Programm (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis) in Europa herausgegebene klinische Falldefinition. Diese soll dem praktizierenden Arzt als Orientierung dienen und eine Standardisierung in klinischen Studien ermöglichen (CIMMINO et al., 1998; STANEK, 1998).

Stadium 1, lokalisiert:

- Erythema migrans (EM) ca. 4-14 Tage nach Zeckenstich meist ohne Allgemeinstörung, z. T. Fieber und grippale Symptome
- Lymphadenosis cutis benigna (LCB)
- regionäre Lymphadenopathie
- Kopfschmerz und Nackensteifheit
- „wandernde“ Arthralgien, Myalgien

Stadium 2, generalisiert:

- schwere Allgemeinstörung mit Abgeschlagenheit, Latenzzeit: 2-10 Wochen
- zusätzlich zu den im Stadium 1 genannten Symptomen: akut-entzündliche Stadien der Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), Morphea, Lichen sclerosus et atrophicus
- Lymphadenosis cutis benigna (LCB)
- akute migratorische Arthralgie oder Arthritis (asymmetrisch, intermittierend, rekurrend)
- Myositis, Fibromyalgie

- lymphozytäre Meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux-Bannwarth-Syndrom), Meningitis, Encephalitis, Neuritis cranialis, Radiculitis, Mononeuritis, Myelitis
- regionäre oder generalisierte Lymphadenopathie, Splenomegalie
- AV-Block, Endocarditis, Myocarditis, Pancarditis
- Konjunktivitis, Uveitis
- milde oder rekurrende Hepatitis

Stadium 3, chronisch:

- Allgemeinstörung mit Abgeschlagenheit, Latenzzeit: Monate bis Jahre
- chronisch-atrophische Stadien der ACA, Morphea, Lichen sclerosus et atrophicus
- chronische Arthritis, längere arthritische Attacken (migratorisch, asymmetrisch, intermittierend, rekurrend)
- chronisch-progrediente Meningoencephalitis, Encephalopathie, Vasculopathie, chronische Myelitis, Polyneuropathie, Polyradiculopathie
- Keratitis
- chronische Karditis, AV-Block, Kardiomyopathie.

2.4.2. Veterinärmedizin

Haus- und Wildtiere besitzen durch ihren häufigen Wald- und Wiesenkontakt und der damit einhergehenden erhöhten Zeckenexposition eine viel größere Prädisposition für eine Borrelieninfektion als der Mensch. Immer noch ungeklärt ist die Frage, inwieweit infizierte Tiere klinische Erscheinungen einer Lyme-Borreliose (LB) zeigen bzw. ein Reservoir für *B. burgdorferi* darstellen (LIEBISCH, 1993).

In zahlreichen Infektionsstudien an Labortieren (Maus, Ratte, Gerbil, Meerschweinchen, Hamster und Hase) wurde versucht, Symptome einer LB ähnlich denen des Menschen hervorzurufen. Allerdings entwickelten nur immunsupprimierte oder jugendliche Tiere klinische Zeichen einer LB, meist in Form von Arthritis oder Erythema migrans (PHILIPP and JOHNSON, 1994).

Da die beim Tier postulierte Symptomatik größtenteils auf Fallbeispiele zurückzuführen ist, kann ein einheitliches Krankheitsbild nicht definiert werden. Eine Einteilung der vielfältigen Symptome in Stadien, wie sie beim Menschen praktiziert wird, ist beim Tier nicht möglich.

Im Zusammenhang mit serologisch nachgewiesenen *B. burgdorferi*-Infektionen beim **Hund** wurde von klinischen Symptomen berichtet z.B. gestörtes Allgemeinbefinden (Mattigkeit,

Lethargie, Inappetenz, Fieber, Anorexie, Diarrhoe, Kachexie), Lymphadenopathie, Erkrankungen des Bewegungsapparates (Gliedersteifheit, Gelenkschwellung – vor allem der Karpalgelenke –, Gelenkschmerzen, intermittierende Lahmheit, Arthritis, Oligoarthritis, Parese der Hintergliedmaßen, Myalgie, Myopathie wie Muskelatrophie meist einhergehend mit einer kyphotischen Rückenhaltung), Herzmanifestationen (Myocarditis, kompletter AV-Block bzw. AV-Block 1. Grades mit atrioventrikulären Überleitungsstörungen), Nierenfunktionsstörungen (Glomerulonephritis, Nierendysfunktion), neurologische Störungen (Ataxie, Astasie, Kopfschiefhaltung, tonische Krämpfe, Hyperreflexie, Hyperästhesie, einseitige Fazialisparese, Meningitis), Splenomegalie und Hautläsionen (LISSMANN et al., 1984; KORNBLATT et al., 1985; MAGNARELLI et al., 1987b; BOSLER et al., 1988; ENG et al., 1988; GRAUER et al., 1988; LEVY and DURAY, 1988; PFISTER et al., 1989; COHEN et al., 1990; WEBER et al., 1991; FISCHER und LEUTERER, 1992; WASMOEN et al., 1992; APPEL et al., 1993; LIEBISCH und LIEBISCH, 1993; BREITSCHWERDT et al., 1994; CERRI et al., 1994; MÜLLER, 1994; GOEBEL, 1995; LINDNER und BÖCKEL, 1995; DAMBACH et al., 1997; FRESE, 1997; STRAUBINGER et al., 1998).

Über klinische Manifestationen bei der **Katze** ist nur wenig bekannt. In den Untersuchungen von MAGNARELLI und Mitarbeitern (1990a) konnte kein Kausalzusammenhang zwischen dem AK-Nachweis gegen *B. burgdorferi* und Symptomen wie Lahmheit, Fieber, Abgeschlagenheit und Anorexie festgestellt werden. BURGESS (1992) infizierte experimentell 15 Katzen mit *B. burgdorferi*, worauf diese Antikörper entwickelten, jedoch keine klinischen Anzeichen einer Infektion zeigten. BECKER (1996) beobachtete in einigen Fällen Gelenkbeschwerden mit hohem Fieber.

Seroepidemiologische Untersuchungen an **Rindern** in Europa ergaben gehäuft positive Antikörperreaktionen. Die dabei erhobenen Symptome beim Rind sind folgende: Gelenk- und Gliedmaßenmanifestationen (Lahmheit, Steifheit, Gelenkschwellung, Arthritis, Klauenentzündung, Festliegen), Inappetenz, Fieber, Gewichtsverlust, Lymphadenopathie, Erythem am Euter (mit Hyperthermie, Schwellung und Hypersensibilität), Aborte und Rückgang der Milchleistung (BURGESS et al., 1987; BURGESS, 1988; POST et al., 1988; BRAND, 1990; KÄSBOHRER und SCHÖNBERG, 1990; KOPP, 1990; PARKER and WHITE, 1992; LISCHER et al., 2000).

Bei **kleinen Wiederkäuern** werden im Zusammenhang mit erhöhten Antikörpertitern gegen *B. burgdorferi* gehäuft Arthritiden beobachtet (HOVMARK et al., 1986; KOPP, 1990; BERGMANN et al., 1992). FRIDRIKSDÓTTIR und Mitarbeiter (1992) berichteten über einen LB-Verdacht bei

Schafen in Norwegen. Die Lämmer zeigten starke Lahmheit, schlechten Allgemeinzustand und Inappetenz.

Die beim **Pferd** postulierte Symptomatik geht größtenteils auf Fallbeispiele aus Amerika zurück. In Europa wurden bis zum heutigen Zeitpunkt nur wenige Borreliosefälle beschrieben.

Von dem ersten Borreliose-Verdachtsfall beim Pferd berichteten BURGESS und Mitarbeiter (1986). Es handelte sich um ein Shetland-Pony aus Wisconsin, das seit 6 Monaten an einer schmerzhaften Schwellung der Karpalgelenke mit einhergehender Lahmheit und einem auffälligen Augenbefund (Corneaödem, Konjunktivitis, ulzerative Keratitis, Uveitis) litt. Die Untersuchung von Serum und Synovia mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests (IFT) erbrachte einen erhöhten AK-Titer gegen *B. burgdorferi* (1:1024). Der Erreger konnte aus der vorderen Augenkammer des linken Auges isoliert werden.

In einer weiteren Studie wurden 40 Pferde aus Connecticut von POST und Mitarbeiter (1987) sowie MAGNARELLI und Mitarbeiter (1988) serologisch auf AK gegen *B. burgdorferi* untersucht. Dabei zeigten 8 Tiere positive Titer von 1:64 bis 1:1024 im IFT. Klinische Symptome wie Lethargie, Fieber, geschwollene Gelenke, Laminitis, haarlose und schuppige Haut, Hypersensibilität der Haut, Bewegungsunlust und Steifheit wurden nur bei 3 der 8 seropositiven Tiere beobachtet.

1987 berichteten BURGESS und MATTISON von einem 6 jährigen Wallach aus Wisconsin, der an einer progressiven Enzephalitis litt, die mit Kopfschiefhaltung, ständigem Laufen, Schweiflähme und Dysphagie einherging. Der im Serum mit Hilfe des IFT ermittelte AK-Titer betrug 1:2048. Der Nachweis von Borrelien gelang mittels direktem Immunfluoreszenztest (DIFT) aus dem Gehirn.

Der erste Fall von LB in British Columbia, Kanada, wurde 1988 vorgestellt. Hierbei handelte es sich um einen 11 jährigen Wallach und um ein 3 Monate altes Fohlen. Der Wallach zeigte eine unklare Lahmheit. Die serologische Untersuchung auf AK gegen *B. burgdorferi* verlief positiv. Beim Fohlen, das ebenfalls einen erhöhten AK-Titer im Serum aufwies, wurden Polyarthritiden und Lahmheit sowie Kreislaufstörungen beobachtet (anonym).

Untersuchungen von Pferdeseren aus Endemiegebieten ergaben höhere Durchseuchungstiter als Blutproben aus nicht endemischen Regionen (DOBY et al., 1987; COHEN et al., 1988; COHEN et al., 1992; CARTER et al., 1994). Dabei konnten MAGNARELLI und Mitarbeiter (1988) bei 9 von 86 seropositiven Pferden eine einmalige oder rekurrende Lahmheit registrieren.

Allerdings ist nicht jeder seropositive Befund als Beweis einer LB anzusehen. Einige seroepidemiologische Studien belegen, dass Pferde mit einem positiven AK-Titer gegen *B. burgdorferi* nicht unbedingt klinische Symptome aufweisen müssen (VENNER und DEEGEN,

1996). So konnten LINDENMEYER und Mitarbeiter 1989 in New England zwar bei 46 (75%) von 61 Tieren im IFT einen positiven AK-Titer bestimmen, jedoch verhielten sich die Pferde klinisch unauffällig. Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch MARCUS und Mitarbeiter (1985) und BUSHMICH und POST (1989).

In einer 1988 durchgeführten Studie in Wisconsin (BURGESS) zeigten von 86 seropositiven Pferden 47 Lahmheit oder Steifheit, 8 Hufrehe, weitere 8 Kachexie, 7 geschwollene Gelenke und 6 Lethargie und Fieber. 10 Tiere waren ohne klinische Symptome. Eine Kontrollgruppe wurde in dieser Studie nicht aufgestellt.

Bei einem intravenösen (i.v.) Infektionsversuch an 4 Ponys (BURGESS and GENDRON-FRITZPATRICK, 1990) wurden klinische Symptome von den Autoren nicht genannt, allerdings berichteten sie über die histologischen Befunde nach der Obduktion. Dabei waren milde Anzeichen einer lymphoplasmatischen perivaskulären Infiltration in der Niere, im Herzen, in der Zunge und in der Leber zu beobachten. Zusätzlich zeigte sich eine gering- bis mittelgradige Proliferation der Synovialis mit perivaskulären lymphoiden Infiltrationen in einigen Gelenken.

Ein weiterer Infektionsversuch an 7 natürlich-infizierten Stuten konnte die Möglichkeit einer intrauterinen Infektion beweisen (BURGESS et al., 1990). 2 dieser Stuten abortierten oder resorbierten ihren Fötus, 3 Fohlen starben kurz nach der Geburt und nur 2 Fohlen überlebten. 1 Fohlen musste einjährig aufgrund von neurologischen Symptomen euthanasiert werden. Bei den adulten Tieren wurden Symptome wie Lahmheit und Steifheit bis 3 Wochen nach der Geburt beobachtet. *B. burgdorferi* konnte aus den Nieren sowie aus dem Gehirn der toten Fohlen isoliert werden.

Bei einer seroepidemiologischen Studie in Berlin reagierten im IFT kein Pferd und im ELISA 16,1% der Tiere positiv (KÄSBOHRER und SCHÖNBERG, 1990). Klinisch auffällige Tiere wurden nicht beobachtet.

Die Untersuchungen von BROWNING und Mitarbeitern (1993) zeigten, dass Pferde mit ungeklärter Lahmheit und teilweisem Fieber eine höhere Seropositivität aufwiesen (49%) als klinisch unauffällige (3-4%). Bei einem Probanden dieser Untersuchungsgruppe wurde aufgrund der Anamnese, der klinischen Zeichen und der erfolgreichen antibiotischen Therapie die Verdachtsdiagnose LB gestellt. Der Nachweis von IgG-AK gelang im Serum und in der Synovia, jedoch erfolgte kein direkter Erregernachweis.

GERHARDS und WOLLANKE (1996) untersuchten 153 gesunde und 79 ERU erkrankte Pferde auf AK gegen *B. burgdorferi* aufgrund des Verdachts ihrer Beteiligung am equinen rezidivierenden Uveitis-Geschehen (ERU). 48% der Probanden reagierten bei einem Grenztiter von 1:64 im IFT positiv. Es bestand weder ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der ERU und Seropositivität noch konnte eine klinische

Symptomatik im Sinne einer Lyme-Borreliose (LB) bei den Pferden mit hohen AK-Titern festgestellt werden.

Von einem möglichen Borreliose-Fall berichteten HAHN und Mitarbeiter (1996). Es handelte sich um eine 8jährige Vollblutstute, die seit 3 Wochen unter Lethargie, Anorexie, Fieber, Ataxie und Hyperästhesie am Kopf litt. Nach anfänglichem Behandlungserfolg mit Antibiotika verschlechterte sich ihr Zustand zusehends. Zu den beobachteten Symptomen zählten: Arthritis vor allem der Karpalgelenke, intermittierendes Fieber, Bewegungsunlust, Füllung der Sehnenscheiden, akute Uveitis, Hypersensitivität am Kopf, an den Beckengliedmaßen und in der Perinealregion, bis hin zu Depression, Kopfpresen, Stupor, Manegebewegungen, quadripedale Ataxie und extremer Exzitation. Der AK-Nachweis erfolgte mit Hilfe des ELISA im Serum sowie in der Synovia. Nach der Euthanasie des Tieres gelang die Isolierung von Borrelien-DNA mit Ausnahme des Augenkammerwassers aus dem gesamten Probenmaterial.

MANION und Mitarbeiter (1998) gelang eine Erregerisolierung aus Urin von 2 allerdings klinisch unauffälligen Pferden.

LIEBISCH und Mitarbeiter (1999) untersuchten 1492 klinisch verdächtige und unverdächtige Pferde und ermittelten bei 47,9% der Tiere einen erhöhten AK-Titer. Die in diesem Rahmen postulierten klinischen Symptome umfassen Allgemeinstörungen (Leistungsabfall, Kachexie, Lethargie, Fieber), Gelenk- und Gliedmaßenmanifestationen (intermittierende Lahmheit, Bewegungsunlust, Arthritis, Polyarthritis, Gelenkschwellung), neurologische Erkrankungen (Ataxie, Hyperästhesie, Somnolenz), Hautveränderungen (Erythema chronicum migrans, Hyperkeratose, Acrodermatitis atrophicans, Alopezie, equines Sarkoid), Augenmanifestationen (Uveitis, Keratitis, Konjunktivitis, Chorioiditis, Lidödem, Corneatrübung) und Endokarditis. Aus dieser Studie gingen 4 Fallbeispiele hervor, die laut Verfasser den Beweis einer Infektion mit *B. burgdorferi* s.l. und daraus folgender klinischer Erkrankung erbrachten. Bei dem ersten Fall handelte es sich um einen 10jährigen Wallach mit Polyarthritis, Endokarditis und Kachexie. Im IFT wurde ein AK-Titer von 1:128 sowohl im Serum als auch in der Synovia der jeweils erkrankten Gelenke detektiert. Der Nachweis von AK im Serum konnte mit dem Western Blot bestätigt werden. Die kulturelle Anzucht aus der Synovia und der Haut war positiv. Nach der Euthanasie des Pferdes gelang die Isolierung von Borrelien aus einigen Lymphknoten, der Lunge, der Leber und der Milz. Der zweite Fall betraf einen 6jährigen Wallach, der ebenfalls an Polyarthritis, Endokarditis und Kachexie litt. Bei ihm wurden die gleichen Befunde erhoben wie im vorher beschriebenen Fall. Des Weiteren wurde über eine 13jährige Stute berichtet, die an einer beidseitigen chronischen Keratitis erkrankt war. Auch bei diesem Pferd konnte im IFT ein AK-Titer von 1:128 im Serum nachgewiesen werden. Die Kultivierung von Konjunktivalschleimhaut sowie Haut und anschließender Isolierung von Borrelien war erfolgreich. Der letzte Fall beschrieb

eine 18jährige Stute mit diffuser Hyperkeratose und sarkoiden Hautveränderungen, die im IFT eine Serokonversion von 1:128 bis 1:1024 zeigte. Aus dem Bioparatmaterial von den veränderten Hautarealen konnten Borrelien isoliert werden. Gleichzeitig gelang die kulturelle Anzucht von *B. burgdorferi* s.l. aus der Lunge, der Niere, der Leber und des Großhirns teilweise schon nach 24h. Die Verfasser berichteten außerdem, dass aus den zahlreich angegebenen Isolaten ohne Schwierigkeit Reinkulturen von *B. burgdorferi* s.l. angezchtet werden konnten, wobei konkrete Angaben fehlten. Auch spätere Veröffentlichungen enthielten keine detaillierten Angaben zu den Ergebnissen (Liebisch et al., 2002).

CHANG und Mitarbeiter (2000) berichteten über ein Pony, das mit rekombinanter OspA-Vakzine geimpft und 3 Monate danach mit *B. burgdorferi*-infizierten Zecken konfrontiert wurde. 2 Wochen nach Zeckenexposition reagierte das Tier mit Fieber. Danach zeigten sich keine weiteren Symptome. Mit Hilfe der PCR wurde allerdings eine Ehrlichiose diagnostiziert. In einer Studie aus Schweden wurden 2018 Pferde auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* s.l. und *Ehrlichia* ssp. getestet. Die Seroprävalenz gegenüber *B. burgdorferi* s.l. betrug 16,8%. In dieser Untersuchung konnte eine Assoziation zwischen Seropositivität und Gelenkerkrankungen aufgezeigt werden (EGENVALL et al., 2001).

2.5. Diagnostik

Die Vielzahl der klinischen Erscheinungsformen und ihre teilweise langen Inkubationszeiten erfordern direkte und indirekte Nachweisverfahren zur Abklärung der klinisch gestellten Verdachtsdiagnose.

2.5.1. Direkter Erregernachweis

2.5.1.1. Kultivierung und Mikroskopie

Ein eindeutiger Beweis einer Borrelieninfektion wird durch den kulturellen Nachweis geführt. Borrelien sind durch ihre hohen Ansprüche an die Kultur schwer anzuzüchten und benötigen daher eine mehrwöchige Inkubationszeit. Somit ist der kulturelle Erregernachweis für die Routinediagnostik ungeeignet (WILSKE et al., 2000).

Die verwendeten Untersuchungsmaterialien sind in Abhängigkeit vom Krankheitsbild Liquor, Synovia, Haut und andere Gewebeproben sowie Urin und Blut, aus denen jedoch selten der Erregernachweis gelang (MANION et al., 1998; TALASKA, 1998a; CHANG et al., 1999; PRIEM

und KRAUSE, 1999). Eine optimale Probengewinnung vorausgesetzt, können Borrelien in Medien wie BSK- und MKP-Medium mit und ohne Zugabe von Hemmstoffen sowie unter den im Kap. 2.2.3. angegebenen Bedingungen angezüchtet werden (SCHÖNBERG et al., 1995; GUPTA et al., 1995; GRAY et al., 1996; KAHL et al., 1998).

Die Nativdarstellung ist im Dunkelfeld- oder Phasenkontrastmikroskop bei einer 160- bis 400fachen Vergrößerung möglich. Eine weitere Methode zur direkten Darstellung des Erregers aus der Kultur ist die "Multiple-Drop-Technique" mit Negativ-Kontrastierung (WOLF, 1996). Dazu wird das erregerehaltige Kulturmedium zentrifugiert und das Sediment nach Zugabe von einer Saccharose-Lösung in mehreren Tropfen in eine Petrischale überführt. Anschließend erfolgt das Auflegen von mit speziellem Kunststoff beschichteten Kupfernetzchen, sogenannte Grids, die in der Elektronenmikroskopie Einsatz finden.

Borrelien verhalten sich gramnegativ und sind nach Giemsa oder Warthin-Starry gut anfärbbar. Eine Färbung mit Carbofuchsin eignet sich ebenfalls zur fixen Darstellung (PREAC-MURSIC and WILSKE, 1993). Allerdings können sich Borrelien nach Fixierung und Färbung verändern, wodurch Artefakte entstehen (PREAC-MURSIC et al., 1986).

2.5.1.2. Polymerase-Kettenreaktion

Eine weitere Möglichkeit des direkten Erregernachweises bietet die PCR (engl. Polymerase Chain Reaction). Die PCR-Technik erlaubt den Nachweis geringster Mengen erregerspezifischer DNA (engl. Desoxyribonucleinacid) im Probenmaterial (wie Blut, Liquor, Synovia, Urin, Haut und anderen Gewebeproben) in Abhängigkeit von der Manifestation der Erkrankung. So wurde aus Urin von an Neuroborreliose sowie an Lyme-Arthritis erkrankten Patienten *B. burgdorferi*-DNA isoliert (BAYER et al., 1996). Im Gegensatz dazu ist die Nachweisrate von Borrelien-DNA aus dem Urin bei an Haut-Borreliose erkrankten Personen sehr gering. Hier ist eine DNA-Isolation aus der Haut am erfolgreichsten (BRETTSCHEIDER et al., 1998). Eine Isolierung von Borrelien-DNA aus Blut ist weniger sensitiv, da Borrelien eine sehr kurze Bakteriämiephase aufweisen (HARTMANN, 2002). Hinzu kommt, dass wahrscheinlich die Anwesenheit von Eisen, das im Hämoglobin der Erythrozyten gebunden ist, die PCR-Reaktion hemmt (LEUTENEGGER et al., 1999).

Zu beachten ist, dass ein positives PCR-Ergebnis eine Lyme-Borreliose (LB) weder ausschließen noch beweisen kann. Es ermöglicht lediglich einen Rückschluss auf das Vorhandensein des Erregers. Ob dieser noch infektiös oder bereits abgetötet ist, wird

mit diesem Verfahren nicht beantwortet. Neueste Forschungsergebnisse belegen, dass künstlich injizierte Borrelien-DNA (bei Nichtanwesenheit von vermehrungsfähigen Borrelien) im Hundeorganismus schon nach drei Wochen abgebaut und damit nicht mehr nachweisbar ist (HARTMANN, 2002). Deshalb sollte die PCR nur im Kontext zu anderen Nachweisverfahren und der klinischen Symptomatik durchgeführt werden (TALASKA, 1998a; PRIEM und KRAUSE, 1999).

Bei der PCR-Reaktion wird ein Fragment der zu vermehrenden Nukleinsäure (Template) über die DNA-sequenzspezifische Hybridisierung und Elongation von zwei Oligonukleotid-Primern in exponentieller Weise amplifiziert. Das Grundprinzip dieser dreistufigen thermozyklischen Reaktion basiert auf der wiederholten Denaturierung doppelsträngiger DNA zu Einzelsträngen, der spezifischen Hybridisierung (Annealing) kurzer Oligonukleotide (Primer) und einer matrixspezifischen Verlängerung (Elongation) dieser Primer mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Über diese Reaktionsfolge wird eine exakte Kopie des Matrix-Nukleinsäurebereichs zwischen den beiden Primer-Hybridisierungsstellen erzeugt. Während jedes Replikationsschrittes verdoppelt sich die Anzahl der Template-Moleküle im Reaktionsansatz. In der Regel werden 25 bis 30 Zyklen durchlaufen, bis in einem letzten Schritt die Endelongation erfolgt. Es werden so im Reaktionsansatz Konzentrationen von ca. 10^8 bp erzielt (REICHL, 1996). Durch eine entsprechende Primerauswahl bzw. durch Sequenzierung der PCR-Amplifikate kann eine Geno- und Serotypisierung des Erregers vorgenommen werden (EIFFERT et al., 1995; ROESSLER et al., 1996).

Als Zielsequenz werden insbesondere spezifische plasmidkodierte Gensequenzen der äußeren Membranproteine A (OspA) und B (OspB) sowie chromosomale Genabschnitte (Flagellin, 16S rRNA, 23S rRNA) verwendet (KAWABATA et al., 1994; ALEKSEEV et al., 1998; HUBBARD et al., 1998; LIEBISCH et al., 1998; SKOTARCZAK et al., 1998). Oft wird eine geschachtelte PCR (nested-PCR), wie die nested-Flagellin-PCR oder die nested-OspA-PCR durchgeführt (BAUERFEIND et al., 1998; MATUSCHKA et al., 1998, HEIDRICH, 2000).

Der Nachweis der spezifischen DNA-Fragmente von *B. burgdorferi* erfolgt entweder direkt oder nach in-vitro-Hybridisierung im Southern-Blot-Verfahren. Nach elektrophoretischer Trennung (Agarosegel) und alkalischer Denaturierung werden die Fragmente auf einen Filter (Membran) übertragen, der anschließend mit einer spezifischen Gensonde inkubiert wird. Die einsträngigen komplementären Sequenzen können sich miteinander paaren und bilden Hybridmoleküle, die autoradiographisch nachgewiesen werden.

Eine Verbesserung der konventionellen PCR wurde durch die Entwicklung der Real-Time PCR (so genannte Echtzeit-PCR) erreicht. Das Prinzip dieser PCR beruht auf der Sichtbarmachung der PCR-Produkte mit Hilfe einer Sonde (TaqMan-Sonde), welche sich zwischen den beiden PCR-Primern an die zu vermehrende Sequenz bindet. Durch die Kombination von PCR Thermocycler und einem Spektrophotometer können die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten TaqMan-Sonden in Echtzeit während der Vermehrungszyklen nachgewiesen werden (HEID et al., 1996). Durch den Verzicht auf den Elektrophoreseschritt arbeitet diese PCR wesentlich schneller und präziser. Ein weiterer Vorteil liegt in der Quantifizier- sowie Standardisierbarkeit dieses Systems (LEUTENEGGER et al., 2002).

2.5.2. Indirekter Erregernachweis

1982 wurde von BURGDORFER und Mitarbeitern der indirekte Immunfluoreszenztest oder auch Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IFT bzw. IFAT) für die Diagnostik der Lyme-Borreliose (LB) entwickelt. Schon kurze Zeit später konnten RUSSEL und Mitarbeiter (1984) den IFT durch einen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ergänzen. Beide Verfahren stellen trotz der Vielfalt der heute zur Verfügung stehenden Methoden immer noch das Mittel der Wahl in der Serodiagnostik dar. Weitere Nachweisverfahren wie indirekter Hämagglutinationstest (IHA) und Komplementbindungsreaktion fanden keinen Zugang in der Routinediagnostik der LB (TALASKA, 1998b).

Der Nachweis einer Borrelieninfektion beim Tier erfolgt vorwiegend über die serologische Untersuchung, wobei eine 2-Stufen Diagnostik empfohlen wird. Diese besteht aus dem Suchtest, z.B. ELISA oder IFT, und dem Bestätigungstest, Immunoblot oder auch Western Blot (GUY et al., 1998; TALASKA, 1998a; PRIEM und KRAUSE, 1999; MAGNARELLI et al., 2000; DZIERZECKA and KITA, 2002a und b).

Die Sensitivität und Spezifität der heute kommerziell verfügbaren serologischen Nachweisverfahren unterscheiden sich hauptsächlich hinsichtlich der eingesetzten Testantigene (MAGNARELLI et al., 1994; HAUSER et al., 1998). Da eine Vielzahl von Varianten in der Antigenkomposition angeboten wird, kann zur Wertigkeit einzelner Tests keine Aussage getroffen werden. Allgemein ist die Spezifität bei serologischen Nachweisverfahren der zweiten und dritten Generation (90-95%) höher als bei Tests der ersten Generation (80-90%). Bei den Testverfahren der ersten Generation wird das gesamte Antigenpektrum der Borrelien in Form von Ultrasonifikaten (Enzymimmuntest) oder ganzen Zellen

(Immunfluoreszenztest) verwendet. Hingegen kommen bei den Testverfahren der zweiten und dritten Generation aufgereinigte oder angereicherte Antigene und in der letzten Zeit auch rekombinante Proteine von *B. burgdorferi* s.l. zum Einsatz (WILSKE et al., 2000).

2.5.2.1. Immunfluoreszenztest

Der Immunfluoreszenztest ist ein immunologisches Verfahren zum mikroskopischen Nachweis von Antigen (AG) oder Antikörpern (AK) in histologischen oder zytologischen Präparaten. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Kopplung des spezifischen Antikörpers mit einem fluoreszierenden Farbstoff, z.B. Fluorescein-Isothiozyanat (FITC). Bei einer Reaktion von Antigen und Antikörpern kann der entstandene AG-AK-Komplex mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden (COONS et al., 1941).

Es werden der direkte und der indirekte Immunfluoreszenztest unterschieden.

Der direkte Immunfluoreszenztest (DIFT) dient der qualitativen Antigendarstellung, gehört somit nicht zu den indirekten Nachweisverfahren und soll hier nur kurz erläutert werden. Das zu diagnostizierende AG wird mit einem bekannten, gegen das AG gerichteten AK, das mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist (Konjugat), versetzt. Nach Entfernung des nicht gebundenen Konjugats können fluoreszierende AG-AK-Komplexe unter dem Mikroskop sichtbar werden (WILSKE and PREAC-MURSIC, 1993; ROLLE und MAYR, 2002). Dieses Testverfahren wird vorrangig bei epidemiologischen Untersuchungen der LB eingesetzt (BERGMANN et al., 1992; LIVESLEY et al., 1994; OHEIM und HERRMANN, 1994; ZHIUOA et al., 1996).

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) weist AK gegen *B. burgdorferi* im Blut sowie in anderen Körperflüssigkeiten (z.B. Liquor, Synovia) nach. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, allerdings ist es nicht sehr spezifisch. Als AG fungieren morphologisch intakte Borrelien, die mit dem zu untersuchenden Probenmaterial versetzt werden. Im Anschluss daran wird ein gegen die Spezies des Serumspenders gerichtetes Antiglobulin-Konjugat verwendet. Bei erfolgreicher AG-AK-Reaktion kann eine Fluoreszenz im Mikroskop beobachtet werden (TALASKA, 1998a; PRIEM und KRAUSE, 1999; ROLLE und MAYR, 2002).

2.5.2.2. ELISA

Der ELISA (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) stellt eine Kombination aus immunologischen und enzymatischen Verfahren dar und ist sowohl spezifisch als auch hochsensitiv. Die Grundlage des Verfahrens beruht auf Wechselwirkungen zwischen dem spezifischen AK und dem AG, denen das Schlüssel/Schloss-Prinzip zugrunde liegt. Dieses besagt, dass bestimmte Bereiche des AK, die Paratope, zu Oberflächenstrukturen des AG, den Epitopen, eine genaue Passform besitzen.

Der ELISA kann sowohl zum AG- als auch zum AK-Nachweis herangezogen werden, wobei in der Diagnostik der Lyme-Borreliose vor allem die AK-Bestimmung eine Rolle spielt (RUSSEL et al., 1984; KÄSBOHRER und SCHÖNBERG, 1990; GOLUBIC et al., 1998; TALASKA, 1998a; PRIEM und KRAUSE, 1999).

Die Bestimmung von AK erfolgt nach dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Im ersten Schritt werden die bekannten AG an eine Oberfläche, z.B. Polystyrolkunststoffplatten, gebunden. Anschließend erfolgt die Inkubation des zu testenden Probenmaterials (Serum). Nach Trennung der frei in Lösung verbliebenen Bestandteile vom gebildeten Immunkomplex werden die gebundenen AK im folgenden Reaktionsschritt durch enzymmarkierte Anti-Spezies-Antikörper, sogenannte sekundäre AK, nachgewiesen. Ein häufig verwendetes Enzym ist die Meerrettichperoxidase, die bei der Reaktion mit Wasserstoffperoxid freie Sauerstoffradikale bildet und somit zur Oxydation organischer Substrate befähigt ist.

Nach erneuter Entfernung der ungebundenen Bestandteile erfolgt die Enzym/Substrat-Reaktion. Als Substrat wird oft Diammonium-2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-sulfonat) (ABTS) eingesetzt. Das ABTS bildet bei der Oxydation ein wasserlösliches, metastabiles, grünes Zwischenprodukt, das seine Absorptionsmaxima bei 405-410 nm besitzt und dadurch photometrisch messbar wird. Die gemessene Extinktion des bei der Enzym/Substrat-Reaktion gebildeten Farbstoffes ist der Menge an umgesetztem Substrat proportional (ROLLE und MAYR, 2002).

2.5.2.3. Western Blot

Beim Western Blot werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine in einem elektrischen Feld auf Filter transferiert und dort gebunden. Die Charakterisierung der Proteine (AG) erfolgt immunologisch durch Anlagerung spezifischer AK. Die AG-AK-Komplexe lassen sich nach Anlagerung von enzymmarkierten sekundären AK, wie sie beim ELISA eingesetzt

werden, oder radioaktivem Protein A, das heute jedoch nicht mehr verwendet wird, autoradiographisch nachweisen. Die Auswertung der entwickelten Blots erfolgt mit freiem Auge oder mit Dokumentationssystemen (Densitometer), die die auf dem Blot befindlichen AG-AK-Komplexe mit Hilfe von Molekulargewichts-Markern identifizieren (ROLLE und MAYR, 2002).

Der Western Blot weist eine hohe Spezifität auf, da er in der Lage ist, die Immunantwort auf einzelne Proteinbestandteile des Erregers zu analysieren. Daher wird dieser Test vorrangig für Abklärungsuntersuchungen fraglicher Seren verwendet.

In der Humanmedizin werden für die spezifische Borreliendiagnostik die Oberflächenproteine p17, p24 (OspC), p31 (OspA), p34 (OspB), p39, p41 (Flagellin), p66 und p83/100 eingesetzt. HAUSER und Mitarbeiter (1997) sowie das National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS (1998) bemühten sich um die Standardisierung des Western Blots in Europa und in den USA hinsichtlich der Interpretation von Bandenmustern.

WILSKE und Mitarbeiter entwickelten 1993 einen Western Blot mit rekombinantem Antigen für den Nachweis von IgM- und IgG-AK. Dabei wurden folgende AG verwandt: p100, p41 (Flagellin) und p41/i (internes Fragment des Geißelantigens) sowie p31 (OspA) und p23 (OspC). Die höchste Sensitivität im IgG-Test erreichten p100 und p41/i, während p41 häufig falsch positive Reaktionen auslöste. OspA und OspC reagierten sehr selten mit Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose.

MÜLLER (1999) untersuchte 311 Seren von klinisch gesunden Pferden mit Hilfe des Western Blots auf AK gegen *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae*. Dabei konnten 27 Banden in einem Molekulargewichtsbereich von 9 kD bis 83/100 kD definiert werden. Eine AK-Reaktion gegenüber allen Genospezies wurde nur bei p41 (Flagellin) und p83/100 beobachtet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Hundeseren mit Hilfe des ELISA und des Western Blots erbrachten eine sehr gute serologische Reaktion mit den Proteinen OspF, p35 und p39. Diese wurden von den Autoren als die wichtigsten Indikatorantigene für eine natürliche Infektion mit *B. burgdorferi* angesehen (MAGNARELLI et al., 2001). OspC zeigte in dieser Studie allerdings eine geringe AK-Reaktion in Hundeseren. Auch beim Pferd scheint OspC in der serologischen Diagnostik keine große Rolle zu spielen (MAGNARELLI et al., 2000). Hier erwiesen sich eher p31, p34, p37, p39, p58 und p93 als AK-reaktiv.

DZIERZECKA und KITA (2002b) untersuchten 87 Pferdeseren mit Hilfe des ELISA. Die dabei seropositiv befundenen Proben wurden mittels Western Blot evaluiert. Die in den Seren nachgewiesenen Antikörper richteten sich gegen die Antigenproteine: OspB, p41, p62/60, p66, p72 und p93. Auch hier erwies sich das Flagellin (p41) als unspezifisch.

2.5.3. Unspezifische Laborbefunde

Pathologische Blutparameter und diagnostische Wertigkeit hinsichtlich einer Lyme-Borreliose (LB) sind vor allem für die Humanmedizin beschrieben. So ist der im Frühstadium einer LB am häufigsten auftretende pathologische Laborbefund eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) mit Werten von 21 bis 68 mm/h (STEERE et al., 1983; STIERNSTEDT, 1985). STEERE und Mitarbeiter (1983) untersuchten das Serum von Patienten mit EM, dabei beobachteten sie eine Erhöhung folgender Parameter: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Lactat-Dehydrogenase (LDH). Auch Anämie, Leukozytose mit Linksverschiebung und Mikrohämaturie können im Stadium 1 der Erkrankung vorkommen.

In der Veterinärmedizin konnte bei einer experimentellen Infektion von 12 SPF-Hunden am 85. Tag p. inf. eine Leukozytose beobachtet werden (JENAL, 2002).

Auch beim Pferd wurde im Zusammenhang mit der Äußerung der Verdachtsdiagnose LB eine Leukozytose beobachtet (BROWNING et al., 1993; HAHN et al., 1996).

2.5.4. Methodenvergleich

Ein Vergleich der labordiagnostischen Methoden zur Verifizierung einer Lyme-Borreliose (LB) ist erst in den letzten Jahren durchgeführt worden. Vor allem aus der Humanmedizin liegen Berichte von Untersuchungen hinsichtlich Methodenvergleich vor. So untersuchten TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA und Mitarbeiter (2002) 90 Patienten mit klinischen Zeichen einer LB. Dabei benutzten sie für den serologischen Borreliennachweis einen rekombinanten ELISA sowie einen Immunoblot. Der direkte Erregernachweis im Probenmaterial Blut, Liquor und Synovia erfolgte mit Hilfe der kulturellen Anzucht und der PCR. In dieser Untersuchung konnte keine Korrelation zwischen dem AK-Nachweis mittels ELISA und den Proteinfractionen, die mit dem Immunoblot dargestellt wurden, registriert werden. Bei einigen Patienten, bei denen ein Nachweis von Borrelien in der Kultur gelang, wurden sogar fragliche sowie negative AK-Titer beobachtet.

Auch RUZIC-SABLJIC und Mitarbeiter (2002) beschäftigten sich ebenfalls mit dem Methodenvergleich. Sie untersuchten 117 Patienten mit Erythema migrans (EM) sowie 96 gesunde Personen. Der indirekte Erregernachweis erfolgte mit Hilfe des IFT und des Western Blots. Von den Patienten mit EM stand eine Hautbiopsie, die der kulturellen Anzucht von *B. burgdorferi* s.l. diente, zur Verfügung. Bei 62 von 117 Patienten mit EM konnte ein Nachweis von Borrelien geführt werden, wobei in 52 Proben *B. afzelii* und in 10 Proben *B. garinii* isoliert wurde. Der IgM-Nachweis mit Hilfe des IFT gelang in 2, der IgG-Nachweis in 3 der Fälle (n=117). Hingegen wurde mittels Western Blot bei 56 Serumproben IgM und bei 36 Serumproben IgG nachgewiesen (n=117). In der Kontrollgruppe konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Somit gestaltete sich die Immunantwort der zwei Gruppen unabhängig von den Nachweismethoden sehr ähnlich. Die serologischen Ergebnisse des IFT und des Western Blots divergierten jedoch stark.

PANELIUS und Mitarbeiter (2002) untersuchten einen mit rekombinanten OspC (rOspC) beschichteten ELISA auf die Immunreaktionsfähigkeit in Abhängigkeit der Herkunft von OspC. Sie konnten eine stärkere Immunantwort auf das rOspC von *B. garinii* und *B. afzelii* als auf das rOspC von *B. burgdorferi* s.s. beobachten. In der frühen Phase einer LB wird sowohl mit rOspC als auch mit Flagellin IgM-AK nachgewiesen. Kreuzreaktive Antikörper zu rOspC traten vor allem bei Patienten mit positivem Rheuma-Faktor, Syphilis oder Epstein-Barr-Virus-Infektion auf.

HAUSER und Mitarbeiter (1998) beobachteten, dass ELISA mit einem *B. afzelii*-Stamm als Antigenbeschichtung die höchste Sensitivität für länger zurückliegende Infektionen aufwies.

HUNFELD und Mitarbeiter veröffentlichten 2002 die Ergebnisse eines internationalen Ringversuches zur qualitativen Validierung von serologischen Nachweisverfahren einer LB, an dem insgesamt 367 mikrobiologische Laboratorien aus Deutschland sowie 13 anderen europäischen Staaten teilnahmen. Dabei erhielt jeder der Versuchsteilnehmer zwei definierte Serumproben zur Bestimmung von AK gegen *B. burgdorferi* s.l. mit Hilfe des ELISA, des IFT, des IHA und des Western Blots. Die Übereinstimmung der Testergebnisse war sehr variabel und korrelierte mit dem Fabrikat sowie der angewandten Methode der einzelnen Nachweisverfahren. Ein Nachweis von IgM-AK gestaltete sich schwieriger als von IgG-AK. Die Resultate des ELISA zeigten eine bessere Reproduzierbarkeit sowie eine höhere Sensitivität und Spezifität als der IFT und der IHA. Die quantitativen Testergebnisse und der Nachweis von spezifischen Immunoblotbanden ließen ebenfalls eine hohe Variabilität erkennen.

2.6. Therapeutische Möglichkeiten

Der Erreger der Lyme-Borreliose (LB) besitzt eine Empfindlichkeit gegenüber Penicillin, Cephalosporin, Tetrazyklin und einigen Makroliden, während er gegen Rifampicin, Sulfonamide, Fosfomycin sowie Fluorouracil resistent ist (STANEK, 1997b). In der Humanmedizin wurde in der letzten Zeit eine Zunahme der Resistenz gegenüber Erythromycin beobachtet (TEREKHOVA et al., 2002).

Die Behandlung von an LB erkrankten Tieren erfolgt in Anlehnung an die Therapieempfehlungen aus der Humanmedizin. Die dort eingesetzten Substanzen wurden in klinischen Studien überprüft und sind in der Tabelle 3 zusammengefasst (STANEK, 1997b).

In der Veterinärmedizin werden in erster Linie Tetracycline, vor allem Doxycyclin oder Minocyclin, aber auch Penicilline angewandt, wobei Penicillin G keine zufriedenstellende Wirkung zeigt. Bei jungen, tragenden oder laktierenden Tieren sollte auf den Einsatz von Tetracyclin verzichtet werden, statt dessen wird empfohlen, auf das gut wirksame Amoxicillin zurückzugreifen (APPEL, 1990; LIEBISCH, 1993; MÜLLER, 1994). Bei Spätmanifestationen haben sich Cephalosporine, vor allem Ceftriaxon bewährt. Sie besitzen die Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden sowie in andere immunologische Nischen zu diffundieren. Somit können sie dort inhibitorische, wenn nicht sogar mikrobizide Konzentrationen erreichen.

Entscheidend ist eine hohe Medikation über einen längeren Zeitraum. Um eine effektive Blutkonzentration zu erzielen, sollte initial mit einer parenteralen Therapie begonnen werden (APPEL, 1990; NIESENBAUM, 1991). Danach kann sich eine orale Behandlung anschließen. Bei neurologischen Symptomen mit Veränderung der CSF sowie in schlecht auf die orale Therapie ansprechenden Fällen ist eine intravenöse Medikation angezeigt (SUTER, 1994).

In der Humanmedizin wird oft nach 1- bis 2-tägiger Antibiotikagabe eine sogenannte Jarisch-Herxheimer-Reaktion (Verschlechterung des Gesundheitszustandes des Patienten durch massive Freisetzung von Antigenen und Toxinen) beobachtet. Ob ähnliche Reaktionen beim Tier zu verzeichnen sind, ist bisher unbekannt (MADIGAN, 1993).

Equine Krankheitsfälle in den USA zeigten bei einer initialen Therapie mit Procain G über 10 Tage mit anschließender Behandlung mit Benzylpenicillin (30.000-45.000 IU/kg KG i.m.) eine Verbesserung des Krankheitsbildes (PARKER and WHITE, 1992). Demgegenüber erreichten BROWNING und Mitarbeiter (1993) erst mit Oxytetracyclin (1800 mg/Pferd) über 10 Tage einen Therapieerfolg. Auch HAHN und Mitarbeiter (1996) versuchten eine Therapie mit

Oxytetracyclin (4,5 mg/kg KG) über 13 Tage, allerdings ohne Besserung des Zustandes des Patienten. Beim Einsatz von Oxytetracyclin (6-12 mg/kg KG p.o.) über einen längeren Zeitraum muss mit der Entwicklung einer Colitis gerechnet werden. Weiterhin sollte das in der Humanmedizin hoch wirksame Doxycyclin beim Pferd mit Vorsicht eingesetzt werden, da schon Dosen von 0,3 mg/kg KG i.v. zu kardiovaskulären Störungen führen können

Tab. 3: Antibiotikatherapie der LB in der Humanmedizin (nach STANEK, 1997b)

Symptomatik	Antibiotikum	Dosis pro Tag	Applikation	Therapiedauer
Erythema migrans	Amoxicillin	2 x 1 g	p.o.	2 Wochen
Borrelien-Lymphozytom	Azithromycin	2 x 500 mg	p.o.	1. Tag
		dann 1 x 500 mg	p.o.	2.-5. Tag
	Cefuroxim	2 x 500 mg	p.o.	2 Wochen
	Doxycyclin	1 x 200 mg	p.o.	2 Wochen
	Penicillin V	3 x 1,5 Mio IE	p.o.	2 Wochen
Acrodermatitis chronica atrophicans	Amoxicillin	3 x 1000 mg	p.o.	3 Wochen
	Ceftriaxon	1 x 2 g	i.v.	2 Wochen
	Cefotaxim	3 x 2 g	i.v.	2 Wochen
	Doxycyclin	1 x 200 mg	p.o.	3 Wochen
Arthritis	Amoxicillin	2 x 1 g	p.o.	3 Wochen
	Ceftriaxon	1 x 2 g	i.v.	2 Wochen
	Cefotaxim	3 x 2 g	i.v.	2 Wochen
	Cefuroxim	2 x 500 mg	p.o.	2 Wochen
	Doxycyclin	1 x 200 mg	p.o.	3 Wochen
Akute Neuroborreliose	Ceftriaxon	1 x 2 g	i.v.	2 Wochen
	Cefotaxim	3 x 2 g	i.v.	2 Wochen
	Doxycyclin	1 x 200 mg	p.o.	2 Wochen
	Penicillin G	4 x 5 Mio IE	i.v.	2 Wochen
Chronische Neuroborreliose	Ceftriaxon	1 x 2 g	i.v.	3 Wochen
	Cefotaxim	3 x 2 g	i.v.	3 Wochen
Erythema migrans in der Schwangerschaft	Amoxicillin	2 x 1 g	p.o.	2 Wochen
	Ceftriaxon	1 x 2 g	i.v.	2 Wochen
	Cefuroxim	2 x 500 mg	i.v.	2 Wochen
	Penicillin V	3 x 1,5 Mio IE	p.o.	3 Wochen
Karditis	Ceftriaxon	1 x 2 g	i.v.	2 Wochen
	Cefotaxim	3 x 2 g	i.v.	2 Wochen