

4. Diskussion

4.1 Reservoirkompetenz von Waldmäusen und Gerbilen

Ein Wirt ist für *B. burgdorferi* s.l. kompetent, wenn beide subadulte Stadien von *I. ricinus* mehrfach an ihm saugen können, er leicht durch eine Spirochäten-tragende Nymphe infiziert wird, sich die Spirochäten anschließend in ihm vermehren und erneut durch Larven aufgenommen werden können. Je länger ein Wirt nach einer Infektion für den Vektor infektiös ist, desto mehr infizierte Larven entstehen durch eine einzige positive Nymphe. Weil kleine Wirte seltener von Nymphen infestiert werden (Matuschka et al. 1992b), sollten sie dabei möglichst so lange infektiös bleiben, dass auch nach ihrer Überwinterung wieder Zecken infiziert werden können, damit im Frühjahr die Durchseuchung der Zeckenpopulation möglichst schnell erfolgt. Somit sind Wirte, die über einen langen Zeitraum infektiös bleiben, besonders gute Reservoirwirte.

Die Dauer der Infektiösität von europäischen Reservoirwirten für Zecken ist bisher nur an im Freiland gefangenen Tieren geschätzt worden. *Apodemus*-Mäuse sind demnach mindestens 14 Monate infektiös (Gern et al. 1994). Da sie dabei nur *B. afzelii* auf ihre xenodiagnostischen Zecken übertrugen, wurde eine Infektion mit *B. burgdorferi* s.s. als kurzlebig vermutet (Humair et al. 1995). Allerdings war beim Fang der Zeitpunkt der Infektion unbekannt. Standardisierte Laboruntersuchungen zur Kompetenz wurden bisher nur an amerikanischen Reservoirwirten, die mit der dortigen Genospezies *B. burgdorferi* s.s. zu einem definierten Zeitpunkt infiziert wurden, und mit dortigen Vektorzecken durchgeführt (Donahue et al. 1987, Shih et al. 1995). Dabei blieben die Wirte mindestens sieben Monate für Zecken infektiös. Bei Xenodiagnosen an in Europa gefangenen Kleinnagern wurde sehr viel häufiger *B. afzelii* nachgewiesen als *B. burgdorferi* s.s. (Hu et al. 1997, Humair et al. 1995 und 1998b). Die daraus abgeleitete Vermutung, dass europäische *B. burgdorferi* s.s. kürzer infektiös sind als amerikanische hat sich jedoch nicht bestätigt. Anders als bisher angenommen sind Waldmäuse für beide Genospezies über den untersuchten Zeitraum kompetent, beide Genospezies können also im Wirt überwintern. Die lang andauernde Infektiösität überbrückt die Wintermonate, so dass im Frühjahr eine frühe Durchseuchung der Larven an diesen Wirten möglich ist und somit weitere Wirte schnell infiziert werden können. Die überwiegende Isolierung von *B. afzelii* aus Kleinnagern und *B. garinii* aus Vögeln führte zu der Annahme, dass eine enge Assoziation dieser Genospezies mit den genannten Wirten vorliegt (Humair et al. 1995, 1998a). Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass es in Gebieten in denen kaum infizierte Mäuse vorhanden sind, keine oder wenig mit *B. afzelii*-infizierte Zecken gibt (Kurtenbach et al. 1998b, Gray et al. 2000). Und in Gebieten in denen viele Fasane, *Phasianus colchicus*, vorkommen, sind wirtssuchende Zecken vermehrt mit *B. garinii* infiziert (Kurtenbach et al. 1998b). Dennoch wurde auch die Übertragung aller drei humanpathogenen Genospezies auf Zecken von Vögeln und Kleinnagern beschrieben. So wurden in *I. ricinus*-Larven, die an Zugvögeln gesogen hatten, *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. nachgewiesen (Olsen et al. 1995a). Ratten und Gelbhalsmäuse übertrugen ebenfalls alle drei Genospezies auf ihre Zecken (Richter et al. 1999). Auch Vögel der Gattung *Turdus* sind nicht nur für *B. garinii* kompetent (Humair et al. 1998a) sondern auch für *B. burgdorferi* s.s. (Richter et al. 2000). Für diese in Nord-Amerika wichtigste Genospezies dienen dort vor allem Weißfußmäuse als Reservoirwirte (Levine et al. 1985), in West-Europa war keine Festlegung auf einen Wirt möglich, hier passieren unter anderem Eichhörnchen diese Genospezies (Humair et al. 1998b). Es gibt also keine ausschließende Assoziation zwischen Wirtstierklasse und Genospezies. Sonst würde eine mit *B. afzelii*-infizierte

Nymphe, die an einem für diese Genospezies nicht kompetenten Vogel saugt, die Infektion nicht weitergeben können, der Erreger würde für den Kreislauf verloren sein und die Infektion in einer Sackgasse enden. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Larve, die sich an einem Vogel bzw. Nager infiziert, auch als Nymphe wieder an einem Vogel bzw. Nager saugt, ist bei dem nicht-wirtsspezifischen Vektor *I. ricinus* relativ gering. Der Zyklus könnte nicht aufrechterhalten werden, wenn derselbe Vektor an verschiedenen Wirten saugt, aber nur bestimmte Wirte für bestimmte Genospezies kompetent wären.

Die Unterschiede in der Kompetenz einer Tierart für verschiedene Genospezies und dem Vorkommen dieser Tierart könnte Auswirkungen auf die Prävalenz von Genospezies in wirtssuchenden Zecken haben. Eine größere Gesamtinfektiösität von Waldmäusen für *B. afzelii* bedeutet, dass sie mehr Zecken mit dieser Genospezies infizieren als mit *B. burgdorferi* s.s. Außerdem gehören Mäuse der Gattung *Apodemus* zu den wichtigsten Reservoirwirten in Mitteleuropa (Matuschka et al. 1992b, De Boer et al. 1993). Wirtssuchende Zecken sind tatsächlich häufiger mit *B. afzelii* infiziert als mit *B. burgdorferi* s.s. (Tab. 1: Eiffert et al. 1995, Ohlenbusch et al. 1996, Richter et al. 1999, Pichon et al. 1995, Rijpkema et al. 1995 und 1996, Basta et al. 1999). Die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. in wirtssuchenden Zecken wird somit bestätigt.

Zur Gewinnung Spirochäten-infizierter Nymphen und nicht-infizierter Larven in ausreichender Zahl benötigt man Wirte, die für *B. burgdorferi* s.l. kompetent sind und das mehrfache Saugen von *I. ricinus* dulden. Beides trifft auf die natürlichen Reservoirwirte zu. Haltung und Zucht von Wildnagern, z. B. der Gattung *Apodemus* oder *Clethrionomys*, sind allerdings nicht einfach, da die Tiere schreckhaft, scheu und bissig sind. Für standardisierte Untersuchungen ist es jedoch wichtig, über nicht-infizierte Reservoirwirte bekannten Alters und in entsprechender Anzahl zu verfügen. Zur Aufrechterhaltung des Erreger-Zyklus mittels Wirt-Vektor-Passagen von *B. burgdorferi* s.l. reicht aber auch ein einfach zu haltender und züchtender Wirt, der für dieses Pathogen kompetent ist. Der Wirt muß außerdem groß genug sein, denn die Größe bzw. das Gewicht entscheidet wesentlich darüber, ob die Nymphen zur Infektion oder auch zur Zeckenzucht in entsprechender Anzahl diesen Wirt infestieren (Matuschka et al. 1992b). Auch die Fellstruktur ist für die Infestation wichtig, denn ein sehr feines Fell erschwert den Nymphen das Vordringen zur Haut und Wirte wie der Goldhamster, *Mesocricetus auratus*, können deswegen schlechter infestiert werden. Gegen Hamster spricht trotz ihrer Größe (150-200g) auch ihre Angewohnheit, sich sehr gründlich, geradezu kammartig, mit den Hinterpfoten zu putzen und Nymphen dabei zu entfernen (eigene Beobachtung), sowie ihr Einzelgängerdasein, weswegen ihre Haltung sehr viel Platz beansprucht. Wenn hingegen die Bedingungen erfüllt sind, dann ist ein Wirt umso zweckdienlicher, je infektiöser er für Larven ist. Der Gerbil erfüllt alle diese Voraussetzungen (Janetzki et al. 1992, Kahl 1992). Seine Infektiösität für Zecken übertrifft sogar die der Waldmaus für die beiden Genospezies *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s., er ist also ideal geeignet um viele infizierte Zecken mit hoher Infektionsrate zu gewinnen. Jedoch ist er für *B. burgdorferi* s.s. über einen kürzeren Zeitraum infektiös als Waldmäuse. Um infizierte Zecken für Versuche zu gewinnen, sind also besonders die ersten Wochen nach der Infektion geeignet, weil der Gerbil dann infektiöser ist als die Waldmaus. Zur Erzeugung vieler infizierter Nymphen ist der Gerbil hervorragend geeignet.

Anhand des Nachweises von Spirochäten oder deren DNA in den Organen von potentiellen Reservoirwirten wird oft Rückschluß auf deren Kompetenz gezogen (Ishiguro et al. 1996, Zore et al. 1999). Mit diesem Nachweis läßt sich hingegen nur aussagen, dass der Wirt mit dem Erreger Kontakt hatte, er belegt nicht, dass der Wirt kompetent ist. Auch eine

Spirochätämie ist sehr selten, denn Spirochäten bevorzugen zum Aufenthalt Gewebe wie die Haut. Aufgrund ihrer Eigenmotilität sind sie auf visköse Gewebe angewiesen, in denen sie sich besser bewegen können (Kimsey und Spielman 1990). Da *I. ricinus* beim Saugen vornehmlich Lymphe und später auch nachsickerndes Blut aus der Haut aufnimmt, können nur Spirochäten, die sich in der Haut aufhalten, in die Zecke gelangen (Matuschka et al. 1986). Aber auch der Nachweis einer bestimmten Genospezies aus der Haut liefert noch keine Aussage, welche Genospezies auf die Zecke übertragen wird. Denn aus Ohren von Ratten wurde mittels PCR *B. afzelii* nachgewiesen, aber diese Wirte infizierten ihre Zecken auch mit *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* (Richter et al. 1999). Da aufgrund falscher Lagerung der Proben kein Nachweis über Spirochäten in der Haut der Gerbilde zu erbringen war, wurde kein Vergleich mit den Waldmäusen vorgenommen. In allen Organen von Gerbilden und Waldmäusen außer der Leber war Spirochäten-DNA nachweisbar obwohl dies bei Lebern infizierter Hunde gelungen war (Hovius et al. 1999). Beim Gerbil als Labor-Modell waren die Spirochäten nach 27 Wochen aus den Organen eliminiert, denn die Infektion mit *B. burgdorferi* s.s. scheint zeitlich limitiert. Bei einem kompetenten Wirt gilt also nur: wenn keine Übertragung mehr stattfindet, der Wirt nicht mehr infektiös für Zecken ist, sind auch keine Spirochäten mehr in den Organen nachweisbar.

4.2 Reservoirkompetenz von Ratten

Der Beitrag eines Wirtes im Freiland zum Vorkommen infizierter Zecken wird durch seine Reservoirkapazität bestimmt, die sowohl in Experimenten als auch durch Parameter, die im Freiland gemessen werden, ermittelt wird. Beeinflusst wird die Kapazität sowohl durch die Reservoirkompetenz als auch durch den Infestationsgrad des Wirtes mit infizierten Nymphen. Die Anzahl der Larven, die sich an diesem Wirt infizieren, seine Häufigkeit und seine Lebensweise bzw. sein Habitat sind weitere Parameter, die im Freiland seine Reservoirkapazität beeinflussen. Ratten sind aufgrund ihrer Größe und ihres Gewichtes für Nymphen attraktiver als Mäuse. Siebenmal mehr Larven saugen an ihnen als an Mäusen, außerdem leben Ratten deutlich länger als Mäuse, daher infizieren sie weitaus mehr Zecken (Matuschka et al. 1996b). Ratten bevorzugen Habitate, in denen auch *I. ricinus* Zecken überleben können und sie tragen durch ihren großen Aktionsradius (Calhoun JB 1963) zur Verbreitung infizierter Zecken bei und ermöglichen so die Einführung infizierter Zecken vom Waldrand in Stadtparks. Gesogene Larven fallen während der Ruhezeit der Ratten in deren Nestern ab, dort können sie sich dank des feuchten Klimas zu Nymphen häuten und erneut die Bewohner infestieren. Wanderratten werden somit früher im Leben mit Nymphen infestiert und damit auch infiziert als Mäuse (Matuschka et al. 1997). Ratten werden durch viele Nymphen parasitiert, sie leben relativ lange und haben eine hohe Populationsdichte, bei entsprechender Reservoirkompetenz haben sie daher eine hohe Reservoirkapazität für *B. burgdorferi* s.l. Die experimentell bestimmte Kompetenz von Ratten für den Erreger der Lyme-Krankheit ist ein wichtiger Bestandteil ihrer Reservoirkapazität. Sowohl gefangene als auch im Labor gezüchtete Wanderratten erweisen sich als kompetent für *B. afzelii* (Matuschka et al. 1996b, 1997). Auch Wanderratten an der Ostküste Nord-Amerikas infizieren dortige *Ixodes*-Zecken mit einheimischen *B. burgdorferi* s.s. (Smith et al. 1993). In den standardisierten Laboruntersuchungen der vorliegenden Studie infizierten Wanderratten ihre Zecken jeweils mit beiden europäischen Genospezies über einen Zeitraum von mehreren Monaten. Sie ermöglichen daher, genau wie Waldmäuse, im Frühjahr die prompte Infektion der Larvenpopulation von *I. ricinus* mit Spirochäten. Wanderratten haben für beide Genospezies

den gleichen Grad der Kompetenz. Er ist für *B. afzelii* im Vergleich mit den Waldmäusen geringer, so übertrug z.B. einer der Wirte überhaupt keine *B. afzelii*-Spirochäten auf seine Zecken, obwohl die DNA dieser Spirochäten in den Organen nachweisbar war. Die Kompetenz für die untersuchten Genospezies ist zwar gleich oder sogar geringer als die von Waldmäusen, durch ihre höhere Reservoirkapazität ist der Beitrag von Ratten zur Prävalenz *B. afzelii*- und *B. burgdorferi* s.s.-infizierter Zecken vermutlich größer als der von *Apodemus*-Mäusen (Richter et al. 1999).

Durch eine häufige Re-Infektion von Reservoirwirten, die von vielen Nymphen parasitiert werden, könnte die Infektionsrate in saugenden Zeckenlarven erhöht werden und die Kompetenz der Wirte ansteigen. Kompetente Wanderratten lassen sich nach Absinken der Infektionsrate in ihren xenodiagnostischen Zecken erfolgreich re-infizieren und nahezu alle an ihnen saugenden Larven nehmen wieder Spirochäten auf (Richter et al. 2000). Auch die Infektiosität der Wanderratten steigt nach Re-Infektion wieder an. In Laboruntersuchungen auftretende Schwankungen in den Infektionsraten der Zecken könnten bei langlebigen Wirten, die im Freiland immer wieder re-infiziert werden, ausgeglichen werden. Es käme zu einem gleichmäßigeren Verlauf der Infektionsraten in der Natur. Infestationsraten mit infizierten Nymphen über dem Schwellenwert für die gleichmäßige Re-Infizierung sind dagegen ungünstig, da diese Nymphen weniger attraktive Wirte nicht infestieren, die somit nicht infiziert werden. Ratten werden also, wie Wanderratten, nach einer Infektion nicht immun gegen Spirochäten. Durch ihre häufige Re-Infizierung tragen sie somit stärker zur Prävalenz infizierter Zecken im Freiland bei.

Durch die überwiegende Isolierung von *B. garinii* aus Vögeln wird eine enge Assoziation vermutet. Jedoch infizieren auch Gerbilde, *Meriones unguiculatus*, nach Infestation mit wirtssuchenden Nymphen ihre Zecken mit *B. garinii*-Spirochäten (Gray et al. 1996). Auch Hausmäuse infizieren Zecken mit *B. garinii* Serotyp 4, nachdem wirtssuchende Nymphen an ihnen gesogen hatten (Hu et al. 2001). Und in Japan infizieren sich *I. persulcatus*-Zecken regelmäßig mit *B. garinii*-Spirochäten an Kleinnagern (Nakao et al. 1994). In den durchgeführten standardisierten Laboruntersuchungen zur Übertragung europäischer *B. garinii*-Spirochäten von Nagetieren auf Zecken erweisen sich infizierte Wanderratten als wenig infektiös für ihre Zecken. Weniger als die Hälfte der Tiere infizierte ihre Zecken mit Spirochäten, zwei sogar nur 10% davon. Die Spirochäten dieser Genospezies sind sehr heterogen und werden aufgrund ihres OspA in fünf Serotypen eingeteilt (Wilske et al. 1993). Diese Heterogenität bedingt möglicherweise Unterschiede in der Übertragbarkeit von *B. garinii*-Spirochäten, sowohl von Zecken auf Wirte als auch von Wirten auf ihre Zecken (Hu et al. 2001, Huegli et al. 2002). Auch die Proliferation im Wirt könnte dadurch beeinflusst werden. Wanderratten infizieren im Freiland die Hälfte ihrer positiven Zecken mit *B. garinii*, davon waren die meisten Stämme den Serotypen 3 und 6 zuzuordnen (Diss. Ohlenbusch 1996, Richter et al. 1999). Auch Nagetiere sind somit kompetent für *B. garinii*-Spirochäten. Bei einer Infektion mit Spirochäten bildet der Wirt Antikörper gegen diese und beeinflusst gegebenenfalls dadurch die Übertragung der Spirochäten auf Zecken. Bei der Untersuchung der Reservoirkompetenz von Kaninchen für *B. afzelii*, infizierte nur dasjenige Tier seine Zecken mit Spirochäten, welches auch Antikörper gegen die Spirochäten gebildet hatte (Matuschka et al. 2000). Die Infektiosität von Hausmäusen für Zecken nahm zwar über einen gewissen Zeitraum ab, aber es bestand kein konträrer Einfluss der gebildeten Antikörper (Shih et al. 1995). Auch die Weißfußmaus, *P. leucopus*, bildet hohe und langanhaltende Antikörpertiter, unabhängig von der Übertragungsintensität von *B. burgdorferi* s.s., dennoch ist sie ein sehr guter Reservoirwirt und infiziert mehr als dreiviertel der an ihr saugenden

Larven (Rosa Brunet et al. 1995). Dagegen soll die im Vergleich zu Rötelmäusen geringere Übertragung von Spirochäten auf Zecken durch *Apodemus*-Mäuse aufgrund der höheren Antikörpertiter dieser Art gegen *B. burgdorferi* s.l. verursacht sein (Kurtenbach et al. 1994). Verglichen wurden jedoch Antikörpertiter nach Prä-immunisierung der Tiere mit Spirochäten aus Kultur. Auch wurden die Wirte anschließend mittels kapillar-gefütterter Larven infiziert. Natürlich infizierte Wirte beider Arten zeigten hingegen keine quantitativen Unterschiede in der Antikörperbildung, sondern nur in den Infektionsraten der xenodiagnostischen Zecken. In der vorliegenden Studie bildeten auch Wanderratten hohe Antikörpertiter nach einer Infektion mit *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s., infizierten ihre xenodiagnostischen Zecken mit diesen Spirochäten aber auch zu einem hohen Prozentsatz. Die Ratten hingegen, die mit *B. garinii* infiziert wurden, waren wenig infektiös. Nur in der Ratte, welche fast zwei Drittel ihrer Zecken mit Spirochäten infizierte, war DNA von *B. garinii*-Spirochäten in der Haut und ein relativ hoher Antikörpertiter nachweisbar. Den höchsten Titer dieser Gruppe bildete der Wirt, bei dem Spirochäten-DNA im Herz nachweisbar war, er infizierte aber keine Zecken. Die Absiedlung der Spirochäten im Herz bewirkte wahrscheinlich die starke Antikörperbildung, da Spirochäten aber nicht in der Haut zu finden waren, konnten sich Zecken an ihnen nicht infizieren. Die beiden re-infizierten Tiere bildeten zwar einen geringen Antikörpertiter, eines infizierte auch Zecken mit Spirochäten, aber in ihren Organen ließ sich keine Spirochäten-DNA nachweisen. Läßt sich *B. garinii* also in den Organen nachweisen, bildet der Wirt auch hohe Antikörpertiter. Der Organismus hat durch die Vermehrung der Spirochäten und ihre Absiedlung in Organen länger und intensiver Kontakt mit diesen und das Immunsystem wird ausreichend zur Bildung von Antikörpern stimuliert. Diese wiederum verhindern nicht die Übertragung von Spirochäten auf saugende Zecken.

Wanderratten sind offensichtlich kompetenter für *B. afzelii* und für *B. burgdorferi* s.s. als für *B. garinii* Serotyp 6. Hausmäuse übertragen *B. garinii* Serotyp 4, aber nicht die Serotypen 5 und 6 auf Zecken (Hu et al. 2001). Nagetiere sind möglicherweise auch unterschiedlich kompetent für die einzelnen Serotypen. Zwei der einmal infestierten Wanderratten blieben seronegativ, obwohl die parasitierenden Nymphen nachweislich mit Spirochäten infiziert waren. Das Immunsystem der Wirte schien also nicht in Kontakt mit Spirochäten gekommen zu sein. Von der Entwicklung eines Impfstoffes gegen *B. burgdorferi* s.l. ist bekannt, dass vom Wirt gegen das OspA der Spirochäten gebildete Antikörper von der Zecke beim Saugen aufgenommen werden und die Spirochäten bereits in der Zecke abgefangen werden (Fikrig et al. 1992). Auch die unspezifische Immunabwehr verfügt mit dem Komplement-System über eine effektive Möglichkeit, Erreger abzuwehren. So werden die unterschiedlichen Genospezies von *B. burgdorferi* s.l. in Kultur durch Seren verschiedener Tierarten ungleich stark abgetötet, nach Erhitzung der Seren auf 56°C unterbleibt diese Abtötung der Spirochäten (Kurtenbach et al. 1998a). Durch den Saugakt aufgenommene Proteine des Komplement-Systems können somit die Spirochäten bereits in der Zecke zerstören (Kurtenbach et al. 2002). Reagiert dieses System unterschiedlich auf die Serotypen von *B. garinii*, würde dies eine individuell unterschiedliche Kompetenz der Ratten für diese Genospezies erklären.

4.3 Superinfektion von Kleinnagern und Zecken

Die Zahl der erfolgreich gesogenen Zecken unterscheidet sich bei der experimentellen Infektion der Waldmäuse zwischen den Gruppen. Waldmäuse putzen sich nach dem Ansatz der Nymphen für gewöhnlich sehr gründlich und sie sind aufgrund ihrer geringeren Größe und Gewichte weniger attraktiv für die Nymphen als Gerbile. Auch vom Alter der Zecken ist die

Infestationszahl abhängig. Je älter die Nymphen sind, desto hungrier sind sie und desto eher infestieren sie Wirte, die sonst nicht so attraktiv für sie sind. Bei einer geringeren Infektionsrate der Zecken müssen mehr Zecken pro Wirt angesetzt werden, damit eine Infektion sichergestellt wird. Ähnlich wie in der Natur sind somit die Anzahl infestierender und gesogener Nymphen sehr unterschiedlich.

Reservoirwirte, die regelmäßig durch Nymphen infestiert werden, können mit verschiedenen Genospezies von *B. burgdorferi* s.l. infiziert sein. Dabei sind mehrere Möglichkeiten denkbar, mit welchen Genospezies diese Wirte die anschließend an ihnen saugenden Larven infizieren. Die erstinfizierende Genospezies könnte sich unter Umständen besser im Wirt etablieren, da dessen Immunsystem vorher noch nicht mit Spirochäten in Kontakt gekommen war. Sie könnte somit stärker disseminieren und eher von den Zecken aufgenommen werden. Würde die zuletzt-infizierende Genospezies aufgenommen werden, wäre die Ursache eventuell darin zu suchen, dass sie noch im akuten Stadium infiziert und dadurch stärker im Wirt disseminiert als die bereits länger im Organismus vorhandene Genospezies. Möglicherweise wird aber auch unabhängig von der Reihenfolge der infizierenden Genospezies von einer Wirtsart nur eine bestimmte Genospezies aufgenommen, da sie am besten an diesen Wirt angepasst ist. Bei allen drei Möglichkeiten würde sich die dominierende Genospezies stärker vermehren und hätte somit eine höhere Dichte in der Haut, wodurch sie besser von saugenden Zecken aufgenommen wird. Bei der experimentellen Infektion des Reservoirwirtes Waldmaus und des Labormodells Gerbil ist bei beiden Tierarten unabhängig vom Infektionsmodus *B. afzelii* die deutlich dominierende Genospezies in den xenodiagnostischen Zecken. Nur wenn *B. burgdorferi* s.s. acht Wochen nach *B. afzelii* den Gerbil infiziert, dann hat sie Chancen in die Zecken zu gelangen. *B. afzelii* ist die besser an den Wirt angepasste Genospezies, sie setzt sich im superinfizierten Wirt unabhängig vom Infektionszeitpunkt durch und infiziert mehr Zecken.

Reservoirwirte werden regelmäßig durch verschiedene Genospezies von *B. burgdorferi* s.l. infiziert, dabei infizieren sie ihre Zecken meistens nur mit der besser angepassten Genospezies. In japanischen *Apodemus speciosus* waren ein Drittel der Organproben sowohl mit *B. afzelii* als auch mit *B. garinii* infiziert (Nakao et al. 1995). In anderen japanischen Kleinnagern wurden deutlich weniger Mischinfektionen gefunden (Sato et al. 1996, Masuzawa et al. 1997). In Europa war jedoch in 41% der Organproben von Kleinnagern DNA von mehr als einer Genospezies nachweisbar (Zore et al. 1999). Bei der experimentellen Super-Infektion mit zwei Genospezies lässt sich hingegen nur in ca. 2% der Organe von Waldmäusen DNA beider Genospezies nachweisen, bei den Gerbilen aus doppelt so vielen Organen. Wie bei den xenodiagnostischen Zecken setzt sich *B. afzelii* in den Organen durch. Nur in der Gruppe der Gerbile, die ihre Zecken auch mit *B. burgdorferi* s.s. infizieren, sind die Organe ebenfalls häufiger mit dieser Genospezies infiziert. Wirte im Freiland können jedoch mehrfachen Infektionen ausgesetzt sein, so dass vermutlich die Wahrscheinlichkeit einer Ansiedlung von Spirochäten verschiedener Genospezies in den Organen mit der Lebensdauer ansteigt.

Möglicherweise läßt sich eine Aussage über eine Mehrfach-Infektion des Wirtes schon durch eine relativ einfache serologische Untersuchung treffen. Dafür wurde der im Labor entwickelte genospezifische ELISA eingesetzt. Weder der Zeitpunkt der Infektion noch ihre Reihenfolge haben einen Einfluß auf die Gesamtmenge der gebildeten Antikörper. Die im ELISA gemessene Antikörpermenge ist bei beiden untersuchten Wirtsspezies unabhängig von der Infektionsrate der xenodiagnostischen Zecken oder dem Vorhandensein von Spirochäten-DNA in den Organen. Die Waldmäuse bilden mehr genospezies-spezifische Antikörper

gegen die erst-infizierende Genospezies. Der Unterschied zwischen den Antikörpern ist bei dieser Tierart deutlicher sichtbar. Bei natürlichen Reservoirwirten kann dies ein Hinweis auf eine Mehrfach-Infektion sein, die aber durch die Analyse von xenodiagnostischen Zecken bestätigt werden muss.

Mehrfach infizierte Zecken entstehen durch die gleichzeitige oder sequentielle Aufnahme von mehr als einer Genospezies. Generell können adulte Zecken häufiger doppelt infiziert sein, da sie an zwei Wirten gesogen haben. Wirtssuchende adulte Zecken sind zu 23,3% mehrfach infiziert, 1,4% enthalten sogar drei Genospezies (Rijpkema et al. 1996, Kirstein et al. 1997a, Kurtenbach et al. 1998b, Stánczak et al. 2000). Ein Viertel der doppelt infizierten adulten Zecken enthalten *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s., auch die vier dreifach infizierten Zecken enthielten diese beiden und eine weitere Genospezies. Ein Fünftel der positiven adulten Zecken, die in der aktuellen Studie unter Laborbedingungen mit *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. sequentiell infiziert wurden, enthalten beide Genospezies. Bei den restlichen ist nur eine Genospezies nachweisbar, obwohl sie als Larve und Nymphe an mit beiden Genospezies infizierten Wirten gesogen haben und somit die Gelegenheit hatten, beide aufzunehmen. Der Gerbil diente für alle Larven als Quelle für die erste Genospezies. Saugte die resultierende Nymphe anschließend an einem Wirt, der mit der jeweils anderen Genospezies infiziert war, beeinflusst der Wirt, welche Genospezies sich in der daraus entstehenden adulten Zecke durchsetzt. Hat die Nymphe an einer Waldmaus die zweite Genospezies aufgenommen, dominiert in der adulten Zecke die erste Genospezies, während sich beim Gerbil als Wirt die zweite Genospezies in der Zecke durchsetzt. Möglicherweise findet in der Zecke eine Interaktion der Genospezies statt, wobei eine stark dominiert und nur noch diese mit den angewendeten Methoden nachweisbar ist. Beim Vergleich kompetenter Wirte setzt sich im Vektor die zweite Genospezies durch wenn die gleiche Wirtsspezies für beide Blutmahlzeiten diente. Bei unterschiedlichen Wirtsspezies setzt sich die Genospezies vom infektiöseren Wirt durch. Nicht nur die sequentielle Aufnahme, sondern auch der Wirt und seine Infektiösität scheinen entscheidend für die Doppelinfektion oder das Vorherrschen einer bestimmten Genospezies in einer Zecke zu sein.

Bei doppelt infizierten Nymphen stammen diese Genospezies von einem einzigen Wirt, da in ungesogenen Larven noch keine Spirochäten vorhanden sind. 41% der mehrfach infizierten wirtssuchenden Nymphen enthalten *B. garinii* und *B. valaisiana* (Kirstein et al. 1997a,b), beide Genospezies werden mit Vögeln wie z.B der Amsel, *Turdus merula*, als wichtigste Reservoirwirte assoziiert (Humair et al. 1998a). Ein weiteres Fünftel der Nymphen sind doppelt-infiziert mit *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. und stammen somit von Reservoirwirten, die wie die Waldmaus für beide Genospezies kompetent sind (Kirstein et al. 1997a,b, Stánczak et al. 2000). Immerhin fast ein Drittel der mehrfach infizierten Nymphen enthalten *B. afzelii* und *B. valaisiana*, obwohl beiden Genospezies unterschiedliche Reservoirwirtsklassen zugeordnet werden (Rijpkema et al. 1995 und 1996, Kirstein et al. 1997 a, b). Bestimmte Kombinationen von Genospezies sind sehr viel öfter nachzuweisen, andere wiederum sind kaum vorhanden oder kommen nur lokal gehäuft vor, möglicherweise werden durch andere Methoden aber auch die Doppelinfektionen sensitiver nachgewiesen. Wenn ein Wirt für zwei Genospezies kompetent und mit beiden infiziert ist, bedeutet dies nicht, dass auch alle an ihm saugenden Zecken mit beiden Genospezies infiziert werden. In der vorliegenden Studie ist *B. afzelii* die dominantere Genospezies und setzt sich in der Nymphe durch. Also kommen unter Standardbedingungen weniger Doppelinfektionen vor als für wirtssuchende Nymphen im Freiland beschrieben ist.

In der Natur gibt es sowohl mehrfach infizierte Wirte als auch mehrfach infizierte Zecken.

Möglicherweise setzt sich jedoch eine bestimmte Genospezies bei fortlaufenden Passagen durch. Von superinfizierten Gerbilen nahmen fast viermal so viele Zecken *B. afzelii* wie *B. burgdorferi* s.s. auf. Bei der nächsten Passage nahmen sogar 14mal mehr Zecken *B. afzelii* von Hausmäusen auf. Sind beide Genospezies anfangs noch in jedem Wirt, ändert sich das Verhältnis im Verlauf der Passagen zu Gunsten von *B. afzelii*. Wenn sich diese Tendenz fortsetzt, käme es zur Ausdünnung von *B. burgdorferi* s.s. Obwohl in der 1. Passage nur zehn von zwölf Gerbilen ihre Zecken mit *B. afzelii* infizieren, aber noch vier mit *B. burgdorferi* s.s., infizieren in der 2. Passage alle Hausmäuse ihre Zecken mit *B. afzelii*, nur zwei auch noch mit *B. burgdorferi* s.s.. Bei den restlichen wird *B. burgdorferi* s.s. nicht weitergegeben, obwohl diese Genospezies auf fast alle Mäuse hätte übertragen werden können, wie der Nachweis in den infizierenden Nymphen nach dem Saugakt zeigt. Der Saugakt der Nymphen aktiviert anscheinend auch Spirochäten zur Vermehrung, die in geringer Anzahl in der Zecke vorhanden sind. Durch die Vermehrung in der Zecke werden sie nach dem Ende der Blutmahlzeit besser nachweisbar, waren aber möglicherweise nicht rechtzeitig für eine Übertragung in die Speicheldrüsen der Zecke gelangt. Fortlaufende Passagen scheinen auf manche Genospezies eine Art Filterwirkung zu haben, die ihre Aufnahme durch saugende Zecken vermindert und sie aus dem Zyklus entfernt.

4.4 Übertragungszeitpunkt auf den Wirt

Die Übertragungsgeschwindigkeit der einzelnen Genospezies vom Vektor auf den Wirt ist unter Umständen unterschiedlich, dadurch besteht für die schneller übertragene Genospezies möglicherweise ein Vorteil gegenüber den anderen, wenn z.B. die Gefahr besteht, dass Zecken abgekratzt werden oder sich aus einem anderen Grund nicht vollsaugen können. Der Vergleich der Infektiösität hat gezeigt, dass *B. afzelii* besser an ihren Wirt angepasst ist, die Superinfektion hat außerdem offenbart, dass *B. afzelii* *B. burgdorferi* s.s. verdrängt und bevorzugt auf Zecken übertragen wird. Möglicherweise wird *B. afzelii* auch schneller als *B. burgdorferi* s.s. von Zecken auf den Wirt übertragen und kann sich somit eher etablieren. Die Zeit zwischen Saugbeginn der Zecke und Übertragung der Spirochäten auf den Zeckenwirt ist zur Einschätzung der Gefahr für den Menschen von großer Bedeutung. Die Übertragung auf den Wirt erfolgt normalerweise erst nach zwei bis drei Tagen Saugdauer mittels Speichel (Piesman et al. 1987, Ribeiro et al. 1987, Piesman et al. 1993), da in ungesogenen infizierten Zecken die Spirochäten hauptsächlich im Mitteldarm vorhanden sind (Monin et al. 1989, Lebet et al. 1994, Leuba-Garcia et al. 1994). Erst während des Saugaktes wandern die Spirochäten vom Mitteldarm in die Hämolymphe aus und erreichen weitere Organe, unter anderem auch die Speicheldrüsen (Ribeiro et al. 1987, Monin et al. 1989, Zung et al. 1989). Erst jetzt können sie auf den Wirt übertragen werden. Untersuchungen sind bisher nur in den USA mit einheimischer *I. dammini* und der dortigen Genospezies *B. burgdorferi* s.s. durchgeführt worden. Keine der infestierten Mäuse wurde nach 24 h saugen infiziert, der Zeitpunkt 30 h wurde nicht untersucht (Piesman et al. 1987, 1993, Shih et al. 1993). Die früheste Infektion von Mäusen fand nach 36 h statt, auch nach 48 bzw. 72 h waren jedoch nicht immer alle Tiere infiziert. Wenn *B. afzelii* schneller in den Speicheldrüsen wäre als *B. burgdorferi* s.s., dann geht auch für den Menschen eine größere Gefahr von *B. afzelii* als von *B. burgdorferi* s.s. aus. In der durchgeführten Studie wurde nach 30 h jeweils eine von sechs Mäusen mit *B. afzelii* bzw. mit *B. burgdorferi* s.s. infiziert. Mit *B. afzelii* sind bereits nach 42 h alle Tiere infiziert, mit *B. burgdorferi* s.s. jedoch erst nach 48 h. *I. dammini* saugen im Laborvergleich mit *I. ricinus* jedoch langsamer (persönl. Mitteilung Dr. Richter) und geben

dadurch möglicherweise Spirochäten erst später während des Saugaktes ab. Untersuchungen mit *I. ricinus* wurden bisher nur mittels artifizierlicher Kapselfütterung an Gerbilen durchgeführt, bereits nach 17 h war fast die Hälfte der Tiere infiziert, die Genospezies der übertragenen Spirochäten wurde jedoch nicht ermittelt (Kahl et al. 1998). Beide untersuchte Genospezies werden nicht vor 24 Stunden nach Saugbeginn auf den Wirt übertragen, *B. afzelii* aber nach Übertragungsbeginn schneller als *B. burgdorferi* s.s. und infiziert somit auch bei kürzerer Saugdauer der Zecke den Wirt erfolgreich.