

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Reservoirkompetenz von Waldmäusen und Gerbilen für *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s.

Um die Reservoirkompetenz für *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. bei Waldmäusen und Gerbilen zu vergleichen, wurden diese Wirte durch Infestation mit *I. ricinus*-Nymphen infiziert. Dabei wurden monoinfizierte Nymphen mit einem Pinsel auf die Tiere gegeben (Tab.4). Gleichzeitig mit den Nymphen wurden ca. 20 spirochätenfreie Larven auf den Wirt gesetzt. Alle 2-3 Tage wurden erneut ca. 20 Larven auf jeden Wirt gesetzt. Diese Xenodiagnose wurde drei Wochen kontinuierlich durchgeführt. Anschließend erfolgte alle sechs Wochen bis einschließlich sieben Monate nach der Infektion eine Xenodiagnose, bei der ca. 50 Larven pro Wirt angesetzt wurden. Acht Monate nach der Infektionssetzung wurden die Tiere getötet, um Blut und Organproben zu entnehmen. Nach der Häutung der xenodiagnostischen Larven zu Nymphen wurden von jedem Wirt alle gehäuteten Zecken der ersten drei Wochen und je zehn Zecken von den späteren xenodiagnostischen Zeitpunkten mittels Dunkelfeldmikroskopie untersucht. Jeweils zwei Waldmäuse und zwei Gerbile ließen sich nicht mit *B. burgdorferi* s.s. infizieren, so dass diese Wirte nicht weiter in die Untersuchung eingingen. Die Seren wurden mittels ELISA auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* s.l. getestet und die Organproben mittels PCR untersucht.

Tab.4 Infektionssetzung bei Waldmäusen, *A. sylvaticus*, und Gerbilen, *M. unguiculatus*, zur Ermittlung der Infektiösität für *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s.

Wirt		infizierende Nymphen				Anzahl infizierte Wirte nach Xenodiagnose
Art	Anzahl	mit Genospezies	Anzahl angesetzt	% infiziert	Ø Anzahl gesogen	
<i>A. sylvaticus</i>	6	afz	8	100	4,5	6
	7	bur	15	70	2,1	5
<i>M. unguiculatus</i>	6	afz	8	100	4,9	6
	7	bur	12	70	4,0	5

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s.

### 3.1.1 Verlauf der Infektiösität

Bereits eine Woche nach Infektionssetzung nahm ein Fünftel der Larven die an *B. afzelii*-infizierten Waldmäusen saugten Spirochäten auf. An *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Waldmäusen infizierten sich die saugenden Larven erst nach zwei Wochen und nur ein Zehntel nahmen Spirochäten auf (Abb. 1). Bereits vier Tage nach dem Ansaugen infizierter Nymphen nahmen die Hälfte der Larven Spirochäten auf, die an *B. afzelii*-infizierten Gerbilen saugten. Die mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Gerbile übertrugen sechs Tage nach der Infestierung nur auf ein Zehntel der an ihnen saugenden Larven Spirochäten. *B. afzelii*-infizierte Waldmäuse infizierten alle xenodiagnostischen Larven an Tag 18, während bei mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Waldmäusen der Höhepunkt der Infektion an Tag 22 erreicht wurde, als sich etwa die Hälfte der Larven an diesen Wirten infizierte. Nahezu alle Larven, die an *B. afzelii*-infizierten Gerbilen saugten, nahmen bereits nach 10 Tagen Spirochäten auf. Von den Larven, die an *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Gerbilen saugten, sogar nach drei Wochen nur drei Viertel. Bei beiden Nagetierarten scheinen *B. afzelii*-Spirochäten schneller und stärker infektiös für die Vektorzecken zu sein als *B. burgdorferi* s.s.-Spirochäten.

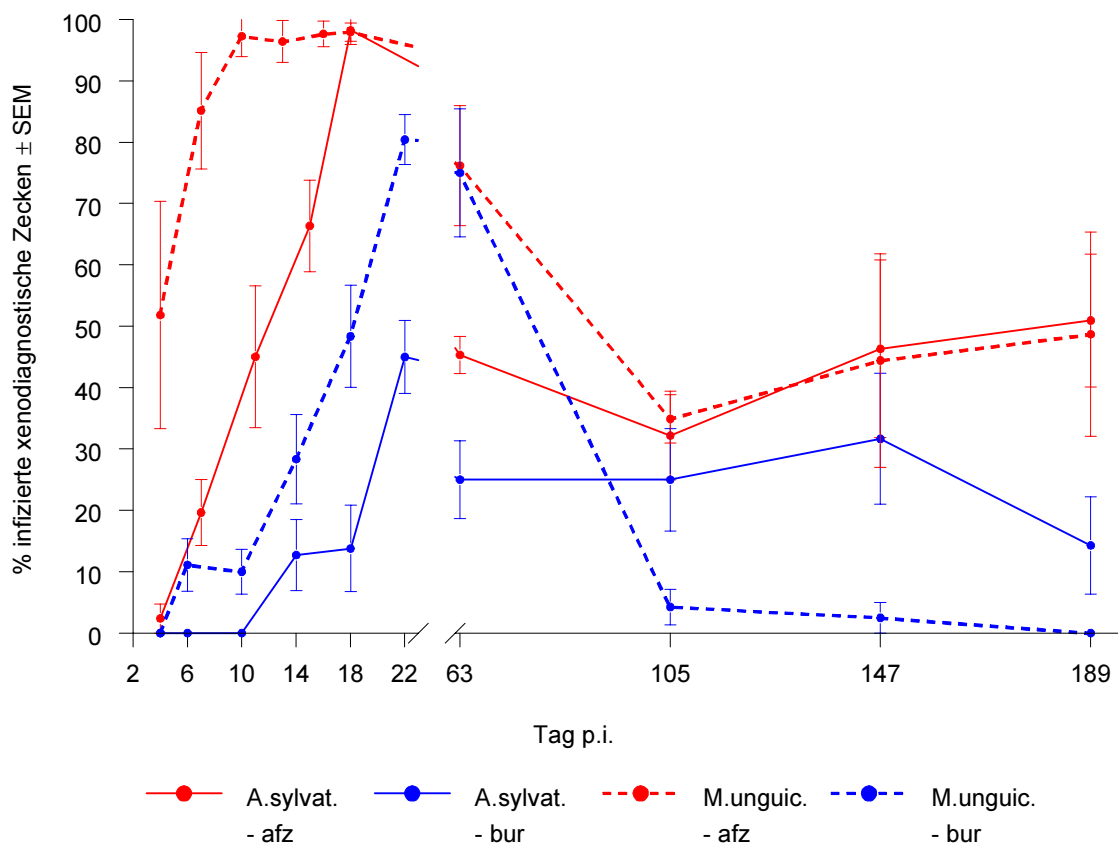


Abb. 1 Infektiösität für xenodiagnostische Zecken von Waldmäusen, *A. sylvaticus*, (durchgezogene Linie) und Gerbilen, *M. unguiculatus*, (gestrichelte Linie) die mit *B. afzelii* (rot) oder *B. burgdorferi* s.s. (blau) infiziert waren. Während der ersten drei Wochen nach der Infektion fand eine kontinuierliche Xenodiagnose statt, indem jeden zweiten Tag Larven angesetzt wurden. Aufgrund der geringen Probengrößen wurden die Daten jedoch zu jeweils 2-3 Tagen zusammengefasst ausgewertet. Danach wurden die Wirte zu den angegebenen Zeitpunkten jeweils einmalig mit Larven infestiert.

Während der sich anschließenden Phase der Infektion übertrugen die mit *B. afzelii* infizierten Waldmäuse über die folgenden sieben Monate Spirochäten auf jede zweite bis dritte Larve (Abb. 1). Von *B. afzelii*-infizierten Gerbilen wurde zwei Monate nach der Infektion noch auf drei Viertel der Zecken Spirochäten übertragen, vier Monate nach der Infektion nur noch auf etwa ein Drittel. Danach stieg die Infektiösität der Gerbile wieder leicht an und sieben Monate nach der Infektion wurden wieder auf die Hälfte der Zecken Spirochäten übertragen. Waldmäuse infizierten bis fünf Monate nach der Infektion ein Viertel aller an ihnen saugenden Zecken mit *B. burgdorferi* s.s.-Spirochäten, erst nach sieben Monaten sank die Infektionsrate auf ein knappes Fünftel ab. Von *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Gerbilen nahmen nach knapp vier Monaten weniger als zehn Prozent der Larven noch Spirochäten auf, nach fast sieben Monaten waren alle untersuchten xenodiagnostischen Zecken negativ. Beide Nagetierarten sind für *B. afzelii* länger und stärker infektiös als für *B. burgdorferi* s.s., der natürliche Reservoirwirt Waldmaus für letztere länger als der Laborwirt Gerbil.

Um die Effektivität zu vergleichen, mit der Spirochäten unterschiedlicher Genospezies von verschiedenen Wirten auf ihre xenodiagnostischen Zecken übertragen werden, wurde die Gesamt-Infektiösität bestimmt. Während der ersten drei Wochen nach Infektionssetzung infizierten Waldmäuse die Hälfte ihrer Zecken mit *B. afzelii*, aber nur ein knappes Fünftel mit *B. burgdorferi* s.s. Gerbile infizierten im gleichen Zeitraum sogar über vier Fünftel ihrer Zecken mit *B. afzelii* und ein Drittel der Zecken mit *B. burgdorferi* s.s. (Tab.5a). Beide Tierarten übertrugen signifikant mehr *B. afzelii*- als *B. burgdorferi* s.s.-Spirochäten auf ihre Zecken ( $p < 0,0001$ ; Fisher's exact test). Waldmäuse infizierten über den gesamten Untersuchungszeitraum von 28 Wochen knapp die Hälfte ihrer Zecken mit *B. afzelii* und ein Fünftel mit *B. burgdorferi* s.s., Gerbile hingegen infizierten zwei Drittel ihrer Zecken mit *B. afzelii* und ein Viertel mit *B. burgdorferi* s.s. (Tab. 5b). Die Infektiösität von *B. afzelii*-infizierten Waldmäusen und Gerbilen für Zecken war über den gesamten Zeitraum signifikant unterschiedlich ( $p < 0,0001$ ; Fischer' exact test), nicht hingegen bei *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Wirten ( $p > 0,05$ ; Fischer' exact test). Waldmäuse und Gerbile infizieren also mehr Zecken mit *B. afzelii* als mit *B. burgdorferi* s.s. und Gerbile übertragen mehr Spirochäten einer Genospezies auf ihre Zecken als Waldmäuse.

Tab.5a Effektivität, mit der Spirochäten der Genospezies *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. von Waldmäusen, *A. sylvaticus*, und Gerbilen, *M. unguiculatus*, auf ihre xenodiagnostischen Zecken während der ersten 3 Wochen nach der Infektionssetzung übertragen wurden.

Wirt			xenodiagnostische Nymphen	
Art	Anzahl	Genospezies	Anzahl	% infiziert
<i>A. sylvat.</i>	6	afz	376	50,8
	5	bur	168	17,3
<i>M. unguic.</i>	6	afz	265	85,7
	5	bur	248	32,7

Tab.5b Effektivität, mit der Spirochäten der Genospezies *B. afzelii* und *B.burgdorferi* s.s. von Waldmäusen, *A. sylvaticus*, und Gerbilen, *M. unguiculatus*, auf ihre xenodiagnostischen Zecken während 28 Wochen nach der Infektionssetzung übertragen wurden.

Wirt			xenodiagnostische Nymphen	
Art	Anzahl	Genospezies	Anzahl	% infiziert
<i>A. sylvat.</i>	5	afz	604	48,0
	5	bur	339	21,2
<i>M. unguic.</i>	6	afz	493	68,8
	4	bur	415	27,5

### 3.1.2 Infektionsverlauf beim einzelnen Tier

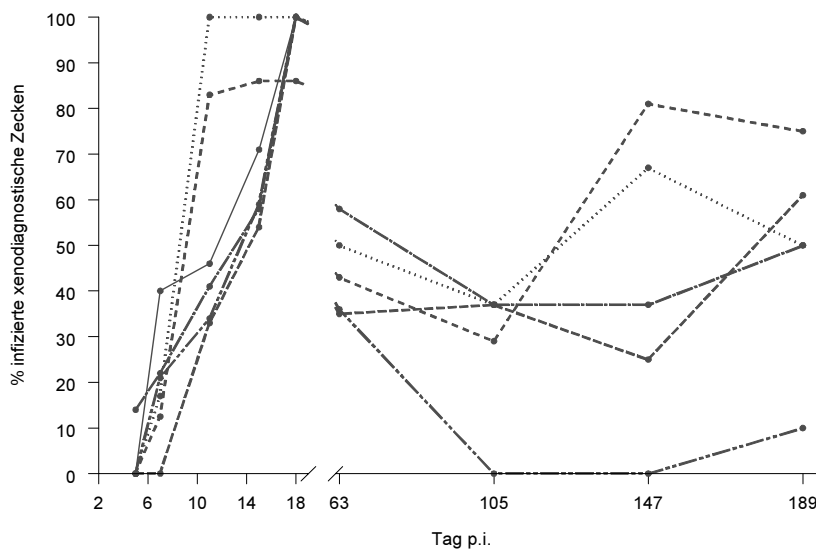
Durch Verwendung von Auszucht-Mäusen bzw. Nachzuchten wildlebender Vorfahren sind die Versuchstiere genetisch uneinheitlich. Ihre Infektiösität für Zecken war individuell sehr unterschiedlich und ergab starke Streuungen bei der Errechnung der durchschnittlichen Infektionsraten der xenodiagnostischen Zecken. So übertrugen von den mit *B. afzelii*-infizierten Waldmäusen zwei der Tiere bereits nach zehn Tagen Spirochäten auf mehr als drei Viertel der Zecken, die restlichen zwei Drittel der Wirte taten dies erst nach 18 Tagen (Abb. 2a). Eine der Waldmäuse infizierte nach vier Monaten keine der untersuchten Zecken mehr mit *B. afzelii*. Hingegen infizierten die restlichen Waldmäusen siebenundzwanzig Wochen nach der Infektion wieder 50-80% der xenodiagnostischen Zecken mit Spirochäten. Bei den mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Waldmäusen übertrug ein Tier bereits nach 14 Tagen Spirochäten auf ein Drittel der Zecken, 18 Tage nach Infektionssetzung aber auf keine Zecke und 3 Wochen nach Ansetzen der Nymphen infizierte es knapp die Hälfte seiner Larven (Abb. 2b). Nur bei einem der Tiere konnte in keiner der untersuchten zehn Zecken ab dem 105. Tag p.i. Spirochäten nachgewiesen werden, die anderen vier Tieren infizierten jeweils zwischen einem Zehntel und der Hälfte ihrer xenodiagnostischen Zecken. Während die Infektiösität von Waldmäusen für Zecken in der akuten Phase relativ einheitlich ist, werden über einen längeren Zeitraum individuell sehr unterschiedliche Anteile der Zecken mit Spirochäten infiziert.

Zwei der mit *B. afzelii*-infizierten Gerbile übertrugen Spirochäten schon ab dem vierten Tag nach dem Ansaugen der infizierten Nymphen auf alle untersuchten xenodiagnostischen Zecken (Abb. 2c). Zum gleichen Zeitpunkt waren bei einem Drittel der Tiere allerdings noch alle Zecken negativ. Diese beiden Gerbile übertrugen erst nach zehn Tagen Spirochäten auf sämtliche Zecken. Die restlichen beiden Gerbile infizierten am vierten Tag nach Infektionssetzung über die Hälfte bis zwei Drittel ihrer Zecken und erst ab dem sechsten bzw. zehnten Tag wurden auf alle xenodiagnostischen Zecken Spirochäten übertragen. Von den beiden Gerbilen, die alle Zecken zu Beginn infiziert hatten, nahmen auch nach 189 Tagen noch über 90% der xenodiagnostischen Zecken Spirochäten auf. Bei den beiden Gerbilen, die am Anfang noch keine Spirochäten an ihre Zecken weitergaben, sank die Infektionsrate nach 27 Wochen unter ein Drittel. Und die beiden anderen Gerbile infizierten am Beginn und Ende des Untersuchungszeitraumes jeweils zwischen 40 und 80% ihrer Zecken. Gerbile die bereits

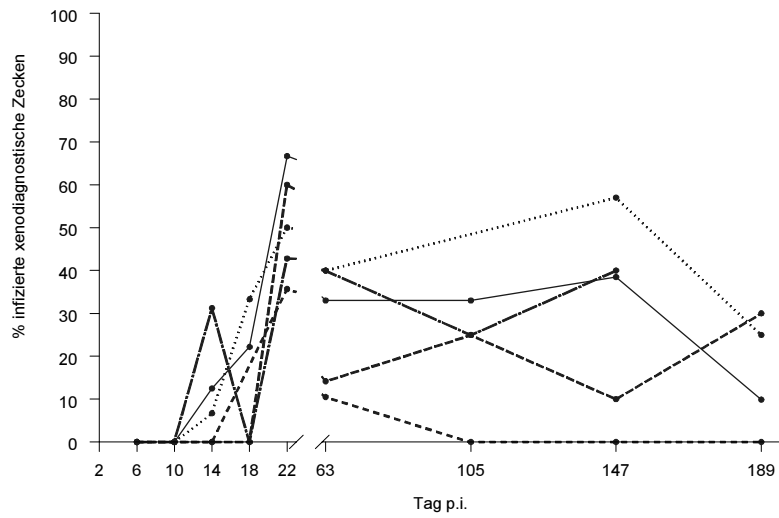
in der akuten Phase hoch-infektiös für Zecken sind, sind dies auch über den Zeitraum von sieben Monaten. Hingegen scheinen Individuen, die erst später infektiös werden, eine kürzere Phase dieser hohen Infektiösität für Zecken aufzuweisen. Mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierte Gerbile zeigten sowohl während der akuten Infektionsphase als auch während der sich anschließenden, über mehrere Monate dauernden, im Folgenden kurz chronisch genannten, Phase einen einheitlichen Infektionsverlauf (Abb. 2d).

Abb. 2 Infektiösität für xenodiagnostische Zecken von Waldmäusen, *A. sylvaticus*, (a,b) und Gerbilen, *M. unguiculatus*, (c,d) die mit *B. afzelii* (a,c) oder *B. burgdorferi* s.s. (b,d) infiziert waren.

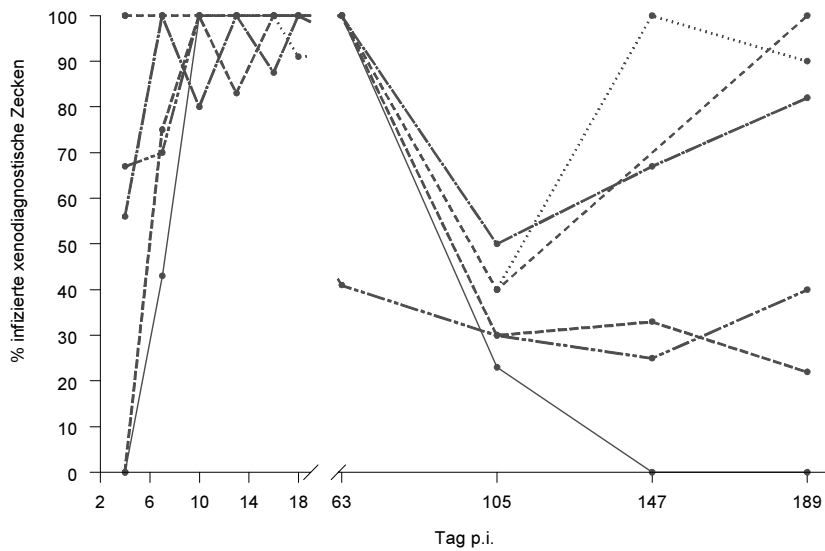
a) *B. afzelii*-infizierte Waldmäuse



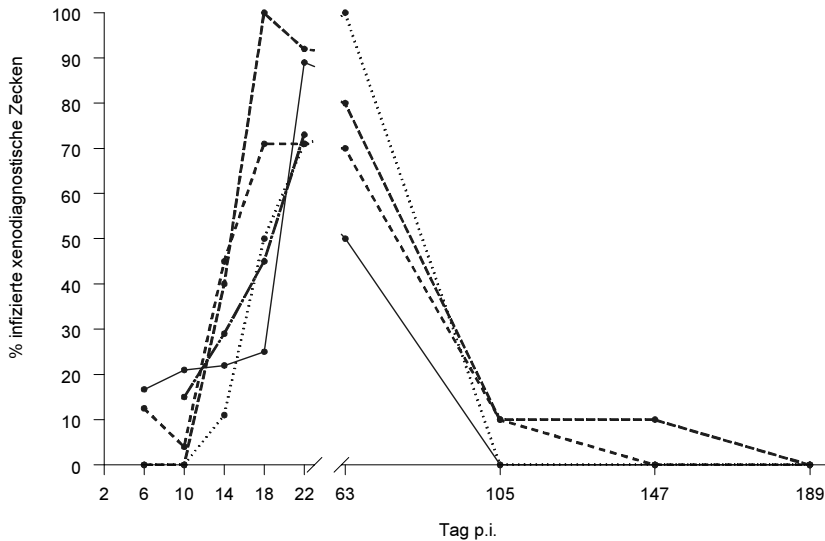
b) *B. burgdorferi* s.s.-infizierte Waldmäuse



c) *B. afzelii*-infizierte Gerbille



#### d) *B. burgdorferi* s.s.-infizierte Gerbale



### 3.1.3 Nachweis von Spirochäten-DNA in Organen

Um festzustellen, ob eine Genospezies bevorzugt bestimmte Organe infiziert, wurden zusätzlich zu den xenodiagnostischen Zecken die Organe der Tiere mittels 16S-PCR auf Spirochäten-DNA untersucht (Tab. 6a,b). Von den Waldmäusen konnten nur Organe von der Hälfte der Tiere untersucht werden, bei den Gerbilen verstarb eins der mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Tiere vorzeitig, so dass die Organe nicht verwertbar waren. Im Herz aller mit *B. afzelii*-infizierten Waldmäuse fand sich Spirochäten-DNA, während dies in der Harnblase aller mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Waldmäusen der Fall war. Die Nieren von zwei der untersuchten mit *B. afzelii*-infizierten Waldmäuse und von einem Fünftel der mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Waldmäuse enthielten Spirochäten-DNA. Jeweils eine mit *B. afzelii*- und eine mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierte Waldmaus hatte Spirochäten-DNA in der Milz. Bei keinem der untersuchten Tiere ließ sich Spirochäten-DNA in der Leber nachweisen. Die Nieren von zwei Drittel der mit *B. afzelii*-infizierten Gerbile und die Herzen der Hälfte dieser Tiere enthielt Spirochäten-DNA. Hingegen war in der Harnblase nur bei einem mit *B. afzelii*-infizierten Gerbil Spirochäten-DNA und in der Milz bei keinem der Tiere nachzuweisen. Sämtliche untersuchten Organe der mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Gerbale waren ohne Spirochäten-DNA. Die Organe von Waldmäusen enthalten häufiger Spirochäten-DNA als die der Gerbale, aufgrund der geringen Probengröße ist jedoch eine Signifikanz nicht bestimmbar. Spirochäten scheinen häufiger in Herz und Harnblase der verwendeten Wirtstiere nachweisbar, ein Unterschied im Organtropismus besteht zwischen den beiden Genospezies *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. nicht.

Tab.6a Nachweis von Spirochäten-DNA durch Amplifikation des 16S-rRNA-Gens in Organen von mit *B. afzelii*- oder mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Waldmäusen, *A. sylvaticus*.

Organ	<i>B. afzelii</i>				<i>B. burgdorferi</i> s.s.					
	Wirt Ident. Nr.				Wirt Ident. Nr.					
	01	02	03	%	01	02	03	04	05	%
Herz	+	+	+	100	-	+	+	-	+	60
Harnblase	-	+	+	66	+	+	+	+	+	100
Niere	+	-	+	66	-	-	-	-	+	20
Milz	-	+	-	33	-	-	-	-	+	20
Leber	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0

Tab.6b Nachweis von Spirochäten-DNA durch Amplifikation des 16S-rRNA-Gens in Organen von mit *B. afzelii*- oder mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Gerbilen, *M. unguiculatus*

Organ	<i>B. afzelii</i>						<i>B. burgdorferi</i> s.s.					
	Wirt Ident. Nr.						Wirt Ident. Nr.					
	01	02	03	04	05	06	%	01	02	03	04	%
Herz	-	+	-	+	+	-	50	-	-	-	-	0
Harnblase	-	+	-	-	-	-	17	-	-	-	-	0
Niere	-	+	-	+	+	+	67	-	-	-	-	0
Milz	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
Leber	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0

### 3.2 Reservoirkompetenz von Wanderratten für *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii*

Um die Reservoirkompetenz von Wanderratten für Spirochäten der Genospezies *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* Serotyp 6 zu ermitteln, wurden je Genospezies sechs Ratten mittels monoinfizierter Nymphen infiziert. Nach zwei Wochen wurde eine Xenodiagnose mit ca. 200 spirochätenfreien Larven durchgeführt. Bei jeweils zwei Tieren, die mit 25 *B. afzelii*-Nymphen bzw. 20 *B. burgdorferi* s.s.-Nymphen infestiert worden waren, wurde alle sechs Wochen eine weitere Xenodiagnose bis einschließlich sieben Monate nach der Infektion durchgeführt (Tab. 7a). Die verbleibenden vier Tiere wurden nach zehn Wochen mit infizierten Nymphen re-infestiert und zwei Wochen später einer Xenodiagnose unterzogen. Vier der mit *B. garinii* Serotyp 6-infizierten Ratten wurden nach acht Wochen getötet. Bei den restlichen Tieren erfolgte zehn Wochen nach der ersten Infestierung ein erneuter Besatz mit infizierten Nymphen und eine Xenodiagnose nach zwei weiteren Wochen. Wirt 19 wurde mittels der xenodiagnostischen Zecken von Wirt 13 infiziert (Tab. 7b). Allen Tieren wurde abschließend Blut und Organe für die Antikörperbestimmung bzw. Untersuchung mittels PCR entnommen.



Tab.7a Infektionssetzung bei Wanderratten, *R. norvegicus*, zur Ermittlung der Infektiösität für *B. afzelii*- und *B. burgdorferi* s.s.-Spirochäten

Genospezies	Wirt Ident. Nr.	infizierende Nymphen		
		Anzahl angesetzt	% infiziert	Anzahl gesogen
<i>B. afzelii</i>	01	25	100	1
	02	25	100	10
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	07	20	100	15
	08	20	100	17

Tab.7b Infektionssetzung bei Wanderratten, *R. norvegicus*, zur Ermittlung der Infektiösität für *B. afzelii*-, *B. burgdorferi* s.s.- und *B. garinii* Serotyp 6-Spirochäten nach Erst- und Re-Infestation.

Genospezies	Wirt Ident. Nr.	Erst-Infestation - infizierende Nymphen			Re-Infestation - infizierende Nymphen		
		Anzahl angesetzt	% infiziert	Anzahl gesogen	Anzahl angesetzt	% infiziert	Anzahl gesogen
<i>B. afzelii</i>	03	10	100	1	5	100	1
	04	10	100	6	5	100	0*
	05	10	100	5	5	100	3
	06	10	100	2	5	100	1
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	09	10	100	3	10	100	8
	10	10	100	6	10	100	5
	11	10	100	3	10	100	2
	12	10	100	3	nd <sup>1</sup>	--	--
<i>B. garinii</i> Serotyp 6	13	6	75	5	nd	--	--
	14	6	75	1	nd	--	--
	15	6	75	2	nd	--	--
	16	6	75	2	nd	--	--
	17	6	75	2	15	92	6
	18	6	75	1	15	92	7
	19	10	70	2	nd	--	--

\* keine gesogene Nymphe eingesammelt, <sup>1</sup> Wirt 7 Wochen nach Erst-Infestation verstorben, nd = nicht durchgeführt

### 3.2.1 Verlauf der Infektiösität

Zur Ermittlung der Reservoirkompetenz für *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. wurden je Genospezies zwei Ratten infiziert und über einen Zeitraum von sieben Monaten alle sechs Wochen einer Xenodiagnose unterzogen. Von jeder Xenodiagnose wurden pro Wirt 5-15 Zecken mittels Dunkelfeldmikroskopie untersucht. Zwei Wochen nach der Infektion übertrugen beide mit *B. afzelii*-infizierte Ratten Spirochäten auf alle der untersuchten xenodiagnostischen Zecken (Abb. 3). Bei den mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Ratten geschah dies nur bei zwei Drittel der Zecken. Bis zur 15. Woche ähnelt sich die Infektiösität der beiden Gruppen, danach infizierten mit *B. afzelii*-infizierte Ratten keine oder nur noch 10% ihrer Zecken, mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierte Wirte noch etwa ein Drittel der Zecken. Sechs Wochen später infizierte einer dieser Wirte dann wieder 50%, der andere nur noch 10% der Zecken. Mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierte Ratten scheinen kurz nach der Infektion für Zecken nicht so stark infektiös zu sein wie mit *B. afzelii*-infizierte Ratten, übertragen dafür aber über einen längeren Zeitraum Spirochäten auf ihre xenodiagnostischen Zecken.

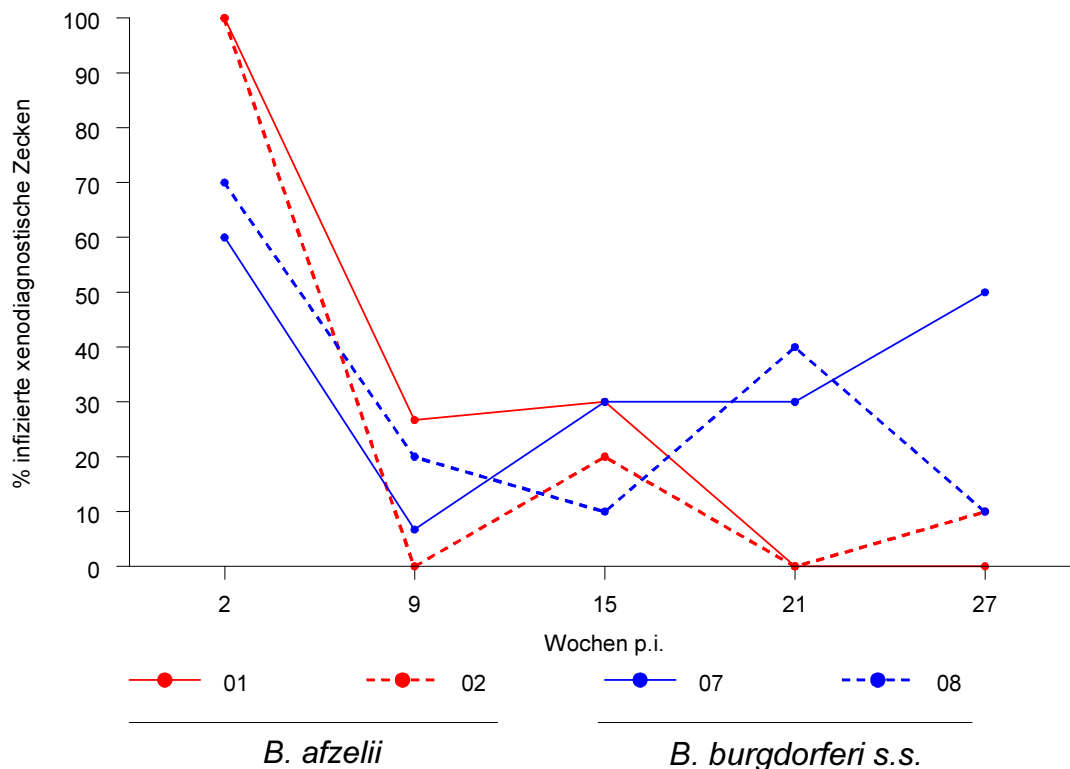


Abb. 3 Infektiösität für xenodiagnostische Zecken von Wanderratten, *Rattus norvegicus*, die mit *B.afzelii* (rot) oder *B.burgdorferi* s.s. (blau) infiziert waren.

### 3.2.2 Verlauf der Infektiösität bei Re-Infestation mit infizierten Nymphen

Um festzustellen, ob Wanderratten nach einer Infektion mit *B. burgdorferi* s.l. eine Immunität gegen Spirochäten entwickeln, wurden je Genospezies vier bzw. bei *B. garinii* nur zwei

Ratten zehn Wochen nach der Erst-Infestation erneut mit infizierten Nymphen besetzt und einer Xenodiagnose unterzogen. Von jeder Xenodiagnose wurden sechs bis 15 Zecken je Wirt mittels Dunkelfeldmikroskopie untersucht. Vier Ratten, die mit *B. afzelii* infiziert worden waren, waren zwei Wochen nach der Infektion im Gegensatz zu den ersten beiden mit *B. afzelii* infizierten Wirten sehr unterschiedlich infektiös für ihre xenodiagnostischen Zecken (Tab. 8a). Neun Wochen nach der Infektion übertrugen zwei Ratten Spirochäten nur noch auf etwa ein Zehntel der Zecken, in den Zecken der beiden anderen Ratten fanden sich keine Spirochäten. Bei der Xenodiagnose nach Re-Infestation übertrug ein Wirt Spirochäten auf 80% seiner Zecken, drei Wirte hingegen auf weniger als 15% ihrer Zecken. Bei Wirt 05 fanden sich zu keinem Zeitpunkt Spirochäten in den xenodiagnostischen Zecken. Bei der Re-Infestation mit derselben Genospezies konnte bei Wirt 04 keine gesogene Nymphe eingesammelt werden. Auch die drei mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Ratten - ein Tier verstarb zwischenzeitlich - sind zwei Wochen nach der Erst-Infestation im Gegensatz zu den ersten beiden mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Wirten sehr unterschiedlich infektiös für ihre xenodiagnostischen Zecken (Tab. 8b). Neun Wochen nach der Infektion übertrugen drei Ratten *B. burgdorferi* s.s.-Spirochäten nur noch auf eine bzw. auf gar keine der untersuchten Zecken. Nach der Re-Infestation infizierten die Wirte 09 und 11 wieder fast die Hälfte der Zecken mit Spirochäten, Wirt 10 hingegen übertrug genau wie direkt vor der Re-Infestation auf keine der untersuchten Zecken Spirochäten. Bei beiden Genospezies infiziert die Hälfte bzw. zwei Drittel der Wirte nach der Re-Infestation wieder mehr Zecken als vorher, sie scheinen also keine Immunität gegen *B. afzelii* oder *B. burgdorferi* s.s. zu entwickeln.

Tab. 8a Infektösität von mit *B. afzelii*-infizierten Wanderratten, *Rattus norvegicus*, für xenodiagnostische Zecken, die 2 bzw. 9 Wochen nach der Infestation mit infizierten Nymphen gesogen hatten. Alle Wirte wurden zehn Wochen nach der Erst-Infestation mit Nymphen re-infestiert, die mit derselben Genospezies infiziert waren.

Wirt Ident. Nr.	Erst-Infestation				Re-Infestation		% Gesamt- Infektösität
	2 Wochen p.i.		9 Wochen p.i.		Anzahl	% infiziert	
	Anzahl	% infiziert	Anzahl	% infiziert			
03	10	50	15	13,3	15	73,3	45,0
04	10	30	15	0	15	13,3	12,5
05	10	0	15	0	15	0	0
06	10	80	15	13,3	15	6,7	27,5

Tab. 8b Infektiosität von mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Wanderratten, *Rattus norvegicus*, für xenodiagnostische Zecken, die 2 bzw. 9 Wochen nach der Infestation mit infizierten Nymphen gesogen hatten. Alle Wirte wurden zehn Wochen nach der Erst-Infestation mit Nymphen re-infestiert, die mit derselben Genospezies infiziert waren.

Wirt Ident. Nr.	Erst-Infestation				Re-Infestation		% Gesamt- Infektiosität
	2 Wochen p.i.		9 Wochen p.i.		Anzahl	% infiziert	
	Anzahl	% infiziert	Anzahl	% infiziert			
09	11	0	15	0	9	44,4	11,4
10	6	83,3	15	0	10	0	16,1
11	6	16,7	15	6,7	9	44,4	20,0
12	6	33,3	--	--	--	--	33,3

Nur Wirt 13 der mit *B. garinii*-infizierten Ratten übertrug nach der Erst-Infestation Spirochäten auf seine xenodiagnostischen Zecken (Tab. 8c). Vor und nach der Häutung sind ein bzw. zwei Drittel dieser Zecken mit Spirochäten infiziert. Sequenzierung der mittels OspA-PCR amplifizierten Produkte zeigten für *B. garinii* Serotyp 6 zugehörige Basenabfolgen. Bei einer Passage dieser Spirochäten durch Wirt 19 nahmen nur ein Fünftel der xenodiagnostischen Zecken Erreger auf, diese waren aber nach der Häutung der Zecken nicht mehr nachweisbar. Eine der beiden Ratten, die erneut mit infizierten Zecken besetzt wurden, übertrug nach der Re-Infestierung Spirochäten auf ein Zehntel ihrer Zecken.

Tab.8c Infektiosität von mit *B. garinii* Serotyp 6 infizierten Wanderratten, *Rattus norvegicus*, für xenodiagnostische Zecken, die jeweils 2 Wochen nach Erst- und Re-Infestation gesogen hatten. Bei den mittels PCR untersuchten Zecken wurde das 16S-rRNA-Gen amplifiziert. Wirt 17 und 18 wurden 10 Wochen nach Erst-Infestation mit Nymphen infestiert, die mit derselben Genospezies infiziert waren.

Wirt Ident. Nr.	Erst-Infektion						Re-Infektion		Infektiosität für Zecken % infiziert
	Larven untersucht		Nymphen untersucht mittels				Nymphen untersucht		
	mittels PCR		PCR		Dunkelfeld		mittels Dunkelfeld		
	Anzahl	% infiziert	Anzahl	% infiziert	Anzahl	% infiziert	Anzahl	% infiziert	
13	10	40	6	67	10	70	0	--	57,7
14	10	0	10	0	10	0	0	--	0
15	10	0	0	--	10	0	0	--	0
16	10	0	0	--	10	0	0	--	0
17	10	0	0	--	10	0	10	0	0
18	10	0	0	--	10	0	10	10	3,3
19	10	20	0	--	10	0	0	--	10,0

Um die Effektivität zu vergleichen, mit der Wanderratten Spirochäten aller drei humanpathogenen Genospezies auf ihre xenodiagnostischen Zecken übertragen, wurde die Gesamt-Infektionsrate aller xenodiagnostischen Zecken über zwölf Wochen nach der Infektionssetzung bestimmt (Tab.9). Mit *B. afzelii*- und *B. burgdorferi* s.s.-infizierte Ratten übertrugen Spirochäten jeweils auf etwas über ein Fünftel ihrer Zecken, mit *B. garinii*-infizierte Ratten auf ein Zehntel der Zecken. An Wanderratten infizieren sich etwa gleich viele Zecken mit *B. afzelii* bzw. *B. burgdorferi* s.s., aber signifikant weniger Zecken mit *B. garinii* ( $p < 0,05$ ; Fisher's exact Test).

Tab. 9 Effektivität, mit der Wanderratten, *R. norvegicus*, Spirochäten der Genospezies *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* Serotyp 6 auf ihre xenodiagnostischen Zecken während 12 Wochen nach der Infektionssetzung übertragen.

Wirt		Nymphen		
Art	Anzahl	Genospezies	Anzahl	% infiziert
<i>R. norveg.</i>	6	afz	201	23,9
	6	bur	152	22,3
	7	gar	146	10,8

### 3.2.3 Nachweis von Spirochäten-DNA in Organen

Haut, Herz und Harnblase aller mit *B. afzelii*- und *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Ratten enthielt DNA von Spirochäten (Tab. 10a,b). Obwohl in der Milz der Hälfte der mit *B. afzelii*-infizierten Wirte Spirochäten-DNA vorhanden war, war sie in diesem Organ bei *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Wirten nicht nachweisbar. Nur vereinzelt ließ sich Erreger-DNA in Niere und Leber finden. Eines der mit *B. afzelii*-infizierten Tiere enthielt sogar in allen Organen Erreger-DNA. Dieser Wirt (06) infizierte zwei Wochen nach der Infektion noch 80% seiner Zecken, nach der Re-Infestation aber nur noch 10%. DNA in der Haut der mit *B. garinii* Serotyp 6-infizierten Ratten war nur von dem Wirt, bei dem zwei Drittel der gehäuteten xenodiagnostischen Zecken Spirochäten enthielten, nachzuweisen (Tab. 10c). Ein weiteres Tier enthielt DNA nur im Herz, die übrigen fünf Wirte waren frei von Erreger-DNA in Haut und Organen. Von den belegbar (Spirochäten-DNA in Organen oder spezifische Antikörper gebildet) mit *B. garinii*-infizierten Ratten ist nur bei 40% der Tiere Spirochäten-DNA in den Organen nachweisbar. Die drei untersuchten Genospezies zeigen in Ratten keinen Organtropismus; obwohl sich in allen mit *B. afzelii* oder *B. burgdorferi* s.s. infizierten Ratten DNA der jeweiligen Genospezies nachweisen ließ, fehlt Erreger-DNA in mehr als der Hälfte der Ratten, die nachweislich mit *B. garinii* in Kontakt gekommen waren.

Tab.10a Nachweis von Spirochäten-DNA in Organen von mit *B. afzelii*-infizierten Wanderratten durch Amplifikation des 16S-rRNA-Gens

Organ	Wirt - Identifikations Nummer						%
	01	02	03	04	05	06	
							10
Haut	+	+	+	+	+	+	0
							10
Herz	+	+	+	+	+	+	0
Harnblase	+	+	+	-	+	+	83
Niere	-	-	-	-	+	+	33
Milz	-	-	+	+	-	+	50
Leber	-	-	-	-	-	+	17

Tab.10b Nachweis von Spirochäten-DNA in Organen von mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Wanderratten durch Amplifikation des 16S-rRNA-Gens

Organ	Wirt - Identifikations Nummer						%
	07	08	09	10	11	12	
							10
Haut	+	+	+	+	+	+	0
							10
Herz	+	+	+	+	+	+	0
							10
Harnblase	+	+	+	+	+	+	0
Niere	-	-	-	+	-	-	17
Milz	-	-	-	-	-	-	0
Leber	-	-	-	-	-	-	0

Tab.10c Nachweis von Spirochäten-DNA in Organen von mit *B. garinii* Serotyp 6-infizierten Wanderratten durch Amplifikation des 16S-rRNA-Gens

Organ	Wirt - Identifikations Nummer								%
	13	14	15	16	17	18	19		
Haut	+	-	-	-	-	-	-	-	17
Herz	-	+	-	-	-	-	-	-	17
Harnblase	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Niere	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Milz	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Leber	-	-	-	-	-	-	-	-	0

### 3.2.4 Nachweis von spezifischen Antikörpern

Zum Nachweis von Antikörpern gegen die infizierende Genospezies wurde ein im Labor entwickelter genospezifischer ELISA angewandt. Jede mit *B. afzelii*-infizierte Ratte bildete gegen diese Genospezies die meisten Antikörper (Tab. 11a). Der Unterschied zur Antikörpermenge gegenüber den beiden anderen Genospezies war aber nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; Mann-Whitney Test). Auch alle mit *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Ratten produzierten die höchste Antikörpermenge gegen die sie infizierende Genospezies (Tab. 11b). Der Unterschied zu den beiden anderen Genospezies war ebenfalls nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; Mann-Whitney Test). Von den mit *B. garinii* Serotyp 6 -infizierten Ratten blieben zwei, welche nur einmal mit Zecken besetzt worden waren, seronegativ (Tab. 11c). Zwei weitere sowie die Wirte, die re-infestiert worden waren, bildeten gegen die sie infizierende Genospezies die meisten Antikörper. Wirt 13, der auf zwei Drittel seiner gehäuteten xenodiagnostischen Zecken *B. garinii*-Spirochäten übertragen hatte, bildete interessanterweise gegen *B. afzelii*-Antigen die meisten Antikörper. Der Unterschied zu den anderen beiden genospezifischen Antikörpermengen war aber nicht signifikant. Die mit *B. garinii*-infizierten Ratten hatten jeweils eine absolute Titerhöhe, die niedriger war als bei den mit *B. afzelii*- bzw. *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Ratten, wobei die Dauer zwischen der Erst-Infektion und der Serumabnahme keinen Einfluß auf die Titerhöhe hatte. Der Nachweis genospezifischer Antikörper beim Reservoirwirt Wanderratte kann generell bei mono-infizierten Tieren ein Hinweis auf die infizierende Genospezies sein.

Tab.11a Relative Menge von spezifischem Immunglobulin G in *B. afzelii*-infizierten Wanderratten im genospezifischen ELISA als optische Dichte bei 405 nm.

Wirt Ident. Nr.	Serum- Entnahme Wochen p.i.	Relative Antikörpermenge gegen Antigene von*			Verhältnis afz : bur : gar
		afz	bur	gar	
01	35	763	300	334	1,0 : 0,4 : 0,4
02	35	667	421	575	1,0 : 0,6 : 0,9
03	15	560	351	410	1,0 : 0,6 : 0,7
04	17	762	369	584	1,0 : 0,5 : 0,8
05	17	840	437	754	1,0 : 0,5 : 0,9
06	17	773	410	591	1,0 : 0,5 : 0,8
negative Kontrolle		114	89	94	

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s., gar = *B. garinii*

Tab.11b Relative Menge von spezifischem Immunglobulin G in *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Wanderratten im genospezifischen ELISA als optische Dichte bei 405 nm.

Wirt Ident. Nr.	Serum- Entnahme Wochen p.i.	Relative Antikörpermenge gegen Antigene von*			Verhältnis bur : afz : gar
		bur	afz	gar	
07	35	857	575	402	1,0 : 0,7 : 0,5
08	35	912	416	425	1,0 : 0,5 : 0,5
09	14	1094	301	317	1,0 : 0,3 : 0,3
10	12	943	296	276	1,0 : 0,3 : 0,3
11	14	996	406	552	1,0 : 0,4 : 0,6
12	7	956	219	203	1,0 : 0,2 : 0,2
negative Kontrolle		89	114	94	

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s., gar = *B. garinii*

Tab.11c Relative Menge von spezifischem Immunglobulin G in *B. garinii* Serotyp 6-infizierten Wanderratten im genospezifischen ELISA als optische Dichte bei 405 nm.

Wirt Ident. Nr.	Serum- Entnahme Wochen p.i.	Relative Antikörpermenge gegen Antigene von*			Verhältnis gar : afz : bur
		gar	afz	bur	
13	8	357	404	177	1,0 : 1,1 : 0,5
14	8	871	606	397	1,0 : 0,7 : 0,5
15	9	92	89	88	seronegativ
16	9	100	110	89	seronegativ
17	13	416	235	208	1,0 : 0,6 : 0,5
18	13	249	199	154	1,0 : 0,8 : 0,6
19	4	300	164	173	1,0 : 0,6 : 0,6
negative Kontrolle		94	114	89	

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s., gar = *B. garinii*



### 3.3 Superinfektion mit *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s.

Es sollte ermittelt werden, welche Genospezies in ihrer Übertragungseffizienz auf Zecken dominiert wenn ein Wirt mit Erregern verschiedener Genospezies superinfiziert wird. Die Versuche wurden sowohl mit Waldmäusen, als auch mit Gerbilen durchgeführt (Tab.12). Es wurden jeweils sechs Nager (zwei Gruppen à drei Tiere) mit *B. afzelii* oder mit *B. burgdorferi* s.s. infiziert. An allen Tieren erfolgte nach zehn Tagen eine Xenodiagnose, um sicherzustellen, dass sie erfolgreich infiziert wurden. An jeweils drei Waldmäuse und drei Gerbile wurden zwei Wochen nach der Erstinfektion - im Folgenden akutes Stadium genannt - Nymphen mit der jeweils anderen Genospezies angesetzt. Wieder erfolgte nach zwei Wochen eine Xenodiagnose, die Tiere wurden getötet und Serum sowie Organproben gewonnen. Die übrigen drei Tiere beider Arten wurden erst nach zwei Monaten - im Folgenden chronisches Stadium genannt - mit der zweiten Genospezies superinfiziert. Zwei Wochen später erfolgte auch bei diesen Tieren eine Xenodiagnose, nach deren Abschluß Serum und Organproben gewonnen wurden. Die Zecken der Xenodiagnose, die nach der Erstinfektion durchgeführt wurde, wurden nach ihrer Häutung zu Nymphen mittels Dunkelfeldmikroskopie auf Spirochäten untersucht. Die Genospezies in den xenodiagnostischen Zecken nach der Superinfektion sowie in den Organen wurde mittels 16S-PCR und anschließender Sequenzierung des amplifizierten Genfragmentes bestimmt. Die genospezifischen Antikörpermengen wurden im Serum mittels ELISA gemessen. Desweiteren wurden die Genospezies in den Nymphen, die im akuten Stadium zur Superinfektion dienten, nach ihrer Häutung zu adulten Zecken mittels 16S-PCR und Sequenzierung bestimmt (siehe 3.3.2). Außerdem wurden jeweils zehn xenodiagnostische Zecken der Gerbile an Hausmäuse angesetzt, um zu erfahren, welche Genospezies sie übertragen (siehe 3.3.3). So läßt sich feststellen, ob Erreger der zuerst infizierenden oder der superinfizierenden Genospezies in den Zecken dominieren oder ob eine bestimmte Genospezies, davon unabhängig, bevorzugt übertragen wird.

Tab.12 Erstinfektion und Superinfektion bei Waldmäusen, *A. sylvaticus*, und Gerbilen, *M. unguiculatus*.

Wirt		Erstinfektion - infizierende Nymphen				Superinfektion - infizierende Nymphen				
		mit Genospezies*	Anzahl angesetzt pro Wirt	% infiziert	Ø Anzahl gesogen	Wochen nach Erstinfektion	mit Genospezies	Anzahl angesetzt pro Wirt	% infiziert	Ø Anzahl gesogen
Art	Anzahl									
<i>A. sylvaticus</i>										
	3	afz	8	100	1,7	2	bur	10	100	7,0
	3	afz	8	100	1,0	8	bur	10	100	5,0
	3	bur	10	57	7,3	2	afz	10	100	3,0
	3	bur	12	75	7,3	8	afz	14	90	2,7
<i>M. unguiculatus</i>										
	3	afz	25	100	23,7	2	bur	25	100	21,0
	3	afz	12	100	6,7	8	bur	11	90	10,0
	3	bur	20	100	15,0	2	afz	14	100	11,0
	3	bur	15	100	10,0	8	afz	8	100	6,3

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s.

### 3.3.1 Superinfektion bei Waldmäusen und Gerbilen

Jede der zuerst mit *B. afzelii* infizierten Waldmäuse war für ihre xenodiagnostischen Zecken nach der Erstinfektion infektiös, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität (Tab. 13a). Die Hälfte der mit *B. burgdorferi* s.s. infizierten Waldmäuse übertrug hingegen nach der Erstinfektion keine Spirochäten auf ihre Zecken. In den Organen dieser Wirte ließ sich jedoch später diese Genospezies nachweisen. Die meisten der xenodiagnostischen Zecken enthielten nach der Superinfektion *B. afzelii*. Nur in weniger als 10% der Zecken war *B. burgdorferi* s.s. nachweisbar. Eine Assoziation mit einer bestimmten Infektionsreihenfolge fehlte. Wirt 09 infizierte mehr Zecken mit *B. burgdorferi* s.s. als mit *B. afzelii*, wies aber nur eine geringe Infektionsrate in den Zecken nach der Superinfektion auf. *B. afzelii* dominiert in den xenodiagnostischen Zecken der superinfizierten Waldmäuse, unabhängig von der Reihenfolge oder dem Zeitpunkt der Infektionen.

Tab. 13a Genospezies der Spirochäten, die nach Infektion und Superinfektion auf xenodiagnostische Zecken übertragen wurden. Waldmäuse, *A. sylvaticus*, wurden erst mit *B. afzelii* oder *B. burgdorferi* s.s. infiziert und nach 2 bzw. 8 Wochen mit der jeweils anderen Genospezies superinfiziert.

Wirt Ident. Nr.	Erstinfektion:			Superinfektion					
	xenodiagnostische Zecken			infizierende Nymphen		xenodiagnostische Zecken			
	mit Genospezies*	Anzahl untersucht	% infiziert	Wochen nach Erstinfektion	mit Genospezies	Anzahl untersucht	Anzahl mit Genospezies		
							afz	bur	afz\bur
01	afz	4	100	2	bur	7	6	0	0
02	afz	4	100	2	bur	12	5	2	0
03	afz	4	100	2	bur	9	2	0	0
04	afz	5	80	8	bur	20	8	0	0
05	afz	10	40	8	bur	20	9	1	0
06	afz	4	75	8	bur	20	8	1	0
07	bur	10	0	2	afz	8	6	0	0
08	bur	6	33	2	afz	8	7	0	0
09	bur	5	80	2	afz	9	1	2	0
10	bur	10	0	8	afz	7	0	0	0
11	bur	10	0	8	afz	7	5	0	0
12	bur	8	63	8	afz	8	6	0	0

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s.

Vergleichend zu den Waldmäusen wurde die Superinfektion auch in Gerbilen durchgeführt (Tab. 13b). Alle xenodiagnostischen Zecken infizierten sich nach der Erstinfektion mit *B. afzelii*. *B. burgdorferi* s.s. als erst-infizierende Genospezies wurde von einer der beiden Versuchsgruppen weniger effizient an die xenodiagnostischen Zecken weitergegeben. Nach der Superinfektion dominierten in drei von vier Versuchsgruppen *B. afzelii*-Spirochäten in den xenodiagnostischen Zecken. Wenn die Gerbile allerdings im chronischen Stadium der *B. afzelii*-Infektion mit *B. burgdorferi* s.s. superinfiziert wurden, setzte sich letztere in den xenodiagnostischen Zecken durch. Einer dieser Wirte gab sowohl *B. afzelii* als auch *B. burgdorferi* s.s. an seine Zecken weiter.

Tab. 13b Genospezies der Spirochäten, die nach Infektion und Superinfektion auf xenodiagnostische Zecken übertragen wurden. Gerbile, *M. unguiculatus*, wurden erst mit *B. afzelii* oder *B. burgdorferi* s.s. infiziert und nach 2 bzw. 8 Wochen mit der jeweils anderen Genospezies superinfiziert.

Wirt Ident. Nr.	Erstinfektion: xenodiagnostische Zecken			Superinfektion					
	mit Genospezies*	Anzahl untersucht	%	infizierende Nymphen		xenodiagnostische Zecken			
				Wochen nach Erstinfektion	mit Genospezies	Anzahl untersucht	Anzahl mit Genospezies		
							afz	bur	afz+bur
01	afz	3	100	2	bur	8	6	0	1
02	afz	3	100	2	bur	6	6	0	0
03	afz	3	100	2	bur	6	6	0	0
04	afz	3	100	8	bur	8	0	7	0
05	afz	3	100	8	bur	13	6	3	0
06	afz	3	100	8	bur	10	0	6	0
07	bur	3	100	2	afz	6	6	0	0
08	bur	3	100	2	afz	6	5	0	0
09	bur	3	100	2	afz	6	6	0	0
10	bur	3	66	8	afz	6	6	0	0
11	bur	7	57	8	afz	12	7	0	0
12	bur	8	75	8	afz	6	6	0	0

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass *B. afzelii* in den xenodiagnostischen Zecken fast aller Versuchsgruppen dominierte. Bei beiden Wirtstierarten wurde nur *B. afzelii* auf die xenodiagnostischen Zecken übertragen, wenn sie im chronischen Stadium superinfiziert hatte, und bei den Gerbilen auch bei der Infektion im akuten Stadium (Tab. 14). Nur Gerbile, die im chronischen Stadium mit *B. burgdorferi* s.s. superinfiziert wurden, infizierten drei Viertel aller Zecken mit *B. burgdorferi* s.s.- Spirochäten, obwohl im vergleichbaren Versuchsansatz Waldmäuse 90% ihrer Zecken mit *B. afzelii* infizierten. Nur in einer Zecke ließen sich beide Genospezies nachweisen. Während in drei der vier Versuchsansätze nur *B. afzelii* in den Zecken nachweisbar ist, sind drei Viertel der Zecken mit *B. burgdorferi* s.s. infiziert, wenn sie an Wirten gesogen haben, die im chronischen Stadium mit dieser Genospezies superinfiziert worden waren.

Tab. 14 Anteil der Genospezies in xenodiagnostischen Zecken, die 2 Wochen nach der Super-Infektion an Waldmäusen, *A. sylvaticus*, oder Gerbilen, *M. unguiculatus*, gesogen haben.

Wirt		Erstinfektion		Superinfektion		Xenodiagnostische Zecken nach Superinfektion				
Art	Anzahl	mit Genospezies*	% infizierte xenod. Zeck.#	Wochen nach Erstinfektion	mit Genospezies	Anzahl untersucht	% infiziert	davon % Genospezies		
								afz	bur	afz+bur
<i>A. sylvat.</i>										
	3	afz	100	2	bur	28	54	87,0	13,0	0
	3	afz	57,9	8	bur	60	45	92,6	7,4	0
	3	bur	28,6	2	afz	25	64	87,5	12,5	0
	2	bur	17,9	8	afz	15	73	100	0	0
<i>M. unguic.</i>										
	3	afz	100	2	bur	21	90	95,0	0	5
	3	afz	100	8	bur	31	71	27,0	73,0	0
	3	bur	100	2	afz	18	94	100	0	0
	3	bur	66,6	8	afz	24	79	100	0	0

\*afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s. # xenodiagnostische Zecken

### 3.3.1.1 Nachweis von Genospezies von *B. burgdorferi* s.l. in Organen

Um festzustellen, ob eine Genospezies bestimmte Organe superinfizierter Waldmäuse bevorzugt infiziert, wurden diese im Anschluss an die Superinfektion entnommen und die Genospezies mittels 16S-PCR und Sequenzierung festgestellt (Tab. 15a). *B. afzelii* dominierte in fast allen Organen. Nur in Wirten, die mit *B. afzelii* im akuten Stadium superinfiziert wurden, war *B. burgdorferi* s.s. in der Harnblase aller drei Wirte, aber auch in Herz und Milz eines Tieres nachweisbar. Sogar eine Doppelinfektion war bei Wirt 07 in der Milz nachzuweisen. Weil bei Wirt 10 nur DNA von *B. burgdorferi* s.s.-Spirochäten in den Organen, keine *B. afzelii*-Spirochäten-DNA in den xenodiagnostischen Zecken war und auch die superinfizierende Nymphe negativ war, wurde er nicht superinfiziert. Obwohl auch Erreger-DNA in der Haut nachweisbar war, enthielten zehn untersuchte xenodiagnostische Zecken dieses Wirtes keine Spirochäten. In Wirt 05 ließ sich keine DNA von Spirochäten in Milz und Niere, dafür aber in der Leber nachweisen.

Auch die Organe der Gerbile wurden mittels 16S-PCR und Sequenzierung untersucht (Tab. 15b). Die im chronischen Stadium superinfizierende Genospezies überwog in den Organen, unabhängig davon, um welche der beiden Genospezies es sich handelte. In Herz und Harnblase dominierten die Genospezies der Erstinfektionen, wenn die Superinfektion im akuten Stadium stattfand. Wenn *B. burgdorferi* s.s. im akuten Stadium zur Superinfektion diente, ließ sich bei zwei Wirten eine Doppelinfektion in Milz bzw. Niere nachweisen. Wurden *B. burgdorferi* s.s.-infizierte Wirte mit *B. afzelii* im akuten Stadium superinfiziert, dann waren die Organe sowohl mit *B. afzelii* als auch mit *B. burgdorferi* s.s. infiziert. Nur bei zwei Wirten ließ sich in der Leber Spirochäten-DNA nachweisen. Auch in den Organen beider Wirtstierarten überwiegt *B. afzelii*. Bei den Waldmäusen läßt sich *B. burgdorferi* s.s. nur nachweisen, wenn die Wirte damit erstinfiziert und im akuten Stadium superinfiziert wurden. Hingegen dominiert *B. burgdorferi* s.s. in den Organen der Gerbile, wenn diese Genospezies im chronischen Stadium super- oder im akuten Stadium erstinfiziert hatte.

Tab. 15a Nachweis von Spirochäten durch Amplifikation und Sequenzierung des 16SrRNA-Gens in Organen von superinfizierten Waldmäusen, *A. sylvaticus*, die erst mit *B. afzelii* oder *B. burgdorferi* s.s. infiziert und nach 2 bzw. 8 Wochen mit der jeweils anderen Genospezies superinfiziert wurden.

Wirt Ident. Nr.	Erstinfektion mit Genospezies*	Superinfektion		Genospezies in Organen					
		Wochen nach Erstinfektion	mit Genospezies	Haut	Leber	Milz	Niere	Harnblase	Herz
01	afz	2	bur	afz	-	afz	afz	afz	afz
02	afz	2	bur	afz	-	afz	-	afz	afz
03	afz	2	bur	afz	-	afz	afz	afz	afz
04	afz	8	bur	afz	-	afz	-	afz	afz
05	afz	8	bur	afz	afz	-	-	afz	afz
06	afz	8	bur	afz	-	afz	afz	afz	afz
07	bur	2	afz	afz	-	afz+bur	afz	bur	afz
08	bur	2	afz	afz	-	afz	afz	bur	afz
09	bur	2	afz	afz	-	bur	afz	bur	bur
10	bur	8	afz	bur	-	-	bur	bur	bur
11	bur	8	afz	afz	-	afz	afz	afz	afz
12	bur	8	afz	afz	-	afz	afz	afz	afz

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s.

Tab. 15b Nachweis von Spirochäten durch Amplifikation und Sequenzierung des 16SrRNA-Gens in Organen von superinfizierten Gerbilen, *M. unguiculatus*, die erst mit *B. afzelii* oder *B. burgdorferi* s.s. infiziert und nach 2 bzw. 8 Wochen mit der jeweils anderen Genospezies superinfiziert wurden.

Wirt Ident. Nr.	Erstinfektion mit Genospezies*	Superinfektion		Genospezies in Organen				
		Wochen nach Erstinfektion	mit Genospezies	Leber	Milz	Niere	Harnblase	Herz
01	afz	2	bur	-	afz+bur	bur	afz	afz
02	afz	2	bur	-	afz	afz	afz	afz
03	afz	2	bur	-	bur	afz+bur	afz	afz
04	afz	8	bur	-	bur	bur	bur	bur
05	afz	8	bur	-	-	afz	bur	-
06	afz	8	bur	-	bur	bur	bur	bur
07	bur	2	afz	-	afz	-	bur	bur
08	bur	2	afz	-	bur	-	bur	bur
09	bur	2	afz	-	afz	afz	afz	afz
10	bur	8	afz	afz	afz	afz	afz	afz
11	bur	8	afz	-	afz	afz	afz	afz
12	bur	8	afz	afz	afz	afz	afz	afz

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s.

### 3.3.1.2 Nachweis von spezifischen Antikörpern

Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen der Reihenfolge der Infektion mit den beiden Genospezies und den gebildeten Antikörpern besteht, wurde mit dem Serum der Wirte der im Labor entwickelte genospezifische ELISA durchgeführt. Alle Waldmäuse wiesen die meisten Antikörper gegen die erstinfizierende Genospezies auf (Tab. 16a). Selbst Wirte, die nur oder vorwiegend *B. afzelii* auf ihre Zecken übertrugen und in den Organen enthielten, bildeten mehr Antikörper gegen *B. burgdorferi* s.s. wenn diese Genospezies den nativen Wirt infizierte. Die absolute Antikörpermenge war in den Gerbilen im Vergleich zu den Waldmäusen im Durchschnitt höher (Tab. 16b). Im Gegensatz zu den Waldmäusen haben nur die Gerbile, die mit *B. afzelii* erst- und mit *B. burgdorferi* s.s. im akuten Stadium superinfiziert worden waren, die meisten Antikörper gegen die erstinfizierende Genospezies gebildet. Diese wurde bis auf eine Doppelinfektion als einzige auch auf die Zecken übertragen und war in den Organen dominierend. Einer der Gerbile, die im chronischen Stadium mit *B. burgdorferi* s.s. superinfiziert wurden, bildete gegen *B. afzelii* die meisten Antikörper, obwohl in den Organen und den xenodiagnostischen Zecken überwiegend *B. burgdorferi* s.s. nachweisbar war. Hingegen produzierte der dritte Wirt aus dieser Gruppe, bei welchem auch nur *B. burgdorferi* s.s. in den Organen und den Zecken nachweisbar war, die höchste Antikörpermenge gegen diese Genospezies. Wirte, die im akuten Stadium mit *B. afzelii* superinfiziert worden waren, bildeten dann die meisten Antikörper gegen *B. burgdorferi* s.s., wenn diese Genospezies auch in den Organen nachweisbar war. Wenn sowohl in den Organen als auch den xenodiagnostischen Zecken nur *B. afzelii* vorhanden war, erfolgte eine Antikörperbildung überwiegend gegen diese Genospezies. Gerbile produzierten die höhere Antikörpermenge nicht einheitlich gegen die erstinfizierende Genospezies aber deutlich mehr Antikörper als Waldmäuse. Es besteht kein Zusammenhang zwischen absoluter Antikörpermenge und Infektionsrate der xenodiagnostischen Zecken nach der Superinfektion.

Tab. 16a Relative Menge von Antikörpern bei Waldmäusen, *A. sylvaticus*, gegen Antigene der erst- und superinfizierenden Genospezies, gemessen als Optische Dichte bei 405 nm im genospezifischen ELISA. Wirte wurden erst mit *B. afzelii* oder *B. burgdorferi* s.s. infiziert und nach 2 bzw. 8 Wochen mit der jeweils anderen Genospezies superinfiziert.

Wirt Ident. Nr.	Erstinfektion mit Genospezies*	Superinfektion		Antikörper gegen Antigene von		Verhältnis afz : bur	Verhältnis bur : afz
		Wochen nach Erstinfektion	mit Genospezies	afz	bur		
01	afz	2	bur	740	179	4,1	
02	afz	2	bur	560	197	2,8	
03	afz	2	bur	962	636	1,5	
04	afz	8	bur	888	475	1,9	
05	afz	8	bur	951	401	2,4	
06	afz	8	bur	809	509	1,6	
07	bur	2	afz	347	1070		3,1
08	bur	2	afz	316	720		2,3
09	bur	2	afz	112	389		3,5
10	bur	8	afz	345	1094		3,2
11	bur	8	afz	677	764		1,1
12	bur	8	afz	685	824		1,2
Kontrollen							
	<i>B. afzelii</i>	--	--	1012	431	2,4	
	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	--	--	219	1022		4,7
	negativ	--	--	84	98		

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s.

Tab. 16b Relative Menge von Antikörpern bei Gerbilen, *M. unguiculatus*, gegen Antigene der erst- und superinfizierenden Genospezies, gemessen als Optische Dichte bei 405 nm im genospezifischen ELISA. Wirte wurden erst mit *B. afzelii* oder *B. burgdorferi* s.s. infiziert und nach 2 bzw. 8 Wochen mit der jeweils anderen Genospezies superinfiziert.

Wirt Ident. Nr.	Erstinfektion mit Genospezies*	Superinfektion		Antikörper gegen Antigene von		Verhältnis afz : bur	Verhältnis bur : afz
		Wochen nach Erstinfektion	mit Genospezies	afz	bur		
01	afz	2	bur	1163	802	1,5	
02	afz	2	bur	1235	745	1,7	
03	afz	2	bur	1019	720	1,4	
04	afz	8	bur	1371	877	1,6	
05	afz	8	bur	1072	994	1,1	
06	afz	8	bur	532	1068	0,5	
07	bur	2	afz	525	852		1,6
08	bur	2	afz	578	822		1,4
09	bur	2	afz	1155	409		0,4
10	bur	8	afz	1210	643		0,5
11	bur	8	afz	1197	1096		0,9
12	bur	8	afz	1100	1050		1,0
Kontrollen							
	<i>B. afzelii</i>	--	--	929	424	2,2	
	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	--	--	987	1052		1,1
	negativ	--	--	75	76		

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s.



### 3.3.2 Superinfizierte adulte *I. ricinus* Zecken

Um festzustellen, welche Genospezies in einer adulten Zecke dominiert, wenn diese verschiedene Genospezies während der beiden vorangegangenen Blutmahlzeiten aufgenommen haben könnte, wurden die adulten Zecken, die sich aus superinfizierenden Nymphen der Versuche (3.3.1) entwickelt hatten, auf die sie infizierende Genospezies untersucht (Tab. 17).

Über 80% der adulten Zecken waren mit *B. afzelii* infiziert, wenn sie als Larven an mit *B. afzelii*-infizierten Wirten und als Nymphen an Waldmäusen gesogen hatten, die mit *B. burgdorferi* s.s. infiziert waren. Keine Zecke war mit beiden Genospezies infiziert. Hatten die Zecken zuerst *B. burgdorferi* s.s. aufgenommen und als Nymphen an mit *B. afzelii*-infizierten Waldmäusen gesogen, enthielt die Hälfte *B. burgdorferi* s.s. und weniger als ein Viertel *B. afzelii*. Jedoch war fast ein Drittel der Zecken mit beiden Genospezies infiziert. Bei den Gerbilen hingegen enthielten alle adulten Zecken *B. burgdorferi* s.s., wenn sie als Larven an *B. afzelii*-infizierten Wirten gesogen hatten und anschließend an *B. burgdorferi* s.s.-infizierten Gerbilen. Obwohl ein Drittel der Zecken mit beiden Genospezies infiziert waren, war keine Zecke ausschließlich mit *B. afzelii* infiziert. Hatten die Zecken allerdings erst als Nymphen an mit *B. afzelii*-infizierten Wirten gesogen, waren fast alle mit *B. afzelii* infiziert und nur 7% mit beiden Genospezies. In adulten Zecken, die als subadulte Stadien infizierte Waldmäuse infestiert hatten, überwiegt die Genospezies, die im Larvenstadium aufgenommen wurde, es scheint keine Verdrängung während der Blutmahlzeit aus der Nymphe stattzufinden. In adulten Zecken, die in beiden subadulten Stadien infizierte Gerbile infestiert hatten, überwiegt dagegen die Genospezies, die erst im Nymphenstadium aufgenommen wurde. Die Verteilung der Genospezies und die Häufigkeit von Doppelinfektionen in adulten Zecken sind von der Wirtstierart abhängig.

Tab. 17 Genospezies in adulten *I. ricinus*-Zecken, die als Larven und Nymphen an Wirten jeweils 2 Wochen nach deren Infektion mit unterschiedlichen Genospezies gesogen haben.

Art	Wirt		Resultierende adulte Zecken				
	infiziert mit Genospezies*		Anzahl untersucht	%	davon % Genospezies		
	Larve	Nymphe			afz	bur	afz+bur
<i>A. sylvat.</i>	afz	bur	8	75	83,3	16,7	0
	bur	afz	21	100	23,8	47,6	28,6
<i>M. unguic.</i>	afz	bur	15	93	0	64,3	35,7
	bur	afz	46	96	90,9	2,3	6,8

### 3.3.3 Passagierung von *B. burgdorferi* s.l. durch einen zweiten Wirt

Um festzustellen, welche Genospezies bei einer 2. Passage dominiert, wurden Nymphen, die als Larven an superinfizierten Gerbilen parasitiert hatten, an haarlose Hausmäuse, *Mus musculus*, angesetzt. Jeweils 10-15 Nymphen eines Gerbils infestierten eine Hausmaus. Diese Nymphen wurden nach ihrem Saugakt mittels 16 S-PCR und Sequenzierung auf die enthaltene Genospezies untersucht (Tab. 17). Obwohl in den ungesogenen xenodiagnostischen Nymphen von den Gerbilen noch überwiegend *B. afzelii* bzw. bei drei Gerbilen auch *B. burgdorferi* s.s. nachweisbar war (Tab. 13b), war in beiden Gruppen nach dem Saugakt der Nymphen auch wieder die jeweils andere Genospezies vorhanden. In allen gesogenen Nymphen fand sich *B. afzelii*, bei zehn der Wirte auch zusätzlich *B. burgdorferi* s.s. An den Hausmäusen wurde nach 14 Tagen eine Xenodiagnose durchgeführt. Die xenodiagnostischen Zecken wurden als frisch gesogene Larven und als gehäutete Nymphen mittels 16 S-PCR und Sequenzierung auf die übertragene Genospezies untersucht (Tab. 18). Xenodiagnostische Zecken infizierten sich an Hausmäusen überwiegend mit *B. afzelii*. Nur von wenigen Wirten nahmen sie *B. burgdorferi* s.s. auf. Zwar war in Larven von zwei Hausmäusen, bei denen die Wirte der 1. Passage vorwiegend *B. burgdorferi* s.s. übertragen hatten, diese Genospezies noch nachweisbar, in den Nymphen ist sie häufig nicht mehr vertreten. Nur von einem Wirt nahmen mehr xenodiagnostische Zecken *B. burgdorferi* s.s.- als *B. afzelii*-Spirochäten auf. Bei einer gleichzeitigen Passage durch kompetente Wirte wird überwiegend *B. afzelii* auf deren Zecken übertragen, auch wenn eine Infektion des Wirtes mit beiden Genospezies stattgefunden hatte.

Tab.18 Übertragung von Spirochäten durch Nymphen, die als xenodiagnostische Larven an doppelt-infizierten Gerbilen, *M. unguiculatus*, gesogen hatten, auf haarlose Hausmäuse, *Mus musculus*. Nachweis der Genospezies durch Amplifikation und Sequenzierung des 16SrRNA-Gens.

1. Passage										2. Passage									
Erstinfektion mit Genospezies*	Superinfektion		von Wirt		infizierende Nymphen nach Saugakt		Genospezies in xenodiagnostischen Zecken von Hausmäusen				gehäutete Nymphen								
	Wochen nach Erstinfektion	Genospezies	Ident. Nr.	Anzahl untersucht	% infiziert	afz	bur	afz/bur	Anzahl untersucht	% infiziert	afz	bur	afz/bur	Anzahl untersucht	% infiziert	afz	bur	afz/bur	
afz	2	bur	01	8	87	58	28	14	8	100	100	0	0	12	100	100	0	0	
			02	8	100	13	62	25	7	86	100	0	0	12	100	100	0	0	
			03	11	82	67	22	11	12	100	100	0	0	11	100	100	0	0	
afz	8	bur	04	10	100	10	60	30	12	100	83	0	17	12	100	100	0	0	
			05	9	100	89	11	0	8	100	100	0	0	12	100	100	0	0	
			06	9	78	14	86	0	9	100	12	44	44	12	100	8	67	25	
bur	2	afz	07	9	89	62	25	13	9	100	100	0	0	12	100	100	0	0	
			08	11	73	74	13	13	9	100	100	0	0	11	100	91	9	0	
			09	14	64	100	0	0	9	100	100	0	0	11	100	100	0	0	
bur	8	afz	10	10	80	100	0	0	9	100	100	0	0	11	100	100	0	0	
			11	9	55	80	20	0	9	100	100	0	0	12	100	100	0	0	
			12	11	73	87	13	0	9	100	100	0	0	12	92	100	0	0	

\* afz = *B. afzelii*, bur = *B. burgdorferi* s.s.

### 3.4 Übertragungszeitpunkt von *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. vom Vektor auf den Wirt

Um die Dauer zwischen Saugbeginn infizierter Nymphen und Übertragung von *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. auf den Wirt zu vergleichen, wurden monoinfizierte Nymphen, die entweder mit *B. afzelii* oder *B. burgdorferi* s.s. infiziert waren, nach definierter Saugzeit von ihren Wirten entfernt. Als Wirte wurden haarlose Hausmäuse, *Mus musculus*, verwendet. Durch die Verwendung dieser Mäuse ließ sich der Zeitpunkt des Saugbeginns der Nymphen genau beobachten und es war sicher gestellt, dass auch alle Nymphen zu einem definierten Zeitpunkt entfernt wurden. Für jede der beiden Genospezies wurden mindestens sechs Mäuse je vorgesehener Saugdauer mit jeweils fünf bis sieben Nymphen im Nackenbereich infestiert. Die Nymphen stammten aus einer Charge hochinfizierter Zecken (90-100%), deren Infektionsrate vorher per Dunkelfeldmikroskopie ermittelt worden war. Nach 24, 30, 36, 42 bzw. 48 Stunden Saugdauer wurden jeweils alle Nymphen der jeweiligen Wirte mittels Pinzette entfernt. Nach zwei Wochen wurde an allen Mäusen eine Xenodiagnose durchgeführt. Von den xenodiagnostischen Larven wurden nach ihrer Häutung zu Nymphen je drei bis sechs Zecken von jeder Maus mittels Dunkelfeldmikroskopie auf ihre Infektion mit Lyme-Spirochäten untersucht. Zusätzlich wurde beim Versuchsansatz mit *B. burgdorferi* s.s. Serum von den Mäusen nach acht Wochen gewonnen und der Anteil von IgG Antikörpern gegen *B. burgdorferi* s.l. mittels Dako-ELISA bestimmt.

Die Untersuchung der xenodiagnostischen Zecken und die Bestimmung der Antikörper gegen *B. burgdorferi* s.l. ergab einen relativ einheitlichen Übertragungsmodus bei beiden Genospezies. Keine der jeweils sechs Mäuse war nach 24 Stunden mit Spirochäten infiziert. Erst nach 30 Stunden war jeweils eine Maus infiziert (Tab. 19a, b). Nymphen übertrugen *B. afzelii* nach 36 h auf die Hälfte, nach 42 h auf alle Mäuse. Sie infizierten allerdings zu den gleichen Zeitpunkten nur ein Drittel der Tiere mit *B. burgdorferi* s.s. Spirochäten beider Genospezies wurden nach 48 Stunden auf alle Mäuse übertragen. Der beim Versuchsansatz mit *B. burgdorferi* s.s. durchgeführte ELISA bestätigte die aus den Xenodiagnosen erhaltenen Ergebnisse für jedes Tier. Nur eine Maus war serokonvertiert, ohne dass in den sechs per Dunkelfeldmikroskopie untersuchten Zecken Spirochäten nachweisbar waren. Obwohl die Saugdauer bis zur ersten Übertragung von Spirochäten für beide Genospezies ähnlich ist, infizieren mit *B. burgdorferi* s.s.- Spirochäten infizierte Nymphen ihre Wirte zu Beginn weniger effizient als solche, die mit *B. afzelii*- Spirochäten infiziert sind.

Tab. 19a Abhängigkeit der Übertragung von *B. afzelii* auf haarlose Hausmäuse von der Saugdauer der Nymphe. Die Saugdauer wurde durch Entfernen der Nymphen festgelegt. Der Infektionsstatus des Wirtes wurde durch Xenodiagnose und anschließendem mikroskopischen Nachweis von Spirochäten in den Zecken ermittelt.

Saugdauer in Stunden	Anzahl infizierende Nymphen ± SE	Hausmaus	
		Anzahl	% Wirte mit ≥ 1 Zecke infiziert
24	5,1 ± 1,4	6	0
30	7,3 ± 1,0	6	17
36	6,1 ± 0,3	6	50
42	5,7 ± 1,0	6	100
48	5,4 ± 1,1	6	100

Tab. 19b Abhängigkeit der Übertragung von *B. burgdorferi* s.s. auf haarlose Hausmäuse von der Saugdauer der Nymphe. Die Saugdauer wurde durch Entfernen der Nymphen festgelegt. Der Infektionsstatus des Wirtes wurde durch Xenodiagnose und anschließendem mikroskopischen und molekularbiologischen Nachweis von Spirochäten in den Zecken ermittelt und mittels ELISA bestätigt.

Saugdauer in Stunden	Anzahl infizierende Nymphen ± SE	Hausmaus		
		Anzahl	% Wirte mit ≥ 1 Zecke infiziert	% sero- Konvertierte Wirte*
24	6,5 ± 0,8	6	0	0
30	7,8 ± 0,4	6	17	17
36	5,9 ± 1,0	12	33	33
42	6,6 ± 1,1	24	33	38
48	6,7 ± 0,5	6	100	100

\* OD ≥ 2 x OD der negativen Kontrolle