

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchung zum Vorkommen von  
durch Arthropoden und Gastropoden  
übertragenen Pathogenen  
bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von  
**Christina Sabine Helm**  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2019  
Journal-Nr.: 4140







**Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchung zum Vorkommen von  
durch Arthropoden und Gastropoden übertragenen  
Pathogenen  
bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Christina Sabine Helm**

Tierärztin aus Berlin

**Berlin 2019**

**Journal-Nr.: 4140**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: PD Dr. Jürgen Krücken  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Cornelia Silaghi  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Bäumer

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

dogs, foxes, anaplasma, babesia, leishmania, dirofilaria, Angiostrongylus vasorum, ehrlichia, borrelia, disease vectors, disease prevalence, epidemiology, blood samples, spleen, polymerase chain reaction, ELISA, berlin, brandenburg

Tag der Promotion: 03.06.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-982-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin  
verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhalt

Inhalt.....	I
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis Anhang .....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis Anhang .....	X
Abkürzungsverzeichnis .....	XI
1. Einleitung .....	1
2. Literatur .....	3
2.1.    Verwendete Untersuchungsverfahren.....	3
2.1.1.    Vor- und Nachteile von Untersuchungsverfahren in epidemiologischen Studien.....	4
2.2.    Vektor-übertragene Erkrankungen bei Hunden.....	5
2.2.1.    Aktuelle Ausbreitung und Entwicklung.....	5
2.3.    Untersuchte Erreger .....	8
2.3.1.    Leishmanien .....	9
2.3.1.1.    Taxonomie und Morphologie .....	9
2.3.1.2.    Wirtsspektrum.....	9
2.3.1.3.    Entwicklungszyklus und Übertragungswege .....	9
2.3.1.4.    Diagnostik.....	10
2.3.1.5.    Verbreitung .....	12
2.3.1.6.    Klinik .....	13
2.3.1.7.    Therapie .....	14
2.3.1.8.    Prophylaxe.....	15
2.3.1.9.    Zoonotisches Potenzial .....	17
2.3.2.    Babesien.....	18
2.3.2.1.    Taxonomie und Morphologie .....	18
2.3.2.2.    Wirtsspektrum.....	18
2.3.2.3.    Entwicklungszyklus und Übertragung.....	19
2.3.2.4.    Diagnostik.....	19
2.3.2.5.    Verbreitung .....	20
2.3.2.6.    Klinik .....	21

2.3.2.7.	Therapie .....	22
2.3.2.8.	Prophylaxe.....	23
2.3.2.9.	Zoonotisches Potenzial .....	24
2.3.3.	Anaplasmen.....	24
2.3.3.1.	Taxonomie und Morphologie .....	24
2.3.3.2.	Wirtsspektrum.....	25
2.3.3.3.	Vermehrung und Übertragung.....	25
2.3.3.4.	Diagnostik.....	26
2.3.3.5.	Verbreitung .....	27
2.3.3.6.	Klinik .....	28
2.3.3.7.	Therapie .....	29
2.3.3.8.	Prophylaxe.....	30
2.3.3.9.	Zoonotisches Potenzial .....	30
2.3.4.	Ehrlichien .....	31
2.3.4.1.	Taxonomie und Morphologie .....	31
2.3.4.2.	Wirtsspektrum und Übertragung.....	32
2.3.4.3.	Vermehrung.....	32
2.3.4.4.	Diagnostik.....	32
2.3.4.5.	Verbreitung .....	34
2.3.4.6.	Klinik .....	35
2.3.4.7.	Therapie .....	36
2.3.4.8.	Prophylaxe.....	36
2.3.4.9.	Zoonotisches Potenzial .....	37
2.3.5.	Borrelien .....	37
2.3.5.1.	Taxonomie und Morphologie .....	37
2.3.5.2.	Wirtsspektrum.....	37
2.3.5.3.	Vermehrung und Übertragung.....	38
2.3.5.4.	Diagnostik.....	38
2.3.5.5.	Verbreitung .....	40
2.3.5.6.	Klinik .....	41
2.3.5.7.	Therapie .....	42
2.3.5.8.	Prophylaxe.....	42
2.3.5.9.	Zoonotisches Potenzial .....	43
2.3.6.	Dirofilarien.....	43
2.3.6.1.	Taxonomie und Morphologie .....	43
2.3.6.2.	Wirtsspektrum.....	44
2.3.6.3.	Entwicklungszyklus.....	44

2.3.6.4.	Diagnostik.....	45
2.3.6.5.	Verbreitung.....	46
2.3.6.6.	Klinik.....	49
2.3.6.7.	Therapie.....	50
2.3.6.8.	Prophylaxe.....	51
2.3.6.9.	Zoonotisches Potenzial.....	51
2.3.7.	<i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	52
2.3.7.1.	Taxonomie und Morphologie.....	52
2.3.7.2.	Wirtsspektrum.....	53
2.3.7.3.	Entwicklungszyklus.....	53
2.3.7.4.	Diagnostik.....	54
2.3.7.5.	Verbreitung.....	55
2.3.7.6.	Klinik.....	56
2.3.7.7.	Therapie.....	57
2.3.7.8.	Prophylaxe.....	58
2.3.7.9.	Zoonotisches Potenzial.....	58
2.3.8.	<i>Hepatozoon canis</i> .....	58
2.3.8.1.	Taxonomie und Morphologie.....	58
2.3.8.2.	Wirtsspektrum.....	59
2.3.8.3.	Entwicklungszyklus.....	60
2.3.8.4.	Diagnostik.....	61
2.3.8.5.	Verbreitung.....	63
2.3.8.6.	Klinik.....	64
2.3.8.7.	Therapie.....	66
2.3.8.8.	Prophylaxe.....	66
2.3.8.9.	Zoonotisches Potenzial.....	67
3.	Material und Methoden.....	68
3.1.	Aufbau der Studie.....	68
3.1.1.	Standortwahl.....	68
3.1.2.	Probengewinnung und -lagerung.....	69
3.2.	Material.....	70
3.2.1.	Test-Kits.....	70
3.2.1.1.	Afosa Anaplasmen ELISA-Testkit.....	70
3.2.1.2.	Afosa Babesien ELISA-Testkit.....	70
3.2.1.3.	Afosa Leishmanien ELISA-Testkit.....	71
3.2.1.4.	IDEXX SNAP®4Dx®Plus-Testkit.....	71

3.2.2.	Reaktionskits .....	71
3.2.3.	Software.....	72
3.2.4.	Chemikalien .....	72
3.2.5.	Enzyme.....	73
3.2.6.	Puffer und Flüssigkeiten .....	73
3.2.7.	verwendete Primer.....	74
3.2.8.	Marker.....	74
3.2.9.	Einwegartikel .....	75
3.2.10.	Geräte .....	76
3.2.11.	Weitere Laborartikel .....	77
3.3.	Methoden .....	78
3.3.1.	Zufallsgenerator mit R .....	78
3.3.2.	Herstellung von Puffern und Reagenzien .....	78
3.3.2.1.	Puffer für den Leishmanien - ELISA .....	78
3.3.2.1.1.	Carbonat-Coating-Puffer .....	78
3.3.2.1.2.	PBS-Tween Waschpuffer.....	78
3.3.2.1.3.	Verdünnungspuffer für Leishmanien ELISA.....	79
3.3.2.1.4.	Substratpuffer .....	79
3.3.2.1.5.	Phosphorsäure-Stopplösung .....	79
3.3.2.2.	Puffer für den Dirofilarien- und Angiostrongylus-ELISA .....	79
3.3.2.2.1.	Waschpuffer für die Dirofilarien- und Angiostrongylus-ELISA .....	79
3.3.2.2.2.	Verdünnungspuffer für die Dirofilarien- und Angiostrongylus-ELISA .....	80
3.3.2.2.3.	Puffer I .....	80
3.3.2.2.4.	Puffer II .....	80
3.3.2.2.5.	Puffer III .....	80
3.3.2.3.	Puffer und Reagenzien für molekularbiologische Methoden .....	80
3.3.2.3.1.	6 × Loading-Dye.....	80
3.3.2.3.2.	50 × TAE-Puffer .....	80
3.3.2.3.3.	LB-Agar.....	81
3.3.2.3.4.	LB-Medium.....	81
3.3.2.3.5.	100 bp und <i>EcoRI</i> Marker .....	81
3.3.3.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	81
3.3.3.1.	Leishmanien-ELISA Testkit NovaTec.....	82
3.3.3.2.	Leishmanien-ELISA in house FU Berlin .....	82

3.3.3.2.1.	Beschichtung der Antigen-Platten .....	82
3.3.3.2.2.	Durchführung des ELISA.....	83
3.3.3.3.	Leishmanien ELISA-Testkit von Afosa .....	84
3.3.3.4.	Anaplasmen ELISA-Testkit von Afosa.....	86
3.3.3.5.	Babesien ELISA-Testkit von Afosa.....	89
3.3.3.6.	Dirofilarien-ELISA .....	91
3.3.3.6.1.	Beschichtung der ELISA-Platte .....	92
3.3.3.6.2.	Durchführung des ELISA.....	92
3.3.3.7.	<i>Angiostrongylus vasorum</i> Antigen-ELISA.....	93
3.3.3.7.1.	Beschichtung der ELISA-Platte .....	93
3.3.3.7.2.	Durchführung des ELISA.....	93
3.3.3.7.3.	Auswertung des ELISA .....	95
3.3.3.8.	<i>Angiostrongylus vasorum</i> Antikörper-ELISA .....	95
3.3.3.8.1.	Beschichtung der ELISA-Platte .....	95
3.3.3.8.2.	Durchführung des ELISA.....	95
3.3.3.8.3.	Auswertung des ELISA .....	96
3.3.4.	IDEXX SNAP®4Dx®Plus Testkit.....	97
3.3.5.	Immunfluoreszenz Antikörper Test .....	98
3.3.5.1.	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> -Immunfluoreszenz Antikörper Test.....	99
3.3.5.2.	<i>Leishmania infantum</i> -Immunfluoreszenz Antikörper Test .....	99
3.3.6.	DNA-Isolation mit Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit .....	99
3.3.7.	Dichtemessung von DNA mit dem Epoch® Biotek Spektralphotometer .....	100
3.3.8.	Aufreinigung von DNA und Plasmiden .....	101
3.3.8.1.	Aufreinigung mit DNA cleaner and concentrator™- 5 Kit .....	101
3.3.8.2.	Aufreinigung von PCR Produkten mittels Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit .....	101
3.3.9.	Klonierung von DNA .....	102
3.3.9.1.	StrataClone Blunt PCR Cloning Kit .....	102
3.3.9.2.	Klonierung von DNA mittels TOPO TA Cloning Kit .....	103
3.3.10.	Plasmid DNA Miniprep Kit.....	103
3.3.11.	GenUp™ Plasmid Kit .....	104
3.3.12.	Plasmid DNA Midiprep Kit.....	104
3.3.13.	Sequenzierung von DNA.....	105
3.3.14.	Restriktionsverdau von Plasmiden mit EcoRI Enzym .....	106
3.3.15.	Polymerasekettenreaktion.....	106

3.3.15.1.	konventionelle PCR zur Untersuchung auf <i>Dirofilarien</i> .....	106
3.3.15.2.	konventionelle PCR zur Untersuchung auf Anaplasmen.....	107
3.3.15.3.	High Resolution Melt PCR zur Untersuchung auf <i>Ehrlichia canis</i> und <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	108
3.3.15.4.	konventionelle PCR zur Untersuchung auf Babesien.....	109
3.3.15.5.	konventionelle PCR zur Untersuchung auf <i>Hepatozoon canis</i> .....	109
3.3.16.	Agarosegelelektrophorese .....	110
3.3.17.	Statistische Auswertung.....	110
3.3.18.	Phylogenetische Analyse .....	111
4.	Ergebnisse .....	112
4.1.	Stichprobengröße.....	112
4.2.	Herkunft und geografische Verteilung der Proben .....	114
4.3.	Signalement der getesteten Hunde .....	116
4.4.	Seroprävalenzen der Erreger bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg .....	118
4.4.1.	Leishmanien .....	118
4.4.2.	Babesien.....	120
4.4.3.	Anaplasmen.....	121
4.4.4.	Ehrlichien .....	124
4.4.5.	Borrelien .....	126
4.4.6.	Dirofilarien.....	127
4.4.7.	<i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	129
4.4.8.	Gemeinsames Vorkommen von Infektionen .....	132
4.4.9.	Mid p-Exact Test.....	133
4.4.10.	logistische Regression .....	133
4.5.	<i>Hepatozoon canis</i> .....	134
4.5.1.	Prävalenzuntersuchen mittels PCR.....	134
4.5.2.	Phylogenetische Analyse der <i>Hepatozoon canis</i> Ergebnisse.....	135
5.	Diskussion.....	137
5.1.	Beurteilung von Sammelgebiet und Stichprobengröße.....	137
5.2.	Beurteilung der Prävalenzen von Krankheitserregern bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg.....	139
5.2.1.	Leishmanien .....	139

5.2.2.	Babesien.....	140
5.2.3.	Anaplasmen.....	141
5.2.4.	Ehrlichien.....	144
5.2.5.	Borrelien.....	145
5.2.6.	Dirofilarien.....	147
5.2.7.	<i>Angiostrongylus vasorum</i> .....	149
5.3.	<i>Hepatozoon canis</i> .....	150
5.3.1.	Beurteilung der Prävalenzuntersuchung.....	150
5.3.2.	Beurteilung der phylogenetischen Analyse.....	152
5.4.	Beurteilung der Ermittlung der Reisegeschichte und PCR Abklärung in positiven Fällen.....	152
5.5.	Einflussfaktoren für die Verbreitung von Vektor übertragenen Erkrankungen ...	153
5.6.	Ausblick.....	154
6.	Zusammenfassung.....	156
7.	Summary.....	158
8.	Literaturverzeichnis.....	160
9.	Anhang.....	XIII
9.1.	Fragebogen für die Hundebesitzer.....	XIII
9.2.	Phylogenetische Analyse der <i>Hepatozoon canis</i> Proben.....	XVI
	Publikationen.....	XX
	Danksagung.....	XXI
	Selbstständigkeitserklärung.....	XXIII

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Untersuchungsverfahren.....	3
Tabelle 2: Untersuchte Erreger .....	8
Tabelle 3: Verwendete Reaktionskits .....	71
Tabelle 4: Verwendete Software .....	72
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien.....	73
Tabelle 6: Verwendete Enzyme .....	73
Tabelle 7: Verwendete Puffer und Flüssigkeiten.....	74
Tabelle 8: Verwendete Primer.....	74
Tabelle 9: Verwendete Marker .....	74
Tabelle 10: Verwendete Einwegartikel .....	75
Tabelle 11: Verwendete Geräte .....	76
Tabelle 12: Weitere verwendete Laborartikel.....	77
Tabelle 13: Referenzen des <i>A. vasorum</i> Antigen ELISA.....	95
Tabelle 14: Referenzen des <i>A. vasorum</i> Antikörper ELISA .....	97
Tabelle 15: gemeinsames Vorkommen von Infektionen .....	132
Tabelle 16: p-Werte des Mid p-Exact Tests .....	133

## Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle A1: Übersicht der Sequenzen aus Gruppierung 2 des phylogenetischen Baumes <i>Hepatozoon canis</i> .....	XIX
--	-----

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Testinterpretation des SNAP®4Dx®Plus .....	98
Abbildung 2: Anzahl der Proben je Monat.....	113
Abbildung 3: Standorte der teilnehmenden Praxen* .....	115
Abbildung 4: Herkunft der Proben* .....	116
Abbildung 5: Alter der Hunde in Jahren .....	117
Abbildung 6: Geschlecht der Hunde in %.....	117
Abbildung 7: Lokale Verteilung der positiven Leishmanienproben* .....	119
Abbildung 8: Saisonale Verteilung der positiven Leishmanienproben .....	119
Abbildung 9: Lokale Verteilung der positiven Babesienproben* .....	120
Abbildung 10: Saisonale Verteilung der positiven Babesienproben .....	121
Abbildung 11: Lokale Verteilung der positiven Anaplasmenproben im SNAP-Test* .....	122
Abbildung 12: Lokale Verteilung der positiven Anaplasmenproben im konventionellen ELISA* .....	123
Abbildung 13: Saisonale Verteilung der positiven Anaplasmenproben im SNAP-Test .....	123
Abbildung 14: Saisonale Verteilung der positiven Anaplasmenproben im konventionellen ELISA .....	124
Abbildung 15: Lokale Verteilung der positiven Ehrlichienproben* .....	125
Abbildung 16: Saisonale Verteilung der positiven Ehrlichienproben .....	125
Abbildung 17: Lokale Verteilung der positiven Borrelienproben* .....	126
Abbildung 18: Saisonale Verteilung der positiven Borrelienproben .....	127
Abbildung 19: Lokale Verteilung der positiven Dirofilarienproben* .....	128
Abbildung 20: Saisonale Verteilung der positiven Dirofilarienproben.....	129
Abbildung 21: Lokale Verteilung der positiven <i>A. vasorum</i> Antigen Proben* .....	130
Abbildung 22: Lokale Verteilung der positiven <i>A. vasorum</i> Antikörper Proben* .....	131
Abbildung 23: Saisonale Verteilung der positiven <i>A. vasorum</i> Antigen Proben .....	131
Abbildung 24: Saisonale Verteilung der positiven <i>A. vasorum</i> Antikörper Proben.....	132
Abbildung 25: Logistische Regressionsanalyse <i>Anaplasma</i> spp. ....	134
Abbildung 26: Netzwerk <i>H. canis</i> .....	136

\* verändert nach: "Metropolregion Berlin/ Brandenburg", <http://gl.berlin-brandenburg.de/hauptstadtregion/index.html>, lizenziert unter: [Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/)

## **Abbildungsverzeichnis Anhang**

Abbildung A1: Überblick phylogenetischer Baum <i>Hepatozoon canis</i> .....	XVI
Abbildung A2: Gruppierung 1 des phylogenetischen Baumes <i>Hepatozoon canis</i> .....	XVII
Abbildung A3: Gruppierung 2 des phylogenetischen Baumes <i>Hepatozoon canis</i> .....	XVIII

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aqua dest.	destilliertes Wasser
APP	Akute-Phase Proteine
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Gradcelsius
cm	Zentimeter
dest.	Destilliert
DUs	Development Units
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxynucleotide-Solution-Mix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym- linked Immunosorbent Assay
E/S	exkretorisch/ sekretorisch
FCS	Fetal calf serum
g	Gramm
HGA	Humanen Granulozytären Anaplasiose
HRM	High Resolution Melting Analysis
IFAT	Immunofluoreszenz Antikörper Test
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KELA	kinetischer ELISA
KI	Konfidenzintervall
korr.	korrigiert

l	Liter
L	Leerwert
L1	Larvenstadium 1
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
M	Mol
mAb	monoklonale Antikörper
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPS	Mononukleäres Phagozyten-System
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OD	optische Dichte = Extinktionswerte
P	Prozentsatz
PBS-Tween	Phosphate Buffered Saline with Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p.o.	per os
PK	Positivkontrolle
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPA	lösliche Parasitenantigene
spp.	Species pluralis
TE	Testergebnis
TMB	Tetramethylbenzidin
USA	United States of America

## 1. Einleitung

Vektor-übertragene Erkrankungen machen einen Anteil von 17 % an allen Infektionskrankheiten aus und sind der Grund für eine Million Tode jährlich (WHO, 2017).

In den letzten Jahren wurde zunehmend von einer Ausbreitung verschiedener Vektor-übertragener Erkrankungen in ganz Europa berichtet (Baneth et al., 2012; Otranto et al., 2013; Savic et al., 2014). Dabei wurde auch das Auftreten von autochthonen Infektionen in Betracht gezogen, sowohl bei Hunden (Jolly et al., 2015; Silbermayr et al., 2014; Staebler et al., 2005) als auch beim Menschen (Tappe et al., 2014).

Aufgrund der globalen Erwärmung und veränderten Bodennutzung, sowie den damit verbundenen klimatischen und Vegetationsveränderungen, kommt es zu einem Wandel der geografischen Verteilung von Vektorspezies. So zeigt sich, dass sich die Prävalenz vieler Parasiten in Regionen mit gemäßigttem Klima erhöht. Dies ist darin begründet, dass die Parasiten, welche wechselwarme Zwischenwirte nutzen, bestimmte Schwellenwerte der Temperaturen über eine gewisse Zeit des Jahres benötigen, um ihren Entwicklungszyklus in den Wirten vervollständigen zu können. Mit steigender Gesamttemperatur wird dieser Teil des Entwicklungszyklus beschleunigt. Außerdem kommt es durch die verlängerten Zeitabschnitte mit Temperaturen über dem benötigten Schwellenwert zu einer längeren saisonalen Aktivität der Zwischenwirte.

Weiterhin verantwortlich für die globale Umstrukturierung der Endemiegebiete sind weltweite Handelstransporte, gestiegene Reiseaktivität der Bevölkerung, aber auch der Hunde, durch Ausstellungen, als Begleiter auf Reisen und Importe durch beispielsweise Tierschutzorganisationen oder zu Zuchtzwecken, sowie weitere sozioökonomische Faktoren (Krämer and Mencke, 2011).

In Bezug auf die Gesundheit der domestiziert gehaltenen Hunde ist es erforderlich, die Ausbreitung von Parasiten wie *Dirofilaren*, *Babesien* und *Leishmanien* zu überwachen, da anzunehmen ist, dass sie bereits in naher Zukunft gehäuft in bisher nicht endemischen Gebieten auftreten werden. Bei vielen der Erreger handelt es sich zudem um die Gesundheit des Menschen gefährdenden Zoonosen.

Mücken, welche positiv für beide *Dirofilariaspezies* getestet wurden, sind in den letzten Jahren bereits in Brandenburg gefunden worden und es wurden auch Ausbrüche von *D. repens* dokumentiert (Czajka et al., 2014; Sassnau et al., 2013). Die aufgrund dessen durchgeführten Überprüfungen von über 1000 Blutproben von Hunden in Brandenburg mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), konnten keinen Nachweis für autochthone Infektionen erbringen (Liesner et al., 2016). Außerdem liegen bisher nur wenige Informationen über die generelle Ausbreitung von Vektor-übertragene Krankheiten im Raum

Berlin/Brandenburg vor, was aber in Anbetracht der hohen Dichte von in diesem Gebiet lebenden Hunden und dem daraus resultierenden Infektionsdruck von großem Interesse ist. Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die aktuelle Prävalenz bestimmter Vektorübertragener Erreger, die Krankheiten wie die Leishmaniose, Babesiose, Dirofilariose, Angiostrongylose, Anaplasmose, Borreliose, Hepatozoonose sowie Ehrlichiose bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg zu untersuchen, mögliche autochthone Infektionen zu identifizieren, sowie das Infektionsrisiko besser einschätzen zu können.

## 2. Literatur

### 2.1. Verwendete Untersuchungsverfahren

Nachweisverfahren	Nachgewiesenes Agens
<u>Serologisch</u>	
Babesien-ELISA (Afosa)	spezifische IgG-Antikörper durch Vollzellantigen
Leishmanien-ELISA (Afosa)	spezifische IgG-Antikörper durch Vollzellantigen
Anaplasmen-ELISA (Afosa)	spezifische IgG-Antikörper durch Vollzellantigen
Leishmanien-ELISA (NovaTec)	spezifische Antikörper
Filarien-ELISA	spezifische Antikörper durch E/S Antigen
<i>A. vasorum</i> -Antigen-ELISA	spezifische Antikörper durch E/S Antigen
<i>A. vasorum</i> -Antikörper-ELISA	<i>A. vasorum</i> -Antigen
SNAP®4Dx®Plus <i>D. immitis</i>	zirkulierendes <i>D. immitis</i> -Antigen
<i>A. phagocytophilum</i> /	Antikörper, die an das p44 Peptid APH-4 binden
<i>A. platys</i>	
<i>B. burgdorferi</i>	Antikörper, die an das C <sub>6</sub> -Peptid binden
<i>E. canis</i> /	Antikörper, die an das rekombinante Analog
<i>E. ewingii</i>	wichtiger Membranproteine binden
Anaplasmen-IFAT (Megacor)	spezifische Antikörper durch fixiertes Vollzellantigen
Leishmanien-IFAT (Megacor)	spezifische Antikörper durch fixiertes Vollzellantigen
<u>Molekularbiologisch</u>	
Babesien-PCR	Fragment des 18S rRNA-Gen
Ehrlichien-PCR	Fragment des 16SrRNA-Gen
Anaplasmen-PCR	Fragment des 16SrRNA-Gen
Filarien-PCR	Fragment der ITS-1 Region
Hepatozoon-PCR	Fragment des 18S rRNA-Gen

Tabelle 1: verwendete Untersuchungsverfahren

### **2.1.1. Vor- und Nachteile von Untersuchungsverfahren in epidemiologischen Studien**

Bei der Auswahl eines Untersuchungsverfahrens zum Erregernachweis sind neben den Kosten und der Durchführbarkeit, die Verfügbarkeit des zu untersuchenden Materials sowie der Probenentnahmezeitpunkt und die Limitationen des Tests durch Sensitivität und Spezifität zu beachten.

Im Folgenden werde ich auf die Vor- und Nachteile von serologischen im Vergleich zu molekularbiologischen Methoden eingehen. Dass zwischen den mit verschiedenen Nachweismethoden ermittelten Prävalenzen große Unterschiede liegen können, ist bereits in vielen Studien gezeigt worden und sollte deshalb unbedingt immer bei der Einordnung der Prävalenz beachtet werden. So zeigten beispielsweise Studien über das Vorkommen von *A. phagocytophilum* bei Hunden in Deutschland deutliche Unterschiede zwischen der Seroprävalenz und dem Erregernachweis mittels PCR. Es wurde bei 111 der auf *A. phagocytophilum* untersuchten Hunde eine Seroprävalenz von 43,2 % ermittelt, währenddessen die mittels PCR Untersuchungen festgestellte nur bei 6,3 % lag (Jensen et al., 2007a). Auch in einer Studie an der 522 Hunde teilnahmen, konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die Seroprävalenz lag bei 43 %, dagegen konnten mittels der PCR nur bei 5,7 % der Hunde ein positives Ergebnis gezeigt werden (Kohn et al., 2011).

Dieser Unterschied kommt dadurch zu Stande, dass die direkte Nachweisbarkeit des Erregers zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion möglich ist (Granick et al., 2009), währenddessen Antikörper eher zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung gebildet werden (Chandrashekar et al., 2010; Eberts et al., 2011) und dann zum Teil über Monate bis zu einem Jahr persistieren können (Egenvall et al., 1997). Außerdem ziehen sich viele Erreger in bestimmte Organe zurück, weshalb die Erregerdichte tageszeitlich aber auch im Infektionsverlauf unterschiedlich sein kann und so nicht immer ausreichend DNA für ein positives PCR Ergebnis in der entnommenen Probe zu finden ist. Somit ist ein negatives PCR Ergebnis nur bedingt aussagekräftig, da damit eine Infektion nicht ausgeschlossen werden kann. Antikörper-basierte Tests sind häufig auch nach der Behandlung eine gewisse Zeit lang positiv, da zwar der Erreger im besten Fall eliminiert wurde, aber Antikörper weiter persistieren. Weiterhin sind serologische Tests oft nicht in der Lage geimpfte von ungeimpften, infizierten Tieren zu unterscheiden. Insgesamt liefern serologische Nachweisverfahren eine größere Bandbreite an Testergebnissen, die dann eingeschätzt werden müssen und wenn möglich in Zusammenhang mit der Klinik zu sehen sind. Schwierig macht dies das Vorkommen von Kreuzreaktionen. Im Falle einer PCR kann ein positives Ergebnis außerdem durch Sequenzierung überprüft und der Erreger belegt werden. Aber auch bei den serologischen Testverfahren existieren teils große Unterschiede zwischen den ermittelten Prävalenzergebnissen.

Dabei sind Schnelltests, wie der SNAP®4Dx®Plus von IDEXX, durch die Möglichkeit im Vergleich kostengünstig und schnell ein Ergebnis zu erhalten für die Praxis sehr attraktiv, wobei zu beachten ist, dass jeder serologische Test zum Nachweis eine Antigenpräparation verwendet, die variieren kann. So verwendet der SNAP-Test beispielsweise synthetische, hochspezifische Peptide aus den Oberflächenproteinen und kein Vollantigen wie viele andere ELISAs oder IFATs. Dadurch wurde versucht einen Test zu entwickeln der möglichst akute Infektionen nachweist und nicht durch lange Antikörperpersistenz oder Impfantikörper beeinflusst ist (Chandrashekar et al., 2010). Des Weiteren unterliegt der IFAT subjektiven Einflüssen durch den Durchführenden und seine Erfahrung, was eine Standardisierbarkeit erschwert. Dies ist beim ELISA besser möglich.

## **2.2. Vektor-übertragene Erkrankungen bei Hunden**

Zu den Vektor-übertragenen Erkrankungen gehören unter anderem die Anaplasmoose, Ehrlichiose, Babesiose, Borreliose, Dirofilariose, Leishmaniose, Bartonellose, Rickettsiose, sowie die Thelaziose (Baneth et al., 2012). Es handelt sich dabei um Erkrankungen, die durch Vektoren übertragene Viren, Bakterien und Parasiten ausgelöst werden, bei Tieren zu schweren, zum Teil lebensbedrohlichen Krankheitsverläufen führen können und oftmals auch eine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen. Aus diesem Grund sind aktuelle Untersuchungen über die Ausbreitung der Erreger und ihrer Vektoren, die Therapie- und Prophylaxemöglichkeiten, sowie die Aufklärung und Sensibilisierung, sowohl der Tierhalter als auch der Tierärzte, von großer Bedeutung (Baneth et al., 2012) und waren auch bereits in den letzten Jahren Gegenstand vieler Studien (Trotz-Williams and Trees, 2003).

### **2.2.1. Aktuelle Ausbreitung und Entwicklung**

In den letzten Jahren haben Vektor-übertragene Erkrankungen stark an Bedeutung zugenommen, wie verschiedene Autoren beschrieben haben (Beugnet and Chalvet-Monfray, 2013; Mencke, 2013; Schaffner et al., 2013; Semenza and Menne, 2009; Suk et al., 2014). Dies wird durch viele Faktoren begünstigt, so zum Beispiel durch den Klimawandel, das erhöhte Reise- und Handelsaufkommen, auch über größere Entfernungen, sowie die Renaturierung landwirtschaftlicher Nutzflächen und die dadurch begünstigte Vermehrung von Reservoirwirten (Semenza and Menne, 2009; Suk et al., 2014). Besonders wenn infizierte Vektoren und Wirte bei passenden klimatischen Bedingungen lokal und temporär aufeinandertreffen, steigt die Wahrscheinlichkeit der Ausbreitung rasch an. In solchen Fällen sind dann auch schnell humane Populationen bedroht (Savic et al., 2014).

Dieses Risiko wird oft unterschätzt. Allerdings ist an Situationen, wie 2009 in Griechenland, als die seit 1974 eliminierte Malaria wieder ausbrach und es zu mehreren humanen Erkrankungsfällen kam (Zeller et al., 2013), zu sehen, wie große Relevanz solche Erkrankungen immer wieder bekommen können. Weiterhin gilt der West-Nil-Virus als mögliche zoonotische Bedrohung, da hierzulande *Culex* und *Aedes* als endemisch angesehen werden (Becker et al., 2014). Ebenso werden immer wieder neue Vektoren auch in Deutschland zufällig importiert, wie die durch mehrere Autoren beschriebene asiatische Tigermücke *Aedes albopictus* (Becker et al., 2014; Semenza and Menne, 2009) und *Aedes japonicus* (Kampen et al., 2012; Werner and Kampen, 2013; Werner et al., 2012). Außerdem ist von einer möglichen Expansion (Suk and Semenza, 2014) und einer dadurch gestiegenen Bedrohung durch Erkrankungen, wie dem Dengue-Fieber und Chikungunya die Rede, da bereits 2004 nachgewiesen werden konnte, dass *Ae. albopictus* Überträger dieser Pathogene ist (Gratz, 2004). Auch für *Ae. japonicus* konnte diese Erkenntnis einige Jahre später gewonnen werden (Schaffner et al., 2011).

Bei meinen Untersuchungen handelt es sich um eine Folgestudie eines bereits beendeten Projekts. In diesem wurden ebenfalls Hunde in Brandenburg auf das Vorkommen von Erregern wie Dirofilarien, Babesien, Anaplasmen und Ehrlichien untersucht, allerdings mit molekularbiologischen Methoden (Liesner et al., 2016). Dabei wurden insgesamt 1023 Hundebloodproben, sowie einige Fuchsblut- und Fuchsmilzproben in die Studie einbezogen. Es wurden insgesamt sechs Hunde positiv auf Filarien getestet, wobei es sich bei zweien um *D. repens* und bei zwei weiteren um *D. immitis* handelte. Außerdem wurde in 15 von 1023 Hunden ein Vorhandensein von *A. phagocytophilum* festgestellt. Weiterhin konnte in einer Probe *E. canis* nachgewiesen werden. Diese Probe wies ebenfalls eine Infektion mit *D. repens* auf. Ebenfalls eine Probe wurde positiv auf *B. canis* getestet. Insgesamt konnte kein endemisches Vorkommen von Dirofilarien bei Hunden oder Füchsen in Brandenburg bestätigt werden (Liesner et al., 2016). Die Gefahr ist trotzdem als hoch einzustufen, da die Erreger immer wieder in Hunden aus dieser Region nachgewiesen wurden.

So gab es in Deutschland bereits 2004 den ersten autochthonen *D. repens* Fall bei einem Hund in Baden-Württemberg (Hermosilla et al., 2006). Außerdem berichtete Reinhold Sassnau 2009 sowie 2012 von autochthonem Vorkommen in einem Schlittenhundrudel in Brandenburg (Sassnau et al., 2009; Sassnau et al., 2013). In einer daraufhin 2009 durchgeführten Studie im Havelland in Brandenburg konnte in keiner der 122 genommenen Fuchsblutproben das Vorhandensein von *D. repens* DNA nachweisen werden (Härtwig et al., 2016). Einige Jahre später konnte jedoch sowohl das Vorkommen von *D. immitis* als auch von *D. repens* in einheimischen Mückenpopulationen in einer deutschlandweiten Studie 2014 (Czajka et al.) und in einer in Brandenburg 2013 von Sassnau et. al. (2014a) durchgeführten Studie belegt werden. In Deutschland spielen als Vektoren vor allem die Gattungen *Aedes*,

*Culex* und *Anopheles* eine Rolle, in welchen bereits zwischen 2011 und 2013 von Becker et al. (2014) die DNA von *D. repens* nachgewiesen wurde. Obwohl damit ein möglicher Hinweis für das endemische Vorkommen dieser beiden Dirofilarienarten erbracht worden ist, sind in Studien bisher eher geringe Prävalenzen festgestellt worden.

Auch Babesien sind in Deutschland in verschiedenen Regionen nachgewiesen worden, wie 2014 durch Schreiber et al. und ebenso 2016 durch Liesner et al. in Brandenburg (Liesner et al., 2016; Schreiber et al., 2014). Die Seroprävalenz bei Reise- und Importhunden aus Deutschland lag laut einer Studie von 2011 bei 4,9 % für *B. canis* (Hamel et al., 2011). Ebenso wird von autochthonen Fällen berichtet, wie 2005 in Norddeutschland (Jensen and Nolte, 2005) und im Saarland, sowie in Oberbayern (Naucke, 2008). Außerdem wurden zwischen April und Juni 2015 vier weitere Fälle in Zusammenarbeit der Klinik für kleine Haustiere mit dem parasitologischen Institut der FU Berlin beschrieben. Dabei handelte es sich um Hunde, die mit typischen Symptomen und Laborveränderungen in der Klinik für kleine Haustiere vorgestellt wurden und bis auf einen, der 8 Monate zuvor in Polen war, den Norden Deutschlands nicht verlassen hatten. Nachgewiesen wurde die Babesieninfektion im Blutaussstrich und sie wurde mittels PCR bestätigt (Krücken et al., 2016).

Ebenfalls die Ausbreitung des Vektors *Dermacentor reticulatus* in bestimmten, vor allem südlichen, Regionen Deutschlands und Europas (Rubel et al., 2016) sowie das Vorkommen von *Ixodes ricinus* in Deutschland sind durch Studien von Rubel et al. (2014) belegt. Auch in Berlin/ Brandenburg konnte sie bereits in relativ hoher Dichte nachgewiesen werden (Kohn et al., 2019).

Die Prävalenz von *A. phagocytophilum* in Zecken im Raum Berlin/ Brandenburg wurde von Schreiber et al. (2014) mittels PCR untersucht. In weiteren Studien, zum Beispiel von Jensen et al. (2007a) und Kohn et al. (2011) wurde ein deutlicher Unterschied gezeigt zwischen der Seroprävalenz, welche um 43 % lag, und der mit PCR festgestellten von 5,7 % bzw. 6,3 %.

Des Weiteren existieren Studien über das Vorkommen des Vektors der Leishmaniose, die beweisen, dass sich das Endemiegebiet erweitert. Zum Beispiel Richtung Frankreich (Peyrefitte et al., 2013), dem nördlichen Österreich, Belgien und den Niederlanden (Poepl et al., 2013). Als endemisch kann aber bisher nur das Gebiet bis in die nördlichen Alpen angesehen werden. Auch in Deutschland wurden bereits einige Funde gemacht, allerdings bisher nur vereinzelt. Aufgrund der klimatischen Bedingungen wäre ein Vorkommen entlang des Rheingraben bis Köln denkbar, denn es wurde herausgefunden, dass Phlebotomen ab einer Jahresisotherme von 10 °C dauerhaft überleben können. Dies ist in Deutschland nur dort gegeben (Steinhausen, 2005).

In den letzten Jahren gab es immer mehr Untersuchungen in Deutschland, welche im Ergebnis einen deutlichen Anstieg der diagnostizierten Leishmanioseinfektionen (Kaszak et al., 2015; Mencke, 2013), darunter auch immer wieder autochthone Infektionen (Kellermeier

et al., 2007; Naucke and Lorentz, 2012), zeigten.

Auch im Falle von *H. canis* ist eine Ausbreitung in nördlichere Gebiete zu erkennen. So konnten drei importierte Fälle in Großbritannien durch PCR und Blutausschrieb nachgewiesen werden (Attipa et al., 2018a). In der Tschechischen Republik konnten autochthone Infektionen bei Hunden festgestellt werden, nachdem diese engen Kontakt zu Füchsen bei einer Fuchsjagd hatten (Mitkova et al., 2016). Des Weiteren wurde 2014 vom ersten Fall von caniner Hepatozoonose in Deutschland berichtet (Najm et al., 2014b).

Diese Beispiele zeigen die Wichtigkeit weiterer Untersuchungen, die der Beobachtung von Vorkommen, der Ausbreitung und Übertragungswegen dienen, sowohl von Krankheitsfällen, als auch der Verbreitung der notwendigen Vektoren. Weiterhin ist der Entwicklung von Bekämpfungsstrategien größere Aufmerksamkeit zu widmen, was bereits mit der Aufklärung über die aktuelle epidemiologische Lage und die Prophylaxemöglichkeiten beginnt (Baneth et al., 2012).

Diese Arbeit soll sich auf solche Vektor-übertragenen Erreger fokussieren, welche im Raum Berlin/Brandenburg von Bedeutung sind bzw. bei denen es Hinweise gibt, dass ihr Vorkommen von hoher Relevanz wäre. Diese sind in einer anschließenden Tabelle ausgeführt und werden in der Literaturübersicht erläutert.

### 2.3. Untersuchte Erreger

Vektor	Pathogen
Schildzecken (Ixodidae)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
	<i>Anaplasma platys</i>
	<i>Babesia canis canis</i>
	<i>Babesia canis vogeli</i>
	<i>Babesia canis rossi</i>
	<i>Babesia gibsoni</i>
	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>
	<i>Ehrlichia canis</i>
	<i>Ehrlichia ewingii</i>
	<i>Hepatozoon canis</i>
Stechmücken (Culicidae)	<i>Dirofilaria repens</i>
	<i>Dirofilaria immitis</i>
Sandmücken (Phlebotomus)	<i>Leishmania infantum</i>
Schnecken (Pulmonata)	<i>Angiostrongylus vasorum</i>

Tabelle 2: Untersuchte Erreger

### 2.3.1. Leishmanien

#### 2.3.1.1. Taxonomie und Morphologie

Leishmanien zählen zur Ordnung der Kinetoplastida und darin zur Familie der Trypanosomatidae (Garnham, 1971). *Leishmania* spp. wird in drei Subgenera unterteilt: *Leishmania*, *Vianna* und *Sauroleishmania*. Weiterhin wird innerhalb des Subgenus *Leishmania* in die Erreger viszeraler Erkrankungen, *Leishmania infantum* und *Leishmania donovani*, sowie die cutanen Spezies der Alten Welt, *Leishmania tropica*, *Leishmania major* und *Leishmania aethiopica*, und der Neuen Welt, *Leishmania mexicana* und *Leishmania amazonensis*, unterschieden (Bates, 2007). Die beim Hund in europäischen Endemiegebieten anzutreffende Spezies ist *L. infantum* (Tyzzer and Walker, 1919). Selten kann auch eine Infektion mit *L. tropica* (Christodoulou et al., 2012) oder *L. donovani* (Antoniou et al., 2008) festgestellt werden. Dagegen ist *Leishmania chagasi* in Südamerika der Erreger der Hundeleishmaniose. Die genetischen Unterschiede sind allerdings nur gering und häufig wird *Leishmania chagasi* als Synonym von *L. infantum* betrachtet. Insgesamt ist es morphologisch nicht möglich die *Leishmania*-Arten zu differenzieren. Sie werden auf Grund biologischer, immunologischer sowie biochemischer Merkmale unterschieden.

Leishmanien sind charakterisiert durch ein stumpfes Hinterende und einen kleinen Kinetoplasten, der subterminal gelegen ist. Sie sind ca. 10-20 µm lang und liegen im Vektor in der promastigoten, der begeißelten Form, sowie innerhalb des Wirbeltieres in der amastigoten, unbegeißelten Form, vor (Jacobson, 2003). Die Geißel ist kurz und überragt die Zelloberfläche nicht. In der amastigoten Form sind die Leishmanien rundoval und enthalten einen großen Kern (Garnham, 1971).

#### 2.3.1.2. Wirtsspektrum

*Leishmania* spp. infizieren eine Vielzahl von Säugetieren. *Leishmania infantum* ist vorrangig in domestizierten, aber auch in Wildcaniden (Criado-Fornelio et al., 2000; Karayiannis et al., 2015; Sastre et al., 2008) zu finden. Weiterhin konnte ein Vorkommen in Katzen (Maroli et al., 2007), Hasenartigen (Molina et al., 2012), Nagern (Tsakmakidis et al., 2017), Beuteltieren (Montoya et al., 2016), Primaten (Malta et al., 2010) und Equiden (Fernández-Bellón et al., 2006) nachgewiesen werden.

#### 2.3.1.3. Entwicklungszyklus und Übertragungswege

Die Phlebotomenweibchen können bei der Blutmahlzeit, die sie vor der Eiablage benötigen, an einem infizierten Wirt die amastigoten Stadien aufnehmen, welche sich in Makrophagen und Monozyten befinden. Im Mitteldarm der Phlebotomen wandeln sich die amastigoten in

promastigote Zellen um. Durch Zweiteilungen vermehren sich diese und besiedeln zum Teil in freier und zum Teil in an die Darmwand gebundener Form den Vektor (Deplazes et al., 2012a). Der sich zum metazyklischen, promastigoten Stadium entwickelnde Teil wird durch den Saugrüssel der Mücke beim nächsten Stich in die Haut des Wirtes injiziert (Bates, 2007). Die promastigoten Leishmanien binden Oponine, durch welche sie an Rezeptoren des Mononukleäres Phagozyten-System (MPS) andocken können. Auf diesem Weg gelangt der Erreger über ein Phagosom in ein Phagolysosom, wo sich die amastigote Form entwickelt und wiederum durch asexuelle Zweiteilung vermehrt. In dieser intrazellulären Lage im Phagolysosom sind Leishmanien durch Mechanismen der Zellumprogrammierung vor den eigentlich dort stattfindenden Immunabwehr geschützt (Barbieri, 2006). Beim Zerfall der Zelle werden die amastigoten Stadien frei und können so weitere Makrophagen infizieren (Bates, 2007).

Neben dem Stich von Phlebotomen stellen Kontaktinfektionen zwischen Hunden durch Wunden oder Bisse (Naucke et al., 2016), pränatale Infektionen (Naucke and Lorentz, 2012; Naucke and Lorentz, 2013), sowie mechanische Übertragung, wie die iatrogene und solche durch Bluttransfusionen (de Freitas et al., 2006; Owens et al., 2001) weitere Transmissionswege dar. Weiterhin wurde von zwei möglicherweise autochthon infizierten Golden Retrievern berichtet, welche untereinander sexuellen Kontakt hatten, sowie mit einem Hund, welcher einen Auslandsaufenthalt in Spanien als Reisevorgeschichte hatte (Kellermeier et al., 2007). Sexuelle und transplazentare Übertragung von Leishmanien wurde bereits bei Mäusen (Rosypal and Lindsay, 2005), Menschen (Pagliano et al., 2005; Symmers, 1960) und Hunden (Naucke and Lorentz, 2012; Rosypal et al., 2005; Silva et al., 2009) gezeigt. Genitale Läsionen im Zusammenhang mit Leishmaniose sind bei Hunden gut dokumentiert (Junior et al., 2017; Silva et al., 2008). Des Weiteren konnte *Leishmania* spp. immer wieder in Proben von Totgeburten oder Neugeborenen von symptomatisch oder asymptomatisch natürlich infizierten Hündinnen nachgewiesen werden, die mit nekrotisierender Plazentitis und Abort oder mikroskopischen Veränderungen in der Plazenta assoziiert sind (Dubey et al., 2005; Masucci et al., 2003). Insgesamt unterstützen diese Studien die Vorstellung, dass die canine Leishmaniose vertikal übertragen wird. Auch stehen andere blutsaugende Arthropoden, wie Zecken oder Flöhe im Verdacht Leishmanien zu übertragen (Oliveira et al., 2015). Es gibt bisher keine endgültigen Aussagen über die Rolle dieser Ektoparasiten im Übertragungszyklus der Leishmaniose (Baneth, 2014).

#### 2.3.1.4. Diagnostik

Aufgrund der zum Teil unspezifischen klinischen Symptome und der langen Inkubationszeit kann sich die Diagnostik im Fall der Leishmaniose schwierig gestalten. Obwohl sich Antikörper erst einige Wochen nach der Infektion bilden, werden zumeist serologische

Testverfahren, wie ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) oder Westernblot verwendet, welche die Anti-Leishmanien-Antikörper im Serum messen. Diese Tests sind, aufgrund der langen Inkubationszeit, bereits oft vor dem Eintreten klinischer Erscheinungen positiv, so dass ein Hund mit Symptomen und positivem Testergebnis sehr sicher an einer Leishmaniose erkrankt ist (Oliva et al., 2006). Allerdings kann es immer wieder auch zu falsch positiven Ergebnissen kommen (Wolf et al., 2014). So ist es beispielsweise nicht möglich mit serologischen Testverfahren geimpfte von infizierten Tieren zu unterscheiden. Außerdem kann es zu Kreuzreaktionen mit Trypanosomen oder anderen Hämoparasiten kommen (de Castro Ferreira et al., 2007; Krawczak Fda et al., 2015; Porrozzi et al., 2007). Insgesamt konnte festgestellt werden, dass der IFAT vor allem in asymptomatischen Fällen unspezifischer ist als der ELISA. Außerdem scheinen sich ELISA mit löslichen promastigoten oder amastigoten Antigenen am besten für die serologische Diagnostik zu eignen (Mettler et al., 2005).

Weiterhin wurden verschiedene immunochromatografische Assays als Schnelltests entwickelt, welche in der Regel rekombinante Proteine der Leishmanien enthalten (Fraga et al., 2016).

Außerdem gibt es Untersuchungen, die die Konzentration von Akute-Phase Proteinen (APP) zur Einschätzung der klinischen Situation zu nutzen versuchen. Es wurde in diesem Zusammenhang eine Einteilung der erkrankten Hunde in drei Gruppen vorgeschlagen, wobei Gruppe 1 die Hunde ohne klinische Symptome und APP-Werte im Referenzbereich enthielt, Gruppe 2 solche, die keine klinischen Anzeichen, aber leicht erhöhte APP-Werte zeigten und Gruppe 3 die Hunde, welche klinische Symptome und leicht bis stark erhöhte APP-Werte aufwiesen (Ceron et al., 2018). Damit könnte eine Überwachung der klinischen Entwicklung von asymptomatischen Hunden oder welchen mit fraglichem serologischen Testergebnis möglich sein.

Eine andere Studie untersuchte den Anstieg des spezifischen Anti-*Phlebotomus perniciosus* IgG2 in natürlich und experimentell durch *Phlebotomus perniciosus* infizierten Hunden. Eine Messung mittels ELISA könnte als Risikomarker nützlich zu sein, denn es konnte eine negative Korrelation zwischen der caninen Antikörperreaktion auf Phlebotomenstiche und dem Risiko der Leishmanienübertragung nachgewiesen werden (Vlkova et al., 2011).

Allerdings sind auch molekularbiologische oder histopathologische sowie zytologische Nachweise mögliche Verfahren, wobei sich vor allem Proben aus lymphatischen Organen zur Diagnostik eignen (Nunes et al., 2018; Solano-Gallego et al., 2009).

Die PCR und qPCR stellen sehr sensitive und spezifische Methoden des Nachweises dar. Bei Verwendung einer nested PCR konnte eine hohe Sensitivität selbst bei asymptomatischen Hunden erzielt werden (Albuquerque et al., 2017). Es werden vorrangig periphere Blutproben, Knochenmarksaspirate, sowie Lymphknoten- und Hautbiopsien

verwendet (Silva et al., 2017). Aber auch Konjunktivalabstriche können mittels PCR analysiert werden und es ist dabei möglich, eine Sensitivität von bis zu 78,4 % und eine Spezifität von bis zu 93,8 % zu erreichen (Geisweid et al., 2013).

Die entstehende granulomatöse Entzündungsreaktion ist, zusammen mit den amastigoten Stadien der Leishmanien in den Makrophagen, histopathologisch zu erkennen (Baneth et al., 2008) und stellt einen eindeutigen Erregernachweis dar. Eine Hautbiopsie oder Aspirationsbiopsie aus Lymphknoten, Knochenmark oder Milz können als gefärbte Ausstriche analysiert werden (Tafari et al., 2001). Dabei erzielen Milzaspirate das beste Ergebnis (Barrouin-Melo et al., 2004).

Auch Abstriche sind möglich, werden aber in der kurativen Praxis seltener angewendet. Die Sensitivität des Knochenmarkabstrichs beträgt etwa 60-85 % und bei einem Lymphknotenabstrich 30-40 % (Sundar and Rai, 2002).

#### 2.3.1.5. Verbreitung

Die canine Leishmaniose ist in über 70 Ländern weltweit endemisch (Moreno and Alvar, 2002). *Leishmania infantum* kommt bereits seit längerem im Nahen Osten und in Gebieten in Asien, Afrika und Süd- und Zentralamerika vor (Baneth et al., 2008), sowie in den Tropen und Subtropen (Naucke and Lorentz, 2012). Auch in Europa konnten, vor allem in der Mittelmeerregion, verschiedene Endemieherde lokalisiert werden, welche sich in immer nördlichere Regionen ausdehnen.

Beispielsweise galt der Norden Italiens 1983 noch als Leishmaniose-frei. Im Laufe der 90er Jahre etablierten sich Herde in verschiedenen Gegenden, wie der Toskana, Umbrien und den Abruzzen. Mit Hilfe von „LeishMap“ konnten 2003 auch in den Regionen Lombardei und Südtirol neue Herde gefunden werden. Ebenso konnte eine Ausweitung der bereits bestehenden endemischen Gebiete gezeigt werden (Capelli et al., 2004; Maroli et al., 2008). Diese Ausbreitung in Richtung Norden wurde auch in Frankreich (Chamaillé et al., 2010; Kasbari et al., 2012) und Spanien (Amusatogui et al., 2004) nachgewiesen. Eine Umfrage in Frankreich, Griechenland, Spanien, Italien und Portugal 2014 zeigte, dass die Prävalenz sehr unterschiedlich ist. So wurden in Frankreich 0,71 %, in Portugal 3,71 % und in Griechenland 7,80 % ermittelt (Mattin et al., 2014). Eine andere Veröffentlichung berichtet von einer Prävalenz von 9,1 % bei Hunden in Portugal, welche mit serologischen Methoden untersucht wurden (Menn et al., 2010). Auf Mallorca wurden 100 Hunde mittels Serologie sowie PCR aus Konjunktivalabstrich, Haut- und Knochenmarksproben untersucht und eine Gesamtprävalenz von 67 % festgestellt (Solano-Gallego et al., 2001). Mittels PCR konnte in Barcelona eine Prävalenz von 29,4 % bei der Untersuchung von 153 Hunden ermittelt werden (Tabar et al., 2009).

In Deutschland zeigten serologische Untersuchungen (IFAT) bei Hunden mit Reisevorgeschichte eine Prävalenz von 3,6 % (Hamel et al., 2011) bzw. 12,2 % (Menn et al., 2010). Eine weitere mittels IFAT durchgeführte Studie bei Hunden, die eine Reiseanamnese aufwiesen, ergab eine Prävalenz von 17,7 % (Hirsch and Pantchev, 2008). Retrospektiv wurden Ergebnisse von Untersuchungen auf Leishmanien bei Hunden in Deutschland mit Reisehintergrund zwischen 2004 und 2008 analysiert und dabei mit serologischen Verfahren eine Prävalenz von 9,6 % und mit PCR von 14,9 % ermittelt (Röhrig et al., 2011).

Studien über das Vorkommen der Phlebotomen zeigen, dass der Vektor auch in weiten Gebieten Europas nördlich der Endemiegrenze der Leishmaniose vorkommt, wenn auch nur in geringen Populationsdichten. So gab es Funde in der Südschweiz (Knechtli and Jenni, 1989), im Norden Österreichs (Poepl et al., 2013) und Frankreichs (Lewis, 1982; Peyrefitte et al., 2013), sowie in den Niederlanden (Teske et al., 2002). Auch in Deutschland wurden bereits vereinzelt Phlebotomen in Rheinland-Pfalz (Naucke and Schmitt, 2004) und Baden-Württemberg (Naucke and Pesson, 2000) gefangen, wobei es sich teilweise auch um zufällig importierte Individuen handeln könnte. Als endemisch kann bisher nur das Gebiet bis in die nördlichen Alpen angesehen werden. So konnten in einer Studie 2013 keine endemischen Herde im Süden Deutschlands gefunden werden (Haeberlein et al., 2013). Allerdings ist auch belegt, dass aufgrund der klimatischen Bedingungen ein Vorkommen entlang des Rheingraben bis Köln denkbar wäre, da ermittelt wurde, dass Phlebotomen ab einer Isotherme von 10 °C dauerhaft überleben können. Diese Bedingung wäre in Deutschland bis jetzt nur dort gegeben (Steinhausen, 2005). Trotzdem gibt es immer wieder Berichte von autochthonen Infektionen, wie zum Beispiel in Brandenburg 2007 bei zwei Golden Retrievern (Kellermeier et al., 2007). Auch in den Nachbarländern Deutschlands kommt es vereinzelt zu autochthonem Vorkommen, wie bereits 1997 in den Niederlanden beschrieben (Díaz-Espiñeira and Slappendel, 1997).

#### 2.3.1.6. Klinik

Die Intensität der klinischen Symptome hängt von verschiedenen Faktoren der Infektion ab, vor allem aber vom Immunstatus des Hundes. So sind manche Hunde in der Lage den Ausbruch der Leishmaniose über Jahre zu kontrollieren und sogar eine spontane Heilung zu entwickeln (Koutinas and Koutinas, 2014). Insgesamt sind die klinischen Erscheinungen sehr variabel, da es sich um eine häufig chronisch verlaufende Erkrankung handelt, an der viele Organe beteiligt sein können (Solano-Gallego et al., 2011). Es wird davon ausgegangen, dass ungefähr 50 % aller betroffenen Hunde keine Symptome zeigen (Mancianti et al., 1988).

Man unterscheidet die viszerale und die cutane Form der Leishmanieninfektion. Bei der caninen Leishmaniose sind die ersten Symptome häufig Müdigkeit und ausgeprägte,

generalisierte Lymphknotenschwellung (Lima et al., 2004). Des Weiteren kommt es bei den meisten Hunden zu Hautveränderungen wie Alopezie, exfoliativer Dermatitis und Schuppenbildung (Manzillo et al., 2013). Diese entstehen aber erst, wenn sich die Parasiten bereits im Körper ausgebreitet haben und so sind meist auch viszerale Symptome zu bemerken (Ferrer et al., 1988). Dazu zählen Leistungsschwäche, Fieber, Muskelatrophie, Augenveränderungen, wie Keratokonjunktivitis und Uveitis oder auch Anorexie (Ciaramella et al., 1997). Ebenfalls wird Nasenbluten als Folge der Thrombozytopenie und verminderter Thrombozytenfunktion beobachtet. Des Weiteren sind Nierenversagen und Proteinurie aufgrund einer Glomerulonephritis durch die bei der humoralen Immunantwort gebildeten Antikörper-Komplexablagerungen typisch und häufig Todesursache (de Oliveira Frazillio et al., 2018). Diese Antikörper-Komplexe lagern sich auch in anderen inneren Organen ab und führen dort zu Entzündungsreaktionen mit Folgen wie Vaskulitiden, Lahmheit oder neurologischen Symptomen (Giannuzzi et al., 2017).

Zu den häufigen Laborwertveränderungen zählen Hyperproteinämie mit Hyperglobulinämie und Hypoalbuminämie. Weiterhin sind oft eine milde Anämie und Leukopenie zu beobachten.

#### 2.3.1.7. Therapie

Behandlungen gegen Leishmaniose können die klinischen Symptome mildern, das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen und die Parasitämie deutlich senken. Allerdings gibt es keine Heilung, da es nicht möglich ist den Erreger aus dem Körper zu eliminieren (Alvar et al., 1994). Trotzdem ist auch die Behandlung von asymptomatisch Hunden aufgrund eines möglichen akuten Ausbruchs bei Immunsuppression auf jeden Fall zu empfehlen (Miro and Lopez-Velez, 2018).

Derzeit sind einige Medikamente für die Behandlung von Leishmaniose beim Hund zugelassen, wie zum Beispiel das leishmanistatische Allopurinol (Gothe et al., 1997), ein Purin-Analogen, welches zum Teil über Jahre per os (p.o.) verabreicht wird. Als Nebenwirkung treten vor allem Urolithiasis auf (Oliva et al., 2010) und es konnten mittlerweile Resistenzen von *L. infantum* Populationen nachgewiesen werden (Yasur-Landau et al., 2018). Ebenso ist eine Kombination mit Antimonpräparaten, wie dem leishmaniziden N-Methylglucamin, als Therapie möglich (Moritz et al., 1998). Weiterhin existiert ein Wirkstoff mit leishmanizider Wirkung, welcher auch in der Onkologie eingesetzt wird, das Miltefosin (Manna et al., 2008). Dieser Wirkstoff wird über den Kot ausgeschieden und eignet sich so auch bei chronischer Niereninsuffizienz in gleichbleibender Dosierung, von 2 mg/kg Körpergewicht täglich über 28 Tage (Solano-Gallego et al., 2009). Milteforan® ist nicht in Deutschland zugelassen, kann aber über internationale Apotheken bestellt werden. Probleme mit dem Verdauungstrakt sind die häufigste Nebenwirkung (Manna et al., 2008). Auch hierbei ist eine Kombination mit Allopurinol möglich. Als weiteres Medikament steht Amphotericin B zur Verfügung, was wegen seiner Nephrotoxizität aber seltener Anwendung

findet (Oliva et al., 2010). Aufgrund der Bedeutsamkeit der Leishmaniose und der Nebenwirkungen der bisher entwickelten Medikamente wird an neuen Formulierungen geforscht. So ist beispielsweise Furazolidon schon länger für seine leishmanizide Wirkung bekannt. Allerdings sind die toxischen Nebenwirkungen umfangreich. Deshalb wurde versucht die Löslichkeit zu erhöhen, indem Komplexe zwischen Furazolidon und Beta-Cyclodextrin gebildet wurden. Dadurch konnten die Nebenwirkungen bei weiterhin vorhandener Wirksamkeit reduziert werden (Carvalho et al., 2018).

Neben leishmaniziden Wirkstoffen werden Immunmodulatoren wie Domperidon, ein gastrointestinales Prokinetikum und Prolaktinstimulator, eingesetzt, um eine zelluläre Immunantwort auszulösen (Gómez-Ochoa et al., 2012; Sabaté et al., 2014). Ebenso wurde berichtet, dass die Verabreichung bestimmter Nukleotide in Kombination mit den leishmaniziden Mitteln zu einer guten klinischen Besserung führt (Segarra et al., 2017). Außerdem sollte auf eine purinarme Ernährung geachtet werden, entsprechende Futtermittel sind mittlerweile kommerziell erhältlich.

Weiterhin fand man heraus, dass das Impfen von Leishmanien-positiven Hunden zu einer Reduktion der Symptome und in diesem Zusammenhang zu einer verminderten Mortalität führen kann. In einer Untersuchung wurde dazu eine doppelblinde, blockrandomisierte, placebokontrollierte Impfstoff-Immuntherapie-Studie durchgeführt, in der die Wirksamkeit eines rekombinanten Leishmania A2-Proteins, saponinadjuvantierten Impfstoffs (LeishTec®) überprüft wurde (Toepp et al., 2018). Eine andere Studie zeigte die Wirksamkeit eines Impfstoffes bestehend aus Gesamtantigenen von *L. amazonensis* und Saponin, der in der Lage war hämatologische und biochemische Parameter zu erhalten, den klinischen Status zu verbessern, den Serumspiegel von IgG zu senken, eine lymphoproliferative Kapazität gegen lösliche Antigene von *L. infantum* zu induzieren und deutlich die Parasitenbelastung zu senken. Es konnte jedoch keine Elimination der Infektion erreicht werden (Viana et al., 2018).

Ungefähr 90 % der Hunde erreichen eine klinische Heilung und Normalisierung der Laborwerte durch Gabe der beschriebenen Chemotherapien nach einigen Monaten. Rezidive sind noch bis ca. 2 Jahre nach Absetzen der Medikamente möglich. Aus diesem Grund sollten die Hunde engmaschig klinisch überwacht werden. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach der Diagnosestellung beträgt 6 Jahre (Solano-Gallego et al., 2011).

#### 2.3.1.8. Prophylaxe

Da es sich bei der Leishmaniose um eine nicht heilbare, lebensbedrohliche und zoonotische Erkrankung handelt, sollte der Prävention besondere Bedeutung beigemessen werden. So sind einige Präparate mit Repellenteffekt gegen Sandmücken erhältlich, welche, wenn sich der Hund in Endemiegebieten aufhält, unbedingt angewendet werden sollten. Diese sind als

Halsbänder und Spot-on Präparate erhältlich und enthalten Wirkstoffe, wie zum Beispiel Deltamethrin oder Permethrin. Bei den Spot-on Präparaten muss darauf geachtet werden, dass der Hund bei häufigem Nasswerden öfter behandelt wird. Außerdem konnte in einer Untersuchung 2004 gezeigt werden, dass selbst bei korrekter Anwendung kein topisches Präparat einen vollständigen Schutz vor Stichen durch die Sandmücken darstellen konnte (Alvar et al., 2004). So konnte in einer Untersuchung über den Effekt eines Präparates aus 10 % Imidacloprid und 50 % Permethrin nachgewiesen werden, dass die repellierende Wirksamkeit am ersten Tag bei 94,6 % und die insektizide Wirkung bei 60,0 % lag. Am 29. Tag der Untersuchung lag die repellierende Wirksamkeit nur noch bei 55,9 % und die insektizide Wirkung bei 29,3 % (Mencke et al., 2003). Eine weitere Studie mit dem gleichen Präparat, allerdings unter Feldbedingungen in Süditalien getestet, ergab eine protektive Wirksamkeit 88,9 % bis 100 % in den jeweiligen Versuchsgruppen (Otranto et al., 2007).

Weiterhin bieten Insektengitter an den Fenstern und Türen einen gewissen Schutz in den Räumlichkeiten. Auch sollte darauf geachtet werden, dass die Brutplätze der Phlebotomen gemieden werden und sich der Aufenthalt der Hunde im Freien auf die Zeit ungefähr eine Stunde nach Sonnenaufgang bis eine Stunde vor Sonnenuntergang beschränkt (Martín-Sánchez et al., 2009), da vor allem während der Risikosaison Mai bis November in südeuropäischen Endemiegebieten die weiblichen Phlebotomen im restlichen Zeitraum am aktivsten sind.

Des Weiteren existieren drei für die Veterinärmedizin zugelassene Impfstoffe, die eine Schutzwirkung von mindestens 12 Monaten haben. Allerdings bieten sie keinen Schutz vor den Phlebotomenstichen, sondern sollen das Risiko einer aktiven Infektion und einer klinischen Erkrankung nach Kontakt mit *L. infantum* verringern. Deshalb sollte auf die anderen genannten Präventionsmaßnahmen nicht verzichtet werden. Es wurden verschiedene Impfstoffvarianten getestet, wobei diese auf Basis rekombinanter Antigene oder deren Ausscheidungs-Sekretionsprodukten die besten Ergebnisse erzielten (Moreno et al., 2014; Oliva et al., 2014). Als wirksame Bestandteile enthält der Impfstoff CaniLeish® von Leishmanien exkretierte und sekretierte Proteine (ESP) sowie ein Adjuvans. Die ESP enthalten sowohl Oberflächenproteine als auch intrazelluläre Eiweiße und werden aus der promastigoten und der amastigoten Form der Leishmanien gewonnen. Das Adjuvanz stellt ebenfalls einen wirksamen Bestandteil dar und spricht vor allem die zelluläre Immunabwehr der Hunde an, was bei Erregern, die intrazellulär vorkommen, wie den Leishmanien, besonders wichtig ist (Anonym, 2012). Weiterhin sind als Anti-Leishmanien Impfstoffe ein rekombinantes Einzelprotein-Antigen und ein rekombinantes Polypeptid-Antigen erhältlich. Die Wirksamkeit dieser kommerziell erhältlichen Impfstoffe ist allerdings eingeschränkt und liegt zwischen 68,4 und 80 % (Fernandes et al., 2014; Oliva et al., 2014; Palatnik-de-Sousa, 2008; Regina-Silva et al., 2016).

In einigen Ländern, wie beispielsweise Brasilien, werden nachweislich infizierte Hunde euthanasiert, um die Inzidenz bei Hunden und Menschen zu senken. Eine Studie, die durchgeführt wurde, um die Wirksamkeit dieser Maßnahme zu überprüfen, fand heraus, dass es vor allem in den ersten beiden Jahren zu einer sinkenden Zahl der Neuerkrankungen bei Hunden von 36 auf 6 % kam. Auch bei den menschlichen Krankheitsfällen konnte ein signifikanter Rückgang vermerkt werden. Insgesamt konnte keine Elimination der Erkrankung erreicht werden, allerdings eine deutliche Reduzierung der klinischen Fälle (Ashford et al., 1998). Trotzdem sollte die ethische Vertretbarkeit dieser Maßnahme überdacht werden. Eine weitere Studie in Brasilien untersuchte die Auswirkung der Anwendung von Deltamethrin-imprägnierten Hundehalsbändern (Scalibor®) und konnte eine Reduzierung der Prävalenz um 53-59 % feststellen (Kazimoto et al., 2018). Dies zeigt, dass auch die Unterbrechung des Infektionskreislaufes als Präventionsmaßnahme von großer Bedeutung ist. Denn es ist, wie bereits erwähnt, nicht möglich eine Eliminierung des Erregers trotz therapeutischer Maßnahmen zu erreichen und so kann es zu immer neuen Infektionen der Vektoren kommen (Baneth and Shaw, 2002). Deshalb sollten infizierte Hunde zusätzlich mit insektiziden Medikamenten behandelt werden, um eine Weiterverbreitung zu verhindern (Ribeiro et al., 2018). Gleiches gilt, falls möglich, für asymptomatisch infizierte Hunde.

#### 2.3.1.9. Zoonotisches Potenzial

Die Weltorganisation für Tiergesundheit hat die Leishmaniose als vernachlässigte tropische Krankheit (NTD) zu den 20 wichtigsten Krankheiten aufgrund des DALY-Systems erklärt (Mitra and Mawson, 2017). Jedes Jahr infizieren sich weltweit eine halbe Million Menschen mit Leishmanioseerregern und 51.000 sterben daran (Desjeux, 1996; Zhao et al., 2016). Die Inzidenz ist zunehmend (Guarga et al., 2000; Michalsky et al., 2007).

In endemischen Gebieten des Erregers *L. infantum* sind Kinder wie Erwachsene betroffen, besonders anfällig sind immunsupprimierte Menschen. Im Fall von *L. infantum* handelt es sich häufig um asymptomatische Infektionen (Gramiccia and Gradoni, 2005). Der Hund stellt in diesen Gebieten ein großes Reservoir dar und Studien belegen, dass Menschen die Hunde in endemischen Gebieten halten ein höheres Risiko besitzen an Leishmaniose zu erkranken (Brodskyn and Kamhawi, 2018; Bsrat et al., 2018). Die meisten Infektionen werden dabei durch Phlebotomenstiche übertragen (Courtenay et al., 2002). Auch die Übertragung durch Bluttransfusionen, verunreinigte Spritzen und diaplazentär spielen eine Rolle. Immer wieder kann die Übertragung aber auch nicht sicher abgeklärt werden, wie in einem Fallbericht über einen amerikanischen Mann, der Urlaub in Italien gemacht hatte, sich aber keiner Insektenstiche oder dergleichen bewusst war (Asbury et al., 2018).

Zumeist ist die kutane Form seltener als die viszerale zu beobachten. Die Entwicklung eines humanen Anti-Leishmanienimpfstoffes war bisher nicht erfolgreich (Gradoni et al., 2005).

## 2.3.2. Babesien

### 2.3.2.1. Taxonomie und Morphologie

Babesien gehören zusammen mit den Theileriidae zur Ordnung der Piroplasmida und sind Teil der Familie der Babesiidae. Es existieren mehr als 100 verschiedene Babesienarten (Levine, 1971). Da sich diese Studie mit Hunden beschäftigt, werde ich mich in den folgenden Ausführungen vorwiegend auf einige bestimmte Arten beschränken: *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia rossi*, *Babesia gibsoni* und *Babesia annae*. Aufgrund der Vielfalt dieser Gattung gab es besonders vor der Einführung molekularbiologischer Methoden große Schwierigkeiten bei der Zuordnung der einzelnen Spezies. So erkannte Reichenow erst lange nach der Benennung von *B. canis* Unterschiede in der Pathogenität der Isolate und differenzierte so erstmals *Babesia canis* und *Babesia vogeli* (Reichenow, 1935). Heute werden drei Arten von *B. canis* aufgrund von Kreuzimmunität, serologischen Tests, Vektorspezifität und molekularer Phylogenie klassifiziert: *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia rossi* (Carret et al., 1999; Matijatko et al., 2012).

Weiterhin ist taxonomisch, die erst vor kurzem identifizierte Art *B. annae* von Bedeutung. Denn die im Jahre 2000 erstmals beschriebene Spezies (Zahler et al., 2000a) hat große phylogenetische Ähnlichkeit zu *B. microti*, wurde aber auch teilweise den Theilerien zugeordnet, weshalb sie in der Literatur viele Synonyme hat, wie *B. microti*-like, *Babesia* Spanish dog Isolat, *Babesia cf. microti* oder *Theileria annae*. Sie verursacht zumeist subklinische Infektionen bei Rotfüchsen, löst aber auch Anämie, Thrombozytopenie und Azotämie bei Hunden aus. Neuere Untersuchungen zeigen eine deutliche Abgrenzung zu den Theilerien, aber auch Unterschiede zu *B. microti*. Deshalb wurde der Name „*Babesia vulpes* sp. nov.“ für die neue Spezies vorgeschlagen (Baneth et al., 2015). Da aber auch hier eine Verwandtschaft zu den Babesien impliziert wird, welche phylogenetisch so nicht belegt werden konnte, empfiehlt Harris et al. (2016) bis zur definitiven Genotypisierung diesen Erreger unter der „Microti-Gruppe“ zusammenzufassen.

Es ist wahrscheinlich, dass die Genotypisierung von Piroplasmen noch nicht abgeschlossen ist und neue Isolate charakterisiert werden können (Irwin, 2009).

Man unterscheidet Babesien in große Arten, mit Merozoiten über 2,5 µm, und kleine Arten, welche Merozoiten unter 2,5 µm enthalten. Charakteristisch sind die tropfen- oder birnenförmigen, einkernigen, 0,3-0,5 µm langen Merozoiten, die meist paarweise, seltener zu mehreren, zentral oder marginal im Erythrozyten von Säugern liegen (Irwin, 2010).

### 2.3.2.2. Wirtsspektrum

*Babesia* spp. befallen hauptsächlich Säugetiere wie Nager (Obiegala et al., 2015), Carnivoren und Wiederkäuer (Boch, 1985), selten auch Vögel (Andersson et al., 2017a).

Dabei sind Babesien im Allgemeinen recht wirtsspezifisch (Bauer et al., 2011). So infizieren sich Hunde meist mit *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia rossi*, *Babesia gibsoni* oder *Babesia annae*. Auch in Füchsen und Wölfen konnten einige dieser Babesia-Spezies nachgewiesen werden (Farkas et al., 2015). Ebenso konnte aber auch *B. equi* in Hunden gefunden werden (Beck et al., 2009). Somit scheinen Überschneidungen bei der Erregerspezifität möglich, allerdings führen diese Infektionen selten zu klinisch manifesten Infektionen (Criado-Fornelio et al., 2003).

#### 2.3.2.3. Entwicklungszyklus und Übertragung

Den wichtigsten Vektor stellen verschiedene Schildzeckenspezies dar. So wird *B. canis* von *Dermacentor reticulatus* und *B. vogeli* von *Ripicephalus sanguineus* übertragen. *Haemaphysalis* spp. und *Dermacentor* spp. sind die Vektoren für *B. gibsoni* (Homer et al., 2000). Eine Übertragung findet ab einer Saugdauer von 24 Stunden statt. Eine Ausnahme stellen infizierte männliche *D. reticulatus* Zecken dar, die die infektiösen Stadien bei einer zweiten Blutmahlzeit sofort übertragen können (Heile et al., 2007).

Bei dem Stich der Zecke gelangen die mit sphäroiden Merogoniestadien infizierten Erythrozyten in den Darm des Vektors, wo sich männliche und weibliche Gamonten bilden. Die aus der Gamogamie hervorgegangenen Zygoten differenzieren sich zu Kineten, die in die Darmzellen eindringen, sich vermehren und Sporokineten bilden. Diese wandern in die Hämolymphe und befallen die Hämozyten sowie die Körperzellen verschiedener Organe der Zecke, wie zum Beispiel die Ovarien. Bei den Zecken ist so neben der transstadialen, auch die transovarische Übertragung von Babesien möglich (Reule et al., 2007). In diesen Zellen finden weiterhin Sporogonienzyklen statt. Erst nach dem Schlüpfen der Zeckenlarve aus dem infizierten Ei, gelangen Sporokineten in die Speicheldrüsenzellen, wo sie sich zu Sporozoiten entwickeln. Mit dem Speichel der Zecke gelangen diese in die Blutbahn des Wirtes, wo sie die Erythrozyten befallen und sich zunächst Trophozoiten bilden. Durch Exodyogenie entstehen birnenförmige Merozoiten (Telford III et al., 1993), die bei der anschließenden Zelllyse weitere Erythrozyten infizieren können (Bauer et al., 2011).

#### 2.3.2.4. Diagnostik

Eine Möglichkeit der Diagnose ist der direkte Nachweis durch eine Färbung des Blutausstriches mit Giemsa. Die verschiedenen Spezies der Babesien lassen sich darin nicht differenzieren, aber es kann in große und kleine Arten unterschieden werden. Eine Schnellfärbung mit Diff-Quick ist weniger geeignet. Außerdem ist zu beachten, dass möglichst peripheres Kapillarblut aus der Ohrmuschel oder Schwanzspitze verwendet wird, da dort oft eine höhere Anzahl infizierter Erythrozyten zu finden ist (Böhm et al., 2006). Im

Falle einer chronischen Infektion ist die Diagnosestellung mittels Blutaussstrich meist schwierig, da die Parasitämie geringer ausgeprägt ist. Es handelt sich um ein günstiges und schnelles Nachweisverfahren, welches überall durchgeführt werden kann. Allerdings ist die Sensitivität und Spezifität von der Erfahrung des Durchführenden abhängig (Lempereur et al., 2017).

Eine PCR stellt eine weitere Möglichkeit des Nachweises dar. Sie ist sensitiver als die mikroskopische Untersuchung und ermöglicht eine Speziesdifferenzierung, welche für die Therapie von Bedeutung sein kann. Aus diesem Grund wurden PCRs mit verschiedenen Primern etabliert, sowie nested und real-time PCRs, um eine schnelle und möglichst sichere Speziesdifferenzierung durchführen zu können (Irwin, 2009; Zahler et al., 1998). Mit einer PCR ist auch die Detektion chronischer Infektionen möglich, in Kombination mit serologischen Methoden wird die Sensitivität noch erhöht.

Die am weitesten verbreitete Methode zum Nachweis einer Babesiose ist der IFAT (Anderson et al., 1980; Levy et al., 1987). Wegen des akuten Verlaufs der Babesiose ist eine alleinige serologische Untersuchung auf Antikörper mit Hilfe von IFAT oder ELISA nicht sinnvoll, da am Anfang der Erkrankung noch keine Antikörper vorhanden sind. Diese werden erst ab ca. 14 Tage nach Erstinfektion gebildet (Bauer et al., 2011). In der Regel zeigt ein positiver Titer eine Exposition an. Aber auch der Nachweis von Impfantikörpern ist möglich. Bei einer chronischen Babesiose verläuft die Parasitämie intermittierend und in deren Verlauf sind dann Antikörper und Parasiten nachweisbar (Irwin and Hutchinson, 1991). Trotz der Verwendung von rekombinanten Antigenen ist es schwierig eine ausreichende Spezifität für eine bestimmte *Babesia*-Spezies zu erreichen (Aboqe et al., 2007; Mandal et al., 2016). Der Nachweis von *Babesia* spp. ist dagegen gut möglich.

#### 2.3.2.5. Verbreitung

Die Verbreitung der caninen Babesiose richtet sich weitgehend nach dem Vorkommen der als Vektor benötigten Zecken.

*Babesia canis* ist in Afrika (Taboada, 1998), sowie in herdförmigen Gebieten verteilt über ganz Europa bis zum Baltikum und besonders in Süd- und Osteuropa zu finden (Adaszek and Winiarczyk, 2008; Beck et al., 2009; Cardoso et al., 2008; de Marco et al., 2017; Foldvari et al., 2005; Ionita et al., 2012; Solano-Gallego et al., 2008). In Deutschland konnte das Vorkommen einer adulten *D. reticulatus* Zecke erstmals 1973 dokumentiert (Immler, 1973) und nur drei Jahre später bereits das autochthone Vorkommen belegt werden (Liebisch and Rahman, 1976). Seither sind verschiedene endemische Herde gefunden worden (Beelitz et al., 2012; Gothe and Wegerdt, 1991; Zahler and Gothe, 1997). Diese breiten sich aus und so kommt es immer wieder zu autochthonen Infektionen, wie zum Beispiel am Niederrhein (Dürbaum, 1999), in München (Zahler et al., 2000b), Niedersachsen (Jensen and Nolte,

2005) und Brandenburg (Heile et al., 2006). Kürzlich konnte wieder das Vorkommen der Babesiose und *D. reticulatus* bei Hunden in Brandenburg gezeigt werden (Liesner et al., 2016; Schreiber et al., 2014). Eine aktuelle Studie untersuchte die räumliche Verbreitung und die Saisonalität von *D. reticulatus* in Berlin/Brandenburg sowie das Vorkommen bestimmter Krankheitserreger in den Zecken (Kohn et al., 2019). Dabei konnte vor allem eine Zeckenaktivität über das ganze Jahr und sogar in Frostperioden festgestellt werden. Mittels PCR konnte in keiner der 2000 untersuchten Zecken *Babesia* spp. gefunden werden (Kohn et al., 2019).

Bei *B. vogeli* handelt es sich um die am weitesten verbreitete Babesienspezies. Diese und ihr Vektor *R. sanguineus* sind nahezu weltweit anzutreffen im tropischen, subtropischen, sowie mediterranen Raum (Beck et al., 2009; Cardoso et al., 2008; Carret et al., 1999; Criado-Fornelio et al., 2003; Matjila et al., 2004; Solano-Gallego et al., 2008).

*Babesia rossi* kommt ausschließlich in Afrika südlich der Sahara vor (Jacobson and Clark, 1994; Matjila et al., 2004; Uilenberg, 1989).

Erstmals wurde 2007 eine *B. gibsoni* Infektion bei Hunden in Deutschland beschrieben (Hartelt et al., 2007). Sonst ist dieser Erreger hauptsächlich in Asien, Australien und Nordafrika beheimatet (Bostrom et al., 2008; Jefferies et al., 2007). Aber auch in den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) treten gehäuft Fälle bei Hunden nach Bissverletzungen auf (Birkenheuer et al., 2005). Besonders gefährdet sind Hunde bei Hundekämpfen, wofür bevorzugt Pitbulls eingesetzt werden (Yeagley et al., 2009).

Das Verbreitungsgebiet von *B. annae* umfasst vor allem Spanien und Portugal (Camacho et al., 2001). Aber auch in Kanada, Ungarn und Deutschland konnte der Erreger in Füchsen nachgewiesen werden (Clancey et al., 2010; Farkas et al., 2015; Najm et al., 2014a).

Eine mit Hilfe von Fragebögen ermittelte Inzidenz in Spanien, Frankreich, den Benelux-Ländern, Deutschland und Österreich von klinisch an Babesiose erkrankten Hunden lag bei 0,7 % (Halos et al., 2014). In einer anderen Studie wurde retrospektiv bei Hunden in Deutschland, welche eine Reiseanamnese aufwiesen, eine Prävalenz von 2,7 % ermittelt (Hirsch and Pantchev, 2008). Weiterhin konnte in Deutschland eine Seroprävalenz von 23,4 % für *Babesia* spp. bei Hunden mit Reisehintergrund festgestellt werden (Menn et al., 2010). In einer weiteren Untersuchung wurden Blutaussstriche und PCR zu Ermittlung der Prävalenz bei Hunden in Deutschland verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass 1,7 % der 170 Blutaussstriche und 3,3 % der 502 mit PCR untersuchten Blutproben positiv für *Babesia* spp. waren. Dabei wurden außerdem 15 autochthone Fälle gefunden (Vrhovec et al., 2017).

#### 2.3.2.6. Klinik

Die klinischen Erscheinungen einer Babesiose beim Hund reichen von subklinischen Infektionen über milde Anämien und Multiorganversagen bis zum Tod. Entscheidend für den

Verlauf ist das Alter, der Immunstatus, Vorerkrankungen und nicht zuletzt auch die Virulenz der jeweiligen Babesienspezies (Welzl et al., 2001). So gilt *B. vogeli* als die am wenigsten pathogene Form, während *B. rossi* oft zu schwerwiegenden Komplikationen mit Todesfolge führt (Irwin and Hutchinson, 1991; Solano-Gallego et al., 2008). Insgesamt bedingt die Stärke der Parasitämie die Ausprägung der Symptome (Böhm et al., 2006). Dagegen scheinen Koinfektionen mit anderen Vektor-übertragenen Erregern keinen signifikanten Einfluss auf die klinische Ausprägung zu haben (Krawczak Fda et al., 2015).

Die Inkubationszeit beträgt 7-21 Tage. Im akuten Verlauf ist das Krankheitsbild durch Apathie, Inappetenz, hohes Fieber und nach ca. 24 h auch durch Anämie geprägt. Zum Teil treten Hämoglobinurie, sowie Ikterus und in sehr seltenen Fällen neurologische Störungen auf. Auch akutes Nierenversagen sowie hämorrhagische Enteritis werden häufig kurz vor dem Tod der Hunde beobachtet (Mathe et al., 2006). Weiterhin konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Durchblutungsstörungen auf eine schlechte Prognose hindeuten (Böhm et al., 2006).

Bei einer chronischen Babesiose ist die Anämie meist deutlicher ausgeprägt und die Temperaturerhöhung oft nur vorübergehend. Weiterhin sind ein Konditionsverlust und Apathie zu bemerken. Insgesamt scheinen die meisten Hunde eine chronische Infektion gut zu überstehen und sogar eine gewisse humorale Immunität gegenüber anderen vektor-übertragenen Erkrankungen zu entwickeln. Allerdings besteht das Risiko durch die vorhandene Parasitämie im Falle einer Immunsuppression klinisch akut zu erkranken (Brandao et al., 2003).

#### 2.3.2.7. Therapie

Imidocarbdiopropionat und Diminazinaceturat sind weit verbreitete Antiprotozoika-Medikamente. Zur Behandlung von *B. canis* reicht eine Injektion mit 5-6 mg/kg und eine Wiederholung nach 14 Tagen. Es existieren weitere Therapiemöglichkeiten, die seit vielen Jahren verwendet werden und bei der Bewältigung der klinischen Anzeichen einer Babesiose unterschiedlich erfolgreich sind, wie zum Beispiel Chinuroniumsulfat, Trypanblau, Pentamidin, Phenamidin und Parvaquon, sowie Azithromycin und Atovaquon (Baneth, 2018). Diese Präparate sind nicht in allen Ländern für die Behandlung einer Babesieninfektion beim Hund zugelassen. In Deutschland ist es möglich aufgrund eines Therapienotstandes umzuwidmen.

Einige der Medikamente sind mit einer hohen Rate von Nebenwirkungen verbunden, die im Zusammenhang mit einem Anticholinesterase-Effekt stehen. So werden bereits in therapeutischer Dosis Nebenwirkungen wie Speicheln, Tränenfluss, Unruhe durch Tachykardie und Tachypnoe sowie Erbrechen, Diarrhoe und Kolik verursacht. Eine Gabe

von Atropin ca. 30 min vor der Imidocarb-Behandlung kann diese Nebenwirkungen deutlich mildern (Bauer et al., 2011).

Bestenfalls führen die obengenannten Medikamente zu einer Verbesserung der klinischen Symptome, selten kann eine vollständige Eliminierung des Erregers erreicht werden (Baneth, 2018; Irwin, 2010).

Die erfolgreiche Behandlung der kleinen Piroplasmeninfektionen, insbesondere von *B. gibsoni*, war eine besondere Herausforderung, da eine gewisse Unempfindlichkeit gegen die aromatischen Diamidine vorzuliegen scheint (Baneth, 2018). Wirksam gegen Infektionen mit *B. gibsoni* und *B. annae* sind Doxycyclin, Phenamidinisothionat und Pentamidin (Bauer et al., 2011). Auch Clindamycin führte bei einer Gabe von 25 mg/kg alle 12h zu einer deutlich reduzierten Parasitämie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen, eliminierte den Erreger jedoch nicht (Wulansari et al., 2003). Ebenso kann eine Kombination des Hydroxynaphthochinons Atovaquone und des antibiotischen Azithromycins zur Behandlung in Betracht gezogen werden. Allerdings haben Atovaquone und ähnliche Formulierungen starke gastrointerstinale Nebenwirkungen und sind sehr teuer (Irwin, 2009). Azithromycin und andere Antibiotika mit anti-protozoalen Eigenschaften zielen auf den Apikoplast, der in Apicomplexa vorkommt, und üben eine verzögerte Todeswirkung aus. Die dreifach Kombination aus Clindamycin, Diminazenaceturat und Imidocarbdiäpropionat ist auch gegen *B. gibsoni* wirksam und wird zur Behandlung atovaquonresistenter Stämme dieser Art eingesetzt (Baneth, 2018).

Bei schwerwiegenden Verläufen ist eine Bluttransfusion nötig. Des Weiteren können palliative Therapien, wie eine Schockbehandlung, Rehydratation oder eine symptomatische Behandlung einer Niereninsuffizienz notwendig sein.

Für die Prognose entscheidend ist eine schnelle Diagnosestellung und ein sofortiger Therapiebeginn.

#### 2.3.2.8. Prophylaxe

Den bedeutendsten Schutz vor einer Babesieninfektion stellt die Vermeidung der Exposition mit dem Vektor dar. Allerdings ist dies in endemischen Gebieten oft nicht möglich. Deshalb sollte eine Ektoparasitenprophylaxe mit Halsbändern oder spot-on Präparaten erfolgen. Eine neue Kombination von Permethrin und Fipronil wurde 2015 erfolgreich getestet (Navarro et al., 2015). Es wies eine Wirksamkeit von 92,9-100 % auf und schützte die Hunde zwischen dem 2. und 28. Tag nach der Anwendung. Auch die präventive Wirkung von Fluralaner Kautabletten gegen die Übertragung von *B. canis* durch *Dermacentor reticulatus* Zecken wurde untersucht. Keiner der 8 einmal mit Fluralaner Kautabletten behandelten Hunde wurde während der 12-wöchigen Studie mit *B. canis* infiziert, wie mittels IFAT und PCR getestet wurde. Es wurde eine 99,2-100 %ige Wirksamkeit gegen Zecken erreicht (Taenzler et al.,

2015). Der Wirkstoff ist mittlerweile auch als spot-on Präparat zu erhalten und zeigte eine sehr ähnliche Effektivität wie die Kautabletten (Taenzler et al., 2016).

Eine prophylaktische Behandlung mit Imidocarb-Dipropionat subkutan in einer Dosis von 6 mg/kg verhindert zwischen zwei und vier Wochen eine Infektion mit Babesien bzw. einen schwerwiegenden Verlauf (Uilenberg et al., 1981; Vercammen et al., 1996a). In einer weiteren Studie wurde die prophylaktische Wirksamkeit von Doxycyclin getestet (Vercammen et al., 1996b). In dem Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Tagesdosis von 5 mg/kg die klinische Erkrankung nicht vollständig verhinderte. Allerdings blieben die Symptome moderat. Bei einer Dosis von 20 mg/kg pro Tag wurden keine klinischen Symptome beobachtet, aber eine asymptomatische Infektion konnte nicht ausgeschlossen werden.

Die genetische Vielfalt von *Babesia* spp. stellt eine besondere Herausforderung bei der Entwicklung eines ausreichend wirksamen Schutzes durch einen Impfstoff dar.

In vitro aus der Kultur stammende, lösliche Parasitenantigene (SPA) wurden seit den 1980er Jahren zum Schutz von Hunden in Europa gegen *B. canis* eingesetzt. Dieses *B. canis*-Derivat SPA konnte Hunde nicht vor Infektionen mit *B. rossi* schützen (Schetters et al., 1995), was zur Entwicklung eines Impfstoffs führte, der eine Mischung von SPA sowohl aus europäischem *B. canis* als auch aus südafrikanischem *B. rossi* enthält (Schetters et al., 2001). Diese Impfstoffe schützten nach Grundimmunisierung ca. 6 Monate vor schweren klinischen Verläufen (Schetters et al., 2006). Derzeit gibt es keinen in Europa zugelassenen Impfstoff gegen die canine Babesiose.

#### 2.3.2.9. Zoonotisches Potenzial

*Babesia* spp. sind in Europa als Zoonoseerreger bekannt. Besonders die Subtypen *B. divergens* (Haselbarth et al., 2007; Herwaldt et al., 2003) und *B. microti* (Hildebrandt et al., 2007) sind beschrieben. Auch *Babesia venatorum* spielt eine Rolle (Rizzoli et al., 2014). Insgesamt sind ungefähr 50 klinische Fälle in Europa bekannt, was vermutlich aber weit unter der eigentlichen Infektionsrate liegt, da die Anzahl der asymptomatischen Patienten als bedeutend eingeschätzt wird (Hildebrandt et al., 2013).

### 2.3.3. Anaplasmen

#### 2.3.3.1. Taxonomie und Morphologie

Anaplasmen sind der Klasse der alpha-Proteobakterien zuzuordnen. Sie gehören zur Ordnung der Rickettsiales und der Familie der Anaplasmataceae, zu der außerdem die Gattungen *Ehrlichia* spp., *Candidatus Neoehrlichia*, *Neorickettsia* und *Wolbachia* zählen

(Bowman, 2011). Aufgrund genetischer Analysen fasste man vor einigen Jahren die Erreger *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophilum* und den Erreger der Humanen granulozytären Ehrlichiose zu der Spezies *Anaplasma phagocytophilum* zusammen (Dumler et al., 2001). Diese Einordnung entstand aufgrund von molekularer Phylogenie und ist insofern diskussionswürdig, als dass sich diese Erreger in ihrem Zelltropismus deutlich von denen der bisher zur Gattung *Anaplasma* spp., wie *Anaplasma platys* und *Anaplasma marginale*, Gezählten unterscheiden (Carrade et al., 2009).

Es handelt sich bei den Anaplasmen um gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien (Woldehiwet, 2010). Die pleomorphen Kokken vermehren sich je nach Spezies bevorzugt in neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten, Erythrozyten bzw. in Thrombozyten (Dumler et al., 2001; Woldehiwet, 2010) und bilden unter dem Mikroskop erkennbare 2-5 µm große Einschlüsse, die sogenannten Morulae (Carrade et al., 2009).

#### 2.3.3.2. Wirtsspektrum

Das Wirtsspektrum von *Anaplasma phagocytophilum* ist sehr vielfältig und umfasst neben Säugetieren, wie Pferden, Hunden, Katzen, Rindern (Pusterla et al., 1998a; Stuen et al., 2013), Elchen, Rehen (Stigum et al., 2019) und Nagern (Silaghi et al., 2012), auch den Menschen (Oteo et al., 2000; Pokorn et al., 2016). Ob auch Vögel ein Reservoir darstellen, ist nicht abschließend geklärt (Stuen et al., 2013). Dagegen ist *Anaplasma platys* vor allem beim Hund beschrieben (Aguirre et al., 2006; Dyachenko et al., 2012). Es gibt auch Berichte über das Vorkommen von *A. platys* DNA in Katzen außerhalb von Europa (Lima et al., 2010), sowie in Füchsen zum Beispiel in Portugal (Cardoso et al., 2015).

#### 2.3.3.3. Vermehrung und Übertragung

Übertragen werden Anaplasmen durch den Stich einer Schildzecke, welche zuvor das Bakterium bei der Blutmahlzeit von einem anderen infizierten Tier aufgenommen hat. In Europa ist der Vektor hauptsächlich *Ixodes ricinus* (Parola and Raoult, 2001) bzw. *Rhipicephalus sanguineus* (Sanogo et al., 2003) in mediterranen Gegenden. Während in den USA *Ixodes scapularis* und *I. pacificus*, sowie in Asien *I. persulcatus* den Vektor darstellen (Woldehiwet, 2010). Um eine Übertragung des Erregers sicherzustellen, muss die Zecke mindestens 36 bis 48 Stunden am Wirt saugen (Katavolos et al., 1998).

Es gibt Veröffentlichungen, welche auch andere Übertragungswege nachweisen. So sind Infektionen ohne vorherige Zeckenexposition beschrieben, bei denen vermutet wird, dass die Übertragung durch eine Bluttransfusion stattgefunden haben könnte (Chirek, 2018; Zhang et al., 2008). Ebenso wird die transplazentare Infektion diskutiert. Beim Menschen wurden

Fallberichte dazu veröffentlicht (Horowitz et al., 1998). Bei Hunden konnte dieser Übertragungsweg nicht nachgewiesen werden.

Die Vermehrung findet durch Teilung und anschließendes Wachstum im Mitteldarm der Zecke statt. Auch im Säugetier ist eine Vermehrung möglich. Dabei werden vornehmlich neutrophile, aber auch eosinophile Granulozyten (*A. phagocytophilum*) und Thrombozyten (*A. platys*) genutzt (Woldehiwet, 2010). Anaplasmen können sich in Endothelzellen zurückziehen und dann durch direkten Zellkontakt Granulozyten bzw. Thrombozyten infizieren (Herron et al., 2005). Dabei nutzen sie scheinbar spezifische Liganden, die direkt an der Oberfläche der Wirtszellen anheften und gelangen so über rezeptormedierte Endozytose in die Zelle. Dort finden sie Nährstoffe für die binäre Teilung. Sie reproduzieren sich in membrangebundenen Vesikeln unter der Bildung von Morulae, die eine Art Mikrokolonien darstellen (Carrade et al., 2009; Dumler et al., 2005). Danach erfolgt die Lyse der infizierten Zellen und die neu gebildeten Erreger werden in die Peripherie entlassen, wo sie erneut Wirtszellen infizieren können.

#### 2.3.3.4. Diagnostik

Im Falle einer Anaplasmosen gibt weder die Klinik noch die Anamnese eindeutige Hinweise auf das Vorliegen einer Infektion. Somit ist ein Erregernachweis unabdingbar.

Dafür steht zum einen die Kultivierung zur Verfügung. Allerdings ist diese sehr zeitaufwendig, kann nicht bei vorbehandelten Tieren eingesetzt werden und ist nur im positiven Fall beweisend für eine Infektion (Dyachenko et al., 2013; Ismail et al., 2010).

Auch eine mikroskopische Untersuchung ist möglich. Dabei werden Morulae in den Granulozyten bzw. Thrombozyten nachgewiesen. Ein solcher Nachweis wäre beweisend für eine Infektion. Allerdings ist damit keine Unterscheidung zwischen *Anaplasma* spp. und *Ehrlichia* spp. möglich (Carrade et al., 2009). Ein weiterer Nachteil ist, dass nicht zwingend sichtbare Morulae gebildet werden und diese nur bei einem akuten Geschehen mit hinreichender Sensitivität zu beobachten sind (Eberts et al., 2011; Egenvall et al., 1998).

Ebenfalls im frühen Stadium einer Infektion ist eine PCR als Nachweis möglich (Granick et al., 2009). Dabei eignet sich DNA aus Blut, Knochenmark und Milzgewebe (Carrade et al., 2009). In Studien konnte gezeigt werden, dass damit ein Erregernachweis ab dem 2. Tag bis ca. 20 - 60 Tage nach der Infektion möglich ist (Egenvall et al., 2000b; Scorpio et al., 2011). Es wurden zum einen eine sondenbasierte Echtzeit-Multiplex-PCR (Jahfari et al., 2012) und zum anderen ein Protokoll mit hochauflösender PCR und Schmelzkurvenanalyse (Krücken et al., 2013) entwickelt, mit denen sowohl der Nachweis von Anaplasmataceae als auch die Unterscheidung der einzelnen Spezies möglich ist. Dabei ist die high resolution meltcurve PCR deutlich kostengünstiger. Generell dient ein negatives PCR Ergebnis nicht dem Ausschluss der Diagnose und ein positives muss nicht zwangsläufig eine klinisch manifeste

Infektion bedeuten. Aus diesem Grund sollte zur Diagnosestellung eine Kombination aus direkten und indirekten Verfahren zum Nachweis verwendet werden.

Bei der serologischen Untersuchung stehen sowohl der ELISA als auch der IFAT zur Verfügung. Allerdings ist eine einmalige Untersuchung nicht ausreichend, um eine Infektion zu belegen (Kohn et al., 2011), da bereits die Exposition des Hundes zu einem erhöhten Titer führen kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Serokonversion bis zu 30 Tage nach der Infektion erfolgen kann. Damit ist eine Erkennung im frühen Infektionsverlauf nicht immer möglich (Chandrashekar et al., 2010; Eberts et al., 2011). Deshalb wird eine Wiederholung des IFAT nach 2-3 Wochen empfohlen, da so der Verlauf des Antikörpertiters verfolgt werden kann. Dabei wird ein vierfacher Titeranstieg als aussagekräftig angesehen (Sainz et al., 2015). Zu beachten ist das Risiko von Kreuzreaktionen, sowie die Subjektivität bei der Auswertung des IFAT (Barth, 2013). Insgesamt verwenden die meisten serologischen Tests ein Vollzellantigenpräparat, was die bereits erwähnten Kreuzreaktionen bedingt. Dagegen verwendet der SNAP®4Dx®Plus ein synthetisches Peptid des Oberflächenproteins p44, was zu einer besseren Spezifität führt (Chandrashekar et al., 2010). Eine Kreuzreaktion zwischen *A. phagocytophilum* und *A. platys* ist auch mit diesem Test gegeben.

Zur Diagnose einer klinisch manifesten Infektion sollten 3 Nachweise erbracht sein. Ein positiver direkter Erregernachweis, eine Thrombozytopenie und der Anstieg der Thrombozytenzahl während der Therapie (Bergmann and Hartmann, 2015).

#### 2.3.3.5. Verbreitung

Die Ausbreitung von *A. phagocytophilum* korrespondiert im Allgemeinen mit der Verbreitung des Vektors *I. ricinus* bzw. nahe verwandter *Anaplasma*-Arten. Dieser ist in Europa ubiquitär, weshalb ganz Europa als Endemiegebiet angesehen wird.

Die ermittelten Prävalenzen sind sehr unterschiedlich, was zum Teil an der verwendeten Testmethode, sowie den regionalen Begebenheiten liegt und andererseits im Studiendesign sowie der Auswahl der getesteten Hunde begründet ist. So wurde mittels IFAT in Italien eine Prävalenz von 33 % (Torina and Caracappa, 2006) ermittelt, in Portugal von 55 % (Santos et al., 2009), in Österreich von 56,5 % (Kirtz et al., 2007), in Schweden von 17,7 % (Egenvall et al., 2000a), in der Schweiz von 7,5 % (Pusterla et al., 1998b) und in Spanien von 11,5 % (Solano-Gallego et al., 2006). Die mit PCR durchgeführten Studien wiesen Prävalenzen von 1 % in Polen (Skotarczak et al., 2004) nach, von 0,8 % in Großbritannien (Shaw et al., 2005) und in Italien, sowie in Portugal konnten in verschiedenen Studien keine *A. phagocytophilum* infizierten Hunde gefunden werden (De la Fuente et al., 2006; Santos et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2006). Weitere Untersuchungen wurden mit dem SNAP®4Dx®Plus gemacht und dabei Prävalenzen von 2,7 % in Frankreich (Pantchev et al., 2009b), 3,1 % in Spanien

(Miró et al., 2013), 5,3 % in Finnland (Vera et al., 2014) und 7,9 % in Ungarn (Farkas et al., 2014a) ermittelt.

In Deutschland wurden ebenfalls einige Studien zum Vorkommen von *A. phagocytophilum* durchgeführt. Dabei wurde ein deutlicher Unterschied zwischen der Seroprävalenz im IFAT, welche mit 43 % bzw. 43,2 % beziffert wurde, und der mit PCR festgestellten von 5,7 % bzw. 6,3 % (Jensen et al., 2007a; Kohn et al., 2011), nachgewiesen. Untersuchungen mit dem SNAP®4Dx®Plus zeigten Prävalenzen von 19,4 % (Barth et al., 2012) bzw. 21,5 % (Straubinger et al., 2008).

In Brandenburg wurde mit Hilfe von PCR ein Vorhandensein in 15 von 1023 Hunden festgestellt und somit eine Prävalenz von 1,5 % nachgewiesen (Liesner et al., 2016). Schon vorher wurde die Prävalenz von *A. phagocytophilum* in mit Hunden assoziierten Zecken im Raum Berlin/Brandenburg mittels PCR untersucht und mit 3,9 % in *I. hexagonus* und 6,5 % in *I. ricinus* ermittelt (Schreiber et al., 2014). Eine weitere Studie, die an verschiedenen Orten in Deutschland, unter anderem auch im Raum Berlin und Umland, das Vorkommen von *A. phagocytophilum* in gesammelten Zecken mittels PCR untersuchte, ermittelte eine Prävalenz von 4,1 % bei insgesamt 542 untersuchten *I. ricinus* (Richter and Matuschka, 2012).

Das Verbreitungsgebiet von *A. platys* ist eher im mediterranen Raum gelegen. Es existieren Berichte über das Vorkommen in Italien (De la Fuente et al., 2006), Spanien (Aguirre et al., 2006), Portugal (Cardoso et al., 2010), Frankreich (Brouqui, 2002), Griechenland (Kontos et al., 1991), Kroatien (Dyachenko et al., 2012), Rumänien (Andersson et al., 2013) und der Türkei (Ulutaş et al., 2007). Prävalenzen wurden meist mittels PCR und nicht flächendeckend ermittelt. So wurde in Italien von Prävalenzen zwischen 4 %, bei 344 zufällig ausgewählten Hunden aus verschiedenen Regionen (De la Fuente et al., 2006), und bis zu 70,5 % bei Zwingerhunden (de Caprariis et al., 2011), berichtet.

#### 2.3.3.6. Klinik

Die Inkubationszeit bei einer Infektion mit Anaplasmen beträgt ungefähr 4 -14 Tage (Egenvall et al., 1998). Bei einer Infektion mit *A. phagocytophilum* wird von der caninen granulozytären Anaplasrose gesprochen und bei *A. platys* von caniner zyklischer Thrombozytopenie (Dumler et al., 2001).

Eine Infektion mit *A. phagocytophilum* verläuft häufig asymptomatisch (Sainz et al., 2015). Bei Auftreten von klinischen Symptomen sind die Verläufe sehr vielfältig und reichen von mild bis schwer. Es wird vermutet und konnte auch in einer Studie durch signifikante Unterschiede dargestellt werden, dass unterschiedliche genetische Varianten von *A. phagocytophilum* zu unterschiedlichen klinischen Ausprägungen beim Hund führen (Silaghi et al., 2011). Außerdem wurde in einer anderen Studie belegt, dass eine klinische canine granulozytäre Anaplasrose immer mit einem Thrombozytenabfall einhergeht,

während dies bei einer Asymptomatischen nicht zu beobachten war (De Arcangeli et al., 2018).

Von den infizierten Blutzellen ausgehend, breitet sich die Infektion im gesamten Organismus aus und befällt verschiedene Organe wie Lunge, Leber, Nieren und zentrales Nervensystem. In einer aktuellen Studie wurden die Symptome von 63 natürlich mit *A. phagocytophilum* infizierten Hunden dokumentiert und dabei festgestellt, dass ein reduziertes Allgemeinbefinden mit Apathie, Fieber und Inappetenz bei über 60 % der Hunde zu beobachten war (Chirek, 2018). In früheren Studien wurden außerdem auch vermehrt unspezifische Symptome, wie Lahmheit, gastrointestinale Symptome und Blutungen beschrieben (Carrade et al., 2009; Eberts et al., 2011; Kohn et al., 2008). Diese gehörten, ebenso wie die Polyurie und Polydipsie, in der Untersuchung von Chirek zu den selteneren Symptomen. Dies könnte damit zu erklären sein, dass bei dieser Untersuchung Hunde mit Koinfektionen sehr gründlich ausgeschlossen wurden (Chirek, 2018). In einer weiteren Studie konnte das Vorkommen von Splenomegalie mit einer caninen granulozytären Anaplasiose in Verbindung gebracht werden (Kohn et al., 2008). Kontrovers diskutiert wird auch das Auftreten von zentralnervösen Symptomen sowie Meningitis (Barber et al., 2010; Lazzarini, 2016).

Die klinischen Anzeichen einer Infektion mit *A. platys* sind ebenfalls sehr unspezifisch. Nicht in allen Studien, die die klinische Symptomatik untersucht haben, wurden Koinfektionen ausgeschlossen. Zu den häufigsten Symptomen zählen Fieber, Apathie, Anorexie, Petechien, Nasenausfluss und Lymphknotenschwellung (Dyachenko et al., 2012; Harrus et al., 1997; Kontos et al., 1991).

Sowohl bei der caninen granulozytären Anaplasiose als auch bei der caninen zyklischen Thrombozytopenie können Veränderungen des Blutbildes in Form von Thrombozytopenie, Hyperglobulinämie, Hypalbuminämie, Anämie, Lymphopenie, sowie erhöhte Leberenzyme auftreten (Granick et al., 2009; Kohn et al., 2011).

Chronische Verläufe von Anaplasiose sind bisher nicht beschrieben (Chirek, 2018).

#### 2.3.3.7. Therapie

Das Mittel der Wahl ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracykline. In den meisten Fällen wird Doxycyclin verwendet. Es werden über einen Zeitraum von drei Wochen alle 12 Stunden 5 mg/kg p.o. gegeben (Sainz et al., 2015). Ungefähr 75 % der Hunde zeigen bereits nach wenigen Tagen eine deutliche Besserung. Dabei kann auch der Anstieg der Thrombozyten als Indikator verwendet werden (Carrade et al., 2009). Eine Erregerpersistenz nach einer Behandlung mit Doxycyclin über 28 Tage besteht nicht (Yancey et al., 2018).

Alternativ kann bei Welpen Chloramphenicol eingesetzt werden (Greig and Armstrong, 2006). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Rifampicin und Levofloxacin wirksam

gegen *A. phagocytophilum* sind (Maurin et al., 2003). Für die Therapie von *A. platys* ist außerdem eine Gabe von 5 mg/kg alle 12 h für 14-21 Tage als erfolgreich beschrieben worden (Chang et al., 1997). Bei schweren Verläufen ist zusätzlich eine symptomatische Therapie angeraten und bei immunmedierten Komplikationen kann auch der Einsatz von Glukokortikoiden in Betracht gezogen werden (Sainz et al., 2015).

Es sollten nur Hunde mit klinischen Symptomen behandelt werden (Bergmann and Hartmann, 2015). Über die Persistenz der Antikörper nach der Behandlung existieren verschiedene Angaben. So waren bei experimentell mit *A. phagocytophilum* infizierten Hunden zwischen 7 und 8 Monaten nach der Behandlung keine Antikörper mehr nachweisbar (Egenvall et al., 1997), währenddessen bei natürlich infizierten Hunden Berichte vorliegen, dass noch bis zu 12 Monate lang Antikörper gefunden wurden (Poitout et al., 2005).

#### 2.3.3.8. Prophylaxe

Die wichtigste Prophylaxemaßnahme gegen eine Anaplasmeninfektion ist das Verhindern der Übertragung durch Zeckenstiche. Dabei ist zum einen das baldige Absammeln von Zecken hilfreich, zum anderen aber ist das Anwenden von Akariziden mit Repellenteffekt von Bedeutung (Katavolos et al., 1998). Auch die Übertragung durch eine Bluttransfusion ist möglich (McQuiston et al., 2000; Sainz et al., 2015) und kann durch eine vorher durchgeführte PCR vermieden werden (Chirek, 2018; Ewing et al., 1997). Es existiert kein in Deutschland zugelassener Impfstoff (Bergmann and Hartmann, 2015).

#### 2.3.3.9. Zoonotisches Potenzial

Bei *A. phagocytophilum* handelt es sich um einen zoonotischen Erreger, welche das Krankheitsbild der Humanen Granulozytären Anaplasrose (HGA) hervorruft. Dieses ist durch unspezifische Symptome, wie Fieber, Muskel- und Gelenkschmerzen, sowie Bauchschmerzen, Erbrechen und Diarrhoe gekennzeichnet. Allerdings verlaufen 67-75 % der Infektionen asymptomatisch (Bakken and Dumler, 2015). In sehr seltenen Fällen, wie beispielsweise bei immunsupprimierten Patienten kann es zu Multiorganversagen, Meningoenzephalitis und akuter Atemnot kommen (Dumler et al., 2005). Auch schwere Sekundärinfektionen können in solchen Fällen auftreten (Ismail et al., 2010). Labordiagnostische Veränderungen sind vor allem eine Thrombozytopenie, Leukopenie, Anämie sowie Veränderungen der Leberenzyme (Bakken et al., 2001).

Die HGA wird über einen Zeckenstich oder auch bei Bluttransfusionen übertragen. Bis zum Eintritt der ersten Symptome vergeht eine Inkubationszeit von ca. 1-2 Wochen (Fishbein et al., 1994). Direkte Infektionen durch infizierte Hunde sind bislang nicht beschrieben.

Allerdings gibt es Veröffentlichungen, in denen vor Kontakt mit dem Blut von infizierten Wildtieren gewarnt wird (Dumler et al., 2001; Poitout et al., 2005).

Der erste Bericht über Anaplasiose beim Menschen kam 1994 aus den USA (Bakken et al., 1994). Danach nahmen die Fallberichte sowohl in den USA (Markowicz et al., 2016) als auch in Europa stetig zu. So wird immer wieder von klinischen Fällen berichtet, wie beispielsweise in Österreich (Vogl et al., 2010), Spanien (Oteo et al., 2000), Griechenland (Tsiodras et al., 2017) und Polen (Tylewska-Wierzbanowska et al., 2001). Auch das Vorkommen von HGA in China konnte bestätigt werden (Zhang et al., 2008).

Insgesamt liegt die Seroprävalenz in Europa regional unterschiedlich bei 1-20 % (Jin et al., 2012). Zwischen 1994 und 2001 wurde im Raum Berlin/Brandenburg eine Studie zur Ermittlung der Seroprävalenz von *A. phagocytophilum* mittels IFAT beim Menschen durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass ein Anstieg von 2,2 % auf 8,7 % über den Untersuchungszeitraum dokumentiert werden konnte. Außerdem konnten autochthone Fälle nachgewiesen werden (Kowalski et al., 2006).

Über das Vorkommen von *A. platys* beim Menschen gibt es weit weniger Berichte. So existiert ein Bericht über einen Krankheitsfall in einer Familie aus den USA in Zusammenhang mit einer Koinfektion (Maggi et al., 2013) und ein weiterer Fallbericht über den molekularen Nachweis bei zwei Frauen aus Venezuela (Arraga-Alvarado et al., 2014).

#### **2.3.4. Ehrlichien**

##### **2.3.4.1. Taxonomie und Morphologie**

Bei den Ehrlichien handelt es sich um gram-negative, pleomorphe Bakterien (Skotarczak, 2003), welche obligat intrazellulär vorkommen. Sie sind durch ihre intrazelluläre Lage vor dem Immunsystem geschützt und bevorzugen dabei die hämatopoetischen Zellen, wie Lympho- und Monozyten, als Rückzugsort (Skotarczak, 2003). In diesen Wirtszellen bilden sie Einschlusskörperchen, die sich, wie bei den *Anaplasma* spp., Morulae nennen (Rikihisa, 1991).

Zusammen mit den Anaplasmen und Wolbachien gehören die Ehrlichien der Familie der *Anaplasmataceae* an und der Ordnung der Rickettsiales (Bowman, 2011). Bisher wurde in Europa nur *Ehrlichia canis* beschrieben (Aguirre et al., 2004; Keysary et al., 1996). Des Weiteren gehören dieser Gattung u.a. *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. ruminantium* und *E. muris* an (Rar and Golovljova, 2011).

#### 2.3.4.2. Wirtsspektrum und Übertragung

Das Wirtsspektrum von *E. canis* umfasst vor allem den Hund (Huxsoll et al., 1970), aber auch andere Caniden, wie Rotfüchse, Wölfe und Goldschakale (Criado-Fornelio et al., 2018; Ebani et al., 2011; Waner et al., 1999). Auch Infektionen bei der Katze wurden beschrieben (Breitschwerdt et al., 2002; Persichetti et al., 2018).

Beim Vektor handelt es sich um die Schildzecke *Rhipicephalus sanguineus*, auch braune Hundezecke genannt (Groves et al., 1975). Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass *E. canis* auch in anderen Zecken überleben und sich vermehren kann (Ferrolo et al., 2016). Die Übertragung von *E. canis* findet durch den Stich der Zecke statt und wurde in einer Studie 2013 untersucht. Dabei fand man heraus, dass bereits eine Saugdauer von 3 Stunden ausreichend für die Übertragung sein kann (Fourie et al., 2013c).

Auch eine Übertragung durch Bluttransfusion ist möglich (Woody and Hoskins, 1991).

#### 2.3.4.3. Vermehrung

Der Erreger sammelt sich in den Speicheldrüsen der Zecke und wird beim Stich mit dem Speichel übertragen. Anschließend befällt er hämatopoetische Zellen (Bauer et al., 2011) und breitet sich in retikuloendothelialen Organen aus. In diesen Organen befällt er die Phagozyten, wobei er innerhalb des betroffenen Phagozyten in Vakuolen liegt und sich dort zu Mikrokolonien, die auch als Morula bezeichnet werden, mittels Zweiteilung vermehrt. Durch anschließende Zelllyse ist der Befall neuer Zellen und so die weitere Ausbreitung möglich (Selbitz et al., 2015).

Die Zecke benötigt vor jeder Häutung eine Blutmahlzeit, während der dann eine Übertragung möglich wäre. Es findet also eine transstadielle Übertragung von *E. canis* im Vektor *R. sanguineus* statt, jedoch keine transovariable (Ipek et al., 2018). Demnach sind Nymphen und Adulte potentiell infektiös, die Larven aber nicht.

#### 2.3.4.4. Diagnostik

Die Diagnose kann theoretisch durch den Nachweis von Moruale im Blutaussstrich erfolgen. Allerdings ist dies nur in 4-6 % der klinischen Fälle erfolgreich (Mylonakis et al., 2003). Es kann eine Sensitivität zwischen 60 und 74 % erreicht werden, wenn die Ausstriche vom sogenannten buffy-coat angefertigt werden, wobei es sich um eine Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten zwischen Erythrozyten und Plasmid nach der Zentrifugation des Blutes handelt. Dabei ist trotzdem Laborpersonal mit sehr guten zytologischen Kenntnissen erforderlich (Mylonakis et al., 2003). Auch die mikroskopische Untersuchung eines Aspirationspunktats aus einem Lymphknoten zum Nachweis ist möglich.

Da die Sensitivität dieser Methoden eher gering ist, wurden serologische und molekularbiologische Methoden entwickelt, mit denen *E. canis*-Infektionen nachgewiesen werden können. Die Aussagen, zu welchem Zeitpunkt nach einer Infektion Antikörper im Blut zu finden sind, sind unterschiedlich. Man findet Angaben zu ab 7 Tagen (Baneth et al., 2009) oder auch ab 12-14 Tagen (Harrus et al., 1998a). Ebenfalls ist der Nachweis von Antikörpern aus dem Knochenmark möglich (Eddlestone et al., 2006). Der IFAT gilt als Goldstandard zur Diagnose von *E. canis*-Infektionen (Waner et al., 2001). Allerdings kann er nur in spezialisierten Laboren durchgeführt werden und unterliegt immer einer gewissen Subjektivität des Durchführenden (Waner et al., 2000). Außerdem sind Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen *Ehrlichia*-Spezies nicht auszuschließen (Breitschwerdt et al., 1998b).

Eine weitere Möglichkeit bieten verschiedene ELISA-Systeme und Schnelltests, wie zum Beispiel der Immunocomb Test. Insgesamt können serologische Tests auf Antikörper nicht zwischen einer aktuellen und einer ausgeheilten Infektion mit Antikörperpersistenz unterscheiden (Belanger et al., 2002; Gaunt et al., 2010). Der SNAP®4Dx®Plus von IDEXX verwendet rekombinante Analoge wichtiger Membranproteine, im Gegensatz zu vielen anderen Testsystemen, die Vollzellantigene verwenden. In einer vergleichenden Studie wurde eine 15 % höhere Sensitivität und 2,3 % höhere Spezifität festgestellt (Belanger et al., 2002). Allerdings war die Probenanzahl zu gering um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten. In einer anderen vergleichenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der IFAT und der SNAP®4Dx®Plus von IDEXX eine Übereinstimmung von 91 % aufwiesen (Harrus et al., 2002). Es wird empfohlen serologische Tests im Abstand von 2 bis 4 Wochen zu wiederholen, um die Aussagekraft zu erhöhen. Da das Vorhandensein von bakterieller DNA ein Zeichen für eine aktive Infektion ist, wird weiterhin angeraten positive Antikörpertests durch Nachweis mit Hilfe einer PCR abzuklären (Sainz et al., 2015).

Mittels PCR kann der Erreger auch im Gewebe nachgewiesen werden. Während der klinischen Phase ist dabei die Menge an DNA im Blut 10-fach höher als in asymptomatischen Phasen (Baneth et al., 2009). Allgemein eignet sich Blut, Knochenmark oder auch Milzgewebe gut zur Diagnostik von *E. canis* (Baneth et al., 2009; Eddlestone et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine PCR aus DNA einer Milzaspiration sehr geeignet ist (Harrus et al., 1998b). Dagegen scheint der Nachweis aus dem Kot nicht möglich zu sein (Criado-Fornelio et al., 2018). Bei der PCR aus konjunktivalen Abstrichen kommt es immer wieder zu falsch negativen Ergebnissen (Baneth et al., 2009). Es existieren etablierte real-time PCR Protokolle, welche eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen und Kreuzreaktionen mit zum Beispiel Anaplasmen ausschließen können. Auch eine neu entwickelte TaqMan PCR ist vergleichbar geeignet (Thomson et al., 2018). Ebenso können konventionelle nested PCRs für die Diagnostik oder für eine Therapieerfolgskontrolle

verwendet werden (Wen et al., 1997). Weiterhin wurden Protokolle publiziert, welche eine Erregerdifferenzierung möglich machen. So wurde zum einen eine sondenbasierte Echtzeit-Multiplex-PCR (Jahfari et al., 2012) und zum anderen ein Protokoll einer hochauflösenden PCR mit Schmelzkurvenanalyse (Krücken et al., 2013) entwickelt, mit denen sowohl der Nachweis von Anaplasmataceae als auch Unterscheidung der einzelnen Spezies und der Nachweis von *E. canis* möglich ist.

#### 2.3.4.5. Verbreitung

*Ehrlichia canis* kommt in den verschiedenen Ländern Europas vor. Aufgrund des benötigten Vektors hängt die Ausbreitung der Erkrankung stark von dessen Vorkommen ab (Gray et al., 2009). Dabei ist ein gehäuftes Auftreten in mediterranen Gegenden zu bemerken. In Portugal wurden beispielsweise Prävalenzen von bis zu 22 % durch PCR (Alexandre et al., 2009) und 24,8 % mittels IFAT (Menn et al., 2010) ermittelt. In einer Studie in Spanien 2006 wurden Hunde mittels IFAT untersucht und dabei eine Prävalenz von 16,7 % festgestellt (Solano-Gallego et al., 2006). Dagegen konnte in Barcelona mittels PCR nur eine Prävalenz von 4 % nachgewiesen werden (Tabar et al., 2009). In Italien gab es Untersuchungen, die eine Prävalenz von 1,8-13 % mittels PCR und 25-73 % mittels serologischer Methoden in den unterschiedlichen Regionen zeigten (Trotta et al., 2009). Eine Studie in der Schweiz wies mit Hilfe des IFAT eine Prävalenz von 2,2 % nach (Pusterla et al., 1998b). Deutlich geringer war die mittels SNAP®4Dx®Plus festgestellte Häufigkeit von 0,26 % in der polnischen Hundepopulation (Krämer et al., 2014). Auch eine mit SNAP®4Dx®Plus durchgeführte Studie in Frankreich konnte nur eine Prävalenz von 0,33 % nachweisen (Pantchev et al., 2009b). In Rumänien wurden in 96 Hunden, welche unspezifische klinische Anzeichen zeigten, mittels PCR keine Ehrlichien nachgewiesen (Andersson et al., 2017b). Einige Jahre zuvor wurde mittels SNAP®4Dx®Plus eine Prävalenz von 2,1 % festgestellt (Mircean et al., 2012).

Obwohl der Lebensraum von *R. sanguineus* hauptsächlich in mediterranen, ganzjährig warmen Regionen liegt, wird die Zecke auch immer wieder an anderen Orten angetroffen, was durch die Reiseaktivität, vor allem mit Hunden und dem Überleben in beheizten Räumen oder Zwingern ermöglicht wird (Dongus et al., 1996; Sainz et al., 2015). So wurde in Deutschland von Hunden mit wahrscheinlich autochthonen *E. canis*-Infektionen berichtet (Dongus et al., 1996; Gothe, 1998). Eine retrospektive Untersuchung von Hunden ohne Auslandsaufenthalt konnte bei 6,3 % Antikörper gegen Ehrlichien nachweisen, während in der PCR kein Hund positiv war (Jensen et al., 2007b). Insgesamt handelt es sich also bei der caninen Ehrlichiose vorrangig noch um eine Reise- und Importerkrankung (Jensen et al., 2007b).

Außerdem gibt es einige Veröffentlichungen, die retrospektiv Proben einbeziehen, welche in Labore zur Untersuchung auf Reisekrankheiten eingesendet wurden und dadurch als Schwerpunkt Hunde mit Reise- oder Importvergangenheit untersuchen. So wurde in einer retrospektiven Studie zwischen 2004 und 2006 eine Prävalenz von 15,8 % mittels IFAT und 3,2 % mittels PCR ermittelt (Vrhovec et al., 2017). Eine weitere Studie in diesem Zeitraum stellte bei 12,5-14,5 % der getesteten Hunde Antikörper fest (Hirsch and Pantchev, 2008). In einer Studie, welche sich ausschließlich mit Reise- und Importhunden in Deutschland beschäftigte, wurde eine Prävalenz von 10,1 % mittels IFAT ermittelt (Menn et al., 2010). Außerdem stellte eine in Süddeutschland durchgeführte Untersuchung in 2,2 % der gesammelten Zecken ein Vorkommen von *Ehrlichia canis* fest (Baumgarten et al., 1999), was einen Hinweis auf ein mögliches Vorkommen autochthoner Fälle darstellt.

#### 2.3.4.6. Klinik

Die klinischen Anzeichen einer *E. canis*-Infektion können je nach Belastung, Immunantwort des Hundes und dem Vorliegen von Begleitinfektionen mit anderen Krankheitserregern variieren. Es ist zu beachten, dass einige Hunde möglicherweise keine klinischen oder Blutbildveränderungen im Zusammenhang mit einer *Ehrlichia*-Infektion aufweisen, während andere schwere Anzeichen zeigen können. Im Allgemeinen scheint eine Ehrlichiose schwerwiegendere klinische Symptome zu verursachen als eine Anaplasrose (Egenvall et al., 1998; Harrus et al., 1997; Tabar et al., 2009).

Die canine monozytäre Ehrlichiose hat eine Inkubationszeit von 9-12 Tagen (Baneth et al., 2009) und verläuft zumeist in drei Stadien, welche unterschiedliche Ausprägungen zeigen können. Die erste akute Phase kann Wochen bis hin zu einem Monat andauern und ist gekennzeichnet von Fieber, Anorexie, Schwäche, Durchfall, Erbrechen, erniedrigter Zellzahl im Blut, blassen Schleimhäuten und Knochenmarksdepression. In der zweiten, subklinischen Phase, sind keine Symptome feststellbar. Einige Hunde können den Erreger in dieser Zeit eliminieren. Das letzte Stadium ist die chronische Phase, welche tödlich verlaufen kann. Es finden sich in dieser Zeit verschiedenste Symptome, wie Ödeme, Dyspnoe, Blutungen, Anämie, Niereninsuffizienz und neurologische sowie ophthalmologische Ausfälle (Skotarczak, 2003).

Trotz klinisch relevanter Thrombozytopenie zeigen nicht alle Hunde Blutungen. Dafür verantwortlich sind wahrscheinlich aktivierte Thrombozyten und ein hyperkoagulabler, hypofibrinolytischer Zustand (Shropshire et al., 2018).

Lahmheit und Polyarthritiden wurden lange Zeit zu den Symptomen der Ehrlichiose gezählt (Bellah et al., 1986). Allerdings existieren keine evidenzbasierten Untersuchungen, die das belegen. Somit ist eine Koinfektion mit *A. phagocytophilum* oder *B. burgdorferi* auszuschließen (Sainz et al., 2015).

#### 2.3.4.7. Therapie

Die Therapie der caninen monozytären Ehrlichiose erfolgt mit Tetrazyklinen. Dabei wird zumeist Doxycyclin verwendet, in einer Dosierung von zweimal 5 mg/kg über 21 Tage (Egenvall et al., 1997; Harrus et al., 1998a). Es wird diskutiert, ob mit dieser Therapie eine Erregerelimination möglich ist. In einer Untersuchung 2009 konnte eine Elimination bei einer akuten experimentellen Infektion mittels PCR nachgewiesen werden (Baneth et al., 2009). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass trotz Langzeittherapie oft eine Antikörperpersistenz zu sehen war, sowie eine verlängerte subklinische Phase und verzögerte Rückfälle (Bartsch and Greene, 1996). Daraus lässt sich schließen, dass akute Infektionen gut mit Doxycyclin zu therapieren sind, während dies bei chronischen Verläufen noch fraglich ist (Breitschwerdt et al., 1998a). Insgesamt ist deshalb eine Therapie anzuraten, die solange weitergeführt wird, bis Pathogenfreiheit in der PCR besteht (Harrus et al., 1998a; Little, 2010). Bei einer Langzeittherapie sollte eine regelmäßige Kontrolle der Leberwerte erfolgen. Durch die zweimal tägliche Gabe von Doxycyclin können Nebenwirkungen wie Erbrechen gemindert werden, welche bei der Verabreichung der Tagesdosis zu einem Zeitpunkt häufig beobachtet werden konnten (Harrus et al., 1998a). Imidocarbdiopropionat wurde ebenfalls als mögliche Behandlung der Ehrlichiose bei Hunden beschrieben. Neuere Studien, die in vitro und bei experimentell infizierten Hunden durchgeführt wurden, zeigten, dass Imidocarbdiopropionat gegen *E. canis* nicht wirksam war (Eddlestone et al., 2006). Allerdings kann ein Einsatz bei Koinfektionen nützlich sein. Ebenso wurden andere Antibiotika auf ihre Wirksamkeit überprüft. Dabei konnten für Rifampicin und Levofloxacin in vitro gute Ergebnisse gezeigt werden (Schäfer et al., 2008), welche sich in experimentellen in vivo Studien aber nicht bestätigen ließen (Theodorou et al., 2013). Weiterhin sollte eine symptomatische Therapie vor allem des Flüssigkeitshaushaltes, der Anämie und Thrombozytopenie erfolgen.

#### 2.3.4.8. Prophylaxe

Die wichtigste Prophylaxemaßnahme ist das Meiden von endemischen Gebieten mit dem Hund, wobei eine Untersuchung zeigte, dass begrenzte Aufenthalte, wie zum Beispiel auf Reisen, nur ein bedingtes Risiko darstellen (Hamel et al., 2013). Das Absammeln der Zecken spielt bei der Ehrlichiose eine untergeordnete Rolle, da die Übertragung nach dem Zeckenstich innerhalb weniger Stunden stattfindet. Deshalb ist entscheidend, dass ein Akarizid verwendet wird, welches einen Repellent- bzw. Anti-Attachmenteffekt aufweist und somit eine schnelle Tötung der saugenden Zecke (Fourie et al., 2013c). In einem Versuch konnte belegt werden, dass ein Kombinationspräparat aus Imidacloprid und Permethrin (Advantix®) vier Wochen vor einer *E. canis*-Infektion schützt. Es konnten zwischen 96,1 und 98,9 % der Zecken von der Infestation abgehalten werden. Kein Hund der Studie, der mit dem Präparat behandelt wurde, infizierte sich mit *E. canis* (Fourie et al., 2013a). Diese

Ergebnisse konnten auch bei einer Untersuchung im Feld bestätigt werden (Otranto et al., 2008).

In einer weiteren Studie wurde eine Kombination aus Fipronil, Amitraz und (S)-Methoprene getestet, welche 100 % der Zeckenstiche verhinderte (Fourie et al., 2013b). Dagegen konnten die Wirkstoffe Afoxolaner und Fluralaner in einer vergleichenden Studie eine Infektion nicht immer verhindern. Die Tötungsgeschwindigkeit war meist zu langsam (Jongejan et al., 2016). Diese wurde für Fluralaner in einer anderen Studie mit ungefähr 12 Stunden belegt (Wengenmayer et al., 2014).

Es existiert keine kommerziell erhältliche Impfung gegen die canine Ehrlichiose. Allerdings konnte in einer Studie gezeigt werden, dass ein abgeschwächter *E. canis*-Stamm als zukünftiger Impfstoff dienen könnte (Rudoler et al., 2012).

#### 2.3.4.9. Zoonotisches Potenzial

Die canine Ehrlichiose wird nicht als zoonotische Erkrankung angesehen (Sainz et al., 2015).

### 2.3.5. Borrelien

#### 2.3.5.1. Taxonomie und Morphologie

Bei Borrelien handelt es sich um Bakterien, die zur Familie der Spirochaetacea gehören. Zu dieser Familie werden weiterhin die Gattungen *Leptospira* und *Treponema* gezählt (Herzer, 2013). Der Erreger der Lyme-Borreliose ist *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Burgdorfer et al., 1983). Dieser Spezies-Komplex wird in 18 verschiedene Genospezies unterteilt (Margos et al., 2011). Die in Europa relevantesten sind *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia valaisiana* und *Borrelia bissettii*. Beim Hund konnte bisher nur *Borrelia burgdorferi sensu stricto* als krankheitsverursachender Erreger experimentell nachgewiesen werden. Auch *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* konnten bei Hunden in Europa isoliert werden (Straubinger, 2008).

Spirocheten haben einen wellenförmigen Körper, der zwischen der inneren und äußeren Membran, die, für die Beweglichkeit verantwortliche, Flagelle enthält (Barbour and Hayes, 1986).

#### 2.3.5.2. Wirtsspektrum

Als Wirt für Borrelien können viele verschiedene Säugetierarten, sowie der Mensch und auch Vögel dienen (Steere et al., 2004). Dabei wechselt das Bakterium immer zwischen Wirbeltier und Zeckenvektoren. Das breite Wirtsspektrum von Ixodes hat dabei dazu geführt, dass

Borrelien in so vielen Wirtsspezies zu finden sind. Allerdings infizieren nicht alle *Borrelia*-Arten jeden Wirt. *Borrelia burgdorferi sensu lato* beinhaltet viele verschiedene Genotypen mit jeweils eigener Wirtsassoziation (Kurtenbach et al., 2002).

#### 2.3.5.3. Vermehrung und Übertragung

*Borrelia burgdorferi* wird in Europa in erster Linie durch den Holzbock, *Ixodes ricinus*, übertragen (Burgdorfer et al., 1983). Auch die Infektion mittels *I. hexagonus* spielt eine Rolle (Gern et al., 1991). Weniger als 16 Stunden nach dem Stich der Zecke beginnt die Übertragung durch den Zeckenspeichel (Heile et al., 2007; Kahl et al., 1998).

Bei der Vermehrung sind Mäuse, andere Kleinsäugetiere und auch Vögel von großer Bedeutung, da sie als Reservoir dienen (Hovmark et al., 1988; Kurtenbach et al., 2002; Matuschka et al., 1994).

Das erste Entwicklungsstadium der Zecke, die aus dem Ei geschlüpfte Larve, kann bereits bei ihrer ersten Blutmahlzeit Borrelien aufnehmen. Danach häutet sie sich zur Nymphe und überträgt die Borrelien zum einen transstadiell (Stafford et al., 1998). Zum anderen kann aber bei der Blutmahlzeit der Nymphe, welche sie benötigt um eine erneute Häutung und so die Entwicklung zur adulten Zecke vollziehen zu können, auch bereits eine Übertragung der Borrelien auf den Wirt stattfinden. Nur die Weibchen brauchen dann vor der Eiablage eine weitere Blutmahlzeit. Die Borrelien persistieren im Mitteldarm der Zecke und werden erst wieder aktiv, wenn durch eine Blutmahlzeit Blut in den Darm gelangt. Daraufhin wandern die Bakterien in die Speicheldrüsen der Zecke aus und können den Wirt infizieren (Gern et al., 1996). Durch ihre Lage im Mitteldarm der Zecke wird eine relativ lange Saugdauer bis zur Übertragung benötigt. Allerdings ist es den Borrelien so möglich in der Zecke zu überwintern (Krause and Majer, 2012).

Die Inkubationszeit der Borreliose beträgt zwischen 2 und 5 Monate (Appel et al., 1993).

#### 2.3.5.4. Diagnostik

Es existieren direkte und indirekte Verfahren zum Nachweis von Borrelien.

Der Nachweis mittels direkter Methoden, wie PCR oder einer Kultur, sind schwer und wenig praktikabel (Wilske, 2003). Borrelien sind selten in Flüssigkeiten, wie Blut, Urin oder Liquor anzutreffen, eher schon in Muskel, Lymphknoten oder Bindegewebe (Krupka and Straubinger, 2010). Am höchsten ist die Sensitivität bei Kulturen von Hautbiopsien (Aguero-Rosenfeld et al., 2005; Appel et al., 1993), währenddessen die Kultivierung aus dem Blut nur äußerst selten funktioniert (Krupka and Straubinger, 2010). Die Spezifität der PCR liegt zum großen Teil bei 100 % (Aguero-Rosenfeld et al., 2005). Allerdings ist die Sensitivität oft nicht ausreichend. Bei antibiotisch vorbehandelten Patienten ist das Risiko von falsch-negativen

Ergebnissen noch zusätzlich erhöht. Außerdem kann ein positives Ergebnis auch durch nicht lebensfähige Fragmente der Borrelien ausgelöst werden (Persing et al., 1994).

Zur Diagnostik der Borreliose wird sowohl beim Menschen als auch beim Tier deshalb zumeist auf serologische Testverfahren zurückgegriffen, welche die zirkulierenden Antikörper nachweisen (Liebisch et al., 1994). Dafür eignen sich sowohl ELISA als auch IFAT oder ein Westernblot.

Beim Menschen wird vor allem das Vorhandensein von IgM Antikörpern überprüft, was in frühen Stadien der Infektion auffällt, aber nicht sehr spezifisch ist. Beim Hund ist dies keine Möglichkeit der Diagnostik (Krupka and Straubinger, 2010). Es werden erst relativ spät Antikörper gebildet (Appel et al., 1993). Da zum Zeitpunkt des Auftretens von klinischen Symptomen beim Hund meist schon IgM und IgG Antikörper vorliegen, eignet sich diese Unterscheidung nicht zur zeitlichen Einordnung der Infektion. Außerdem kommt es, beim erneuten Aufflammen der Infektion im chronischen Stadium, auch immer wieder zur Bildung von IgM Antikörpern, weshalb diese nicht zum Identifizieren einer akuten Infektion dienen können. Die Persistenz der Antikörper scheint über einen sehr langen Zeitraum, eventuell sogar lebenslang, anzudauern (Magnarelli et al., 1987; Stanek et al., 2012).

Der Westernblot gilt als Goldstandard und ist die einzige Methode, die geimpfte von ungeimpften, infizierten Hunden unterscheiden kann. Ebenso wie beim IFAT besteht allerdings der Nachteil, dass das durchführende Personal einen subjektiven Einfluss auf das Ergebnis hat und es zu Kreuzreaktionen mit zum Beispiel Leptospiren-Antikörpern kommen kann (Bruckbauer et al., 1992). Im Gegensatz zum konventionellen ELISA bietet der kinetische ELISA (KELA) die Möglichkeit zur Automatisierung und einfacheren Durchführung. Außerdem handelt es sich um eine direkte Messung der Antikörperkonzentration. Es können allerdings auch Welpen von infizierten Müttern als falsch positiv getestet werden (Chomel, 2015).

Eine weitere Möglichkeit ist der C<sub>6</sub>-ELISA, welcher in kommerzieller Form erhältlich ist und auch für die Untersuchungen dieser Studie verwendet wurde. Dabei werden nicht, wie bei den anderen serologischen Verfahren, kultivierte Vollzell-Borrelien zum Nachweis genutzt, sondern ein spezifisches synthetisches Peptid, welches aus der invariablen Region des Oberflächenproteins unterschiedlicher *B. burgdorferi*-Stämme besteht (Liang et al., 2000). Es konnten keine Kreuzreaktionen mit impfspezifischen Antikörpern oder mit anderen Spirochäten nachgewiesen werden (Liang et al., 1999) und der SNAP®4Dx®Plus reagiert nicht mit Antikörpern gegen *Borrelia miyamotoi*, dem Erreger des Rückfallfiebers. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass C<sub>6</sub>-Antikörper nach einer Antibiotikatherapie um 81 % absinken und auch nicht wieder ansteigen (Chandrashekar et al., 2017).

#### 2.3.5.5. Verbreitung

*Borrelia burgdorferi* ist weltweit in den gemäßigten Klimazonen verbreitet (Rizzoli et al., 2011; Sigal and Curran, 1991). In Europa reicht die geografische Ausbreitung vom Norden der Türkei und dem Atlasgebirge bis in den Norden Schwedens und betrifft somit auch ganz Deutschland (Chomel, 2015). In einer Metaanalyse, die 110 Publikationen aus 24 Ländern Europas auswertete, wird berichtet, dass ungefähr 18,6 % der Adulten und 10,1 % der Nymphen mit Borrelien belastet sind.

Für Deutschland existiert momentan nur eine flächendeckende, methodisch einheitliche und geografisch übergreifende Studie, welche für *Borrelia burgdorferi sensu lato*-Antikörper eine Prävalenz zwischen 1,9 % und 10,3 % in 5581 Hunden mittels SNAP®4Dx®Plus ermittelt hat. Dabei wurden, zur regionalen Unterteilung Deutschlands in insgesamt 10 Gebiete, die Postleitzahlzonen verwendet. So wurde für die Region 1 Nordost-Deutschland, zur welcher auch Berlin/Brandenburg zählt, die insgesamt niedrigste Prävalenz mit 1,9 % ermittelt, währenddessen zum Beispiel die Regionen 8 und 9, die das Bundesland Bayern umfassen, eine Prävalenz von 3,4 % bzw. 8,9 % zeigten (Krupka et al., 2007). In früheren Studien im Süden Deutschlands wurden deutlich höhere Prävalenzen ermittelt. Beispielsweise 1991 in Nordbayern, wo 130 aus einer Kleintierpraxis stammende, zufällig ausgewählte Blutproben mit dem IFAT untersucht wurden. Dabei konnte eine Prävalenz von 35,5 % festgestellt werden (Weber et al., 1991). In einer weiteren Studie in Süddeutschland, welche ebenfalls mit dem IFAT durchgeführt wurde, konnte fast 15 Jahre später eine Infektionsrate von 95 % ermittelt werden (Sum et al., 2005).

In den Nachbarländern Deutschlands, wie beispielsweise durch einen Fallbericht aus Belgien (McKenna et al., 1995), wurde über ein Vorkommen von *B. burgdorferi* berichtet. Auch in Dänemark wiesen Untersuchungen eine Seroprävalenz von 16 % im ELISA nach (Hansen and Dietz, 1989) und in Polen konnte eine Prävalenz von 11 %, welche mittels SNAP®4Dx®Plus ermittelt wurde, festgestellt werden (Dziegiel et al., 2016).

In Spanien wurden in verschiedenen Regionen Studien durchgeführt, welche zum Teil sehr unterschiedliche Prävalenzen zeigten. So wurden in der Provinz Soria, im Norden Spaniens, zwischen 1993 und 1994 Proben gesammelt und eine Seroprävalenz von 11,6 % ermittelt (Merino et al., 2000). Dagegen wurde 1995 in einer Studie in Zamora eine Prävalenz von 42,8 % nachgewiesen. Allerdings lag die Seroprävalenz in den anderen untersuchten Regionen dieser Studie bei 20 % und weniger (Delgado and Cármenes, 1995).

Untersuchte Zecken aus Schweden, Deutschland, Österreich, den Niederlanden und der Schweiz wiesen Infektionsraten zwischen 5 % und 36 % auf (Aeschlimann et al., 1987; Hovius et al., 1998; Hovmark et al., 1988). Dabei wurden unterschiedliche PCR-Protokolle und Zielgene verwendet. Bei 21 % der untersuchten Zecken konnte ein Befall mit *Borrelia burgdorferi sensu lato* nachgewiesen werden (Beichel et al., 1996). In Sachsen wurden in

einem Projekt Zecken von Wildtieren und Jagdhunden gesammelt und auf Borrelien-DNA untersucht. Dabei wiesen die Adulten eine Prävalenz von 24,9 % bis 30,4 % auf (Göttfert et al., 2009). Zu einem ähnlichen Zeitpunkt wurden im südlichen Niedersachsen Studien über das Vorhandensein von Borrelien in dort lebenden Zecken durchgeführt und eine Vorkommensrate von durchschnittlich 25 % sowohl in den Adulten als auch in den Nymphen ermittelt (Runge et al., 2010). In einer Untersuchung von 2014 in Brandenburg wurde in rund 11 % aller mit Hunden assoziierten Ixodes Zecken *Borrelia spp.* gefunden (Schreiber et al., 2014). In einer anderen Studie, die im Umland von Berlin gesammelte *D. reticulatus* und *I. ricinus* Zecken untersuchte, konnte keine DNA von *Borrelia spp.* in *D. reticulatus*, aber in 20,3 % der *I. ricinus* nachgewiesen werden (Richter et al., 2013).

Bei der Bewertung, der teilweise hohen Prävalenzen, sind jahreszeitliche und vor allem regionale Schwankungen, die zum Teil sehr deutlich ausfallen, zu bedenken (Straubinger, 2008).

#### 2.3.5.6. Klinik

Es wird vermutet, dass ca. 95 % der infizierten Hunde asymptomatisch bleiben (Barth, 2013; Littman, 2003).

Die klinische Borreliose ist durch die Entzündungsreaktion des Wirtes begründet. So wandern Granulozyten und Makrophagen zur Einstichstelle und versuchen die Bakterien mittels Phagozytose zu entfernen (Krupka and Straubinger, 2010). Diese Reaktion ist allerdings stark lokal begrenzt und kann die Erreger deshalb nur sehr selten vollständig eliminieren.

Fieber, Lymphadenomegalie, wechselnde Lahmheit, Gelenkschwellung und Anorexie stellen akute Symptome einer Infektion dar (Levy and Magnarelli, 1992; Straubinger et al., 2000). Diese verschwinden jedoch nach einigen Tagen wieder und werden häufig übersehen. Genauso wie die rötliche Schwellung, die manchmal um den Zeckenstich auftritt. Eine Erythema migrans wie beim Menschen ist beim Hund nicht zu beobachten (Krupka and Straubinger, 2010).

Bei chronischer Borreliose ist Polyarthritits das Hauptsymptom. Diese pathologischen Veränderungen in den Gelenken sind progressiv.

Weiterhin können Glomerulopathien mit Proteinverlust auftreten (Grauer et al., 1988). Fraglich ist, ob es zu fortschreitenden Nierenerkrankungen aufgrund einer Borrelieninfektion kommen kann, da in Verdachtsfällen ein solcher Verlauf beschrieben wurde, aber keine lebensfähigen Bakterien aus Nierengewebe kultiviert werden konnten.

Neurologische Dysfunktionen infolge von Perineuritiden und Meningitiden sowie Herzrhythmusstörungen aufgrund einer Myokarditis wurden in einigen Fällen beobachtet, konnten aber unter experimentellen Bedingungen nicht bestätigt werden. Auch war es nicht möglich Borrelien aus der Herzmuskulatur zu isolieren (Krupka and Straubinger, 2010).

#### 2.3.5.7. Therapie

Das Mittel der Wahl stellt Doxycyclin dar, welches für mindestens einen Monat mit 10 mg/kg Körpermasse pro Tag dosiert wird. Die Vorteile gegenüber anderen Antibiotika liegen dabei zum einen darin, dass es auch bei möglichen Koinfektionen wirksam ist und zum anderen antiphlogistisch wirkt. Des Weiteren ist es eine recht kostengünstige Möglichkeit (Straubinger et al., 1998). Auch die Gabe von Amoxicillin ist eine gängige Therapie, besonders bei empfindlichen und im Wachstum befindlichen Tieren (Krupka and Straubinger, 2010; Stanek et al., 2012). Alternativ ist auch die Verwendung eines Cephalosporin-Antibiotikums, dem Cefovecin, möglich, wobei keine tägliche orale Gabe notwendig ist (Wagner et al., 2015). Weiterhin sollte eine symptomatische Therapie bei schmerzhaften Zuständen, wie Arthritiden und ähnlichem, durchgeführt werden (Krupka and Straubinger, 2010).

Die Behandlung von seropositiven Hunden, welche asymptomatisch und ohne Proteinurie sind, stellt immer noch ein viel diskutiertes Thema dar, denn eine routinemäßige Behandlung dieser Hunde würde den Antibiotikaeinsatz erhöhen. Außerdem konnte nicht nachgewiesen werden, dass eine solche Behandlung zu einem geringeren Erkrankungsrisiko für die Hunde führt. Weiterhin kann eine Behandlung keine vollständige Erregerelimination bewirken und die Wiederinfektionsrate in endemischen Gebieten ist relativ hoch (Littman and Goldstein, 2011; Littman et al., 2018).

#### 2.3.5.8. Prophylaxe

Es gibt drei mögliche Ansätze zur Prävention einer Borrelioseerkrankung beim Hund. Zum einen ist das zeitnahe Absammeln der Zecken vom Hund nach Exposition von großer Bedeutung, wobei allerdings vor allem die Nymphen häufig übersehen werden. Beim Vergleich von drei Zeckenentfernungsmethoden konnte kein signifikanter Unterschied auf die Übertragungswahrscheinlichkeit festgestellt werden (Kahl et al., 1998).

Außerdem sollte ein akarizides Antiparasitikum möglichst mit Repellenz-Aktivität verwendet werden, wie zum Beispiel Permethrin- bzw. Permethrin-Kombi-Präparate oder Carbamate enthaltende Präparate. Eine aktuelle Studie zeigt auch eine sehr gute Wirksamkeit von Afoxolaner (Baker et al., 2016).

Die dritte Möglichkeit der Prophylaxe stellt die Impfung dar. Es handelt sich dabei um eine der wenigen Impfungen, welche außerhalb des Körpers wirken. Die Impfung induziert eine Antikörperbildung im Hund. Diese Antikörper zirkulieren im Blut und sind auch in der Haut zu finden. Mit dem Stich nimmt die Zecke die Antikörper auf und diese können dann in den Mitteldarm der Zecke wandern, wo sich die Borrelien befinden. Dort binden die Antikörper an das Oberflächenprotein OspA der Borrelien und machen diese bewegungsunfähig. Damit ist eine Wanderung in die Speicheldrüsen und so ein Infizieren des Hundes nicht möglich (Krupka and Straubinger, 2010; Straubinger, 2008). Nach der Grundimmunisierung sind

jährliche Boosterimpfungen nötig, um den Impfschutz zu erhalten. Studien zeigen eine sehr gute Wirksamkeit von Impfstoffen gegen die Entstehung der Borreliose (LaFleur et al., 2015).

#### 2.3.5.9. Zoonotisches Potenzial

Für den Menschen in Europa relevante Spezies sind in erster Linie *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* und *B. afzelii* (Wilske, 2003).

Es ist nicht abschließend geklärt inwieweit Hunde als direkte Infektionsquelle für den Menschen in Frage kommen. In einer Studie 2001 wurde kein Anhaltspunkt auf ein erhöhtes Risiko für Menschen durch mit Borrelien infizierten Hunde gefunden (Goossens et al., 2001). Wahrscheinlich scheiden Hunde die Spirochäten nicht mit den Körperflüssigkeiten aus. Allerdings wurde 1988 berichtet, dass es gelungen sei *Borrelia burgdorferi* aus dem Urin eines Hundes zu isolieren (Grauer et al., 1988). Gesunde Hunde, die für ein Jahr in direktem Kontakt mit infizierten Hunden gehalten wurden, zeigten trotzdem keine Antikörperbildung oder klinische Symptome (Appel et al., 1993).

### 2.3.6. Dirofilarien

#### 2.3.6.1. Taxonomie und Morphologie

In Europa sind fünf Filarienarten beim Hund bekannt: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Acanthocheilonema reconditum*, *Acanthocheilonema dracunculoides* und *Cercopithifilaria grassii*. Die Dirofilarien gehören zur Ordnung der Spirurida und zur Familie der Onchiocercidae (Anderson, 2000). Die Gattung *Dirofilaria* unterteilt sich zum einen in die Untergattung *Dirofilaria*, welche u.a. *D. immitis* beinhaltet, und zum anderen die Untergattung *Nochtiella*, zu welcher u.a. *D. repens* gehört (Canestri et al., 1997). Während *D. repens* genetisch recht homogen zu sein scheint, wurde in dieser Untersuchung auch festgestellt, dass es sich bei *D. hongkongensis* scheinbar um eine eigene Spezies handelt, von der auch Proben aus Thailand, die zu Hauterkrankungen geführt haben, unterschieden werden sollten. Es scheint sich insgesamt um einen kryptischen multispezies Komplex zu handeln (Yilmaz et al., 2016).

Weitere wichtige Vertreter sind *Dirofilaria ursi* und *Dirofilaria tenuis*, die aber vor allem in den USA von Bedeutung sind.

*D. repens* und *D. immitis* sind Nematoden, welche fadenförmig sind und ca. 1 mm Durchmesser haben. Sie sind von einer weißlichen Cuticula umschlossen. Die Cuticula eignet sich zur Differenzierung von *D. immitis* und der Untergattung *Nochtiella*, wie beispielsweise *D. repens*. Denn während sie bei *D. immitis* von glatter Beschaffenheit ist,

weist die Cuticula von *D. repens* im Querschnitt eine zackenartige Struktur auf, welche histologisch zu erkennen ist (Canestri et al., 1997).

Die Männchen erreichen eine Länge von 18 cm, während die Weiblichen bis zu 30 cm lang werden können. Die meisten Dirofilarien haben ein stumpfes Hinterende. Lediglich die männlichen adulten Vertreter von *D. immitis* besitzen ein aufgerolltes Hinterende (Manfredi et al., 2007).

#### 2.3.6.2. Wirtsspektrum

Dirofilarien können viele Haus- und Wildtierarten befallen. Für *D. immitis* sind Hunde die Hauptwirte, aber auch bei Wölfen, Dingos, Kojoten, Schakalen (Ionica et al., 2016), Füchsen (Magi et al., 2009) und verschiedenen Katzen konnten patente Infektionen nachgewiesen werden (McCall et al., 2008). Musteliden, wie z.B. Frettchen, Bären, Pandas, Biber, Nasenbären, Kaninchen, Hirsche, Pferde, nichtmenschliche Primaten und der Mensch stellen immer wieder Fehlwirte dar (Manfredi et al., 2007; McCall et al., 2008).

Auch *D. repens* infiziert hauptsächlich Hunde. Es gibt außerdem Berichte von Hauskatzen (Manzocchi et al., 2017a), Ginsterkatzen, Löwen und Füchsen. Ebenso wurden zahlreiche Fälle beim Menschen gemeldet. Im Jahre 2009 und zwischen 2013 und 2014 wurde die Relevanz des Fuchses als Endwirt untersucht. Allerdings konnte in keiner der 122 bzw. 179 mittels PCR untersuchten Proben ein positiver Fund verzeichnet werden (Härtwig et al., 2016; Liesner et al., 2016). In beiden Studien wurden allerdings nicht endemische Regionen untersucht. Dagegen konnte bei Untersuchungen in Italien ein Fall von *D. repens* beim Fuchs nachgewiesen werden (Magi et al., 2009).

*D. immitis* und *D. repens* benötigen einen Zwischenwirt, um ihren Entwicklungszyklus zu vervollständigen. Dazu dienen ihnen verschiedene Steckmückenarten (Cancrini and Gabrielli, 2007). In Deutschland spielen vor allem die Gattungen *Aedes* (Montarsi et al., 2015; Silaghi et al., 2017), *Culex* und *Anopheles* (Kronefeld et al., 2014) eine Rolle, in welchen bereits zwischen 2011 und 2013 in Deutschland und auch in Brandenburg die DNA von *D. repens* nachgewiesen wurde (Becker et al., 2014). Da Stechmücken ektotherm sind, ist es möglich, dass sie in tropischen Regionen ganzjährig aktiv sind. Dagegen sind sie in den gemäßigten Klimazonen vor allem auf die Sommermonate beschränkt bzw. die Zeit, in der die, für die Entwicklung benötigten, Temperaturen herrschen (Becker et al., 2014; Cancrini and Gabrielli, 2007).

#### 2.3.6.3. Entwicklungszyklus

Damit der Entwicklungszyklus der Dirofilarien vollständig ablaufen kann, werden wie bereits beschrieben ein Zwischen- und ein Endwirt benötigt. Die Makrofilarien-Weibchen sind

ovovivipar und entlassen nach der Paarung das 1. Larvenstadium (L1), die Mikrofilarien, in das Blut des Wirtes. Diese werden während einer Blutmahlzeit aufgenommen und wandern in die Malphigischen Gefäße der Culiciden, wo sich die L2 und später die L3 entwickeln. Diese Entwicklung ist temperaturabhängig. Dabei variiert die Dauer um mehrere Tage und unter 14 °C findet keine Weiterentwicklung statt (Fortin and Slocombe, 1981). So benötigen die Larven bei 22 °C zwischen 16 und 20 Tagen und bei 28 °C bereits nur noch 8-10 Tage (Cancrini and Gabrielli, 2007).

Die L3 wiederum wandern anschließend zur Mundregion und können so bei dem nächsten Stechakt wieder auf ein Wirtstier übertragen werden. Im subkutanen Bindegewebe des Endwirt entwickeln sich die Larven durch Häutung zum Stadium der L4 (Cancrini and Gabrielli, 2007).

*D. immitis* und *D. repens* unterscheiden sich in der Lokalisation im Endwirt. So sind die Adulten von *D. repens* vor allem in der Subkutis zu finden (Webber and Hawking, 1955), während die Präadulten der *D. immitis* ihre Wanderung im Wirt vollziehen und sich durch den Blutstrom meist in der Aorta pulmonalis, der Vena cava und dem rechten Herzen ansiedeln. Dort findet dann die Entwicklung zum adulten Wurm statt (McCall et al., 2008).

#### 2.3.6.4. Diagnostik

Nach einer Präpatenz von 189 bis 239 Tagen zirkulieren die Mikrofilarien in der Blutbahn des Endwirtes (Webber and Hawking, 1955). Der früheste Zeitpunkt des Nachweises von Herzwurmantigen oder Mikrofilarien ist etwa 5 bis 6 Monate nach einer Infektion. Die Antigenämie kann vorausgehen, verzögert aber manchmal das Auftreten von Mikrofilarien um einige Wochen. Darüber hinaus kann die Antigenämie bis etwa 9 Monate nach der Infektion bei infizierten Hunden unterdrückt werden, wenn diese eine makrozyklische Lakton-Prophylaxe erhalten haben. Dieses Phänomen wird auch als Antigen-Blockade bezeichnet (Drake et al., 2015).

Bei der Diagnose können bereits das klinische Erscheinungsbild und die Anamnese zu einem Verdacht führen, wobei die sehr variable Inkubationszeit beachtet werden muss. Im Falle von *D. repens* werden die subkutanen Knoten häufig mit Tumoren verwechselt (Pampiglione et al., 2001). Immer wieder wird auch von Zufallsbefunden bei Operationen, Ultraschall- oder Röntgenuntersuchungen berichtet (McCall et al., 2008).

Bei der Labordiagnostik stehen verschiedene direkte und indirekte Nachweisverfahren zur Verfügung. Es besteht die Möglichkeit des Mikrofilariennachweises über einen Blutausschrieb oder mit Hilfe des Knott-Tests bzw. modifizierten Knott-Tests (Knott, 1939). Dabei ist zu beachten, dass möglicherweise nicht alle Filarienarten unterschieden werden können (Magnis et al., 2013). Außerdem wurden verschiedene PCR Protokolle beschrieben, die zum Nachweis der Filarien DNA dienen. Dabei ist es möglich entweder durch anschließende

Sequenzierung, Restriktionslängenfragmentpolymorphismus oder durch eine Schmelzkurvenanalyse bei der real-time PCR eine Erregerdifferenzierung vorzunehmen (Albonico et al., 2014; Latrofa et al., 2012). Die Mikrofilarien sind im peripheren Blut besonders in den Abendstunden nachzuweisen, während tagsüber die Mikrofilariämie um 80-95 % verringert ist (Ionica et al., 2017). Deshalb sollte der Zeitpunkt der Blutentnahme entsprechend gewählt werden. Insgesamt ist dabei zu beachten, dass ein negatives Testergebnis nicht zum Ausschluss der Diagnose dient. Aus diesem Grund ist ein ausschließlicher Nachweis von Mikrofilarien nicht zu empfehlen (Manzocchi et al., 2017b).

Weiterhin werden serologische Nachweisverfahren häufig in der Diagnostik eingesetzt. Dabei sind besonders der ELISA zu erwähnen, sowie verschiedene kommerzielle Schnelltests, die nach ähnlichem Prinzip funktionieren und sehr gute Übereinstimmungen mit etablierten ELISAs zeigen (Henry et al., 2018). Diese weisen die zirkulierenden Antigene von adulten *D. immitis* Weibchen nach, welche während der Geburt von Mikrofilarien ins periphere Blut gelangen. Bei Hunden mit geringer Wurmbelastung ist es möglich, dass das Antigen nicht oder nur sporadisch nachgewiesen werden kann (Nelson et al., 2014). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es durch Antigen-Maskierung aufgrund der Bildung von Immunkomplexen, zum Beispiel durch prophylaktische Behandlung mit makrozyklischen Laktonen, zu falsch-negativen Ergebnissen kommen kann. Diese können durch Wärmebehandlung der Proben vor der Testung deutlich reduziert werden (DiGangi et al., 2017; Venco et al., 2017). Derzeit gibt es keine verifizierten Tests, die Infektionen erkennen können, welche nur aus erwachsenen männlichen Würmern bestehen. Bei serologischen Antigen-Tests sollten außerdem Kreuzreaktionen mit *Spirocerca lupi* in Betracht gezogen werden (Aroch et al., 2015).

Des Weiteren kann eine Typisierung der Mikrofilarien notwendig sein, wenn im Knott-Test Mikrofilarien nachgewiesen werden konnten, aber ebenfalls ein negatives Dirofilarien-Antigen Ergebnis vorliegt. In diesem Fall handelt es sich wahrscheinlich um andere Filarienarten, wie *D. repens*, *A. reconditum* oder *A. dracunculoides* (Nelson et al., 2014). Für weitere Therapie- und Prophylaxemaßnahmen kann diese Information entscheidend sein.

#### 2.3.6.5. Verbreitung

*Dirofilaria immitis* kommt weltweit in tropischen und subtropischen Gegenden vor. Zunehmend breitet sich der Erreger in die angrenzenden gemäßigten Zonen aus. So trat die Infektion zuerst in den südöstlichen Küstenstaaten der USA auf und betraf einige Jahrzehnte später bereits den ganzen nordamerikanischen Kontinent einschließlich des südlichen Kanadas (Deplazes et al., 2012b). In den europäischen Breiten des Mittelmeerraumes mit Tendenz in die nördlichen Gebiete sind Infektionen mit *D. immitis* und *D. repens* zu finden

(Genchi et al., 2005). Außerdem kommt *D. repens* in Asien und Afrika vor (Deplazes et al., 2012b).

Ausgangspunkt der Ausbreitung in Europa waren Endemiegebiete entlang der Poebene in Italien, Mazedonien und Griechenland (Genchi et al., 2011; Trotz-Williams and Trees, 2003). Zwischen 1966 und 1991 ergab sich eine 2,8-fache Zunahme der endemischen Region, wie eine vergleichende Studie feststellen konnte (Rossi et al., 1996).

*D. repens* ist in Europa bis vor einigen Jahren hauptsächlich in südlichen und östlichen Ländern, wie Italien (Pampiglione et al., 2001; Traversa et al., 2010), Frankreich (Chauve, 1997), Griechenland (Vakalis and Himonas, 1997), Spanien (Cancrini et al., 2000), der Slowakei (Miterpakovza et al., 2009) und der Ukraine (Hamel et al., 2013) nachgewiesen worden. Mittlerweile gibt es vermehrt Publikationen, die ein Vordringen in nördlichere bisher nicht endemische Gebiete beschreiben (Fuehrer et al., 2016; Magi et al., 2016; Otranto et al., 2009; Traversa et al., 2010) und von autochthonen Infektionen bei Hunden und Menschen berichten, wie beispielsweise in Österreich (Duscher et al., 2009), Polen (Demiaszkiewicz et al., 2009), Tschechien (Svobodová et al., 2006), Finnland (Pietikäinen et al., 2017), Russland (Kartashev et al., 2011), Estland (Jokelainen et al., 2016), Lettland (Stepanjana et al., 2012) und den Niederlanden (Overgaaauw and Dijk, 2009).

Diese Berichte zeigen, dass auch in Deutschland das Risiko einer Endemisierung besteht. In Deutschland gab es bereits 2004 den ersten autochthonen *D. repens* Fall bei einem Hund in Baden-Württemberg in der Region des Mittleren Oberrheins (Hermosilla et al., 2006) und 2007 sowie 2012 in einem Schlittenhundrudel in Brandenburg (Sassnau et al., 2009; Sassnau et al., 2013). In einer weiteren Studie bei 44 Jagdhunden konnten ebenfalls 3 wahrscheinlich autochthone Fälle von *D. repens* mittels PCR belegt werden (Pantchev et al., 2009a). Autochthone Fälle von *D. immitis* sind in Deutschland bisher nicht bekannt.

Sowohl das Vorkommen von *D. immitis* als auch von *D. repens* (Czajka et al., 2014) konnten in Deutschland in einheimischen Mückenpopulationen belegt werden (Kronefeld et al., 2014; Sassnau et al., 2014a).

Die klimatischen Bedingungen sind in einigen Regionen Deutschlands geeignet für das Vorkommen von Dirofilarien. Dies wird mit Prognosemodellen, in der Regel nach dem System der wachsenden Gradtage, beschrieben. Danach heißt es, dass ein Gradtag eintritt, wenn die Tagesmitteltemperatur 1 °C über der Schwellentemperatur liegt (Fortin and Slocombe, 1981). Das saisonale Transmissionsmodell geht von einer Anforderung von 130 Developing Units (DUs) bevor Larven in der Mücke ihre Infektiosität erreichen und von einer maximalen Lebenserwartung von 30 Tagen für eine Vektormücke, aus. DUs sind definiert als die tägliche Summe von Grad Celsius oberhalb der Grenze von 14 C, da sich unterhalb dieser Temperatur keine Entwicklung von *Dirofilaria*-Larven in Stechmücken möglich ist (Slocombe et al., 1989). Basierend auf diesen Annahmen wurden klimabasierte Modelle zur

Vorhersage des Auftretens und der Saisonalität von *Dirofilaria* spp. in Europa (Genchi et al., 2005; Genchi et al., 2009), Großbritannien (Medlock et al., 2006) und Argentinien (Vezzani and Carbajo, 2006) verwendet.

Aufgrund der fortschreitenden Ausbreitung werden immer wieder Prävalenzstudien in den einzelnen Ländern mit verschiedenen Nachweismethoden durchgeführt. Zum Beispiel konnten in Portugal mit serologischen Methoden, abhängig von der untersuchten Region, Prävalenzen von 13,2-24,8 % belegt werden (Alho et al., 2014). Eine andere Studie wies bei 8,8 % der Hunde *D. immitis* Antigen, bei 13,1 % der Hunde Mikrofilarien und bei 13,7 % *Dirofilaria*-DNA nach (Ferreira et al., 2017). In Italien konnte bei der Untersuchung auf *D. immitis* Antigen eine Prävalenz von 4,4 % in einem Rudel in Süditalien ermittelt werden (Del Prete et al., 2015). In Ungarn konnte eine Untersuchung mit dem SNAP®4Dx®Plus durchgeführt und in 2,4 % der Hunde im Blut zirkulierendes *D. immitis* Antigen nachgewiesen werden (Farkas et al., 2014a). Eine in Frankreich landesweit durchgeführte Studie ermittelte bei Hunden ohne Reisehintergrund und Symptome eine Prävalenz von 0,22 % mit Hilfe des SNAP-Tests. In der gleichen Studie wurden auch Hunde mit klinischen Symptomen einer Herzwurminfektion getestet und eine Prävalenz von 6,87 % festgestellt (Pantchev et al., 2009b). Eine Publikation aus Spanien berichtet über den Unterschied in der Vorkommenshäufigkeit bei der Untersuchung von Regionen in der Nähe von Gewässern und solchen, die eher entfernter davon liegen. Dabei konnte festgestellt werden, dass *Dirofilarien* ausschließlich in den gewässernahen Regionen zu finden waren und dabei eine Prävalenz von 16,7 % ermittelt wurde (Diosdado et al., 2018). In einer anderen Publikation über das Vorkommen von *D. immitis* in Madrid wurde von einer Prävalenz von 3 % in Hundeserumproben berichtet (Montoya-Alonso et al., 2017). Eine in Polen durchgeführte Studie mit insgesamt 1588 Hunden konnte kein Vorkommen von *D. immitis* nachweisen, aber eine durchschnittliche Prävalenz von 11,7 % für *D. repens* (Demiaszkiewicz et al., 2014). Im Jahre 2016 wurde eine Untersuchung in den nördlichen Ländern der EU mittels Fragebogenanalyse durchgeführt. Dabei konnte eine Gesamtprävalenz von 15 % für *D. immitis* und 9 % für *D. repens* ermittelt werden (Tiskina and Jokelainen, 2017).

Eine in Deutschland retrospektiv durchgeführte Untersuchung zeigte 2005 und 2006 eine gleichbleibende Prävalenz von 1,2 bzw. 1,1% von *D. immitis* Antigen bei in Deutschland lebenden Hunden mit Reisehintergrund (Hirsch and Pantchev, 2008). Eine andere Studie, die ebenfalls bei Hunden mit Reisehintergrund Mikrofilarien nachgewiesen hat, zeigte eine Prävalenz von 7,7 % (Menn et al., 2010). Retrospektiv betrachtete eine weitere Studie in ein deutsches Labor eingesendete Proben auf die Ergebnisse für kanine Vektor-übertragene Erkrankungen und stellte dabei eine Prävalenz von 1,4 % für im Blut zirkulierendes *D. immitis*-Antigen fest (Vrhovec et al., 2017).

Auch in Wildtierpopulationen in Europa wurden Infektionen mit *Dirofilaria* spp. gefunden. Jedoch konnte keine der Studien die Rolle von Wildtieren als Reservoirwirte belegen. Eine 2009 durchgeführte Studie im Havelland, sowie eine zwischen 2013 und 2014 in ganz Brandenburg durchgeführte Untersuchung, konnte in keiner der 122 bzw. 179 genommenen Proben von Füchsen das Vorhandensein von *D. repens* DNA nachweisen (Härtwig et al., 2016; Liesner et al., 2016).

#### 2.3.6.6. Klinik

Die Inkubationszeit beträgt mindestens 5-6 Monate, meist aber länger. Die Ausprägung der Symptomatik ist abhängig von der Anzahl der adulten Würmer und ihrer Lokalisation.

Bei einer Infektion mit *D. repens* treten als häufigstes Symptom schmerzlose Knoten in der Subkutis auf (Bredal et al., 1998). An diesen Stellen kann es zu Juckreiz kommen, eventuell auch zu Rötungen, Schwellungen oder sekundär zu einer Dermatitis (Tarello, 1999). Es wurden verschiedene Lokalisationen beschrieben (Hermosilla et al., 2006). Da die Würmer durch das subkutane Bindegewebe wandern, können sich die Knoten verändern bzw. verschwinden. Ein asymptomatischer Verlauf der Infektion ist ebenso möglich (Genchi et al., 2011).

Eine Infektion mit *D. immitis* verläuft zumeist schwerwiegender, da es zu systemischen Symptomen in Lunge, Herz, Leber und Niere kommt. Die meisten Hunde fallen anfangs durch chronischen Husten, später durch Dyspnoe und Erbrechen, eventuell auch blutiges Speicheln auf. Oft sind dabei Leistungseinbußen, Gewichtsverlust und Lethargie zu beobachten. In schweren Fällen kommt es zu Tachykardie und Tachypnoe, sowie Aszites, Anämie, Leberstauung und Nierenfunktionsstörungen (Venco, 2007). Diese Symptome werden scheinbar fast vollständig durch tote Mikrofilarien bzw. durch die Nebenprodukte ausgelöst, wie eine Studie bei der Hunde nach Antigenexposition untersucht wurden, gezeigt hat (Atwell et al., 1988). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass durch die in den Mikrofilarien vorhandenen *Wolbachia*-Antigene Immunkomplexe gebildet werden, welche sich in den Nierenglomeruli ablagern und so zu einer Proteinurie führen können (Morchon et al., 2012).

Besonders bei kleinen Hunden ist klinisch auch das Vena-cava-Syndrom bekannt. Es entsteht durch abgelagerte Wurmaggregate, welche zur Obturation der kaudalen Hohlvene, der rechten Vorkammer und den entsprechenden Klappenbehinderungen führen. Es kommt dabei auch zur intravasalen Hämolyse, in Folge dessen zu schockartigen Symptomen und zu deutlicher Hämoglobinurie (Fok, 2007; Venco, 2007).

### 2.3.6.7. Therapie

Laut aktuellen Empfehlungen der ESCCAP sollte bei der Therapie einer Dirofilariose auf eine Erregerdifferenzierung, den klinischen Zustand des Hundes, sowie die Mikrofilariendichte geachtet werden (ESCCAP, 2014). Außerdem sollte die Therapie so gewählt sein, dass letztendlich alle Larvenstadien und die Adulten eliminiert werden. Somit ist es wichtig vor einer Therapie der Makrofilarien, eine Stabilisierung der klinischen Situation vorzunehmen, zum Beispiel mit Glukokortikoiden, Flüssigkeitstherapie, Diuretika, Vasodilatoren und positiven inotrop wirkenden Präparaten.

Adultizide Arsenverbindungen, wie Melarsomin, wirken gegen die Makrofilarien. Diese Therapie kann mit starken Nebenwirkungen einhergehen. Außerdem sollte begleitend eine Thromboseprophylaxe durchgeführt werden, sowie Ruhighaltung (Kramer et al., 2018). Im Anschluss muss eine Behandlung gegen Mikrofilarien durchgeführt werden, welche durch das Melarsomin nicht erfasst werden und über Monate persistieren können (Baneth et al., 2002). Die Dauer der Therapie richtet sich nach der Schwere der Erkrankung. Es sind verschiedene Behandlungsprotokolle beschrieben, wobei berichtet wird, dass das 3-Dosis-Protokoll einen deutlich höheren Anteil Herzwürmer eliminiert, als das 2-Dosis-Protokoll und deshalb von der American Heartworm Society empfohlen wird (Nelson et al., 2014).

Makrozyklische Laktone haben eine sehr gute mikrofilarizide Wirkung, sind aber nur zur Prophylaxe zugelassen und die Herzwürmer weisen mittlerweile Resistenzen auf (Ballesteros et al., 2018; Bourguinat et al., 2011). Außerdem kann es bei einmaliger Behandlung, bei hoher Mikrofilariämie, zu erheblichen Nebenwirkungen kommen. Es gibt weiterhin Studien, die bei Behandlung mit Moxidectin (Advocate®) gute Erfolge bei der Elimination von Mikrofilarien gezeigt haben (Bowman et al., 2015; Fok et al., 2010; Hellmann et al., 2011).

Die Gabe von Arsenverbindungen oder makrozyklischen Laktone hat zum einen den Nachteil einer Reihe unerwünschter Wirkungen und zum anderen entsteht eine Lücke in der Empfänglichkeit, da die jugendlichen Würmer davon nicht erfasst werden. Diese wird durch eine verlängerte Therapiedauer und durch die zusätzliche Gabe von Doxycyclin abgedeckt (Giannelli et al., 2013a; Grandi et al., 2011). Dabei hat sich Doxycyclin als deutlich schonendere Therapie erwiesen (Kramer et al., 2011). Eine weitere Untersuchung zeigte die Effektivität einer ausschließlichen Doxycyclintherapie bei einer Infektion mit *D. immitis* (Menozzi et al., 2015). Die Wirksamkeit von Doxycyclin in diesen Fällen ist dadurch begründet, dass Tetrazykline gegen die gram-negativen Bakterien der Gattung *Wolbachia* wirksam sind (Chandrashekar et al., 2014). Diese leben in Endosymbiose mit verschiedenen Filarienarten und spielen eine Rolle bei ihrer Entwicklung (Bandi et al., 2001).

Die adulten Würmer können auch auf chirurgischem Wege entfernt werden. Dabei muss darauf geachtet werden, sie im Ganzen zu extrahieren, da sonst eine Schockreaktion riskiert wird. Indiziert ist diese Behandlung zum Beispiel bei einem schweren Vena-cava Syndrom. Als erfolgreich kann die Therapie angesehen werden, wenn zwei Antigen-Tests im Abstand von 6 Wochen negativ waren (Bendas et al., 2017).

#### 2.3.6.8. Prophylaxe

Die Chemoprophylaxe gegen Mikrofilarien mit makrozyklischen Laktonen ist sehr wirksam und nahezu nebenwirkungsfrei auch bei Langzeitanwendung (Genchi et al., 2013). Mindestens während der Zeit, in der die Stechmücken aktiv sind, sollten Hunde in endemischen Gebieten einmal monatlich behandelt werden (Nelson et al., 2014). Dabei existieren sowohl Medikamente, die p.o. verabreicht werden, wie Milbemycinoxim, als auch spot-on Präparate, wie Moxidectin (Bowman et al., 2017b), Ivermectin oder Selamectin, mit den jeweiligen Vor- und Nachteilen (McCall et al., 2008). Außerdem gibt es die Möglichkeit einer parenteralen Gabe in Form von subkutan injizierten Moxidectin-impregnierten Lipidmikrokugeln, die über einen Zeitraum von 6 Monaten kontinuierlich Wirkstoff abgeben (Cady et al., 2013; Genchi et al., 2010). In allen Fällen wird die Ausbildung adulter Stadien verhindert bzw. besteht auch eine therapeutische Wirkung bei Larven bis zum 4. Stadium. In seltenen Fällen kann es, durch die mikrofilarizide Wirkung bei einer bestehenden Dirofilariose zu unerwünschten Reaktionen kommen. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass makrozyklische Lakton resistente Isolate von *Dirofilaria* spp. existieren (Ballesteros et al., 2018; Bourguinat et al., 2011). Um trotzdem einen möglichst wirksamen Schutz für Hunde in Endemiegebieten gewährleisten zu können, wird an neuen Formulierungen geforscht und bereits zugelassene auf ihre Wirksamkeit überprüft (Bowman et al., 2017a). Des Weiteren sollte eine Stechmückenprophylaxe durchgeführt werden, zum Beispiel mit einem spot-on Kombinationspräparat aus Permethrin und Imidacloprid, Permethrin und Fipronil oder auch einem Deltamethrin-Halsband. Diese Kombination aus Permethrin und Imidacloprid wurde in einer Studie bei 41 Hunden aus einem hochendemischen Gebiet für Vektor-übertragene Erreger getestet. Dabei wurde über 6 Monate eine sehr gute Wirksamkeit sowie das Ausbleiben von Nebenwirkungen gezeigt (Abbate et al., 2018).

#### 2.3.6.9. Zoonotisches Potenzial

Infektiöse Larven von *D. immitis* und *D. repens* werden gelegentlich durch Stechmücken auf Menschen übertragen. Die Adulten entwickeln sich im Menschen meist nicht bis zur Geschlechtsreife und persistieren je nach Gattung in der Subkutis oder Okularregion bzw. bilden pulmonale Herde (Simon et al., 2012). Es werden nur selten andere Organe befallen

oder Mikrofilarien gebildet (Damle et al., 2014) und so sind auch schwerere Verläufe selten. Die subkutanen Knoten treten auch in der Schläfen- (Tappe et al., 2014) oder Nackenregion (Chan et al., 2013) auf. Dort verursachen sie Juckreiz, Schwellungen und Rötungen. Dies wird auch als kutanes Larva migrans Syndrom bezeichnet, wobei die Wanderungsgänge unter der Haut sichtbar sein können und ein brennendes Gefühl, sowie Schmerzen verursachen (Antolova et al., 2015). Die meisten humanen Fälle von *D. repens* werden allerdings bei einer Involvierung der Okularregion diagnostiziert (Agrawal et al., 2017; Arvanitis et al., 1997). Dabei darf als Differentialdiagnose *Onchocerca lupi* nicht außer Acht gelassen werden (Otranto et al., 2012).

Humane Fälle von Dirofilariosen treten weltweit auf. Die Inzidenz ist steigend (Pampiglione and Rivasi, 2000; Pampiglione et al., 2001). Von autochthonen Fällen wird bereits seit Jahren aus zahlreichen Ländern Europas berichtet. So gibt es Aufzeichnungen darüber aus Griechenland (Maltezos et al., 2002; Siepmann et al., 2005), Italien (Aiello et al., 2005), Spanien (Layne-Roldan et al., 2018), Österreich (Auer and Susani, 2008), Frankreich (Khechine-Martinez et al., 2009; Pampiglione and Rivasi, 2000), Ungarn (Pónyai et al., 2006) und Polen (Borkowski et al., 2015; Cielecka et al., 2012). Auch in Deutschland wurde erstmals 2014 über eine autochthone Infektion bei einem Menschen berichtet (Tappe et al., 2014).

### **2.3.7. Angiostrongylus vasorum**

#### **2.3.7.1. Taxonomie und Morphologie**

*Angiostrongylus vasorum*, auch als „French Heartworm“ bezeichnet, gehört zur Familie der Angiostrongylidae und wurde erstmals 1866 durch Baillet beschrieben (Baillet, 1866). Er gehört zur Ordnung der Strongylida und zum Stamm der Nematzoa.

Die Adulten sind fadenförmig und makroskopisch sichtbar. Sie haben einen Durchmesser von ungefähr 270-350 µm (Guilhon and Cens, 1973). Die männlichen Tiere sind 14-18 mm lang, während die Weibchen mit einer Länge von 18-25 mm etwas größer sind (Bourque et al., 2008). Die Männchen sind gut durch ihr rötliches, meist eingerolltes Hinterende mit einer kleinen Bursa zu erkennen und besitzen zwei 360-400 µm lange Spikula. Dagegen sind die Weibchen an ihren grauweißen, Ovarien, welche spiralig mit dem vom Blut rotgefärbten Darm verflochtenen sind, und den im Uterus enthaltenen Eiern zu erkennen (Bolt et al., 1994; Rosen et al., 1970).

Die Larven sind lichtdurchlässig und besitzen ein spitzes, im Falle der L3 mit Querrillen ausgestattetes Hinterende, welches als Unterscheidungsmerkmal zu anderen Lungenwurmlarven, wie Filaroides und Crenosoma dient (Rosen et al., 1970).

#### 2.3.7.2. Wirtsspektrum

Die Endwirte von *A. vasorum* sind zumeist Hunde und Rotfüchse (Bolt et al., 1992). Aber auch andere Caniden, wie Fennek (Bolt et al., 1994), Wölfe (De Liberato et al., 2017; Segovia et al., 2001), Goldschakale (Gavrilovic et al., 2017), Kojoten (Bourque et al., 2005) sowie Katzen (Kamenov et al., 1999) und Dachse (Torres et al., 2001) wurden als Wirte beschrieben. Bisher ist die epidemiologische Bedeutung vieler Endwirte ungeklärt (Morgan et al., 2005).

Außerdem benötigt *A. vasorum* zur Vollendung des Entwicklungszyklus einen Zwischenwirt (Guilhon and Cens, 1969). Dazu dienen verschiedene Schneckenarten (Barcante et al., 2003; Guilhon and Cens, 1973; Rosen et al., 1970), in Europa zum Beispiel die rote Wegschnecke (*Arion rufus*) (Guilhon, 1960). Experimentell konnten auch viele andere Land- und Wasserschnecken infiziert werden (Ferdushy et al., 2009; Koch and Willesen, 2009). Außerdem konnte der Grasfrosch (Bolt et al., 1993) und auch Muscheln als Zwischenwirte identifiziert werden (Mozzer et al., 2015). Die Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* gilt als der am besten geeignete experimentelle Zwischenwirt (Ferdushy and Hasan, 2010; Rosen et al., 1970).

#### 2.3.7.3. Entwicklungszyklus

Die adulten Würmer von *A. vasorum* befinden sich in den Pulmonalarterien, ihren Ästen und selten auch in der rechten Herzkammer der Endwirte. Die Weibchen legen ihre Eier in den Lungengefäßen ab, die dann über die Blutbahn zu den Alveolen transportiert werden. Die sich dort entwickelnden L1 penetrieren die Kapillar- und Alveolarwände. So wandern sie die Luftwege entlang und gelangen durch Hochhusten und anschließendes Abschlucken in den Verdauungstrakt (Rosen et al., 1970). Nach einer sehr unterschiedlich langen Präpatenz von 28-108 Tagen (Bolt et al., 1994), meist aber 33-76 Tage (Oliveira-Junior et al., 2006), werden die L1 mit dem Kot ausgeschieden (Guilhon and Cens, 1973). Die Ausscheidung der L1 kann über Jahre oder auch lebenslang andauern (Morgan et al., 2005; Rosen et al., 1970).

Zur Weiterentwicklung wird ein Zwischenwirt benötigt, welcher die Larven direkt aus dem Kot oder über Pflanzenteile und ähnliches aufnimmt (Bourque et al., 2008). Die Larven können einige Zeit in der Umwelt überleben (Sauerländer and Eckert, 1974), aber nehmen dabei an Infektiosität ab (Ferdushy et al., 2010). In der Schnecke entwickelt sich dann innerhalb von ca. 3 Wochen die L1 zur L3 (Guilhon, 1960; Rosen et al., 1970). Abschließend infizieren sich die Endwirte durch Aufnahme der Zwischenwirte. Die Larven dringen in die Darmwand ein, entwickeln sich zur L4 und werden als Präadulte über den Mesenteriallymphknoten und die Portalvene in das Herz und schließlich in die Lungenarterien transportiert (Guilhon and Cens, 1973).

#### 2.3.7.4. Diagnostik

Aufgrund der Einfachheit wird häufig ein direkter Erregernachweis, durch mikroskopische Untersuchung eines Direktausstriches, einer Flotation oder das Auswanderungsverfahren nach Baermann-Wetzel für die Diagnose von *A. vasorum* in Kotproben eingesetzt. Da die Ausscheidung von *A. vasorum* Larven jedoch intermittierend ist (Oliveira-Junior et al., 2006; Schnyder, 2010), sollten Proben von drei aufeinander folgenden Tagen getestet werden, um die Sensitivität zu erhöhen (Bolt et al., 1994; Chapman et al., 2004). Insgesamt weist das Auswanderungsverfahren nach Baermann-Wetzel die höchste Sensitivität dieser Verfahren auf, da es zum Beispiel bei der Flotation durch das verwendete Flotationsmedium zu osmotischen Schäden kommen kann und beim Direktausstrich nur sehr wenig Material untersucht wird (Koch and Willeßen, 2009).

Es sind noch verschiedene weitere Möglichkeiten zur Diagnose der L1 beschrieben. So kann der Nachweis auch durch Trachealwäsche, einen Trachealabstrich (Ramsey et al., 1996) oder eine bronchoalveoläre Lavage (Barcante et al., 2008) sowie durch Feinnadel-Lungenaspirate (Tebb et al., 2007) erfolgen. Dabei handelt es sich um deutlich invasivere Verfahren, als eine Kotprobenuntersuchung und auch in diesem Fall führt ein negatives Ergebnis nicht zum Ausschluss der Diagnose. Allerdings ist zum Teil ein sehr früher Nachweis möglich und auch die zytologische Analyse, durch den Nachweis erhöhter Zellzahlen oder das vermehrte Vorkommen von Entzündungszellen, kann Hinweise bei der Diagnosestellung liefern (Barcante et al., 2008; Chapman et al., 2004).

Differentialdiagnostisch darf *Crenosoma vulpis* und Protostrongyliden bei der mikroskopischen Untersuchung nicht außer Acht gelassen werden.

Da die morphologische Diagnose in diesem Fall ein Verfahren mit fraglicher Sensitivität ist (Cannon et al., 2018; Verzberger-Epshtein et al., 2008), wurden serologische Tests wie ELISA und Western Blot-Analyse, die *A. vasorum*-Infektion auch schon während der Präpatenz nachweisen, entwickelt (Guardone et al., 2013). Im ELISA können das zirkulierende Antigen oder die Antikörper mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden (Schnyder et al., 2011). Allerdings kommt es immer wieder zu Kreuzreaktionen mit *Crenosoma*, *Toxocara canis* und *Dirofilaria immitis*. Weiterhin wurde berichtet, dass zum Teil eine Wärmebehandlung der Proben, vor der Testung mit dem ELISA zu einer besseren Sensitivität führt, da weniger falsch-negative Ergebnisse entstanden (Gillis-Germitsch and Schnyder, 2017). Dies ist wahrscheinlich mit dem Lösen von Immunkomplexen während der Erwärmung zu erklären.

Außerdem ist ein kommerzieller Schnelltest erhältlich, der eine Sensitivität von 84,6 % und eine gute Spezifität, aber auch Kreuzreaktionen mit *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Crenosoma vulpis*, *Oslerus osleri*, *Eucoleus aerophilus*, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*,

*Acantocheilonema reconditum* und *Dipetalonema dracunculoides* aufweist (Liu et al., 2017; Schnyder et al., 2014).

Weitere Methoden des indirekten Nachweises sind die PCR und die real-time PCR. Dabei wird das Vorhandensein von ribosomaler DNA als Nachweis der Adulten und Larven aus den Zwischenwirten, dem Kot oder Blut des Endwirtes gezeigt (Caldeira et al., 2003; Jefferies et al., 2009; Varela et al., 2018). Es ist eine Differenzierung von *A. vasorum* von anderen Angiostrongylus- und Lungenwurm-Arten möglich.

Eine Studie ergab, dass es die Wahrscheinlichkeit eine Infektion mit *A. vasorum* zu erkennen, maßgeblich steigert, wenn man eine Kombination aus serologischen und molekular-biologischen Methoden zum Nachweis wählt (Jefferies et al., 2011).

Durch bildgebende Verfahren besteht die Möglichkeit, die durch eine *A. vasorum* Infektion entstandenen Veränderungen an Lunge und Herz zu dokumentieren (Dennler et al., 2011). Allerdings konnten in Studien keine pathognomischen, radiologischen Veränderungen festgestellt werden (Coia et al., 2017). Während in einer Untersuchung 61,4 % der Hunde Veränderungen zeigten (Willesen et al., 2007), waren es einer Anderen sogar 94,7 % (Chapman et al., 2004). Darunter auch Hunde ohne respiratorische Symptome.

#### 2.3.7.5. Verbreitung

*Angiostrongylus vasorum* kommt in weiten Teilen Europas, Afrikas, sowie Nord- und Südamerikas vor. Dabei sind vorallem die tropischen, subtropischen und gemäßigten Klimagebieten betroffen. In den letzten Jahren kamen zu den bekannten Endemiegebieten neue Herde hinzu (Morgan et al., 2005) und es werden weltweit sporadische Fälle von Angiostrongylose bei Hunden publiziert (Bolt et al., 1994). So wird von Fällen in Ungarn (Benda et al., 2017; Schnyder et al., 2015), Schweden (Grandi et al., 2017), Portugal (Alho et al., 2018), Großbritannien (Chapman et al., 2004; Kirk et al., 2014; Martin and Neal, 1992), Italien (De Liberato et al., 2017; Del Prete et al., 2015; Liberato et al., 2018), Belgien (Lempereur et al., 2016), Frankreich (Schnyder et al., 2017) und Polen (Schnyder et al., 2013) berichtet.

Der erste Hund mit Angiostrongylose in Deutschland konnte in einer Sektion im Jahre 1967 diagnostiziert werden (Pallaske, 1967). Trotzdem ging man lange Zeit davon aus, dass *A. vasorum* in Deutschland nicht vorkommt bzw. es sich um vereinzelte, importierte Fälle handelte. So wurden 8438 Kotproben von Hunden aus ganz Deutschland untersucht. Zwischen 1999 und 2002 konnte dabei eine Prävalenz von 0,1 % für *A. vasorum* ermittelt werden (Barutzki and Schaper, 2003). Im Jahre 2004 wurde bei der Untersuchung von 1281 Kotproben mittels Auswanderungsverfahren *A. vasorum* nicht nachgewiesen (Epe et al., 2004). In einer weiteren Studie wurden Hunde mit respiratorischen Symptomen untersucht. Die Auswertung von 958 Proben im Zeitraum von 2003 bis 2007 ergab 12 positive Befunde

für *A. vasorum* (Taubert et al., 2009). Im Gegensatz zu früheren Vermutungen konnte in dieser Studie wie auch in einer Weiteren im Jahre 2008 festgestellt werden, dass der überwiegende Teil der positiven Hunde aus südlichen und westlichen Teilen Deutschlands stammte. Diesem Hinweis auf endemisches Vorkommen folgend, wurde in einer 2008 durchgeführten Untersuchung, in welcher 443 Hunde mit klinischen Symptomen einer potentiellen Infektion mit *A. vasorum* mit Hilfe von Kotprobenuntersuchungen getestet wurden, weiter nachgegangen. Dabei konnte eine Prävalenz von 1,8 % ermittelt werden (Herмосilla et al., 2009). Bei einer anderen deutschlandweiten Prävalenzstudie zwischen 2007 und 2009 wurden jeweils drei Kotproben von Hunden mit respiratorischen, kreislaufbedingten oder neurologischen Symptomen oder auch Blutgerinnungsstörungen untersucht. Nur Hunde, die die letzten drei Monate vor Entwicklung ihrer Symptome nicht im Ausland waren, nahmen an der Studie teil. Dabei konnte bereits bei 7,4 % der Hunde eine Infektion mit *A. vasorum* nachgewiesen werden, was deutlich über den bis dahin ermittelten Prävalenzen lag (Barutzki and Schaper, 2009).

In den letzten Jahren wurde außerdem immer wieder über einzelne Infektionen in der nördlichen Schweiz und dem südlichen Deutschland berichtet, wobei vermutet wird, dass es sich um autochthone Infektionen handelt (Staebler et al., 2005). Das Vorkommen möglicher Zwischenwirte in nördlicheren Gebieten konnte in einer Studie, die um Kopenhagen herum durchgeführt wurde, ebenfalls bestätigt werden (Ferdushy et al., 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass der Fuchs als Reservoir dient und die Prävalenzen, in den jeweiligen Gebieten meist deutlich über denen der Hunde liegen (Koch and Willesen, 2009).

#### 2.3.7.6. Klinik

Das klinische Erscheinungsbild der Angiostrongylose ist sehr vielfältig. Die Verlaufsformen reichen von asymptomatisch bis tödlich (Koch and Willesen, 2009).

Die Symptome lassen sich in vier Komplexe einteilen: kardiovaskulär, respiratorisch, neurologisch und gastrointestinal. Die durch die Alveolenwand bohrenden Larven führen zu Blutungen, Thrombosierungen und Verbrauchskoagulopathien mit der Folge von Anämien sowie hämorrhagischen Diathesen (Glaus et al., 2016; Pallaske, 1967; Ramsey et al., 1996). Außerdem kommt es durch die Eier, Larven und Adulte in den Gefäßen zu Obliterationen. Die Larvenwanderung führt weiterhin zu granulomatösen Entzündungen. Als Folge der Lungenveränderungen fallen häufig Rechtsherzdilatation mit Folgen wie Aszites, Konditionsverlust, Husten und Dyspnoe auf (Chapman et al., 2004). Im akuten Stadium treten diese Symptome oft in Verbindung mit reduziertem Allgemeinbefinden und Appetitlosigkeit auf (Koch and Willesen, 2009). Im weiteren Verlauf kann die fortschreitende Rechtsherzsymptomatik zu plötzlichen Todesfällen führen. Seltener kommt es auf Grund der zerebralen Hypoxie oder auch durch die larvale Streuung ins Zentralnervensystem, zu

Muskelzittern, ataktischem Gang, Schwindel, vestibulärem Syndrom bis hin zu epileptiformen Anfällen (Jang et al., 2016; Reifinger and Greszl, 1994). Als gastrointestinale Beschwerden treten vor allem Erbrechen und Durchfall (Chapman et al., 2004; Oliveira-Junior et al., 2006), wahrscheinlich aufgrund der Irritation der Mukosa durch die Larven, auf (Oliveira-Junior et al., 2006).

Im Blutbild fallen vor allem regenerative Anämien, Eosinophilie, Thrombozytopenie und Veränderungen der Gerinnungsparameter auf (Brennan et al., 2004). In einer Studie mit experimentell infizierten Hunden wurden Einflüsse auf das Blutbild untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es keine signifikanten biochemischen Auswirkungen der Infektion gibt. Allerdings konnte das Creatinkinase-Isoenzym MB als Indikator für durch *A. vasorum* ausgelöste Herzerkrankungen verwendet werden kann (Cury et al., 2005).

Eine Reihe von unspezifischen Symptomen, die auch durch die systemische Wanderung der Parasiten entstehen, können die Diagnostik erschweren (Di Cesare et al., 2015; Jolly et al., 2015; Schnyder, 2010). So sind Fälle von Augenerkrankungen durch *A. vasorum* Infektionen beschrieben (Colella et al., 2016; Perry et al., 1991).

#### 2.3.7.7. Therapie

Wirkstoffe, aus der Gruppe der Benzimidazole, wie Fenbendazol, oder aus der Gruppe der makrozyklischen Laktone, wie Milbemycinoxim und Moxidectin, haben sich in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Behandlungsprotokollen zur Therapie von Hunden als geeignet erwiesen (Bird et al., 2018; Böhm et al., 2017; Conboy, 2004).

In einer randomisierten Blindstudie wurden 2007 50 erkrankte Hunde, aufgeteilt in zwei Gruppen, mit Fenbendazol 20 mg/kg für 20 Tage p.o. bzw. mit einmalig 0,1 ml/kg Imidacloprid 10 % Moxidectin 2,5 % spot-on Lösung behandelt. Die Effizienz wurde mit 85,2 % Wirksamkeit bei dem Spot-on und 91,3 % bei der Fenbendazoltherapie festgestellt und so konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Therapien ermittelt werden (Willesen et al., 2007).

Eine andere Studie testete die Wirksamkeit einer Kautablette mit einer Wirkstoffkombination aus Afoxolaner und Milbemycinoxim. Bei monatlicher Anwendung konnte eine Wirksamkeit von 94,9 % festgestellt werden (Lebon et al., 2016).

Eine Publikation aus dem Jahre 1996 berichtet von schweren Nebenwirkungen einer Levamisol-Therapie, weshalb empfohlen wird, auf andere Wirkstoffe bei der Behandlung von *A. vasorum* Infektionen zurückzugreifen (Soland and Bolt, 1996).

Neben der anthelmintischen Therapie werden häufig Antibiotika, Bronchodilatoren, Diuretika, Heparin oder Kortikosteroide als symptomatische Behandlung eingesetzt.

#### 2.3.7.8. Prophylaxe

Die Prophylaxe gestaltet sich im Falle von *A. vasorum* schwierig, da dies vor allem durch das Verhindern der Aufnahme von Schnecken bzw. den L3 aus der Umgebung und vom Futter des Hundes möglich wäre. Kiesböden können das Infektionsrisiko, vor allem in Zwingerhaltung und Ausläufen, senken (Eckert and Lämmler, 1972). Außerdem ist als prophylaktische Maßnahme die ordnungsgemäße Entsorgung von Hundekot wichtig, um die Umwelt frei von Verunreinigungen mit L1 zu halten. Ebenso relevant ist es den Zyklus von *A. vasorum* durch die regelmäßige Untersuchung von Kotproben, auch asymptomatischer Hunde und die eventuelle Behandlung infizierter Tiere, zu unterbrechen (Martin et al., 1993).

#### 2.3.7.9. Zoonotisches Potenzial

*Angiostrongylus vasorum* scheint kein zoonotisches Potenzial zu haben. Von human-pathogener Bedeutung sind dagegen *Angiostrongylus costaricensis* (Morera and Céspedes, 1971) und *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935).

Der Mensch wird durch die Aufnahme von rohen Schnecken oder deren Schleimhäuten an ungekochtem Gemüse und Obst infiziert. Die meisten Fälle von *Angiostrongylus costaricensis* wurden in Costa Rica gemeldet wurden (Strickland, 2000), aber auch aus den USA, Argentinien, von einige karibischen Inseln (Strickland, 2000) und in Zaire in Afrika (Baird et al., 1987) wurden Fälle diagnostiziert. Der erste Ausbruch der Infektion wurde in Guatemala festgestellt (Kramer et al., 1998). In Venezuela wurden ebenfalls bei zwei Menschen chirurgische Proben der Ileocaecalregion, die als pseudotumoröse eosinophile Ileokolitis parasitären Ursprungs diagnostiziert wurden, gefunden (Incani et al., 2007)

*Angiostrongylus cantonensis* hat sich von den traditionellen endemischen Regionen der pazifischen Inseln und Südostasiens auf den amerikanischen Kontinent einschließlich der USA, der karibischen Inseln und Brasiliens ausgebreitet. Der Mensch erwirbt *A. cantonensis* durch den Verzehr von rohen Zwischenwirten, wie Schnecken oder paratenischen Wirten, wie Fröschen oder Krebsen. (Wang et al., 2012)

### **2.3.8. Hepatozoon canis**

#### 2.3.8.1. Taxonomie und Morphologie

*Hepatozoon canis* ist ein Protozoon der Unterklasse Coccidia aus dem Stamm der Apicomplexa, das erstmals im Blut von Hunden in Indien nachgewiesen und als *Leukocytozoon canis* bestimmt wurde (Christophers, 1907; James, 1905). Es gehört zur Familie der Hepatozoidae der Unterordnung Adeleorina. Diese Familie besteht aus mehr als 300 Arten (Smith, 1996). Für Hunde haben *H. canis* und *H. americanum* klinische Bedeutung

(Baneth and Shkap, 2003). Diese Spezies weisen unterschiedliche geografische Verbreitung, Pathogenität und Vektorspektrum auf (Baneth, 2011; Ewing and Panciera, 2003).

Im Blutaussstrich sind backsteinförmige Gamonten in den Leukozyten zu erkennen. Es handelt sich dabei um längsovale, azidophile Einschlusskörperchen (Christian, 2018; Heile and Schein, 2008).

#### 2.3.8.2. Wirtsspektrum

Das Wirtstier- und Vektorspektrum von *H. canis* ist scheinbar sehr breit, umfasst Säugetiere, Vögel und Reptilien und ist nicht abschließend geklärt (Smith, 1996). Für die braune Hundezecke *R. sanguineus* (Christophers, 1907), und die Zwischenwirte Hund und verschiedene wilde Caniden, konnte der Zyklus allerdings mit großer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden (Attipa et al., 2018a; Baneth et al., 2001; Nordgren and Craig, 1984). Neben *R. sanguineus* als Vektor von *H. canis* (Dantas-Torres et al., 2012; Gabrielli et al., 2010) wurden in verschiedenen Untersuchungen auch andere Zeckenarten als Vektoren für diesen Parasiten bestätigt, darunter *Amblyomma ovale* (Forlano et al., 2005; Rubini et al., 2009) und *Rhipicephalus turanicus* (Giannelli et al., 2017).

Des Weiteren wurde *H. canis* in gesogenen *I. ricinus*, *I. canisuga*, *I. hexagonus* und *D. reticulatus* aus Deutschland (Najm et al., 2014b), sowie in *I. ricinus* aus Italien (Gabrielli et al., 2010; Giannelli et al., 2017) und Luxemburg (Reye et al., 2010) nachgewiesen. Auch wurde von Funden in gesogenen *Haemaphysalis punctata* und *Haemaphysalis concinna* berichtet (Andersson et al., 2017a). In Ungarn konnten *H. canis* positive Zecken der Spezies *D. marginatus*, *D. reticulatus* und *Ha. concinna* auch auf PCR-negativen Hunden gefunden werden (Hornok et al., 2013). De Miranda et al. (2011) entdeckten Oozysten von *H. canis* in der Hämolymphe von natürlich infizierten *Rhipicephalus microplus*, die von einem infizierten Hund entfernt wurde. In Japan wurde *Haemaphysalis longicornis* und *Haemaphysalis flava* als weitere potenzielle Zeckenvektoren gefunden (Murata et al., 1995).

Der Zeckenvektor von *H. americanum* ist *Amblyomma maculatum*. Die Zecke ist in ihrer regionalen Ausbreitung auf die Golfküste von Nordamerika und die südliche Atlantikküste beschränkt (Williams, 2002). Sie wurde auch aus Mittelamerika und dem nördlichen Südamerika gemeldet (Estrada-Pena et al., 2005). Berichte über eine *H. americanum*-Infektion bei Hunden außerhalb der USA fehlen, obwohl bei einer Wildtieruntersuchung eine 18S rDNA-Sequenz beschrieben wurde, die 97 % Ähnlichkeit mit der von *H. americanum* aufwies. Die Probe wurde von einem Krabbenfuchs (Maikong, *Cerdocyon thous*) aus Brasilien genommen (Criado-Fornelio et al., 2006). In den letzten Jahrzehnten hat sich der Bereich von *A. maculatum* nach Norden ausgedehnt, mit Populationen, die heute in Gebieten von Oklahoma, Kansas, Kentucky und einigen anderen Staaten etabliert sind

(Estrada-Pena et al., 2005). Darüber hinaus wurde aus Kalifornien, Washington und Vermont von einem Vorkommen von *H. americanum* berichtet (Li et al., 2008). In einigen Staaten außerhalb dieses Bereichs, der durch den Zeckenvektor besiedelt ist, wurden, vermutlich aufgrund der Umsiedlung infizierter Hunde aus endemischen Gebieten, auch vereinzelte Fälle gefunden.

Das Wirtsspektrum von *H. canis* umfasst hauptsächlich Fleischfresser, wie Hund (Criado-Fornelio et al., 2007b), Fuchs (Alencar et al., 1997; Conceição-Silva et al., 1988; Criado-Fornelio et al., 2003; Maede et al., 1982), Kojote, Schabrackenschakal (Macintire et al., 1997), Goldschakal (Shamir et al., 2001), Afrikanischen Wildhund (Shkap et al., 1994), Hyäne, Gepard, Leopard und Löwe (McCully et al., 1975). Das Potenzial von *H. canis*, auch andere Arten zu infizieren, ist gegeben und konnte durch experimentelle Übertragungen und vergleichende genetische Typisierung der erhaltenen Isolate bestätigt werden (Ivanov and Tsachev, 2008). So konnte *H. canis* dann auch in Nagern nachgewiesen werden (Hamsikova et al., 2016).

Der Rotfuchs stellt ein mutmaßliches Reservoir für Haushunde dar (Cardoso et al., 2014; Hodzic et al., 2015). Eine Studie, die die Reservoirfunktion von Goldschakalen in Rumänien, Tschechien und Österreich betrachtete, fand mittels PCR heraus, dass 70 % der untersuchten Tiere positiv für *H. canis* waren (Mitskova et al., 2017). Wahrscheinlich haben sie eine ähnliche Funktion bei der Ausbreitung von *H. canis*, wie die Rotfüchse.

#### 2.3.8.3. Entwicklungszyklus

*Hepatozoon canis* hat eine für Kokzidien eher untypische Entwicklung mit Schizogonie und Gamontenbildung im Wirbeltier-Wirt und Sporogonie im Vektor.

Die Vektorzecke nimmt im Nymphenstadium infiziertes Blut von einem Hund auf. Die Gamonten von *H. canis* befinden sich in den Leukozyten (Baneth et al., 2001; Baneth et al., 2007; Craig, 1990; Gevrey, 1993). Im Darm der Zecken teilen sich die Gamonten und bis zu 24 Stunden nach der Infektion bilden sich Makro- und Mikrogamonten, welche sich paarweise aneinanderlagern und fusionieren. Nach dem 8. Tag konnten Zygoten und junge Oozysten nachgewiesen werden. Die Sporogonie endet etwa am 50. Tag nach der Aufnahme von infiziertem Blut (Baneth et al., 2001; Baneth et al., 2007). Die Zygote dringt durch die Darmwand ins Hämocoel ein und die Oozysten entwickeln sich, wobei Sporozysten mit Sporozoiten entstehen. Der Hauptweg der Infektion bei Hunden ist die orale Aufnahme einer Zecke, die sporulierte Oozysten enthält (Baneth, 2011; Ewing and Panciera, 2003). Im Hundedarm werden die Sporozoiten frei, dringen ins Darmepithel ein und gelangen über Lymph- oder Blutgefäße in das hämolymphatische Gewebe, einschließlich Knochenmark, Milz und Lymphknoten, ein. Dort findet die Schizogonie statt. Dabei entwickeln sich aus den Schizonten der 1. Generation Makromerozoiten, welche große

Schizonten der 2. Generation bilden. Die daraus entstehenden Mikromerozoiten befallen dann schließlich die Leukozyten und entwickeln sich zu Gamonten (Beaufils et al., 1988).

Bei *H. canis* wurde von einer transphasischen Übertragung von Nymphe zu Adulten berichtet (Murata et al., 1993). Eine transovarielle Übertragung wurde nicht beobachtet (Baneth et al., 2001).

Experimentelle Infektionen waren mit der parenteralen Beimpfung von Gewebe oder Blut von infizierten Hunden nicht erfolgreich, konnten aber mit der Eingabe von Zeckengewebe-emulsionen erreicht werden (Wenyon, 1926). *Hepatozoon americanum* kann zusätzlich durch die Einnahme von Beute, die die Zystozystenstadien des Parasiten enthält, verbreitet werden. Dieser Übertragungsweg konnte für *H. canis* bisher nicht nachgewiesen werden (Baneth, 2011).

Eine Studie, die den Lebenszyklus von *H. canis* und *R. sanguineus* bei Haushunden untersuchte, fand heraus, dass die Präpatenz 81 Tage beträgt (Baneth et al., 2007). Des Weiteren konnte die Dauer der einzelnen Abschnitte der Entwicklung erforscht werden. So konnten nach 40 Tagen reife Oozysten in den Zecken nachgewiesen werden und ab 13 Tage nach der Aufnahme durch die Hunde kam es zur Merogonie im Knochenmark. Die Gamontogonie mit Infektion von Leukozyten durch Mikromerozoiten trat ab 26 Tagen nach der Infektion auf, und Gamontparasitämie wurde nach 28 Tagen nachgewiesen (Baneth et al., 2007).

#### 2.3.8.4. Diagnostik

Aufgrund ihres komplexen Lebenszyklus können die Stadien von *H. canis* in einer Vielzahl von Geweben gefunden werden. Blut ist das am häufigsten verwendete Material für die intravitale Diagnostik (Modrý et al., 2017). Mit einem Blutaussstrich kann eine Infektion schnell, kostengünstig und ohne besondere Ausstattung nachgewiesen werden. Diese Methode ist meist nur bei Tieren mit hoher Parasitämie aussagekräftig. Für subklinische Infektionen und für solche, die während der klinischen Erkrankung niedrige Parasitämiewerte produzieren, ist die Sensitivität deutlich verringert (Vincent-Johnson et al., 1997). Da die Gamonten fast ausschließlich in den Leukozyten zu finden sind, erhöht die Verwendung der Buffy Coat-Schicht die Sensitivität für den mikroskopischen Nachweis (Otranto et al., 2011). Gamonten haben eine ovale Form, Abmessungen von 8-12 × 3-6 µm und werden im Zytoplasma von Neutrophilen und selten in dem von Monozyten gefunden. Geeignet sind Romanowsky-Färbungen, einschließlich Giemsa-Färbungen und kommerzielle Schnellfärbungen, wie Diff-Quick. Auch Färbungen nach Pappenheim und Hemacolor werden häufig verwendet.

Die verschiedenen Lebensphasen von *H. canis* im Hund können auch durch Zytologie oder Biopsie-Histopathologie im Knochenmark, in der Milz, in den Lymphknoten oder im

gestreiften Muskel nachgewiesen werden. Die Milz ist jedoch das primäre Zielorgan für den Nachweis des Parasiten (Baneth et al., 2007). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Blut weniger geeignet als Milzgewebe für die Diagnostik ist (Duscher et al., 2014; Hodzic et al., 2018). Es konnten Schizonten von *H. canis* in histologischen oder Abklatschpräparaten von Lymphknoten, Milz und Knochenmark beobachtet werden. Diese sind rund oder oval, mit einem Durchmesser von ca. 30 µm und enthalten 2 oder 4 Makromerozoiten oder über 20 Mikromerozoiten. Histologisch konnten Mikroschizonten mit der sogenannten "Radspeichenform" beobachtet werden. In Muskelbiopsien sind die Schizonten der 2. Generation nachweisbar (Craig, 1990).

Da allerdings die pathogenen Stadien, die Schizonten der 1. Generation, bereits starke Schäden hervorrufen bevor überhaupt Gamonten im Blut nachweisbar sind, wurden serologische Assays zum Nachweis von Antikörpern gegen *Hepatozoon* spp. bei Hunden entwickelt. Ein IFAT für Anti-*H. canis*-Antikörper mit Gamonten-Antigen wurde in epidemiologischen Studien in Israel, Japan und der Türkei verwendet (Baneth et al., 1996; Karagenc et al., 2006; Shkap et al., 1994) und ein IFA-Test mit Sporozoiten-Antigenen, die von Zecken stammen, wurde zum Nachweis von Anti-*H. americanum*-Antikörpern entwickelt. Der letztgenannte Test erwies sich bei der Diagnose dieser Infektion als so empfindlich wie eine Muskelbiopsie (Mathew et al., 2000). Darüber hinaus wurde ein ELISA für Anti-*H. canis*-Antikörper auf Basis von Gamonten-Antigen entwickelt (Gonen et al., 2004). Bei der Verwendung des *H. canis* ELISA mit Seren von mit *H. americanum* infizierten Hunden wurde eine Kreuzreaktivität festgestellt (Gonen et al., 2004).

In den letzten zehn Jahren wurden serologische Tests aber weitgehend durch molekularbiologische Methoden ersetzt aufgrund der besseren Sensitivität. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der histopathologische Nachweis des Parasiten signifikant weniger sensitiv ist als die PCR (Cardoso et al., 2014).

Es wurden verschiedene konventionelle PCR-Protokolle und Primer für den Nachweis von *H. canis* entworfen. Viele Primer amplifizieren ein breites Spektrum an Zielsequenzen, weshalb eine anschließende Sequenzierung empfohlen wird (Modrý et al., 2017). Aus diesem Grund werden für die Diagnostik eher Primer verwendet, die sehr spezifisch eher kurze PCR Produkte erstellen, was für eine phylogenetische Analyse aber ungeeignet wäre (Modrý et al., 2017). Auch nested-PCRs mit dem Nachteil des höheren Kontaminationsrisikos und der höheren Kosten wurden entwickelt. Ebenso gibt es zwei qPCR-Assays, die auf das konservierte 18S rRNA-Gen abzielen. Diese wurden etabliert, um die Prävalenz und Intensität der Hepatozoon-Infektion bei Fleischfressern zu bewerten (Criado-Fornelio et al., 2007a; Li et al., 2008). Mit den Primern HEP1 und HEP2 konnten Criado-Fornelio et al. Arten, die Caniden und Feliden infizieren, trennen ohne Schmelzkurvenanalyse, während die andere qPCR in Kombination mit einem „fluorescence

resonance energy transfer“ (FRET) einzelne Ziel-DNAs mit 100%iger Spezifität identifizierte und so die Differenzierung von den für Hunde relevanten Spezien *H. canis* und *H. americanum* ermöglichte (Kelly et al., 2013; Li et al., 2008). Das erste und bisher einzige qPCR-Protokoll, das auf der Schmelzkurvenanalyse basiert und die Unterscheidung zwischen einer gemischten Infektion von Adeleoriniden und Eimerioriniden ermöglicht, wurde entwickelt, um deren Anwesenheit in Reptilien zu untersuchen (Maia et al., 2014).

Das Vorkommen von *H. canis* Infektionen konnte ebenfalls in der Zecke nachgewiesen werden. Dort war es möglich Oozysten mikroskopisch in gefärbten Präparaten aus Hämozoel, Speicheldrüsen oder anderen inneren Organen zu beobachten. Innerhalb der Oozyten wurden zahlreiche ovale Sporozysten gefunden.

#### 2.3.8.5. Verbreitung

Hepatozoon-Infektionen beim Hund durch *H. canis* sind in Südeuropa (Hervas et al., 1995; Kontos et al., 1991), Afrika (Baneth et al., 2001), Asien (Murata et al., 1991; Rajamanickam et al., 1985) und Südamerika (Alencar et al., 1997; O'Dwyer et al., 2001) weit verbreitet.

Die Verteilung entspricht hauptsächlich der des Vektors *R. sanguineus*, welcher in Afrika, Südeuropa, Südamerika und Asien, einschließlich des Nahen Ostens, des Pazifiks und der Inseln im Indischen Ozean zu finden ist (Baneth et al., 2001; Craig, 1990; Gevrey, 1993; Giannelli et al., 2017). Aber auch in anderen Gebieten wurden Fälle von *H. canis* nachgewiesen, wie in Ungarn in Füchsen und dem Goldschakal (Farkas et al., 2014b).

*Hepatozoon canis* wurde als sehr verbreitet in Rotfuchs-Populationen aus Nord-, Mittel- und Südportugal gefunden. Mittels PCR konnte eine Prävalenz von 75,6 % ermittelt werden (Cardoso et al., 2014). In Österreich wurde ebenfalls mit PCR in 58,3 % einer Kohorte von 36 Füchsen *H. canis* nachgewiesen (Duscher et al., 2014). In Westösterreich wurden Füchse auf das Vorkommen von *H. canis* mittels PCR aus Milz und Blutproben untersucht. Dabei waren 18,5 % (n=351) der Blutproben und 29,8 % (n=506) der Milzproben positiv (Hodzic et al., 2018). In Mittelitalien wurde *H. canis*-DNA in 75 von 153 Rotfüchsen (49%; 95% CI: 40,86-57,22%) mit Hilfe einer PCR aus Milzproben nachgewiesen (Ebani et al., 2017). Eine andere Untersuchung ermittelte ebenfalls in Italien mittels PCR bei Füchsen eine Prävalenz von 13,4 % (Gabielli et al., 2010). Auch in Kroatien wurden Füchse mit *H. canis* identifiziert (Dezdek et al., 2010). Es wurde außerdem ein natürlich infizierter Rotfuchs in der Slowakei gefunden und mittels PCR belegt (Majlathova et al., 2007), sowie *Hepatozoon* spp. in Zecken gefunden (Hamsikova et al., 2016).

Die Seroprävalenz von *H. canis* bei Hunden weist regionsabhängig eine hohe Variabilität auf. So konnte eine Studie mit serologischen Methoden 36 % in Portugal, 17,6 % in Nigeria, 2,5 % in Indien, 2,3 % in Israel und 2,1 % in Thailand nachweisen (Gevrey, 1993; Ivanov and Tsachev, 2008). In einer anderen Untersuchung wurden zirkulierende *H. canis* Antikörper

gegen Gamonten im Blut bei 39 % der Hunde in den ländlichen Gebieten des Staates Rio de Janeiro in Brasilien (O'Dwyer et al., 2001), bei 22 % der Hunde in Zaria, Nigeria und bei 1,2 % der Hunde in Malaysia (Rajamanickam et al., 1985) festgestellt.

Die Prävalenz von *H. canis* bei Hunden wurde auch mit molekularbiologischen Methoden untersucht. So wurden in Portugal 1010 Hunde mit PCR getestet und dabei 3,1 % der Proben positiv befundet (Maia et al., 2015). In Ungarn wurde eine weitere Untersuchung bei 126 Hunden durchgeführt, wobei in 26 % der Blutproben *H. canis* DNA nachgewiesen werden konnte (Hornok et al., 2013). In Rumänien stellte man bei 96 Hunden mittels PCR eine Prävalenz von 15 % fest (Andersson et al., 2017b). Eine Studie, die sowohl Hunde aus Portugal als auch in Deutschland lebende Hunde mit Reisehintergrund untersuchte, ermittelte in Portugal durch PCR eine Prävalenz von 21,1 % und für Deutschland von 2,7 %, wobei dabei eine Bestimmung aus dem Buffy-Coat vorgenommen wurde (Menn et al., 2010). Eine in Deutschland durchgeführte Untersuchung mittels einer konventionellen PCR bei Proben aus Zecken und Fuchsmilzen ermittelte eine Prävalenz von 45,2 % bei den Füchsen und 7,5 % bei den gesammelten Zecken (Najm et al., 2014b). Dies war die erste Beschreibung von *H. canis* in Deutschland. Die positiven Zecken gehörten den Spezies *I. ricinus*, *Ixodes canisuga*, *I. hexagonus* und *D. reticulatus* an.

In der Tschechischen Republik konnten autochthone Infektionen bei Hunden nachgewiesen werden, nachdem diese engen Kontakt zu Füchsen bei einer Fuchsjagd hatten (Mitkova et al., 2016).

#### 2.3.8.6. Klinik

Die Protozoenkonzentration steht in direktem Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung. Infektionen mit *H. canis* bei Hunden können in drei Formen auftreten: subklinisch, welches die häufigste Form darstellt, akut, die sich etwa eine Woche vor dem Tod entwickelt, und chronisch, welche von Phasen mit klinischer Expression und Remission geprägt ist (Barton et al., 1985; Beaufils et al., 1988; Ivanov and Tsachev, 2008). Die Symptome sind sehr unterschiedlich und unspezifisch (Barton et al., 1985; Elias and Homans, 1988). Die meisten mit *H. canis* infizierten Hunde entwickeln wahrscheinlich subklinische Infektionen. So waren 33 % der Hunde, die auf das Vorhandensein von *H. canis* Antikörpern in Israel untersucht wurden, seropositiv, aber nur 3 % wiesen Gamonten im Blut und 1 % schwere klinische Symptome auf (Baneth et al., 1996).

Hauptsächlich betroffen durch die Infektion sind die Milz, Lymphknoten und das Knochenmark, was zu Anämie und Lethargie führt (Baneth and Weigler, 1997). In mehreren Studien an Hunden, mit sowohl experimentellen als auch spontanen *H. canis* Infektionen, wurden am häufigsten klinische Symptome, wie Anämie, Abmagerung, Muskelatrophie, intermittierendes Fieber, ikterische Schleimhäute und leicht vergrößerte Milz und Leber,

festgestellt (Baneth et al., 1997; Baneth et al., 1995; Baneth et al., 2007; Craig et al., 1978; Elias and Homans, 1988; Gavazza et al., 2003; Gevrey, 1993). Ebenfalls in vielen Fällen wurde von Leistungsdepressionen, Muskelhyperästhesie, eitriger Konjunktivitis und Rhinitis berichtet. Auch kongestive Veränderungen in der Lunge und der Magenschleimhaut sowie Lymphadenopathie wurden beschrieben (Craig, 1990; Gevrey, 1993). Seltener wurden auch, Durchfall, teils blutig, Paraparese und Paraplegie beobachtet. Eine Studie zu den klinischen und labordiagnostischen Auffälligkeiten von natürlich mit *H. canis* infizierten Hunden, fand heraus, dass bei allen 16 untersuchten Fällen Gewichtsabnahme und Leistungseinbußen zu beobachten waren (Gavazza et al., 2003). Weiterhin zeigten 37,5 % leichte und 25 % schwere Lymphadenomegalie, 25 % Fieber und je 6,25 % blasse Schleimhäute und Schmerzen bei der Muskelpalpation.

In den meisten Hunden wird eine eher niedrige Parasitämie mit Gamonten in weniger als 5 % der Neutrophilen beschrieben. Damit verbunden ist im Allgemeinen eine asymptomatische oder leicht verlaufende Erkrankung. Die schweren klinischen Symptome sind charakteristisch für eine hohe Parasitämie mit bis zu 150.000 / $\mu$ l, verbunden mit einer Leukozytose (Craig, 1990). Im Blutbild zeigen sich häufig regenerative Anämien. Außerdem zeigte die Studie von Craig et al., dass ein Drittel der mit *H. canis* infizierten Hunde eine Thrombozytopenie aufwies. Dies war aber in einigen Fällen mit Koinfektionen wie *E. canis* verbunden (Craig et al., 1978).

Auch das unterentwickelte Immunsystem von Jungtieren oder eine Immunsuppression durch andere Krankheiten haben einen Einfluss auf die Pathogenese einer neuen oder chronischen *H. canis* Infektion (Baneth et al., 1997; Hervas et al., 1995; Mylonakis et al., 2004). So kann die Behandlung mit immunsuppressiven Mitteln wie Prednisolon eine Parasitämie bei Hunden auslösen, die mit *H. canis* infiziert sind. In der Literatur wird von schweren Ko-Infektionen mit anderen Krankheitserregern berichtet, wie beispielsweise dem Parvovirus (Hervas et al., 1995), *E. canis* (Baneth and Weigler, 1997), *Toxoplasma gondii* (Harmelin et al., 1992) und *L. infantum* (Rioux et al., 1964). In solchen Fällen treten schwerwiegendere Verläufe mit deutlich höherer Parasitämie auf (Baneth et al., 1997)

Histologisch werden Schizonten in der Skelett- und Herzmuskulatur, den Lymphknoten, der Milz, der Leber und den Nieren gefunden (Craig, 1990; Gevrey, 1993; Greene, 2013). Die Schizonten der 1.Generation sind die pathogenen Formen. Sie verursachen die Bildung entzündlicher Infiltrate und multiple Läsionen in allen befallenen Organen, insbesondere in Leber und Knochenmark. Dies findet statt bevor Gamonten im Blut auftreten. Die Schizonten treten häufig als Mikroschizonten mit Merozoiten auf. Bei der Freisetzung der Merozoiten kommt es zu einer intensiven Zellreaktion, die zur Bildung von Neutrophilenclustern in den Muskeln führt und wahrscheinlich die Ursache für Schmerzen, Fieber und periostale Proliferationen sind. In diesem Stadium können die Hunde akut versterben. Sind die

Schäden durch die Schizonten überwunden, kann es zu Anbauvorgängen am Skelett kommen, die sich radiografisch feststellen lassen (Barton et al., 1985; Nordgren and Craig, 1984). Die Proliferationen sind lokalisiert an den Stellen der Muskelansätze, zum Beispiel an Wirbeln, Becken, Radius, Elle, Oberarmknochen, Oberschenkelknochen, Wadenbein und Schienbein. Knochenläsionen sind nicht bei allen betroffenen Tieren vorhanden, sondern häufiger bei jungen Hunden von unter einem Jahr (Greene, 2013).

Pathologisch-anatomisch fallen Nekrosen in der Milz, sowie neutrophile Infiltrationen und teilweise Atrophie der weißen und roten Pulpa auf. *Hepatozoon canis* führt außerdem zu Zystenbildung in der Milz (Baneth and Shkap, 2003).

Während es bei Hunden zu teilweise schweren Verläufen der Infektion kommt, scheint sie verhältnismäßig harmlos für Füchse zu sein (Conceição-Silva et al., 1988).

#### 2.3.8.7. Therapie

Das Medikament, das heutzutage hauptsächlich in der Therapie der Hunde-Hepatozoonose verwendet wird, ist Imidocarb-Dipropionat. Es wird mit 5-6 mg/kg, subkutan oder intramuskulär im Abstand von 14 Tagen bis zum Verschwinden von Gamonten aus dem Blut gegeben. In der Regel sind ein oder zwei Injektionen ausreichend, bei schweren Verläufen kann eine 8-wöchige oder längere Behandlung erforderlich sein (Baneth and Weigler, 1997; Ivanov and Tsachev, 2008).

Auch eine tägliche, orale Dosis von 10 mg/kg Imidocarb-Dipropionat mit Doxycyclin kombiniert, oft über 21 Tage lang, hat sich als guter Therapieansatz erwiesen (Heile and Schein, 2008). Ebenso möglich ist eine Kombination von Imidocarb und Tetrazyklinhydrochlorid (Elias and Homans, 1988). Außerdem können Sulfonamide und Toltrazuril gegen die Schizonten von *H. canis* eingesetzt werden (Krampitz and Haberkorn, 1988). Allerdings ist diese Therapie nur im frühen Stadium der Infektion sinnvoll, in welcher die Diagnose aber selten gestellt werden kann.

Der Anteil der geheilten Hunde bei vorher niedriger Parasitämie ist hoch und hängt vor allem von möglichen Sekundärinfektionen ab. Die Prognose bei Tieren mit hohen Parasitämiewerten ist deutlich schlechter. In experimentellen Studien sollen 48 % der Hunde mit hoher Parasitämie zwar überleben, benötigten aber fast 2 Monate intensiver Therapie (Baneth and Weigler, 1997).

#### 2.3.8.8. Prophylaxe

Die Prävention von *H. canis* Infektionen basiert auf der effektiven Kontrolle der Zecken bei den Hunden. Dies geschieht durch die Verwendung verschiedener Akarizide (Heile and Schein, 2008). Zur Prophylaxe gegen Zecken haben sich sowohl Halsbänder als auch Spot-

on-Präparate bewährt. Als Wirkstoffe stehen Pyrethroide wie Flumethrin und Deltamethrin zur Verfügung. Spot-on-Präparate, die Amitraz, Fipronil, Pyriprol oder Permethrin enthalten, können ebenfalls eingesetzt werden. Auch das regelmäßige Absammeln der Zecken bietet einen gewissen Schutz (Heile and Schein, 2008).

Aufgrund der nicht ausgeschlossenen Möglichkeit einer Übertragung von *H. canis* durch infiziertes Gewebe, sollten Hunde nicht mit Rohfleisch aus endemischen Regionen gefüttert werden (Greene, 2013).

#### 2.3.8.9. Zoonotisches Potenzial

Die Bandbreite der natürlichen *H. canis* Wirte ist nicht vollständig untersucht. Es ist sehr wahrscheinlich, dass *H. canis* für den immunkompetenten Menschen nicht von Bedeutung ist.

Es gibt bisher nur einen Bericht über die *Hepatozoon* spp. Infektion eines Mannes auf den Philippinen (Craig, 1990). Der Patient war anämisch und ikterisch. Gamonten wurden in seinem Blut nachgewiesen. Parasiten waren in der Leber und im Knochenmark nicht vorhanden. Alle bisher verfügbaren Daten deuten auf eine *H. canis* Infektion hin.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Aufbau der Studie

Die Studie hatte eine Laufzeit von zwei Jahren. Im Verlauf dieser zwei Jahre beginnend im Mai 2016 war geplant, 1000 Serumbloodproben von Hunden aus dem Raum Berlin/Brandenburg zu sammeln und auf das Vorkommen von *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Dirofilaria* spp., *Ehrlichia* spp., *Leishmania* spp., *Angiostrongylus vasorum* und *Borrelia* spp. hin zu untersuchen. Dabei sollten serologische Nachweisverfahren verwendet werden, da in einer vorausgegangenen Studie von 2013 bis 2015 ähnliche Erreger mit Hilfe von DNA-Isolation und anschließender PCR untersucht wurden (Liesner et al., 2016).

Informationen über Patientendaten und Untersuchungsergebnisse wurden in Exceltabellen dokumentiert. Im Falle positiver Nachweise wurde versucht, die Hundebesitzer zu kontaktieren und eine Reiseanamnese zu erfragen, sowie eine Blutprobe zur weiteren diagnostischen Abklärung zu erhalten.

Außerdem sollten die DNA-Proben, welche in einer vorausgegangenen Studie gesammelt und aus Hunde- bzw. Fuchsblut extrahiert wurde, auf *H. canis* untersucht werden. Dafür sollte zuerst eine PCR etabliert und eine Positivkontrolle hergestellt werden. Anschließend sollten die 1050 Hunde- und die 201 Fuchsproben untersucht werden und in positiven Fällen aufgereinigt, sequenziert und phylogenetisch analysiert werden.

##### 3.1.1. Standortwahl

Als Untersuchungsgebiet wurde der Raum Berlin/Brandenburg gewählt. Grund dafür war, dass in verschiedenen Studien immer wieder von einem Auftreten der in dieser Studie untersuchten Erregern berichtet wird. So wurden zwischen 2007 und 2012 in Brandenburg Infektionen mit *D. repens* dokumentiert (Sassnau et al., 2013) und in Füchsen *Angiostrongylus vasorum* nachgewiesen (Härtwig et al., 2015). Es gibt auch Hinweise, dass *Anaplasma phagocytophilum* endemisch in diesem Gebiet wird (Härtwig et al., 2014). Des Weiteren wurden autochthone Infektionen, zum Beispiel mit Leishmanien in Brandenburg diskutiert (Kellermeier et al., 2007). Auch über das vermehrte Vorkommen bestimmter Vektoren, wie zum Beispiel der Stechmücken wurde in den letzten Jahren verstärkt berichtet (Becker et al., 2014).

Da es sich bei Berlin und seinem Umland um ein Gebiet mit hoher Bevölkerungsdichte und einer großen Anzahl von Hunden handelt, ist hier mit erhöhter Wahrscheinlichkeit mit

Erkrankungen insgesamt und speziell mit übertragbaren Erkrankungen zu rechnen, sollte es aus dem Untersuchungsgebiet nicht ausgeschlossen werden.

### **3.1.2. Probengewinnung und -lagerung**

Bei der Probengewinnung wurden ausschließlich Proben verwendet, welche zu diagnostischen Zwecken genommen wurden und nach dem Abschluss der Untersuchungen verworfen worden wären.

Um eine repräsentative Anzahl von Proben zur Untersuchung zu erhalten, wurden diese in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin und dem Labor LABOKLIN (Bad Kissingen) gesammelt. Dazu unterschrieben alle teilnehmenden Praxen eine Einverständniserklärung, in welcher sie bestätigten, dass sie einer Weiteruntersuchung der Proben im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin zustimmten. Es wurde auch in der Einverständniserklärung darauf hingewiesen, dass bei positiven Nachweisen Interesse an einer weiterführenden diagnostischen Abklärung, in Form einer Reiseanamnese und weiterführenden Tests, bestünde und diese auf Kosten des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin stattfinden würde.

Bereits Ende Juli 2016 zeigte sich, dass es ein unerwartet hohes Probenaufkommen gab, da allein aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin zu diesem Zeitpunkt rund 400 Serumproben gesammelt werden konnten. Da es aber bei der vorher festgelegten Gesamtanzahl der Proben bleiben sollte, wäre bei Einbeziehung aller gesammelten Proben kein repräsentativer Zeitraum untersucht worden. Somit war es nötig, ein zufälliges Auswahlverfahren zu entwickeln. Dabei fiel die Wahl auf einen Zufallsgenerator, welcher mit R Studio geschrieben wurde. Es bestand die Maßgabe, dass gleich viele Proben aus Berlin und Brandenburg jeden Monat untersucht werden sollten. Der Zeitraum von zwei Jahren wurde beibehalten, wodurch eine Probenanzahl von je 21 aus Berlin und Brandenburg pro Monat entstand.

Die Sammlung der Hundebloodproben begann im Juli 2016, wobei auch Proben ab Mai 2016 miteinbezogen wurden, welche seitdem bei -20 °C gelagert wurden und endete im April 2018. Zuerst wurden nur Proben aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin gesammelt. Ab August 2016 wurden auch Proben von LABOKLIN in die Studie mit einbezogen.

Alle Blutproben wurden sofort nach ihrem Eingang im Institut fortlaufend in Eppendorfgefäßkästen eingeordnet und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C gelagert. Außerdem wurden die durch Zufall ausgewählten Proben erneut zentrifugiert und das Serum in neue Eppendorfgefäße umpipettiert, welche mit Probennummer, Monat, Jahr und einem „B“ für Berlin bzw. einem „BB“ für Brandenburg gekennzeichnet wurden.

## 3.2. Material

### 3.2.1. Test-Kits

#### 3.2.1.1. Afosa Anaplasmen ELISA-Testkit

Darin enthalten:

- Mikrotiterplatte mit *Anaplasma* - Antigen (inaktiviert) beschichtet, 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen = 96 Vertiefungen pro Platte, einzeln abbrechbar
- Probenverdünnungspuffer mit Proteinzusatz, konserviert mit Natriumazid
- Waschpufferkonzentrat 10-fach konzentriert, konserviert mit ProClin 300
- Kontrollserum, Positivkontrolle, von mit *Anaplasma*-Erregern infizierten Hunden gewonnener Serumpool, konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig
- Kontrollserum, Negativkontrolle, von *Anaplasma*-Erregern frei aufgezogenen Hunden gewonnenes Serum, konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig
- Konjugatlösung, Anti-Hund-IgG-Antikörper, mit Meerrettichperoxidase konjugiert, konserviert mit ProClin 300, gebrauchsfertig
- Substratlösung, Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung, gebrauchsfertig
- Stopplösung, 1 N Schwefelsäure, gebrauchsfertig, Vorsicht ätzend

#### 3.2.1.2. Afosa Babesien ELISA-Testkit

Darin enthalten:

- 1 Mikrotiterplatte, 96 Kavitäten (mit inaktivem *Babesia*-Antigen beschichtet)
- 50 ml Probenverdünnungspuffer (8 Puffer mit Proteinzusatz, konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig)
- 50 ml Waschpuffer (phosphatgepuffert, 10-fach konzentriert, konserviert mit ProClin 300)
- 12 ml Konjugatlösung (Anti-Hund-IgG-Antikörper, mit Meerrettichperoxidase konjugiert, konserviert ProClin 300, gebrauchsfertig)
- 12 ml Substratlösung (Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung, gebrauchsfertig)
- 12 ml Stopplösung (1 N Schwefelsäure, gebrauchsfertig)
- 1,5 ml Positiv-Kontrollserum (mit *Babesia*-Erregern experimentell infizierter Hunde gewonnener Serumpool, konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig)
- 1,5 ml Negativ-Kontrollserum (von *Babesia*-Erregern frei aufzogener Hunde gewonnenes Serum, konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig)

3.2.1.3. Afosa Leishmanien ELISA-Testkit

Darin enthalten:

- 1 Mikrotiterplatte, 96 Kavitäten (mit Leishmania-Antigen beschichtet)
- 50 ml Probenverdünnungspuffer
- 50 ml Waschpuffer (10-fach konzentriert)
- 12 ml Konjugatlösung
- 12 ml Substratlösung
- 12 ml Stopplösung
- 1,5 ml Positiv-Kontrollserum
- 1,5 ml Negativ-Kontrollserum

3.2.1.4. IDEXX SNAP®4Dx®Plus-Testkit

Darin enthalten:

- 1 Fläschchen (Anti-*D. immitis*/ *Anaplasma* spp./ *B. burgdorferi*/ *E. canis*/ *E. ewingii*) HRPO-Konjugat (Konservierungsstoff: Gentamicin und Kathon) je 7 ml
- 1 SNAP Testeinheit mit enthaltener Waschlösung (Konservierungsstoff: Kathon) 0,4 ml und Substratlösung 0,6 ml
- Transferpipette
- Probenröhrchen
- Reagenzstände

**3.2.2. Reaktionskits**

Reaktionskits	Hersteller
DNA Clean & Concentrator™-5	ZYMO RESEARCH CORP., Irvine, USA
GenUP™ Plasmid Kit	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit	Promega Corporation, Madison, USA
Plasmid DNA Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Plasmid DNA Midiprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
StrataClone Blunt PCR Cloning Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	ZYMO RESEARCH CORP., Irvine, USA

**Tabelle 3: Verwendete Reaktionskits**

### 3.2.3. Software

Software	Hersteller
BLAST Software (Altschul et al., 1990)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
Bio - Rad Precision Melt Analysis™ 1.0	Bio - Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
CloneManager Professional 9	Scientific & Educational Software, Denver, USA
Endnote X8	Thomson Reuters, New York, USA
Gen5™ Datenanalyse	BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA
GeneSnap Version 7.09.06	SYNGENE International, Indien
GraphPad Prism	Graphpad Prism, La Jolla, USA
MEGA 7	Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MUSCLE	EMBL-EBI, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, Großbritannien
PopART 1.7	Dept of Mathematics and Statistics University of Otago, Dunedin, Neuseeland
RStudio Version 0.98.1103	Free Software Foundation, Inc., Boston, USA
R Version 3.5.0. (2018-04-23)	Free Software Foundation, Inc., Boston, USA
Sigma Plot	Systat Software, Chicago, USA
www.OpenEpi.com	Public Health Version (Sullivan et al., 2009)

**Tabelle 4: Verwendete Software**

### 3.2.4. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agar-Agar Kobe I Pulver	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Bacillol® AF Desinfektion	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Dinatriumhydrogen-phosphat - Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ≥ 99%	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Ethanol reinst ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Glycerin ROTIPURAN® ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe

Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
LE Agarose Pulver	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Milchpulver	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid - Plätzchen	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salmon Sperm	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka Analytix, München, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-acetat	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Zitronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 5: Verwendete Chemikalien**

### 3.2.5. Enzyme

Enzyme	Hersteller
<i>EcoRI</i> 10 U/μl Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Anti-Dog IgG-Peroxidase Antikörper	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Maxima®Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase 5 U/μl	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase 2 U/μl	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA

**Tabelle 6: Verwendete Enzyme**

### 3.2.6. Puffer und Flüssigkeiten

Flüssigkeit	Hersteller
Aqua bidest	TKA-Gebpure Reinstwassersystem, Berlin
DEPC-behandeltes Wasser, Bioscience- Grade, Nuklease frei und autoklaviert	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
dNTP Mix, 10 mM	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
EvaGreen®	BIOSCIENCE, Jena

GRGreen (GRSafe) Nucleic Acid Gel Stain	Labgene Scientific SA, Chatel- St. Denis, Schweiz
Handdesinfektionsmittel AHD 2000®	Lysoform, Berlin
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
5 x Phusion HF Puffer	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Roti® Nukleinsäurefrei Spray	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
10 x Maxima®Hot Start Puffer	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
10 x Puffer EcoRI mit BSA	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
10 x Hot Start PCR Puffer	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA

**Tabelle 7: Verwendete Puffer und Flüssigkeiten**

### 3.2.7. verwendete Primer

Sequenz	Name	Quelle
5' GGTGAACCTGCGGAAGGATC 3'	ITS-1 Filarien-ITS1-Forw	(Nuchprayoon et al., 2005)
5' CTCAATGCGTCTGCAATTCGC 3'	ITS-1 Filarien-ITS1-Rev	(Nuchprayoon et al., 2005)
5' GGGGATGATGTCAARTCAGCAY 3'	A/Efor	(Tabar et al., 2008)
5' CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT 3'	A/Erev	(Tabar et al., 2008)
5' GACACAGGGAGGTAGTGACAAG 3'	RLB-F2	(Matjila et al., 2004)
5' CTAAGAATTTACCTCTGACAGT 3'	RLB-R2	(Matjila et al., 2004)
5' ATA CAT GAG CAA AAT CTC AAC 3'	Hep R	(Inokuma et al., 2002)
5' CTT ATT ATT CCA TGC TGC AG 3'	Hep F	(Inokuma et al., 2002)

**Tabelle 8: Verwendete Primer**

### 3.2.8. Marker

Marker	Hersteller
GeneRuler™ 100bp Marker	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
λ EcoRI/HindIII Marker	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA

**Tabelle 9: Verwendete Marker**

**3.2.9. Einwegartikel**

<b>Einwegartikel</b>	<b>Hersteller</b>
Abdeckfolien	Excel Scientific, Inc.
Antigenstrips	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Biosphere® Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Zentrifugationsröhrchen 50 ml	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Faltenfilter	Schleicher und Schüll, München, Deutschland
Flüssigkeitsreservior	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Kimtech Mehrfachwischtücher	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Lens Paper	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
NitriCare® Handschuhe Nitril Gr. M	Showa Best Glove S.A.S., Frankreich
Papierhandtücher	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Parafilm® M	Bemis Company, Inc., Neenah, USA
PCR SingleCap 8er - Softstrips 0,2 ml, weiß, flat cap	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Petrischalen Ø 9 cm	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 5 ml, 10 ml (Typ Eppendorf)	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Rahmen für Wellstreifen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Rotilab® Sterilindikatorband für Dampfsterilisation	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
rotiprotect® Handschuhe Latex Gr. M	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
SafeDeal Gefäße 0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Skalpellklingen	Henry Schein Inc., Melville, USA
Tissue Box Zellstofftücher	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht

**Tabelle 10: Verwendete Einwegartikel**

**3.2.10. Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
ALC-1100.2 Waage	Acculab, Satorius AG, Göttingen
Biofuge 13 Zentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau
Biofuge pico Zentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau
C1000™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Epoch BioTek® Instrument	BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA
Eppendorf Research Pipetten 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Forma 900 Series Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Gasprofi 1 micro Bunsenbrenner	WLD-TEC, Arenhausen
G:Box Geldokumentation	SynGene Europe, Cambridge, UK
HI208 Educational pH-Meter	Hanna® Instruments, Woonsocket, USA
IKA® COMBIMAG RCT Magnetrührer	IKA® Works, Inc., Wilmington, USA
IKA® Vortex Genius 3 Vortexer	IKA® Works, Inc., Wilmington, USA
LABOKLAV Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
Liebherr Gefrierschrank	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Max Q 6000 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, USA
Maxwell® 16 Research Instrument	Promega Corporation, Madison, USA
Mikrowellengerät	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Multipipette 10-300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Nunc Immuno Wash 8	Nunc, Roskilde, Dänemark
PCR Chamber Laborwerkbank mit UV-Licht	PLAS Labs, Inc., Lansing, USA
ScanLaf Mars Safety Class 2 Sterilbank	LaboGene Aps, Lyngø, Dänemark
Take 3™ Multi-Volume Plate	BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA
Thermoshaker PST-60HL-4	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Tischzentrifuge	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Waschautomat	BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA
Wide Mini-Sub® Cell GT Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
WNE 45 Wasserbad	Memmert GmbH&Co. KG, Schwabach

**Tabelle 11: Verwendete Geräte**

**3.2.11. Weitere Laborartikel**

<b>Laborartikel</b>	<b>Hersteller</b>
Bechergläser 25 ml, 50 ml, 100 ml	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Chemikalienlöffel	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Drigalski Spatel	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Eppendorfkästen	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Gelkämme und -schlitten, Gießstände	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Laborglasflaschen 500 ml	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Magnetrührstäbe	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand	Promega Corporation, Madison, USA
Messzylinder 25 ml, 50 ml, 500 ml, 1000 ml	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Reagenzgläser	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäßhalter	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Stoppuhr	HANHART 1882 GmbH, Gütenbach, Deutschland
Trichter aus Kunststoff	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Trichter aus Glas	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
UV- Gesichtsschutzvisir	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Vakuumverteiler	ZYMO RESEARCH CORP., Irvine, USA
Weithals-Erlenmeyerkolben 25 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Wiegeschälchen	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe

**Tabelle 12: Weitere verwendete Laborartikel**

### **3.3. Methoden**

#### **3.3.1. Zufallsgenerator mit R**

Damit die Proben zufällig ausgewählt werden konnten, wurde folgende Formel verwendet, die in „R“ eingetragen und je nach Gesamtprobenanzahl des Monats und Sammelgebiet variiert wurde:

```
sample(1:x,y,replace=F)
```

Wobei „x“ für die Gesamtanzahl der Proben in dem jeweiligen Monat und dem Sammelgebiet steht und „y“ immer „21“ ist, denn es sollten je Monat 21 Proben ausgewählt werden. „1:x“ bedeutet demnach, dass eine Probe aus der Gesamtanzahl „x“ gezogen werden soll und dass „y“ mal, also in dieser Studie 21 mal. „replace = F“ sagt aus, dass dies ohne „Zurücklegen“ geschehen soll, folglich keine Probennummer doppelt vorkommen kann.

Für das Beispiel „Berlin Mai 2016“ würde die Formel dann wie folgt lauten, da im Monat Mai des Jahres 2016 insgesamt 67 Serumproben aus Berlin gesammelt werden konnten:

```
sample(1:67,21,replace=F)
```

#### **3.3.2. Herstellung von Puffern und Reagenzien**

##### **3.3.2.1. Puffer für den Leishmanien - ELISA**

###### **3.3.2.1.1. Carbonat-Coating-Puffer**

Der Carbonat-Coating-Puffer war für die Beschichtung der Antigenplatten für den Leishmanien ELISA nötig. Bei der Herstellung wurden 2,93 g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) und 1,59 g Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) in destilliertem Wasser (aqua dest.) mit Hilfe des Magnetrührers gelöst, wobei das Endvolumen 1 l umfasste.

###### **3.3.2.1.2. PBS-Tween Waschpuffer**

Zur Herstellung, des für den Leishmanien ELISA verwendeten Waschpuffers wurden zunächst 80 g Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ), 2 g Kaliumchlorid ( $\text{KCl}$ ), 14,24 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) und 2 g Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ ) abgewogen und vermischt, sowie anschließend in 1l aqua dest. gelöst. Danach wurde mittels 1M Natronlauge ( $\text{NaOH}$ ) der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Im nächsten Schritt wurde die

entstandene Lösung mit aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt. Außerdem wurden je 1 l Lösung 500 µl Tween 20 hinzugegeben.

#### 3.3.2.1.3. Verdünnungspuffer für Leishmanien ELISA

Der Verdünnungspuffer für die Verdünnung der Proben für den Leishmanien ELISA bestand aus 50 ml PBS-Tween Waschpuffer und 0,25 g Milchpulver. So entstand mittels eines Magnetrührers eine 5 %ige Lösung, welche filtriert wurde, bevor sie gebrauchsfertig war.

#### 3.3.2.1.4. Substratpuffer

Der Substratpuffer wurde bei dem in dieser Arbeit verwendeten Leishmanien ELISA benötigt. Dazu wurden zuerst 21,02 g Zitronensäure-Monohydrat ( $C_6H_8O_7 \times H_2O$ ) in 250 ml aqua dest. gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,2 mol Natronlauge (NaOH) auf 3,95 eingestellt. Zum Schluss wurde auf 1000 ml mit aqua dest. aufgefüllt.

Weiterer Bestandteil war 100 mg 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), welches mit 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) vermischt wurde.

Direkt vor dem Gebrauch wurden die drei Reagenzien mithilfe des Magnetrührers vermischt. Dazu wurden 10 ml Zitronensäurepuffer, 200 µl TMB (<0,02 %) und 2 µl 30%  $H_2O_2$  in ein Becherglas gegeben.

#### 3.3.2.1.5. Phosphorsäure-Stopplösung

Die Phosphorsäure-Stopplösung wurde ebenfalls für den Leishmanien ELISA verwendet. Dabei wurden 28 ml 85% konzentrierte Phosphorsäure ( $H_3PO_4$ ) mit 472 ml aqua dest. verdünnt.

### 3.3.2.2. Puffer für den Dirofilarien- und Angiostrongylus-ELISA

#### 3.3.2.2.1. Waschpuffer für die Dirofilarien- und Angiostrongylus-ELISA

Für die Waschlösung wurden in 5 l aqua dest. 45 g NaCl und 15 ml Tween 20 gegeben. Dieses wurde nun eine Stunde mit einem Magnetrührer durchmischt und anschließend in den Kanister des Waschautomaten gegeben.

#### 3.3.2.2.2. Verdünnungspuffer für die Dirofilarien- und Angiostrongylus-ELISA

Aus fetalem Kälberserum (FCS) und Puffer II wurde im Verhältnis 1:9 ein Gemisch hergestellt, das zum Verdünnen der Serumproben für die ELISAs diente.

#### 3.3.2.2.3. Puffer I

Bei Puffer I handelt es sich um einen 0,1 M Carbonat/ Bicarbonat-Beschichtungspuffer mit einem pH-Wert von 9,6 (Schucan et al., 2012).

#### 3.3.2.2.4. Puffer II

Puffer II besteht aus PBS (pH 7,2) mit 0,02 % Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), 0,05 % Rinderhämoglobin und 0,2 % Tween-20 (Schucan et al., 2012).

#### 3.3.2.2.5. Puffer III

Puffer III ist ein 0,05 M Carbonat/ Bicarbonat-Puffer (pH 9,8) mit 1 mM Magnesiumchlorid (MgCl) versetzt (Schucan et al., 2012).

### 3.3.2.3. Puffer und Reagenzien für molekularbiologische Methoden

#### 3.3.2.3.1. 6 × Loading-Dye

Zum Herstellen des Loading Dye wurden 60 ml 100 %iges Glycerin mit 1 ml 3% Bromphenolblau, sowie 10 ml Tris-Cl-Puffer (pH-Wert 7,6), in einen Erlenmeyerkolben gegeben, auf 100 ml mit aqua dest. aufgefüllt und mit dem Magnetrührer vermischt, bis das Gemisch homogen war. Anschließend wurde der Loading Dye in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert.

#### 3.3.2.3.2. 50 × TAE-Puffer

Hierfür wurden 242 g Tris (pH-Wert 8) in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend wurden 100 ml EDTA hinzugefügt. Weiterhin wurden 57,1 ml Essigsäure dazu gegeben, und das Gemisch auf 1000 ml mit aqua dest. aufgefüllt. Um eine gebrauchsfertige Lösung zu erhalten, wurde dieser Stock im Verhältnis 1:50 mit aqua dest. verdünnt.

Für die 500 mM EDTA Lösung wurden 186,1 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA) auf 800 ml aqua dest. in einem Erlenmeyerkolben aufgefüllt und Natriumhydroxid-Plätzchen hinzugefügt, bis ein pH-Wert von 8,0 erreicht war.

#### 3.3.2.3.3. LB-Agar

10 g Agar-Agar Pulver wurden mit 12,5 g LB-Pulver auf 500 ml aqua dest. in einer Laborflasche aufgefüllt und diese anschließend autoklaviert.

#### 3.3.2.3.4. LB-Medium

LB-Medium wurde hergestellt indem 25 g LB-Pulver in einem Liter aqua dest. gemischt wurde. Dieses wurde anschließend autoklaviert.

#### 3.3.2.3.5. 100 bp und EcoRI Marker

Zur Herstellung der Marker wurden 94 µl aqua dest. mit 20 µl Loading Dye × 6 und 6 µl des jeweiligen Markers in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit einem Vortexer sorgfältig vermischt.

### **3.3.3. Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

Ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay wird zur Messung von Antigen- oder Antikörperkonzentration zum Beispiel im Blut verwendet.

Die Durchführung eines ELISA erfordert entweder einen Antikörper, um ein spezifisches Antigen zu detektieren oder das Vorhandensein des passenden Antigens, an dem die gesuchten Antikörper binden können.

Im Falle eines direkten ELISAs wird die Probe, welche eine unbekannte Menge Antigen enthält, auf einem Untergrund, der mit Antikörpern beschichtet ist, immobilisiert. Danach wird ein Antikörper zur Detektion zugegeben und formt einen Komplex mit dem Antigen. Dieser Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert und erlaubt, im letzten Arbeitsschritt die Umsetzung eines Substrats in ein detektierbares Signal. Dabei werden positive Resultate durch Farbumschlag angezeigt und mittels Photometer gemessen (Engvall and Perlmann, 1971).

Bei der indirekten Methode dagegen wird die Mikrotiterplatte mit Antigen beschichtet, woran die Antikörper aus der Probe binden. Im nächsten Schritt folgt dann wieder ein markierter Antikörper, wodurch die Farbreaktion möglich gemacht wird.

Eine weitere Methode ist der Sandwich ELISA. Dabei wird die Menge Antigen zwischen zwei Lagen von Antikörpern gemessen. Um dieses Assay anzuwenden, wird ein sogenannter Fangantikörper an einen Untergrund gebunden. Das Antigen wird hinzugefügt und bindet an diesen. Ein zweiter primärer Detektionsantikörper wird hinzugefügt, um das Sandwich zu vervollständigen. Das Ergebnis kann quantifiziert werden, indem ein markierter sekundärer

Antikörper hinzugefügt wird, der an den zweiten primären Antikörper bindet und die enzymatische Farbreaktion katalysiert (Engvall et al., 1971).

Bei dem kompetitiven ELISA wird wieder ein Antikörper an einen Untergrund gebunden. Dieser primäre Antikörper wird mit den zu messenden Proben inkubiert. Danach wird ein konjugiertes Antigen oder ein mit einem Enzym gebundener Antikörper hinzugefügt. Das Antigenkonjugat bindet den primären Antikörper überall dort, wo er nicht an unmarkiertes Antigen aus der Probe gebunden hat. Daraus folgt, dass je mehr Antigen in der Probe vorhanden ist, desto weniger konjugiertes Antigen kann gebunden werden (Hornbeck, 2015).

#### 3.3.3.1. Leishmanien-ELISA Testkit NovaTec

Der Leishmanien-ELISA wird in dem Labor LABOLKIN (Bad Kissigen) durchgeführt. Das von NovaTec entwickelte Protokoll wurde verkürzt und durch die Umrechnung der Einheiten auch andere Referenzwerte entwickelt. Der Test wurde im Labor in Bad Kissigen validiert und ist in den Akkreditierungen nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 enthalten.

Es findet ein qualitativer immunoenzymatischer Nachweis spezifischer Antikörper statt. Dazu werden Mikrotiterplatten verwendet, welche mit spezifischen Antigenen beschichtet sind, um entsprechende Antikörper der Probe zu binden. Nach dem Waschen der Wells zur Entfernung des ungebundenen Probenmaterials wird ein mit Meerrettichperoxidase markiertes Konjugat zugegeben. Dieses Konjugat bindet an die eingefangenen Antikörper. In einem zweiten Waschschrift wird das ungebundene Konjugat entfernt. Der durch das gebundene Konjugat gebildete Immunkomplex wird durch Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat visualisiert, das ein blaues Reaktionsprodukt ergibt. Die Intensität dieses Produkts ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Um die Reaktion zu stoppen, wird Schwefelsäure zugesetzt. Dadurch entsteht eine gelbe Endpunktfarbe. Die Absorption bei 450/620 nm wird mit einem ELISA-Mikrotiterplattenleser gemessen.

Der Test weist eine diagnostische Sensitivität von 90,91 % (95 % CI: 70,84 %-98,88 %) und eine diagnostische Spezifität von 92,59 % (95 % CI: 82,11 %-97,94 %) auf.

#### 3.3.3.2. Leishmanien-ELISA in house FU Berlin

##### 3.3.3.2.1. Beschichtung der Antigen-Platten

Zur Herstellung der Antigen-Platten für den Leishmanien ELISA wurden Nunc-Rahmen mit Antigen-Strips bestückt und anschließend mit einem Gemisch bestehend aus 104 µl Leishmanien-Antigen, welches bei -20 °C gelagert wurde, und 10 ml Carbonat-Coating-Puffer beschichtet. Dabei wurden 100 µl in jede Kavität peppitiert. Danach wurde die Platte

eine Stunde lang auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 4 °C über Nacht gelagert. Nun war diese zur weiteren Verwendung bereit. Zur längeren Lagerung wurde sie eingeschweißt und bei -20 °C aufbewahrt.

Vor dem Aufpeppitieren der Proben wurde die Platte einmal mit 200 µl PBS-Tween Waschlösung gewaschen.

#### 3.3.3.2.2. Durchführung des ELISA

Zuerst wurden die Antigen-Stripes entsprechender Menge aus dem Kühlschrank genommen, damit sie Raumtemperatur annehmen konnten. Dabei wurden sie in der Folie belassen.

Währenddessen wurde der Verdünnungspuffer angesetzt. Im nächsten Schritt wurden die Proben sowie die Positiv- (PK) und Negativkontrolle (NK) im Verhältnis 1:201 verdünnt. Dazu wurden 400 µl des Probenverdünnungspuffers zusammen mit 2 µl der jeweiligen Probe in ein Eppendorfgefäß gegeben und durch Schütteln auf dem Vortexer vermischt.

Darauf folgt die Beschichtung der Platte mit jeweils 100 µl je Kavität, wobei Proben, Positiv- und Negativkontrolle, sowie Blank im Doppelansatz untersucht wurden, und eine halbstündige Inkubation im Thermoshaker bei 37 °C.

In der Zwischenzeit musste das Konjugat hergestellt werden, welches Anti-Dog IgG-Peroxidase Antikörper und Verdünnungspuffer im Verhältnis von 1:3000 enthält. Dies wurde erreicht indem 12 ml Verdünnungspuffer und 4 µl Anti-Dog IgG-Peroxidase Antikörper mit dem Magnetrührer vermischt wurden.

Nach der 30minütigen Inkubation folgte der erste Waschvorgang. Dabei wurde drei Mal jeweils mit 200 µl PBS-Tween Waschlösung gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrritten erfolgte eine 5minütige Inkubation.

Danach wurde die Platte mit 100 µl je Kavität der Konjugatverdünnung beschichtet und wiederum für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Der darauffolgende Waschvorgang wurde wie der erste durchgeführt.

Kurz vor der Verwendung wurde die Substratlösung, bestehend aus 10 ml Substratpuffer, 200 µl Tetramethylbenzidin (TMB) und 2 µl Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) angesetzt. Davon wurden mittels einer Mehrkanalpipette 100 µl in jede Kavität gegeben.

Nach mindestens einminütigem Inkubieren und schütteln der Platte wurde der Vorgang mit 50 µl Phosphorsäure abgestoppt.

Zuletzt folgte die Messung bei 450 nm im Photometer.

Bei der Auswertung des Tests wurden zuerst Positiv-, Negativkontrolle und Leerwert (L) überprüft.

PK:  $\approx 0,1$

NK:  $\approx 0,07$  bis  $0,08$

L:  $\approx 0,05$  bis  $0,06$

Dabei ist zu beachten, dass eine etwas erhöhte Positivkontrolle dann auch eine erhöhte Negativkontrolle erlaubte.

Bei der Berechnung der Ergebnisse wurden zuerst die Mittelwerte aller Proben, sowie der Positiv-, Negativkontrolle und des Leerwertes ermittelt. Anschließend erfolgte die Korrektur von Positivkontrolle und Probenwerten durch Abziehen des Leerwertes.

Mit diesen korrigierten Werten wurde das Ergebnis mithilfe folgender Formel in Prozent errechnet:

$$\text{Testergebnis (TE) (\%)} = (\text{korr. Probe} / \text{korr. PK}) \times 100$$

Wobei für

TE < 19 = negativ,	
TE $\approx$ 19 = fraglich	und
TE > 20 = positiv	gilt.

### 3.3.3.3. Leishmanien ELISA-Testkit von Afosa

Der LEISHMANIA-ELISA DOG ist ein ELISA in Mikrotiterplattenformat zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Leishmania infantum* in Blutserum- oder Blutplasmaprobe von Hunden.

Der Test basiert auf löslichen Antigenen, präpariert aus *Leishmania infantum*. Er ist in der Lage, spezifische Antikörper in 88,4-100 % (95 % Konfidenzintervall-KI) Leishmania infizierter Hunde nachzuweisen, wie bei der Testung mit 30 Seren ermittelt wurde. Die Testspezifität beträgt 86,3 %-99,5 % im Vergleich zu klinisch gesunden Hunden unterschiedlichster Rassen. Kreuzreaktionen bei Hunden mit anderen parasitären Erkrankungen sind nicht vollkommen ausgeschlossen; in einem Panel von 26 Seren von Hunden mit Babesiose, Toxoplasmose, Neosporose und Hepatozoonose, allerdings unbekannter Historie einer möglicherweise früheren Leishmaniose, wurden drei Positivreagenten ermittelt.

Die Mikrotiterplatte ist mit einer Leishmania-Antigen-Präparation beschichtet. Antikörper gegen *Leishmania infantum* bilden während der Inkubation der Probe in der beschichteten Vertiefung einen Komplex mit dem Antigen. Nichtgebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Das hinzugefügte Enzym-Konjugat bindet sich an die antigengebundenen

IgG-Antikörper. Ungebundenes Enzym-Konjugat wird herausgewaschen. Nach Hinzugabe der Substratlösung erfolgt eine Farbentwicklung durch antikörpergebundenes Enzym. Die Farbreaktion steht in Korrelation zur Menge von Anti-Leishmania-Antikörpern in der Probe. Die diagnostische Bewertung erfolgt durch den Vergleich der Extinktionswerte von Proben und Kontrollen.

Mit einer Mikrotiterplatte können maximal 91 Proben untersucht werden. Die Mikrotiterplatte besteht aus 12 Streifen mit je 8 Reaktionsvertiefungen. Die benötigten Testreagenzien wurden vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18 bis 25 °C) gebracht und vor der Verwendung durch Schwenken der Flasche bzw. Vortexen des Plastikröhrchens gründlich zu durchmischen. Substrat- und Konjugatlösung dürfen starkem Lichteinfall nicht ausgesetzt werden. Nach längerer Kühlung kann sich die Substratlösung durch spontane Umsetzung schwach bläulich färben. Diese leichte Färbung verschwindet nach Erwärmung auf Raumtemperatur. Die benötigte Menge an Waschpuffer wurde hergestellt, indem die entsprechende Menge des 10-fach Konzentrats 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Für die gesamte Mikrotiterplatte wurden 216 ml destilliertes Wasser mit 24 ml Waschpufferkonzentrat angemischt.

Es kann frisches, kühl aufbewahrtes oder gefroren gelagertes und aufgetautes Blutserum oder Blutplasma verwendet werden. Aufgetaute Proben wurden vor der Verwendung gründlich durchmischt. Dann wurde eine 1:10-Verdünnung hergestellt und diese gründlich gemischt. Anschließend wurde daraus eine 1:30-Verdünnung erstellt, so dass die Probe in einer Endverdünnung von 1:300 vorliegt. Bei jedem Test ist es notwendig, Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, um die korrekte Testdurchführung und die Stabilität der Reagenzien überprüfen zu können.

Je 100 µl der Kontrollseren wurden in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben. Außerdem wurden 100 µl der vorverdünnten Proben auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Als nächstes wurde die Platte 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte das erste Waschen. Dazu wurden die Mikrotiterplatten entleert und 4-mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschgang wurde die Platte auf einer sauberen, saugfähigen Unterlage ausgeschlagen.

Im nächsten Schritt wurde in jede Vertiefung 100 µl Konjugatlösung gegeben. Dann wurde die Platte wieder abgedeckt und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beim zweiten Waschen wurde ebenso verfahren, wie beim ersten Waschgang.

Anschließend wurden 100 µl Substratlösung je Vertiefung auf die Platte pipettiert und diese wiederum abgedeckt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde mit der Zeitmessung nach Füllen der ersten Vertiefung begonnen. Dann wurde 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung und zwar in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit, in der die Substratlösung zugegeben wurde, pipettiert.

Danach wurde die Platte vorsichtig, aber gründlich geschüttelt und die Extinktionswerte (OD) innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm gemessen.

Bei der Auswertung des Tests waren zuerst folgende Kontrollwerte zu überprüfen:

OD des Positiv-Kontrollserums PK:  $OD_{PK} > 0,8 < 2,8$   
Prozentsatz des Negativ-Kontrollserums NK:  $P < 20$

Dazu wurden zuerst die Mittelwerte der optischen Dichte der Positivkontrolle und der Negativkontrolle ( $OD_{PK}$ ,  $OD_{NK}$ ) berechnet.

Anschließend wurde der Prozentsatz der optischen Dichte des Negativkontrollserums nach folgender Formel berechnet:

$$P = (OD_{NK} \times 100) / (OD_{PK})$$

Wurden die oben genannten Kontrollwerte erreicht, war die Testdurchführung erfolgreich.

Zur Berechnung des Testergebnisses wurden vom Mittelwert der optischen Dichte des Positivkontrollserums ( $OD_{PK}$ ) und von der optischen Dichte der Proben ( $OD_{Probe}$ ) der Mittelwert des Negativkontrollserums ( $OD_{NK}$ ) abgezogen.

$$OD_{PK, \text{ kor}} = OD_{PK} - OD_{NK}$$

$$OD_{Probe, \text{ kor}} = OD_{Probe} - OD_{NK}$$

Das Testergebnis der Proben wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$TE = (OD_{Probe, \text{ kor}} \times 100) / (OD_{PK, \text{ kor}})$$

Wobei für

TE < 7 = negativ,	
TE 7 - 12 = fraglich	und
TE > 12 = positiv	gelten.

#### 3.3.3.4. Anaplasmen ELISA-Testkit von Afosa

Der Anaplasma-ELISA DOG ist ein ELISA in Mikrotiterplattenformat zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Anaplasma phagocytophilum* in Blutserum- oder Blutplasma von Hunden.

Der Test ist in Sensitivität und Spezifität mit dem Anaplasma-IFAT vergleichbar. Die Validierung von 154 charakterisierten Seren ergab eine Sensitivität von 92% bei einer Spezifität von bis zu 97%. Kreuzreaktionen mit *Ehrlichia canis* sind nicht auszuschließen. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer *Anaplasma*-Antigen-Präparation beschichtet. Antikörper gegen *Anaplasma phagocytophilum* bilden während der Inkubation der Probe in der beschichteten Vertiefung einen Komplex mit dem Antigen. Nichtgebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Das hinzugefügte Enzym-Konjugat bindet sich an die antigengebundenen IgG-Antikörper. Ungebundenes Enzym-Konjugat wird herausgewaschen. Nach Hinzugabe der Substratlösung erfolgt eine Farbentwicklung durch antikörper-gebundenes Enzym. Die Farbreaktion steht in Korrelation zur Menge von Anti-*Anaplasma*-Antikörpern in der Probe. Die diagnostische Bewertung erfolgt durch den Vergleich der Extinktionswerte von Proben und Kontrollen.

Mit einer Mikrotiterplatte können maximal 91 Proben untersucht werden. Die Mikrotiterplatte besteht aus 12 Streifen mit je 8 Reaktionsvertiefungen.

Als erstes wurde die benötigte Menge an Waschpuffer hergestellt, indem die entsprechende Menge des 10-fach Konzentrats 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Anschließend wurde die Probenverdünnung vorgenommen. Dazu wurden 5 µl der Probe in 495 µl Probenverdünnungspuffer pipettiert und diese gründlich gemischt. Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden. Bei jedem Test war es notwendig, Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, um die korrekte Testdurchführung und die Stabilität der Reagenzien überprüfen zu können. Sämtliche Reagenzien wurden vor Anwendung auf Raumtemperatur gebracht.

Je 100 µl der Kontrollseren und der Proben wurde in die dafür vorgesehenen Vertiefungen auf der Mikrotiterplatte gegeben und dann abgedeckt, sowie für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte das erste Waschen. Dazu wurden die Vertiefungen entleert und 4-mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Am Ende des Waschvorganges wurde die Restflüssigkeit durch Ausschlagen der Platte auf einer sauberen saugfähigen Unterlage entfernt.

Im nächsten Schritt wurde in jede Vertiefung 100 µl Konjugatlösung gegeben und die Platte wiederum abgedeckt und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgt der zweite Waschvorgang, welcher wie der erste abläuft.

Dann wurden 100 µl Substratlösung je Vertiefung auf die Platte gegeben. Diese wurde abgedeckt 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit der Zeitmessung wurde nach dem Füllen der ersten Vertiefung begonnen.

Danach wurden 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung pipettiert, und zwar in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit, in der die Substratlösung zugegeben wurde. Nach dem

vorsichtigen Schütteln der Platte wurden die Extinktionswerte innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm gemessen.

Bei der Auswertung des Tests waren zuerst folgende Kontrollwerte zu überprüfen:

OD des Positiv-Kontrollserums PK:	$OD_{PK} > 0,8 < 2,8$
Prozentsatz des Negativ-Kontrollserums NK:	$P < 20$
Leerwert (Probenverdünnungspuffer):	$OD < 0,1$

Dazu wurden zuerst die Mittelwerte der optischen Dichte der Positivkontrolle und der Negativkontrolle ( $OD_{PK}$ ,  $OD_{NK}$ ) berechnet.

Anschließend wurde der Prozentsatz der optischen Dichte des Negativkontrollserums nach folgender Formel berechnet:

$$P = (OD_{NK} \times 100) / (OD_{PK})$$

Wurden die oben genannten Kontrollwerte erreicht, war die Testdurchführung erfolgreich.

Zur Berechnung des Testergebnisses wurden vom Mittelwert der optischen Dichte des Positivkontrollserums ( $OD_{PK}$ ) und von der optischen Dichte der Proben ( $OD_{Probe}$ ) der Mittelwert des Negativkontrollserums ( $OD_{NK}$ ) abgezogen.

$$OD_{PK, \text{ korrr}} = OD_{PK} - OD_{NK}$$

$$OD_{Probe, \text{ korrr}} = OD_{Probe} - OD_{NK}$$

Das Testergebnis der Proben wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$TE = (OD_{Probe, \text{ korrr}} \times 100) / (OD_{PK, \text{ korrr}})$$

Wobei für

TE < 8 = negativ,	
TE 8 - 12 = fraglich	und
TE > 12 = positiv	gelten.

### 3.3.3.5. Babesien ELISA-Testkit von Afosa

Der Babesia-ELISA DOG ist ein Enzymimmunoassay in Mikrotiterplattenformat zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Babesia canis* in Blutserum- oder Blutplasmaproben von Hunden.

Die Mikrotiterplatte wurde mit einer *Babesia*-Antigen-Präparation beschichtet. Antikörper gegen *Babesia canis* bilden während der Inkubation der Probe in der beschichteten Vertiefung einen Komplex mit dem Antigen. Nichtgebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Das hinzugefügte Enzym-Konjugat bindet an die antigengebundenen IgG-Antikörper. Ungebundenes Enzym-Konjugat wird herausgewaschen. Nach Hinzugabe der Substratlösung erfolgt eine Farbentwicklung durch antikörpergebundenes Enzym. Die Farbreaktion steht in Korrelation zur Menge von Anti-*Babesia*-Antikörpern in der Probe. Die diagnostische Bewertung erfolgt durch den Vergleich der Extinktionswerte von Proben und Kontrollen.

Mit einer Mikrotiterplatte können maximal 91 Proben untersucht werden. Die Mikrotiterplatte wird im Folienbeutel mit Wiederverschluss geliefert. In der Verpackung befindet sich außerdem ein Trockenbeutel mit Indikator. Die Mikrotiterplatte besteht aus 12 Streifen mit je 8 Reaktionsvertiefungen.

Die Sensitivität und Spezifität des Babesia canis-ELISA lag in Bezug zum Goldstandard (671 mit vier verschiedene IFATs untersuchte Seren) bei 91,6 % bzw. 95,4 %, in Bezug zu einem an einem Universitätsinstitut nach streng wissenschaftlichen Kriterien validierten IFAT als Goldstandard (287 Seren) bei 96,3 % bzw. 100 %.

Zur Vorbereitung der Testdurchführung waren folgende Schritte zu erledigen:

Die benötigten Testreagenzien waren vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur zu bringen und vor der Verwendung durch Schwenken der Flasche bzw. Vortexen des Plastikröhrchens gründlich zu durchmischen.

Die benötigte Menge an Waschpuffer musste hergestellt werden, indem die entsprechende Menge des 10-fach Konzentrats 1:10 mit destilliertem Wasser oder Reinstwasser verdünnt wurde. Sollten sich Kristalle im Waschpufferkonzentrat befinden, so löste man diese durch vorsichtiges Erwärmen des Waschpufferkonzentrats auf.

Es konnte frisches, kühl aufbewahrtes oder gefroren gelagertes und aufgetautes Blutserum oder Blutplasma verwendet werden. Die aufgetauten Proben wurden vor der Verwendung gründlich durchmischt.

Zur Probenverdünnung wurden 5 µl der Probe in 495 µl Probenverdünnungspuffer (1:100) gegeben und gründlich vermischt. Die Kontrollen waren bereits gebrauchsfertig. Bei jedem Test war es notwendig, Positiv- und Negativkontrolle, sowie eine Leerwertkontrolle

mitzuführen, um die korrekte Testdurchführung und die Stabilität der Reagenzien überprüfen zu können.

Bei der Durchführung wurde wie folgt verfahren:

Als erstes wurden je 100 µl der Kontrollseren in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben. Dabei wurde besonders bei einer größeren Anzahl Proben eine Doppelbestimmung empfohlen, weshalb diese auch erfolgte.

Als Leerwert wurden 100 µl Probenverdünnungspuffer in die dafür vorgesehene Vertiefung gegeben. In diesem Fall war eine Einzelbestimmung ausreichend.

Anschließend wurden 100 µl der 1:100 vorverdünnten Proben in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipittiert.

Nun wurde die Platte abgedeckt und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach erfolgte der erste Waschvorgang. Dazu wurden die Vertiefungen entleert und diese 4-mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gespült. Es wurde mit einer Mehrkanal-Pipette gewaschen und anschließend die Platte nach jedem einzelnen Waschgang auf einer sauberen, saugfähigen Unterlage ausgeschlagen, in diesem Fall auf einem Papierhandtuch.

Danach wurde in jede Vertiefung 100 µl Konjugatlösung gegeben, die Platte anschließend wieder abgedeckt und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann erfolgte der zweite Waschvorgang. Dazu wurden wieder die Vertiefungen entleert und anschließend wie beim ersten Waschvorgang verfahren.

Nun wurden in jede Vertiefung 100 µl Substratlösung pipettiert und als nächstes die abgedeckte Platte für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit der Zeitmessung wurde nach dem Füllen der ersten Vertiefung begonnen.

Darauf folgte das Zugeben von je 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung und zwar in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit, in der die Substratlösung zugegeben wurde.

Zum Schluss wurde die Platte vorsichtig, aber gründlich geschüttelt und innerhalb von 10 min nach Zugeben der Stopplösung die Extinktionswerte (OD) bei 450 nm gemessen.

Bei der Auswertung des Tests waren zuerst folgende Kontrollwerte zu überprüfen:

OD des Positiv-Kontrollserums PK:	$OD_{PK} > 0,8 < 2,8$
Prozentsatz des Negativ-Kontrollserums NK:	$P < 20$
Leerwert (Probenverdünnungspuffer):	$OD < 0,1$

Dazu wurden zuerst die Mittelwerte der optischen Dichte der Positivkontrolle und der Negativkontrolle ( $OD_{PK}$ ,  $OD_{NK}$ ) berechnet.

Anschließend wurde der Prozentsatz der optischen Dichte des Negativkontrollserums nach folgender Formel berechnet:

$$P = (OD_{NK} \times 100) / (OD_{PK})$$

Wurden die oben genannten Kontrollwerte erreicht, war die Testdurchführung erfolgreich.

Zur Berechnung des Testergebnisses wurden vom Mittelwert der optischen Dichte des Positivkontrollserums ( $OD_{PK}$ ) und von der optischen Dichte der Proben ( $OD_{Probe}$ ) der Mittelwert des Negativkontrollserums ( $OD_{NK}$ ) abgezogen.

$$OD_{PK, \text{ kor}} = OD_{PK} - OD_{NK}$$

$$OD_{Probe, \text{ kor}} = OD_{Probe} - OD_{NK}$$

Das Testergebnis der Proben wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$TE = (OD_{Probe, \text{ kor}} \times 100) / (OD_{PK, \text{ kor}})$$

Wobei für

TE < 14 = negativ,

TE 14 - 19 = fraglich            und

TE > 19 = positiv                gelten.

#### 3.3.3.6. Dirofilarien-ELISA

Dabei handelt es sich um einen Sandwich-ELISA auf Basis von monoklonalen Antikörpern und aufgereinigtem, somatischen Antigen von adulten *D. immitis*-Stadien, welcher zum Nachweis von Antikörpern gegen *D. immitis* und *D. repens* in Hundeseren verwendet wird. Die Sensitivität des Tests für patente *D. immitis* Infektionen wurde mit 93,8 % (95 % KI: 79,2-99,2 %) und für *D. repens* Infektionen mit 100 % (95 % KI: 81,9-100 %) berechnet. Die Spezifität betrug 98,6 % (95 % KI: 92,2-100 %) bei Seren von 69 Hunden aus einem nicht-endemischen Gebiet. Kreuzreaktionen mit anderen Nematoden wie *Acanthocheilonema* und *Dipetalonema* spp. (50 % bzw. 66,7 %), *Crenosoma vulpis* (16,7 %), *Capillaria aerophila* (14,3 %) und mit natürlich, aber nicht experimentell infizierten Hunden mit *Angiostrongylus vasorum* (14,3 %) waren vorhanden. Bei experimentell infizierten Hunden mit *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* und *Trichuris vulpis* traten keine positiven Reaktionen auf (Joekel et al., 2017).

#### 3.3.3.6.1. Beschichtung der ELISA-Platte

Zur Herstellung der Antigen-Platten für den Dirofilarien ELISA wurde ein Rahmen mit Stripes bestückt. Anschließend wurden diese mit 100 µl je Kavität eines Gemischs aus 44 µl Antikörperlösung und 9,956 ml Puffer I beschichtet. Dabei bestand die Antikörperlösung aus 1,44 µg/ml einer aufgereinigten, gepoolten Probe „mAbDi36/1“. Die Kavität A1 wurde leer gelassen, da es sich dabei um den Leerwert handelte.

Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C in einer humid chamber gelagert und inkubiert.

#### 3.3.3.6.2. Durchführung des ELISA

Als Erstes wurden die am Vortag beschichteten Platten 4 mal mit 350 µl Waschlösung mit Hilfe eines Waschautomaten gewaschen. Dann folgte das Blocken, wobei 300 µl/ Kavität Puffer II auf die Platte gegeben wurden und diese 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Es wurde wieder der Leerwert ausgespart.

Nach dem erneuten Waschen der Platte nach oben beschriebenem Schema wurde auf die Platte die Antigenlösung aufgetragen. Die Antigenlösung bestand aus 20,5 µl Antigen „Diro crute AG 11.3.10“, welches aus einem Wurm extrahiert wurde und eine Konzentration von 8,44 mg/ml aufwies, sowie 9979,5 µl Puffer II. In jede Kavität, abgesehen vom Leerwert, wurden 100 µl pipettiert und die Platte bei 37 °C eine Stunde inkubiert.

Währenddessen wurden die Proben sowie die Kontrollen mit FCS und Puffer II verdünnt. Dazu wurden 400 µl der Verdünnungslösung und je 2 µl der Probe in ein cluster tube gegeben. Der Leerwert bleibt wieder frei, sowie in diesem Schritt auch die Konjugatkontrolle. Als weitere Kontrollen wurden zwei Negativkontrollen, zwei unterschiedlich starke Positivkontrollen, sowie eine schwach positive Probe, welche als cut-off diente, verwendet.

Die Platte wurde nach der Inkubation wieder gewaschen und anschließend mit 100 µl/ Kavität der eben verdünnten Proben und Kontrollen beschichtet. Dazu wurde nun eine Mehrkanalpipette verwendet, wobei vor dem Auftragen darauf zu achten war, die verdünnten Proben durch auf und ab pipettieren in den cluster tubes nochmals gründlich zu durchmischen. Es folgte wieder eine einstündige Inkubation bei 37 °C.

Nach einem weiteren Waschen der Platte wurde diese mit 100 µl/ Kavität Konjugat, welches aus 8 µl anti Dog und 10 ml Puffer II bestand, beschichtet und nochmals bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

Danach wurde die Platte nach dem üblichen Schema gewaschen und mit 100 µl/ Kavität Substrat, bestehend aus 10 ml Puffer III und 0,01 g 4-Nitrophenylphosphatdinatriumhexahydrat, beschichtet, inklusive des Leerwertes.

Die Messungen mit dem Photometer erfolgten 10 min und 15 min nach Auftragen des Substrates bei 405 nm.

Zur Auswertung diente der jeweilige cut-off Wert der einzelnen Platte.

### 3.3.3.7. Angiostrongylus vasorum Antigen-ELISA

Beim Antigen-ELISA handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Das dafür benötigte Antigen wurde aus adulten Würmern durch Inkubation in Medium, Zentrifugation, Sterilfiltration und anschließender Konzentration des Mediums hergestellt (Schnyder et al., 2011). Die polyklonalen Antikörper wurden aus dem Serum von neuseeländischen, weißen Kaninchen, welche zuvor immunisiert wurden, gewonnen (Schnyder et al., 2011). Für die monoklonalen Antikörper (mAb) wurden Mäuse immunisiert und danach Milzzellen aseptisch entfernt, gewaschen und Lymphozyten mit der gleichen Menge an AG8-Myelomzellen vermischt. Darauf folgt eine Kultivierung (Schnyder et al., 2011).

Die Sensitivität des Antigen-Tests betrug 95,7 % (95 % KI: 78,1-99,9 %), bestimmt mit Seren von 23 Hunden, die nicht experimentell mit *A. vasorum* infiziert waren. Die Spezifität betrug 94,0 % (95 % KI: 83,5-98,7 %) unter Verwendung von 50 Hundeseren, die zur Untersuchung auf andere parasitäre Erreger im Institut für Parasitologie der Universität Zürich eingesandt wurden. Mögliche Kreuzreaktionen wurden mit Seren einer Gruppe von insgesamt 61 Hunden mit nachgewiesenen Infektionen mit *D. immitis* (n=23), *Crenosoma vulpis* (n=14), *Ancylostoma caninum* (n=4) oder *Toxocara canis* (n=20) untersucht. Es wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Anteils der positiven Reaktionen zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit nachgewiesenen Helmintheninfektionen außer *A. vasorum* beobachtet (Schnyder et al., 2011).

#### 3.3.3.7.1. Beschichtung der ELISA-Platte

Die Platte, bestehend aus Stripes und Rahmen, wurde am Vortag der Durchführung beschichtet und in einer humid chamber Box, welche mit Silikongel gefüllt war, im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Je Platte wurden 10 ml Puffer I und 28 µl Antikörperlösung „mAb56/1/2“ gemischt und davon 100 µl/ Kavität aufgetragen. Der Blank wurde dabei ausgespart.

#### 3.3.3.7.2. Durchführung des ELISA

Als Erstes wurde das FCS und die Kontrollseren aufgetaut und die Antigen-Platte 4 mal mit jeweils 350 µl der Waschlösung gewaschen. Anschließend folgte das Blocken. Dazu wurden 300 µl Puffer II in jede Kavität, abgesehen vom Blank, gegeben und die Platte bei 37 °C eine halbe Stunde inkubiert.

In dieser Zeit konnten die Kontrollen vorbereitet werden. Auf jeder Platte befinden sich zwei unterschiedliche Negativkontrollen, zwei unterschiedliche Positivkontrollen und eine Referenzprobe, welche an zwei Stellen auf der Platte aufgetragen wird. Die Referenzprobe

„6182“ der Antigenplatte wurde im Verhältnis 1:100 mit Puffer II verdünnt. Dies wurde in einem Eppendorfgesäß durchgeführt.

Nach der Inkubationszeit wurde die Antigen-Platte leer geklopft und in jede Kavität 55 µl Puffer II pipettiert, sowie 55 µl Serum bzw. 55 µl der jeweiligen Kontrollen. Danach wurden 100 µl der verdünnten Referenzprobe „6182“ in die dafür vorgesehene Vertiefung gegeben. Außerdem wurde für die Konjugatkontrolle weitere 55 µl Puffer II in die entsprechende Kavität hinzugefügt. Des Weiteren bleibt der Blank leer. Hierbei ist anzumerken, dass in dieser Studie *A. vasorum* Antigen- und Antikörper-ELISA immer parallel durchgeführt wurden und deshalb 55 µl jeder Substanz verwendet wurden. So war es möglich, die vorverdünnten Serumproben und auch einen Teil der Kontrollen ebenfalls für den Antikörper-ELISA zu benutzen. Im Falle der einzelnen Durchführung müssten nur 50 µl eingesetzt werden.

Danach wurde die Antigen-Platte für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die weiteren benötigten Reagenzien angemischt.

Für den ersten Antikörper wurden 20 µl Kaninchen-anti-*A. vasorum* Antikörper mit 10 ml Puffer II (1:500) vermischt.

Für das Konjugat der Antigenplatte wurden 200 µl Goat anti-rabbit IgG in 10 ml Puffer II gegeben. Dabei war die hohe Viskosität des Goat anti-rabbit IgG, welche durch eine Vorverdünnung in Glycerin- und PBS-Mischung entsteht, zu beachten.

Das Substrat, bestehend aus 10 ml Puffer III und 0,01 g 4-Nitrophenylphosphat-dinatriumhexahydrat, musste unbedingt vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Während der Zeit zwischen dem Ansetzen und Verwenden der Lösung befindet sich das Zentrifugationsröhrchen auf einer Rüttelplatte, um ein Ausfallen zu Verhindern.

Nun wurde die Antigenplatte gewaschen und mit 100 µl/ Kavität Kaninchen-anti-*A. vasorum* Antikörper beschichtet. Es folgte wiederum die einstündige Inkubation bei 37 °C.

Danach wurde die Antigenplatte wieder gewaschen und 100 µl/ Kavität des vorbereiteten Konjugats in die Kavitäten pipettiert, worauf eine Inkubation von einer Stunde bei 37 °C erfolgte.

Im letzten Schritt wurden nach dem Waschen der Antigenplatte 100 µl Substrat in alle Vertiefungen pipettiert, einschließlich des Blank (Schnyder et al., 2011).

3.3.3.7.3. Auswertung des ELISA

Abgelesen wurde die Platte nach ungefähr 10 min mittels eines Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm. Dabei sollen möglichst die folgenden Referenzwerte erreicht werden:

Kontrollen	Extinktionswerte
Positivkontrolle 1	1,6
Positivkontrolle 2	0,8
Referenzprobe	0,279

Tabelle 13: Referenzen des *A. vasorum* Antigen ELISA

Es werden die Extinktionswerte der Messung in die Auswertung mit einbezogen bei denen die Referenzwerte am besten übereinstimmen.

Die Cut-off-Werte wurden auf Basis des Mittelwertes ermittelt, zuzüglich der dreifachen Standardabweichung der OD-Werte von 300 Serumproben der Studie, was zu einer Cut-off OD von 0,218 für den Antigen-ELISA führte.

3.3.3.8. Angiostrongylus vasorum Antikörper-ELISA

Für den Antikörpernachweis wurde das Sandwich-ELISA auf Basis des mit monoklonalen Antikörpern gereinigten somatischen Antigens *A. vasorum* adult (mAb 5/5) verwendet (Schucan et al., 2012). Die Sensitivität liegt bei 42,2 % und die Spezifität bei 92,0 % (Gillis-Germitsch et al., 2017).

3.3.3.8.1. Beschichtung der ELISA-Platte

Die aus Stripes und Rahmen bestehende Platte wurde am Vortag der Durchführung beschichtet und in einer humid chamber Box, welche mit Silikongel gefüllt war, im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Je Platte wurden 10 ml Puffer I verwendet und diese mit 21 µl Antigenlösung „5/5“ vermischt. 100 µl davon wurden in die Vertiefungen gegeben. Der Blank wurde dabei leer gelassen.

3.3.3.8.2. Durchführung des ELISA

Das FCS und die Kontrollseren wurden als Erstes aufgetaut und die Antikörper-Platte 4 mal mit jeweils 350 µl der Waschlösung gewaschen. Anschließend folgte das Blocken. Dazu wurden 300 µl Puffer II in jede Kavität, abgesehen vom Blank, welcher bis zum letzten Schritt leer blieb, gegeben und die Platte bei 37 °C eine halbe Stunde inkubiert.

Währenddessen wurden 10 ml FCS und 90 ml Puffer II gemischt und davon je 1 ml in ein cluster tube gegeben. Außerdem wurden die Kontrollen vorbereitet. Auf jeder Platte befanden sich zwei unterschiedliche Negativkontrollen, zwei unterschiedliche Positivkontrollen und eine Referenzprobe, welche an zwei Stellen auf der Platte aufgetragen wird. Bis auf die Referenzprobe und eine der beiden Positivkontrollen unterscheiden sich die Kontrollen der Antigen- und der Antikörperplatte nicht. Die Referenzprobe der Antikörperplatte „1957“ wird im Verhältnis 1:150 mit Puffer II verdünnt. Auch die sich unterscheidende Positivkontrolle „3186“ wird mit Puffer II verdünnt und zwar im Verhältnis 1:200. Diese beiden Verdünnungen wurden direkt im cluster tube vorgenommen.

Nach der 30-minütigen Inkubation wurde die Antikörper-Platte geleert und dann mit *A. vasorum* somatic antigen beschichtet. Dabei handelt es sich um eine gepoolte Probe, welche eine Konzentration von 4,2 mg/ml aufweist. Davon werden 12 µl mit 10 ml Puffer II verdünnt. Anschließend wurde die Platte für eine Stunde inkubiert.

Im nächsten Schritt ist wieder entscheidend, ob Antigen- und Antikörper-ELISA parallel durchgeführt werden sollen. Soll nur der Antikörper-ELISA gemacht werden, ist es notwendig die Serumproben im Verhältnis 5:1000 in den cluster tubes zu vermischen. In dieser Studie wurden 10 µl aus der Antigen-Platte entnommen und in die cluster tubes gegeben. Dabei ist auf die Unterschiede zwischen den jeweiligen Kontrollen der Platten zu achten.

Nach der Inkubation der Antikörper-Platte wurde diese gewaschen und dann 100 µl aus den cluster tubes auf die Platte gegeben.

Nun wird die Antikörper-Platte wiederum eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die weiteren benötigten Reagenzien angemischt. Das Konjugat der Antikörperplatte bestand aus 13,3 µl Goat anti-dog IgG und 10 ml Puffer II. Als Substrat wurde, wie bereits im Antigen-ELISA, ein Gemisch aus 10 ml Puffer III und 0,01 g 4-Nitrophenylphosphat-dinatriumhexahydrat verwendet. Auch hier ist auf die Temperatur zu achten, sowie das Ausfallen während der Erwärmung auf Raumtemperatur zu verhindern.

Die Antikörper-Platte wurde nach dem Waschen mit 100 µl/ Kavität Konjugat beschichtet, worauf wiederum die Inkubation für eine Stunde bei 37 °C erfolgt.

Im letzten Schritt wurden nach dem Waschen der Antikörper-Platte 100 µl/ Kavität Substrat in alle Vertiefungen pipettiert, diesmal einschließlich des Blank (Schucan et al., 2012).

#### 3.3.3.8.3. Auswertung des ELISA

Wie beim Antigen-ELISA wurde nach der Inkubationszeit auch mit der Antikörperplatte verfahren. Allerdings erfolgte die Messung erst ungefähr 20 min nach Auftragen des Substrates.

Die Referenzwerte der Antikörperplatte lauten wie folgt:

Kontrollen	Extinktionswerte
Positivkontrolle 1	0,9
Positivkontrolle 2	0,5
Referenzprobe	0,509

**Tabelle 14: Referenzen des *A. vasorum* Antikörper ELISA**

Auch diesmal wurden die Extinktionswerte der Messung in die Auswertung mit einbezogen bei denen die Referenzwerte am besten übereinstimmen.

Die Cut-off-Werte wurden auf Basis des Mittelwertes ermittelt, zuzüglich der dreifachen Standardabweichung der OD-Werte von 300 Serumproben der Studie, was zu einer Cut-off OD von 0,323 für den Antikörper-ELISA führte.

#### **3.3.4. IDEXX SNAP®4Dx®Plus Testkit**

Bei dem IDEXX SNAP®4Dx®Plus Testkit handelt es sich um ein in-vitro-Diagnostikum zum Nachweis von im Blut zirkulierendem *Dirofilaria immitis*-Antigen, *Anaplasma phagocytophilum*-Antikörpern, *Anaplasma platys*-Antikörpern, *Borrelia burgdorferi*-Antikörpern, *Ehrlichia canis*-Antikörpern und *Ehrlichia ewingii*-Antikörpern in Serum, Plasma oder Vollblut von Hunden.

Die Spezifität liegt für alle im SNAP®4Dx®Plus getesteten Erreger bei 100 %. Die Sensitivität liegt für *Dirofilaria immitis*-Antigen, *Anaplasma* spp. und *Ehrlichia* spp. bei 99 % sowie für *Borrelia* spp. bei 96 %.

Das gefrorene Serum wurde aufgetaut, erneut zentrifugiert und bei Raumtemperatur getestet. Auch die Testkomponenten, die bis zur Durchführung im Kühlschrank lagerten, wurden vorher auf Raumtemperatur gebracht.

Um bei der Menge des eingesetzten Serums sparsam sein zu können, wurde nicht mit der im Testkit enthaltenen Pipette gearbeitet, sondern eine Eppendorfpipette mit 200 µl Spitzen verwendet. Für jeden Test wurden 140 µl Serum genutzt.

Zuerst mussten drei Tropfen der Probe, bzw. 140 µl, und vier Tropfen des Konjugats in das Einweg-Probenröhrchen gegeben werden. Anschließend wurde dieses zum Vermischen der beiden Komponenten 4-5 mal geschwenkt. Dann wurde in die Probenvertiefung, der auf einer ebenen Fläche liegenden Testeinheit, der gesamte Inhalt des Probenröhrchens gegeben. Die Probe floss nun über das Auswertefenster und erreichte nach ca. 30-60 s den Aktivierungskreis. Sobald sich der Aktivierungskreis vollständig verfärbt hatte, wurde der

Aktivator fest eingedrückt bis er auf gleicher Ebene mit dem Körper der Testeinheit war. Nach 8 min konnte das Testergebnis abgelesen werden.

Jede Farbentwicklung in den Probenanzeigen zeigte die Präsenz von *Dirofiliria immitis*-Antigen, *Anaplasma phagocytophilum*-Antikörpern, *Anaplasma platys*-Antikörpern, *Borrelia burgdorferi*-Antikörpern, *Ehrlichis canis*-Antikörpern oder *Ehrlichia ewingii*-Antikörpern in der Probe an.

Dabei war im Falle von *Ehrlichis canis*-Antikörpern und *Ehrlichia ewingii*-Antikörpern sowie *Anaplasma phagocytophilum*-Antikörpern und *Anaplasma platys*-Antikörpern keine Unterscheidung zwischen den Spezies möglich.

Zur Kontrolle der Testdurchführung und der Richtigkeit der Ergebnisse gab es eine Positivkontrolle, welche sich immer verfärben sollte.

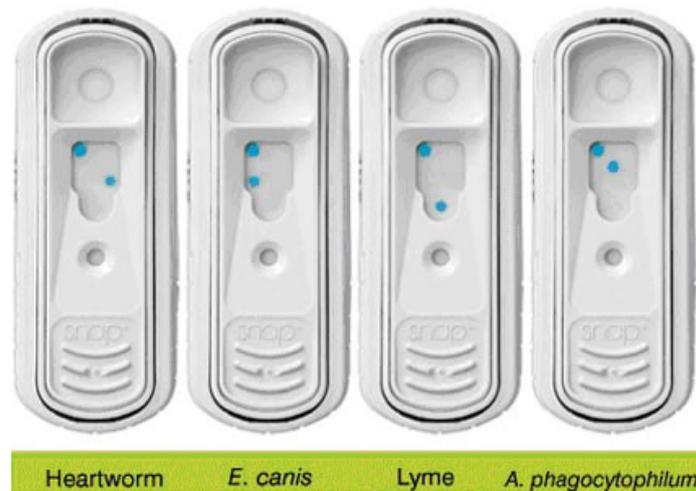


Abbildung 1: Testinterpretation des SNAP@4Dx@Plus

### 3.3.5. Immunfluoreszenz Antikörper Test

Einige der, im Vergleich zwischen den Leishmanien-ELISAs bzw. zwischen dem kommerziellen Anaplasmen-ELISA und dem SNAP-Test, Proben mit abweichendem Ergebnis wurden im Labor am Zugersee durch Dr. Schaarschmidt mit zwei kommerziell erhältlichen IFATs untersucht.

Es handelt sich um einen serologischen Test zum Nachweis von wirtsspezifischen Antikörpern. Sowohl infizierte als auch nicht infizierte Zellen werden auf einem Objektträger gebunden. Das verdünnte Testserum wird über die Zellen gegeben und inkubiert, um die Antikörperbindung an Antigene zu ermöglichen. Ungebundene Antikörper werden dann vom Objektträger gewaschen. Ein fluoreszenzmarkierter, artspezifischer Anti-Immunglobulin-Antikörper wird hinzugefügt und bindet an die Antikörper. Ungebundener, markierter Antikörper wird abgewaschen, dann ein Fluoreszenzmikroskop zur Beobachtung der spezifischen Fluoreszenz verwendet. Diese Testdurchführung ist schnell, preiswert und sensitiv, aber ihre Interpretation ist subjektiv und erfordert einen erfahrenen Beobachter.

#### 3.3.5.1. Anaplasma phagocytophilum-Immunfluoreszenz Antikörper Test

Es wurde das Testkit MegaFLUO® ANAPLASMA ph von MEGACOR Diagnostik verwendet. Bei der Durchführung wurde sich an die Gebrauchsinformation von 05/2018 gehalten. Der Test weist eine Sensitivität von 100 % und Spezifität von 96 % laut Herstellerangaben auf.

*Anaplasma phagocytophilum* und *A. platys* sind aufgrund der hohen Homologie serologisch nicht zu unterscheiden. Des Weiteren sind Kreuzreaktionen mit *E. canis*-positiven Seren in niedrigen Titerstufen möglich.

#### 3.3.5.2. Leishmania infantum-Immunfluoreszenz Antikörper Test

Es wurde das Testkit MegaFLUO® LEISH von MEGACOR Diagnostik verwendet. Bei der Durchführung wurde sich an die Gebrauchsinformation von 02/2018 gehalten. Der Test weist eine Sensitivität von 98,2 % und Spezifität von 92,2 % laut Herstellerangaben auf.

Aufgrund immunologischer Ähnlichkeit zu *Trypanosoma cruzi* sind bei Seren aus Süd- und Mittelamerika potenziell falsch positive Testergebnisse möglich.

#### **3.3.6. DNA-Isolation mit Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit**

Bei der DNA Isolation erfolgt zunächst eine Lyse der Zellen im Blut mit dem Detergent Natriumdodecylsulfat (SDS) und dann der Verdau mit einem Enzym, der Proteinase K, um die Nukleinsäuren zugänglich zu machen. Im Anschluss daran folgt die Bindung der Nukleinsäuren an spezielle Partikel oder an eine Filtersäule. Darauf finden Waschschriffe zur Reinigung der gebundenen Partikel und zum Entfernen von anderen Zellbestandteilen statt. Abschließend werden die Nukleinsäuren in einem Puffer eluiert.

Bei der Isolation mit dem Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit wurde EDTA-Blut verwendet. Die Proben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und der Heizblock auf 56 °C vorgeheizt. Das flüssige Blut wurde mit einem Vortexer gründlich durchmischt, um die Probe zu homogenisieren. Danach wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 300 µl Lysepuffer, 300 µl EDTA-Blut und 30 µl Proteinase K hinein pipettiert. Das Gemisch wurde anschließend für 10 s mit dem Vortexer gemischt. Nun erfolgte die Inkubation der Proben im Heizblock bei 56 °C für 20 min.

Währenddessen wurde die Arbeitsplattform aus dem Maxwell® 16 Research Instrument für die nachfolgende automatische Isolation vorbereitet. Hierfür wurden die vorgefertigten Kartuschen mit den darin enthaltenen Waschpuffern in die Arbeitsplattform eingesetzt und die Schutzfolie abgezogen. Die Kartuschen bestanden aus insgesamt 8 Wannen. In Wanne

1 befand sich der Bindungspuffer, in die das Probengemisch pipettiert wurde. Wanne 2 enthielt paramagnetische Zellulosepartikel. Die Wannen 3 bis 7 dienten für die einzelnen Waschschritte und in Wanne 8 wurde vor Beginn der Isolation ein Kunststoffkolben, der Plunger zum Schutz der Magnetstäbe des Automaten, eingebracht. Außerdem wurden 0,5 ml Reaktionsgefäße mit jeweils 50 µl Elutionspuffer in die dafür vorgesehene Vertiefung auf der Plattform gestellt. Darin enthalten war anschließend die DNA, weshalb das Gefäß während der Isolation geöffnet bleiben musste und ausreichend beschriftet sein sollte.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde das lysierte Probengemisch in Wanne 1 einer Kartusche pipettiert. Pro Isolationsvorgang konnten bis zu 16 Proben bearbeitet werden. Das Maxwell® 16 Research Instrument wurde eingeschaltet, die mit Kartuschen und Reaktionsgefäßen befüllte Arbeitsplattform eingesetzt und das passende Programm ausgewählt.

Nach Ende des Programms wurden die Kartuschen und die Schutzkolben aus der Plattform entfernt und entsorgt, sowie das Reaktionsgefäß mit der isolierten DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.3.7. Dichtemessung von DNA mit dem Epoch® Biotek Spektralphotometer**

Die aus Blutproben extrahierte DNA wurde vor den Untersuchungen auf Qualität und Quantität überprüft. Hierzu wurde das Epoch® Biotek Spektralphotometer mit der Software Gen5™ verwendet. Die Funktionsweise eines Photometers beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz, welches besagt, dass die Intensität monochromatischen Lichtes bei Durchdringen eines absorbierenden Stoffes abnimmt. Aus der Differenz der Lichtintensität vor und nach Durchdringen der Probe kann die Absorptionsdichte und damit die Konzentration der Probe ermittelt werden, wenn der Extinktionskoeffizient bekannt ist (Reinard, 2010). Nukleinsäuren absorbieren Licht maximal bei einer Wellenlänge von 260 nm, daher wird die Messung bei dieser Wellenlänge durchgeführt und die Absorption in einer Konzentration mit der Einheit ng/µl umgerechnet. Aus dem Verhältnis  $OD_{260/280}$  kann auf die Reinheit der Probe geschlossen werden, so wird eine  $OD_{260/280}$  zwischen 1,8 und 2,0 als „rein“ für DNA angesehen (Wilfinger et al., 1997). Um das Photometer zu kalibrieren und damit einen Ausgangs- bzw. Nullwert zu erhalten, wurden auf zwei der insgesamt 16 Felder der Take3-Platte nebeneinander je 2 µl Elutionspuffer aufgetragen und die Konzentrationsmessung mit dem Programm Gen5™ gestartet. Anschließend wurden 2 µl einer DNA Probe auf die Take3-Platte pipettiert und die Konzentration gemessen.

### **3.3.8. Aufreinigung von DNA und Plasmiden**

Die Aufreinigung diente der Entfernung von Inhibitoren und qualitätsmindernden Substanzen wie beispielsweise DNA Polymerasen, Fluoreszenzfarbstoffen, Primern, Pyrophosphat oder freiem Desoxynucleotide-Solution-Mix (dNTP). So konnte die Reinheit der Proben für die weiteren Untersuchungen sichergestellt werden.

#### **3.3.8.1. Aufreinigung mit DNA cleaner and concentrator™- 5 Kit**

Hierzu wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß die gewünschte Menge an Ausgangsprodukt, beispielsweise DNA, PCR-Produkt oder Plasmid, pipettiert und entsprechend den Vorgaben mit DNA Bindungspuffer gemischt. Anschließend wurde das Gemisch gründlich mit einem Vortexer vermischt. Als Nächstes wurde das Probengemisch auf die Zymo-Spin™ Filtersäule in einem 2 ml Auffanggefäß überführt und für 30 s bei 13.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf die Filtersäule 200 µl DNA Waschpuffer pipettiert. Danach wurde die Zentrifugation wiederholt. Anschließend wurde wieder Waschpuffer auf die Säule gegeben und ein weiteres Mal zentrifugiert. Die Filtersäule wurde dann auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, mit 6 µl Elutionspuffer beladen, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und mittels Zentrifugation für 30 s bei 13.000 × g die DNA eluiert.

#### **3.3.8.2. Aufreinigung von PCR Produkten mittels Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit**

Dieses Kit ermöglicht es gezielte DNA Fragmente auch bei Vorhandensein mehrerer Banden im Agarosegel getrennt auszuschneiden, aufzureinigen und zu untersuchen.

Hierzu wurde das gewünschte DNA Fragment unter Blaulichtanregung in der G:Box Geldokumentation sichtbar gemacht und dann mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten, sowie anschließend in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß gegeben, bei welchem zuvor das Leergewicht mit einer Laborwaage bestimmt wurde. Danach wurde das Reaktionsgefäß mit Inhalt erneut gewogen und so das Gewicht des Gelstückes ermittelt. Der Heizblock wurde auf 55 °C eingestellt, die dreifache Gewichtsmenge des Gelstückes an ADB Puffer in das Reaktionsgefäß gegeben und das Probengemisch solange im Heizblock Tmix bei 300 rpm inkubiert und geschüttelt bis das Gelstück vollständig aufgelöst war. Dies dauerte zwischen 5 und 10 min. Anschließend wurde das Probengemisch auf eine Zymo-Spin™ Filtersäule, die auf einem 2 ml Auffanggefäß steckt, überführt und für 30 s bei 10.000 × g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nun verworfen, 200 µl DNA Waschpuffer auf die Filtersäule pipettiert und die Probe danach bei derselben Geschwindigkeit erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Abschließend wurde die Filtersäule auf ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, 6 µl Elutionspuffer darauf pipettiert und für

30 s bei  $10.000 \times g$  zentrifugiert. Um den Erfolg der Aufreinigung aus dem Gel zu überprüfen, wurde im Anschluss ein Gemisch aus 9  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidest, 2  $\mu\text{l}$  6  $\times$  Loading Dye und 1  $\mu\text{l}$  aufgereinigtes PCR Produkt auf ein 1,5 % Gel aufgetragen und während der Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Vorhandensein der erwünschten Banden wurde wiederum in der G:Box Geldokumentation geprüft.

### **3.3.9. Klonierung von DNA**

#### **3.3.9.1. StrataClone Blunt PCR Cloning Kit**

Für den Ligationsansatz wurde 1  $\mu\text{l}$  aufgereinigtes PCR-Produkt mit 1,5  $\mu\text{l}$  StrataClone Blunt Klonierungspuffer und 0,5  $\mu\text{l}$  StrataClone Blunt Vektor Mix in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, sorgfältig gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechend der Probenanzahl wurden kompetente *E. coli* Zellen des StrataClone SoloPack in Reaktionsgefäßen aus dem  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen zu je 25  $\mu\text{l}$  aufgeteilt und 1  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes hinzugegeben. Das Probengemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das Wasserbad und das LB-Medium auf  $42\text{ }^\circ\text{C}$  sowie der Inkubator auf  $37\text{ }^\circ\text{C}$  vorgeheizt. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für einen Hitzeschock 45 s ins Wasserbad und dann für 2 min auf Eis gestellt. Danach wurden 250  $\mu\text{l}$  vorgewärmtes LB-Medium zu den Proben gegeben und diese für 1 h bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und 250 rpm inkubiert. Pro Probenansatz wurden zwei Petrischalen mit je 20 ml LB-Agar, 20  $\mu\text{l}$  X-Gal und 20  $\mu\text{l}$  Kanamycin unter der Sterilbank vorbereitet. Nach Erkalten wurden diese geschlossen und bis zur weiteren Nutzung bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden von jedem Probenansatz 150  $\mu\text{l}$  auf jeweils eine Agarplatte mit einem vorher abgeflamten Drigalski Spatel ausplattiert und über Nacht bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  im Inkubator belassen.

Am nächsten Morgen wurden die Platten aus dem Inkubator entnommen, auf Koloniewachstum geprüft, mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank bei  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Später wurden mit einer 10  $\mu\text{l}$  Pipettenspitze einzelne weiße Kolonien von den Platten gepickt und diese mitsamt Pipettenspitze in vorbereitete, beschriftete Reagenzgläser mit je 5 ml LB-Medium und 5  $\mu\text{l}$  Kanamycin überführt.

Über Nacht wurden die Reagenzgläser im  $37\text{ }^\circ\text{C}$  Inkubator bei 250 rpm geschüttelt.

Am nächsten Morgen wurden die Reagenzgläser aus dem Inkubator entnommen und bis zur weiteren Nutzung im Kühlschrank bei  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.3.9.2. Klonierung von DNA mittels TOPO TA Cloning Kit

Zuerst wurden 4 µl PCR Produkt, 1 µl Salt Solution und 1 µl TOPO vector gemischt und dieses Gemisch bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt.

Pro Probe wurde ein Röhrchen mit kompetenten *E. coli* Zellen aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. Im nächsten Schritt wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu den Zellen gegeben und vorsichtig vermischt. Das Gemisch wurde 30 min auf Eis inkubiert.

Währenddessen wurde das Wasserbad auf 42 °C und der Inkubator auf 37 °C vorgeheizt. Außerdem wurden das S.O.C. Medium aufgetaut und die Agarplatten vorbereitet. Dazu wurde LB-Agar aufgekocht und je 20 ml pro Platte mit 20 µl Kanamycin und 20 µl X-Gal versetzt. Es wurden je Probe zwei Platten benötigt und diese nach dem Trocknen bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C im Inkubator gelagert.

Die Probengemische erfuhren nun im Wasserbad bei 42 °C für 30 s einen Hitzeschock und wurden danach 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 250 µl des auf Raumtemperatur gebrachten S.O.C. Mediums dazugegeben und die Reaktionsgefäße bei 37 °C und 200 rpm für eine Stunde inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 10 % des jeweiligen Probengemischs auf die eine Platte und die restlichen 90 % auf die zweite Platte aufgetragen und mit einem Drigalski-Spatel verteilt. Zwischen den Proben musste der Spatel mit Hilfe eines Bunsenbrenners abgeflammt werden.

Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Morgen auf Koloniewachstum überprüft. Dann wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

Im Weiteren wurden mit einer 10 µl Pipettenspitze einzelne weiße Kolonien von den Platten gepickt und diese mitsamt Pipettenspitze in vorbereitete, beschriftete Reagenzgläser mit je 5 ml LB-Medium und 5 µl Kanamycin überführt. Über Nacht wurden die Reagenzgläser im 37 °C Inkubator bei 250 rpm geschüttelt.

Am nächsten Morgen wurden die Reagenzgläser aus dem Inkubator entnommen und bis zur weiteren Nutzung im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

### 3.3.10. Plasmid DNA Miniprep Kit

Von den Bakterienkulturen, welche am Vortag gepickt und angesetzt wurden, wurden jeweils 2 ml in ein Reaktionsgefäß gegeben und anschließend für 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in einen Erlenmeyerkolben abgegossen und der Schritt mit weiteren 2 ml der Bakterienkultur wiederholt. Danach wurden 250 µl Buffer B1 hinzugegeben und durch gründliches Vermischen mit Hilfe eines Vortexers das entstandene Bakterienpellet wieder gelöst. Als Nächstes wurden 250 µl Buffer B2 in das Reaktionsgefäß gegeben und dieses

vorsichtig 4- bis 6-mal gekippt. Ebenso wurde nach der Zugabe von 350 µl Buffer B3 verfahren. Nun wurde das Gemisch bei 13.000 rpm für 7 min zentrifugiert. Währenddessen wurde für jede Probe ein neues 2 ml großes Reaktionsgefäß mit einer Mini-Filtersäule bereitgestellt. In diese wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren gegeben. Der Deckel wurde geschlossen und das Reaktionsgefäß bei 13.000 rpm 30 s lang zentrifugiert. Danach wurden 700 µl Buffer B4 auf den Filter gegeben und erneut zentrifugiert. Nachdem das Filtrat aus dem Reaktionsgefäß verworfen wurde, wurde noch einmal zentrifugiert, um den Filter zu trocknen. Zum Schluss wurde der Filter in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 30 µl Buffer B5 direkt auf den Filter pipettiert. Dies wurde eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert, um die Plasmid DNA zu eluieren.

### **3.3.11. GenUp™ Plasmid Kit**

Seit Anfang 2018 wurde ein neues Kit zur Herstellung von Plasmid DNA verwendet. Zu Beginn wurden wieder 4 ml der Bakterienkultur in einem Reaktionsgefäß eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden 250 µl Buffer RESUSPENSION dazugegeben und solange auf dem Vortexschüttler gemischt bis ein homogenes Gemisch entstanden ist. Anschließend wurden 250 µl Buffer LYSIS LP hinzu pipettiert und durch siebenmaliges Schwenken vermischt. Darauf folgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 350 µl Buffer NEUTRALIZATION zu dem Gemisch gegeben und bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde auf eine Mini-Filtersäule gegeben, welche in einem Sammelgefäß stand. Diese wurde bei 12.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Nun folgten zwei Waschschriffe. Im Ersten wurden 500 µl Buffer WASH PA auf den Filter pipettiert und eine Minute zentrifugiert. Im zweiten Waschschriff wurden 700 µl Buffer WASH PB verwendet und wiederum eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Filter nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert, um diesen zu trocknen. Nun wurde der Filter auf ein neues Reaktionsgefäß aufgesetzt und 50 µl Buffer ELUTION EP auf den Filter pipettiert. Nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein letztes Mal bei 8.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Dann konnte der Filter entfernt werden. Die Plasmid DNA befand sich im Reaktionsgefäß.

### **3.3.12. Plasmid DNA Midiprep Kit**

Zuerst wurden die Bakterienkulturen, welche am Vortag angelegt werden, schrittweise zentrifugiert. Dabei wurden je 50 ml in einem Falcon bei 7000 rof für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt.

Das so entstandene Bakterienpellet wurde in 8 ml ZymoPURE™ P1 (Red) mittels gründlichem Schütteln auf dem Vortexer gelöst. Dann wurden 8 ml ZymoPURE™ P2 (Green) dazu gegeben und durch mehrmaliges Schwenken vermischt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden weitere 8 ml ZymoPURE™ P3 (Yellow) hinzu pipettiert und durch Schwenken vermengt. Nun wurde eine Spritze mit ZymoPURE™ Syringe Filter in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gestellt, das Gemisch in die Spritze gegeben, 8 min lang inkubiert und dieses dann mit Hilfe des Spritzenkolbens durch den Filter gedrückt. Zu der gefilterten Lösung wurden nun 8 ml ZymoPURE™ Binding Buffer pipettiert und dieses wiederum 8-mal geschwenkt.

Jetzt wurde die Vakuumpumpe benötigt. Nachdem diese angeschlossen und überprüft wurde, wurde das Zymo-Spin™ III-P Column Assembly auf den Vakuumverteiler aufgesteckt. Das Gemisch wurde hineingegeben und das Vakuum aktiviert. Wenn die gesamte Säule geleert war, konnte das Reservoir entfernt werden. Anschließend wurde die Säule gewaschen. Während des Pipettierens des Waschpuffers sollte das Vakuum jeweils ausgeschaltet werden. Zuerst wurden 800 µl ZymoPURE™ Wash 1 in die Säule gegeben und das Vakuum aktiviert bis der Waschpuffer vollständig durch die Säule gesaugt wurde. Dieser Schritt wurde nun zwei Mal mit 800 µl ZymoPURE™ Wash 2 wiederholt. Danach wurde die Zymo-Spin™ III-P Column in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Zum Schluss wurde die Zymo-Spin™ III-P Column in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, 200 µl ZymoPURE™ Elution Buffer auf die Säulenmembran pipettiert und dieses für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Plasmid aus dem Filter zu lösen, folgte nun eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm.

### **3.3.13. Sequenzierung von DNA**

Um Erreger eindeutig zu identifizieren, können die einzelnen Basen der amplifizierten DNA-Abschnitte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) entschlüsselt und anschließend mit der Software BLAST (= Basic Local Alignment Search Tool [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast)) abgeglichen werden (Altschul et al., 1990).

Für diese Studie wurden die zu sequenzierenden Proben zu LGC Genomics (Berlin) geschickt und dort analysiert. Hierzu wurde zunächst das PCR Produkt aufgereinigt und anschließend 1 µl PCR Produkt, 9 µl Aqua bidest und 2 µl Loading Dye × 6 auf ein 1,5 % Gel aufgetragen, um das Vorhandensein von ausreichend DNA zu überprüfen. Zusätzlich wurde die aufgereinigte DNA auf Qualität und Quantität mittels einer Dichtemessung mit dem Epoch® Bioteck Spektralphotometer überprüft.

Für die Sequenzierung wurden 15 µl der aufgereinigten DNA mit einer ungefähren Konzentration von 100 ng/µl in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und in eine

Pick up Box gegeben, welche täglich geleert und die Proben in die Firma LGC Genomics gebracht wurden. Als Primer dienten zumeist das Standardprimerpaar M13-24F-BLUE und M13-24R-BLUE bzw. M13-21F und M13-29R.

#### **3.3.14. Restriktionsverdau von Plasmiden mit EcoRI Enzym**

Für den Verdau von Plasmiden wurde in dieser Studie das Restriktionsenzym *EcoRI* verwendet. Um die Restriktion anzusetzen, wurden 16,5 µl Aqua bidest, 2 µl *EcoRI* Puffer, 0,5 µl *EcoRI* Enzym (10 U/µl) und 1 µl aufgereinigtes Plasmid zusammen in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 37 °C für 1 bis 3 Stunden im Wasserbad belassen. Um das Ergebnis ablesen zu können, wurden 4 µl 6 × Loading Dye zu dem Verdau gegeben und 10 µl auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Außerdem wurden 125 ng des *EcoRI* Markers auf das Gel aufgetragen, um damit die Größen der DNA Fragmente abzulesen. Das Gel wurde dann in der Elektrophoresekammer aufgetrennt und im Anschluss in der G:Box Geldokumentation ausgewertet.

#### **3.3.15. Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Amplifizierung von Genabschnitten. Dabei werden die DNA-Doppelstränge unter hohen Temperaturen denaturiert. An die so entstandenen Einzelstränge binden passende Primer, die als Start- und Endpunkte dienen, damit neue, identische Doppelstränge gebildet werden können. Diesen Schritt nennt man „Annealing“. Darauf folgt die Phase der „Elongation“, bei der die exponentielle Vervielfältigung der DNA, welche von der Polymerase katalysiert wird, stattfindet (Reinard, 2010).

Neben der thermostabilen Polymerase und einem Primerpaar werden zur Durchführung einer PCR Puffer für das richtige pH-Milieu, Nukleotide für die Zweitstrangbildung und die zu vervielfältigende DNA aus dem Ausgangsmaterial benötigt. Diese Reagenzien und Puffer können in einem Master-Mix gemischt und auf die Reaktionsgefäße aufgeteilt werden, sodass nur noch das Template einzeln hinzugefügt werden muss.

##### **3.3.15.1. konventionelle PCR zur Untersuchung auf Dirofilarien**

Als Zielregion für die Untersuchung auf *Dirofilaria* spp. wurde die Internal Transcribed Spacer Region 2 (ITS-2) gewählt. Dieser Bereich liegt innerhalb der genomischen, ribosomalen DNA und kommt in nahezu allen Eukaryoten vor. Die rDNA-Region ist bei jedem Erreger individuell und setzt sich aus mehreren konservierten Genabschnitten (18S, ITS-1, 5.8S, ITS-2, 28S) zusammen, die für den Aufbau von Ribosomen kodieren. Die für rRNA

kodierenden Gene liegen bei Eukaryoten als tandem-repeats im Genom vor. Die verwendeten Primer für diese PCR binden außerhalb der ITS-1-Region in der 18S und der 5.8S Region und wurden bereits in der Literatur beschrieben (Nuchprayoon et al., 2005). Die gesuchte Fragmentgröße beträgt für *Dirofilaria repens* 599-602 bp und für *Dirofilaria immitis* 595 bp.

Pro 20 µl Ansatz für eine PCR wurden im Mastermix 12,4 µl DEPC-Wasser, 4,0 µl 5 x Phusion HF Puffer, 0,4 µl dNTPmix 10 mM, 0,5 µl Primer ITS-1 Filarien-ITS1-Forw (10 µM), 0,5 µl Primer ITS-1 Filarien-ITS1-Rev (10 µM), 0,2 µl Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl) sowie 2,0 µl Template DNA (20-100 ng/µl) vermischt.

Bei jeder PCR wurde ein Plasmid von *D. hongkongensis* mit 200 Kopien als Positivkontrolle mitgeführt, das sich in seiner Fragmentgröße von 473 bp deutlich von dem gesuchten Produkt unterschied, um falsch positive Ergebnisse zu erkennen. Es gab bei jeder PCR ebenfalls eine Negativkontrolle mit 2 µl DEPC-Wasser statt Template DNA im Ansatz. Die Detektionsgrenze dieser PCR lag bei 2 Kopien und wurde mit einer Verdünnungsreihe ermittelt.

Die initiale Denaturierung fand bei 98 °C für 30 s statt, gefolgt von 40 Zyklen mit 98 °C für 10 s und 68 °C für 45 s. Danach folgte die abschließende Elongationsphase bei 72 °C für 5 min.

Die PCR Produkte wurden anschließend mit Loading-Dye vermischt auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde das Bandenmuster mittels G:Box und GeneSnap-Software sichtbar gemacht.

#### 3.3.15.2. konventionelle PCR zur Untersuchung auf Anaplasmen

Zum Nachweis von *Anaplasma* spp. wurde eine konventionelle PCR zum Nachweis des 16S rRNA-Gens durchgeführt.

Die dazu verwendeten Primer wurden auf Grundlage einer Publikation aus 2008 (Tabar et al., 2008) bereits für eine frühere Studie modifiziert (Liesner et al., 2016). Dabei wurde die letzte Base des Vorwärtsprimers durch Cytosin oder Thymin ausgetauscht. Diese letzte Base bindet somit Guanin bzw. Adenin. Durch diese Modifikation wird ein breiteres Spektrum an Zielsequenzen abgedeckt. Das gesuchte Fragment hat eine Größe von 251 bp.

Es wurden für die PCR jeweils 25 µl Ansätze verwendet, welche 17,5 µl nukleasefreies Wasser, 2,5 µl 10× Hot Start PCR Puffer, 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,75 µl A/Efor (10 µM), 0,75 µl A/Erev (10 µM), 0,75 µl dNTP Mix (10 mM), 0,25 µl Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase (5 U/µl), sowie 2,0 µl Template DNA (50-140 ng/µl) enthielten.

Bei der Amplifikation wurde eine initiale Denaturierungsphase von 95 °C für 5 min durchlaufen, gefolgt von 40 Zyklen von je 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C und 30 s bei 70 °C. Daran schloss sich eine Elongationsphase von 7 min bei 72 °C an.

Das Resultat der PCR wurde anschließend im 1,5%igen Agarosegel durch Elektrophorese überprüft. Ein 100 bp-Marker wurde zur Kontrolle der Bandengröße aufgetragen.

Als Positivkontrolle diente eine Probe, welche umgerechnet 40 Kopien/µl des zu untersuchenden Genbereiches für *Anaplasma phagocytophilum* enthielt. Diese wurde mit 0,25 µl/ml ssDNA Salmon Sperm in einer seriellen Verdünnung hergestellt. Die Sensitivität lag in der durchgeführten Verdünnungsreihe bei 20 Kopien.

### 3.3.15.3. High Resolution Melt PCR zur Untersuchung auf *Ehrlichia canis* und *Anaplasma phagocytophilum*

Bei dieser Methode findet zunächst eine real-time PCR in Gegenwart seines Fluoreszenzfarbstoffs statt, der nur an doppelsträngige DNA bindet. An diese schließt sich eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse, die High Resolution Melting Analysis (HRM), an. In der vorliegenden Arbeit wurde sie für die Identifizierung von zwei verschiedenen Erregern, *A. phagocytophilum* und *E. canis*, eingesetzt und ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Krücken et al., 2013). Während der PCR wurde das gesuchte DNA Fragment mit einer Größe von 257 bp amplifiziert und der Fluoreszenzstoff EvaGreen® bindet an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA Helix, wodurch ein detektierbares Signal erzeugt wurde. Darauf folgte die eigentliche Schmelzkurvenanalyse. Durch eine kontinuierliche Erhitzung kommt es zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge, der Fluoreszenzfarbstoff löst sich und das Signal nimmt ab. Es entstehen entsprechend der Nukleotidzusammensetzung und Länge der DNA-Fragmente erregerspezifische Schmelzkurven, die mit der Bio-Rad Precision Melt Analysis™ 1.0 Software analysiert werden und durch ihre unterschiedlichen Verläufe mit dem Vergleich von mitgeführten Positivkontrollen einem Erreger zugeordnet werden können.

Während der gesamten Vorbereitungs- und Pipettierphase wurde sorgfältig darauf geachtet, dass das Umgebungslicht gedimmt war, da der Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist. Pro Ansatz wurden 15,1 µl DEPC-Wasser, 5,0 µl 5 × Phusion HF Puffer, 0,75 µl Primer A/E for (10 µM), 0,75 µl Primer A/E rev (10 µM), 0,75 µl dNTPmix 10 mM, 0,25 µl Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl), 0,4 µl Eva Green DNA stain (50 × conc.) und 2,0 µl Template DNA (20-100 ng/µl) in dafür vorgesehene Felder von weißen 96-well PCR-Platten pipettiert. Die Platte wurde anschließend mit BZO Seal Film verschlossen und in den CFX96™ Real-Time System Cycler gestellt.

Folgendes PCR-Programm wurde durchlaufen: 98 °C für 30 s, gefolgt von 50 Zyklen mit 98 °C für 15 s, 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s. Im Anschluss fand die kontinuierliche Erhitzung statt, beginnend bei 72 °C und endend bei 94,2 °C. Die Temperatur stieg dabei um 0,1 °C je 10 s. Darauf folgte die Auswertung mit der Bio-Rad Precision Melt Analysis™ 1.0 Software.

Als Positivkontrolle wurden im Doppelansatz Plasmide mit 300 bzw. 200 Kopien von *A. phagocytophilum* bzw. *E. canis* verwendet. Die Detektionsgrenze lag bei 200 Kopien und wurde mit einer Verdünnungsreihe ermittelt.

#### 3.3.15.4. konventionelle PCR zur Untersuchung auf Babesien

Als Zielregion für die PCR zum Nachweis von *Babesia* spp. wurde das 18S rRNA-Gen genutzt.

Als Primer wurden die bereits in der Literatur beschriebenen RLB-F2 und RLB-R2 verwendet (Matjila et al., 2004). Das gesuchte DNA-Fragment ist zwischen 460 und 540 bp lang.

Für die PCR wurde ein 25 µl Ansatz verwendet, welcher 16,8 µl nukleasefreies Wasser, 2,5 µl 10× Hot Start PCR Puffer, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µl dNTP Mix (10 mM), 0,75 µl RLB-F2 (10 µM), 0,75 µl RLB-R2 (10 µM), 0,2 µl Maxima®Hot Start *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl) und 2,0 µl Template DNA (50-140 ng/µl) enthielt.

Nach einer initialen Denaturierung bei 94 °C für 4 min wurde ein Protokoll mit 40 Zyklen von je 15 s bei 94 °C, 30 s bei 63 °C und 40 s bei 72 °C durchlaufen. Darauf folgte eine abschließende Elongationsphase bei 72 °C über 10 min.

Als Positivkontrolle wurden 25 Kopien von einem Plasmid eingesetzt. Die Nachweisgrenze lag in der Verdünnungsreihe bei 10 Kopien.

Die sich an die PCR anschließende Gelelektrophorese fand im 1,5 % Agarosegel statt.

#### 3.3.15.5. konventionelle PCR zur Untersuchung auf Hepatozoon canis

Zum Nachweis von *H. canis* in den Hunde- und Fuchsblutproben wurden die in der Literatur bereits beschriebenen Primer HepF und HepR verwendet (Inokuma et al., 2002). Als Zielregion diente ein 666 bp langes Fragment des Hepatozoon sp. 18S rRNA-Gens.

Es wurde ein Ansatz aus 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,3 µM von jedem Primer (10 µM) und 1 U Maxima®Hot Start *Taq* DNA Polymerase in 25 µl 1×Hot Start PCR-Puffer verwendet. Außerdem wurden 2 µl Template dieser Mischung hinzugefügt. Nach der anfänglichen Denaturierung bei 94 °C für 4 min wurden 40 Zyklen von 94 °C für 15 s, 56 °C für 30 s und 72 °C für 40 s vor einer Endinkubation bei 72 °C für 10 min durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in 1,5 % Agarosegelen getrennt, die mit GRGreen gefärbt wurden.

Als Positivkontrolle diente ein verdünntes Plasmid mit 200 Kopien. Die Sensitivität der PCR lag bei 60 Kopien.

### **3.3.16. Agarosegelelektrophorese**

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle durch die Erzeugung eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels eines Farbstoffes sichtbar gemacht. Die DNA-Moleküle sind durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen und wandern daher im Gel von der Anode zur Kathode. Das Agarosegel bietet aufgrund seiner Porenbeschaffenheit kleinen Molekülen weniger Widerstand, so dass große DNA-Fragmente langsamer wandern. Moleküle mit gleicher Größe und Laufgeschwindigkeit sammeln sich in Banden auf dem Gel. Anhand der Länge der DNA-Fragmente im Vergleich zu bekannten Kontrollen können dann bestimmte Erreger identifiziert werden.

Als Erstes wurde das Agarosegel hergestellt. Abhängig von der erwarteten DNA-Fragmentgröße wurde die passende Gelkonzentration gewählt. In dieser Studie wurde zumeist eine 1,5 %ige Konzentration von Agarose Pulver in TAE-Puffer verwendet. Die Lösung wurde dann auf 65 °C im Wasserbad temperiert. Anschließend wurde die benötigte Menge in ein 120 ml Gefäß aus Kunststoff abgefüllt, pro 100 ml Agaroseflüssigkeit 10 µl GR Green Farbstoff hinzu pipettiert und das Gefäß vorsichtig geschwenkt, damit sich der Farbstoff gleichmäßig verteilt. Ein Kamm von einer Größe entsprechend der Probenzahl wurde in einen Gelschlitten eingesetzt, dieser in einem Gießstand befestigt und die Gelflüssigkeit in den Schlitten gegossen. Nachdem das Gel fest war, wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer, die mit TAE Puffer befüllt war, eingesetzt. Im Anschluss wurden die Geltaschen mit 10 µl eines Gemischs aus PCR Produkt und 6 × Loading Dye im Verhältnis 6:1 beladen. Zum Ablesen der Bandengrößen wurde ein Marker am Rande des Gels aufgetragen. Anschließend wurde die Gelkammer verschlossen und an Elektroden in Verbindung zu einem Netzgerät angeschlossen. Die Elektrophorese erfolgte mit 3,4 V/cm. Die Auswertung des Gels fand in der G:Box Geldokumentation mit der GeneSnap Version 7.09.06 Software statt.

### **3.3.17. Statistische Auswertung**

Die Auswertung der in dieser Studie generierten Daten fand mit R version 3.5.0. statt. Dazu wurden die zu den Hunden ermittelten Daten wie Alter und Geschlecht mit Zahlen kodiert und anschließend die Exceltabelle in R importiert. So konnte die Prävalenz der einzelnen Erreger mit einem 95 % Konfidenzintervall errechnet werden. Dazu wurde das Wilson Score Interval herangezogen. Außerdem fand eine Auswertung mittels des Mid-p-Exact Tests in R statt. Es war aufgrund der teils fehlenden Daten bzw. niedrigen Infektionsraten nur bedingt möglich Zusammenhänge zwischen den einzelnen Variablen herzustellen. Ebenso wurde versucht eine logistische Regression mit entsprechenden odds ratios zu erstellen.

Des Weiteren wurde der Cohen-Kappa-Test beim Vergleich verschiedener Untersuchungsmethoden für den Nachweis der jeweiligen Erreger verwendet. Die Berechnung wurde mit einem online verfügbaren Programm durchgeführt (<http://vassarstats.net/kappa.html>).

### **3.3.18. Phylogenetische Analyse**

Die in der Hepatozoon PCR positiven Fuchs- und Hundeproben wurden phylogenetisch weiter untersucht. Dazu wurde entweder direkt das PCR-Produkt aufgereinigt oder wenn nötig die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend aufgereinigt. Im Falle der Fuchsproben wurden die aufgereinigten PCR-Produkte zum Sequenzieren eingeschickt. Die aufgereinigten Hundeproben wurden zuerst kloniert und dann das Plasmid zum Sequenzieren gegeben.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des CloneManager Professional 9 bearbeitet und mittels BLASTn-Suche in GenBank™ (Altschul et al., 1990) identifiziert. Im nächsten Schritt wurden die Sequenzen mit einigen Vergleichssequenzen aus der GenBank™ in MEGA7 (Kumar et al., 2016) importiert. Darin wurde ein Alignment erstellt.

Anschließend wurden die Sequenzen mit Hilfe von MUSCLE (Edgar, 2004) auf die GenBank™-Einträge abgestimmt. In PopART 1.7 (Bandelt et al., 1999) (<http://popart.otago.ac.nz>) wurde ein median-joining-Netzwerk berechnet.

Konfidenzintervalle für Parasitenhäufigkeiten wurden mit der binom.wilson-Funktion berechnet und Häufigkeiten mit der tab2by2.test Funktion aus dem EpiTool-Paket in R 3.5.2 verglichen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Stichprobengröße

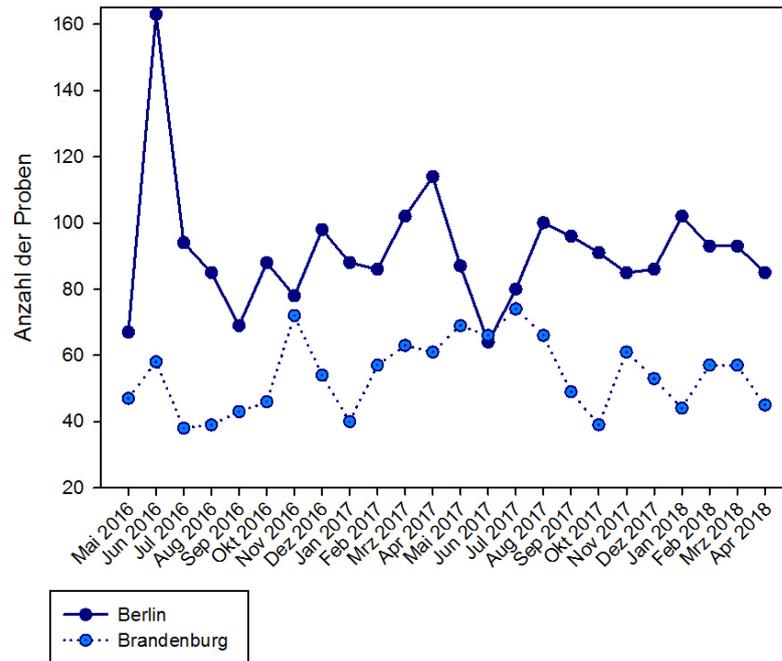
Die Stichprobengröße von  $n = 1000$  orientierte sich an einer zwischen 2013-2016 durchgeführten Studie im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin, aus welcher auch die Proben für die Untersuchungen auf *H. canis* stammten. Dabei wurden bei einem ähnlichen Studiendesign rund 1000 Hunde aus Brandenburg beprobt (Liesner et al., 2016). Diese Stichprobe wurde mittels der Statistik Software OpenEpi Version 3.01 und der Formel Stichprobengröße  $n = [DEFF * Np(1-p)] / [(d_2 / Z_{21-\alpha/2} * (N-1) + p * (1-p)]$  berechnet.

Dabei stand **DEFF** für den Design Effekt = 1 (Verhältnis der Varianz der Stichprobe zur Varianz einer zufälligen Stichprobe, hier angenommen als 1), **d** für Konfidenzgrenzen als % von 100 (absolute +/- %) = 5 %, **p** für die hypothetische % Frequenz des gesuchten Faktors in der Population, wenn unbekannt 50 % = 50 % (+/- 5) und **N** für die Populationsgröße = 121.224 Hunde aus dem Bundesland Brandenburg (Quelle: Innenministerium Brandenburg, Stand 2012). Zu gleicher Zeit belief sich die Populationsgröße der Hunde aus dem Bundesland Berlin auf 97.996 (Quelle: Senatsverwaltung für Finanzen „Statistisches Jahrbuch Berlin 2014“). Bei der Berechnung der obengenannten Formel mit der neuen Populationsgröße von 219.220 Hunden in der Region Berlin/ Brandenburg änderte sich die kalkulierte Stichprobengröße bei einem Konfidenzintervall von 99,9 % nicht. Aus Gründen der Vergleichbarkeit hatten wir uns entschieden die Stichprobengröße bei  $n = 1000$  zu belassen.

Durch das bereits erwähnte hohe Probenaufkommen zu Beginn der Studie entschieden wir, dass aus den gesammelten Proben jeden Monat nur 42 Proben letztendlich untersucht werden sollten, damit bei der festgelegten Stichprobengröße und einem repräsentativen Zeitraum von zwei Jahren geblieben werden konnte. Diese Proben wurden mittels eines Zufallsgenerators ausgewählt, wobei jeden Monat 21 Proben aus der Region Berlin und 21 aus Region Brandenburg stammten, damit beide Regionen in der Studie gleichmäßig beprobt werden konnten.

Insgesamt habe ich im Verlauf von zwei Jahren, beginnend im Mai 2016, 3515 Serumproben von Hunden aus Berlin und Brandenburg gesammelt. Die Probensammlung war im April 2018 abgeschlossen. Aufgrund der zufälligen Auswahl gingen 1008 Proben in die Untersuchungen ein.

In Abbildung 2 wurde das Probenaufkommen über den Sammelzeitraum, unterteilt in die beiden Bundesländer Berlin und Brandenburg, dargestellt. Die Probensammlung dauerte 24 Monate und es war von allen Proben das genaue Entnahmedatum nachzuvollziehen. Für die Region Brandenburg lagen in jedem Monat weniger Proben vor als für die Region Berlin, außer im Juni 2017. Im Mittel wurden aus Berlin 91,42 Proben jeden Monat gesammelt und aus Brandenburg 54,08. Zuerst gingen nur Proben aus der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin ein. Ab August 2016 waren auch Proben über das Labor LABOKLIN zugänglich.



**Abbildung 2: Anzahl der Proben je Monat**

Die Proben wurden nach Abschluss der Sammlung für den jeweiligen Monat auf *Babesia* spp., *Leishmania* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia* spp. und *Dirofilaria immitis* untersucht. Im Dezember 2017 erfolgte die Untersuchung von 756 Proben auf *A. vasorum* Antigen und Antikörper sowie auf *Dirofilaria* spp. Im Verlauf der Studie wurden außerdem 1002 Proben nochmals auf das Vorkommen von *Leishmania* spp. untersucht. Des Weiteren konnten im November 2018 die fehlenden 252 Proben auf *A. vasorum* Antigen und Antikörper sowie auf *Dirofilaria* spp. getestet werden und ebenfalls im November 2018 ein ELISA für den Nachweis von *Leishmania* spp. und *Anaplasma* spp. für 991 bzw. 1001 Proben durchgeführt werden. Im Anschluss daran erfolgte eine Untersuchung weniger ausgewählter Proben mittels IFAT auf *Leishmania* spp. und *Anaplasma* spp.

#### **4.2. Herkunft und geografische Verteilung der Proben**

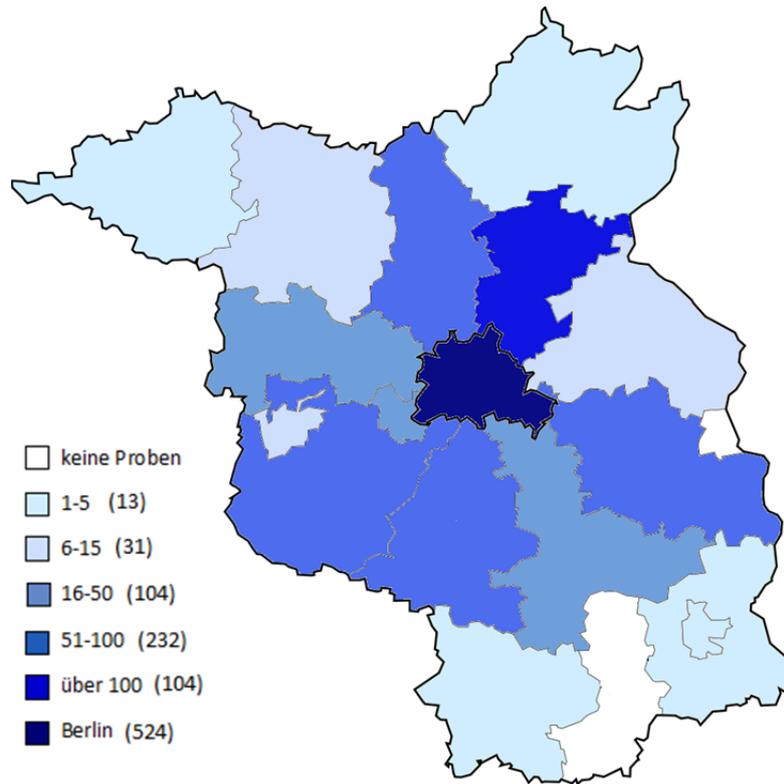
Die Proben dieser Studie stammten zum einen von Patienten der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin und zum anderen von Tierarztpraxen aus Berlin und Brandenburg, welche die Serumproben ihrer Patienten aufgrund anderer Untersuchungen in das Labor LABOKLIN geschickt haben und mittels Einverständniserklärung die Weiteruntersuchung im Rahmen dieser Studie im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin erlaubten. Dadurch wurden für diese Studie ausschließlich Proben verwendet, welche zu diagnostischen Zwecken entnommen wurden und nach Abschluss der Untersuchungen verworfen worden wären. Außerdem wurden DNA-Proben, welche aus Hundevollblut gewonnen wurden, einer früheren Studie für die PCR-Untersuchungen auf *H. canis* verwendet. Auch diese Proben stammten aus der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin und von Tierarztpraxen aus Brandenburg (Liesner et al., 2016). In dieser Studie wurden außerdem Fuchsproben gesammelt, die von Herrn Dr. Schulze aus dem Landeslabor Berlin-Brandenburg in Frankfurt (Oder) zur Verfügung gestellt wurden.

In Abbildung 3 sind der Standort der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin und der Praxen dargestellt. Insgesamt nahmen 61 Tierarztpraxen auf diesem Weg an der Studie teil. Davon hatten 29 ihren Hauptsitz in Berlin und 32 in Brandenburg. Aufgrund dieser Verteilung ist die Region Berlin in dieser Studie deutlich besser repräsentiert als die Region Brandenburg. Vor allem in den Randgebieten sind kaum teilnehmende Tierarztpraxen angesiedelt. Aus drei von vier kreisfreien Städten, sowie sechs von 14 Landkreisen haben keine Praxen an der Studie teilgenommen. Teilweise konnten trotzdem Proben aus diesen Gebieten für die Studie ausgewertet werden, da die Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität ein sehr großes Einzugsgebiet hat. Insgesamt sind 692 Proben (68,65 %) von Patienten der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin in die Studie eingegangen und 316 (31,35 %) aus anderen Tierarztpraxen.



**Abbildung 3: Standorte der teilnehmenden Praxen\***

In Abbildung 4 ist die Herkunft der Proben aus den einzelnen Landkreisen dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass aus dem Landkreis Oberspreewald-Lausitz und aus Frankfurt Oder keine Proben in die Studie eingegangen sind. Aufgrund des Studiendesigns kamen aus Berlin die Hälfte aller Proben. In Brandenburg kamen die meisten Proben aus dem Landkreis Barnim mit 104 Proben (10,32 %).

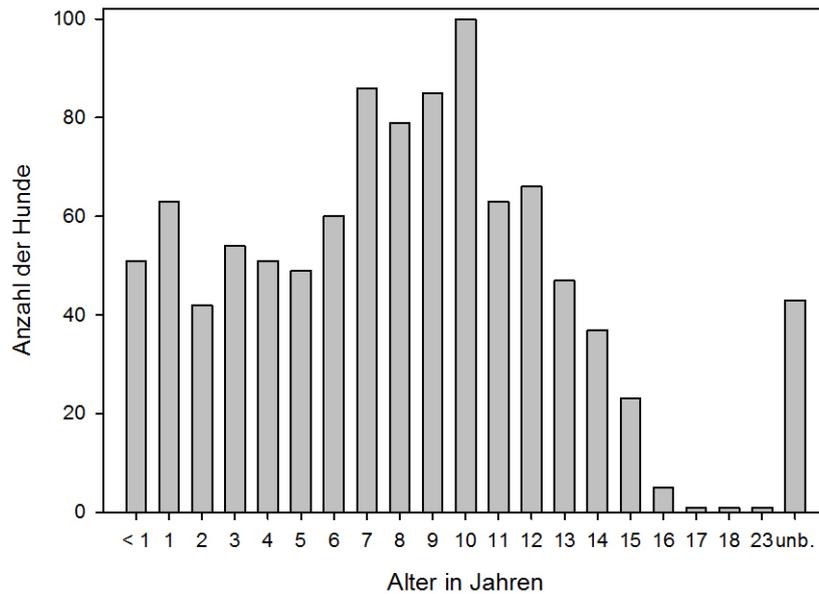


**Abbildung 4: Herkunft der Proben\***  
in () ist die Anzahl der Proben in der Stichprobenspanne angegeben

### 4.3. Signalement der getesteten Hunde

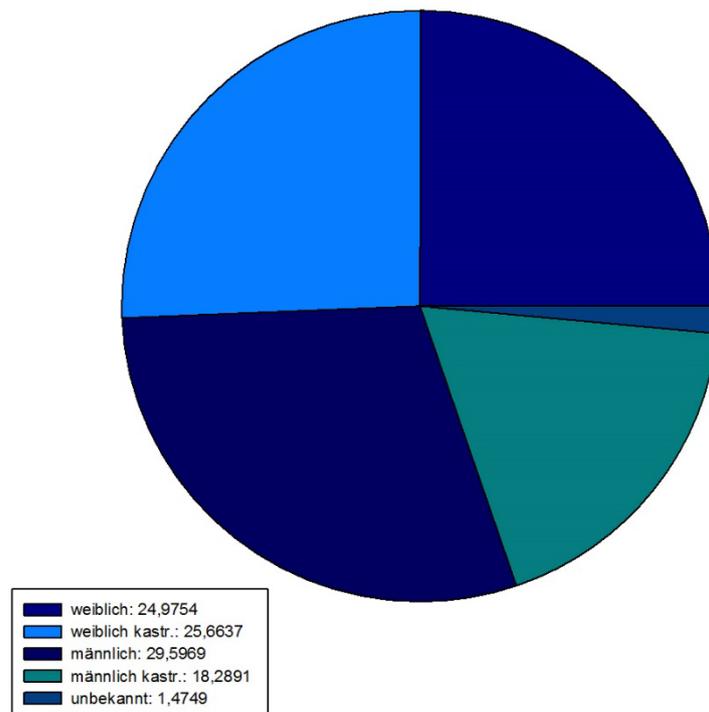
Bei der Probensammlung wurde versucht, das Signalement der Hunde so gut wie möglich zu dokumentieren. Dabei wurden im Falle der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin Daten aus den Akten der Hunde verwendet und bei den Proben, die durch das Labor LABOKLIN eingeschickt wurden, über die Untersuchungsbögen aus den Tierarztpraxen ermittelt. Aufgrund datenschutzrechtlicher Bestimmungen konnte nur der Name des Hundes, Alter, Geschlecht, der Wohnort bzw. der Sitz der Praxis und in den meisten Fällen die Rasse des Hundes vermerkt werden.

In Abbildung 5 ist die Altersverteilung der Hunde dargestellt, die an der Studie teilgenommen haben. Die Hunde waren im Mittel 7,5 Jahre alt. Der jüngste Hund war 0,17 Jahre alt und der älteste 23 Jahre. Daraus ergibt sich eine Spannweite von 22,83 Jahren. Bei 43 Hunden (4,27 %) konnte das Alter nicht ermittelt werden.



**Abbildung 5: Alter der Hunde in Jahren**

Das Geschlechterverhältnis kann in der vorliegenden Arbeit als grob ausgeglichen angesehen werden, wie in Abbildung 6 zu erkennen ist. Insgesamt 254 Hunde (24,98 %) der Studie waren weiblichen Geschlechts und 261 (25,66 %) waren weiblich kastriert. Bei den männlichen Hunden zeigte sich ein etwas geringerer Anteil an kastrierten Hunden. Es nahmen insgesamt 487 (48,31 %) männliche Hunde an den Untersuchungen teil, davon waren 186 (18,29 %) kastriert. Das Geschlecht von 15 Hunden (1,47 %) der Studie war unbekannt.



**Abbildung 6: Geschlecht der Hunde in %**

Alles in allem nahmen 113 verschiedene Rassen an der Studie teil. Die meisten Hunde waren Mischlinge mit 15,18 % (153 Hunde). Bei den reinrassigen Hunden waren der Labrador, mit 66 Hunden (6,55 %), und der Deutsche Schäferhund, mit 30 Hunden (2,98 %), am häufigsten vertreten. Bei insgesamt 704 Hunden (69,84 %) konnten Aussagen zur Rasse dokumentiert werden.

#### **4.4. Seroprävalenzen der Erreger bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg**

Die Seroprävalenzen für *Leishmania* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Borrelia* spp., *Dirofilaria* spp. und *A. vasorum* wurden in der vorliegenden Arbeit mittels verschiedener ELISA Untersuchungen ermittelt. Außerdem fand eine Prävalenzuntersuchung auf *H. canis* mittels PCR statt.

##### **4.4.1. Leishmanien**

Die Untersuchungen auf Leishmanien wurden zuerst mit einem in-house entwickelten Test durchgeführt. Allerdings fielen dabei schnell Probleme mit dem cut-off auf, welche sich nicht ausreichend klären oder beheben ließen. Aus diesem Grund wurden die Proben im Labor von LABOKLIN mit dem dort verwendeten Test untersucht.

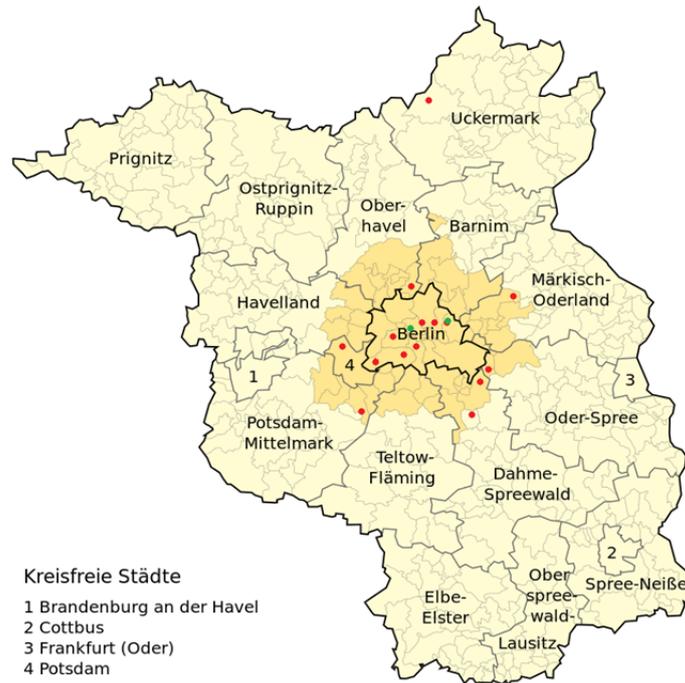
Von den 1002 getesteten Serumproben mit dem Leishmanien-ELISA von LABOKLIN konnten 53 als positiv detektiert werden. Das entspricht einer Prävalenz von 5,28 %, das dazugehörige 95 % Konfidenzintervall (95 % KI) reicht von 4,07 % - 6,85 %. Im Verlauf der Studie ergab sich außerdem die Möglichkeit, die Proben mit dem von Afosa entwickelten Leishmanien-ELISA zu testen. Dabei konnten in 31 von 991 Proben Antikörper auf *Leishmania* spp. nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 3,13 % mit einem 95 % KI von 2,21 - 4,41 %.

Insgesamt waren 14 Proben in beiden Tests positiv und 925 Proben in beiden Tests negativ. Beim Vergleich der beiden ELISAs mit dem Cohen Kappa Test wurde ein Koeffizient von 0,32 (KI 95%: 0,14-0,50) ermittelt, was einer schwachen Übereinstimmung entspricht.

Zur weiteren Abklärung der in nur einem ELISA positiv getesteten Proben wurden 48 davon nochmals mit einem IFAT untersucht. Dabei wurden zwei positive Ergebnisse detektiert. Einmal konnte so ein Ergebnis des LABOKLIN-ELISAs und einmal eines des Afosa-ELISAs bestätigt werden.

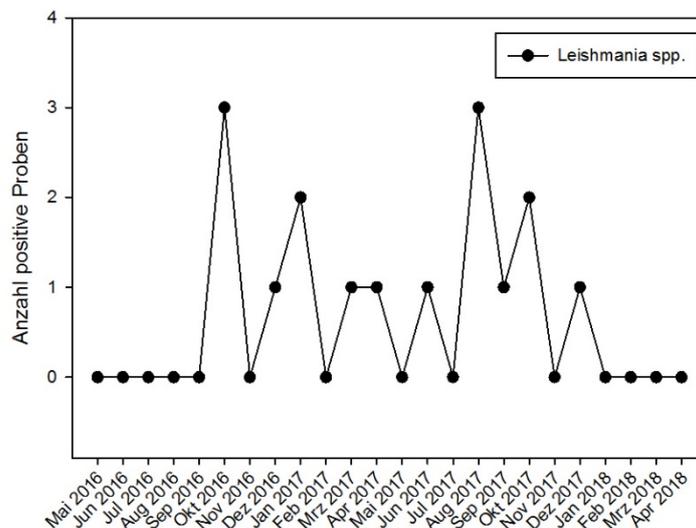
Aufgrund dessen wird in der weiteren Betrachtung von 16 definitiv als positiv getesteten Hunden ausgegangen.

Die lokale Verteilung der positiven Leishmanienproben ist in Abbildung 7 mittels Punkten dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die meisten der positiven Hunde in Berlin und dem Umland leben, sowie auch vereinzelt in Brandenburg zu finden sind.



**Abbildung 7: Lokale Verteilung der positiven Leishmanienproben\***

Die saisonale Verteilung der positiven Leishmanienproben ist in Abbildung 8 dargestellt. In dem Diagramm ist zu erkennen, dass im September 2016 und im August 2017 drei positive Funde zu verzeichnen waren, was der höchsten monatlichen Anzahl entspricht. Außerdem wurden im Januar 2017 und Oktober 2017 jeweils zwei positive Proben gefunden. In den restlichen Monaten des Sammelzeitraumes war maximal ein Hund positiv auf Leishmanien getestet worden. Durchschnittlich konnten 0,66 positive Hunde je Monat gefunden werden.



**Abbildung 8: Saisonale Verteilung der positiven Leishmanienproben**

Der Reisehintergrund konnte bei 12 der 16 positiv getesteten Hunde abgeklärt werden. Bei vier Fällen konnte keine Reiseanamnese erhoben werden bzw. war diese den Besitzern unbekannt. Laut Aussagen der Besitzer haben zwei Hunde Deutschland nicht verlassen (grüne Punkte in Abb. 7), während bei 10 Hunden ein Reisehintergrund vorhanden war. Zur diagnostischen Abklärung wurden teilweise Vollblutproben von den positiven Hunden entnommen und diese nach DNA-Extraktion mittels PCR untersucht. Von den 53 im LABOKLIN- ELISA positiven Hunden wurde bei sieben eine Vollblutprobe eingesendet. Davon war keine in der PCR positiv. Von den definitiv positiven Proben waren zwei unter denen in der PCR getestet.

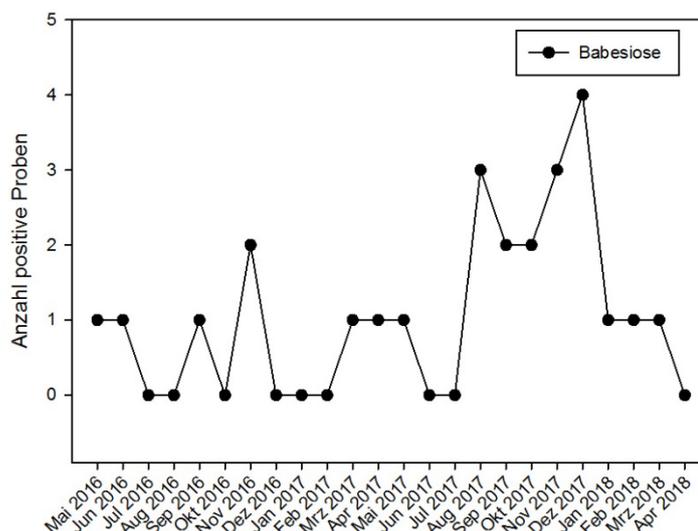
#### 4.4.2. Babesien

Mit dem Babesien-ELISA wurden 1008 Proben untersucht, wobei 26 positiv getestet wurden. Demnach liegt die ermittelte Prävalenz bei 2,58 % mit einem 95 % KI von 1,77 - 3,75 %. In Abbildung 9 ist die lokale Verteilung der positiven Babesienfälle durch Punkte dargestellt. Der Wohnort der Hunde liegt hauptsächlich in Berlin und dem Umland. Nur sechs Proben wurden außerhalb dieses Gebietes entnommen.



Abbildung 9: Lokale Verteilung der positiven Babesienproben\*

Saisonal betrachtet fiel auf, dass zwischen August 2017 und Dezember 2017 deutlich mehr positive Fälle auftraten als in den anderen Monaten des Untersuchungszeitraums. Dies ist in Abbildung 10 dargestellt. Im Allgemeinen lag die Zahl der positiven Fälle pro Monat ansonsten zwischen 0 und 1, mit Ausnahme des November 2016 als 2 Hunde positiv getestet wurden.



**Abbildung 10: Saisonale Verteilung der positiven Babesienproben**

Von den 26 Babesien positiven Hunden konnte bei der Hälfte etwas über die Reisevorgeschichte in Erfahrung gebracht werden. So hatten vier Hunde Deutschland nicht verlassen (grüne Punkte in Abb. 9) und bei neun Hunden berichteten die Besitzer von Auslandsaufenthalten. In 13 Fällen konnte keine Reiseanamnese erhoben werden.

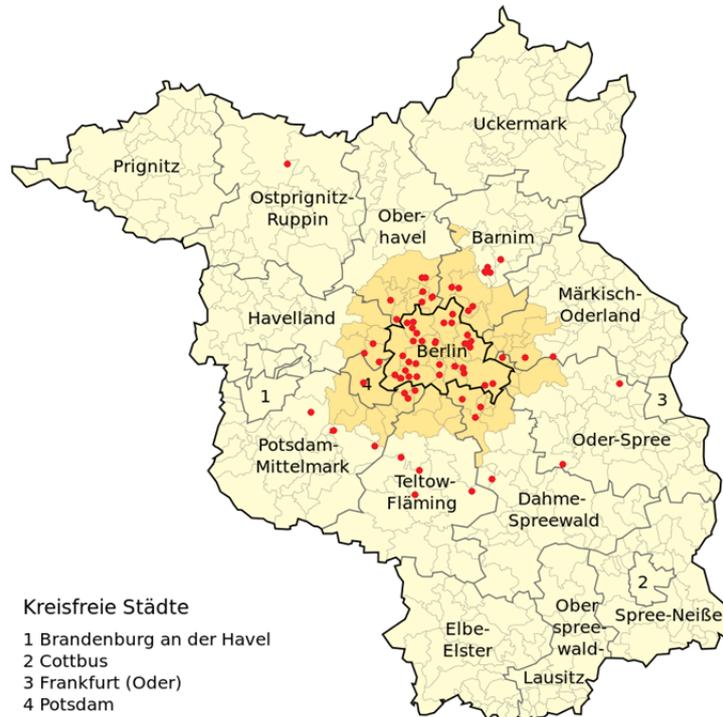
Vollblutproben zur diagnostischen Abklärung wurden von vier Hunden eingesendet. Davon konnte bei einem Hund auch in der PCR das Vorkommen von Babesien bestätigt werden.

#### **4.4.3. Anaplasmen**

Für *Anaplasma phagocytophilum* bzw. *Anaplasma platys* liegen für 1008 Proben Ergebnisse mit dem SNAP-Test vor. Es wurden 66 Proben positiv getestet, was einer Prävalenz von 6,55 % mit einem 95 % KI von 5,71 % - 8,25 % entspricht. Mit dem Anaplasmen-ELISA von Afosa wurden 1001 Proben untersucht. Dabei wiesen 306 Proben ein positives Testergebnis auf. Dies ergibt eine Prävalenz von 30,57 % (KI 95%: 27,79 - 33,49 %).

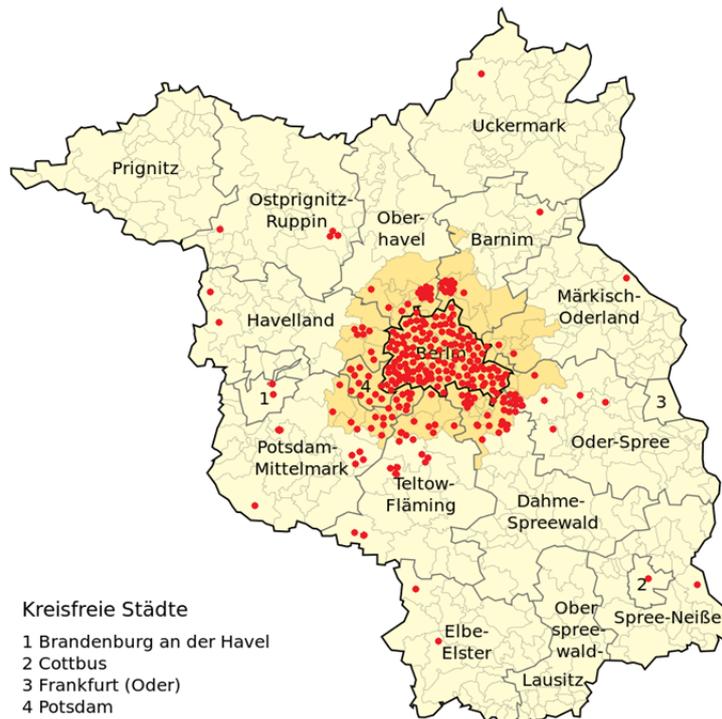
Positiv in beiden Tests waren 45 Proben, während 675 in beiden Tests negativ waren. Beim Vergleich mithilfe des Cohen Kappa-Tests ergab sich ein Koeffizient von 0,15 (KI 95%: 0,07 - 0,24), was einer schwachen Übereinstimmung entspricht. Zur weiteren Abklärung dieser Unterschiede wurden einige Proben mit einem IFAT untersucht. Allerdings konnte damit keine eindeutigere Zuordnung der Proben vorgenommen werden.

Die lokale Verteilung der im SNAP-Test positiven Anaplasmenproben ist in Anbetracht der Lage der einsendenden Praxen recht gleichmäßig mit Konzentration im Raum Berlin und Umland, wie in Abbildung 11 zu erkennen ist.



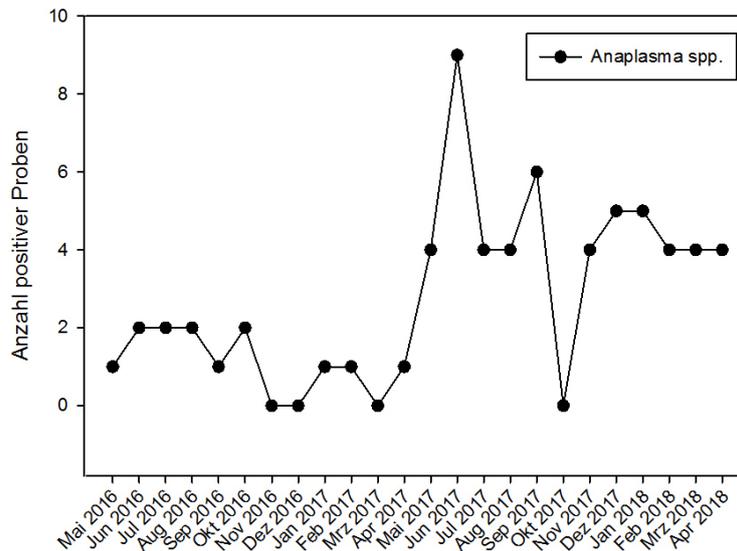
**Abbildung 11: Lokale Verteilung der positiven Anaplasmenproben im SNAP-Test\***

Die lokale Verteilung der im konventionellen ELISA positiven Proben (Abb. 12) ist ebenfalls in Anbetracht der Herkunft der Proben recht gleichmäßig. In Berlin wurden 134 positive Hunde gefunden, welche sehr gleichmäßig aus dem gesamten Stadtgebiet kamen. Eine leichte Ballung ist im Bereich der Klinik für kleine Haustiere zu erkennen. Die restlichen 172 Proben stammten von Hunden aus Brandenburg, wobei über die Region verteilt einzelne Funde zu verzeichnen waren, sowie eine höhere Dichte im Berliner Umland und drei starke Häufungen um einsendende Praxen herum.



**Abbildung 12: Lokale Verteilung der positiven Anaplasmenproben im konventionellen ELISA\***

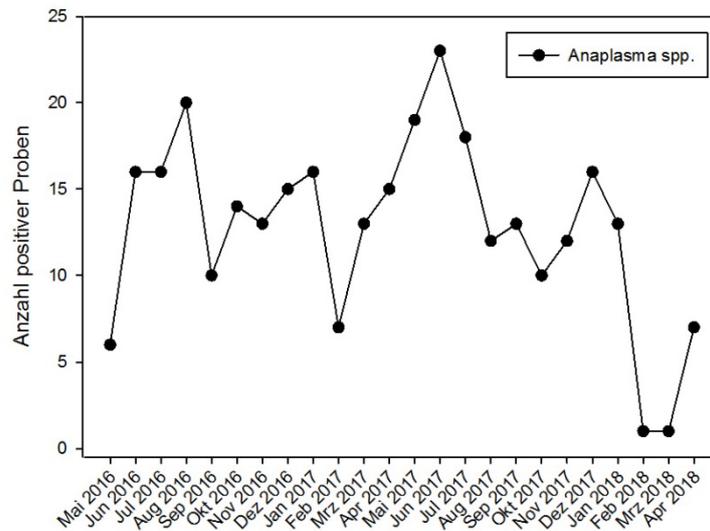
Bei der saisonalen Verteilung der im SNAP-Test positiven Proben fällt eine deutlich erhöhte Anzahl positiver Funde in der zweiten Hälfte des Beprobungszeitraumes auf. So wurden zwischen Mai 2016 und April 2017 im Durchschnitt monatlich 1,08 positive Proben gefunden und zwischen Mai 2017 und April 2018 4,42. In Abbildung 13 ist dieser Anstieg dargestellt.



**Abbildung 13: Saisonale Verteilung der positiven Anaplasmenproben im SNAP-Test**

Im Vergleich dazu ist in der saisonalen Verteilung der im konventionellen ELISA positiven Proben eine deutlich gleichmäßigere Anzahl je Monat zu beobachten. Wie auch im SNAP-Test konnte im Juni 2017 ein deutlicher Peak verzeichnet werden. Auffällig in dieser

Verteilung ist außerdem das Fehlen von positiven Fällen im Februar und März 2018 (Abb.14).



**Abbildung 14: Saisonale Verteilung der positiven Anaplasmenproben im konventionellen ELISA**

Von 66 auf Anaplasmen positiv getesteten Hunden konnten neun mittels PCR nochmals untersucht werden, da die Besitzer Vollblutproben eingesendet haben. Es konnte bei zwei Hunden in der PCR ein positives Ergebnis nachgewiesen werden.

#### 4.4.4. Ehrlichien

Von 1008 Proben konnten 9 auf *Ehrlichia canis* bzw. *Ehrlichia ewingii* positiv getestet werden. Die Prävalenz für Ehrlichien in dieser Studie liegt demnach bei 0,89 % mit einem 95 % KI von 0,47 % - 1,79 %.

Die positiven Ehrlichienfälle konnten bei Hunden nachgewiesen werden, die ihren Wohnort im Süden von Berlin bzw. dem südlichen Umland hatten. Lediglich ein Hund kam aus dem Norden von Berlin und einer aus dem Landkreis Barnim. Dies ist in Abbildung 15 zu erkennen.



Abbildung 15: Lokale Verteilung der positiven Ehrlichienproben\*

Die saisonale Verteilung der positiven Ehrlichienproben ist eher unauffällig. Es wurden zwischen 0 und 2 Proben jeden Monat über den Studienzeitraum als positiv getestet (Abb. 16).

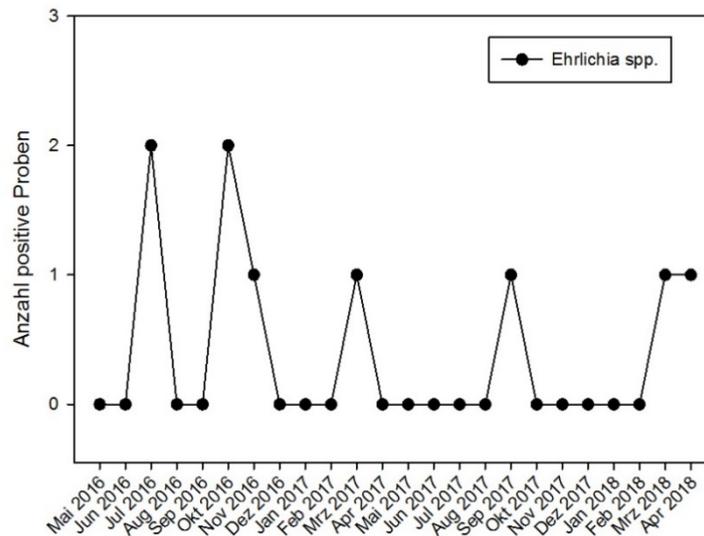


Abbildung 16: Saisonale Verteilung der positiven Ehrlichienproben

Die Reiseanamnese bei den Ehrlichien positiven Hunden konnte in fünf Fällen erhoben werden. Dabei war festzustellen, dass alle fünf Hunde aus dem Ausland stammten bzw. bei Reisen im Ausland waren. Bei den anderen vier Hunden war es nicht möglich, den Reisehintergrund abzuklären.

Es wurde eine Vollblutprobe zur diagnostischen Abklärung mittels PCR auf Ehrlichien untersucht. Das Ergebnis war negativ.

#### 4.4.5. Borrelien

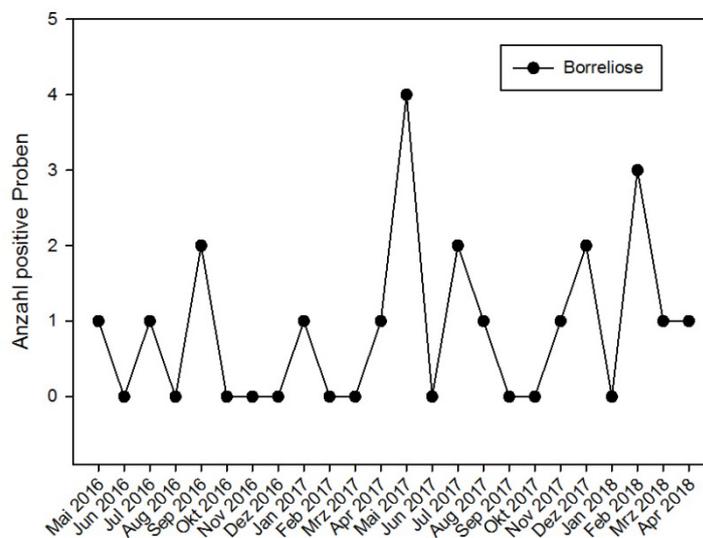
Insgesamt 17 von 1008 Serumproben konnten bei den Untersuchungen auf *Borrelia* spp. positiv getestet werden. Das entspricht einer Prävalenz von 1,69 %, das dazugehörige 95 % KI reicht von 1,06 % - 2,68 %.

Die positiven Borrelienfälle traten in dieser Studie gehäuft im westlichen Berlin auf. Einzelne Fälle konnten auch verteilt im Berliner Umland nachgewiesen werden, sowie jeweils ein Fall im Osten Berlins und einer im Süden (Abb. 17).



**Abbildung 17: Lokale Verteilung der positiven Borrelienproben\***

Durchschnittlich wurden während der Studie jeden Monat 0,88 Hunde positiv auf Borrelien getestet. Dabei schwankte die Anzahl zwischen 0 und 4 Proben (Abb. 18).



**Abbildung 18: Saisonale Verteilung der positiven Borrelienproben**

#### 4.4.6. Dirofilarien

Mit dem SNAP®4Dx®Plus von IDEXX wurden 1008 Proben auf im Blut zirkulierendes *Dirofilaria immitis* Antigen untersucht, wovon 3 Proben ein positives Ergebnis zeigten. Die Prävalenz, die mit diesem Test ermittelt werden konnte, lag damit bei 0,29 % mit einem 95 % KI von 0,1 % - 0,87 %.

Weiterhin konnten 1008 Proben mit einem Filarien-ELISA auf Antikörper gegen *Dirofilaria* spp. untersucht werden und dabei 22 positive Proben festgestellt werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 2,18 % mit einem 95 % KI von 1,44 % - 3,28 %.

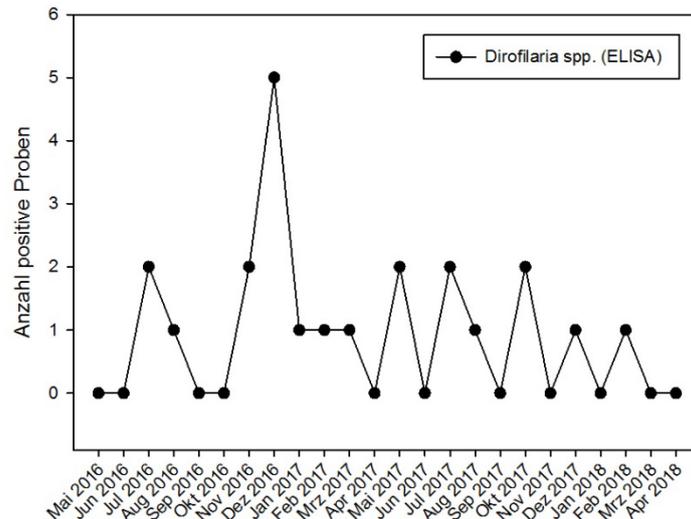
Die drei im SNAP-Test positiv getesteten Proben konnten im Filarien-ELISA bestätigt werden.

In der lokalen Verteilung der positiven Dirofilarienfälle in Abbildung 19 ist zu erkennen, dass 10 Hunde in Berlin lebten und 12 in Brandenburg. Die meisten Proben kamen aus Berlin und dem Umland. Eine Probe kam aus dem Randgebiet von Brandenburg im Landkreis Havelland. Auch im südlichen Teltow-Fläming trat ein positiver Fall auf, sowie zwei in Brandenburg an der Havel.



**Abbildung 19: Lokale Verteilung der positiven Dirofilarienproben\***

Bei der Betrachtung des Diagramms in Abbildung 20, welche die saisonale Verteilung der positiven Dirofilarienfälle zeigt, fällt ein Peak im Dezember 2016 auf. Im restlichen Studienzeitraum lag die Zahl der positiven Proben je Monat zwischen 0 und 2.



**Abbildung 20: Saisonale Verteilung der positiven Dirofilarienproben**

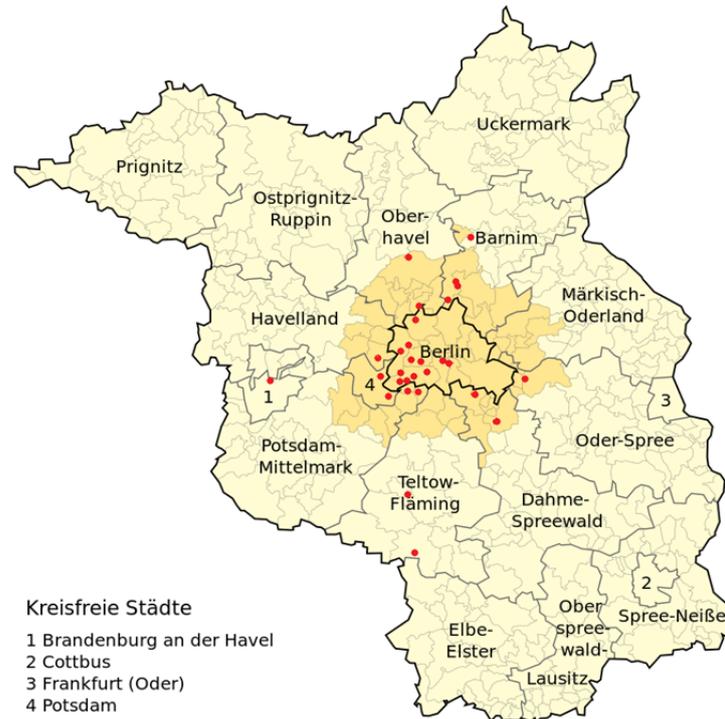
Im Falle der 22 positiv auf Dirofilarien getesteten Hunde konnten bei 12 Aussagen zum Reisehintergrund getroffen werden. Bei 8 Hunden waren Auslandsaufenthalte in ihrer Reiseanamnese dokumentiert, während 4 Deutschland nicht verlassen hatten (grüne Punkte in Abb. 19). Bei den anderen 10 Hunden war der Reisehintergrund nicht eindeutig abzuklären.

Von den 22 positiv getesteten Hunden wurden von 4 Hunden Vollblutproben zur weiteren Untersuchung mittels PCR eingeschickt. Keine der Proben wies in der PCR Filarien-DNA auf.

#### **4.4.7. *Angiostrongylus vasorum***

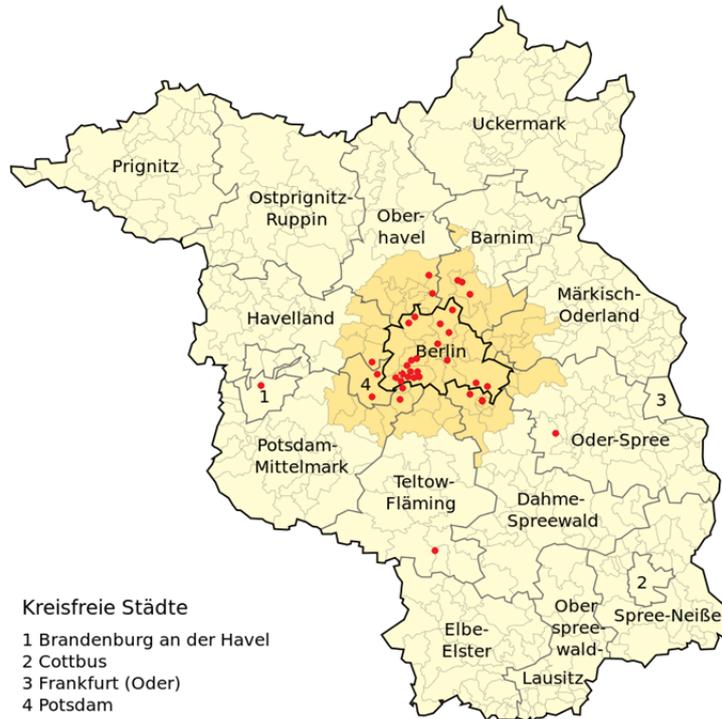
Auf *A. vasorum* wurden 1008 Proben untersucht, jeweils mittels eines Antigen- und eines Antikörper-ELISAs. Im *A. vasorum* Antigen-ELISA wurden 29 Proben als positiv detektiert, was einer Prävalenz von 2,88 % entspricht mit einem 95 % KI von 2,01 % bis 4,10 %. Im *A. vasorum* Antikörper-ELISA wurden 35 positive Proben festgestellt. Somit konnte mit diesem Test eine Prävalenz von 3,47 % ermittelt werden und das 95 % KI reichte von 2,51 % bis 4,79 %. Allerdings gab es nur 12 Proben, welche in beiden ELISAs ein positives Ergebnis zeigten.

Bei der lokalen Verteilung der positiven *A. vasorum* Antigen Proben in Abbildung 21 ist eine Häufung von positiven Fällen um den westlichen Berliner Stadtrand zu erkennen. Die restlichen Fälle traten eher vereinzelt in Berlin und dem Umland auf, sowie ein Fall in Brandenburg an der Havel, einer im Barnim und zwei im Teltow-Fläming.



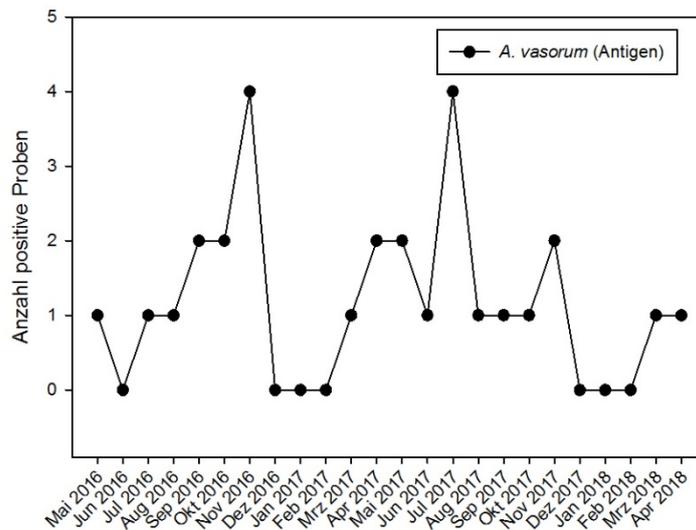
**Abbildung 21: Lokale Verteilung der positiven *A. vasorum* Antigen Proben\***

Im Gegensatz dazu ist bei der lokalen Verteilung der positiven *A. vasorum* Antikörper Proben eine sehr deutliche Ballung im südwestlichen Bereich Berlins zu erkennen (Abb. 22). Auch hier sind wieder einzelne positive Hunde in anderen Landkreisen gefunden worden, wie in Brandenburg an der Havel, dem Teltow-Fläming und Oder-Spree.



**Abbildung 22: Lokale Verteilung der positiven *A. vasorum* Antikörper Proben\***

Die saisonale Verteilung in Abbildung 23 zeigt, dass es sowohl im Dezember 2016 als auch im September 2017 einen Anstieg an positiven Funden von *A. vasorum* Antigenen in den Proben gab. Jeweils vor diesen Peaks war bereits ein leichter Anstieg über die vorausgegangenen Monate zu erkennen. In den Monaten Dezember bis Januar wurden sowohl 2017 als auch 2018 keine positiven Befunde ermittelt.



**Abbildung 23: Saisonale Verteilung der positiven *A. vasorum* Antigen Proben**

Bei der saisonalen Verteilung der positiven *A. vasorum* Antikörper Proben fielen im Dezember und April 2017 höhere Peaks auf, sowie im August 2016, Dezember 2016 und Juni 2017 leichte Anstiege in der Anzahl der positiven Hundeproben (Abb. 24). In der

restlichen Zeit der Studie lag die Anzahl der positiven Hunde jeden Monat zwischen 0 und 2.

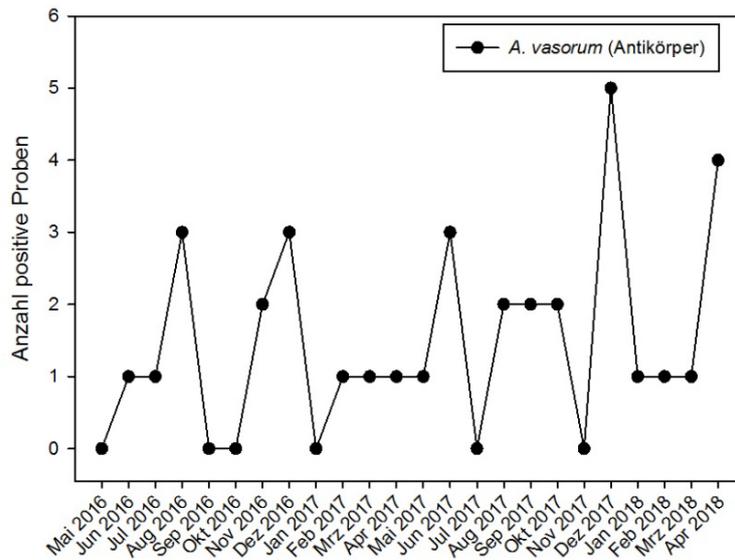


Abbildung 24: Saisonale Verteilung der positiven A. vasorum Antikörper Proben

**4.4.8. Gemeinsames Vorkommen von Infektionen**

In der vorliegenden Studie konnten in 58 Fällen ein gemeinsames Vorkommen mehrerer Infektionen festgestellt werden. Dabei traten 17 verschiedene Kombinationen auf. Darunter waren Doppelinfektionen, aber auch Hunde, die mit drei oder vier Erregern infiziert waren. Am häufigsten mit 19 Fällen trat eine Infektion von *Anaplasma* spp. und *A. vasorum* auf. In Tabelle 15 sind die aufgetretenen Kombinationen zusammengefasst.

Anzahl der Hunde	gemeinsames Vorkommen von Infektionen
19	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>A. vasorum</i>
7	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Babesia</i> spp.
6	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Dirofilaria</i> spp.
4	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp.
3	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Dirofilaria</i> spp./ <i>A. vasorum</i>
3	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Leishmania</i> spp.
2	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Borrelia</i> spp.
2	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Babesia</i> spp.
2	<i>Dirofilaria</i> spp./ <i>Babesia</i> spp.
2	<i>Dirofilaria</i> spp./ <i>A. vasorum</i>
2	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Babesia</i> spp./ <i>Leishmania</i> spp.
1	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Borrelia</i> spp./ <i>Dirofilaria</i> spp./ <i>A. vasorum</i>
1	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Babesia</i> spp./ <i>Dirofilaria</i> spp.
1	<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Borrelia</i> spp./ <i>Babesia</i> spp.
1	<i>Borrelia</i> spp./ <i>A. vasorum</i>
1	<i>Borrelia</i> spp./ <i>Babesia</i> spp.
1	<i>Dirofilaria</i> spp./ <i>A. vasorum</i> / <i>Leishmania</i> spp.

Tabelle 15: gemeinsames Vorkommen von Infektionen

#### 4.4.9. Mid p-Exact Test

Der Zusammenhang zwischen verschiedenen Risikofaktoren und der nachgewiesenen Infektionshäufigkeit, die in der vorliegenden Studie dokumentiert wurde, wurde mit dem Mid p-Exact in R untersucht. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % toleriert, so dass die Zusammenhänge mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Gesamtpopulation zu übertragen sind und nur in geringem Maße dem Zufall geschuldet bleiben.

Die Ergebnisse zeigen, dass signifikant mehr Hunde in Brandenburg mit in dieser Studie untersuchten Erregern infiziert sind als in Berlin ( $p=0,0189$ ). Außerdem scheint auch männlich-nicht kastriert ( $p=0,009$ ) und weiblich-kastriert ( $p=0,049$ ) ein höheres Risiko für eine Infektion zu haben, als männlich-kastriert bzw. weiblich-nicht kastriert. Weiterhin wurde der Einfluss des Alters untersucht. Dabei haben junge Hunde, bis 3 Jahre, ein geringeres Risiko als mittelalte Hunde bis 10 Jahre ( $p=0,0001$ ) oder alte Hunde ab 11 Jahren ( $p=0,0065$ ). Allerdings haben alte Hunde auch ein geringeres Risiko als Mittelalte ( $p=0,0005$ ).

Alle weiteren Ergebnisse zeigen p-Werte  $> 0,1$  und können daher als nicht signifikant betrachtet werden. Das heißt es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den anderen jeweils untersuchten Gruppen. Die weiteren Ergebnisse des Mid p-Exact Tests sind deshalb in Tabelle 16 zusammengefasst.

miteinander verglichene Gruppen	p-Wert
männlich/ weiblich	0,207
nicht kastriert/ kastriert	0,701
<i>Anaplasma</i> spp. SNAP-Test Berlin/ Brandenburg	0,129
<i>A. vasorum</i> Antikörper Berlin/ Brandenburg	0,414
<i>A. vasorum</i> Antigen Berlin/ Brandenburg	0,194
<i>Leishmania</i> spp. Berlin/ Brandenburg	0,182
<i>Babesia</i> spp. Berlin/ Brandenburg	0,242
<i>Dirofilaria</i> spp. Berlin/ Brandenburg	0,399
<i>Borrelia</i> spp. Berlin/ Brandenburg	0,81
<i>Ehrlichia</i> spp. Berlin/ Brandenburg	0,753

**Tabelle 16: p-Werte des Mid p-Exact Tests**

#### 4.4.10. logistische Regression

Die logistische Regressionsanalyse wird angewendet, wenn geprüft werden soll, ob ein Zusammenhang zwischen einer abhängigen Variable und einer oder mehreren unabhängigen Variablen besteht. Es wird der Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit, dass die abhängige Variable den Wert 1 annimmt, und den

unabhängigen Variablen untersucht. Dabei wird über die Höhe des Odds ratio ausgesagt, wie stark die Variable die Chance beeinflusst. Mithilfe der Signifikanz kann eine Aussage über die Übertragbarkeit dieses Ergebnis von der untersuchten Stichprobe auf die Grundgesamtheit getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Region und des Alters auf die Infektionsrate betrachtet. Dabei konnte nur für die mit dem kommerziellen Anaplasmen-ELISA bestimmte Infektionsrate ein signifikantes Ergebnis erhalten werden. Dies ist in Abbildung 25 dargestellt.

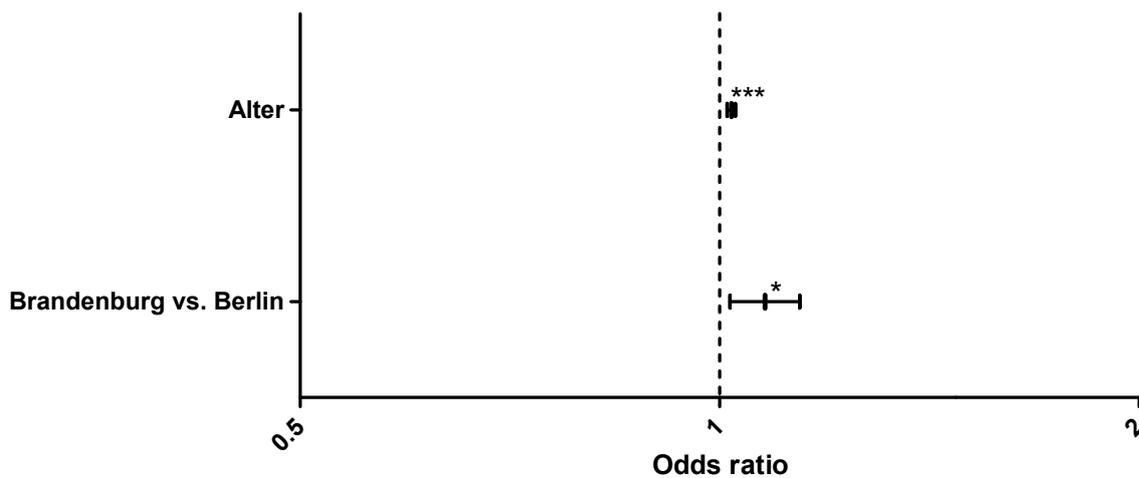


Abbildung 25: Logistische Regressionsanalyse *Anaplasma* spp.

In der Grafik ist zu erkennen, dass Hunde in Brandenburg eine leicht höhere Chance haben, sich mit Anaplasmen zu infizieren als in Berlin lebende. Dieser Zusammenhang ist schwach signifikant. Außerdem erhöht sich die Chance auf eine Anaplasmeninfektion mit steigendem Alter geringgradig. Dieser Zusammenhang ist deutlich signifikant.

Weiterhin wurde dieser Zusammenhang für die im SNAP-Test nachgewiesenen *Anaplasma*-Infektionen, sowie für *A. vasorum*- und *Babesia*-Infektionen überprüft. Dabei konnte allerdings kein signifikantes Ergebnis gezeigt werden.

## 4.5. *Hepatozoon canis*

### 4.5.1. Prävalenzuntersuchen mittels PCR

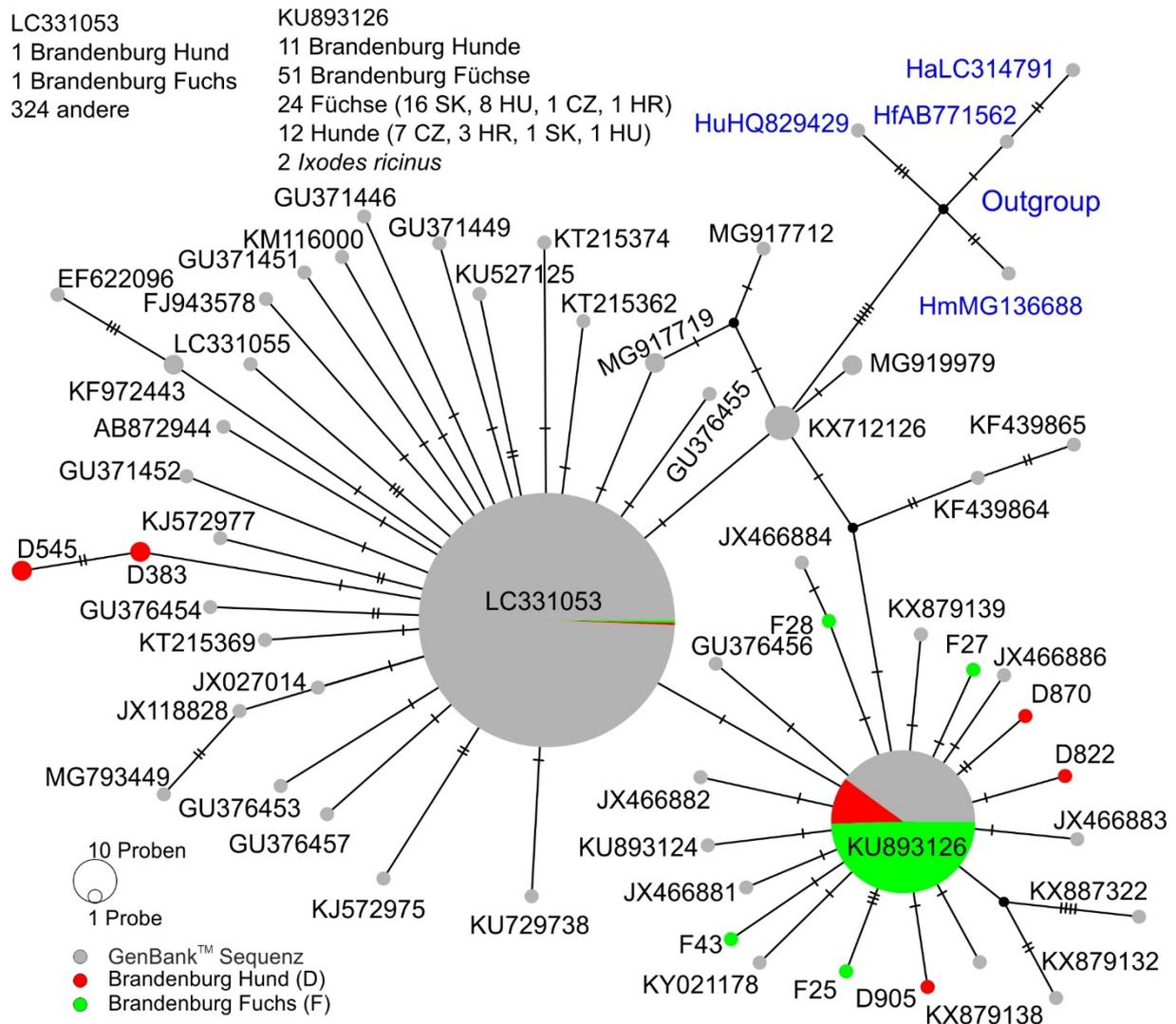
DNA-Proben von Hundeblood bzw. Fuchsmilz wurden zwischen März 2013-September 2014 bzw. Februar -September 2014 während einer früheren Studie entnommen und mittels einer *Hepatozoon* spp. 18S rRNA PCR untersucht. Dabei konnten 46 von 1050 Hunden und 156 von 201 Füchsen positiv getestet werden, was einer Prävalenz von 4,38 % (KI 95 %: 3,3 - 5,79 %) bzw. 77,61 % (KI 95 %: 71,36 - 82,82 %) entspricht. Eine Sequenzierung wurde für

19 Hundebloodproben und 52 Fuchsmilzproben erfolgreich durchgeführt (GenBank™ Accession-Nr: MK757741- MK757815) und alle erhaltenen Sequenzen zeigten eine Ähnlichkeit von 99 - 100 % mit *H. canis*-Sequenzen im Vergleich zu den GenBank™-Sequenzen.

Von den 46 positiven Hundeproben wurde bei neun Hunden durch Besitzerbefragung nachgewiesen, dass sie Deutschland nie verlassen haben. Durch Sequenzierung ließen sich sieben dieser autochthonen Fälle als *H. canis* Infektionen bestätigen. Beim Vergleich der Sequenzen mit der Datenbank wurde für fünf davon eine 99 - 100%ige Übereinstimmung mit Sequenzen von Füchsen aus Ungarn (GenBank® Accession-Nr: KJ572978) gefunden. Die anderen beiden Sequenzen entsprachen einer Sequenz eines Hundes aus der Tschechischen Republik (GenBank™ Accession-Nr: KY021177).

#### **4.5.2. Phylogenetische Analyse der *Hepatozoon canis* Ergebnisse**

Das in Abbildung 26 dargestellte phylogenetische Netzwerk zeigt, dass die *H. canis*-Sequenzen aus der vorliegenden Arbeit mit anderen Sequenzen aus GenBank® gruppieren, getrennt von der "outgroup", die *Hepatozoon ursi*, *Hepatozoon martis*, *Hepatozoon felis* und *Hepatozoon apri* umfasst. Insgesamt gibt es zwei Haplotypen, die Sequenzen der vorliegenden Studie enthalten. Nur eine Mutation trennt sie. In einem befinden sich 11 Hunde und 51 Füchse aus dieser Studie, sowie drei Hunde und vier Füchse, die mit etwa einer bis drei Mutationen verbunden sind. Außerdem umfasst der Haplotype 24 Füchse und 12 Hunde aus Tschechien, der Slowakei, Ungarn und Kroatien sowie zwei *I. ricinus*. Im anderen Haplotype findet man einen Fuchs und einen Hund aus Brandenburg und viele verschiedene Wirtsarten, die aus Ländern auf der ganzen Welt kommen. Außerdem sind noch zwei weitere Hunde über eine bzw. zwei Mutationen damit verbunden.

Abbildung 26: Netzwerk *H. canis*

Des Weiteren wurde mit dem gleichen Sequenzabgleich ein phylogenetischer Baum konstruiert, der im Anhang (Abb. A1) dargestellt ist. Dieser zeigt ebenfalls, dass die Sequenzen aus der vorliegenden Arbeit mit anderen *H. canis*-Sequenzen aus der GenBank™ gruppiert sind, aber getrennt von den Spezies *Hepatozoon ursi*, *Hepatozoon martis*, *Hepatozoon felis* und *Hepatozoon apris*. Insgesamt gibt es zwei Gruppen, die Sequenzen der vorliegenden Studie enthalten. In einer Gruppe (Abb. A2) befinden sich acht Hunde und 50 Füchse und in der anderen ein Fuchs und fünf Hunde. In der ersten Gruppe befinden sich außerdem Füchse und Hunde aus Deutschland, Tschechien, der Slowakei, Ungarn, Kroatien und fünf Goldschakale aus Österreich. In der anderen Gruppe (Abb. A3) gibt es viele verschiedene Wirtsarten, die aus Ländern auf der ganzen Welt stammen. Deshalb sind sie in einer Tabelle A1, die sich ebenfalls im Anhang befindet, dargestellt, gruppiert nach Wirt und Land.

## 5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Erregersituation von Vektor-übertragenen Krankheiten bei Hunden in Berlin und Brandenburg einzuschätzen und somit Schlüsse zur Infektionswahrscheinlichkeit, sowie zur Gefährdung der Gesundheit von Tieren, besonders Hunden, und Menschen in diesem Gebiet ziehen zu können. Dabei wurden *Leishmania infantum*, *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia* spp., *Dirofilaria* spp. und *Angiostrongylus vasorum*, sowie *Hepatozoon canis* untersucht. Die Auswahl fand aufgrund früherer Studien statt, welche Hinweise auf autochthones Vorkommen auch im Raum Berlin/Brandenburg gaben (Baneth et al., 2012; Kronefeld et al., 2014; Liesner et al., 2016; Najm et al., 2014b; Sassnau et al., 2009).

Die Serumproben der Hunde wurden in Kooperation mit der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin und dem Labor LABOKLIN gesammelt und anschließend mit verschiedenen ELISAs untersucht. In positiven Fällen wurde außerdem versucht, eine Reiseanamnese zu erfragen und eine diagnostische Abklärung mittels PCR durchzuführen.

### 5.1. Beurteilung von Sammelgebiet und Stichprobengröße

Die Idee zu der vorliegenden Arbeit entstand aufgrund einer Vorgängerstudie, in welcher Hunde und Füchse aus Brandenburg mittels molekularbiologischer Methoden auf Vektor-übertragene Erkrankungen untersucht worden waren. Die ermittelten Prävalenzen der Studie waren recht niedrig und ein endemisches Vorkommen der untersuchten Erreger konnte, mit Ausnahme von *A. phagocytophilum*, nicht belegt werden (Liesner et al., 2016). Da es aber 2009 und 2012 Berichte über autochthones *D. repens* Vorkommen in einem Schlittenhundrudel im Havelland gab (Sassnau et al., 2009; Sassnau et al., 2013), sowie das Vorkommen von *D. repens* und *D. immitis* in einheimischen Mückenpopulationen belegt wurde (Czajka et al., 2014; Kronefeld et al., 2014), bestand weiterhin der Bedarf für Nachforschung und Überprüfung der epidemiologischen Situation. Deshalb sollte in der vorliegenden Studie mit serologischen Methoden gearbeitet werden, da infizierte Tiere über einen längeren Zeitraum positiv bleiben und damit die Wahrscheinlichkeit der Detektion höher sein sollte.

In der bereits erwähnten Untersuchung von Liesner et al. (2016) zeigte es sich, dass es schwierig war eine repräsentative Anzahl an Proben zu sammeln, wenn man sich auf ein zu kleines Untersuchungsgebiet, in diesem Fall Havelland, festlegt. Daher wurde diesmal schon zu Beginn der Studie das gesamte Bundesland Brandenburg einbezogen. Außerdem sollte

auch Berlin mit einbezogen werden, da dort aufgrund der deutlich höheren Dichte in der Hundepopulation ein Gefährdungspotenzial zu vermuten ist.

Allerdings kam es durch diese Erweiterung des Sammelgebietes zu einem unerwartet hohen Probenaufkommen, was eine zufällige Auswahl der gesammelten Proben notwendig machte, da bei der Stichprobenanzahl von 1000 geblieben und ein repräsentativer Zeitraum untersucht werden sollte. Der Zeitraum von zwei Jahren wurde gewählt, um ein mögliches saisonales Auftreten von Erregern belegen zu können.

Bei der Betrachtung der Herkunft der Proben fällt auf, dass die meisten teilnehmenden Tierarztpraxen sowie die Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin, aus der mehr als die Hälfte aller Probe stammt, in Berlin und dem Berliner Umland liegen (Abb. 3). Allerdings konnten unter anderem aufgrund des großen Einzugsgebietes der Klinik für kleine Haustiere aus allen Landkreisen, außer Frankfurt Oder und Oberspreewald-Lausitz, Proben in die Studie einbezogen werden (Abb. 4). Trotzdem ist die Verteilung im Bundesland Brandenburg recht ungleichmäßig, weshalb die Aussagen der Studie nicht als repräsentativ für ganz Brandenburg gesehen werden können. Die Entscheidung die Hälfte der Proben zufällig aus Berlin und die andere Hälfte aus Brandenburg einzubeziehen, geschah in Bezug auf die Populationsgröße der dort lebenden Hunde, welche in Berlin und Brandenburg als ähnlich angesehen werden kann.

Insgesamt wurde die Stichprobengröße aufgrund der Größe der im Sammelgebiet lebenden Hundepopulation getroffen. So lebten 2012 121.224 Hunde in Brandenburg (Quelle: Innenministerium Brandenburg, Stand 2012) und 97.996 Hunde zur gleichen Zeit in Berlin (Quelle: Senatsverwaltung für Finanzen „Statistisches Jahrbuch Berlin 2014“). Mit Hilfe von OpenEpi wurde so eine Stichprobe von ungefähr 1000 zu beprobenden Hunden ermittelt. Um auf die benötigte Probenanzahl zu kommen, wurden die Proben in Kooperation mit der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin und Tierarztpraxen, welche ihre Proben zum Labor LABOKLIN schickten, gesammelt. Alle Proben der Studie wurden also im Zusammenhang mit einem Tierarztbesuch und zu diagnostischen Zwecken entnommen. Damit handelt es sich nicht um eine zufällige Stichprobe, sondern um eine vorselektierte und damit nicht repräsentative für die Region Berlin/ Brandenburg. Außerdem ist es möglich, dass so eine Überrepräsentativität der untersuchten Krankheitserreger in der Studie auftritt, da eher kranke Hunde mit Symptomen beim Tierarzt vorstellig werden als Gesunde.

## **5.2. Beurteilung der Prävalenzen von Krankheitserregern bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg**

### **5.2.1. Leishmanien**

Bei den Untersuchungen auf Leishmanien mit dem von LABOKLIN verwendeten ELISA wurden 53 von 1002 (5,28 %) Proben positiv getestet. Mit dem von Afosa entwickelten Leishmanien-ELISA konnten dagegen 31 von 991 Proben (3,13 %) als positiv detektiert werden. Es konnte mit dem mid p-Exacttest gezeigt werden, dass die beiden Tests signifikant unterschiedlich sind ( $p=0,019$ ). Mit dem Cohen-Kappa-Koeffizienten konnte lediglich eine schwache Übereinstimmung festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden in die weitere Auswertung nur die 14 Proben einbezogen, die in beiden ELISAs positiv waren. Außerdem wurde ein IFAT durchgeführt, mit dem die Proben mit unterschiedlichen Ergebnissen in beiden Tests nachuntersucht wurden, um so die im ELISA erhaltenen Daten zu objektivieren. Von den 48 getesteten Proben waren allerdings lediglich zwei positiv. Diese zwei Proben wurden ebenfalls in die als sehr wahrscheinlich sicher Positiven eingeordnet und mit in die weitere Auswertung einbezogen. Somit kann von einer Prävalenz von mindestens 1,61 % ausgegangen werden.

Andere in Deutschland durchgeführte Studien untersuchten die Seroprävalenz mittels IFAT bei Hunden mit Reisehintergrund und ermittelten Prävalenzen von 3,6 % (Hamel et al., 2011), 9,6 % (Röhrig et al., 2011) und 12,2 % (Menn et al., 2010). In Hunden, für die ein Reiseprofil angefordert worden war, wurde ebenfalls eine hohe Prävalenz im IFAT von 17,7 % ermittelt (Hirsch and Pantchev, 2008). In der Studie von Röhrig et al. (2011) war der direkte Nachweis mit PCR sensitiver und ergab eine Prävalenz von 14,9 %. Eine weitere Untersuchung stellte Prävalenzen von 23,5 % bzw. 22,7 % mittels IFAT bzw. ELISA fest (Vrhovec et al., 2017). Durch die lange Inkubationszeit, die asymptomatischen Verläufe und die Tatsache, dass auch behandelte Hunde in diagnostischen Tests häufig positiv getestet werden, kommt es wahrscheinlich zu den unterschiedlichen Prävalenzen. Die hier vorliegende Studie untersuchte außerdem Hunde, die nicht zwangsläufig eine Reiseanamnese aufwiesen und mit der Herkunft aus Berlin/ Brandenburg in einer nicht endemischen Region leben, was die deutlich niedrigeren Zahlen im Vergleich zu Studien an Hunden mit Reisevorgeschichte erklärt.

Bei der Analyse des Reisehintergrundes konnten zwei mögliche autochthone Fälle gefunden werden. Auch in früheren Studien konnten vereinzelte autochthone Fälle identifiziert werden (Vrhovec et al., 2017). In geringen Populationsdichten kommen Phlebotomen in Deutschland, auch nördlich der Endemiegrenze, vor. So gab es Funde in Rheinland-Pfalz (Naucke and Schmitt, 2004) und Baden-Württemberg (Naucke and Pesson, 2000). Da es sich um vereinzelte Funde handelt und die klimatischen Bedingungen für ein dauerhaftes Überleben der Phlebotomen größtenteils noch ungeeignet sind (Steinhausen, 2005), ist die

Möglichkeit, dass es sich um importierte Individuen handelt, nicht auszuschließen. Neben dem Stich von Phlebotomen stellen Kontaktinfektionen zwischen Hunden durch Wunden oder Bisse (Naucke et al., 2016), pränatale Infektionen (Naucke and Lorentz, 2012; Naucke and Lorentz, 2013), sowie mechanische Übertragung, wie die iatrogene und solche durch Bluttransfusionen (de Freitas et al., 2006; Kellermeier et al., 2007; Owens et al., 2001) weitere Transmissionswege dar. Weiterhin wurde von möglicherweise sexueller Übertragung berichtet (Kellermeier et al., 2007). Genitale Läsionen im Zusammenhang mit Leishmaniose sind bei Hunden gut dokumentiert (Junior et al., 2017; Silva et al., 2008). Neben der Möglichkeit der vertikalen Übertragung und der Übertragung durch Phlebotomen wurden auch andere blutsaugende Arthropoden wie Zecken oder Flöhe gelegentlich verdächtig Leishmanien zu übertragen (Oliveira et al., 2015).

In Anbetracht der Lage der einsendenden Praxen sind in der lokalen Verteilung keine Auffälligkeiten zu erkennen. Der Grund für die gleichmäßig saisonale Verteilung liegt in der langen Inkubationszeit und den möglichen asymptomatischen Verläufen.

### **5.2.2. Babesien**

Es wurden 1008 Serumproben von Hunden mit einem *Babesia*-ELISA untersucht und dabei eine Prävalenz von 2,58 % (n = 26) ermittelt.

Im Vergleich dazu wurden in einer retrospektiven Studie der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin für *B. canis* bei Importhunden eine Seroprävalenz (IFAT/ELISA) von 10,3 % und bei Hunden mit Reisevorgeschichte von 4,6 % ermittelt (Schäfer et al., 2018). Weiterhin konnte in Deutschland eine Seroprävalenz im IFAT von 23,4 % für *Babesia* spp. bei Hunden mit Reisehintergrund festgestellt werden (Menn et al., 2010). In einer anderen Untersuchung wurden Blutausstriche und PCR zu Ermittlung der Prävalenz bei Hunden in Deutschland verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass 1,7 % der 170 Blutausstriche, 3,3 % der 502 mit PCR untersuchten Blutproben und 11,5 % der mit IFAT untersuchten Proben positiv für *Babesia* spp. waren. Dabei wurden außerdem 15 autochthone Fälle gefunden (Vrhovec et al., 2017). Für das Bundesland Brandenburg wurde außerdem eine Prävalenz von 0,1 % mit Hilfe von PCR ermittelt (Liesner et al., 2016).

Es lässt sich feststellen, dass bei Hunden mit Reisehintergrund höhere Prävalenzen ermittelt wurden, was durch die Endemiegebiete für *B. canis* begründet ist. Im Falle der serologischen Untersuchung von Menn et al. (2010) konnte sogar eine sehr deutlich höhere Prävalenz festgestellt werden, was wahrscheinlich damit zu erklären ist, dass Antikörper beim Kontakt mit dem Erreger gebildet werden und dann auch persistieren, ohne dass es zu einer klinischen Erkrankung kommt. Im Vergleich zu der Studie von Vrhovec et al. wurden in der vorliegenden Arbeit weniger autochthone Fälle und trotz serologischer Untersuchungen eine geringe Prävalenz festgestellt. Dies steht wahrscheinlich mit regionalen Unterschieden, der

Gesamtanzahl an getesteten Proben und dem intermittierenden Auftreten von Antikörpern bei einer chronischen Babesiose (Irwin and Hutchinson, 1991) in Zusammenhang.

Von den 26 positiv getesteten Hunden konnte bei 13 eine Reiseanamnese erhoben werden. Dabei zeigten sich vier Fälle von scheinbar autochthonem Vorkommen. Es wurde auch hier wieder versucht die serologisch erhobenen Ergebnisse in der PCR zu bestätigen. Insgesamt konnten vier Vollblutproben gesammelt werden, wovon eine Probe *Babesia*-DNA enthielt. Eine der Vollblutproben stammte dabei von einem möglicherweise autochthonen Fall. In dieser ließ sich keine *Babesia*-DNA nachweisen. Bereits in früheren Studien wurde das Auftreten von autochthonen Babesiaseinfektionen bei Hunden belegt (Heile et al., 2006; Jensen and Nolte, 2005; Zahler et al., 2000b). So zum Beispiel mehrfach in den letzten Jahren in der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin mittels PCR und Blutausstrich (Krücken et al., 2016). Grund für diese autochthonen Fälle ist, dass der Vektor der caninen Babesiose im Raum Berlin/ Brandenburg mittlerweile in hoher Dichte vorkommt und somit in diesem Gebiet als endemisch angesehen werden muss. In einer 2010/ 2011 durchgeführten Studie konnte eine Häufigkeit von *D. reticulatus* von 45,1 % bei 1728 von Hunden aus der Region abgesammelten Zecken beobachtet werden (Beck et al., 2014). In einer anderen Studie zwischen 2010 und 2012 wurde ebenfalls eine große Anzahl *D. reticulatus* in Berlin/ Brandenburg in der Vegetation gesammelt (Kohn et al., 2019). Bei den Untersuchungen mittels PCR konnte allerdings in keiner von der Vegetation gesammelten Zecken *Babesia* spp. nachgewiesen werden (Kohn et al., 2019). Die Studie zeigte weiterhin, dass die Zecken auch in den Wintermonaten aktiv waren. Dies und die Möglichkeit von persistierenden Antikörpern, subklinischen Infektionen und unter Umständen auch geimpften Tieren ist die Erklärung für die nicht eindeutig saisonal geprägte Verteilung der positiv getesteten Proben (Abb. 10).

Insgesamt kann das Auftreten und die Verbreitung der caninen Babesiose als sehr wahrscheinlich angesehen werden und die Ergebnisse dieser Studie geben einen weiteren Hinweis für eine Endemisierung im Raum Berlin/ Brandenburg.

### **5.2.3. Anaplasmen**

Die Untersuchungen auf das Vorkommen von Anaplasmen wurden einerseits mit Hilfe des IDEXX SNAP®4Dx®Plus durchgeführt, welcher *A. phagocytophilum* und *A. platys* detektiert, und andererseits mit einem konventionellen ELISA, welcher zum Nachweis von *Anaplasma* spp. dient, untersucht. Von den 1008 im SNAP-Test untersuchten Serumproben waren 66 positiv (6,55 %), während im konventionellen ELISA 306 von 1001 (30,57 %) positiv getestet wurden. In beiden Tests waren 45 Proben positiv, wodurch im Cohen-Kappa-Test eine schwache Übereinstimmung festgestellt werden konnte. Auch die Nachuntersuchungen einiger Proben mit einem IFAT klärten diese Unterschiede nicht eindeutig auf.

In anderen Studien wurden mit serologischen Methoden teils deutlich höhere Prävalenzen ermittelt. So wurde bei 111 Hunden aus Deutschland eine Seroprävalenz für *A. phagocytophilum* von 43,2 % ermittelt (Jensen et al., 2007a). Auch in einer Studie an der 522 Hunde teilnahmen, konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die Seroprävalenz lag bei 43 % (Kohn et al., 2011). Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte die Untersuchungsmethode sein. Es wurde in den Studien der IFAT verwendet, welcher eine geringere Spezifität aufgrund von Kreuzreaktionen mit Rickettsienartigen aufweist, als der hier verwendete SNAP-Test. Außerdem unterliegt der IFAT subjektiven Einflüssen durch den Durchführenden, was eine Standardisierbarkeit erschwert. Damit könnte die in dieser Arbeit ermittelte, im Verhältnis niedrige Seroprävalenz zumindest teilweise erklärt werden. Der SNAP®4Dx®Plus verwendet ein synthetisches, hochspezifisches Peptid des p44-Oberflächenproteins von *Anaplasma* spp. zum Nachweis. Dies führt zu Vorteilen bezüglich der Antigenvariabilität und den Kontaminationsrisiken von Antigenpräparationen gegenüber konventionellen Systemen (Chandrashekar et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass das verwendete *A. phagocytophilum* p44 Peptid APH-4 zum Nachweis von frühen Infektionen geeignet ist und so eine akute Infektion nachgewiesen wird (Chandrashekar et al., 2017). Währenddessen weisen im konventionellen ELISA sowie im IFAT Hunde dann einen erhöhten Antikörperlevel auf, wenn sie mit dem Erreger in Kontakt kamen und nicht nur solange diese Antikörper persistieren, sondern auch noch eine Weile darüber hinaus.

Allerdings wurde auch in anderen Studien aus Deutschland mit dem SNAP-Test Prävalenzen von 19,4 % (Barth et al., 2012) bzw. 21,5 % (Straubinger et al., 2008) ermittelt. Dies hängt wahrscheinlich mit regionalen Unterschieden zusammen. In den eben genannten Studien von Barth et al. und Straubinger et al. sind Hunde aus dem südlichen Deutschland untersucht worden. Dagegen ist die Prävalenz, welche in Studien aus anderen Ländern mit dem SNAP-Test festgestellt wurde, gut vergleichbar mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten. So wurde von Prävalenzen von 2,7 % in Frankreich (Pantchev et al., 2009b), 3,1 % in Spanien (Miró et al., 2013), 5,3 % in Finnland (Vera et al., 2014) und 7,9 % in Ungarn (Farkas et al., 2014a) berichtet.

Insgesamt ist eine Kombination aus verschiedenen Nachweisverfahren die Methode der Wahl, um eine klinisch manifeste Infektion zu diagnostizieren. Aus diesem Grund wurde auch in diesem Projekt versucht, von den auf Anaplasmen positiv getesteten Hunden Vollblutproben zu erhalten, um diese mittels PCR untersuchen zu können. Dies war in 9 Fällen möglich. Dass nur in zwei der Proben Anaplasmen DNA nachgewiesen werden konnte, lag sehr wahrscheinlich auch daran, dass der Zeitraum zwischen der Entnahme der Serumprobe und dem Erhalt der Vollblutprobe meist mehrere Wochen betrug und somit die Zeitspanne, in der ein positives PCR Ergebnis aufgrund einer Infektion zu erwarten gewesen

wäre, überschritten wurde. Auch ist es möglich, dass die Hunde zu diesem Zeitpunkt bereits behandelt worden waren.

Die lokale Verteilung der positiven Proben zeigt, sowohl bei den Ergebnissen des SNAP-Tests als auch des konventionellen ELISAs, eine räumlich deutlich größere Ausbreitung im Brandenburger Raum als es bei den anderen untersuchten Erregern der Fall ist. Die Ballungen, die in Abbildung 12 auffallen, sind zum einen mit der Lage der einsendenden Praxen und zum anderen durch die höhere Dichte von Hunden im Raum Berlin zu begründen. Diese demnach als gleichmäßig zu beurteilende Verteilung der positiven Proben ist durch das endemische Vorkommen des Vektors von *A. phagocytophilum* zu erklären. So zeigen Untersuchungen mittels PCR in der Region Berlin/ Brandenburg eine Prävalenz mit *A. phagocytophilum* in Zecken, die von Hunden abgesammelt wurden, von 6,5 % in *I. ricinus* bzw. 3,9 % in *I. hexagonus* (Schreiber et al., 2014). Ähnliches wurde bereits 2013 veröffentlicht, wonach *A. phagocytophilum* mit einer Prävalenz von 8,2 % in *I. ricinus* bzw. 3,3 % in *I. hexagonus* in verschiedenen Nagetieren mit durchschnittlich 2,8 % vorkam (Krücken et al., 2013).

Die klimatischen Verhältnisse der letzten Jahre, mit warmen, feuchten Sommern und milden Herbst- und Wintermonaten und auch die Renaturierung begünstigen die Lebensbedingungen des Vektors *I. ricinus* (Rizzoli et al., 2014). Bei der saisonalen Verteilung der im konventionellen ELISA positiven Proben sind höhere Fundraten in den Sommermonaten zu verzeichnen und meist geringere Anzahlen in den eher kalten Monaten. Auch in der Verteilung der SNAP-Test positiven Ergebnisse ist der Anstieg im Sommer 2017 zu erkennen. Dies ist vor allem durch die Aktivität der Zecken zu diesen Zeiten zu erklären (Granick et al., 2009; Kohn et al., 2008; Poitout et al., 2005). Dass diese Erhöhung im Sommer 2016 nicht nachzuweisen war, dagegen auch im Winter regelmäßig positive Hunde gefunden wurden, liegt einerseits an der Möglichkeit, dass die Antikörper über einen gewissen Zeitraum persistieren können, was bei serologischen Untersuchungen zu einem ausgeglicheneren saisonalen Vorkommen führt. Zum anderen wird durch die milden Winter auch immer wieder außerhalb der üblichen Aktivitätszeit der Zecken von Sichtungen berichtet. Weiterhin können Zecken den Winter in Wohnungen und Hundezwingern überleben und so auch in dieser Zeit Hunde infizieren (Dongus et al., 1996; Sainz et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Hinweis für eine Altersprädisposition gefunden werden. Wie auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass bei älteren Hunden im Vergleich zu Jüngeren häufiger Antikörper nachgewiesen werden (Kohn et al., 2011). Da die Symptome der Anaplasmoze häufig eher unspezifisch sind bzw. eine Infektion auch asymptomatisch verlaufen kann (Sainz et al., 2015), wird eine Infektion mit *Anaplasma* spp. nicht immer als solche erkannt. Damit persistieren in den Tieren die Erreger und sie stellen

eine Infektionsquelle für die Vektoren dar, womit die Gefahr der Weiterverbreitung gegeben ist. Aus diesem Grund ist eine Aufklärung über das Vorkommen und die Diagnosemöglichkeiten bei Tierbesitzern und Tierärzten von großer Bedeutung, um die Gesundheit und Lebenserwartung der Hundepopulation zu verbessern.

#### **5.2.4. Ehrlichien**

Auf *E. canis* und *E. ewingii* wurde mittels des IDEXX SNAP®4Dx®Plus untersucht, wobei von 1008 untersuchten Hunden 9 als positiv (0,89 %) getestet wurden.

Bei fünf der, in der vorliegenden Arbeit, positiv getesteten Hunde konnte eine Reise- bzw. Importvorgeschichte nachgewiesen werden. Zu den anderen vier Hunden lagen keine Informationen vor. Insgesamt konnten also bei diesen Untersuchungen keine Hinweise für autochthones Vorkommen gefunden werden.

Da es sich bei der Ehrlichiose um eine reine Reise- und Importerkrankung handelt, war dieses Ergebnis erwartungsgemäß. Typischer Vektor für die *Ehrlichia* Arten beim Hund ist *R. sanguineus*. Obwohl von möglichen autochthonen Fällen (Gothe, 1998) berichtet wurde und nachgewiesen ist, dass die Vektor-Zecken, aus endemischen Gebieten mitgebracht, in Häusern oder Hundezwingern überleben können (Dongus et al., 1996; Sainz et al., 2015), sind die klimatischen Bedingungen in Deutschland nicht für eine Ansiedlung des Vektors geeignet. Die Zecken benötigen eine Temperatur von 10-12 °C, um aktiv zu sein und die Hunde zu befallen. Ab einer Temperatur von unter 6 °C sterben die meisten der *R. sanguineus* Populationen.

In anderen Studien wurden zum Teil deutlich höhere Prävalenzen mittels PCR und IFAT ermittelt, als in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde. So ergaben retrospektive Analysen von Importhunden, die zwischen 2007 und 2015 Patienten der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin waren und dort mittels PCR bzw. IFAT auf Vektorübertragene Erkrankungen untersucht wurden, eine Prävalenz von 16,2 % bei insgesamt 278 einbezogenen Hunden (Schäfer et al., 2018). In einer ähnlich angelegten Studie über den gleichen Zeitraum wurde bei Hunden, die auf Reisen in endemischen Gebieten waren, eine Prävalenz von 7,7 % ermittelt (Schäfer et al., 2018). Eine weitere Studie, bei der insgesamt 4681 Hunde mit Reisehintergrund einbezogen wurden und die Proben mit IFAT untersucht wurden, ergab eine Prävalenz von 10,1 % (Menn et al., 2010). Der Unterschied zwischen den mit IFAT, PCR und SNAP®4Dx®Plus ermittelten Prävalenzen lässt sich durch das nachgewiesene Agens erklären. So wird im Falle des IFAT das Vorhandensein von Antikörpern nachgewiesen. Es kann dabei nicht zwischen einer akuten und einer chronischen Infektion unterschieden werden. Zumal auch nach einer Therapie über einen langen Zeitraum Antikörper persistieren können (Perille and Matus, 1991). In der PCR dagegen findet ein direkter Erregernachweis statt. Dabei ist zu beachten, dass nicht in jeder

Phase der Erkrankung die Ehrlichien gut im peripheren Blut nachzuweisen sind. Auch eine Therapie führt nicht zwangsläufig zu einer vollständigen Erregereliminierung (Bartsch and Greene, 1996). Allerdings wird in neueren Studien empfohlen, dies als Maßstab für eine gelungene Therapie heranzuziehen (Little, 2010). Im Falle des SNAP®4Dx®Plus von IDEXX wird zum Nachweis ein rekombinantes Analog wichtiger Membranproteine von *E. canis* und *E. ewingii* verwendet, wodurch Antikörper nachgewiesen werden, die nur während der akuten Phase der Erkrankung gebildet werden sollen (Belanger et al., 2002).

Von den neun positiv auf Ehrlichien getesteten Hunden wiesen fünf ein gemeinsames Vorkommen mehrerer Infektionen auf. Dies ist wahrscheinlich über die in solchen Fällen ausgeprägtere Klinik zu begründen, weshalb die Besitzer die Symptome besser wahrnehmen bzw. diese überhaupt auftreten und somit solche Hunde häufiger beim Tierarzt vorgestellt werden (Aroch et al., 2018). Außerdem wurde in einer anderen Studie festgestellt, dass Hunde mit klinischer Leishmaniose signifikant häufiger Koinfektionen mit Ehrlichien aufweisen, was mit dem geschwächten Immunsystem zu erklären ist (Attipa et al., 2018b). In der vorliegenden Arbeit konnte zwar kein Zusammenhang zwischen einer Koinfektion mit Leishmanien und Ehrlichien gezeigt werden. Allerdings ist zu vermuten, dass eine Infektion mit Ehrlichien die Immunabwehr beeinflusst und so Ko- und Sekundärinfektionen wahrscheinlicher macht, worauf auch die in dieser Studie nachgewiesenen Antikörper verschiedener Erreger in einem Hund hindeuten.

Aufgrund der geringen Anzahl positiver Proben, die in der vorliegenden Studie gefunden wurden, ist eine Auswertung von saisonalem Auftreten schwierig. Es konnte zwar gezeigt werden, dass in den Monaten Dezember, Januar und Februar keine positiven Fälle auftraten, dies traf allerdings auch auf die Sommermonate 2017 zu. Insgesamt trifft der Zeitpunkt der Infektion wahrscheinlich nicht oft mit dem der Diagnosestellung zusammen, da asymptomatische Fälle und unspezifische Symptomatik eben diese erschweren und sich die Tiere überwiegend im Ausland infiziert haben dürften.

### **5.2.5. Borrelien**

Die Untersuchungen auf Borrelien wurden mit dem IDEXX SNAP®4Dx®Plus durchgeführt. Dabei wurden 1008 Serumproben untersucht und 17 (1,69 %) positiv getestet.

In früheren Studien wurden teilweise deutlich höhere Seroprävalenzen belegt, wie zum Beispiel 1991, in einer Praxis in Nordbayern, von 35,5 % (Weber et al., 1991). Außerdem kommt der Vektor *I. ricinus* in Brandenburg in großer Anzahl vor. So wurde 2014 über das Vorkommen von *Borrelia* spp. in von Hunden abgesammelten Ixodes-Zecken mit einer Prävalenz von 11,6 % bei *I. ricinus* und 11,2 % bei *I. hexagonus* berichtet (Schreiber et al., 2014). Aufgrund dessen gilt in Berlin/ Brandenburg die Borreliose als endemisch.

Die Saugdauer, bis es zur Übertragung des Erregers kommt, ist mit ungefähr 16 Stunden relativ lang, da die Borrelien erst in die Speicheldrüsen einwandern müssen (Kahl et al., 1998). Dadurch haben die Besitzer theoretisch ausreichend Zeit den Hund nach einem Spaziergang abzusammeln und so eine Übertragung zu verhindern. Allerdings sind auch in den Nymphen *Borrelia spp.* mit einer Prävalenz von ca. 11 % im Raum Brandenburg nachgewiesen worden (Schreiber et al., 2014). Da diese sehr schwer zu erkennen sind, werden sie beim Absammeln häufig übersehen. Deswegen ist es eher unwahrscheinlich, dass dies Auswirkungen auf die ermittelte Prävalenz hat. Auch adulte Zecken werden von den Besitzern trotz täglichem Absammeln in großer Anzahl erst nach mehr als 24 Stunden gefunden (Beck et al., 2014).

Die verwendete Testmethode ist durchaus von großer Bedeutung bei der Interpretation der ermittelten Daten. Zum einen hat der häufig verwendete IFAT den Nachteil geringerer Spezifität und möglicher Kreuzreaktionen (Bruckbauer et al., 1992) und zum anderen ist mit den serologischen Testverfahren nur beim Western Blot das Unterscheiden von geimpften und infizierten Tieren möglich. Zudem weisen diese Tests Antikörper gegen Borrelien nach, welche trotz Therapie oder ohne klinische Anzeichen lebenslang persistieren können (Stanek et al., 2012). So wird in diesen Tests ein positives Ergebnis bei nahezu jedem Hund erzielt, der einen Zeckenstich einer infizierten Zecke hatte. Beim SNAP®4Dx®Plus dagegen wird zum Nachweis ein synthetisches, sehr spezifisches Protein aus der invariablen Region des Oberflächenproteins verschiedener *B. burgdorferi*-Stämme verwendet (Liang et al., 2000). Das C<sub>6</sub>-Peptid sinkt außerdem nach der Therapie ab und es bestehen keine Kreuzreaktionen mit impfspezifischen Antikörpern (Liang et al., 1999). Somit ist die ermittelte Prävalenz, welche sich kaum von der in früheren, mit dem SNAP-Test 4Dx Plus durchgeführten Studien unterscheidet (Krupka et al., 2007; Straubinger, 2008), zu erklären.

Weiterhin gibt es eine Studie, welche zeigt, dass Berner Sennenhunde signifikant häufiger Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi sensu lato* bilden, als andere Hunderassen (Preys-Jägeler et al., 2016). An der vorliegenden Studie nahmen jedoch nur 9 Berner Sennenhunde teil, wovon zwei Borrelien positiv getestet wurden. Aufgrund der fehlenden Kontrollgruppe können keine Aussagen, wie in der oben genannten Studie gemacht werden. Alles in allem ist durch die geringe Anzahl an teilnehmenden Berner Sennenhunde der Einfluss auf die Gesamtprävalenz zu vernachlässigen.

Ebenso wird diskutiert, ob das Alter einen Einfluss auf die Krankheitswahrscheinlichkeit hat. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass Welpen anfälliger sind als ältere Hunde (Appel et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte für Borrelien aufgrund der geringen Infektionsrate keine signifikante Aussage dahingehend getroffen werden. Bei der Betrachtung aller als positiv nachgewiesenen Hunde im Zusammenhang mit dem Alter

konnte gezeigt werden, dass mittelalte Hunde signifikant häufiger infiziert sind, als junge oder alte Hunde.

Der Nachweis jahreszeitlicher Schwankungen in den Infektionsraten, durch die jahreszeitlich unterschiedliche Aktivität der Zecken, ist aufgrund der geringen Anzahl positiver Fälle nicht möglich. So konnte zwar ein Peak im Mai 2017 gezeigt werden, dieser war allerdings für den Mai 2016 nicht zu bestätigen. Insgesamt ist durch die milden Winter eine längere Aktivitätszeit der Zecken zu erkennen. Aufgrund dessen und der langen Inkubationszeit bzw. dem Zeitraum bis Antikörper gebildet werden, sowie der Persistenz der Antikörper bei unbehandelten und möglicherweise asymptomatischen Hunden, ist die Möglichkeit des Darstellens eines jahreszeitlichen Verlaufs eher schwierig.

#### **5.2.6. Dirofilarien**

Während der Studie wurden 1008 Blutproben von Hunden auf im Blut zirkulierendes *D. immitis* Antigen mit Hilfe des IDEXX SNAP®4Dx®Plus und auf Antikörper gegen *Dirofilaria* spp. mittels eines konventionellen ELISAs untersucht. Dabei konnte bei drei von 1008 Hunden (0,29 %) *D. immitis* Antigen nachgewiesen werden und 22 von 1008 Hunden (2,18 %) waren im Filarien-ELISA positiv. Die drei auf *D. immitis* Antigen positiven Hunden zeigten auch im Filarien-ELISA ein positives Ergebnis.

Bei 8 der 22 positiven Hunde konnte eine Reise- bzw. Importgeschichte belegt werden, während diese bei vier weiteren Hunden ausgeschlossen werden konnte. Diese Ergebnisse verdeutlichen, wie notwendig wirksame Parasitenprophylaxe und aussagekräftige Untersuchungen auf Vektor-übertragene Erreger nach Import und Reisen von und mit Hunden sind, um die Gesundheit der Tiere zu schützen und die Ausbreitung von Krankheitserregern zu verhindern (Capelli et al., 2018).

Diese vier offenbar autochthonen Fälle der Studie können als weitere Hinweise für ein endemisches Vorkommen von *Dirofilaria* spp. in der Region Berlin/ Brandenburg gesehen werden. Denn bereits frühere Studien zeigten ähnliche Hinweise. So wurde bereits 2004 vom ersten autochthonen *D. repens* Fall bei einem Hund aus Baden-Württemberg berichtet (Hermosilla et al., 2006). Auch autochthones *D. repens* Vorkommen in einem Schlittenhundrudel im Havelland 2007 und 2012 konnte nachgewiesen werden (Sassnau et al., 2009; Sassnau et al., 2013). Weiterhin wurde DNA von *D. repens* und *D. immitis* in einheimischen Mückenpopulationen in Baden-Württemberg (Kronefeld et al., 2014) und Brandenburg (Czajka et al., 2014) gefunden, was für das Vorkommen von endemischen Herden in Deutschland spricht. Im Gegensatz zu den Berichten über autochthones *D. repens* Vorkommen wurde in Deutschland ein solches noch nicht für *D. immitis* beschrieben, obwohl auch diese DNA in Mücken nachgewiesen wurde. Auch in der vorliegenden Arbeit hatten zwei der drei auf *D. immitis* Antigen positiv getesteten Hunde eine Reisevorgeschichte. In

einem Fall konnten keine Reiseanamnese erhoben werden. Der Verdacht, dass es sich bei den im ELISA positiven, aber im SNAP-Test negativen Proben, um Fälle von *D. repens* handelt, konnte nicht abschließend durch Sequenzierungen bestätigt werden.

Allerdings muss bei der Betrachtung der positiven Dirofilariafälle die Möglichkeit von falsch positiven Testergebnissen sowie Kreuzreaktionen in Betracht gezogen werden. So wies der durchgeführte Filarien-ELISA Kreuzreaktionen mit *Acanthocheilonema* und *Dipetalonema* spp. (50 % bzw. 66,7 %), *Crenosoma vulpis* (16,7 %), *Capillaria aerophila* (14,3 %) und mit natürlich, aber nicht experimentell infizierten Hunden mit *A. vasorum* auf (Joekel et al., 2017). Durch die wenigen Einsendungen von Vollblutproben, in denen auch keine Filarien-DNA nachgewiesen werden konnte, war es nicht möglich eine Speziesdifferenzierung vorzunehmen, womit sowohl Kreuzreaktionen als auch falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen worden wären.

Der Grund für die negativen PCR-Ergebnisse könnte in der Periodizität der Mikrofilarien liegen, deren Anzahl sich tagsüber um bis zu 80-95 % im peripheren Blut verringert, im Vergleich zu ihrem Höhepunkt in den Abendstunden (Webber and Hawking, 1955). Die Blutentnahme in den Tierarztpraxen erfolgte zufällig während der Öffnungszeiten, welche zumeist tagsüber lagen. Ein weiterer Grund für die schlechte Nachweisbarkeit bei den PCR Untersuchungen dieser Studie könnte die lange Präpatenz von 27-34 Wochen sein (Sassnau and Genchi, 2013), da in dieser Zeit der Erreger noch nicht im Blut nachweisbar ist, aber möglicherweise bereits Antikörper gebildet wurden, welche durch den ELISA detektiert wurden (Hiepe and Aspöck, 2006)

Des Weiteren ist trotz intensiver Bemühungen und großer Sorgfalt bei der Erhebung der Reiseanamnesen, wie an dem detaillierten Fragenbogen (s. Anhang) zu erkennen, nicht ausgeschlossen, dass die Besitzeraussagen möglicherweise nicht vollständig oder fehlerhaft waren. Trotzdem sollte autochthones Vorkommen von *D. repens* in Deutschland nicht ausgeschlossen und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als Anhaltspunkt betrachtet werden.

Zur Ausbreitung von Vektor-übertragenen Erkrankungen ist es notwendig, dass außer dem Pathogen, dem passenden Vektor und einem kompetenten Wirt, auch die entsprechenden Umweltbedingungen für die Entwicklung herrschen. Das diese Faktoren in Brandenburg theoretisch gegeben sind, da infizierte Hunde sowie Mücken gefunden wurden und auch eine Analyse der Wetterdaten darauf hindeutet, dass eine aktive Übertragung innerhalb des Gebietes stattfinden kann, wurde bereits in früheren Untersuchungen festgestellt (Capelli et al., 2018; Sassnau et al., 2014a). Der Anstieg der Anzahl an positiven Fällen im Dezember 2016 könnte so mit dem Infektionszeitpunkt und der Präpatenz zusammenhängen, aber auch auf autochthone Infektionen hinweisen. Denn Sassnau et al. (2014b) untersuchten die Tagesmitteltemperaturen an 34 Stationen in Deutschland und fanden heraus, dass ein

Abschließen des dirfilarischen Lebenszyklus zwischen Mai und Oktober in bestimmten deutschen Regionen möglich ist (Sassnau et al., 2014a; Sassnau et al., 2014b).

Aufgrund der Bedeutung als Reise- oder Importkrankheit (Pantchev et al., 2009a) und im Hinblick auf den Klimawandel (Sassnau et al., 2014b) ist die Gefahr der Endemisierung von *Dirofilaria* spp. in Deutschland in jedem Fall gegeben. Durch bisherige Untersuchungsergebnisse und da Voraussetzungen wie geeignete Umwelt- und Klimabedingungen für den Vektor, Vorhandensein des Pathogens und empfängliche Endwirte gegeben sind, ist eine Endemisierung als wahrscheinlich anzusehen. Deshalb ist es unbedingt notwendig, das Vorkommen von *D. repens* und *D. immitis* in weiteren Studien zu untersuchen und Aufklärung über notwendige Parasitenprophylaxe bei Hunden zu betreiben sowie geeignete, zuverlässige Testverfahren zu etablieren, da nur so eine Übertragung vermieden und eine Ausbreitung eingedämmt werden kann.

#### **5.2.7. Angiostrongylus vasorum**

Es wurden 1008 Proben auf *A. vasorum* Antigen- und Antikörper-Vorkommen untersucht. Dabei wurden 29 Proben (2,88 %) im Antigen- und 35 (3,47 %) im Antikörper-ELISA als positiv detektiert. Allerdings gab es nur 12 Proben, welche in beiden ELISAs ein positives Ergebnis zeigten.

Aufgrund von Untersuchungen zwischen 1999 und 2007, als in verschiedenen Studien jeweils nur von wenigen vereinzelt positiven Fällen berichtet wurde (Barutzki and Schaper, 2003; Epe et al., 2004; Taubert et al., 2009), ging man zunächst davon aus, dass es sich bei der caninen Angiostrongylose um eine reine Importkrankheit handelt. Allerdings konnte mittels Kotuntersuchungen 2008 eine Prävalenz von 1,8 % festgestellt werden (Hermosilla et al., 2009) und eine weitere Studie im ähnlichen Zeitraum ebenfalls durch Kotuntersuchungen, berichtet von 7,4 % Vorkommen in der Studienpopulation (Barutzki and Schaper, 2009). In beiden Untersuchungen wurden nur Hunde einbezogen, die klinische Symptome einer *A. vasorum* Infektion zeigten. Letztere hatte als weitere Voraussetzung, dass die Hunde in den letzten drei Monaten vor der Beprobung nicht im Ausland waren. Diese Hinweise für endemisches Vorkommen werden durch Berichte über autochthone Infektionen (Staebler et al., 2005) und das Vorkommen von Vektoren in immer nördlicheren Gebieten (Ferdushy et al., 2009), unterstützt. Da in der vorliegenden Arbeit der Nachweis der Infektion über serologische Verfahren erfolgte, welche eine geringere Sensitivität als koproskopische Methoden aufweisen, ist die geringere Prävalenz gegenüber der Studie von Barutzki und Schaper et al. zu erklären. Außerdem fand diese Untersuchung deutschlandweit statt, wobei auch Gebiete im Süden Deutschlands, mit nachweislich höheren Prävalenzen (Hermosilla et al., 2009; Taubert et al., 2009), einbezogen wurden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Antikörper- und Antigenuntersuchung haben verschiedene Ursachen. Einerseits persistieren Antikörper auch nach der Behandlung noch einige Zeit im Körper und ebenso nach erfolgter Elimination des Erregers durch das Immunsystem. Dadurch kann es bei der gleichen Probe zu einem positiven Antikörper- aber negativen Antigen-Testergebnis kommen. Andererseits weist der verwendete Antikörper-ELISA eine schlechte Sensitivität von 42,2 % auf (Gillis-Germitsch et al., 2017), was zu einigen falsch-negativen Ergebnissen geführt haben wird. Damit sind dann Proben im Antigen-ELISA positiv und im Antikörper-ELISA falsch-negativ, wodurch es zu differierenden Ergebnissen kommt. In solchen Fällen wäre eine Nachtestung der Proben notwendig gewesen. Dafür hat jedoch in den meisten Fällen das vorhandene Material nicht gereicht. Eine weitere Verbesserung der Sensitivität wäre durch eine Wärmebehandlung der Proben möglich gewesen (Gillis-Germitsch and Schnyder, 2017). Allerdings wird diese nicht standardmäßig bei der Durchführung des ELISAs vorgenommen und Nachtestungen waren nur eingeschränkt möglich. Weiterhin könnten Kreuzreaktionen eine mögliche Erklärung darstellen. Die Spezifität der ELISAs lag bei 92 bzw. 94 % (Gillis-Germitsch et al., 2017; Schnyder et al., 2011).

Eine Kontrolle der positiven ELISA-Ergebnisse mittels PCR fand nicht statt, da keine etablierte PCR zur Verfügung stand und es sich schwierig gestaltete, eine geeignete Positivkontrolle zu erhalten. Weiterhin wäre die Anzahl der zur Untersuchung eingesendeten Proben, wie auch im Falle der anderen Erreger, wohl sehr niedrig gewesen. Dies ist hier besonders ausgeprägt, da die Proben gesammelt in zwei Blöcken in Zürich untersucht wurden und daher der Abstand zwischen Probennahme und Diagnose deutlich länger als für andere Erreger war.

### **5.3. *Hepatozoon canis***

#### **5.3.1. Beurteilung der Prävalenzuntersuchung**

Die Prävalenz von *H. canis* in Brandenburg wurde mit Hilfe von PCR ermittelt. Die untersuchten Proben wurden in einer früheren Studie gesammelt und die DNA extrahiert (Liesner et al., 2016). Von den insgesamt 1050 Hundebloodproben und den 201 Fuchsmilzproben waren 46 (4,38 %) bzw. 156 (77,61 %) positiv. Sequenzdaten liegen für 19 Hunde und 52 Füchse vor.

Schon in früheren Studien wurden hohe Prävalenzen von *H. canis* bei europäischen und deutschen Rotfüchsen beschrieben (Cardoso et al., 2014; Criado-Fornelio et al., 2003; Duscher et al., 2014; Ebani et al., 2017; Majlathova et al., 2007; Najm et al., 2014b). Ebenso ist das Vorhandensein von *H. canis* bei Import- oder Reisehunden in Deutschland bekannt. Eine Untersuchung mit 4681 in Deutschland lebenden Hunden mit Reisehintergrund ergab

eine durch PCR ermittelte Prävalenz von 2,7 % (Menn et al., 2010). Somit lässt sich sagen, dass positive Ergebnisse bei den Untersuchungen der Proben zu erwarten waren, jedoch liegt die Höhe der Prävalenz deutlich über dem, was in vergleichbaren Untersuchungen ermittelt wurde. Grund für diese scheinbar rasche Ausbreitung und die steigenden Infektionsraten könnte die Möglichkeit der vertikalen Übertragung sein (Hodzic et al., 2018). Denn bisher ist kein Vektor der caninen Hepatozoonose bekannt, der in Deutschland endemisch ist oder dauerhaft überleben könnte (Gärtner et al., 2008). So gilt *R. sanguineus* als ein nachgewiesener Vektor, diese Zecke kann in Deutschland aber nur, nach Import auf Reisen beispielsweise, in beheizten Wohnungen und Hundezwingern überleben (Dongus et al., 1996). Weitere Vektorzecken werden diskutiert (Farkas et al., 2014b). Beispielsweise wurde *H. canis* Vorkommen in *I. ricinus*-Zecken (Gabielli et al., 2010; Giannelli et al., 2017; Najm et al., 2014b; Reye et al., 2010) nachgewiesen. Auch wurde von Funden in *Haemaphysalis punctata* und *Haemaphysalis concinna* berichtet (Andersson et al., 2017a). Des Weiteren konnten *H. canis* positive Zecken der Spezies *D. marginatus*, *D. reticulatus* und *H. concinna* gefunden werden (Hornok et al., 2013). Bisher liegen aber keine definitiven Nachweise für eine Rolle dieser Zeckenspezies im Entwicklungszyklus von *H. canis* vor, denn das Auffinden von DNA in Zecken nach einer Blutmahlzeit ist nicht aussagekräftig für ihre Vektor-Rolle, sondern kann lediglich als Beweis des Vorkommens des nachgewiesenen Pathogenes in Wirtstieren gesehen werden (Giannelli et al., 2013b).

Bei der Analyse der Daten zur Reiseanamnese konnte festgestellt werden, dass neun der positiven Hunde keine Reisevorgeschichte in endemische Länder hatten. Davon konnte bei sieben Proben eine Sequenzierung vorgenommen werden und der gefundene Genotyp war in den meisten Fällen identisch mit dem in den lokalen Füchsen weit verbreiteten Genotyp. Dieses Ergebnis war überraschend und deutet zusammen mit den hohen Prävalenzen auf eine mögliche lokale horizontale Übertragung hin. Bereits in früheren Studien kam der Verdacht auf, dass Füchse ein Reservoir für Hunde darstellen (Fishman et al., 2004). Eine Studie, welche die Reservoirfunktion von Goldschakalen in Rumänien, Tschechien und Österreich betrachtete, fand mittels PCR heraus, dass 70 % der untersuchten Tiere positiv für *H. canis* waren und stellte die Vermutung auf, dass die Goldschakale eine ähnliche Funktion bei der Ausbreitung von *H. canis* haben, wie die Roffüchse (Mitkova et al., 2017). Ebenso für eine horizontale Übertragung und Reservoirfunktion spricht, dass in einer epidemiologischen Untersuchung im südlichen Ungarn festgestellt wurde, dass westlich der Donau, wo mehr Füchse und Goldschakale vorkommen, die Prävalenz der Hepatozoonose des Hundes deutlich höher ist (Hornok et al., 2013). Neben den bereits genannten Hypothesen zur Übertragung von *H. canis* wurde auch die Rolle von infizierten Beutetieren diskutiert (Duscher et al., 2014). Letzteres erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, da die *Hepatozoon* Spezies aus Nagetieren nicht nahe mit den *Hepatozoon* Spezies aus

Carnivoren verwandt sind und beide eigentlich verschiedenen Gattungen zugeordnet werden sollten (O'Donoghue, 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhobenen Daten deutliche Hinweise für eine Endemisierung und auch auf eine (indirekte) Übertragung zwischen Füchsen und Hunden sind. Weitere Studien zu den beteiligten Vektoren sowie anderen Übertragungswegen sind angezeigt, um die Epidemiologie der Hepatozoonose in Mitteleuropa zu verstehen.

### **5.3.2. Beurteilung der phylogenetischen Analyse**

Für die phylogenetische Analyse der Sequenzdaten der *H. canis* Proben wurde zunächst ein Baum berechnet. Dieser ist in Abbildung A27-A29 dargestellt. Durch die beiden hauptsächlichlichen Cluster, die sich von der outgroup abgrenzen lassen und wovon eines fast alle Sequenzen aus der vorliegenden Arbeit enthält, werden die, aufgrund der erhobenen Prävalenzdaten gemachten, Vermutungen noch bestärkt.

Um die phylogenetischen Beziehungen besser darstellen zu können und weil sich der derzeitige genetische Zustand der Population besser verdeutlichen lässt, wurde ein phylogenetisches Netzwerk berechnet. In diesem sind die Beziehungen der Cluster deutlicher als in einem phylogenetischen Baum, da keine Wurzel existiert und zudem die phylogenetische Nähe, durch die Anzahl der trennenden Mutationen, zu erkennen ist. So befinden sich sechs von sieben Sequenzen von wahrscheinlich autochthonen Fällen dieser Studie mit Hunden und Füchsen aus Deutschland, Ungarn, Tschechien, Kroatien und der Slowakei in einem Haplotype. Dieser ist nur durch eine Mutation von dem größten Haplotype getrennt, welcher hauptsächlich Sequenzen von Hunden und Füchsen weltweit enthält.

Aufgrund der Tatsache, dass der größte Teil der Hunde aus Brandenburg mit dem gleichen Haplotype infiziert war wie die lokalen Füchse, kann eine lokale Übertragung zwischen beiden Wirtsspezies als sehr wahrscheinlich angenommen werden. Daher sind diese Ergebnisse ein wichtiger Hinweis für endemisches Vorkommen von *H. canis* bei Hunden und Füchsen in Deutschland, sowie damit verbundene horizontale und möglicherweise vertikale Übertragung.

### **5.4. Beurteilung der Ermittlung der Reisegeschichte und PCR Abklärung in positiven Fällen**

Das Studiendesign der vorliegenden Arbeit diente der Ermittlung der Prävalenz verschiedener Vektor-übertragener Erreger im Raum Berlin/ Brandenburg. Dabei sollte eine Einschätzung der derzeitigen Situation der in diesem Gebiet lebenden Hunde stattfinden. Somit sollte eigentlich keine Vorselektierung der Proben stattfinden. Allerdings war aus einer früheren Studie bekannt, dass das Probenaufkommen sehr gering ist, wenn keine

Tierarztpraxen einbezogen werden. Um den Studienzeitraum eingrenzen zu können und eine gleichmäßige Anzahl Proben in regelmäßigen Abständen untersuchen zu können, war es also notwendig mit Praxen und Kliniken zusammenzuarbeiten. Dadurch wurden Hunde beprobt, die zur Blutabnahme beim Tierarzt vorgestellt wurden und somit wahrscheinlich häufiger Krankheiten aufwiesen. Trotzdem wurden außer dem derzeitigen Wohnort der Hunde keine weiteren Kriterien bei der Sammlung einbezogen und so die Reisegeschichte vorerst vernachlässigt.

Für die Einordnung der ermittelten Prävalenzen und vor allem der autochthonen Fälle war es jedoch wichtig, etwas über den Reisehintergrund der Hunde zu erfahren, weshalb in positiven Fällen eine Nachforschung angestellt wurde. Diese war leider nicht in allen Fällen möglich, weshalb eine statistische Auswertung nur eingeschränkt vorgenommen werden konnte. Weitere Studien, die möglicherweise nur Hunde einbeziehen, für welche diese Daten eindeutig bekannt sind, wären sicherlich interessant und die Ergebnisse von großem Nutzen. Ebenso verhielt es sich mit der diagnostischen Abklärung von serologisch positiven Hunden mittels PCR. Zur Einordnung der serologischen Ergebnisse wären diese Informationen wesentlich, aber auch hier war der Rücklauf leider sehr gering. Ein Grund dafür war auch sicherlich die eingeschränkte Kommunikationsmöglichkeit. Die Praxen und Kliniken erklärten sich zwar einverstanden, dass die übrig gebliebenen Serumproben in der Studie untersucht wurden, die Besitzer aber wurden erst im Falle positiver Ergebnisse informiert. Dies musste über den Umweg der Praxen laufen, da diese datenschutzrechtlich nicht befugt waren, die Kontaktdaten der Besitzer weiterzugeben. Somit waren die Informationsbeschaffung und Weiterleitung an die Mitarbeit und Kooperationsbereitschaft vieler Menschen gebunden und so sicherlich erschwert. Auch hier wäre möglicherweise ein Studiendesign mit vorheriger Einwilligung der Besitzer in Betracht zu ziehen. Dies wäre dann aber nicht innerhalb des gleichen Zeitraumes und mit der gleichen repräsentativen Anzahl Proben möglich gewesen.

## **5.5. Einflussfaktoren für die Verbreitung von Vektor übertragenen Erkrankungen**

Die Ausbreitung von Vektor-übertragenen Krankheiten hat verschiedene Ursachen und stellt ein komplexes Zusammenspiel aus diesen Faktoren dar.

Durch den Klimawandel und die geänderte Landschaftsnutzung werden Tiere und Vektoren zur Anpassung an diese Bedingungen gezwungen. Es werden zwar Lebensräume unnutzbar, aber andere können erschlossen werden, wie beispielsweise an der Endemisierung von *D. reticulatus* in Brandenburg zu erkennen ist. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass signifikant mehr Hunde aus Brandenburg als aus Berlin eine Infektion aufwiesen. Dies ist eventuell damit zu erklären, dass in Brandenburg bessere Lebensbedingungen für Zecken und ähnliche Vektoren herrschen und so eine Infektion

wahrscheinlicher wird. Bereits in früheren Studien konnte dieser Zusammenhang festgestellt werden (Baneth and Weigler, 1997). Des Weiteren führen steigende Temperaturen zu einer Beschleunigung von Entwicklungszyklen, wodurch sich mehr Vektoren in einer Saison entwickeln können.

Auch die wachsende Weltbevölkerung wirkt sich auf die Verbreitung der Habitate der Tiere aus und es kommt insgesamt zu einem engeren Zusammenleben, was die Übertragung von Krankheiten begünstigt.

Außerdem ist das gestiegene Handels- und Reiseaufkommen ein entscheidender Faktor für die Verbreitung. So gibt es verschiedene Berichte von importierten Vektoren, wie *R. sanguineus* (Dongus et al., 1996) und Phlebotomen (Naucke and Schmitt, 2004). Somit ist eine Vektorpräsenz in vorher nicht-endemischen Gebieten möglich.

Aber auch der Import von Hunden aus endemischen Gebieten ist ein Problem. Internationale Tierschutzorganisationen führen potenziell infizierte Hunde ein, welche dann die Erreger auf mögliche Vektoren oder direkt auf einheimische Hunde übertragen können (Capelli et al., 2018). Eine korrekte und ausreichend lange Ektoparasitenprophylaxe ist deshalb von großer Bedeutung, sowohl für einheimische als auch für erkrankte Hunde. Im Falle der Leishmaniose beispielsweise wird eine Ektoparasitenprophylaxe sogar nach einer Behandlung empfohlen, da eine Elimination des Erregers nicht möglich ist.

Ein weiterer wichtiger Faktor stellt demnach die Prophylaxe und Diagnose durch den Tierarzt dar. Denn eine Prophylaxe vor Reisen und eine schnelle Diagnose und Behandlung infizierter Hunde kann die Ausbreitung stark einschränken. Allerdings sind die Symptome oft nicht eindeutig und es kommen viele asymptomatische Fälle vor. Trotzdem hilft eine Aufklärung der Tierbesitzer und Tierärzte, über das Vorkommen von Vektor-übertragenen Erregern und deren Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten, eine weitere Ausbreitung einzugrenzen (Capelli et al., 2018).

## **5.6. Ausblick**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die epidemiologische Situation der Hunde im Raum Berlin/Brandenburg in Bezug auf das Vorkommen von Vektor-übertragenen Erregern einzuschätzen und mögliche autochthone Fälle zu identifizieren.

Dies ist durch die Ergebnisse dieser Studie möglich und es lässt sich sagen, dass das Endemisierungsrisiko, besonders für *Dirofilaria* spp., *Babesia* spp. und *H. canis*, als hoch einzustufen ist. Auch in dieser Studie konnten autochthone Vorkommen belegt werden. *Dermacentor reticulatus* ist in Brandenburg endemisch und ebenso ist das Auftreten von Dirofilarien und Hepatozoon in möglichen Vektoren bzw. Reservoirwirten belegt. Es sind weitere Studien nötig, um die Ausbreitung und das Risiko von weiterer Endemisierung auch

in den nächsten Jahren zuverlässig einschätzen und durch andere Studiendesigns spezifischere Fragestellungen beantworten zu können.

Weiterhin konnte diese Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung von Tierärzten und Tierbesitzern über die möglichen Risiken von Vektor-übertragenen Erkrankungen sowie über Präventions- und Therapiemaßnahmen leisten. Auch durch den in dieser Arbeit dargestellten Vergleich verschiedener Diagnostikmaßnahmen ist eine bessere Einschätzung von Testergebnissen möglich und kann ein kritischerer Umgang angeraten werden.

## 6. Zusammenfassung

### Untersuchung der Prävalenz von durch Arthropoden und Gastropoden übertragenen Pathogenen bei Hunden im Raum Berlin/Brandenburg

Vektor-übertragene Erkrankungen breiten sich infolge globaler Erwärmung, veränderter Bodennutzung und sozioökonomischer Faktoren aus. Sie stellen für Tiere und Menschen eine erhebliche Gesundheitsgefahr dar.

Eine frühere PCR-basierte Studie hatte geringe Prävalenzen von Vektor-übertragenen Krankheitserregern bei Hunden in Brandenburg ergeben und keine Hinweise auf eine autochthone Übertragung von *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* und Filaroiden gefunden. Trotzdem wird von steigenden Prävalenzen und auch immer wieder autochthonem Vorkommen verschiedener Vektor-übertragener Erkrankungen in Regionen berichtet, die bisher nicht endemisch waren.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwischen Mai 2016 und April 2018 insgesamt 1008 Serumproben von Hunden aus Berlin und Brandenburg gesammelt und auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen bzw. zirkulierenden Antigene von Vektor-übertragenen Krankheitserregern getestet. Die Proben wurden mit dem IDEXX SNAP®4Dx®Plus Test auf Antikörper gegen *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. und *Borrelia* spp. sowie *Dirofilaria immitis* Antigen untersucht. Konventionelle ELISAs wurden zum Nachweis von Antikörpern gegen *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp., *Dirofilaria* spp. und *Angiostrongylus vasorum* und *A. vasorum* Antigen verwendet. Zusätzlich wurden DNA-Proben aus einer vorausgegangenen Studie von Hunden und Füchsen in Brandenburg mittels PCR auf *Hepatozoon canis* untersucht.

Bei diesen Untersuchungen konnten in 22 von 1008 Serumproben (2,2%) Antikörper gegen *Dirofilaria* spp. nachgewiesen werden. Davon waren 3 (0,3%) Proben ebenfalls im SNAP-Test positiv auf *D. immitis* Antigen. Im SNAP-Test waren weiterhin 66 (6,5%) Proben positiv auf *Anaplasma* spp., 9 (0,9%) auf *Ehrlichia* spp., sowie 17 (1,7%) der 1008 getesteten Proben auf *Borrelia* spp. Im Gegensatz dazu zeigten im antigenbasierten *Anaplasma*-ELISA 306 von 1001 Proben (30,6%) ein positives Testergebnis. Die im Anschluss durchgeführten IFAT-Untersuchungen ergaben keine Klärung der differierenden Ergebnisse. Im Falle der *A. vasorum* Untersuchungen waren 29 von 1008 (2,9%) Proben antigenpositiv und 35 (3,5%) antikörperpositiv. Bei 12 (1,2%) Proben wurde in beiden ELISAs ein positives Ergebnis detektiert. *Babesia* spp. Antikörper wurden in 26 von 1008 (2,6%) untersuchten Proben nachgewiesen. Für die Untersuchung auf *Leishmania* spp. wurden zwei ELISAs und ein IFAT verwendet, so dass letztendlich von 16 definitiv positiven Hunden (positiv in mindestens zwei der Tests) in der Studie ausgegangen werden kann. Dies entspricht bei 991

untersuchten Proben einer Prävalenz von 1,4%. Mit der *H. canis* PCR waren 46 von 1050 Hunden (4,4%) und 156 von 201 Füchsen (77,6%) positiv.

Eine Genotypisierung wurde für 19 Hundeblutproben und 52 Fuchsmilzproben vorgenommen und auf Grundlage dessen eine phylogenetische Analyse vorgenommen.

Weiterhin wurde eine Abklärung der Reisegeschichte der positiven Hunde, sowie eine Bestätigung der serologischen Ergebnisse mittels PCR versucht. Für die PCR Untersuchungen kam es leider nur zu sehr wenigen Einsendungen von Proben. Die Dokumentation der Reisegeschichte war dagegen in vielen Fällen möglich und so konnten wahrscheinlich autochthone Fälle identifiziert werden. Bei den *Dirofilaria*-positiven Fällen waren vier Hunde dabei, die Deutschland nicht verlassen hatten. Ebenso viele waren es bei den Babesien-positiven Hunden. Weitere zwei Hunde, die positiv auf Leishmanien getestet wurden, und neun *H. canis* positive Hunde wiesen keinen Reisehintergrund auf. Zu sieben der neun autochthonen *H. canis* Fällen liegen Sequenzdaten vor und der gefundene Haplotype war in sechs Fällen identisch mit dem bei weitem häufigsten Haplotype in der lokalen Fuchspopulation.

Diese Ergebnisse stellen deutliche Hinweise für das Risiko einer weiteren Ausbreitung von Vektor-übertragenen Erkrankungen dar und zeigen deutlich, dass mit einer Endemisierung zu rechnen ist.

## 7. Summary

### Investigation of the prevalence of pathogens transmitted by arthropods and gastropods in dogs in the Berlin/Brandenburg area

Vector-borne diseases are spreading as a result of global warming, changes in land use and socioeconomic factors. They pose a significant health risk to animals and humans.

A previous PCR-based study had found low prevalences of vector-borne pathogens in dogs in Brandenburg and no evidence of autochthonous transmission of *Babesia* spp., *Ehrlichia canis* and filaroids. Nevertheless, increasing prevalences are reported and also repeatedly autochthonous occurrence of various vector-borne diseases in previously non-endemic regions.

For the present study, a total of 1008 serum samples were collected from dogs from Berlin and Brandenburg between May 2016 and April 2018 and tested for antibodies against or circulating antigens of vector-borne pathogens. The samples were analyzed with the IDEXX SNAP®4Dx®Plus test for antibodies against *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp. and *Dirofilaria immitis* antigen. Conventional ELISAs were used to detect antibodies against *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp., *Dirofilaria* spp. as well as *Angiostrongylus vasorum* and *A. vasorum* antigen. In addition, DNA samples from a previous study targeting dogs and foxes in Brandenburg were tested for *Hepatozoon canis* by PCR.

In these tests, antibodies against *Dirofilaria* spp. were detected in 22 of 1008 serum samples (2.2%). Of these, 3 (0.03%) samples were also positive for *D. immitis* antigen in the SNAP-test. In the SNAP-test, 66 (6.5%) samples were positive for *Anaplasma* spp., 9 (0.1%) for *Ehrlichia* spp. and 17 (1.7%) of the 1008 samples tested positive for *Borrelia* spp. In contrast, 306 of 1001 samples (30.6%) in the antigen-based Anaplasma-ELISA showed a positive result. The subsequent IFAT tests could not clarify the different results. In the case of *A. vasorum*, 29 of 1008 (2.9%) samples were antigen positive and 35 (3.5%) were antibody positive. In 12 (1.2%) samples, a positive result was detected in both ELISAs. *Babesia* spp. antibodies were detected in 26 of 1008 (2.6%) tested samples. Two ELISAs and one IFAT were used for the *Leishmania* spp. test, so that 16 definitely positive dogs (positive in at least two tests) can be assumed in the study. This corresponds to a prevalence of 1.4% in 991 tested samples. With the *H. canis* PCR, 46 of 1050 dogs (4.4%) and 156 of 201 foxes (77.6%) were positive.

Genotyping was performed on 19 dog blood samples and 52 fox spleen samples and a phylogenetic analysis was performed based on the location.

Furthermore, a clarification of the travel history of the positive dogs as well as a confirmation of the serological results by PCR were attempted. Unfortunately, only very few sample

submissions were received for the PCR tests. The documentation of the travel history was possible in many cases and thus probably autochthonous cases could be identified. The *Dirofilaria*-positive cases included four dogs that had not left Germany. The same number of *Babesia*-positive dogs was found. Another two dogs tested positive for *Leishmania* spp. and nine *H. canis* positive dogs had no travel background. Sequence data are available for seven of the nine autochthonous *H. canis* cases and the haplotype was identical to the major haplotype in the local fox population for six cases.

These results provide clear indications for the risk of further spread of vector-borne diseases and clearly indicate that endemicity must be expected.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abbate, J.M., Napoli, E., Arfuso, F., Gaglio, G., Giannetto, S., Halos, L., Beugnet, F., Brianti, E., 2018. Six-month field efficacy and safety of the combined treatment of dogs with Frontline Tri-Act(R) and NexGard Spectra(R). *Parasit Vectors* 11, 425.
- Aboqe, G.O., Jia, H., Terkawi, M.A., Goo, Y., Kuriki, K., Nishikawa, Y., Igarashi, I., Suzuki, H., Xuan, X., 2007. A novel 57-kDa merozoite protein of *Babesia gibsoni* is a prospective antigen for diagnosis and serosurvey of canine babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary parasitology* 149, 85-94.
- Adaszek, L., Winiarczyk, S., 2008. Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet Parasitol* 152, 235-241.
- Aeschlimann, A., Chamot, E., Gigon, F., Jeanneret, J.P., Kessler, D., Walther, C., 1987. *B. burgdorferi* in Switzerland. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology* 263, 450-458.
- Agrawal, S., Agrawal, R., Shastri, J., 2017. Ocular Dirofilariasis: A Rare case from Mumbai, India. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 11, Dd09-dd10.
- Aguero-Rosenfeld, M.E., Wang, G., Schwartz, I., Wormser, G.P., 2005. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 18, 484-509.
- Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., Amusatogui, I., Lopez, L., Rodriguez-Franco, F., Luaces, I., Cortes, O., Tesouro, M.A., 2004. First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet Parasitol* 125, 365-372.
- Aguirre, E., Tesouro, M., Ruiz, L., Amusatogui, I., Sainz, A., 2006. Genetic characterization of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* in dogs in Spain. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 53, 197-200.
- Aiello, A., Aiello, P., Aiello, F., 2005. A case of palpebral dirofilariasis. *Eur J Ophthalmol* 15, 407-408.
- Albonico, F., Loiacono, M., Gioia, G., Genchi, C., Genchi, M., Mortarino, M., 2014. Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolution melting analysis. *Vet Parasitol* 200, 128-132.
- Albuquerque, A., Campino, L., Cardoso, L., Cortes, S., 2017. Evaluation of four molecular methods to detect Leishmania infection in dogs. *Parasit Vectors* 10, 57.
- Alencar, N.X., Kohayagawa, A., Santarem, V.A., 1997. *Hepatozoon canis* infection of wild carnivores in Brazil. *Vet Parasitol* 70, 279-282.
- Alexandre, N., Santos, A.S., Nuncio, M.S., Sousa, R., Boinas, F., Bacellar, F., 2009. Detection of *Ehrlichia canis* by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 181, 343-344.
- Alho, A.M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Goncalves, L., de Carvalho, L.M., Belo, S., 2014. Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Vet Parasitol* 206, 99-105.
- Alho, A.M., Meireles, J., Schnyder, M., Cardoso, L., Belo, S., Deplazes, P., de Carvalho, L.M., 2018. *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum*: The current situation of two major canine heartworms in Portugal. *Vet Parasitol* 252, 120-126.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology* 57, 1-88.
- Alvar, J., Molina, R., San Andrés, M., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., González, F., San Andrés, M., Boggio, J., Rodriguez, F., 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 88, 371-378.
- Amusatogui, I., Sainz, A., Aguirre, E., Tesouro, M.A., 2004. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1026, 154-157.
- Anderson, J.F., Magnarelli, L., Sulzer, A., 1980. Canine babesiosis: indirect fluorescent antibody test for a North American isolate of *Babesia gibsoni*. *American Journal of Veterinary Research* 41, 2102-2105.
- Anderson, R.C., 2000. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. *Cabi*.
- Andersson, M., Turcitu, M.A., Stefanache, M., Tamba, P., Barbuceanu, F., Chitimia, L., 2013. First evidence of *Anaplasma platys* and *Hepatozoon canis* co-infection in a dog from Romania—a case report. *Ticks and tick-borne diseases* 4, 317-319.

- Andersson, M.O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Radbea, G., Rubel, F., Waldenstrom, J., Dobler, G., Chitimia-Dobler, L., 2017a. Babesia, Theileria, and Hepatozoon species in ticks infesting animal hosts in Romania. *Parasitol Res* 116, 2291-2297.
- Andersson, M.O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Waldenstrom, J., Dobler, G., Chitimia-Dobler, L., 2017b. Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania. *Parasit Vectors* 10, 155.
- Anonym, 2012. Die canine Leishmaniose–Erkrankung, Therapie und Prophylaxe durch eine Impfung. Enke Verlag.
- Antolova, D., Miterpakova, M., Paralicova, Z., 2015. Case of human *Dirofilaria repens* infection manifested by cutaneous larva migrans syndrome. *Parasitol Res* 114, 2969-2973.
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pralong, F., Dedet, J.-P., Soteriadou, K., 2008. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *The Lancet infectious diseases* 8, 6-7.
- Appel, M.J., Allan, S., Jacobson, R.H., Lauderdale, T.L., Chang, Y.F., Shin, S.J., Thomford, J.W., Todhunter, R.J., Summers, B.A., 1993. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *Journal of Infectious Diseases* 167, 651-654.
- Aroch, I., Baneth, G., Salant, H., Nachum-Biala, Y., Berkowitz, A., Shamir, M., Chai, O., 2018. *Neospora caninum* and *Ehrlichia canis* co-infection in a dog with meningoencephalitis. *Vet Clin Pathol* 47, 289-293.
- Aroch, I., Rojas, A., Slon, P., Lavy, E., Segev, G., Baneth, G., 2015. Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. *Vet Parasitol* 211, 303-305.
- Arraga-Alvarado, C.M., Qurollo, B.A., Parra, O.C., Berrueta, M.A., Hegarty, B.C., Breitschwerdt, E.B., 2014. Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 91, 1161-1165.
- Arvanitis, P.G., Vakalis, N.C., Damanakis, A.G., Theodossiadis, G.P., 1997. Ophthalmic dirofilariasis. *Am J Ophthalmol* 123, 689-691.
- Asbury, K., Seville, M.T., Pritt, B., Scotch, A., Rosenthal, A., Gryns, T.E., Kelemen, K., 2018. The Brief Case: The Unexpected Souvenir. *J Clin Microbiol* 56.
- Ashford, D.A., David, J.R., Freire, M., David, R., Sherlock, I., Eulalio, M.C., Sampaio, D.P., Badaro, R., 1998. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 59, 53-57.
- Attipa, C., Maguire, D., Solano-Gallego, L., Szlodovits, B., Barker, E.N., Farr, A., Baneth, G., Tasker, S., 2018a. *Hepatozoon canis* in three imported dogs: a new tickborne disease reaching the United Kingdom. *The Veterinary record*.
- Attipa, C., Solano-Gallego, L., Papasoulotis, K., Soutter, F., Morris, D., Helps, C., Carver, S., Tasker, S., 2018b. Association between canine leishmaniosis and *Ehrlichia canis* co-infection: a prospective case-control study. *Parasit Vectors* 11, 184.
- Atwell, R.B., Sheridan, A.B., Baldock, F.C., 1988. An evaluation of the Dirochek test for detection of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Aust Vet J* 65, 161-162.
- Auer, H., Susani, M., 2008. [The first autochthonous case of subcutaneous dirofilariosis in Austria]. *Wien Klin Wochenschr* 120, 104-106.
- Baillet, C., 1866. Strongyle des vaisseaux et du Coeur du chien. *Strongylus vasorum*, 587-588.
- Baird, K., Neafie, R.C., Lanoie, L., Connor, D.H., 1987. Abdominal angiostrongylosis in an African man: case study. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 37, 353-356.
- Baker, C.F., McCall, J.W., McCall, S.D., Drag, M.D., Mitchell, E.B., Chester, S.T., Larsen, D., 2016. Ability of an oral formulation of afoxolaner to protect dogs from *Borrelia burgdorferi* infection transmitted by wild *Ixodes scapularis* ticks. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 49, 65-69.
- Bakken, J.S., Agüero-Rosenfeld, M.E., Tilden, R.L., Wormser, G.P., Horowitz, H.W., Raffalli, J.T., Baluch, M., Riddell, D., Walls, J.J., Dumler, J.S., 2001. Serial measurements of hematologic counts during the active phase of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 32, 862-870.
- Bakken, J.S., Dumler, J.S., 2015. Human granulocytic anaplasmosis. *Infectious disease clinics of North America* 29, 341-355.
- Bakken, J.S., Dumler, J.S., Chen, S.M., Eckman, M.R., Van Etta, L.L., Walker, D.H., 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *Jama* 272, 212-218.
- Ballesteros, C., Pulaski, C.N., Bourguinat, C., Keller, K., Prichard, R.K., Geary, T.G., 2018. Clinical validation of molecular markers of macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Rohl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16, 37-48.

- Bandi, C., Dunn, A.M., Hurst, G.D., Rigaud, T., 2001. Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends in parasitology* 17, 88-94.
- Baneth, G., 2011. Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Veterinary parasitology* 181, 3-11.
- Baneth, G., 2014. Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. *Int J Parasitol* 44, 591-596.
- Baneth, G., 2018. Antiprotozoal treatment of canine babesiosis. *Vet Parasitol* 254, 58-63.
- Baneth, G., Aroch, I., Presentey, B., 1997. *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. *Veterinary parasitology* 70, 201-206.
- Baneth, G., Bourdeau, P., Bourdoiseau, G., Bowman, D., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Dantas-Torres, F., Day, M., Dedet, J.P., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Kempf, V., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Maggi, R., Miro, G., Naucke, T., Oliva, G., Otranto, D., Penzhorn, B., Pfeiffer, M., Roura, X., Sainz, A., Shaw, S., Shin, S., Solano-Gallego, L., Straubinger, R., Traub, R., Trees, A., Truyen, U., Demonceau, T., Fitzgerald, R., Gatti, D., Hostetler, J., Kilmer, B., Krieger, K., Mencke, N., Mendao, C., Mottier, L., Pachnicke, S., Rees, B., Siebert, S., Stanneck, D., Mingote, M.T., von Simson, C., Weston, S., Forum, C.W., 2012. Vector-borne diseases-constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. *Parasit Vectors* 5, 55.
- Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L., Schnittger, L., 2015. Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasit Vectors* 8, 207.
- Baneth, G., Harmelin, A., Presentey, B., 1995. *Hepatozoon canis* infection in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 206, 1891-1894.
- Baneth, G., Harrus, S., Ohnona, F.S., Schlesinger, Y., 2009. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. *Veterinary microbiology* 136, 321-325.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in parasitology* 24, 324-330.
- Baneth, G., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I., Shkap, V., 2001. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Journal of Parasitology* 87, 606-611.
- Baneth, G., Samish, M., Shkap, V., 2007. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Parasitology* 93, 283-299.
- Baneth, G., Shaw, S.E., 2002. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 106, 315-324.
- Baneth, G., Shkap, V., 2003. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. *Journal of Parasitology* 89, 379-381.
- Baneth, G., Shkap, V., Presentey, B.-Z., Pipano, E., 1996. *Hepatozoon canis*: the prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. *Veterinary Research Communications* 20, 41-46.
- Baneth, G., Volansky, Z., Anug, Y., Favia, G., Bain, O., Goldstein, R.E., Harrus, S., 2002. *Dirofilaria repens* infection in a dog: diagnosis and treatment with melarsomine and doramectin. *Vet Parasitol* 105, 173-178.
- Baneth, G., Weigler, B., 1997. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11, 365-370.
- Barber, R.M., Li, Q., Diniz, P.P., Porter, B.F., Breitschwerdt, E.B., Claiborne, M.K., Birkenheuer, A.J., Levine, J.M., Levine, G.J., Chandler, K., Kenny, P., Nghiem, P., Wei, S., Greene, C.E., Kent, M., Platt, S.R., Greer, K., Schatzberg, S.J., 2010. Evaluation of brain tissue or cerebrospinal fluid with broadly reactive polymerase chain reaction for Ehrlichia, Anaplasma, spotted fever group Rickettsia, Bartonella, and Borrelia species in canine neurological diseases (109 cases). *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 24, 372-378.
- Barbieri, C.L., 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite immunology* 28, 329-337.
- Barbour, A.G., Hayes, S.F., 1986. Biology of Borrelia species. *Microbiological reviews* 50, 381.
- Barcante, J.M., Barcante, T.A., Ribeiro, V.M., Oliveira-Junior, S.D., Dias, S.R., Negrao-Correa, D., Lima, W.S., 2008. Cytological and parasitological analysis of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs. *Vet Parasitol* 158, 93-102.
- Barcante, T.A., Barcante, J.M., Dias, S.R., Lima Wdos, S., 2003. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected Biomphalaria glabrata snails. *Parasitol Res* 91, 471-475.
- Barrouin-Melo, S.M., Larangeira, D.F., Trigo, J., Aguiar, P.H.P., Dos-Santos, W.L.C., Pontes-de-Carvalho, L., 2004. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling

- methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 99, 195-197.
- Barth, C., 2013. Prävalenz, Diagnostik und Bedeutung von *Borrelia burgdorferi* und *Anaplasma phagozytophilum* bei Hunden im Raum München. Ludwig-Maximilians-Universität München,
- Barth, C., Straubinger, R.K., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., 2012. Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 125, 337-344.
- Barton, C., Russo, E., Craig, T., Green, R., 1985. Canine hepatozoonosis: a retrospective study of 15 naturally occurring cases. Journal of the American Animal Hospital Association 21, 125-134.
- Bartsch, R.C., Greene, R.T., 1996. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine 10, 271-274.
- Barutzki, D., Schaper, R., 2003. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. Parasitol Res 90 Suppl 3, S148-150.
- Barutzki, D., Schaper, R., 2009. Natural infections of *Angiostrongylus vasorum* and *Crenosoma vulpis* in dogs in Germany (2007-2009). Parasitol Res 105 Suppl 1, S39-48.
- Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International journal for parasitology 37, 1097-1106.
- Bauer, C., Brahm, R., Dausgschies, A., Kietzmann, M., Kohn, B., Moritz, A., Schnieder, T., Wendland, B., 2011. VETKOLLEG KLEINTIERE-Empfehlung zur Bekämpfung von durch Vektoren übertragenen Krankheiten bei Hunden und Katzen; Auszüge der deutschen ESCCAP-Empfehlung Nr. 5: Von Zecken übertragene Erkrankungen. Praktische Tierarzt 92, 662.
- Baumgarten, B.U., Rollinghoff, M., Bogdan, C., 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks from southern Germany. J Clin Microbiol 37, 3448-3451.
- Beaufils, J., Martin-Granel, J., Bertrand, F., 1988. Canine hepatozoonosis. 2. Report on 28 cases. Hepatozoonose canine. Pratique Medicale Et Chirurgicale De L Animal De Compagnie 23, 281-293.
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Živičnjak, T., Cacciò, S.M., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. International journal for parasitology 39, 843-848.
- Beck, S., Schreiber, C., Schein, E., Krücken, J., Baldermann, C., Pachnicke, S., von Samson-Himmelstjerna, G., Kohn, B., 2014. Tick infestation and prophylaxis of dogs in northeastern Germany: a prospective study. Ticks Tick Borne Dis 5, 336-342.
- Becker, N., Krüger, A., Kuhn, C., Plenge-Bönig, A., Thomas, S.M., Schmidt-Chanasit, J., Tannich, E., 2014. [Mosquitoes as vectors for exotic pathogens in Germany]. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz 57, 531-540.
- Beelitz, P., Schumacher, S., Marholdt, F., Pfister, K., Silaghi, C., 2012. Untersuchungen zur Prävalenz von *Babesia canis canis* in Auwaldzecken (*Dermacentor reticulatus*) im Saarland. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 125, 168.
- Beichel, E., Petney, T.N., Hassler, D., Brückner, M., Maiwald, M., 1996. Tick infestation patterns and prevalence of *Borrelia burgdorferi* in ticks collected at a veterinary clinic in Germany. Veterinary parasitology 65, 147-155.
- Belanger, M., Sorenson, H.L., France, M.K., Bowie, M.V., Barbet, A.F., Breitschwerdt, E.B., Alleman, A.R., 2002. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. J Clin Microbiol 40, 3506-3508.
- Bellah, J.R., Shull, R.M., Selcer, E.V., 1986. *Ehrlichia canis*-related polyarthritis in a dog. Journal of the American Veterinary Medical Association 189, 922-923.
- Benda, T., Csivincsik, A., Nemes, C., Turbok, J., Zsolnai, A., Simonyai, E., Majoros, G., Nagy, G., 2017. Lethal *Angiostrongylus vasorum* infection in a Hungarian dog. Acta Parasitol 62, 221-224.
- Bendas, A.J.R., Mendes-de-Almeida, F., Von Simson, C., Labarthe, N., 2017. Heat pretreatment of canine samples to evaluate efficacy of imidacloprid + moxidectin and doxycycline in heartworm treatment. Parasit Vectors 10, 246.
- Bergmann, M., Hartmann, K., 2015. Anaplasmose beim Hund—Infektion häufig, Krankheit selten. kleintier konkret 18, 3-7.
- Beugnet, F., Chalvet-Monfray, K., 2013. Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 36, 559-566.
- Bird, L.E., Bilbrough, G., Fitzgerald, R., Walker, D.J., 2018. Determining resolution of *Angiostrongylus vasorum* in dogs following anthelmintic treatment with an imidacloprid 10 per cent/moxidectin 2.5 per cent spot-on. Veterinary record open 5, e000215.

- Birkenheuer, A.J., Correa, M.T., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2005. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000–2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 942-947.
- Boch, J., 1985. [Babesia infections in horses, cattle and dogs in southern Germany]. *Tierärztliche Praxis. Supplement* 1, 3-7.
- Böhm, C., Petry, G., Schmidt, H., Raue, K., Barthel, F., Schaper, R., 2017. Evaluation of the Persistent Preventive Efficacy of 2.5 % Moxidectin/10 % Imidacloprid Spot-on (Advocate(R), Advantage(R) Multi) in Dogs Experimentally Infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol Res* 116, 1-10.
- Böhm, M., Leisewitz, A.L., Thompson, P.N., Schoeman, J.P., 2006. Capillary and venous Babesia canis rossi parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Veterinary Parasitology* 141, 18-29.
- Bolt, G., Monrad, J., Frandsen, F., Henriksen, P., Dietz, H.H., 1993. The common frog (*Rana temporaria*) as a potential paratenic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol Res* 79, 428-430.
- Bolt, G., Monrad, J., Henriksen, P., Dietz, H.H., Koch, J., Bindseil, E., Jensen, A.L., 1992. The fox (*Vulpes vulpes*) as a reservoir for canine angiostrongylosis in Denmark. Field survey and experimental infections. *Acta Vet Scand* 33, 357-362.
- Bolt, G., Monrad, J., Koch, J., Jensen, A.L., 1994. Canine angiostrongylosis: a review. *The Veterinary record* 135, 447-452.
- Borkowski, P.K., Rymkiewicz, G., Golebiewska, J., Nestoros, N., Romejko-Jarosinska, J., Zarnowska-Prymek, H., Masny, A., Palucki, J., Cielecka, D., 2015. The first case of human autochthonous subconjunctival dirofilariosis in Poland and MALT lymphoma as possible consequence of this parasitosis. *Infectious agents and cancer* 10, 1.
- Bostrom, B., Wolf, C., Greene, C., Peterson, D.S., 2008. Sequence conservation in the rRNA first internal transcribed spacer region of Babesia gibsoni genotype Asia isolates. *Vet Parasitol* 152, 152-157.
- Bourguinat, C., Keller, K., Bhan, A., Peregrine, A., Geary, T., Prichard, R., 2011. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*. *Veterinary parasitology* 181, 388-392.
- Bourque, A., Whitney, H., Conboy, G., 2005. *Angiostrongylus vasorum* infection in a coyote (*Canis latrans*) from Newfoundland and Labrador, Canada. *Journal of wildlife diseases* 41, 816-819.
- Bourque, A.C., Conboy, G., Miller, L.M., Whitney, H., 2008. Pathological findings in dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* in Newfoundland and Labrador, Canada. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 20, 11-20.
- Bowman, D.D., 2011. Introduction to the alpha-proteobacteria: Wolbachia and Bartonella, Rickettsia, Brucella, Ehrlichia, and Anaplasma. *Topics in companion animal medicine* 26, 173-177.
- Bowman, D.D., Charles, S.D., Arther, R.G., Settje, T., 2015. Laboratory Evaluation of the Efficacy of 10 % Imidacloprid + 2.5 % Moxidectin Topical Solution (Advantage(R) Multi, Advocate(R)) for the Treatment of *Dirofilaria immitis* Circulating Microfilariae in Dogs. *Parasitol Res* 114 Suppl 1, S165-174.
- Bowman, D.D., McTier, T.L., Adams, E.L., Mahabir, S.P., Login, J.A., Bidgood, T., Woods, D.J., 2017a. Evaluation of the efficacy of ProHeart((R)) 6 (moxidectin) against a resistant isolate of *Dirofilaria immitis* (JYD-34) in dogs. *Parasit Vectors* 10, 502.
- Bowman, D.D., Ohmes, C.M., Hostetler, J.A., Keil, D.J., Settje, T.L., Charles, S.D., 2017b. Efficacy of 10% imidacloprid + 2.5% moxidectin topical solution (Advantage Multi((R)) for Dogs) for the prevention of heartworm disease and infection all month long. *Parasit Vectors* 10, 478.
- Brandao, L.P., Hagiwara, M.K., Myiashiro, S.I., 2003. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. *Vet Parasitol* 114, 253-265.
- Bredal, W., Gjerde, B., Eberhard, M., Aleksandersen, M., Wilhelmsen, D., Mansfield, L., 1998. Adult *Dirofilaria repens* in a subcutaneous granuloma on the chest of a dog. *Journal of small animal practice* 39, 595-604.
- Breitschwerdt, E.B., Abrams-Ogg, A.C., Lappin, M.R., Bienzle, D., Hancock, S.I., Cowan, S.M., Clooten, J.K., Hegarty, B.C., Hawkins, E.C., 2002. Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 16, 642-649.
- Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Hancock, S.I., 1998a. Doxycycline Hyclate Treatment of Experimental Canine Ehrlichiosis Followed by Challenge Inoculation with Two *Ehrlichia canis* Strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 362-368.

- Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Hancock, S.I., 1998b. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J Clin Microbiol 36, 2645-2651.
- Brennan, S.F., McCarthy, G., McAllister, H., Bassett, H., Jones, B.R., 2004. Clinical signs, diagnosis and treatment of three dogs with angiostrongylosis in Ireland. Irish veterinary journal 57, 103.
- Brodskyn, C.I., Kamhawi, S., 2018. Biomarkers for Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Latin America. Front Cell Infect Microbiol 8, 245.
- Brouqui, P., 2002. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case, and characterization of the agent. Revue Méd Vét 153, 85-90.
- Bruckbauer, H.R., Preac-Mursic, V., Fuchs, R., Wilske, B., 1992. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 11, 224-232.
- Bsrat, A., Berhe, M., Gadissa, E., Taddele, H., Tekle, Y., Hagos, Y., Abera, A., M, G.M., Alemayhu, T., Gugsu, G., Aseffa, A., 2018. Serological investigation of visceral Leishmania infection in human and its associated risk factors in Welkait District, Western Tigray, Ethiopia. Parasite epidemiology and control 3, 13-20.
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Peter, O., Aeschlimann, A., 1983. Erythema chronicum migrans—a tickborne spirochetosis. Acta Trop 40, 79-83.
- Cady, S.M., Cheifetz, P.M., Galeska, I., 2013. Veterinary long-acting injections and implants, In: Long Acting Animal Health Drug Products. Springer, pp. 271-294.
- Caldeira, R.L., Carvalho, O.S., Mendonça, C.L., Graeff-Teixeira, C., Silva, M.C., Ben, R., Maurer, R., Lima, W.S., Lenzi, H.L., 2003. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, and *A. vasorum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98, 1039-1043.
- Camacho, A.T., Pallas, E., Gestal, J.J., Guitian, F.J., Olmeda, A.S., Goethert, H.K., Telford, S.R., 2001. Infection of dogs in north-west Spain with a Babesia microti-like agent. The Veterinary record 149, 552-555.
- Cancrini, G., Allende, E., Favia, G., Bornay, F., Anton, F., Simon, F., 2000. Canine dirofilariosis in two cities of southeastern Spain. Veterinary parasitology 92, 81-86.
- Cancrini, G., Gabrielli, S., 2007. Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections, 48-58.
- Canestri, G.T., Pampiglione, S., Rivasi, F., 1997. The species of the genus *Dirofilaria*, Railliet & Henry, 1911. Parassitologia 39, 369-374.
- Canonne, A.M., Billen, F., Losson, B., Peters, I., Schnyder, M., Clercx, C., 2018. Angiostrongylosis in dogs with negative fecal and in-clinic rapid serological tests: 7 Cases (2013-2017). Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine 32, 951-955.
- Capelli, G., Baldelli, R., Ferroglio, E., Genchi, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., Maroli, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Rossi, L., 2004. Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network. Parassitologia 46, 193-197.
- Capelli, G., Genchi, C., Baneth, G., Bourdeau, P., Brianti, E., Cardoso, L., Danesi, P., Fuehrer, H.P., Giannelli, A., Ionica, A.M., Maia, C., Modry, D., Montarsi, F., Krücken, J., Papadopoulos, E., Petric, D., Pfeffer, M., Savic, S., Otranto, D., Poppert, S., Silaghi, C., 2018. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. Parasit Vectors 11, 663.
- Cardoso, L., Cortes, H.C., Eyal, O., Reis, A., Lopes, A.P., Vila-Vicosa, M.J., Rodrigues, P.A., Baneth, G., 2014. Molecular and histopathological detection of *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. Parasit Vectors 7, 113.
- Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. Vet Parasitol 156, 199-204.
- Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H.C., Nachum-Biala, Y., Lopes, A.P., Vila-Vicosa, M.J., Simoes, M., Rodrigues, P.A., Baneth, G., 2015. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. Parasit Vectors 8, 144.
- Cardoso, L., Tuna, J., Vieira, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2010. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from the North of Portugal. Veterinary journal (London, England : 1997) 183, 232-233.
- Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L., Sykes, J.E., 2009. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine 23, 1129-1141.
- Carret, C., WALAS, F., CARCY, B., GRANDE, N., PRÉCIGOUT, É., MOUBRI, K., SCHETTERS, T.P., GORENFLOT, A., 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis

- on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46, 298-301.
- Carvalho, S.G., Siqueira, L.A., Zanini, M.S., Dos Santos Matos, A.P., Quaresma, C.H., da Silva, L.M., de Andrade, S.F., Severi, J.A., Villanova, J.C.O., 2018. Physicochemical and in vitro biological evaluations of furazolidone-based beta-cyclodextrin complexes in *Leishmania amazonensis*. *Res Vet Sci* 119, 143-153.
- Ceron, J.J., Pardo-Marin, L., Caldin, M., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., Tecles, F., Bernal, L., Baneth, G., Martinez-Subiela, S., 2018. Use of acute phase proteins for the clinical assessment and management of canine leishmaniasis: general recommendations. *BMC veterinary research* 14, 196.
- Chamaillé, L., Tran, A., Meunier, A., Bourdoiseau, G., Ready, P., Dedet, J.-P., 2010. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasites & vectors* 3, 31.
- Chan, C.C., Kermanshahi, M.S., Mathew, B., England, R.J., 2013. A rare case of *Dirofilaria repens* infection. *J Laryngol Otol* 127, 607-609.
- Chandrashekar, R., Beall, M.J., Saucier, J., O'Connor, T., McCall, J.W., McCall, S.D., 2014. Experimental *Dirofilaria immitis* infection in dogs: effects of doxycycline and Advantage Multi(R) administration on immature adult parasites. *Vet Parasitol* 206, 93-98.
- Chandrashekar, R., Beall, M.J., Thatcher, B., Saucier, J.M., Tyrrell, P., Lappin, M.R., 2017. Serologic responses to peptides of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in dogs infested with wild-caught *Ixodes scapularis*. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 226, 6-11.
- Chandrashekar, R., Mainville, C.A., Beall, M.J., O'Connor, T., Eberts, M.D., Alleman, A.R., Gaunt, S.D., Breitschwerdt, E.B., 2010. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for the detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. *Am J Vet Res* 71, 1443-1450.
- Chang, W.-L., SU, W.-L., PAN, M.-J., 1997. Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for *Ehrlichia platys* infection. *Journal of veterinary medical science* 59, 849-851.
- Chapman, P., Boag, A., Guitian, J., Boswood, A., 2004. *Angiostrongylus vasorum* infection in 23 dogs (1999–2002). *Journal of Small Animal Practice* 45, 435-440.
- Chauve, C.M., 1997. Importance in France of the infestation by *Dirofilaria (Noctiella) repens* in dogs. *Parassitologia* 39, 393-395.
- Chen, H.-T., 1935. Un nouveau nématode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis*, ng, n. sp. *Annales de parasitologie humaine et comparee* 13, 312-317.
- Chirek, A., 2018. Studien zu *Anaplasma phagocytophilum* beim Hund: Klinik der granulozytären Anaplasmosen und Bedeutung für die Transfusionsmedizin. Freie Universität Berlin.
- Chomel, B., 2015. Lyme disease. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 34, 569-576.
- Christian, M., 2018. Mikroskopische Beurteilung von Blutausstrichen—großer Wert, kleiner Preis. *kleintier konkret* 21, 36-38.
- Christodoulou, V., Antoniou, M., Ntais, P., Messaritakis, I., Ivovic, V., Dedet, J.-P., Pralong, F., Dvorak, V., Tselentis, Y., 2012. Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. *Vector-Borne Zoonot* 12, 214-222.
- Christophers, S.S.R., 1907. The sexual cycle of *Leucocytozoon canis* in the tick. Office of the Superintendent of Government Printing, India.
- Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A., 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary record* 141, 539-543.
- Cielecka, D., Zarnowska-Prymek, H., Masny, A., Salamatin, R., Wesolowska, M., Golab, E., 2012. Human dirofilariosis in Poland: the first cases of autochthonous infections with *Dirofilaria repens*. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* 19, 445-450.
- Clancey, N., Horney, B., Burton, S., Birkenheuer, A., McBurney, S., Tefft, K., 2010. *Babesia (Theileria) annae* in a red fox (*Vulpes vulpes*) from Prince Edward Island, Canada. *Journal of wildlife diseases* 46, 615-621.
- Coia, M.E., Hammond, G., Chan, D., Drees, R., Walker, D., Murtagh, K., Stone, J., Bexfield, N., Reeve, L., Helm, J., 2017. Retrospective evaluation of thoracic computed tomography findings in dogs naturally infected by *Angiostrongylus vasorum*. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 58, 524-534.
- Colella, V., Lia, R.P., Premont, J., Gilmore, P., Cervone, M., Latrofa, M.S., D'Anna, N., Williams, D., Otranto, D., 2016. *Angiostrongylus vasorum* in the eye: new case reports and a review of the literature. *Parasit Vectors* 9, 161.

- Conboy, G., 2004. Natural infections of *Crenosoma vulpis* and *Angiostrongylus vasorum* in dogs in Atlantic Canada and their treatment with milbemycin oxime. *The Veterinary record* 155, 16.
- Conceição-Silva, F., Abranches, P., Silva-Pereira, M., Janz, J., 1988. Hepatozoonosis in foxes from Portugal. *Journal of wildlife diseases* 24, 344-347.
- Courtenay, O., Quinnell, R., Garcez, L., Dye, C., 2002. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology* 125, 407-414.
- Craig, T., 1990. Hepatozoonosis. *Clinical microbiology and infectious diseases of the dogs and cats*, 778-785.
- Craig, T., Smallwood, J., Knauer, K., McGrath, J., 1978. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical, radiographic, and hematologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173, 967-972.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Cunha-Filho, N., Ruas, J., Farias, N., Rey-Valeiron, C., Pingret, J., Etievant, M., Barba-Carretero, J., 2007a. Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp. *Veterinary parasitology* 150, 352-356.
- Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, F., Reus-Garcia, E., Roldan-Soriano, M., Diaz-Sanchez, M., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Veterinary parasitology* 92, 245-251.
- Criado-Fornelio, A., Martin-Perez, T., Verdu-Exposito, C., Reinoso-Ortiz, S.A., Perez-Serrano, J., 2018. Molecular epidemiology of parasitic protozoa and *Ehrlichia canis* in wildlife in Madrid (central Spain). *Parasitol Res* 117, 2291-2298.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2003. Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Vet Parasitol* 113, 189-201.
- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J., Jefferies, R., Irwin, P., 2007b. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary parasitology* 144, 261-269.
- Criado-Fornelio, A., Ruas, J., Casado, N., Farias, N.A.R., Soares, M., Müller, G., Brum, J.G.W., Berne, M.E.A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J., 2006. New molecular data on mammalian Hepatozoon species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *Journal of Parasitology* 92, 93-99.
- Cury, M.C., Guimaraes, M.P., Lima, W.S., Caldeira, M.C., Couto, T.R., Murta, K., Carvalho, M.G., Baptista, J.M., 2005. Biochemical serum profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Vet Parasitol* 128, 121-127.
- Czajka, C., Becker, N., Jost, H., Poppert, S., Schmidt-Chanasit, J., Kruger, A., Tannich, E., 2014. Stable transmission of *Dirofilaria repens* nematodes, northern Germany. *Emerg Infect Dis* 20, 328-331.
- Damle, A.S., Irvane Bajaj, J.A., Khaparkhantkar, M.N., Maher, G.T., Patil, R.V., 2014. Microfilaria in human subcutaneous dirofilariasis: a case report. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 8, 113-114.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Weigl, S., Tarallo, V.D., Lia, R.P., Otranto, D., 2012. *Hepatozoon canis* infection in ticks during spring and summer in Italy. *Parasitology research* 110, 695-698.
- De Arcangeli, S., Balboni, A., Serafini, F., Battilani, M., Dondi, F., 2018. *Anaplasma phagocytophilum* infection in thrombocytopenic dogs. *Vet Ital* 54, 73-78.
- de Caprariis, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Mencke, N., Stanneck, D., Breitschwerdt, E.B., Otranto, D., 2011. Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Veterinary microbiology* 149, 206-212.
- de Castro Ferreira, E., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., da Silva, E.S., Schallig, H., Gontijo, C.M.F., 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary parasitology* 146, 235-241.
- de Freitas, E., Melo, M.N., da Costa-Val, A.P., Michalick, M.S.M., 2006. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary parasitology* 137, 159-167.
- De la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F., Kocan, K.M., 2006. Molecular characterization of *Anaplasma platys* strains from dogs in Sicily, Italy. *BMC veterinary research* 2, 24.
- De Liberato, C., Grifoni, G., Lorenzetti, R., Meoli, R., Cocumelli, C., Mastromattei, A., Scholl, F., Rombola, P., Calderini, P., Bruni, G., Eleni, C., 2017. *Angiostrongylus vasorum* in wolves in Italy: prevalence and pathological findings. *Parasit Vectors* 10, 386.

- de Marco, M., Hernandez-Triana, L.M., Phipps, L.P., Hansford, K., Mitchell, E.S., Cull, B., Swainsbury, C.S., Fooks, A.R., Medlock, J.M., Johnson, N., 2017. Emergence of *Babesia canis* in southern England. *Parasit Vectors* 10, 241.
- de Miranda, R.L., de Castro, J.R., Olegário, M.M.M., Beletti, M.E., Mundim, A.V., O'dwyer, L.H., Eyal, O., Talmi-Frank, D., Cury, M.C., Baneth, G., 2011. Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. *Veterinary parasitology* 177, 392-396.
- de Oliveira Frazilio, F., de Almeida Borges, F., de Souza, A.I., Palumbo, M.I.P., do Nascimento Ramos, C.A., Freire, D.H., Galvao, A.L.B., de Freitas, M.G., Barbosa, F.B., 2018. Biomarkers and renal arterial resistive index in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasitol Res.*
- Del Prete, L., Maurelli, M.P., Pennacchio, S., Bosco, A., Musella, V., Ciuca, L., Cringoli, G., Rinaldi, L., 2015. *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum*: the contemporaneous detection in kennels. *BMC veterinary research* 11, 305.
- Delgado, S., Cármenes, P., 1995. Seroepidemiological survey for *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) in dogs from northwestern of Spain. *European journal of epidemiology* 11, 321-324.
- Demiaszkiewicz, A., Polańczyk, G., Pyziel, A., Kuligowska, I., Lachowicz, J., 2009. The first foci of dirofilariosis of dogs evoked by *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 in central Poland. *Wiadomosci parazytologiczne* 55, 367-370.
- Demiaszkiewicz, A.W., Polanczyk, G., Osinska, B., Pyziel, A.M., Kuligowska, I., Lachowicz, J., Sikorski, A., 2014. Prevalence and distribution of *Dirofilaria repens* Railliet et Henry, 1911 in dogs in Poland. *Polish journal of veterinary sciences* 17, 515-517.
- Dennler, M., Makara, M., Kranjc, A., Schnyder, M., Ossent, P., Deplazes, P., Ohlerth, S., Glaus, T.M., 2011. Thoracic computed tomography findings in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 52, 289-294.
- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012a. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, In: Georg Thieme Verlag, p. 60f.
- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012b. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, In: Georg Thieme Verlag, p. 342.
- Desjeux, P., 1996. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in dermatology* 14, 417-423.
- Dezdek, D., Vojta, L., Curkovic, S., Lipej, Z., 2010. Mihaljevi c, Z., Cvetni c, Z., Beck, R., 2010. Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. *Vet. Parasitol* 172, 333-336.
- Di Cesare, A., Traversa, D., Manzocchi, S., Meloni, S., Grillotti, E., Auriemma, E., Pampurini, F., Garofani, C., Ibba, F., Venco, L., 2015. Elusive *Angiostrongylus vasorum* infections. *Parasit Vectors* 8, 438.
- Díaz-Espiñeira, M., Slappendel, R., 1997. A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 19, 69-71.
- DiGangi, B.A., Dworkin, C., Stull, J.W., O'Quin, J., Elser, M., Marsh, A.E., Groshong, L., Wolfson, W., Duhon, B., Broaddus, K., Gingrich, E.N., Swiniarski, E., Berliner, E.A., 2017. Impact of heat treatment on *Dirofilaria immitis* antigen detection in shelter dogs. *Parasit Vectors* 10, 483.
- Diosdado, A., Gomez, P.J., Gonzalez-Miguel, J., Simon, F., Morchon, R., 2018. Current status of canine dirofilariosis in an endemic area of western Spain. *Journal of helminthology* 92, 520-523.
- Dongus, H., Zahler, M., Gothe, R., 1996. [The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae), in Germany: an epidemiologic study and control measures]. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 109, 245-248.
- Drake, J., Gruntmeir, J., Merritt, H., Allen, L., Little, S.E., 2015. False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. *Parasit Vectors* 8, 68.
- Dubey, J., Rosypal, A.C., Pierce, V., Scheinberg, S.N., Lindsay, D.S., 2005. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227, 1266-1269.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 2145-2165.

- Dumler, J.S., Choi, K.S., Garcia-Garcia, J.C., Barat, N.S., Scorpio, D.G., Garyu, J.W., Grab, D.J., Bakken, J.S., 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis* 11, 1828-1834.
- Dürbaum, M., 1999. Canine Babesiose: Übersicht über den gegenwärtigen Kenntnisstand und Hinweise auf ein endemisches Vorkommen im Raum Düren. *Tierärztliche Hochschule Hannover*,
- Duscher, G., Feiler, A., Wille-Piazzai, W., Bakonyi, T., Leschnik, M., Miterpáková, M., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Joachim, A., 2009. Detection of *Dirofilaria* in Austrian dogs. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 122, 199-203.
- Duscher, G.G., Fuehrer, H.P., Kubber-Heiss, A., 2014. Fox on the run-molecular surveillance of fox blood and tissue for the occurrence of tick-borne pathogens in Austria. *Parasit Vectors* 7, 521.
- Dyachenko, V., Geiger, C., Pantchev, N., Majzoub, M., Bell-Sakyi, L., Krupka, I., Straubinger, R.K., 2013. Isolation of canine *Anaplasma phagocytophilum* strains from clinical blood samples using the *Ixodes ricinus* cell line IRE/CTVM20. *Veterinary microbiology* 162, 980-986.
- Dyachenko, V., Pantchev, N., Balzer, H.-J., Meyersen, A., Straubinger, R.K., 2012. First case of *Anaplasma platys* infection in a dog from Croatia. *Parasites & vectors* 5, 49.
- Dziegiel, B., Adaszek, L., Carbonero, A., Lyp, P., Winiarczyk, M., Debiak, P., Winiarczyk, S., 2016. Detection of canine vector-borne diseases in eastern Poland by ELISA and PCR. *Parasitol Res* 115, 1039-1044.
- Ebani, V.V., Rocchigiani, G., Nardoni, S., Bertelloni, F., Vasta, V., Papini, R.A., Verin, R., Poli, A., Mancianti, F., 2017. Molecular detection of tick-borne pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Central Italy. *Acta Trop* 172, 197-200.
- Ebani, V.V., Verin, R., Fratini, F., Poli, A., Cerri, D., 2011. Molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from central Italy. *Journal of wildlife diseases* 47, 699-703.
- Eberts, M.D., Vissotto de Paiva Diniz, P.P., Beall, M.J., Stillman, B.A., Chandrashekar, R., Breitschwerdt, E.B., 2011. Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 47, e86-94.
- Eckert, J., Lämmler, G., 1972. Angiostrongylose bei Mensch und Tier. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 39, 303-322.
- Eddlestone, S., Neer, T., Gaunt, S., Corstvet, R., Gill, A., Hosgood, G., Hegarty, B., Breitschwerdt, E., 2006. Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of veterinary internal medicine* 20, 840-844.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32, 1792-1797.
- Egenvall, A., Bjoersdorff, A., Lilliehook, I., Olsson Engvall, E., Karlstam, E., Artursson, K., Hedhammar, A., Gunnarsson, A., 1998. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *The Veterinary record* 143, 412-417.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Gunnarsson, A., Hedhammar, Å., Shoukri, M., Bornstein, S., Artursson, K., 2000a. Sero-prevalence of granulocytic *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Swedish dogs 1991-94. *Scandinavian journal of infectious diseases* 32, 19-25.
- Egenvall, A., Hedhammar, Å.A., Bjöersdorff, A., 1997. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *The Veterinary record* 140, 222.
- Egenvall, A., Lilliehook, I., Bjoersdorff, A., Engvall, E.O., Karlstam, E., Artursson, K., Heldtander, M., Gunnarsson, A., 2000b. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *The Veterinary record* 146, 186-190.
- Elias, E., Homans, P., 1988. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and haematological findings; treatment. *Journal of Small Animal Practice* 29, 55-62.
- Engvall, E., Jonsson, K., Perlmann, P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochimica et biophysica acta* 251, 427-434.
- Engvall, E., Perlmann, P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
- Epe, C., Coati, N., Schnieder, T., 2004. [Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 111, 243-247.
- ESCCAP, 2014. Bekämpfung von Würmern (Helminthen) bei Hunden und Katzen. In: <https://www.esccap.de/fileadmin/tieraerzte/ESCCAP-empf-helminthen-2014.pdf> (abgerufen am 20.03.2019).

- Estrada-Pena, A., Venzal, J., Mangold, A., Cafrune, M., Guglielmone, A., 2005. The *Amblyomma maculatum* tick group: diagnostic characters, description of the larva of *A. parvitarsum*, 16S rDNA sequences, distribution, and hosts. *Syst Parasitol* 60, 99-112.
- Ewing, S., Panciera, R., 2003. American canine hepatozoonosis. *Clinical microbiology reviews* 16, 688-697.
- Ewing, S.A., Dawson, J.E., Panciera, R.J., Mathew, J.S., Pratt, K.W., Katavolos, P., Telford, S.R., 3rd, 1997. Dogs infected with a human granulocytotropic *Ehrlichia* spp. (Rickettsiales: Ehrlichieae). *Journal of medical entomology* 34, 710-718.
- Farkas, R., Gyurkovszky, M., Lukacs, Z., Aladics, B., Solymosi, N., 2014a. Seroprevalence of some vector-borne infections of dogs in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14, 256-260.
- Farkas, R., Solymosi, N., Takacs, N., Hornyak, A., Hornok, S., Nachum-Biala, Y., Baneth, G., 2014b. First molecular evidence of *Hepatozoon canis* infection in red foxes and golden jackals from Hungary. *Parasit Vectors* 7, 303.
- Farkas, R., Takacs, N., Hornyak, A., Nachum-Biala, Y., Hornok, S., Baneth, G., 2015. First report on *Babesia cf. microti* infection of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Hungary. *Parasit Vectors* 8, 55.
- Ferdushy, T., Hasan, M.T., 2010. *Angiostrongylus vasorum*: the 'French Heartworm'. *Parasitol Res* 107, 765-771.
- Ferdushy, T., Kapel, C.M., Webster, P., Al-Sabi, M.N., Gronvold, J., 2009. The occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in terrestrial slugs from forests and parks in the Copenhagen area, Denmark. *Journal of helminthology* 83, 379-383.
- Ferdushy, T., Kapel, C.M., Webster, P., Al-Sabi, M.N., Gronvold, J.R., 2010. The effect of temperature and host age on the infectivity and development of *Angiostrongylus vasorum* in the slug *Arion lusitanicus*. *Parasitol Res* 107, 147-151.
- Fernandes, C.B., Junior, J.T.M., de Jesus, C., da Silva Souza, B.M.P., Larangeira, D.F., Fraga, D.B.M., Veras, P.S.T., Barrouin-Melo, S.M., 2014. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine* 32, 1287-1295.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., 2006. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Veterinary parasitology* 135, 181-185.
- Ferreira, C., Afonso, A., Calado, M., Mauricio, I., Alho, A.M., Meireles, J., Madeira de Carvalho, L., Belo, S., 2017. Molecular characterization of *Dirofilaria* spp. circulating in Portugal. *Parasit Vectors* 10, 250.
- Ferrer, L., Rabanal, R., Fondevila, D., Ramos, J., Domingo, M., 1988. Skin lesions in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice* 29, 381-388.
- Ferrolho, J., Simpson, J., Hawes, P., Zwegarth, E., Bell-Sakyi, L., 2016. Growth of *Ehrlichia canis*, the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis, in vector and non-vector ixodid tick cell lines. *Ticks Tick Borne Dis* 7, 631-637.
- Fishbein, D.B., Dawson, J.E., Robinson, L.E., 1994. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Ann Intern Med* 120, 736-743.
- Fishman, Z., Gonen, L., Harrus, S., Strauss-Ayali, D., King, R., Baneth, G., 2004. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. *Vet Parasitol* 119, 21-26.
- Fok, É., 2007. The importance of dirofilariosis in carnivores and humans in Hungary, past and present. The importance of dirofilariosis in carnivores and humans in Hungary, past and present. 8, 181-188.
- Fok, E., Jacso, O., Szebeni, Z., Gyorffy, A., Sukosd, L., Lukacs, Z., Schaper, R., 2010. Elimination of *Dirofilaria* (syn. *Noctiella*) *repens* microfilariae in dogs with monthly treatments of moxidectin 2.5%/imidacloprid 10% (Advocate, Bayer) spot-on. *Parasitol Res* 106, 1141-1149.
- Foldvari, G., Hell, E., Farkas, R., 2005. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. *Vet Parasitol* 127, 221-226.
- Forlano, M., Scofield, A., Elisei, C., Fernandes, K., Ewing, S., Massard, C., 2005. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Veterinary parasitology* 134, 1-7.
- Fortin, J.F., Slocombe, J.O.D., 1981. Temperature Requirements for the Development of *Dirofilaria-Immitis* in *Aedes-Triseriatus* and *Ae Vexans*. *Mosq News* 41, 625-633.
- Fourie, J.J., Luus, H.G., Stanneck, D., Jongejan, F., 2013a. The efficacy of Advantix (R) to prevent transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Parasite* (Paris, France) 20.
- Fourie, J.J., Ollagnier, C., Beugnet, F., Luus, H.G., Jongejan, F., 2013b. Prevention of transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs treated with a combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene (CERTIFECT (R)). *Veterinary Parasitology* 193, 223-228.

- Fourie, J.J., Stanneck, D., Luus, H.G., Beugnet, F., Wijnveld, M., Jongejan, F., 2013c. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Veterinary Parasitology* 197, 595-603.
- Fraga, D.B., Pacheco, L.V., Borja, L.S., Tuy, P.G., Bastos, L.A., Solca Mda, S., Amorim, L.D., Veras, P.S., 2016. The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. *PLoS neglected tropical diseases* 10.
- Fuehrer, H.P., Auer, H., Leschnik, M., Silbermayr, K., Duscher, G., Joachim, A., 2016. *Dirofilaria* in Humans, Dogs, and Vectors in Austria (1978-2014)-From Imported Pathogens to the Endemicity of *Dirofilaria repens*. *PLoS neglected tropical diseases* 10.
- Gabrielli, S., Kumlien, S., Calderini, P., Brozzi, A., Iori, A., Cancrini, G., 2010. The first report of *Hepatozoon canis* identified in *Vulpes vulpes* and ticks from Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10, 855-859.
- Garnham, P.C., 1971. The genus *Leishmania*. *Bull World Health Organ* 44, 477-489.
- Gärtner, S., Just, F.T., Pankraz, A., 2008. *Hepatozoon canis* infections in two dogs from Germany. *Kleintierpraxis* 53, 81.
- Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R., Breitschwerdt, E., 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites & vectors* 3, 33.
- Gavazza, A., Bizzeti, M., Papini, R., 2003. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Revue de médecine vétérinaire* 154, 565-571.
- Gavrilovic, P., Marinkovic, D., Todorovic, I., Gavrilovic, A., 2017. First report of pneumonia caused by *Angiostrongylus vasorum* in a golden jackal. *Acta Parasitol* 62, 880-884.
- Geisweid, K., Weber, K., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., 2013. Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 198, 187-192.
- Genchi, C., Genchi, M., Petry, G., Kruehwagen, E.M., Schaper, R., 2013. Evaluation of the Efficacy of Imidacloprid 10 %/Moxidectin 2.5 % (Advocate(A (R)), Advantage(A (R)) Multi, Bayer) for the Prevention of *Dirofilaria repens* Infection in Dogs. *Parasitology Research* 112, 81-89.
- Genchi, C., Kramer, L.H., Rivasi, F., 2011. *Dirofilarial* Infections in Europe. *Vector-Borne Zoonot* 11, 1307-1317.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M., Cringoli, G., 2005. Is heartworm disease really spreading in Europe? *Veterinary parasitology* 133, 137-148.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G., 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary parasitology* 163, 286-292.
- Genchi, M., Pengo, G., Genchi, C., 2010. Efficacy of moxidectin microsphere sustained release formulation for the prevention of subcutaneous filarial (*Dirofilaria repens*) infection in dogs. *Veterinary parasitology* 170, 167-169.
- Gern, L., Lebet, N., Moret, J., 1996. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* infection in nymphal *Ixodes ricinus* ticks during feeding. *Exp Appl Acarol* 20, 649-658.
- Gern, L., Toutoungi, L.N., Hu, C.M., Aeschlimann, A., 1991. *Ixodes* (Phlebotomus) hexagonus, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med Vet Entomol* 5, 431-435.
- Gevrey, J., 1993. Hepatozoonose canine. *Recueil de Medecine Veterinaire* 169, 6.
- Giannelli, A., Lia, R.P., Annoscia, G., Buonavoglia, C., Lorusso, E., Dantas-Torres, F., Baneth, G., Otranto, D., 2017. *Rhipicephalus turanicus*, a new vector of *Hepatozoon canis*. *Parasitology* 144, 730-737.
- Giannelli, A., Ramos, R.A., Traversa, D., Brianti, E., Annoscia, G., Bastelli, F., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2013a. Treatment of *Dirofilaria repens* microfilariaemia with a combination of doxycycline hyclate and ivermectin. *Vet Parasitol* 197, 702-704.
- Giannelli, A., Ramos, R.A.N., Dantas-Torres, F., Mencke, N., Baneth, G., Otranto, D., 2013b. Experimental evidence against transmission of *Hepatozoon canis* by *Ixodes ricinus*. *Ticks and tick-borne diseases* 4, 391-394.
- Giannuzzi, A., Ricciardi, M., De Simone, A., Gernone, F., 2017. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *Journal of Small Animal Practice* 58, 125-138.
- Gillis-Germitsch, N., Kapel, C.M.O., Thamsborg, S.M., Deplazes, P., Schnyder, M., 2017. Host-specific serological response to *Angiostrongylus vasorum* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*): implications for parasite epidemiology. *Parasitology* 144, 1144-1153.
- Gillis-Germitsch, N., Schnyder, M., 2017. Impact of heat treatment on antigen detection in sera of *Angiostrongylus vasorum* infected dogs. *Parasit Vectors* 10, 421.
- Glaus, T., Sigrist, N., Hofer-Inteeworn, N., Kuemmerle-Fraune, C., Mueller, C., Geisweid, K., Beckmann, K., Wenger, M., Novo Matos, J., 2016. Unexplained bleeding as primary clinical

- complaint in dogs infected with *Angiostrongylus vasorum*. Schweiz Arch Tierheilkd 158, 701-709.
- Gómez-Ochoa, P., Sabate, D., Homedes, J., Ferrer, L., 2012. Use of the nitroblue tetrazolium reduction test for the evaluation of Domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs. Veterinary immunology and immunopathology 146, 97-99.
- Gonen, L., Strauss-Ayali, D., Shkap, V., Vincent-Johnson, N., Macintire, D., Baneth, G., 2004. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. Veterinary parasitology 122, 131-139.
- Goossens, H., Van Den Bogaard, A., Nohlmans, M., 2001. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands. Journal of clinical microbiology 39, 844-848.
- Gothe, R., 1998. [Ehrlichia canis infections of dogs in Germany. Epidemiology, diagnosis, therapy and prophylaxis]. Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere 26, 396-401.
- Gothe, R., Nolte, I., Kraft, W., 1997. [Leishmaniasis in dogs in Germany: epidemiological case analysis and alternatives to conventional causal therapy]. Tierärztl Prax 25, 68-73.
- Gothe, R., Wegerdt, S., 1991. [Babesiosis of dogs in Germany: epidemiologic case analysis]. Tierärztl Prax 19, 170-173.
- Göttfert, M., Hanig, D.B.S., Fenske, A., Friebe, S. 2009. Untersuchungen zum Vorkommen, Verbreitung von Zecken (Ixoidae) bei Wild (Rehen) und Jagdhunden in Sachsen (Biodiversität) und Bestimmung der Infektion mit Krankheitserregern (Borrelien) über Mikroskopie und PCR (TU Dresden).
- Gradoni, L., Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Piantedosi, D., De Luna, R., Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., Oliva, G., 2005. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. Vaccine 23, 5245-5251.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. International journal for parasitology 35, 1169-1180.
- Grandi, G., Lind, E.O., Schaper, R., Agren, E., Schnyder, M., 2017. Canine angiostrongylosis in Sweden: a nationwide seroepidemiological survey by enzyme-linked immunosorbent assays and a summary of five-year diagnostic activity (2011-2015). Acta Vet Scand 59, 85.
- Grandi, G., Quintavalla, C., Mavropoulou, A., Genchi, M., Gnudi, G., Bertoni, G., Kramer, L., 2011. A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) (vol 169, pg 347, 2010). Veterinary Parasitology 177, 196-196.
- Granick, J.L., Armstrong, P.J., Bender, J.B., 2009. *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). Journal of the American Veterinary Medical Association 234, 1559-1565.
- Gratz, N.G., 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol 18, 215-227.
- Grauer, G.F., Burgess, E.C., Cooley, A.J., Hagee, J.H., 1988. Renal Lesions Associated with *Borrelia-Burgdorferi* Infection in a Dog. Journal of the American Veterinary Medical Association 193, 237-239.
- Gray, J.S., Dautel, H., Estrada-Pena, A., Kahl, O., Lindgren, E., 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases 2009, 593232.
- Greene, C.E., 2013. Infectious diseases of the dog and cat, In: Elsevier Health Sciences, pp. 750-757.
- Greig, B., Armstrong, P., 2006. Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* infection). Infectious diseases of the dog and cat 3, 219-224.
- Groves, M., Dennis, G., Amyx, H., Huxsoll, D., 1975. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). American Journal of Veterinary Research 36, 937-940.
- Guardone, L., Schnyder, M., Macchioni, F., Deplazes, P., Magi, M., 2013. Serological detection of circulating *Angiostrongylus vasorum* antigen and specific antibodies in dogs from central and northern Italy. Vet Parasitol 192, 192-198.
- Guarga, J., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M., Peribanez, M., Alvar, J., Castillo, J., 2000. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. Research in Veterinary Science 69, 249-253.
- Guilhon, J., 1960. [Role of the Limacidae in the evolutive cycle of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866)]. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences 251, 2252-2253.
- Guilhon, J., Cens, B., 1969. [Migrations and evolution of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in dogs]. Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles 269, 2377-2380.

- Guilhon, J., Cens, B., 1973. [*Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). Biological and morphological study]. *Annales de parasitologie humaine et comparee* 48, 567-596.
- Haerberlein, S., Fischer, D., Thomas, S.M., Schleicher, U., Beierkuhnlein, C., Bogdan, C., 2013. First assessment for the presence of phlebotomine vectors in Bavaria, Southern Germany, by combined distribution modeling and field surveys. *PLoS One* 8, e81088.
- Halos, L., Lebert, I., Abrial, D., Danlois, F., Garzik, K., Rodes, D., Schillmeier, M., Ducrot, C., Guillot, J., 2014. Questionnaire-based survey on the distribution and incidence of canine babesiosis in countries of Western Europe. *Parasite (Paris, France)* 21, 13.
- Hamel, D., Röhrig, E., Pfister, K., 2011. Canine vector-borne disease in travelled dogs in Germany—a retrospective evaluation of laboratory data from the years 2004-2008. *Vet Parasitol* 181, 31-36.
- Hamel, D., Silaghi, C., Zapadynska, S., Kudrin, A., Pfister, K., 2013. Vector-borne pathogens in ticks and EDTA-blood samples collected from client-owned dogs, Kiev, Ukraine. *Ticks Tick Borne Dis* 4, 152-155.
- Hamsikova, Z., Silaghi, C., Rudolf, I., Venclikova, K., Mahrikova, L., Slovak, M., Mendel, J., Blazejova, H., Berthova, L., Kocianova, E., Hubalek, Z., Schnittger, L., Kazimirova, M., 2016. Molecular detection and phylogenetic analysis of Hepatozoon spp. in questing Ixodes ricinus ticks and rodents from Slovakia and Czech Republic. *Parasitol Res* 115, 3897-3904.
- Hansen, K., Dietz, H.H., 1989. Serosurvey for antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Danish dogs. *Apmis* 97, 281-285.
- Harmelin, A., Dubey, J., Yakobson, B., Nyska, A., Orgad, U., 1992. Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. *Veterinary Parasitology* 43, 131-136.
- Harris, D.J., 2016. Naming no names: Comments on the taxonomy of small piroplasmids in canids. *Parasites & vectors* 9, 289.
- Harrus, S., Alleman, A.R., Bark, H., Mahan, S.M., Waner, T., 2002. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary microbiology* 86, 361-368.
- Harrus, S., Aroch, I., Lavy, E., Bark, H., 1997. Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia. *The Veterinary record* 141, 247-250.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Bark, H., 1998a. Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. *Journal of clinical microbiology* 36, 2140-2142.
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.M., Bark, H., 1998b. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol* 36, 73-76.
- Hartelt, K., Rieker, T., Oehme, R.M., Brockmann, S.O., Müller, W., Dorn, N., 2007. First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7, 163-166.
- Härtwig, V., Schulze, C., Barutzki, D., Schaper, R., Dauschies, A., Dyachenko, V., 2015. Detection of *Angiostrongylus vasorum* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) from Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* 114 Suppl 1, S185-192.
- Härtwig, V., Schulze, C., Pfeffer, M., Dauschies, A., Dyachenko, V., 2016. No evidence of *Dirofilaria repens* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* 115, 867-871.
- Härtwig, V., von Loewenich, F.D., Schulze, C., Straubinger, R.K., Dauschies, A., Dyachenko, V., 2014. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Brandenburg, Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 277-280.
- Haselbarth, K., Tenter, A.M., Brade, V., Krieger, G., Hunfeld, K.P., 2007. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol* 297, 197-204.
- Heile, C., Heydorn, A.-O., Schein, E., 2006. *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794)-distribution, biology and vector for *Babesia canis* in Germany. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 119, 330-334.
- Heile, C., Hoffmann-Köhler, P., Wiemann, A., Schein, E., 2007. Übertragungszeiten von durch Zecken übertragenen Erregern beim Hund: Borrelien, Anaplasmen/Ehrlichien und Babesien.
- Heile, C., Schein, E., 2008. Kardiovaskuläre Dirofilariose und Hepatozoonose. *veterinär spiegel* 18, 19-22.
- Hellmann, K., Heine, J., Braun, G., Paran-Dobesova, R., Svobodova, V., 2011. Evaluation of the therapeutic and preventive efficacy of 2.5% moxidectin/10% imidacloprid (Advocate®, Bayer Animal Health) in dogs naturally infected or at risk of natural infection by *Dirofilaria repens*. *Parasitology research* 109, 77-86.

- Henry, L.G., Brunson, K.J., Walden, H.S., Wenzlow, N., Beachboard, S.E., K, L.B., Long, M.T., 2018. Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. *Vet Parasitol* 254, 178-182.
- Hermosilla, C., Pantchev, N., Dyachenko, V., Gutmann, M., Bauer, C., 2006. First autochthonous case of canine ocular *Dirofilaria repens* infection in Germany. *The Veterinary record* 158, 134-135.
- Hermosilla, C., Taubert, A., Globokar Vrhovec, M., Bauer, C., Fox, M., Pantchev, N., 2009. Current data on the prevalence of *Angiostrongylus vasorum* in dogs in Denmark, Germany and the United Kingdom in 2008. In: *Proc. 1st Bayer Angiostrongylosis Forum*, p. 26.
- Herron, M.J., ERICSON, M.E., KURTTI, T.J., MUNDERLOH, U.G., 2005. The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1063, 374-382.
- Hervas, J., Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J., Mendez, A., Sierra, M., Taylor, S., Kenny, J., Mee, J., Rogers, P., O'Farrell, K., 1995. Acute fatal hepatozoonosis in a puppy: histopathological and ultrastructural study. *The Veterinary record* 137, 518-519.
- Herwaldt, B.L., Caccio, S., Gherlinzoni, F., Aspöck, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Loschenberger, K., Tura, S., Pieniazek, N.J., 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* 9, 942-948.
- Herzer, P., 2013. Lyme-Borreliose: Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik, Klinik und Therapie. Springer-Verlag.
- Hiepe, T., Aspöck, H., 2006. Allgemeine Parasitologie: mit den Grundzügen der Immunbiologie, Diagnostik und Bekämpfung, In: Georg Thieme Verlag, p. 372.
- Hildebrandt, A., Gray, J.S., Hunfeld, K.P., 2013. Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection* 41, 1057-1072.
- Hildebrandt, A., Hunfeld, K.P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H.J., Straube, E., 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 26, 595-601.
- Hirsch, M., Pantchev, N., 2008. Vorkommenshäufigkeit der Reisekrankheiten Leishmaniose, Ehrlichiose, Babesiose und Dirofilariose bei in Deutschland lebenden Hunden. *Kleintierpraxis* 53, 154-165.
- Hodzic, A., Alic, A., Fuehrer, H.P., Harl, J., Wille-Piazzai, W., Duscher, G.G., 2015. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasit Vectors* 8, 88.
- Hodzic, A., Mrowietz, N., Cezanne, R., Bruckschwaiger, P., Punz, S., Habler, V.E., Tomsik, V., Lazar, J., Duscher, G.G., Glawischnig, W., Fuehrer, H.P., 2018. Occurrence and diversity of arthropod-transmitted pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) in western Austria, and possible vertical (transplacental) transmission of *Hepatozoon canis*. *Parasitology* 145, 335-344.
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., 3rd, Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev* 13, 451-469.
- Hornbeck, P.V., 2015. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current protocols in immunology* 110, 2.1.1-23.
- Hornok, S., Tanczos, B., Fernandez de Mera, I.G., de la Fuente, J., Hofmann-Lehmann, R., Farkas, R., 2013. High prevalence of Hepatozoon-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol* 196, 189-193.
- Horowitz, H.W., Kilchevsky, E., Haber, S., Aguero-Rosenfeld, M., Kranwinkel, R., James, E.K., Wong, S.J., Chu, F., Liveris, D., Schwartz, I., 1998. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 339, 375-378.
- Hovius, K., Beijer, B., Rijpkema, S., Bleumink-Pluym, N., Houwers, D., 1998. Identification of four *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in *Ixodes ricinus* ticks collected from Dutch dogs. *Veterinary quarterly* 20, 143-145.
- Hovmark, A., Jaenson, T.G., Asbrink, E., Forsman, A., Jansson, E., 1988. First isolations of *Borrelia burgdorferi* from rodents collected in northern Europe. *Apmis* 96, 917-920.
- Huxsoll, D., Hildebrandt, P., Nims, R., Walker, J., 1970. Tropical canine pancytopenia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 157, 1627.
- Immler, R.M., 1973. Untersuchungen zur Biologie und Ökologie der Zecke *Dermacentor reticulatus* in einem endemischen Vorkommensgebiet. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 46, 2-70.
- Incáni, R.N., Caleiras, E., Martín, M., González, C., 2007. Human infection by *Angiostrongylus costaricensis* in Venezuela: first report of a confirmed case. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 49, 197-200.

- Inokuma, H., Okuda, M., Ohno, K., Shimoda, K., Onishi, T., 2002. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs. *Vet Parasitol* 106, 265-271.
- Ionica, A.M., Matei, I.A., D'Amico, G., Bel, L.V., Dumitrache, M.O., Modry, D., Mihalca, A.D., 2017. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* show circadian co-periodicity in naturally co-infected dogs. *Parasit Vectors* 10, 116.
- Ionica, A.M., Matei, I.A., D'Amico, G., Daskalaki, A.A., Jurankova, J., Ionescu, D.T., Mihalca, A.D., Modry, D., Gherman, C.M., 2016. Role of golden jackals (*Canis aureus*) as natural reservoirs of *Dirofilaria* spp. in Romania. *Parasit Vectors* 9, 240.
- Ionita, M., Mitrea, I.L., Pfister, K., Hamel, D., Buzatu, C.M., Silaghi, C., 2012. Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: a molecular approach. *Parasitol Res* 110, 1659-1664.
- Ipek, N.D.S., Ozubek, S., Aktas, M., 2018. Molecular Evidence for Transstadial Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* Under Field Conditions. *Journal of medical entomology* 55, 440-444.
- Irwin, P.J., 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors* 2, S4.
- Irwin, P.J., 2010. Canine babesiosis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 40, 1141-1156.
- Irwin, P.J., Hutchinson, G.W., 1991. Clinical and pathological findings of *Babesia* infection in dogs. *Aust Vet J* 68, 204-209.
- Ismail, N., Bloch, K.C., McBride, J.W., 2010. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinics in laboratory medicine* 30, 261-292.
- Ivanov, A., Tsachev, I., 2008. Mini-review *Hepatozoon canis* and Hepatozoonosis in the dog. *Trakia Journal of Sciences* 6, 27.
- Jacobson, L.S., Clark, I., 1994. The pathophysiology of canine babesiosis: new approaches to an old puzzle. *Journal of the South African Veterinary Association* 65, 134.
- Jacobson, R.L., 2003. *Leishmania tropica* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)-a perplexing parasite. *Folia parasitologica* 50, 241-250.
- Jahfari, S., Fonville, M., Hengeveld, P., Reusken, C., Scholte, E.J., Takken, W., Heyman, P., Medlock, J.M., Heylen, D., Kleve, J., Sprong, H., 2012. Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasit Vectors* 5, 74.
- James, S.P., 1905. On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. Office of the superintendant of government printing, India.
- Jang, H.Y., Parent, J.M., Hagen, C., Colwell, E., Rist, P.M., Murphy, N., Burton, S., Conboy, G., 2016. Paradoxical vestibular syndrome in a dog from western Newfoundland infected with French heartworm (*Angiostrongylus vasorum*). *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 57, 1251-1255.
- Jefferies, R., Morgan, E., Shaw, S., 2009. A SYBR green real-time PCR assay for the detection of the nematode *Angiostrongylus vasorum* in definitive and intermediate hosts. *Veterinary parasitology* 166, 112-118.
- Jefferies, R., Morgan, E.R., Helm, J., Robinson, M., Shaw, S.E., 2011. Improved detection of canine *Angiostrongylus vasorum* infection using real-time PCR and indirect ELISA. *Parasitol Res* 109, 1577-1583.
- Jefferies, R., Ryan, U., Jardine, J., Broughton, D., Robertson, I., Irwin, P., 2007. Blood, bull terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Australian veterinary journal* 85, 459-463.
- Jensen, J., Nolte, I., 2005. Autochthone *Babesia-canis*-Infektion bei einem Hund aus Norddeutschland. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 33, 408-412.
- Jensen, J., Simon, D., Murua Escobar, H., Soller, J.T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K., Nolte, I., 2007a. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health* 54, 94-101.
- Jensen, J., Simon, D., Schaarschmidt-Kiener, D., Müller, W., Nolte, I., 2007b. Vorkommen von *Ehrlichia canis* bei Hunden in Deutschland? *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 35, 123-128.
- Jin, H., Wei, F., Liu, Q., Qian, J., 2012. Epidemiology and control of human granulocytic anaplasmosis: a systematic review. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12, 269-274.
- Joekel, D.E., Maier, S., Huggel, K., Schaper, R., Deplazes, P., 2017. Specific Antibody Detection in Dogs with Filarial Infections. *Parasitol Res* 116, 81-90.
- Jokelainen, P., Motskula, P.F., Heikkinen, P., Ulevaino, E., Oksanen, A., Lassen, B., 2016. *Dirofilaria repens* Microfilaremia in Three Dogs in Estonia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 16, 136-138.
- Jolly, S., Poncelet, L., Lempereur, L., Caron, Y., Bayrou, C., Cassart, D., Grimm, F., Losson, B., 2015. First report of a fatal autochthonous canine *Angiostrongylus vasorum* infection in Belgium. *Parasitology international* 64, 97-99.
- Jongejan, F., Crafford, D., Erasmus, H., Fourie, J.J., Schunack, B., 2016. Comparative efficacy of oral administrated afoxolaner (NexGard) and fluralaner (Bravecto) with topically applied

- permethrin/imidacloprid (Advantix((R))) against transmission of *Ehrlichia canis* by infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs. *Parasit Vectors* 9, 348.
- Junior, C.C., Neto, R.T., Lopes, V., Belo, V., Alves, N., de Paula, T., Ribeiro, R., Silva, E., 2017. Parasitism and inflammation in ear skin and in genital tissues of symptomatic and asymptomatic male dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitology research* 116, 987-995.
- Kahl, O., Janetzki-Mittmann, C., Gray, J.S., Jonas, R., Stein, J., de Boer, R., 1998. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* for a host in relation to the duration of nymphal Ixodes ricinus feeding and the method of tick removal. *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* 287, 41-52.
- Kamenov, Y., Radev, V., Zlateva, N., 1999. On diagnosis and clinic of angiostrongylosis of cats. *Exp. Pathol. Parasitol* 2, 51-54.
- Kampen, H., Zielke, D., Werner, D., 2012. A new focus of *Aedes japonicus japonicus* (Theobald, 1901)(Diptera, Culicidae) distribution in Western Germany: rapid spread or a further introduction event? *Parasites & vectors* 5, 284.
- Karagenc, T.I., Pasa, S., Kirli, G., Hosgor, M., Bilgic, H.B., Ozon, Y.H., Atasoy, A., Eren, H., 2006. A parasitological, molecular and serological survey of Hepatozoon canis infection in dogs around the Aegean coast of Turkey. *Veterinary parasitology* 135, 113-119.
- Karayiannis, S., Ntais, P., Messaritakis, I., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., 2015. Detection of Leishmania Infantum in red foxes (Vulpes vulpes) in Central Greece. *Parasitology* 142, 1574-1578.
- Kartashev, V., Batashova, I., Kartashov, S., Ermakov, A., Mironova, A., Kuleshova, Y., Ilyasov, B., Kolodiy, I., Klyuchnikov, A., Ryabikina, E., 2011. Canine and human dirofilariosis in the Rostov region (southern Russia). *Veterinary medicine international* 2011.
- Kasbari, M., Ravel, C., Harold, N., Pesson, B., Schaffner, F., Depaquit, J., 2012. Possibility of leishmaniasis transmission in Jura, France. *Emerg Infect Dis* 18, 1030.
- Kaszak, I., Planellas, M., Dworecka-Kaszak, B., 2015. Canine leishmaniosis - an emerging disease. *Ann Parasitol* 61, 69-76.
- Katavolos, P., Armstrong, P.M., Dawson, J.E., Telford, S.R., 3rd, 1998. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 177, 1422-1425.
- Kazimoto, T.A., Amora, S.S.A., Figueiredo, F.B., Magalhaes, J.M.E., Freitas, Y.B.N., Sousa, M.L.R., Melo, A., Campos, M.P., Alves, N.D., Werneck, G.L., 2018. Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated Dog Collars on the Prevalence and Incidence of Canine Visceral Leishmaniasis. *Vector Borne Zoonotic Dis* 18, 356-363.
- Kellermeier, C., Burger, M., Werner, H., Schein, E., Kohn, B., 2007. Autochthonous leishmaniosis in two Golden Retriever dogs from Brandenburg (Germany). *Kleintierpraxis* 52, 646.
- Kelly, P.J., Xu, C., Lucas, H., Loftis, A., Abete, J., Zeoli, F., Stevens, A., Jaegersen, K., Ackerson, K., Gessner, A., 2013. Ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis and hepatozoonosis in dogs from St. Kitts, West Indies. *PLoS One* 8, e53450.
- Keysary, A., Waner, T., Rosner, M., Warner, C.K., Dawson, J.E., Zass, R., Biggie, K.L., Harrus, S., 1996. The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of Ehrlichia canis in Israel. *Vet Parasitol* 62, 331-340.
- Khechine-Martinez, R., Doucet, C., Blanchard, S., Rouland, J., Labalette, P., 2009. [Subconjunctival dirofilariosis: a case report]. *Journal francais d'ophtalmologie* 32, 350.
- Kirk, L., Limon, G., Guitian, F.J., Hermosilla, C., Fox, M.T., 2014. Angiostrongylus vasorum in Great Britain: a nationwide postal questionnaire survey of veterinary practices. *The Veterinary record* 175, 118.
- Kirtz, G., Czettel, B., Thum, D., Leidinger, E., 2007. Anaplasma phagocytophilum in einer österreichischen Hundepopulation: eine Prävalenz-Studie (2001–2006). *Kleintierpraxis* 7, 562-568.
- Knechtli, R., Jenni, L., 1989. Distribution and relative density of three sandfly (Diptera: Phlebotominae) species in southern Switzerland. *Annales de parasitologie humaine et comparee* 64, 53-63.
- Knott, J., 1939. A method for making microfilarial surveys on day blood. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 33, 191-196.
- Koch, J., Willeßen, J.L., 2009. Canine pulmonary angiostrongylosis: an update. *The Veterinary Journal* 179, 348-359.
- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., Pfister, K., 2008. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 22, 1289-1295.
- Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G., Pfister, K., 2011. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci* 91, 71-76.

- Kohn, M., Krücken, J., McKay-Demeler, J., Pachnicke, S., Krieger, K., von Samson-Himmelstjerna, G., 2019. *Dermacentor reticulatus* in Berlin/Brandenburg (Germany): Activity patterns and associated pathogens. Ticks Tick Borne Dis.
- Kontos, V., Papadopoulos, O., French, T., 1991. Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. Veterinary clinical pathology 20, 101-105.
- Koutinas, A., Koutinas, C., 2014. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. Veterinary Pathology 51, 527-538.
- Kowalski, J., Hopfenmüller, W., Fingerle, V., Malberg, H., Eisenblatter, M., Wagner, J., Miksits, K., Hahn, H., Ignatius, R., 2006. Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 12, 924-927.
- Krämer, F., Mencke, N., 2011. Der Klimawandel–Wegbereiter für die Ausbreitung vektorübertragener Erkrankungen des Hundes? Tierärztliche Praxis Kleintiere 39, 31-37.
- Krämer, F., Schaper, R., Schunack, B., Polozowski, A., Piekarska, J., Szwedko, A., Jodies, R., Kowalska, D., Schupbach, D., Pantchev, N., 2014. Serological detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* antibodies and *Dirofilaria immitis* antigen in a countrywide survey in dogs in Poland. Parasitol Res 113, 3229-3239.
- Kramer, L., Crosara, S., Gnudi, G., Genchi, M., Mangia, C., Viglietti, A., Quintavalla, C., 2018. Wolbachia, doxycycline and macrocyclic lactones: New prospects in the treatment of canine heartworm disease. Vet Parasitol 254, 95-97.
- Kramer, L., Grandi, G., Passeri, B., Gianelli, P., Genchi, M., Dzimianski, M.T., Supakordej, P., Mansour, A.M., Supakordej, N., McCall, S.D., McCall, J.W., 2011. Evaluation of lung pathology in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs treated with doxycycline or a combination of doxycycline and ivermectin before administration of melarsomine dihydrochloride. Veterinary Parasitology 176, 357-360.
- Kramer, M.H., Greer, G.J., Quiñonez, J.F., Padilla, N.R., Hernández, B., Arana, B.A., Lorenzana, R., Morera, P., Hightower, A.W., Eberhard, M.L., 1998. First reported outbreak of abdominal angiostrongyliasis. Clinical infectious diseases 26, 365-372.
- Krampitz, H., Haberkorn, A., 1988. Experimental treatment of Hepatozoon infections with the anticoccidial agent toltrazuril. Journal of Veterinary Medicine, Series B 35, 131-137.
- Krause, M., Majer, S., 2012. Lyme-Borreliose: die letzten 30 Jahre. In: Schweiz Med Forum, pp. 976-979.
- Krawczak Fda, S., Reis, I.A., Silveira, J.A., Avelar, D.M., Marcelino, A.P., Werneck, G.L., Labruna, M.B., Paz, G.F., 2015. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 48, 64-68.
- Kronefeld, M., Kampen, H., Sassnau, R., Werner, D., 2014. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. Parasit Vectors 7, 30.
- Krücken, J., Schreiber, C., Maaz, D., Kohn, M., Demeler, J., Beck, S., Schein, E., Olias, P., Richter, D., Matuschka, F.R., Pachnicke, S., Krieger, K., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., 2013. A novel high-resolution melt PCR assay discriminates *Anaplasma phagocytophilum* and "*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*". J Clin Microbiol 51, 1958-1961.
- Krücken, J., Weingart, C., Rueter, M.-T., Ramünke, S., von Samson-Himmelstjerna, G., Kohn, B., 2016. Canine Babesiose im Raum Berlin/ Brandenburg In: DVG-Tagung Parasitologie (Berlin).
- Krupka, I., Pantchev, N., Lorentzen, L., Weise, M., Straubinger, R., 2007. Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* und *Ehrlichia canis* in Deutschland. Prakt Tierarzt 13, 776-788.
- Krupka, I., Straubinger, R.K., 2010. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 40, 1103-1119.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular biology and evolution 33, 1870-1874.
- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S.M., Sewell, H.S., Brade, V., Kraiczy, P., 2002. Host association of *Borrelia burgdorferi sensu lato*-the key role of host complement. Trends in microbiology 10, 74-79.
- LaFleur, R.L., Callister, S.M., Dant, J.C., Wasmoen, T.L., Jobe, D.A., Lovrich, S.D., 2015. Vaccination with the ospA- and ospB-Negative *Borrelia burgdorferi* Strain 50772 Provides Significant Protection against Canine Lyme Disease. Clinical and vaccine immunology : CVI 22, 836-839.

- Latrofa, M.S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Genchi, M., Traversa, D., Otranto, D., 2012. A duplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of and differentiation between *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in dogs and mosquitoes. *Vet Parasitol* 185, 181-185.
- Layne-Roldan, P., Martinez-de la Puente, J., Montalvo, T., Mas, J., Munoz, J., Figuerola, J., Rodriguez-Valero, N., 2018. Two cases of subcutaneous dirofilariasis in Barcelona, Spain. *Parasitol Res.*
- Lazzerini, K., 2016. Untersuchung von Hunden mit Meningitis und Meningoenzephalitis unbekannter Genese auf Vektor-übertragene Mikroorganismen. Freie Universität Berlin,
- Lebon, W., Tielemans, E., Rehbein, S., Dumont, P., Yoon, S., Beugnet, F., Jeannin, P., Larsen, D., Halos, L., 2016. Monthly administrations of milbemycin oxime plus afoxolaner chewable tablets to prevent *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs. *Parasit Vectors* 9, 485.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zuquete, S., Gomes, J., Walder, G., Domingos, A., Antunes, S., Baneth, G., Silaghi, C., Holman, P., Zintl, A., 2017. Guidelines for the Detection of Babesia and Theileria Parasites. *Vector Borne Zoonotic Dis* 17, 51-65.
- Lempereur, L., Martinelle, L., Marechal, F., Bayrou, C., Dalemans, A.C., Schnyder, M., Losson, B., 2016. Prevalence of *Angiostrongylus vasorum* in southern Belgium, a coprological and serological survey. *Parasit Vectors* 9, 533.
- Levine, N.D., 1971. Taxonomy of the piroplasms. *Transactions of the American Microscopical Society*, 2-33.
- Levy, M., Breitschwerdt, E., Moncol, D., 1987. Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina. *American journal of veterinary research* 48, 339-341.
- Levy, S.A., Magnarelli, L.A., 1992. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200, 344-347.
- Lewis, D.J., 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History) (Entomology)* 45, 121-209.
- Li, Y., Wang, C., Allen, K.E., Little, S.E., Ahluwalia, S.K., Gao, D., Macintire, D.K., Blagburn, B.L., Kaltenboeck, B., 2008. Diagnosis of canine Hepatozoon spp. infection by quantitative PCR. *Veterinary parasitology* 157, 50-58.
- Liang, F.T., Jacobson, R.H., Straubinger, R.K., Grooters, A., Philipp, M.T., 2000. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* vlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 38, 4160-4166.
- Liang, F.T., Steere, A.C., Marques, A.R., Johnson, B.J., Miller, J.N., Philipp, M.T., 1999. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* vlsE. *J Clin Microbiol* 37, 3990-3996.
- Liberato, C., Berrilli, F., Odorizi, L., Scarcella, R., Barni, M., Amoruso, C., Scarito, A., Filippo, M.M.D., Carvelli, A., Iacoponi, F., Scaramozzino, P., 2018. Parasites in stray dogs from Italy: prevalence, risk factors and management concerns. *Acta Parasitol* 63, 27-32.
- Liebisch, A., Liebisch, G., Käsbohrer, A., 1994. Möglichkeiten zur Diagnose der Lyme-Borreliose bei Hunden. *Praktischer Tierarzt*.
- Liebisch, A., Rahman, M.S., 1976. [Prevalence of the ticks *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) and *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) and their importance as vectors of diseases in Germany (author's transl)]. *Tropenmedizin und Parasitologie* 27, 393-404.
- Liesner, J.M., Krücken, J., Schaper, R., Pachnicke, S., Kohn, B., Müller, E., Schulze, C., von Samson-Himmelstjerna, G., 2016. Vector-borne pathogens in dogs and red foxes from the federal state of Brandenburg, Germany. *Vet Parasitol* 224, 44-51.
- Lima, M.L., Soares, P.T., Ramos, C.A., Araujo, F.R., Ramos, R.A., Souza, II, Faustino, M.A., Alves, L.C., 2010. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology] 41, 381-385.
- Lima, W.G., Michalick, M.S.M., de Melo, M.N., Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., 2004. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta tropica* 92, 43-53.
- Little, S.E., 2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 40, 1121-1140.
- Littman, M., Goldstein, R., 2011. A matter of opinion: should we treat asymptomatic, nonproteinuric Lyme-seropositive dogs with antibiotics. *Clin Brief* 9, 13-16.
- Littman, M.P., 2003. Canine borreliosis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 33, 827-862.

- Littman, M.P., Gerber, B., Goldstein, R.E., Labato, M.A., Lappin, M.R., Moore, G.E., 2018. ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 32, 887-903.
- Liu, J., Schnyder, M., Willesen, J.L., Potter, A., Chandrashekar, R., 2017. Performance of the Angio Detect™ in-clinic test kit for detection of *Angiostrongylus vasorum* infection in dog samples from Europe. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 7, 45-47.
- Macintire, D., Vincent-Johnson, N., Dillon, A., Blagburn, B., Lindsay, D., Whitley, E., Banfield, C., 1997. Hepatozoonosis in dogs: 22 cases (1989-1994). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210, 916-922.
- Maede, Y., Ohsugi, T., Ohtaishi, N., 1982. Hepatozoon infection in a wild fox (*Vulpes vulpes schrencki* Kishida) in Japan. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science* 44, 137-142.
- Maggi, R.G., Mascarelli, P.E., Havenga, L.N., Naidoo, V., Breitschwerdt, E.B., 2013. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasit Vectors* 6, 103.
- Magi, M., Guardone, L., Mignone, W., Monni, G., Tozzini, G., Prati, M.C., Macchioni, F., 2016. Canine filarial infections in Liguria, north-west Italy. *Journal of helminthology* 90, 121-124.
- Magi, M., Macchioni, F., Dell'Omodarme, M., Prati, M., Calderini, P., Gabrielli, S., Iori, A., Cancrini, G., 2009. Endoparasites of red fox (*Vulpes vulpes*) in central Italy. *Journal of wildlife diseases* 45, 881-885.
- Magnarelli, L.A., Anderson, J.F., Schreier, A.B., Ficke, C.M., 1987. Clinical and serologic studies of canine borreliosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 191, 1089-1094.
- Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke, T.J., Deplazes, P., 2013. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasit Vectors* 6, 48.
- Maia, C., Almeida, B., Coimbra, M., Fernandes, M.C., Cristovao, J.M., Ramos, C., Martins, A., Martinho, F., Silva, P., Neves, N., Nunes, M., Vieira, M.L., Cardoso, L., Campino, L., 2015. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasit Vectors* 8, 138.
- Maia, J.P., Harris, D.J., Carranza, S., Gómez-Díaz, E., 2014. A comparison of multiple methods for estimating parasitemia of hemogregarine hemoparasites (Apicomplexa: Adeleorina) and its application for studying infection in natural populations. *PloS one* 9, e95010.
- Majlathova, V., Hurnikova, Z., Majlath, I., Petko, B., 2007. *Hepatozoon canis* infection in Slovakia: imported or autochthonous? *Vector Borne Zoonotic Dis* 7, 199-202.
- Malta, M.C.C., Tinoco, H.P., Xavier, M.N., Vieira, A.L.S., Costa, É.A., Santos, R.L., 2010. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Veterinary parasitology* 169, 193-197.
- Maltezos, E.S., Sivridis, E.L., Giatromanolaki, A.N., Simopoulos, C.E., 2002. Human subcutaneous dirofilariasis: a report of three cases manifesting as breast or axillary nodules. *Scott Med J* 47, 86-88.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 566-567.
- Mandal, M., Banerjee, P.S., Kumar, S., Garg, R., Ram, H., Raina, O.K., 2016. Development of recombinant BgP12 based enzyme linked immunosorbent assays for serodiagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Veterinary immunology and immunopathology* 169, 27-33.
- Manfredi, M.T., DiCerbo, A., Genchi, M., 2007. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. *Mappe parassitologiche* 8, 40-45.
- Manna, L., Gravino, A.E., Picillo, E., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2008. Leishmania DNA Quantification by Real-time PCR in Naturally Infected Dogs Treated with Miltefosine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149, 358-360.
- Manzillo, V.F., Di Muccio, T., Cappiello, S., Scalone, A., Paparcone, R., Fiorentino, E., Gizzarelli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., Oliva, G., 2013. Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naïve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *PLoS neglected tropical diseases* 7.
- Manzocchi, S., Lendner, M., Piseddu, E., Sebastiani, V., Morabito, S., Dauschies, A., Pantchev, N., 2017a. Nodular presentation of *Dirofilaria repens* infection in a cat mimicking a fibrosarcoma. *Vet Clin Pathol* 46, 158-163.
- Manzocchi, S., Venco, L., Piseddu, E., Pantchev, N., Masserdotti, C., Bonfanti, U., Albanese, F., Kramer, L.H., Bertazzolo, W., 2017b. Positive PCR alone should not be considered sufficient

- to establish *Dirofilaria repens* as the cause of subcutaneous nodular lesions in the absence of a clear cytologic picture. *Vet Clin Pathol* 46, 389-390.
- Margos, G., Vollmer, S.A., Ogden, N.H., Fish, D., 2011. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 11, 1545-1563.
- Markowicz, M., Schotta, A.M., Wijnveld, M., Stanek, G., 2016. Human granulocytic anaplasmosis acquired in Connecticut, USA, diagnosed in Vienna, Austria, 2015. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 84, 347-349.
- Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary parasitology* 145, 357-360.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 13, 256-264.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., Morillas-Márquez, F., 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerging infectious diseases* 15, 795.
- Martin, M., Ashton, G., Simpson, V., Neal, C., 1993. Angiostrongylosis in Cornwall: clinical presentations of eight cases. *Journal of Small Animal Practice* 34, 20-25.
- Martin, M., Neal, C., 1992. Distribution of angiostrongylosis in Cornwall. *Journal of Small Animal Practice* 33, 327-330.
- Masucci, M., De Majo, M., Contarino, R., Borruto, G., Vitale, F., Pennisi, M., 2003. Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Veterinary research communications* 27, 771-774.
- Mathe, A., Voros, K., Papp, L., Reiczigel, J., 2006. Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Vet Hung* 54, 367-385.
- Mathew, J., Van Den Bussche, R., Ewing, S., Malayer, J., Latha, B., Panciera, R., 2000. Phylogenetic relationships of Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. *Journal of Parasitology* 86, 366-372.
- Matijatko, V., Torti, M., Schetters, T.P., 2012. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends in parasitology* 28, 99-105.
- Matjila, P.T., Penzhorn, B.L., Bekker, C.P., Nijhof, A.M., Jongejan, F., 2004. Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. *Vet Parasitol* 122, 119-125.
- Mattin, M.J., Solano-Gallego, L., Dhollander, S., Afonso, A., Brodbelt, D.C., 2014. The frequency and distribution of canine leishmaniasis diagnosed by veterinary practitioners in Europe. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 200, 410-419.
- Matuschka, F.R., Eiffert, H., Ohlenbusch, A., Spielman, A., 1994. Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in central Europe. *J Infect Dis* 170, 122-127.
- Maurin, M., Bakken, J.S., Dumler, J.S., 2003. Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strains from various geographic areas in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47, 413-415.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Advances in parasitology* 66, 193-285.
- McCully, R., Basson, P., Bigalke, R., De, V.V., Young, E., 1975. Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 42, 117-133.
- McKenna, P., Clement, J., Van Dijck, D., Lauwerys, M., Carey, D., Van den Bogaard, T., Bigaignon, G., 1995. Canine Lyme disease in Belgium. *The Veterinary record* 136, 244-247.
- McQuiston, J.H., Childs, J.E., Chamberland, M.E., Tabor, E., 2000. Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States. *Transfusion* 40, 274-284.
- Medlock, J.M., Avenell, D., Barrass, I., Leach, S., 2006. Analysis of the potential for survival and seasonal activity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the United Kingdom. *Journal of Vector Ecology* 31, 292-304.
- Mencke, N., 2013. Future challenges for parasitology: vector control and 'One health' in Europe: the veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 195, 256-271.
- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V., Stanneck, D., 2003. Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitol Res* 90 Suppl 3, S108-111.
- Menn, B., Lorentz, S., Naucke, T.J., 2010. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors* 3, 34.

- Menozzi, A., Bertini, S., Turin, L., Serventi, P., Kramer, L., Bazzocchi, C., 2015. Doxycycline levels and anti-Wolbachia antibodies in sera from dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* and treated with a combination of ivermectin/doxycycline. *Vet Parasitol* 209, 281-284.
- Merino, F.J., Serrano, J.L., Saz, J.V., Nebreda, T., Gegundez, M., Beltran, M., 2000. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain). *European Journal of Epidemiology* 16, 97-100.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43, 5515-5519.
- Michalsky, E.M., Rocha, M.F., da Rocha, A.C.V.M., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, Á.J., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary parasitology* 147, 67-76.
- Mircean, V., Dumitrache, M.O., Gyorke, A., Pantchev, N., Jodies, R., Mihalca, A.D., Cozma, V., 2012. Seroprevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Ehrlichia canis*) in dogs from Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12, 595-604.
- Miro, G., Lopez-Velez, R., 2018. Clinical management of canine leishmaniasis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting "One Health" principles into practice. *Vet Parasitol* 254, 151-159.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R., Sainz, A., 2013. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasites & vectors* 6, 117.
- Miterpakovza, M., Hurnikova, Z., Antolova, D., Dubinsky, P., 2009. Climate changes implicated for *Dirofilaria* dissemination in Slovakia. *Wiadomosci parazytologiczne* 55, 429-431.
- Mitkova, B., Hrazdilova, K., D'Amico, G., Duscher, G.G., Suchentrunk, F., Forejtek, P., Gherman, C.M., Matei, I.A., Ionica, A.M., Daskalaki, A.A., Mihalca, A.D., Votypka, J., Hulva, P., Modry, D., 2017. Eurasian golden jackal as host of canine vector-borne protists. *Parasit Vectors* 10, 183.
- Mitkova, B., Hrazdilova, K., Steinbauer, V., D'Amico, G., Mihalca, A.D., Modry, D., 2016. Autochthonous Hepatozoon infection in hunting dogs and foxes from the Czech Republic. *Parasitol Res* 115, 4167-4171.
- Mitra, A., Mawson, A., 2017. Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. *Tropical medicine and infectious disease* 2, 36.
- Modrý, D., Beck, R., Hrazdilová, K., Baneth, G., 2017. A review of methods for detection of Hepatozoon infection in carnivores and arthropod vectors. *Vector-Borne Zoonot* 17, 66-72.
- Molina, R., Jiménez, M., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary parasitology* 190, 268-271.
- Montarsi, F., Ciocchetta, S., Devine, G., Ravagnan, S., Mutinelli, F., Frangipane di Regalbono, A., Otranto, D., Capelli, G., 2015. Development of *Dirofilaria immitis* within the mosquito *Aedes* (*Finlaya*) *koreicus*, a new invasive species for Europe. *Parasit Vectors* 8, 177.
- Montoya-Alonso, J.A., Morchon, R., Falcon-Cordon, Y., Falcon-Cordon, S., Simon, F., Carreton, E., 2017. Prevalence of heartworm in dogs and cats of Madrid, Spain. *Parasit Vectors* 10, 354.
- Montoya, A., de Quadros, L.P., Mateo, M., Hernández, L., Gálvez, R., Alcántara, G., Checa, R., Jiménez, M.Á., Chicharro, C., Cruz, I., 2016. *Leishmania infantum* infection in Bennett's Wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in a Spanish wildlife park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 47, 586-593.
- Morchon, R., Carreton, E., Grandi, G., Gonzalez-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Simon, F., Genchi, C., Kramer, L.H., 2012. Anti-Wolbachia Surface Protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12, 17-20.
- Moreno, J., Alvar, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in parasitology* 18, 399-405.
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Schreiber, P., Martin, V., McGahie, D., Gueguen, S., Cuisinier, A.-M., 2014. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. *Veterinary immunology and immunopathology* 158, 199-207.
- Morera, P., Céspedes, R., 1971. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Revista de biología tropical* 18, 173-185.
- Morgan, E.R., Shaw, S.E., Brennan, S.F., De Waal, T.D., Jones, B.R., Mulcahy, G., 2005. *Angiostrongylus vasorum*: a real heartbreaker. *Trends in parasitology* 21, 49-51.

- Moritz, A., Steuber, S., Greiner, M., 1998. Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine* 23, 279-283.
- Mozzer, L.R., Coaglio, A.L., Dracz, R.M., Ribeiro, V.M., Lima, W.S., 2015. The development of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822). *Journal of helminthology* 89, 755-759.
- Murata, T., Inoue, M., Tateyama, S., Taura, Y., Nakama, S., 1993. Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* 55, 867-868.
- Murata, T., Inoue, M., Taura, Y., Nakama, S., Abe, H., Fujisaki, K., 1995. Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* 57, 111-112.
- Murata, T., Shiramizu, K., Hara, Y., Inoue, M., Shimoda, K., Nakama, S., 1991. First case of *Hepatozoon canis* infection of a dog in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 53, 1097-1099.
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Baneth, G., Polizopoulou, Z., Fytianou, A., 2004. Mixed Ehrlichia canis, Hepatozoon canis, and presumptive *Anaplasma phagocytophilum* infection in a dog. *Veterinary clinical pathology* 33, 249-251.
- Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Billinis, C., Leontides, L.S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T., Fytianou, A., 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary microbiology* 91, 197-204.
- Najm, N.A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Herb, I., Fensterer, V., Pfister, K., Silaghi, C., 2014a. A molecular survey of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks from Thuringia, Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 386-391.
- Najm, N.A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Pfister, K., Silaghi, C., 2014b. *Hepatozoon canis* in German red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks: molecular characterization and the phylogenetic relationship to other *Hepatozoon* spp. *Parasitol Res* 113, 2679-2685.
- Naucke, T., Pesson, B., 2000. Presence of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae) in Germany. *Parasitology research* 86, 335-336.
- Naucke, T., Schmitt, C., 2004. Is leishmaniasis becoming endemic in Germany? *International Journal of Medical Microbiology* 293, 179.
- Naucke, T.J., 2008. Babesiose/Piroplasmose—ein Update. *veterinär spiegel* 18, 14-16.
- Naucke, T.J., Amelung, S., Lorentz, S., 2016. First report of transmission of canine leishmaniasis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasit Vectors* 9, 256.
- Naucke, T.J., Lorentz, S., 2012. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniasis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors* 5, 67.
- Naucke, T.J., Lorentz, S., 2013. Nicht-vektorassoziierte Übertragung der caninen Leishmaniose in Deutschland.
- Navarro, C., Reymond, N., Fourie, J., Hellmann, K., Bonneau, S., 2015. Prevention of *Babesia canis* in dogs: efficacy of a fixed combination of permethrin and fipronil (Effitix(R)) using an experimental transmission blocking model with infected *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasit Vectors* 8, 32.
- Nelson, C., McCall, J., Carithers, D., 2014. Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs, 2014. Available at [heartwormsociety.org/images/pdf/2014-AHS-Canine-Guidelines.pdf](http://heartwormsociety.org/images/pdf/2014-AHS-Canine-Guidelines.pdf).
- Nordgren, R., Craig, T., 1984. Experimental transmission of the Texas strain of *Hepatozoon canis*. *Veterinary Parasitology* 16, 207-214.
- Nuchprayoon, S., Junpee, A., Poovorawan, Y., Scott, A.L., 2005. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 73, 895-900.
- Nunes, J.B., Coura-Vital, W., Colombo, F.A., Baeta, F.J.M., Pinheiro, A.C., Roatt, B.M., Reis, L.E.S., Reis, A.B., Marques, M.J., 2018. Comparative analysis of real-time PCR assays in the detection of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 117, 3341-3346.
- O'Donoghue, P., 2017. Haemoprotozoa: making biological sense of molecular phylogenies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 6, 241-256.
- O'Dwyer, L.H., Massard, C.L., de Souza, J.C.P., 2001. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 94, 143-150.
- Obiegala, A., Pfeiffer, M., Pfister, K., Karnath, C., Silaghi, C., 2015. Molecular examinations of *Babesia microti* in rodents and rodent-attached ticks from urban and sylvatic habitats in Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 6, 445-449.
- Oliva, G., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Lubas, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A., Zini, E., 2010. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 236, 1192-1198.

- Oliva, G., Nieto, J., Manzillo, V.F., Cappiello, S., Fiorentino, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Moreno, J., Chicharro, C., Carrillo, E., 2014. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LIESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. *PLoS neglected tropical diseases* 8.
- Oliva, G., Scalone, A., Manzillo, V.F., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T., Gradoni, L., 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of clinical microbiology* 44, 1318-1322.
- Oliveira-Junior, S.D., Barcante, J.M., Barcante, T.A., Dias, S.R., Lima, W.S., 2006. Larval output of infected and re-infected dogs with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. *Vet Parasitol* 141, 101-106.
- Oliveira, V.V.G.d., Alves, L.C., Silva Junior, V.A.d., 2015. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. *Ciência Rural* 45, 1622-1628.
- Oteo, J.A., Blanco, J.R., Martinez de Artola, V., Ibarra, V., 2000. First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerg Infect Dis* 6, 430-432.
- Otranto, D., Capelli, G., Genchi, C., 2009. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasit Vectors* 2 Suppl 1, S2.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petric, D., Genchi, C., Capelli, G., 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors* 6, 16.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Cebeci, Z., Yeniad, B., Buyukbabani, N., Boral, O.B., Gustinelli, A., Mounir, T., Mutaftchiev, Y., Bain, O., 2012. Human ocular filariasis: further evidence on the zoonotic role of *Onchocerca lupi*. *Parasites & vectors* 5, 84.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M.S., Stanneck, D., Decaprarriis, D., Capelli, G., Baneth, G., 2011. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasites & vectors* 4, 55.
- Otranto, D., Paradies, P., Lia, R.P., Latrofa, M.S., Testini, G., Cantacessi, C., Mencke, N., Galli, G., Capelli, G., Stanneck, D., 2007. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol* 144, 270-278.
- Otranto, D., Paradies, P., Testini, G., Latrofa, M.S., Weigl, S., Cantacessi, C., Mencke, N., de Caprariis, D., Parisi, A., Capelli, G., Stanneck, D., 2008. Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions. *Vet Parasitol* 153, 320-328.
- Overgaauw, P., Dijk, E.v., 2009. Autochthonous case of *Dirofilaria repens* in a dog in the Netherlands. *Veterinary Record* 164.
- Owens, S.D., Oakley, D.A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T.J., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P., Giger, U., 2001. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219, 1076-1083.
- Pagliano, P., Carannante, N., Rossi, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., Faella, F.S., Gaeta, G.B., 2005. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, 229-233.
- Palatnik-de-Sousa, C.B., 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26, 1709-1724.
- Pallaske, G., 1967. [On angiostrongylosis in dogs]. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 74, 166-171.
- Pampiglione, S., Rivasi, F., 2000. Human dirofilariosis due to *Dirofilaria* (Nochtiella) *repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. *Dirofilaria*, 82.
- Pampiglione, S., Rivasi, F., Angeli, G., Boldorini, R., Incensati, R., Pastormerlo, M., Pavesi, M., Ramponi, A., 2001. Dirofilariosis due to *Dirofilaria repens* in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. *Histopathology* 38, 344-354.
- Pantchev, N., Norden, N., Lorentzen, L., Rossi, M., Rossi, U., Brand, B., Dyachenko, V., 2009a. Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitology research* 105, 63-74.
- Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M., Lorentzen, L., 2009b. Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitol Res* 105 Suppl 1, S101-114.
- Parola, P., Raoult, D., 2001. [Molecular tools in the epidemiology of tick-borne bacterial diseases]. *Annales de biologie clinique* 59, 177-182.
- Perille, A.L., Matus, R.E., 1991. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 5, 195-198.

- Perry, A.W., Hertling, R., Kennedy, M.J., 1991. Angiostrongylosis with disseminated larval infection associated with signs of ocular and nervous disease in an imported dog. The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne 32, 430-431.
- Persichetti, M.F., Pennisi, M.G., Vullo, A., Masucci, M., Migliazzo, A., Solano-Gallego, L., 2018. Clinical evaluation of outdoor cats exposed to ectoparasites and associated risk for vector-borne infections in southern Italy. Parasit Vectors 11, 136.
- Persing, D.H., Rutledge, B.J., Rys, P.N., Podzorski, D.S., Mitchell, P.D., Reed, K.D., Liu, B., Fikrig, E., Malawista, S.E., 1994. Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. J Infect Dis 169, 668-672.
- Peyrefitte, C.N., Grandadam, M., Bessaud, M., Andry, P.E., Fouque, F., Caro, V., Diancourt, L., Schuffenecker, I., Pages, F., Tolou, H., Zeller, H., Depaquit, J., 2013. Diversity of *Phlebotomus perniciosus* in Provence, southeastern France: Detection of two putative new phlebotomus sequences. Vector Borne Zoonotic Dis 13, 630-636.
- Pietikäinen, R., Nordling, S., Jokiranta, S., Saari, S., Heikkinen, P., Gardiner, C., Kerttula, A.-M., Kantanen, T., Nikanorova, A., Laaksonen, S., 2017. *Dirofilaria repens* transmission in southeastern Finland. Parasites & vectors 10, 561.
- Poepl, W., Obwaller, A.G., Weiler, M., Burgmann, H., Mooseder, G., Lorentz, S., Rauchenwald, F., Aspöck, H., Walochnik, J., Naucke, T.J., 2013. Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a Central European country. Parasitol Res 112, 4231-4237.
- Poitout, F.M., Shinozaki, J.K., Stockwell, P.J., Holland, C.J., Shukla, S.K., 2005. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. J Clin Microbiol 43, 796-801.
- Pokorn, M., Zupanc, T.A., Strle, F., 2016. Pediatric Human Granulocytic Anaplasmosis is Rare in Europe. The Pediatric infectious disease journal 35, 358-359.
- Pónyai, K., Wikonkál, N., Bottlik, G., Hársing, J., Kucsera, I., Horváth, A., Kárpáti, S., 2006. *Dirofilaria repens* infection case in Hungary: a case report. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 4, 1051-1053.
- Porrozi, R., da Costa, M.V.S., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazzinelli, R.T., Campos-Neto, A., Grimaldi, G., 2007. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. Clinical and vaccine immunology 14, 544-548.
- Preyss-Jägeler, C., Muller, E., Straubinger, R.K., Hartmann, K., 2016. Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Leptospira interrogans* serovars in Bernese Mountain Dogs. Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere 44, 77-85.
- Pusterla, N., Pusterla, J.B., Braun, U., Lutz, H., 1998a. Serological, hematologic, and PCR studies of cattle in an area of Switzerland in which tick-borne fever (caused by *Ehrlichia phagocytophila*) is endemic. Clin Diagn Lab Immunol 5, 325-327.
- Pusterla, N., Pusterla, J.B., Deplazes, P., Wolfensberger, C., Müller, W., Hörauf, A., Reusch, C., Lutz, H., 1998b. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine granulocytic Ehrlichia infection in dogs in Switzerland. Journal of clinical microbiology 36, 3460-3462.
- Rajamanickam, C., Wiesenhutter, E., Zin, F.M., Hamid, J., 1985. The incidence of canine haematozoa in Peninsular Malaysia. Veterinary parasitology 17, 151-157.
- Ramsey, I., Littlewood, J., Dunn, J., Herrtage, M., 1996. Role of chronic disseminated intravascular coagulation in a case of canine angiostrongylosis. The Veterinary record 138, 360-363.
- Rar, V., Golovljova, I., 2011. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus Neoehrlichia*" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 11, 1842-1861.
- Regina-Silva, S., Feres, A.M.L.T., França-Silva, J.C., Dias, E.S., Michalsky, É.M., de Andrade, H.M., Coelho, E.A.F., Ribeiro, G.M., Fernandes, A.P., Machado-Coelho, G.L.L., 2016. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. Vaccine 34, 2233-2239.
- Reichenow, E., 1935. Übertragungsweise und Entwicklung der Piroplasmen. Zbl Bakt I Orig 135, 108-199.
- Reifinger, M., Greszl, J., 1994. Pulmonale Angiostrongylose mit systemischer Ausbreitung und zentralnervaler Manifestation bei einem Hund. Journal of Veterinary Medicine, Series B 41, 391-398.
- Reinard, T., 2010. Molekularbiologische Methoden, In: Ulmer, Stuttgart, pp. 80-83.
- Reule, M., Scheunemann, R., Heile, C., Schein, E., 2007. Die Babesiose des Hundes. Deutsches Tierärzteblatt.

- Reye, A.L., Hübschen, J.M., Sausy, A., Muller, C.P., 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microb* 76, 2923-2931.
- Ribeiro, R.R., Michalick, M.S.M., da Silva, M.E., Dos Santos, C.C.P., Frezard, F.J.G., da Silva, S.M., 2018. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed research international* 2018.
- Richter, D., Kohn, C., Matuschka, F.-R., 2013. Absence of *Borrelia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in questing adult *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasitology research* 112, 107-111.
- Richter, D., Matuschka, F.-R., 2012. "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*," *Anaplasma phagocytophilum*, and Lyme disease spirochetes in questing European vector ticks and in feeding ticks removed from people. *Journal of clinical microbiology* 50, 943-947.
- Rikihisa, Y., 1991. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 4, 286-308.
- Rioux, J., Golvan, Y., Honin, R., 1964. Mixed *Hepatozoon canis* and *Leishmania canis* infection in a dog in the Sets area, France. *Annales de parasitologie humaine et comparee* 39, 131-135.
- Rizzoli, A., Hauffe, H., Carpi, G., Vourc, H., Neteler, M., Rosa, R., 2011. Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill* 16.
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubalek, Z., Foldvari, G., Plantard, O., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Spitalska, E., Kazimirova, M., 2014. *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Frontiers in public health* 2, 251.
- Röhrig, E., Hamel, D., Pfister, K., 2011. Retrospective evaluation of laboratory data on canine vector-borne infections from the years 2004-2008. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 124, 411-418.
- Rosen, L., Ash, L., Wallace, G., 1970. Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet). *American Journal of Veterinary Research* 31, 131-143.
- Rossi, L., Pollono, F., Meneguz, P., Gribaudo, L., Balbo, T., 1996. An epidemiological study of canine filarioses in north-west Italy: what has changed in 25 years? *Veterinary research communications* 20, 308-315.
- Rosypal, A.C., Lindsay, D.S., 2005. Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. *Journal of Parasitology* 91, 1113-1115.
- Rosypal, A.C., Troy, G.C., Zajac, A.M., Frank, G., Lindsay, D.S., 2005. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology* 91, 970-972.
- Rubel, F., Brugger, K., Monazahian, M., Habedank, B., Dautel, H., Leverenz, S., Kahl, O., 2014. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasit Vectors* 7, 477.
- Rubel, F., Brugger, K., Pfeiffer, M., Chitimia-Dobler, L., Didyk, Y.M., Leverenz, S., Dautel, H., Kahl, O., 2016. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks and tick-borne diseases* 7, 224-233.
- Rubini, A., Paduan, K., Martins, T., Labruna, M., O'dwyer, L., 2009. Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology* 164, 324-327.
- Rudoler, N., Baneth, G., Eyal, O., van Straten, M., Harrus, S., 2012. Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine* 31, 226-233.
- Runge, P.D.M., von Keyserlingk, M., Berke, O., 2010. Hohe Prävalenz von Borrelien in Zecken aus den Revieren von drei niedersächsischen Landesforstämtern-ein potenzieller Borrelien-Hotspot? *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5, 371-375.
- Sabaté, D., Llinás, J., Homedes, J., Sust, M., Ferrer, L., 2014. A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive veterinary medicine* 115, 56-63.
- Sainz, A., Roura, X., Miro, G., Estrada-Pena, A., Kohn, B., Harrus, S., Solano-Gallego, L., 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors* 8, 75.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sanogo, Y., Inokuma, H., Parola, P., Brouqui, P., Davoust, B., Camicas, J., 2003. First evidence of *Anaplasma platys* in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodida) collected from dogs in Africa.
- Santos, A.S., Alexandre, N., Sousa, R., Nuncio, M.S., Bacellar, F., Dumler, J.S., 2009. Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *The Veterinary record* 164, 168-171.

- Sassnau, R., Czajka, C., Kronefeld, M., Werner, D., Genchi, C., Tannich, E., Kampen, H., 2014a. *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* DNA findings in mosquitoes in Germany: temperature data allow autochthonous extrinsic development. *Parasitol Res* 113, 3057-3061.
- Sassnau, R., Dauschies, A., Lendner, M., Genchi, C., 2014b. Climate suitability for the transmission of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in Germany. *Vet Parasitol* 205, 239-245.
- Sassnau, R., Dyachenko, V., Pantchev, N., Stockel, F., Dittmar, K., Dauschies, A., 2009. *Dirofilaria repens* infestation in a sled dog kennel in the federal state of Brandenburg (Germany). Diagnosis and therapy of canine cutaneous dirofilariosis. *Tierarztl Prax K H* 37, 95-101.
- Sassnau, R., Genchi, C., 2013. Qualitative risk assessment for the endemisation of *Dirofilaria repens* in the state of Brandenburg (Germany) based on temperature-dependent vector competence. *Parasitology research* 112, 2647-2652.
- Sassnau, R., Kohn, M., Demeler, J., Kohn, B., Müller, E., Krücken, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2013. Is *Dirofilaria repens* endemic in the Havelland district in Brandenburg, Germany? *Vector Borne Zoonotic Dis* 13, 888-891.
- Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez, A., Altet, L., 2008. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Veterinary parasitology* 158, 117-120.
- Sauerländer, R., Eckert, J., 1974. Die Achatschnecke (*Achatina fulica*) als experimenteller Zwischenwirt für *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 44, 59-72.
- Savic, S., Vidic, B., Grgic, Z., Potkonjak, A., Spasojevic, L., 2014. Emerging Vector-Borne Diseases - Incidence through Vectors. *Frontiers in public health* 2, 267.
- Schäfer, I., Volkmann, M., Müller, E., Merle, R., Kohn, B., 2018. Retrospective analysis of vector-borne diseases in dogs after travelling to endemic areas (2007-2015). In: DGP Tagung (Berlin).
- Schäfer, J.J., Kahn, J., Needham, G.R., Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Stich, R.W., 2008. Antibiotic clearance of *Ehrlichia canis* from dogs infected by intravenous inoculation of carrier blood. *Ann N Y Acad Sci* 1149, 263-269.
- Schaffner, F., Bellini, R., Petric, D., Scholte, E.J., Zeller, H., Rakotoarivony, L.M., 2013. Development of guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. *Parasit Vectors* 6, 209.
- Schaffner, F., Vazeille, M., Kaufmann, C., Failloux, A.-B., Mathis, A., 2011. Vector competence of *Aedes japonicus* for chikungunya and dengue viruses. *Journal of the European Mosquito Control Association* 29, 141-142.
- Schettlers, T.H., Kleuskens, J., Scholtes, N., Bos, H.J., 1995. Strain variation limits protective activity of vaccines based on soluble *Babesia canis* antigens. *Parasite immunology* 17, 215-218.
- Schettlers, T.P., Kleuskens, J.A., Scholtes, N.C., Gorenflot, A., Moubri, K., Vermeulen, A.N., 2001. Vaccination of dogs against heterologous *Babesia canis* infection using antigens from culture supernatants. *Vet Parasitol* 100, 75-86.
- Schettlers, T.P., Kleuskens, J.A., Scholtes, N.C., van de Crommert, J., Krijnen, E., Moubri, K., Gorenflot, A., Vermeulen, A.N., 2006. Onset and duration of immunity against *Babesia canis* infection in dogs vaccinated with antigens from culture supernatants. *Vet Parasitol* 138, 140-146.
- Schnyder, M., 2010. Lungenwürmer—Relevanz und Maßnahmen in der Kleintierpraxis. *kleintier konkret* 13, 8-12.
- Schnyder, M., Bilbrough, G., Hafner, C., Schaper, R., 2017. *Angiostrongylus vasorum*, "The French Heartworm": a Serological Survey in Dogs from France Introduced by a Brief Historical Review. *Parasitol Res* 116, 31-40.
- Schnyder, M., Schaper, R., Lukacs, Z., Hornok, S., Farkas, R., 2015. Combined Serological Detection of Circulating *Angiostrongylus vasorum* Antigen and Parasite-specific Antibodies in Dogs from Hungary. *Parasitol Res* 114 Suppl 1, S145-154.
- Schnyder, M., Schaper, R., Pantchev, N., Kowalska, D., Szwedko, A., Deplazes, P., 2013. Serological detection of circulating *Angiostrongylus vasorum* antigen- and parasite-specific antibodies in dogs from Poland. *Parasitol Res* 112 Suppl 1, 109-117.
- Schnyder, M., Stebler, K., Naucke, T.J., Lorentz, S., Deplazes, P., 2014. Evaluation of a rapid device for serological in-clinic diagnosis of canine angiostrongylosis. *Parasites & vectors* 7, 72.
- Schnyder, M., Tanner, I., Webster, P., Barutzki, D., Deplazes, P., 2011. An ELISA for sensitive and specific detection of circulating antigen of *Angiostrongylus vasorum* in serum samples of naturally and experimentally infected dogs. *Vet Parasitol* 179, 152-158.
- Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Maaz, D., Pachnicke, S., Krieger, K., Gross, M., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., 2014. Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany. *Parasit Vectors* 7, 535.
- Schucan, A., Schnyder, M., Tanner, I., Barutzki, D., Traversa, D., Deplazes, P., 2012. Detection of specific antibodies in dogs infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Vet Parasitol* 185, 216-224.

- Scorpio, D.G., Dumler, J.S., Barat, N.C., Cook, J.A., Barat, C.E., Stillman, B.A., DeBisceglie, K.C., Beall, M.J., Chandrashekar, R., 2011. Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 223-229.
- Segarra, S., Miró, G., Montoya, A., Pardo-Marín, L., Boqué, N., Ferrer, L., Cerón, J., 2017. Randomized, allopurinol-controlled trial of the effects of dietary nucleotides and active hexose correlated compound in the treatment of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology* 239, 50-56.
- Segovia, J., Torres, J., Miquel, J., Llana, L., Feliu, C., 2001. Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. *Journal of helminthology* 75, 183-192.
- Selbitz, H.J., Truyen, U., Valentin-Weigand, P., Alber, G., Amtsberg, G., 2015. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, In: Enke, p. 332f.
- Semenza, J.C., Menne, B., 2009. Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infect Dis* 9, 365-375.
- Shamir, M., Yakobson, B., Baneth, G., King, R., Dar-Verker, S., Markovics, A., Aroch, I., 2001. Antibodies to selected canine pathogens and infestation with intestinal helminths in golden jackals (*Canis aureus*) in Israel. *Veterinary journal (London, England: 1997)* 162, 66-72.
- Shaw, S.E., Binns, S.H., Birtles, R.J., Day, M.J., Smithson, R., Kenny, M.J., 2005. Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. *The Veterinary record* 157, 645-648.
- Shkap, V., Baneth, G., Pipano, E., 1994. Circulating antibodies to *Hepatozoon canis* demonstrated by immunofluorescence. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6, 121-123.
- Shropshire, S., Olver, C., Lappin, M., 2018. Characteristics of hemostasis during experimental *Ehrlichia canis* infection. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*.
- Siepmann, K., Wannke, B., Neumann, D., Rohrbach, J., 2005. Subcutaneous tumor of the lower eyelid: a potential manifestation of a *Dirofilaria repens* infection (SAGE Publications Sage UK: London, England).
- Sigal, L.H., Curran, A.S., 1991. Lyme disease: a multifocal worldwide epidemic. *Annual review of public health* 12, 85-109.
- Silaghi, C., Beck, R., Capelli, G., Montarsi, F., Mathis, A., 2017. Development of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in *Aedes japonicus* and *Aedes geniculatus*. *Parasit Vectors* 10, 94.
- Silaghi, C., Kohn, B., Chirek, A., Thiel, C., Nolte, I., Liebisch, G., Pfister, K., 2011. Relationship of molecular and clinical findings on *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs. *J Clin Microbiol* 49, 4413-4414.
- Silaghi, C., Woll, D., Hamel, D., Pfister, K., Mahling, M., Pfeffer, M., 2012. *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents--analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasit Vectors* 5, 191.
- Silbermayr, K., Eigner, B., Joachim, A., Duscher, G.G., Seidel, B., Allerberger, F., Indra, A., Hufnagl, P., Fuehrer, H.P., 2014. Autochthonous *Dirofilaria repens* in Austria. *Parasit Vectors* 7, 226.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., Santos, R.L., 2009. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary parasitology* 160, 55-59.
- Silva, F.L., Rodrigues, A.A., Rego, I.O., Santos, R.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., Santos, R.L., 2008. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary parasitology* 151, 86-90.
- Silva, R.C., Richini-Pereira, V.B., Kikuti, M., Marson, P.M., Langoni, H., 2017. Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. *Veterinary Quarterly* 37, 23-30.
- Simon, F., Siles-Lucas, M., Morchon, R., Gonzalez-Miguel, J., Mellado, I., Carreton, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and Animal *Dirofilariasis*: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. *Clinical Microbiology Reviews* 25, 507.
- Skotarczak, B., 2003. Canine ehrlichiosis. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* 10, 137-141.
- Skotarczak, B., Adamska, M., Rymaszewska, A., Suproń, M., Sawczuk, M., Maciejewska, A., 2004. *Anaplasma phagocytophila* and protozoans of *Babesia* genus in dogs from endemic areas of Lyme disease in north-western Poland. *Wiadomosci parazytologiczne* 50, 555-561.
- Slocombe, J., Surgeoner, G., Srivastava, B., 1989. Determination of the heartworm transmission period and its use in diagnosis and control. In: *Proceedings of the heartworm symposium*, pp. 19-26.
- Smith, T.G., 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of parasitology*, 565-585.

- Soland, J., Bolt, G., 1996. Hypovolaemic shock after anthelmintic treatment of canine angiostrongylosis. *The Journal of small animal practice* 37, 594-596.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 165, 1-18.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., Breitschwerdt, E., 2006. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Veterinary research* 37, 231-244.
- Solano-Gallego, L., Miro, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., The LeishVet, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 4, 86.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of clinical microbiology* 39, 560-563.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary parasitology* 157, 211-221.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., 2006. Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 515-518.
- Staebler, S., Ochs, H., Steffen, F., Naegeli, F., Borel, N., Sieber-Ruckstuhl, N., Deplazes, P., 2005. Autochthone Infektionen mit *Angiostrongylus vasorum* bei Hunden in der Schweiz und Deutschland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 147, 121-127.
- Stafford, K.C., 3rd, Cartter, M.L., Magnarelli, L.A., Ertel, S.H., Mshar, P.A., 1998. Temporal correlations between tick abundance and prevalence of ticks infected with *Borrelia burgdorferi* and increasing incidence of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 36, 1240-1244.
- Stanek, G., Wormser, G.P., Gray, J., Strle, F., 2012. Lyme borreliosis. *Lancet* 379, 461-473.
- Steere, A.C., Coburn, J., Glickstein, L., 2004. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest* 113, 1093-1101.
- Steinhausen, I., 2005. Untersuchung zur Verbreitung von Sandmücken (Phlebotomen) in Deutschland mit Hilfe geographischer Informationssysteme (GIS). Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Stepanjana, L., Cirule, D., Kirjusina, M., 2012. Occurrence of *Dirofilaria* spp. in dogs in Latvia (2008-2011). In: *Animals, health, food hygiene. Proceedings of Conference on "Current events in veterinary research and practice"*, Jelgava, Latvia, 22-23 November 2012, pp. 148-152.
- Stigum, V.M., Jaarsma, R.I., Sprong, H., Rolandsen, C.M., Mysterud, A., 2019. Infection prevalence and ecotypes of *Anaplasma phagocytophilum* in moose Alces alces, red deer Cervus elaphus, roe deer Capreolus capreolus and Ixodes ricinus ticks from Norway. *Parasit Vectors* 12, 1.
- Straubinger, R., Krupka, I., Pantchev, N., Lorentzen, L., Weise, M., 2008. Single and dual infections with *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in German dogs—a serological research study. In: *Proceedings of the 3rd Canine Vector-Borne Disease (CVBD) Symposium, Germany*, pp. 16-19.
- Straubinger, R., Straubinger, A., Summers, B., Jacobson, R., Erb, H., 1998. Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. *Wiener Klinische Wochenschrift* 110, 874-881.
- Straubinger, R.K., 2008. Erreger, Übertragung und Prävention—Die Lyme-Borreliose bei Hunden. *kleintier konkret* 11, 3-6.
- Straubinger, R.K., Straubinger, A.F., Summers, B.A., Jacobson, R.H., 2000. Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: an experimental study. *Journal of Infectious Diseases* 181, 1069-1081.
- Strickland, G.T., 2000. *Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases*. WB Saunders.
- Stuen, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 31.
- Suk, J.E., Ebi, K.L., Vose, D., Wint, W., Alexander, N., Mintiens, K., Semenza, J.C., 2014. Indicators for tracking European vulnerabilities to the risks of infectious disease transmission due to climate change. *International journal of environmental research and public health* 11, 2218-2235.
- Suk, J.E., Semenza, J.C., 2014. From global to local: vector-borne disease in an interconnected world. *European journal of public health* 24, 531-532.
- Sullivan, K.M., Dean, A., Soe, M.M., 2009. OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public Health Rep* 124, 471-474.

- Sum, S., Müller, W., Hartmann, K., 2005. Antikörperprävalenz gegen *Borrelia burgdorferi* in Süddeutschland. Tierärztl Prax 33, 142.
- Sundar, S., Rai, M., 2002. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clinical and diagnostic laboratory immunology 9, 951-958.
- Svobodová, Z., Svobodová, V., Genchi, C., Forejtek, P., 2006. The first report of autochthonous dirofilariosis in dogs in the Czech Republic. Helminthologia 43, 242-245.
- Symmers, W., 1960. St. C. Leishmaniasis acquired by Contagion. A Case of Marital Infection in Britain. Lancet, 127-132.
- Tabar, M.D., Altet, L., Francino, O., Sanchez, A., Ferrer, L., Roura, X., 2008. Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). Vet Parasitol 151, 332-336.
- Tabar, M.D., Francino, O., Altet, L., Sanchez, A., Ferrer, L., Roura, X., 2009. PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. The Veterinary record 164, 112-116.
- Taboada, J., 1998. Babesiosis. Infectious diseases of the dog and cat, 473-481.
- Taenzler, J., Liebenberg, J., Roepke, R.K., Heckerroth, A.R., 2015. Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs treated orally with fluralaner chewable tablets (Bravecto). Parasit Vectors 8, 305.
- Taenzler, J., Liebenberg, J., Roepke, R.K., Heckerroth, A.R., 2016. Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs after topical administration of fluralaner spot-on solution. Parasit Vectors 9, 234.
- Tafari, W.L., de Oliveira, M.R., Melo, M.N., Tafuri, W.L., 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Veterinary parasitology 96, 203-212.
- Tappe, D., Plauth, M., Bauer, T., Muntau, B., Diessel, L., Tannich, E., Herrmann-Trost, P., 2014. A case of autochthonous human *Dirofilaria* infection, Germany, March 2014. Euro Surveill 19, 2-4.
- Tarello, W., 1999. Canine dirofilariosis due to *Dirofilaria* (Noctiella) repens. Review from literature and a clinical case [dermatosis, pruritus]. Revue de Medecine Veterinaire (France).
- Taubert, A., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., Bauer, C., Hermsilla, C., 2009. Lungworm infections (*Angiostrongylus vasorum*, *Crenosoma vulpis*, *Aelurostrongylus abstrusus*) in dogs and cats in Germany and Denmark in 2003-2007. Vet Parasitol 159, 175-180.
- Tebb, A., Johnson, V., Irwin, P., 2007. *Angiostrongylus vasorum* (French heartworm) in a dog imported into Australia. Australian veterinary journal 85, 23-28.
- Telford III, S.R., Gorenflot, A., Brasseur, P., Spielman, A., 1993. Babesial infections in humans and wildlife. Parasitic protozoa 5, 1-47.
- Teske, E., van Knapen, F., Beijer, E.G., Slappendel, R.J., 2002. Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. Acta Vet Scand 43, 195-201.
- Theodorou, K., Mylonakis, M.E., Siarkou, V.I., Leontides, L., Koutinas, A.F., Koutinas, C.K., Kritsepi-Konstantinou, M., Batzias, G., Flouraki, E., Eyal, O., Kontos, V., Harrus, S., 2013. Efficacy of rifampicin in the treatment of experimental acute canine monocytic ehrlichiosis. The Journal of antimicrobial chemotherapy 68, 1619-1626.
- Thomson, K., Yaaran, T., Belshaw, A., Curson, L., Tisi, L., Maurice, S., Kiddle, G., 2018. A new TaqMan method for the reliable diagnosis of *Ehrlichia* spp. in canine whole blood. Parasit Vectors 11, 350.
- Tiskina, V., Jokelainen, P., 2017. Vector-borne parasitic infections in dogs in the Baltic and Nordic countries: A questionnaire study to veterinarians on canine babesiosis and infections with *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*. Vet Parasitol 244, 7-11.
- Toepp, A., Larson, M., Wilson, G., Grinnage-Pulley, T., Bennett, C., Leal-Lima, A., Anderson, B., Parrish, M., Anderson, M., Fowler, H., Hinman, J., Kontowicz, E., Jefferies, J., Beeman, M., Buch, J., Saucier, J., Tyrrell, P., Gharpure, R., Cotter, C., Petersen, C., 2018. Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess *Leishmania* vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniasis. Vaccine.
- Torina, A., Caracappa, S., 2006. Dog tick-borne diseases in Sicily. Parassitologia 48, 145-147.
- Torres, J., Miquel, J., Motjé, M., 2001. Helminth parasites of the Eurasian badger (*Meles meles* L.) in Spain: a biogeographic approach. Parasitology research 87, 259-263.
- Traversa, D., Aste, G., Milillo, P., Capelli, G., Pampurini, F., Tunesi, C., Santori, D., Paoletti, B., Boari, A., 2010. Autochthonous foci of canine and feline infections by *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in central Italy. Veterinary parasitology 169, 128-132.
- Trotta, M., Fogliazza, A., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., 2009. A molecular and serological study of exposure to tick-borne pathogens in sick dogs from Italy. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15 Suppl 2, 62-63.

- Trotz-Williams, L.A., Trees, A.J., 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *The Veterinary record* 152, 97-105.
- Tsakmakidis, I., Angelopoulou, K., Dovas, C.I., Dokianakis, E., Tamvakis, A., Symeonidou, I., Antoniou, M., Diakou, A., 2017. Leishmania infection in rodents in Greece. *Tropical Medicine & International Health* 22, 1523-1532.
- Tsiodras, S., Spanakis, N., Spanakos, G., Pervanidou, D., Georgakopoulou, T., Campos, E., Petra, T., Kanellopoulos, P., Georgiadis, G., Antalis, E., Kontos, V., Giannopoulos, L.A., Tselentis, Y., Papa, A., Tsakris, A., Saroglou, G., 2017. Fatal human anaplasmosis associated with macrophage activation syndrome in Greece and the Public Health response. *Journal of infection and public health* 10, 819-823.
- Tylewska-Wierzbanowska, S., Chmielewski, T., Kondrusik, M., Hermanowska-Szpakowicz, T., Sawicki, W., Sulek, K., 2001. First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *Eur J Clin Microbiol* 20, 196-198.
- Tyzzar, E.E., Walker, E.L., 1919. A Comparative Study of Leishmania Infantum of Infantile Kala Azar and Leptomonas (Herpetomonas) Ctenocephali Parasitic in the Gut of the Dog Flea. *The Journal of medical research* 40, 129-176.125.
- Uilenberg, G., 1989. [Tropical animal diseases]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 114, 800-804.
- Uilenberg, G., Verdiesen, P.A., Zwart, D., 1981. Imidocarb: a chemoprophylactic experiment with Babesia canis. *The Veterinary quarterly* 3, 118-123.
- Ulutaş, B., Bayramli, G., Karagenç, T., 2007. First case of Anaplasma (Ehrlichia) platys infection in a dog in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 31, 279-282.
- Vakalis, N.C., Himonas, C.A., 1997. Human and canine dirofilariasis in Greece. *Parassitologia* 39, 389-391.
- Varela, M.R., Arias, J.S., Velasquez, L.E., 2018. [Standardization of a multiplex real-time PCR test for the identification of Angiostrongylus cantonensis, A. costaricensis and A. vasorum]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud* 38, 111-119.
- Venco, L., 2007. Heartworm (Dirofilaria immitis) disease in dogs. In. *Dirofilaria immitis and D. repens in Dog and Cat and Human Infections*, 118-125.
- Venco, L., Manzocchi, S., Genchi, M., Kramer, L.H., 2017. Heat treatment and false-positive heartworm antigen testing in ex vivo parasites and dogs naturally infected by Dirofilaria repens and Angiostrongylus vasorum. *Parasit Vectors* 10, 476.
- Vera, C.P., Kapiainen, S., Junnikkala, S., Aaltonen, K., Spillmann, T., Vapalahti, O., 2014. Survey of selected tick-borne diseases in dogs in Finland. *Parasites & vectors* 7, 285.
- Vercammen, F., De Deken, R., Maes, L., 1996a. Prophylactic activity of imidocarb against experimental infection with Babesia canis. *Vet Parasitol* 63, 195-198.
- Vercammen, F., De Deken, R., Maes, L., 1996b. Prophylactic treatment of experimental canine babesiosis (Babesia canis) with doxycycline. *Vet Parasitol* 66, 251-255.
- Verzberger-Epshtein, I., Markham, R., Sheppard, J., Stryhn, H., Whitney, H., Conboy, G., 2008. Serologic detection of Angiostrongylus vasorum infection in dogs. *Veterinary parasitology* 151, 53-60.
- Vezzani, D., Carbajo, A.E., 2006. Spatial and temporal transmission risk of Dirofilaria immitis in Argentina. *International journal for parasitology* 36, 1463-1472.
- Viana, K.F., Lacerda, G., Teixeira, N.S., Rodrigues Cangussu, A.S., Sousa Aguiar, R.W., Giunchetti, R.C., 2018. Therapeutic vaccine of killed Leishmania amazonensis plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with Leishmania infantum. *Vet Parasitol* 254, 98-104.
- Vincent-Johnson, N.A., Macintire, D.K., Lindsay, D.S., Lenz, S.D., Baneth, G., Shkap, V., Blagburn, B.L., 1997. A new Hepatozoon species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. *The Journal of parasitology*, 1165-1172.
- Vlkova, M., Rohousova, I., Drahotova, J., Stanneck, D., Kruehdewagen, E.M., Mencke, N., Otranto, D., Volf, P., 2011. Canine antibody response to Phlebotomus perniciosus bites negatively correlates with the risk of Leishmania infantum transmission. *PLoS neglected tropical diseases* 5.
- Vogl, U.M., Presterl, E., Stanek, G., Ramharter, M., Gattringer, K.B., Graninger, W., 2010. First described case of human granulocytic anaplasmosis in a patient in Eastern Austria. *Wien Med Wochenschr* 160, 91-93.
- Vrhovec, M.G., Pantchev, N., Failing, K., Bauer, C., Travers-Martin, N., Zahner, H., 2017. Retrospective Analysis of Canine Vector-borne Diseases (CVBD) in Germany with Emphasis on the Endemicity and Risk Factors of Leishmaniosis. *Parasitol Res* 116, 131-144.
- Wagner, B., Johnson, J., Garcia-Tapia, D., Honsberger, N., King, V., Strietzel, C., Hardham, J.M., Heinz, T.J., Marconi, R.T., Meeus, P.F., 2015. Comparison of effectiveness of cefovecin,

- doxycycline, and amoxicillin for the treatment of experimentally induced early Lyme borreliosis in dogs. *BMC veterinary research* 11, 163.
- Waner, T., Baneth, G., Strenger, C., Keysary, A., King, R., Harrus, S., 1999. Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogroup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. *Veterinary parasitology* 82, 121-128.
- Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, A.W., 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Veterinary parasitology* 95, 1-15.
- Waner, T., Strenger, C., Keysary, A., 2000. Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 12, 240-244.
- Wang, Q.-P., Wu, Z.-D., Wei, J., Owen, R., Lun, Z.-R., 2012. Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. *Eur J Clin Microbiol* 31, 389-395.
- Webber, W.A., Hawking, F., 1955. Experimental maintenance of *Dirofilaria repens* and *D. immitis* in dogs. *Experimental parasitology* 4, 143-164.
- Weber, A., Heim, U., Schäfer, R., 1991. [Incidence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs in small animal practice in North Bavaria]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 104, 384-386.
- Welzl, C., Leisewitz, A.L., Jacobson, L.S., Vaughan-Scott, T., Myburgh, E., 2001. Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc* 72, 158-162.
- Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Kim, H.-Y., Zhi, N., Couto, G.C., Unver, A., Bartsch, R., 1997. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1852-1855.
- Wengenmayer, C., Williams, H., Zschiesche, E., Moritz, A., Langenstein, J., Roepke, R.K., Heckeroth, A.R., 2014. The speed of kill of fluralaner (Bravecto) against *Ixodes ricinus* ticks on dogs. *Parasit Vectors* 7, 525.
- Wenyon, C.M., 1926. Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists, vol. 2. *Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists, Vol. 2.*
- Werner, D., Kampen, H., 2013. The further spread of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera, Culicidae) towards northern Germany. *Parasitology research* 112, 3665-3668.
- Werner, D., Kronefeld, M., Schaffner, F., Kampen, H., 2012. Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Eurosurveillance* 17, 20067.
- WHO, 2017. Fact Sheet: Vector-borne diseases. In: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> (abgerufen am 20.03.2019).
- Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P., 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474-476, 478-481.
- Willesen, J.L., Kristensen, A.T., Jensen, A.L., Heine, J., Koch, J., 2007. Efficacy and safety of imidacloprid/moxidectin spot-on solution and fenbendazole in the treatment of dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Vet Parasitol* 147, 258-264.
- Williams, H.R., 2002. The Biology and Zoogeography of the Gulf Coast Tick, *Amblyomma Maculatum* Koch, the Potential Vector of *Ehrlichia Ruminantium* (Dumblor) in the United States. Texas A & M University,
- Wilske, B., 2003. Diagnosis of lyme borreliosis in europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 3, 215-227.
- Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 167, 108-122.
- Wolf, D., Failing, K., Taubert, A., Pantchev, N., 2014. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercially available tests. *Parasitol Res* 113, 1997-2002.
- Woody, B.J., Hoskins, J.D., 1991. Ehrlichial diseases of dogs. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 21, 75-98.
- Wulansari, R., Wijaya, A., Ano, H., Horii, Y., Nasu, T., Yamane, S., Makimura, S., 2003. Clindamycin in the treatment of *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 39, 558-562.
- Yancey, C.B., Diniz, P., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Wiesen, C., Qurollo, B.A., 2018. Doxycycline treatment efficacy in dogs with naturally occurring *Anaplasma phagocytophilum* infection. *The Journal of small animal practice* 59, 286-293.
- Yasur-Landau, D., Jaffe, C.L., David, L., Doron-Faigenboim, A., Baneth, G., 2018. Resistance of *Leishmania infantum* to allopurinol is associated with chromosome and gene copy number variations including decrease in the S-adenosylmethionine synthetase (METK) gene copy number. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance* 8, 403-410.

- Yeagley, T.J., Reichard, M.V., Hempstead, J.E., Allen, K.E., Parsons, L.M., White, M.A., Little, S.E., Meinkoth, J.H., 2009. Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small Babesia 'Spanish isolate' in blood samples obtained from dogs confiscated from dogfighting operations. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 235, 535-539.
- Yilmaz, E., Fritzenwanker, M., Pantchev, N., Lendner, M., Wongkamchai, S., Otranto, D., Kroidl, I., Dennebaum, M., Le, T.H., Le, T.A., 2016. The mitochondrial genomes of the zoonotic canine filarial parasites *Dirofilaria (Nochtiella) repens* and *Candidatus Dirofilaria (Nochtiella) honkongensis* provide evidence for presence of cryptic species. *PLoS neglected tropical diseases* 10.
- Zahler, M., Gothe, R., 1997. [Endemic risk of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* in Germany. An epidemiologic study]. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* 25, 666-670.
- Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., Gothe, R., 2000a. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet Parasitol* 89, 241-248.
- Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., Gothe, R., 1998. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research* 84, 544-548.
- Zahler, M., Steffenz, T., Lutz, S., Hähnel, W.-C., Rinder, H., Gothe, R., 2000b. *Babesia canis* und *Dermacentor reticulatus* in München, ein neuer Naturherd in Deutschland. *Tierärztliche Praxis* 28.
- Zeller, H., Marrama, L., Sudre, B., Van Bortel, W., Warns-Petit, E., 2013. Mosquito-borne disease surveillance by the European Centre for Disease Prevention and Control. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19, 693-698.
- Zhang, L., Liu, Y., Ni, D., Li, Q., Yu, Y., Yu, X.J., Wan, K., Li, D., Liang, G., Jiang, X., Jing, H., Run, J., Luan, M., Fu, X., Zhang, J., Yang, W., Wang, Y., Dumler, J.S., Feng, Z., Ren, J., Xu, J., 2008. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *Jama* 300, 2263-2270.
- Zhao, S., Kuang, Y., Wu, C.H., Ben-Arieh, D., Ramalho-Ortigao, M., Bi, K., 2016. Zoonotic visceral leishmaniasis transmission: modeling, backward bifurcation, and optimal control. *Journal of mathematical biology*.

## 9. Anhang

### 9.1. Fragebogen für die Hundebesitzer



**TÄ Christina Helm**

*Doktorandin*

Institut für Parasitologie und

Tropenveterinärmedizin

Freie Universität Berlin

Robert-von-Ostertag-Str. 7-13

14163 Berlin

## Fragebogen

Im Rahmen meiner Doktorarbeit am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin und führe ich eine Studie zum Vorkommen von sogenannten Reisekrankheiten bei Hunden in Berlin und Brandenburg durch. Ich würde mich sehr freuen, wenn Sie mich bei meiner Studie unterstützen würden indem Sie den folgenden Fragebogen ausfüllen.

### 1. Angaben zum Hund

**Name:**

**Alter:**

**Geschlecht:**     weiblich         männlich

**Kastriert**         ja                     nein

**Rasse:**

**Woher stammt der Hund?**

Geburtsort/-land (wenn bekannt):

eingetragener \_\_\_\_\_

Züchter:

Tierheim (Inland): \_\_\_\_\_

Tierheim (Ausland): \_\_\_\_\_

sonstiges: \_\_\_\_\_

## 2. Lebensumfeld

**In welchem Ort lebt der Hund?** (Bitte Postleitzahl angeben!)

**In welchem Wohnumfeld hält sich der Hund auf?** (Bitte kreuzen Sie alles Zutreffende an!)

- Wohnung/ Haus
- Garten/ Grundstück
- Wassernähe (Fließgewässer, See, Teich)
- anderes Umfeld:
- Wiesen/ Feld
- Wald
- in der Nähe von Tierhaltungen

## 3. Reisegewohnheiten

**Nehmen Sie Ihren Hund auf Reisen mit?**

- Ja, auf jede Reise nehme ich den Hund mit.
- teilweise mit Hund, teilweise ohne Hund.
- Nein, für den Hund gibt es keine Änderung seines gewohnten Umfeldes.

**Zu welchen Reisezielen hat Ihr Hund Sie bereits begleitet?**

- in Berlin/ \_\_\_\_\_
- Brandenburg: \_\_\_\_\_
- innerhalb \_\_\_\_\_
- Deutschlands: \_\_\_\_\_
- im EU - Ausland: \_\_\_\_\_
- im nicht EU - Ausland: \_\_\_\_\_

**Zu welcher Jahreszeit verreisen Sie mit Ihrem Hund?**

	nie	eher selten	eher häufig	sehr häufig
<b>Frühjahr</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Sommer</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Herbst</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Winter</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

**4. Einverständnis:**

Weiterhin würde ich anbieten eine Vollblutprobe Ihres Hundes kostenlos in unserem Labor auf den in der Serologie gefundenen Erreger zu untersuchen, wenn Sie mit der Entnahme einverstanden und an einer weiteren diagnostischen Abklärung interessiert sind. Die bisher durchgeführten Untersuchungen (Ausnahme Herzwurm) weisen nach, dass Ihr Hund Kontakt mit dem Erreger hatte und sich sein Immunsystem damit auseinandergesetzt hat. Die weiteren Untersuchungen zielen auf einen direkten Nachweis des Erregers ab.

---

Datum, Unterschrift

## 9.2. Phylogenetische Analyse der *Hepatozoon canis* Proben

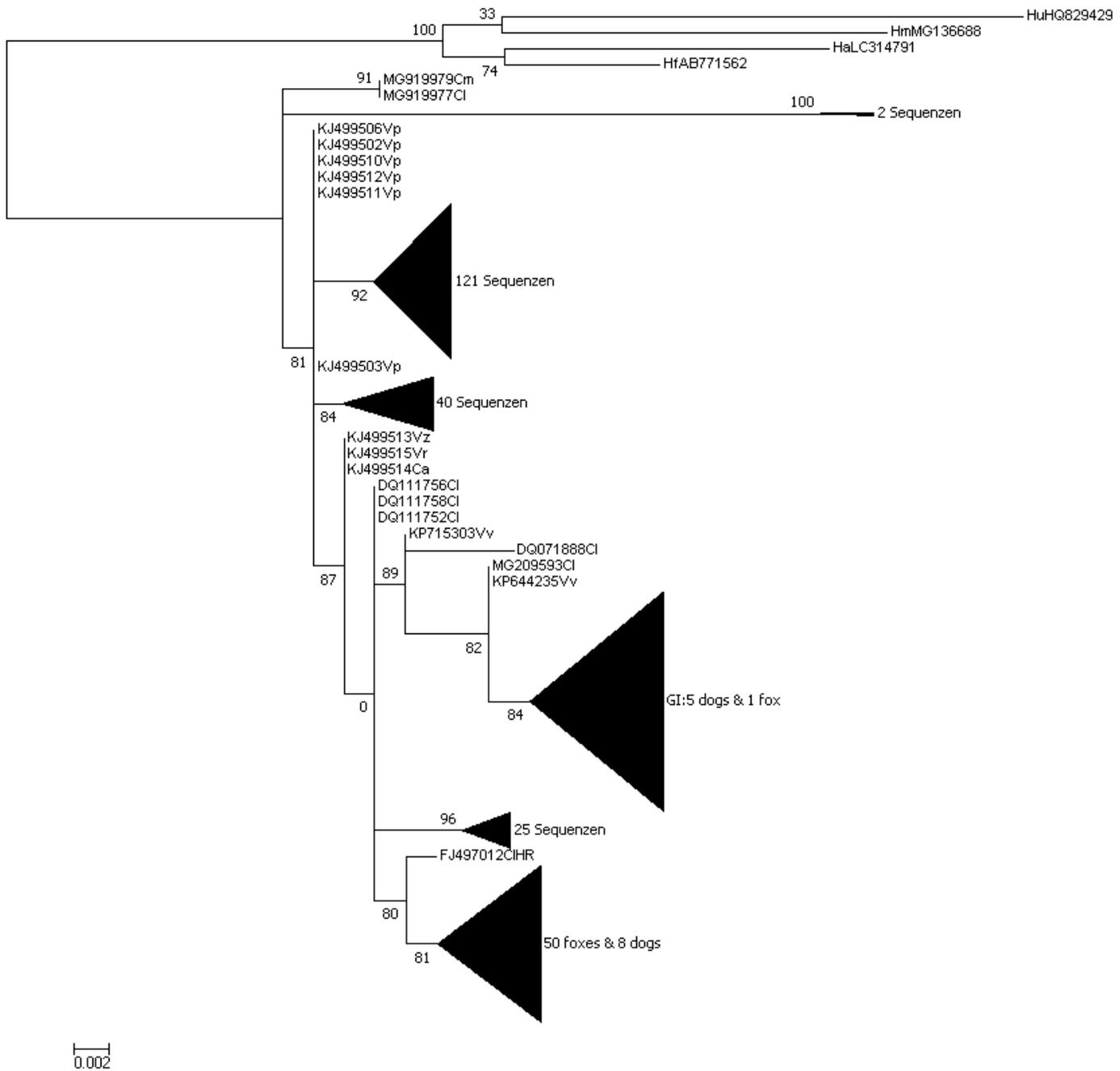


Abbildung A1: Überblick phylogenetischer Baum *Hepatozoon canis*



Abbildung A2: Gruppierung 1 des phylogenetischen Baumes *Hepatozoon canis*

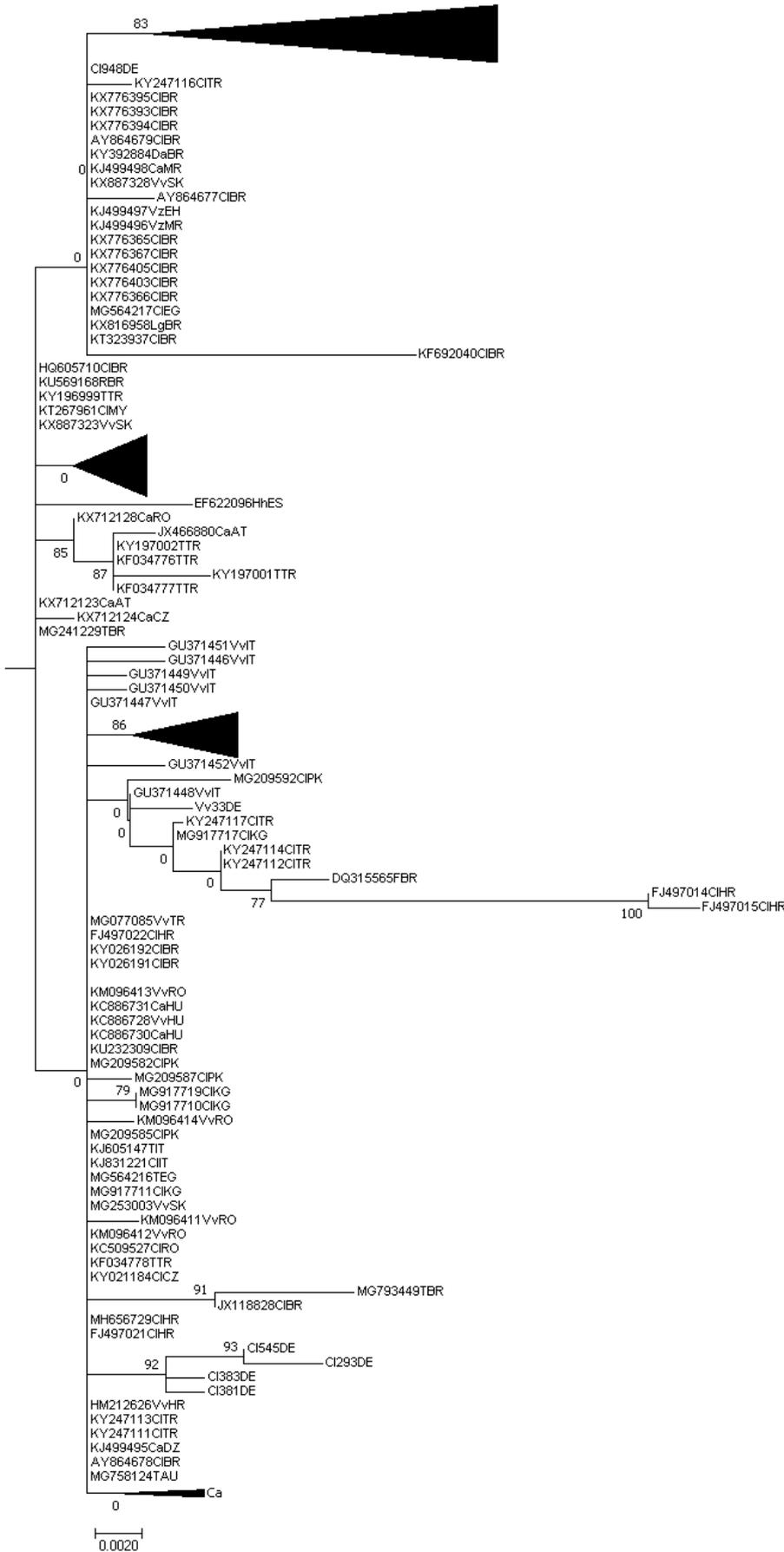


Abbildung A3: Gruppierung 2 des phylogenetischen Baumes *Hepatozoon canis*

<b>Wirt</b>	<b>Land</b>	<b>Anzahl der Sequenzen</b>	
Fuchs (Vv)	Italien (IT)	7	
	Rumänien (RO)	3	
	Slovakei (SK)	2	
	Deutschland (DE)	1	
	Türkei (TR)	1	
	Ungarn (HU)	1	
	Kroatien (HR)	1	
Hund (Cl)	Brasilien (BR)	18	
	Türkei (TR)	6	
	Kroatien (HR)	5	
	Deutschland (DE)	5	
	Kyrgyzstan (KG)	4	
	Pakistan (PK)	4	
	Italien (IT)	1	
	Rumänien (RO)	1	
	Tschechien (CZ)	1	
	Ägypten (EG)	1	
	Malaysia (MY)	1	
	Zecke (T)	Türkei (TR)	7
		Brasilien (BR)	2
Italien (IT)		1	
Ägypten (EG)		1	
Australien (AU)		1	
Goldschakal (Ca)	Ungarn (HU)	2	
	Österreich (AT)	2	
	Algerien (DZ)	1	
	Tschechien (CZ)	1	
	Rumänien (RO)	1	
	Mauritanien (MR)	1	
Fennek (Vz)	Mauritanien (MR)	1	
	West Sahara (EH)	1	
Wasserschwein (Hh)	Spanien (ES)	1	
Pampasfuchs (Lg)	Brasilien (BR)	1	
Nager (R )	Brasilien (BR)	1	
Opossum (Da)	Brasilien (BR)	1	
Katze (F)	Brasilien (BR)	1	

**Tabelle A1: Übersicht der Sequenzen aus Gruppierung 2 des phylogenetischen Baumes *Hepatozoon canis***

## Publikationen

### Conference Proceedings

Helm, C., Krücken, J., Schnyder, M., Weber, C., Müller, E., Schaper, R., Pachnicke, S., Deplazes, P., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., 2018. Niedrige Seroprävalenzen Vektor-übertragener Erkrankungen bei Hunden in Berlin/Brandenburg. In: Tagungsband zur Tagung der DVG-Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten" 02. Juli bis 04. Juli 2018 in Gießen - Veterinärparasitologie: Neue Forschungsergebnisse und aktuelle Probleme in der Praxis, Gießen. ISBN 978-3-86345-420-3, S. 6-7

### Vortrag

Helm, C., Krücken, J., Schnyder, M., Weber, C., Müller, E., Schaper, R., Pachnicke, S., Deplazes, P., Kohn, B., von Samson-Himmelstjerna, G., Niedrige Seroprävalenzen Vektor-übertragener Erkrankungen bei Hunden in Berlin/Brandenburg. Tagung der DVG-Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten" 02. Juli bis 04. Juli 2018 in Gießen - Veterinärparasitologie: Neue Forschungsergebnisse und aktuelle Probleme in der Praxis, Gießen.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. J. Krücken für seine ständige Bereitschaft und Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen und zur Lösung von Problemen, sowie für seine hilfreichen und konstruktiven Vorschläge und Korrekturen bei der Verfassung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. von Samson-Himmelstjerna für die Vergabe des Projektes, sowie sein Vertrauen in mich und seine Unterstützung während der Durchführung der Studie bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Kohn und den Mitarbeitern des Labors der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin für die Bereitstellung der Hundeserumproben, sowie die Hilfe bei der Rückverfolgung der positiven Fälle bedanken.

Bei Frau Dr. Müller und Frau Dr. Weber der Firma LABOKLIN GmbH & Co. KG möchte ich mich für die Unterstützung bei der Suche nach weiteren teilnehmenden Tierarztpraxen bedanken, sowie für das Zusenden der Serumproben. Des Weiteren möchte ich vielmals Frau Dr. Wölms danken, die sehr viel Zeit und Mühe investiert hat, den Kontakt zu den Praxen herzustellen und über die positiven Befunde zu informieren. Bedanken möchte ich mich außerdem für die großzügige Bereitschaft alle Serumproben der Studie mit dem von LABOKLIN verwendeten Leishmanien ELISA in Bad Kissingen zu untersuchen, sowie in einigen Fällen eine Leishmanien PCR durchzuführen.

Auch Herrn PD Dr. Matthes möchte ich danken, für die Bereitstellung weiterer Testkits, die Möglichkeit sein Labor für meine Untersuchungen zu nutzen und die konstruktiven Ratschläge bei der Auswertung der entstandenen Ergebnisse.

Ich danke Herrn Prof. Deplazes und Frau Prof. Schnyder aus dem Institut für Parasitologie der Universität Zürich für die Möglichkeit meine Proben mit ihren ELISA zu untersuchen, sowie Frau Jeannine Fehr und Frau Dr. Nina Gillis-Germitsch für die ausführliche Einarbeitung im Labor und die zuvorkommende Hilfe bei allen Fragen und Problemen.

Mein Dank gilt auch allen Tierarztpraxen und Hundebesitzern für ihre Teilnahme an der Studie und die stets freundliche Zusammenarbeit.

Ein großer Dank geht an alle Mitarbeiter und Doktoranden des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin für die freundliche Aufnahme und die angenehme Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Peggy Hoffmann-Köhler für die Einarbeitung im Labor und die Hilfe mit dem in house ELISA. Ein großer Dank geht außerdem an Sabrina Ramünke für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden und ihre fachliche sowie persönliche Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich bei Nele, Max, Sophia, Tanja und Irina bedanken für die motivierenden Gespräche, die erholsamen Mittagspausen und eure ständige Hilfsbereitschaft!

Ich danke der Firma Bayer Animal Health und meinen Ansprechpartnern Dr. Schaper und Dr. Pachnicke für die Finanzierung der Studie und die stets freundlichen Anmerkungen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihr grenzenloses Vertrauen, ihren Rückhalt und die stets gewährte Unterstützung in jeder Hinsicht. Meinen Großeltern, Emma und Friedrich Helm, danke ich außerdem für die Inspiration zum Veterinärmedizinstudium und meinen Eltern, Sabine und Dirk Helm, dafür, dass sie diesen und all meine anderen Träume unterstützt und geholfen haben umzusetzen. Weiterhin geht ein großer Dank an Philipp Nöske, für viele konstruktive Diskussionen, ermutigenden Zuspruch, seinen Humor und seine Art mir immer wieder ganz neue Sichtweisen zu eröffnen. Nicht zu Letzt möchte ich Stenol danken: Du machst mich jeden Tag überglücklich!

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 06.06.2019

Christina Helm











9 783863 879822

**mbv**berlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-982-2