

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

**Entwicklung eines Multiplex-Diagnostikverfahrens
zur Detektion von caninen vektorübertragenen
Krankheitserregern**

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

vorgelegt von
Anja Barnikol
Tierärztin aus Bad Frankenhausen

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4112

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

**Entwicklung eines Multiplex-Diagnostikverfahrens zur Detektion
von caninen vektorübertragenen Krankheitserregern**

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

vorgelegt von
Anja Barnikol
Tierärztin aus Bad Frankenhausen

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4112

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: PD Dr. Jürgen Krücken
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Vitaly Belik

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dogs, onchocercidae, anaplasmatocae, babesia canis, babesia vogeli, babesia gibsoni, anaplasma phagocytophilum, ehrlichia canis, candidatus mikurensis, rickettsia conorii, dirofilaria immitis, endemic species, epidemiology, diagnostic techniques, blood samples, polymerase chain reaction, greece, hungary, macedonia, bosnia-hercegowina, israel

Tag der Promotion: 05.08.2021

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: 978-3-96729-129-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2021

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 2021 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Familie

Inhalt

Abbildungsverzeichnis VI

Tabellenverzeichnis VII

Abkürzungsverzeichnis..... VIII

I Einleitung und Zielsetzung..... 1

II Literaturübersicht..... 3

1. Piroplasmida..... 3

1.1 Allgemeines..... 3

1.2 „Große“ Babesien: *Babesia canis*, *Babesia rossi*, *Babesia vogeli*..... 3

1.2.1 Morphologie und Entwicklungszyklus 3

1.2.2 Geographische Verbreitung 4

1.2.3 Vektoren und Wirte..... 5

1.2.4 Symptomatik und Diagnose 6

1.3 „Kleine“ Babesien: *Babesia gibsoni*, *Babesia-microti-like*, *Babesia conradae* 8

1.3.1 Morphologie und Entwicklungszyklus 9

1.3.2 Geographische Verbreitung 9

1.3.3 Vektoren und Wirte..... 10

1.3.4 Symptomatik und Diagnose 10

2 Rickettsiales 11

2.1 Allgemeines..... 11

2.2 *Anaplasma phagocytophilum* 12

2.2.1 Morphologie und Vermehrungszyklus..... 12

2.2.2 Geographische Verbreitung 13

2.2.3 Vektoren und Wirte..... 13

2.2.4 Symptomatik und Diagnose 15

2.3 *Ehrlichia canis* 16

2.3.1 Morphologie und Vermehrungszyklus..... 16

2.3.2 Geographische Verbreitung 17

2.3.3 Vektoren und Wirte..... 17

2.3.4 Symptomatik und Diagnose 18

2.4 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* 20

2.4.1 Morphologie und Vermehrungszyklus..... 20

2.4.2	Geographische Verbreitung	20
2.4.3	Vektoren und Wirte.....	21
2.4.4	Symptomatik und Diagnose	21
2.5	<i>Rickettsia</i> spp.	23
2.5.1	Morphologie und Vermehrungszyklus.....	23
2.5.2	Geographische Verbreitung	24
2.5.3	Vektoren und Wirte.....	24
2.5.4	Symptomatik und Diagnose	25
3	Onchocercidae.....	26
3.1	Allgemeines.....	26
3.2	<i>Dirofilaria immitis</i>	27
3.2.1	Morphologie und Entwicklungszyklus	27
3.2.2	Geographische Verbreitung	28
3.2.3	Vektoren und Wirte.....	29
3.2.4	Symptomatik und Diagnose	30
3.2	<i>Dirofilaria repens</i>	32
3.2.1	Morphologie und Entwicklungszyklus	32
3.2.2	Geographische Verbreitung	33
3.2.3	Vektoren und Wirte.....	34
3.2.4	Symptomatik und Diagnose	34
4	Diagnostikverfahren.....	35
4.1	Mikroskopie	35
4.2	Serologische Diagnostikverfahren	36
4.3	Molekularbiologische Diagnostikverfahren.....	37
4.4	Multiplex-Diagnostikverfahren.....	39
4.4.1	Die Multiplex-PCR	39
4.4.2	Der Reverse Line Blot (RLB)	39
4.4.2	Bead-basiertes Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®)	40
III	Material und Methoden.....	41
1	Material	41
1.1	Verbrauchsmaterialien	41
1.2	Reagenzien	42
1.3	Puffer und Lösungen	45

1.4	Medien und Mikroorganismen.....	49
1.5	Reaktionskits und Enzyme.....	49
1.6	Primer.....	51
1.7	Oligonukleotidsonden.....	52
1.8	Positivkontrollen.....	55
1.9	Laborgeräte.....	56
1.10	Software.....	59
2	Methoden.....	60
2.1	Probenmaterial.....	60
2.1.1	Gewinnung der Blutproben.....	60
2.1.2	Transport und Lagerung.....	62
2.1.3	Isolierung der DNA aus den Blutproben.....	62
2.1.4	Untersuchung der Blutproben.....	63
2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	63
2.2.1	Entwicklung und Durchführung der PCR.....	64
2.2.1.1	Singleplex-PCR.....	64
2.2.1.2	Duplex-PCR.....	66
2.2.1.3	Triplex-PCR.....	66
2.2.1.4	Quadruplex-PCR.....	68
2.2.1.5	Ermittlung der Nachweisgrenzen der Singleplex-, Duplex-, Triplex- und Quadruplex-PCRs.....	69
2.2.2	Gelelektrophorese.....	69
2.3	Erstellung der Plasmidpositivkontrollen.....	70
2.3.1	Gewinnung der DNA.....	71
2.3.2	Fällung und Aufreinigung von PCR-Produkten.....	72
2.3.3	Klonierung.....	73
2.3.4	Isolierung des Plasmids.....	75
2.3.5	Quantifizierung des DNA-Gehalts.....	76
2.3.6	Überprüfung der Plasmid-DNA.....	77
2.3.7	Sequenzierung.....	77
2.3.8	Verdünnung und Lagerung.....	77
2.4	Entwicklung eines Bead-basierten Multiplex-Diagnostikverfahrens (Luminex®-xMAP®-Technologie).....	78
2.4.1	Luminex®-Beads.....	79

2.4.2	Oligonukleotidsonden für das Luminex®-Verfahren	79
2.4.3	Kopplung der Luminex®-Beads	79
2.4.4	Verifizierung der Sonden und Überprüfung der Kopplungsreaktion.....	81
2.4.5	Biotinylierung der PCR-Produkte	81
2.4.6	Reverse Line Blot (RLB) zur Verifikation der Biotinylierung	82
2.4.6.1	Oligonukleotidsonden für den Reverse Line Blot (RLB)	82
2.4.6.2	Der Reverse Line Blot (RLB)	82
2.4.7	Luminex®-Hybridisierungsreaktion	84
2.4.7.1	Optimierung der Hybridisierungsreaktion	86
2.4.8	Bio-Plex®-System (Bio-Rad)	87
2.5	Statistische Auswertungen	87
IV	Ergebnisse	90
1	Ergebnisse der Polymerasekettenreaktionen (PCR).....	90
1.1	Nachweisgrenzen der Singleplex-PCR-Verfahren.....	90
1.1.1	Piroplasmida.....	90
1.1.2	Anaplasmataceae (<i>Anaplasma</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp. und <i>Cand. Neoehrlichia</i> mikurensis).....	91
1.1.3	Onchocercidae.....	92
1.1.4	<i>Rickettsia</i> spp.	93
1.2	Nachweisgrenze der Duplex-PCR	94
1.3	Nachweisgrenze der Triplex-PCR	95
1.4	Nachweisgrenze der Quadruplex-PCR	96
1.5	Untersuchung der Blutproben	97
1.5.1	Ergebnisse der Triplex-PCR	98
1.5.2	Ergebnisse der Quadruplex-PCR	102
2	Ergebnisse des Bead-basierten Multiplex-Diagnostikverfahrens (Luminex®- xMAP®-Technologie)	106
2.1	Konstruktion der Oligonukleotidsonden	106
2.2	Die Bead-Kopplung und ihre Verifizierung.....	108
2.3	Der Reverse Line Blot (RLB)	109
2.4	Hybridisierung der Beads mit PCR-Produkten	111
2.4.1	Optimierungsansätze	113
V	Diskussion	114

1	Die Multiplex-Polymerasekettenreaktion	115
1.1	Entwicklung und Anwendung der Multiplex-PCR.....	115
1.2	Untersuchung der Blutproben mittels Multiplex-PCR.....	118
1.2.1	Probenmaterial	118
1.2.2	Erregernachweis mittels Triplex-PCR und Quadruplex-PCR	120
2	Das Bead-basierte Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®-xMAP®- Technologie)	122
2.1	Entwicklung des Verfahrens	122
2.1.1	Die Beads	122
2.1.2	Die Oligonukleotidsonden	123
2.1.3	Die Bead-Kopplung	123
2.1.4	Verifizierung der Bead-Kopplung.....	124
2.1.5	Hybridisierung der Beads mit PCR-Produkten	125
2.1.6	Ansätze zur Überprüfung und Optimierung des Verfahrens.....	126
2.1.7	Ausblick	129
VI	Zusammenfassung.....	131
VII	Summary.....	133
VIII	Literaturverzeichnis.....	135
IX	Danksagung	157
X	Selbstständigkeitserklärung	158

Abbildungsverzeichnis

Abbildung III-1: TOPO TA Cloning® Vektor PCR 4 TOPO (Copyright Thermo Fisher Scientific).....	74
Abbildung IV-1: Nachweisgrenze der Singleplex-PCR mit dem Primerpaar bathF-kurz-R und bathR-kurz am Beispiel von <i>B. canis</i>	91
Abbildung IV-2: Nachweisgrenze der Singleplex-PCR mit dem Primerpaar A/E- FP und A/E-RP am Beispiel von <i>A. phagocytophilum</i>	92
Abbildung IV-3: Nachweisgrenze der Singleplex-PCR mit dem Primerpaar DIDR-F1 und DIDR-R1 am Beispiel von <i>D. immitis</i>	93
Abbildung IV-4: Nachweisgrenze der Singleplex-PCR mit dem Primerpaar CS409d und Rmasglt1065lo am Beispiel von <i>R. raoultii</i>	94
Abbildung IV-5: Nachweisgrenze der Duplex-PCR mit den Primerpaaren bathF-kurz-R und bathR-kurz sowie DIDR-F1 und DIDR-R1 am Beispiel von <i>B. canis</i> und <i>D. immitis</i>	95
Abbildung IV-6: Nachweisgrenze der Triplex-PCR mit den Primerpaaren A/E- FP und A/E-RP, bathF-kurz-R und bathR-kurz, DIDR-F1 und DIDR-R1 am Beispiel von <i>A. phagocytophilum</i> , <i>B. canis</i> und <i>D. immitis</i>	96
Abbildung IV-7: Nachweisgrenze der Quadruplex-PCR mit den Primerpaaren A/E-FP und A/E-RP, bathF-kurz-R und bathR-kurz, DIDR-F1 und DIDR-R1 sowie CS409d und Rmasglt1065lo mit <i>A. phagocytophilum</i> , <i>B. canis</i> , <i>D. immitis</i> und <i>R. raoultii</i>	97
Abbildung IV-8: Beispiel eines Alignments einiger Sequenzen von <i>A. phagocytophilum</i> , <i>E. canis</i> und <i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i> zur Darstellung der Primer und Sonden.....	107
Abbildung IV-9: RLB mit PCR-Produkten von <i>B. gibsoni</i> , <i>B. canis</i> und <i>B. vogeli</i> (vertikal) und spezifischen Oligonukleotidsonden (horizontal).....	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle III-1: Verwendete Primer für Anaplasmataceae (<i>Anaplasma</i> spp./ <i>Ehrlichia</i> spp./ <i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i>), Piroplasmida, Onchocercidae und <i>Rickettsia</i> spp.	51
Tabelle III-2: Oligonukleotidsonden für das Bead-basierte multiplex Diagnostikverfahren (Luminex®)	53
Tabelle III-3: Oligonukleotidsonden für den Reverse Line Blot (RLB)	54
Tabelle III-4: Positivkontrollen	55
Tabelle III-5: Blutproben von Hunden aus Süd- und Südosteuropa.....	61
Tabelle III-6: Thermocyclerprogramm für die Singleplex-PCR	65
Tabelle III-7: Thermocyclerprogramm für die Triplex-PCR.....	68
Tabelle III-8: Zuordnung der Oligonukleotidsonden zu den Luminex®-Bead-Regionen	80
Tabelle IV-1: Anzahl und prozentualer Anteil (KI: 95 %) der positiv getesteten Proben aus 246 caninen Blutproben, untersucht mittels Triplex-PCR.....	99
Tabelle IV-2: Vergleich der länderspezifischen Häufigkeiten bezüglich der Einzelinfektionen innerhalb der untersuchten Hundeblutroben (Triplex-PCR).	100
Tabelle IV-3: Vergleich der länderspezifischen Häufigkeiten bezüglich der Mischinfektionen innerhalb der untersuchten Hundeblutroben (Triplex-PCR).	101
Tabelle IV-4: Erwartungswerte der Mischinfektionen in Bezug auf die Untersuchungsergebnisse der Triplex-PCR.....	102
Tabelle IV-5: Anzahl und prozentualer Anteil (95 % Konfidenzintervall: KI) der positiv getesteten Proben aus 204 caninen Blutproben, untersucht mittels Quadruplex-PCR.....	103
Tabelle IV-6: Vergleich der länderspezifischen Häufigkeiten bezüglich der Einzelinfektionen innerhalb der untersuchten Hundeblutroben (Quadruplex-PCR)	104
Tabelle IV-7: Vergleich der länderspezifischen Häufigkeiten bezüglich der Mischinfektionen innerhalb der untersuchten Hundeblutroben (Quadruplex-PCR).	105
Tabelle IV-8: Erwartungswerte der Mischinfektionen in Bezug auf die Untersuchungsergebnisse der Quadruplex-PCR.....	106
Tabelle IV-9: Beispiele von Luminex®-Ergebnissen nach der Hybridisierung der Beads mit kompatiblen biotinylierten Oligonukleotiden zur Verifizierung der Kopplungsreaktion.....	109
Tabelle IV-10: Beispiel eines Testassays: Luminex®-Ergebnisse nach der Hybridisierung der Beads mit PCR-Produkten der Positivkontrollen	112

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	Lat.: Aqua bidestillata (Dt.: zweifach destilliertes Wasser)
BLAST	Basic local allignment search tool
bp	Basenpaare
ca.	Circa
CGA	Canine Granulozytäre Anaplasnose
CME	Canine Monozytäre Ehrlichiose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Engl.: Disseminated intravasal coagulation (Dt.: Dissmeninierte intravasale Koagulopathie)
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,
et al.	Lat.: et alii (Dt.: und andere)
FTA®	Flinders Technology Associates
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
h	Stunden
H ₂ O	Wasserstoffdioxid
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Horseradish Peroxidase
ICT	Immunochromatographie Test
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test
LB - Medium	Luria broth -Medium
MFI	Engl.: Median Fluorescence Intensity (Dt.: Mediane Intensität der Fluoreszenz)
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
n	Anzahl
nmol	Nannomol
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Engl.: Optical Density (Dt.: optische Dichte)

p	Signifikanzwert
PCR	Engl.: Polymerase Chain Reaction (Dt.: Polymerasekettenreaktion)
pH	Negative dekadischer Logarithmus der H ⁺ Inonenkonzentration
RMSF	Rocky Mountain Spotted Fever
RLB	Reverse Line Blot
s	Sekunden
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SDS	Satriumdodecylsulfat
SFG	„Spotted Fever Group“ der <i>Rickettsia</i> spp.
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TG	„Typhus Group“ der <i>Rickettsia</i> spp.
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
V	Volt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celcius

I Einleitung und Zielsetzung

Zahlreiche Krankheitserreger des Hundes, die man bis vor einigen Jahren fast ausschließlich nur in warmen Regionen fand, erweitern ihre Verbreitungsgebiete in gemäßigte Klimazonen wie Mittel- und Nordeuropa. Gründe dafür sind unter anderem die globale Erwärmung sowie vermehrte internationale Tiertransporte, sowohl von Nutztieren als auch von Haustieren (Beugnet and Marie 2009; Shaw et al. 2001). Eine Studie von Glaser und Gothe (1998) zeigte, dass von 5240 deutschen Hunden 50 % mindestens einmal im Ausland waren, unter anderem in beliebten Urlaubsländern wie Frankreich, Italien und Spanien. Die Tiere sind in endemischen Regionen, beispielsweise in mediterranen Ländern, vermehrt vektorübertragenen Erregern ausgesetzt. Das kann zu Erkrankungen und zur Verschleppung von vektorübertragenen Pathogenen über die Landesgrenzen hinaus führen (Schäfer et al. 2019; Menn et al. 2010). Dabei handelt es sich vor allem um Erreger, die von blutsaugenden Ektoparasiten wie Mücken, Flöhen und Zecken übertragen werden. Diese Überträger werden Vektoren genannt und verursachen die sogenannten Vektorenkrankheiten. Zu den vektorübertragenen Krankheitserregern zählen eine große Anzahl an Viren, Bakterien, Protozoen und Helminthen (Otranto et al. 2009). Dazu gehören unter anderem Vertreter der Familien Anaplasmataceae, Bartonellaceae, Borreliaceae, Babesiidae, Theileriidae, Hepatozoidae, Trypanosomatidae, Thelaziidae und Onchocercidae (Deplazes et al. 2013a; Deplazes et al. 2013b; Otranto and Dantas-Torres 2010; Dumler et al. 2001). Viele dieser Erreger sind nicht nur in der Veterinärmedizin, sondern wegen ihres Zoonosepotentials auch in der Humanmedizin von großer Bedeutung (Otranto et al. 2009). Für dieses Dissertationsprojekt wurden aufgrund ihrer Verbreitungsgebiete und klinischen sowie wissenschaftlichen Relevanz für Deutschland verschiedene Erreger ausgewählt. Aus der Ordnung der Rickettsiales lag der Fokus auf *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* und *Candidatus Neohrlichia mikurensis*. Bei den ebenfalls zu den Rickettsiales gehörenden *Rickettsia* spp. wurde sich auf *Rickettsia conorii* subsp. *conorii* (im Folgenden *R. conorii* genannt) konzentriert, da dieser Erreger in den Studien von Solano-Galego et al. (2006) und Alexandre et al. (2011) bei mehreren klinisch erkrankten Hunden in Europa nachgewiesen werden konnten. Zudem wurden die Piroplasmida mit ihren Vertretern *Babesia canis*, *Babesia vogeli* und *Babesia gibsoni* sowie die Onchocercidae, mit Fokus auf *Dirofilaria immitis* ausgewählt. Viele der caninen vektorübertragenen Erreger, so wie auch die in diesem Projekt untersuchten Organismen, sind unter anderem im Süden Europas

endemisch. Jedoch verursachen einige dieser Pathogene, wie beispielsweise *B. canis* oder *A. phagocytophilum* auch in zentraleuropäischen Ländern wie Deutschland autochthone Erkrankungen bei Hunden (Beelitz et al. 2012; Kohn et al. 2008; Barutzki et al. 2007). Für andere canine Krankheitserreger aus dem südeuropäischen Raum, wie *D. immitis* oder *Dirofilaria repens*, wird die Möglichkeit der Endemisierung in naher Zukunft in Deutschland diskutiert (Kronefeld et al. 2014; Sassnau et al. 2014). Am Beispiel dieser Pathogene ist zu erkennen, dass das Risiko für Infektionen mit zum Teil zoonotischen, caninen vektorübertragenen Erregern für Hunde in Zentral- und Nordeuropa aufgrund voranschreitender Globalisierung und Klimaveränderung steigt (Genchi et al. 2011; Beugnet and Marie 2009). Aus diesem Grund sind epidemiologische Studien sowie adäquate Diagnostikmethoden wichtig, um belastbare Aussagen bezüglich der regionalen Erregerverbreitung und Vektorprävalenz zu ermöglichen. Im Hinblick auf das zoonotische Potential einiger vektorübertragener Erreger, wie beispielsweise *D. repens* sowie *E. canis*, und vor dem damit verbundenen Hintergrund des „One Health“-Ansatzes sind nicht nur veterinärmedizinische, sondern auch humanmedizinische Daten zu berücksichtigen (Simon et al. 2012; Perez et al. 2006). Die Gesundheit von Mensch und Tier sowie Umwelteinflüsse sind eng miteinander verknüpft und müssen daher gleichermaßen berücksichtigt werden, um Zoonosen wirksam zu bekämpfen (Destoumieux-Garzon et al. 2018; Asokan 2015). Das Ziel dieses Dissertationsprojektes war die Etablierung eines Multiplex-Diagnostikverfahrens zur simultanen Detektion der oben genannten caninen vektorübertragenen Krankheitserreger. Ein solches Diagnostikverfahren könnte in zukünftigen Projekten hilfreich bei der Erhebung von epidemiologischen Daten sein. Mit Hilfe von epidemiologischen Daten können Analysen zum Infektionsrisiko für Mensch und Tier in den einzelnen Regionen erstellt und Prophylaxemaßnahmen festgelegt werden. Dies ist unter anderem auch im Zusammenhang mit Tiertransporten und Urlaubsreisen mit Tieren von Bedeutung, um das Verschleppen von Infektionserregern in nicht-endemische Gebiete einzudämmen. Zudem ist die Weiterentwicklung von Diagnostikmethoden ein wichtiger Aspekt für den klinischen Sektor, um eine schnelle und wirksame Behandlung der Patienten zu ermöglichen.

II Literaturübersicht

1. Piroplasmida

1.1 Allgemeines

Die Ordnung der Piroplasmida ist dem Phylum Apicomplexa zugeordnet. Sie gehört zu der Klasse der Haematozoa und unterteilt sich in die Familien Theileriidae sowie Babesiidae. Ihre Vertreter sind Blutparasiten, deren Vermehrung intrazellulär in Blutzellen von Tieren oder Menschen stattfindet (Deplazes et al. 2013a). Die meisten *Babesia*- Arten infizieren Höhere Säugetiere. Aber auch Vögel und Beuteltiere werden von Piroplasmida befallen. Reptilien und Amphibien als Wirte für Piroplasmida werden ebenfalls in Betracht gezogen (Schnittger et al. 2012). Meist erfolgt die Übertragung der für Hunde pathogenen Piroplasmida durch Zecken (Deplazes et al. 2013a). Allerdings sind auch direkte Übertragungswege bei „kleinen“ und „großen“ Babesien bekannt (Jefferies et al. 2007; Stegeman et al. 2003; Freeman et al. 1994).

Die Babesien wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts von Victor Babes beschrieben (Babes 1888). Sie werden in „große“ und „kleine“ Arten unterteilt. *Babesia conradae*, *Babesia microti-like* (*Theileria annea*) und *Babesia gibsoni* gelten als „kleine“ Babesien des Hundes. Zu den „großen“ Arten gehören *Babesia canis*, *Babesia vogeli* und *Babesia rossi*. Letztere wurden aufgrund ihrer Morphologie lange Zeit als Subspezies von *B. canis* betrachtet. Mittlerweile sind sie aber aufgrund ihrer genetischen und epidemiologischen Unterschiede als jeweils eigene Spezies anerkannt (Matijatko et al. 2012). Eine weitere hundepathogene „große“ Babesie, *Babesia sp. (Coco)*, wurde vor einigen Jahren entdeckt und beschrieben (Birkenheuer et al. 2004).

1.2 „Große“ Babesien: *Babesia canis*, *Babesia rossi*, *Babesia vogeli*

1.2.1 Morphologie und Entwicklungszyklus

Babesien werden von ihrem Endwirt, der Zecke, während einer Blutmahlzeit in Form von kugelförmigen Merozoiten und Gamonten aufgenommen. Die Gamonten entwickeln sich noch im Zwischenwirt, hier Hunde und wilde Caniden, aus einigen dafür prädisponierten Merozoiten. Sie differenzieren sich dann im Verdauungstrakt der Zecke zuerst zu Gameten, die

auch als Strahlenkörper bezeichnet werden, um danach während der Gamogonie zu Zygoten zu fusionieren. Diese differenzieren sich durch Mitose zu Kineten und dringen in die Darmzellen ihres Endwirtes ein (Schnittger et al. 2012). Mit der Hämolymphe gelangen sie in die Ovarien von weiblichen Zecken, wo sie die Oozyten befallen (transovarielle Übertragung) und an die Embryonen weitergegeben werden. Außerdem transportiert die Hämolymphe die Kineten in die Speicheldrüsen der Zecke. Dort erfolgt die Entwicklung zum infektiösen Stadium, den Sporozoiten. Diese werden über den Speichel der Zecke auf den Zwischenwirt übertragen und dringen in dessen Blut in die Erythrozyten ein. Dort entsteht aus einem Sporozoiten zunächst ein ringförmiger oder amöboider Trophozoit, der sich anschließend durch die Merogonie zu zwei bis vier Merozoiten mit ihrer charakteristischen Tropfenform entwickelt. Die Merozoite zerstören den Erythrozyten, können somit nach der Freisetzung weitere rote Blutkörperchen infizieren und sich somit weiter teilen oder zu Gamonten entwickeln. Anhand ihrer Größe entstand die Einteilung der Babesien in „große Arten“ und „kleine Arten“. Die in diesem Abschnitt beschriebenen „großen Arten“, *B. canis* und *B. vogeli*, entwickeln Merozoite einer Größe von $> 2,5 \mu\text{m}$ - $5 \mu\text{m}$ (Deplazes et al. 2013a; Schnittger et al. 2012). Bislang ist ein klinischer Fall eines Hundes bekannt, bei dem eine Infektion mit *B. canis* nicht durch einen Zeckenstich, sondern durch eine Bluttransfusion ausgelöst wurde (Freeman et al. 1994).

1.2.2 Geographische Verbreitung

Betrachtet man die ursprünglich endemischen Regionen, kommt *B. rossi* vor allem im südlichen Teil Afrikas vor, während *B. vogeli* sowohl in tropischen, subtropischen und mediterranen Gebieten verbreitet ist. *B. canis* findet man vorwiegend in Europa, aber auch in Asien. Die vor einigen Jahren entdeckte *Babesia* sp. (Coco) wurde bis heute ausschließlich in North Carolina, USA nachgewiesen (Matijatko et al. 2012; Birkenheuer et al. 2004). Die Verbreitungsmuster von *Babesia* spp. sind abhängig vom Vorkommen ihrer Vektoren (Solano-Gallego et al. 2016). Die globale Erwärmung und Tierimporte werden als Gründe für die Erweiterung der Verbreitungsgebiete von Vektoren diskutiert (Beugnet and Marie 2009). *Rhipicephalus sanguineus*, eine Vektorzecke für *B. vogeli*, ist in Europa nicht mehr nur in ihren ursprünglichen Habitaten, den warmen Mittelmeerregionen, zu finden sondern ist mittlerweile auch in weiter nördlich liegenden Gebieten beschrieben (Pantchev et al. 2015a; Hansford et al. 2014; Beugnet and Marie 2009; Gray et al. 2009). Auch der Vektor *Dermacentor reticulatus*, der einst in Nord- und Zentraleuropa seltener zu finden war, verbreitet sich dort zunehmend (Beugnet and Marie 2009; Gray et al. 2009) (Kapitel II 1.2.3). Der Erreger *B. canis*, der von

D. reticulatus übertragen wird, gilt als häufigste Ursache für Babesioseerkrankungen bei Hunden in Europa (Matijatko et al. 2012). In Deutschland wird das Saarland von Beelitz et al. (2012) als Endemiegebiet für *B. canis* beschrieben. Von autochthonen *B. canis*-Infektionen bei Hunden in verschiedenen Regionen Deutschlands wurde mehrfach berichtet, darunter unter anderem die Regionen München und das Saarland (Beelitz et al. 2012; Barutzki et al. 2007; Zahler et al. 2000c). Fälle von autochthonen *B. vogeli*-Erkrankungen sind hingegen in Deutschland bislang nicht bekannt (Tenter und Deplazes 2006). In Frankreich, Ländern der Mittelmeerregion, der Slowakei und Serbien wurde *B. vogeli* bei Hunden sowie infizierten Zecken der Spezies *R. sanguineus* nachgewiesen (Solano-Gallego et al. 2016; Rene et al. 2012).

1.2.3 Vektoren und Wirte

Als Endwirte werden per Definition die Organismen bezeichnet, in denen die geschlechtliche Vermehrung der Parasiten stattfindet (Tenter und Schnieder 2006). Da bei den Babesien der Ort der geschlechtlichen Vermehrung der Zeckendarm ist (Kapitel II 1.2.1), stellen die Zecken die Endwirte dieser Parasiten dar (Schnittger et al. 2012). Sie fungieren als Vektoren für die Übertragung der Pathogene auf die Zwischenwirte, in denen die ungeschlechtliche Vermehrung stattfindet. Dabei sind die verschiedenen Babesien spezialisiert auf unterschiedliche Zeckenarten festgelegt. Bei den hier genannten „großen“ Babesien handelt es sich bei den Zwischenwirten um domestizierte Hunde sowie wildlebende Caniden (Van Heerden 1980).

D. reticulatus überträgt den Erreger *B. canis*. Diese Zeckenart, die zur Familie Ixodidae (Schildzecken) und Gattung *Dermacentor* (Buntzecken) gehört, ist umgangssprachlich fälschlicherweise unter dem Namen Auwaldzecke bekannt. Da sie keineswegs vorwiegend in flussnahen Wäldern auftritt, ist diese Bezeichnung irreführend. Zutreffender ist dagegen, aufgrund der marmorierten Zeichnung ihres Rückenschildes, die ebenfalls gebräuchliche Bezeichnung Buntzecke (Deplazes et al. 2013c). Sie hat ihr Verbreitungsgebiet in Mittel- und Westeuropa, wobei sie Regionen bis Norddeutschland, Nordpolen, Litauen sowie bis zu den Mittelmeerküsten besiedelt und feucht-warmes bis feucht-gemäßigtes Klima bevorzugt (Rubel et al. 2016). Jedoch war sie ursprünglich im kälteren Nord- und Zentraleuropa seltener zu finden (Gray et al. 2009). Alle Teile Deutschlands bieten die generellen Voraussetzungen für die Endemisierung dieser Zeckenart, da Kleinsäuger als Wirte für die Larven und Nymphen sowie Hunde als präferierte Wirte der adulten Zecken ausreichend vorhanden sind. Darüber hinaus werden auch die klimatischen Bedingungen aller deutschen Regionen als geeignet für eine

Ansiedlung eingestuft. Die Übertragung von caninen Babesien auf nicht-infizierte deutsche Zeckenpopulationen erfolgt durch das Blut von infizierten Hunden sowie durch transovarielle Übertragung auf die nächste Zeckenpopulation. Damit sind die Voraussetzungen für die Etablierung einer stabilen Population von *B. canis* in ganz Deutschland vorhanden (Zahler et al. 2000c). Es konnte bereits gezeigt werden, dass *D. reticulatus* in verschiedenen deutschen Regionen zu finden ist (Rubel et al. 2016), darunter auch Berlin/ Brandenburg, wo eine stabile Population dieser Zeckenart nachgewiesen wurde (Kohn et al. 2019).

R. sanguineus, auch Braune Hundezecke genannt, ist die erste Zeckenart, deren Vorkommen aufgrund der Klimaveränderungen und ihrer Wirtsspezialisierung auf den domestizierten Hund fast weltweit verzeichnet werden kann (Parola et al. 2008). Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei *R. sanguineus* um einen Spezieskomplex, auch bezeichnet als *R. sanguineus sensu lato*, mit verschiedenen Vorkommen, Wirtspräferenzen und Vektorkompetenzen handelt (Dantas-Torres and Otranto 2015). Trotz der Vorliebe für warmes Klima in ihren ursprünglich tropischen und subtropischen Habitaten können diese Zecken auch in kalten Regionen und Jahreszeiten überleben. Dies ist auf ihre endophile Lebensweise, das heißt ein Leben in urbanen sowie suburbanen Gebieten und vorrangig in Gebäuden, zurückzuführen. Dies ermöglicht *R. sanguineus*, sich vor Witterungseinflüssen zu schützen und verschiedenste Habitate zu besiedeln (Pantchev et al. 2015a; Sainz et al. 2015; Gray et al. 2013; Gray et al. 2009). Deshalb wird eine Ausbreitung durch Importe dieser Zeckenspezies von mediterranen Regionen auf nördlichere Länder in Europa wie Belgien, den Niederlanden, Frankreich, den Britischen Inseln und Deutschland vermutet (Sainz et al. 2015; Hansford et al. 2014; Beugnet and Marie 2009; Gray et al. 2009). *R. sanguineus* gehört zu den Ixodidae und dient als Vektor für die „große“ Babesie *B. vogeli* (Dantas-Torres 2010).

B. rossi wird von *Haemaphysalis leachi* im südlichen Afrika übertragen (Uilenberg 2006). In Europa gibt es bislang einen Nachweis von *B. rossi* – DNA bei einem Hund aus Frankreich (Fritz 2010).

1.2.4 Symptomatik und Diagnose

Symptomatik

Die Symptome einer Babesioseerkrankung beim Hund sind nicht spezifisch, unterscheiden sich aber in ihrer Ausprägung, abhängig davon um welche Babesienspezies es sich handelt und in welchem Gesundheitszustand sich der Hund befindet. *B. vogeli* verursacht meist subklinische

bis milde Erkrankungen, im Gegensatz zu der stark virulenten Spezies *B. rossi* (Cacciò et al. 2002; Irwin 2009). *B. canis*-Erkrankungen verlaufen oft akut und können unbehandelt tödlich enden (Barutzki et al. 2007). Generell ist bei sehr jungen, alten und immunsupprimierten oder splenektomierten Hunden sowie bei Tieren mit Koinfektionen mit schwereren Krankheitsverläufen zu rechnen (Solano-Gallego et al. 2016). Die Inkubationszeit variiert zwischen 1 und 3 Wochen (Barutzki et al. 2007). In der akuten Krankheitsphase beobachtet man oft Fieber, Lethargie, Anorexie sowie Ikterus, Splenomegalie und Thrombozytopenie. Auch Glomerulonephritiden und Hämoglobinurie sind möglich (Solano-Gallego and Baneth 2011). Diese Symptome werden zum Teil durch die mechanische intravasale Hämolyse ausgelöst, welche die Babesien während der Merogonie und der damit einhergehenden Zerstörung der Erythrozyten verursachen. Aber auch die sekundäre, immunvermittelte Schädigung der Erythrozytenmembranen durch Autoantikörper spielt eine wichtige Rolle und führt zu einer intra- und extravasalen Hämolyse (Zygner et al. 2007). Darüber hinaus wird über eine toxische Hämolyse, ausgelöst durch Hämolyse-Faktoren der Babesien, diskutiert (Furlanello et al. 2005; Onishi et al. 1990). Bei komplizierten Krankheitsverläufen, die vor allem durch den Befall mit *B. rossi* auftreten können, kann es unter anderem zu disseminierter intravasaler Koagulopathie (DIC), akutem Nierenversagen, Lungenödemem sowie Multiorganversagen kommen (Ayoob et al. 2010). Auch neurologische Symptome wie Paresen, Bewegungsstörungen oder epileptiforme Anfälle sind bei Infektionen mit *Babesia* spp. möglich (Ayoob et al. 2010; Barutzki et al. 2007). Die chronische Krankheitsphase verläuft meist asymptomatisch. In dieser Phase besteht das Risiko einer wiederkehrenden Parasitämie mit klinischen Symptomen durch auslösende Faktoren wie Stress oder Immunschwäche (Irwin 2009; Solano-Gallego et al. 2016).

Diagnose

Die Mikroskopie ist bis heute die am häufigsten angewandte Methode, um Babesien nachzuweisen und um „große“ und „kleine“ Babesien zu unterscheiden. Sie ist einfach, schnell und weltweit für die meisten Tierärzte verfügbar. Dabei wird Kapillarblut entnommen, auf einem Objektträger mit Hilfe der Giemsa-Färbung oder ähnlicher Färbetechnik angefärbt und unter dem Mikroskop beurteilt. Diese Methode ist ausschließlich für die akute Krankheitsphase aussagekräftig, da in dieser Phase Merozoite in den Erythrozyten zu finden sind. In der chronischen Phase sind kaum Babesien im Blut nachweisbar (Irwin 2009). Eine sensitivere Diagnostikmethode in der akuten Krankheitsphase ist die PCR (Polymerasekettenreaktion), bei

der vor allem die Genabschnitte 18S, 5,8S, 12S und ITS (Internal Transcribed Spacer) benutzt werden, um Babesien-DNA nachzuweisen. Für die Speziesdifferenzierung der „großen“ Babesien, die morphologisch nicht durchzuführen ist, wurden Methoden wie nested PCR, PCR-RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) und RLB (Reverse Line Blot) etabliert (Irwin 2009; Matijila et al. 2008). In den Fällen, in denen die Anzahl der Babesien zu gering ist, um sie mikroskopisch oder mit molekularen Tests zu detektieren, wie bei chronischen und subklinischen Verlaufsformen, empfiehlt sich die Anwendung von serologischen Verfahren. Mit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test) und ICT (Immunochromatographie Test) lassen sich Antikörper gegen die Blutstadien der Babesien nachweisen (Mosqueda et al. 2012). Der ICT wurde allerdings bisher nur für einige „kleine“ Bebsienarten wie *B. gibsoni* etabliert (Mosqueda et al. 2012; Verdida et al. 2005). Bei den serologischen Nachweismethoden ist zu beachten, dass spezifische Antikörper erst ab ca. zwei Wochen nach der Erstinfektion nachweisbar sind (von Samson-Himmelstjerna 2019). Zudem ist eine Unterscheidung zwischen einem aktuellen Infektionsgeschehen und einem Erregerkontakt in der Vergangenheit bei einmaliger serologischer Untersuchung nicht möglich. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass gegen Babesiose geimpfte Hunde Impfantikörper entwickeln und die positiven serologischen Testergebnisse bei diesen Tieren somit nicht aussagekräftig sind (von Samson-Himmelstjerna 2019; Mosqueda et al. 2012). Um den Infektionsverlauf mittels serologischer Untersuchung abzubilden, sollte ein quantitativer serologischer Test bei Erstvorstellung durchgeführt und nach 4 bis 8 Wochen wiederholt werden (Solano-Gallego et al. 2016). Zudem sind Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen *Babesia* spp. bei serologischen Nachweisverfahren möglich (Solano-Gallego et al. 2016). Im Gegensatz zu den verfügbaren serologischen Methoden bietet die PCR eine verlässlichere Möglichkeit zur Speziesbestimmung, was für die Prognose und die Therapiewahl von Bedeutung sein kann (von Samson-Himmelstjerna 2019; Solano-Gallego et al. 2016). Weitere Aspekte zu Diagnostikverfahren werden in Kapitel II 4 besprochen.

1.3 „Kleine“ Babesien: *Babesia gibsoni*, *Babesia-microti-like*, *Babesia conradae*

Infektionen von domestizierten und wilden Caniden mit „kleinen“ Babesien werden in Europa in vielen Fällen durch *Babesia gibsoni* hervorgerufen (Solano-Gallego and Baneth 2011). Zunächst wurde angenommen, dass neben dem europäischen Genotyp von *B. gibsoni* ein kalifornischer Genotyp existiert (Zahler et al. 2000b). Molekularbiologische Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass es sich bei dem kalifornischen Isolat um eine eigene Spezies

handelt, die *Babesia conradae* genannt wurde (Kjemtrup et al. 2006). Zusätzlich existiert die Spezies *Babesia-microti-like* (*Theileria annae*) in Europa (Solano-Gallego et al. 2016; Zahler et al. 2000a). Vor einigen Jahren wurde vorgeschlagen *Babesia-microti-like* (*Theileria annae*) in *Babesia vulpis* spec. nov. umzubenennen, da laut Baneth, Florin-Christensen et al. (2015) der Fuchs den natürliche Wirt darstellt und der Erreger phylogenetisch nicht mit *Theileria* spp. sondern mit *Babesia* spp. verwandt ist.

1.3.1 Morphologie und Entwicklungszyklus

Der Entwicklungszyklus der „kleinen“ Babesien in Zecken und Hunden bzw. wilden Caniden entspricht dem der „großen“ Babesien (Kapitel II 1.2.1). Die in den Erythrozyten liegenden Merozoite von *B. gibsoni* sind $< 2,5 \mu\text{m}$ groß und damit für die Zuordnung dieses Erregers zu den „kleinen“ Babesien verantwortlich (Deplazes et al. 2013a). Allerdings ist bei *B. gibsoni* nicht nur eine indirekte Übertragung vom Vektor, der Zecke, auf den Zwischenwirt möglich sondern auch eine direkte Transmission zwischen Hunden durch Austausch von Blut. Dabei spielen Hundekämpfe eine wichtige Rolle, aber auch von einer Übertragung durch Bluttransfusionen und von transplazentalen Übertragungen wurde berichtet (Jefferies et al. 2007; Fukumoto et al. 2005; Stegeman et al. 2003).

1.3.2 Geographische Verbreitung

B. gibsoni ist in vielen verschiedenen Regionen der Welt zu finden. Der Erreger ist in Europa, Asien, Afrika, dem Mittleren Osten, Nord Amerika und Australien endemisch (Matsuu et al. 2004; Birkenheuer et al. 1999). Bislang wurden zwei nachgewiesene *B. gibsoni*-Infektionen bei Hunden aus Deutschland publiziert, die laut Hartelt et al. (2007) die ersten autochthonen Krankheitsfälle in Westeuropa sind. Berichte über canine Infektionen aus Spanien, Italien, Kroatien, Serbien, der Slowakei und dem Vereinten Königreich sind ebenfalls bekannt. *Babesia-microti-like* wurden bei Hunden in Kroatien, Frankreich, Italien, Portugal, Serbien, Spanien und Schweden nachgewiesen (Solano-Gallego et al. 2016). Zusätzlich wurden Nachweise von *Babesia microti* -like bei Füchsen in Deutschland, in Thüringen und Brandenburg, erbracht (Liesner et al. 2016; Najm et al. 2014). Nachweise von *B. conradae* – DNA bei Hunden gab es im Westen der USA (Kjemtrup et al. 2006).

1.3.3 Vektoren und Wirte

Haemaphysalis spp. und *Rhipicephalus* spp. sind die Zeckenspezies, die als Vektoren für die Übertragung von *B. gibsoni* auf Caniden fungieren (Matijatko et al. 2012). Zecken sind, wie bei den „großen“ Babesien, die Endwirte, während Caniden die Zwischenwirte darstellen (Kapitel II 1.2.3). Die Vektoren *Haemaphysalis longicornis*, *Haemaphysalis bispinosa* und *Haemaphysalis leachi*, Überträger von *B. gibsoni* und zu der Familie Ixodidae (Schildzecken) gehörend, spielen für Europa keine Rolle, da sie hauptsächlich in Ostasien und Australien bzw. Afrika zu finden sind (Trotta et al. 2009; Ikadai et al. 2007). Dahingegen ist *Rhipicephalus sanguineus*, wie in Kapitel II 1.2.3 beschrieben, auch in Europa verbreitet (Gray et al. 2009). Für *Babesia-microti*-like gelten *Ixodes hexagonus* und *Ixodes canisuga* als potentielle Vektoren (Najm et al. 2014; Camacho et al. 2003). Für *B. conradae* gelten *R. sanguineus* und *D. variabilis* als potentielle Vektoren (Kjemtrup et al. 2006).

1.3.4 Symptomatik und Diagnose

Symptomatik

Die Symptome bei einer Infektion mit *B. gibsoni* können sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Die Erkrankung kann inapparent bis mild verlaufen, in einigen Fällen endet die Infektion tödlich (Solano-Gallego et al. 2016). Chronische Infektionen mit einer subklinischen Verlaufsform treten häufig auf. Die betroffenen Tiere sind entweder inapparent oder zeigen Schwäche und Gewichtsverlust. Die subklinische Verlaufsform findet man häufig in sogenannten Kampfhunderassen wie den Pitbull Terriern (Solano-Gallego and Baneth 2011). Die klinischen Symptome und die Pathologie ähneln denen der Infektion mit „großen“ Babesien (Kapitel II 1.2.4). Dazu gehören mechanische und immunvermittelte hämolytische Anämie sowie deren Folgen, wie Hepatitis, Splenomegalie, Glomerulonephritis und Thrombozytopenie (Solano-Gallego et al. 2016). Die klinischen und hämatologischen Befunde einer Infektion mit *B. conradae* – und *B. microti*-like ähneln denen einer *B. gibsoni* – Infektion (Miro et al. 2015; Kjemtrup et al. 2006).

Diagnose

Die in Kapitel II 1.2.4 beschriebenen mikroskopischen, molekularbiologischen und serologischen Diagnostikverfahren für „große“ Babesien werden auch bei den „kleinen“

Babesienspezies angewandt (Solano-Gallego et al. 2016; Solano-Gallego and Baneth 2011). Kapitel II 4 enthält weitere Aspekte zu Diagnostikverfahren.

2 Rickettsiales

2.1 Allgemeines

Die in dieser Dissertation thematisierten Erreger der Gattungen *Anaplasma*, *Ehrlichia* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* sowie *Rickettsia* sind gram-negative, pleomorphe Bakterien, die zur Familie der Anaplasmataceae bzw. Rickettsiaceae und zur Ordnung der Rickettsiales gehören. Die meisten Vertreter der Rickettsiales leben obligat intrazellulär in eukaryotischen Zellen, so wie auch *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Cand. Neoehrlichia mikurensis* und *Rickettsia* spp. Eine weitere Gemeinsamkeit der vieler Rickettsiales ist die Übertragung auf den Wirt durch Zecken (Dumler et al. 2001).

Die erste Beschreibung und Namensgebung eines Erregers aus der Gruppe der Anaplasmen und Ehrlichien wurde von Theiler (1910) durchgeführt. Dabei handelte es sich um *Anaplasma marginale*. Das Bakterium *A. phagocytophilum* wurde zunächst in den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts unter dem Namen *Rickettsia phagocytophila* in Schafen beschrieben (Severo et al. 2012). Später wurde das Pathogen bei Pferden und Menschen identifiziert und unter dem Namen *Ehrlichia equi* von Stannard et al. (1969) und als Erreger der Erkrankung Humane Granulozytäre Ehrlichiose (HGE) von Chen et al. (1994) publiziert. Inzwischen haben sich aufgrund der Fortschritte in der molekularbiologischen Forschung taxonomische Neuerungen für die Anaplasmataceae ergeben. *E. equi* und der HGE-Erreger wurden unter dem Namen *Ehrlichia phagocytophila* zusammengefasst und dann in *Anaplasma phagocytophilum* umbenannt (Dumler et al. 2001).

Die Bezeichnung *Ehrlichia* spp. wurde Mitte des 20. Jahrhunderts zuvor von Moshkovski (1945) zu Ehren des Bakteriologen Paul Ehrlich eingeführt. *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* und *Ehrlichia ewingii* können Erkrankungen mit ähnlicher Symptomatik wie *A. phagocytophilum* beim Hund verursachen (Mylonakis et al. 2004). *E. ewingii* und *E. chaffeensis* sind humanpathogene Bakterien (Paddock and Childs 2003). Auch Infektionen mit *E. canis* bei Menschen wurden dokumentiert (Perez et al. 2006). Aus der Reihe dieser Erreger wird das zuerst 1935 in Algerien beschriebene Bakterium *E. canis*, aufgrund seiner Verbreitung und veterinärmedizinischen Bedeutung in Europa im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet (Waner

and Harrus 2013; Donatien and Lestoquard 1935). Bis heute wurden drei verschiedene Stämme des Pathogens identifiziert, die sich im Bereich des 16S rRNA-Gens deutlich voneinander unterscheiden: der Florida-, der Israel- und der Oklahoma-Stamm (Keysary et al. 1996).

Der Erreger *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, von Kawahara et al. (2004) erstmals identifiziert, wurde ursprünglich in Nagern (*Rattus norvegicus*) und Zecken der Spezies *Ixodes ovatus* entdeckt, ist aber mittlerweile auch als hunde- und humanpathogener Erreger beschrieben (Diniz et al. 2011; Kawahara et al. 2004). Er ist aufgrund seiner Neuartigkeit sowie seines zoonotischen Potentials von großem Interesse und ist deshalb Bestandteil der Untersuchungen dieser Dissertation (Jahfari et al. 2012).

Die Pathogene der Gattung *Rickettsia* wurden nach Howard Ricketts benannt, einem Mikrobiologen, der Anfang des 20. Jahrhunderts *Rickettsia rickettsii* als Verursacher des Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF) beschrieb (Kovacova et al. 2006; Ricketts 1906). Die Erreger werden anhand ihrer Außenmembranproteine in zwei Gruppen unterteilt: die „Spotted Fever Group“ (SFG) und die „Typhus Group“ (TG). Neuere Systematiken, welche auf der Analyse von genetischen und biologischen Merkmalen von *Rickettsia* spp. beruhen, führen zudem die sogenannte „transitional Group“ ein (Murray et al. 2016). Die hier thematisierten und für Hunde pathogenen *Rickettsia* spp. gehören zur SFG, mit Ausnahme des Bakteriums *R. felis*, welches laut oben genannter neuer Systematik in die „transitional Group“ eingeordnet wird (Brown and Macaluso 2016; Parola et al. 2005).

2.2 *Anaplasma phagocytophilum*

2.2.1 Morphologie und Vermehrungszyklus

A. phagocytophilum ist ein obligat intrazytoplasmatisch lebendes, gramnegatives, kokkoid bis ellipsoides Bakterium (Dumler et al. 2001). Der 0,4–1,3 µm große Erreger infiziert vor allem neutrophile Granulozyten eines Säugetierwirtes. Aber auch andere Zellen myeloiden und nicht-myeloiden Ursprungs können befallen werden (Severo et al. 2012). In diesen Zellen, in die der Erreger durch Phagozytose oder Endozytose gelangt, vermehrt er sich in membrangebundenen Vesikeln und bildet Mikrokolonien, sogenannte Morulae. Diese können einen Durchmesser von bis zu 6 µm erreichen, für gewöhnlich sind sie jedoch 1,5–2,5 µm groß. Die einzelnen Erreger liegen in zwei unterschiedlichen Strukturformen in den Morulae vor. Man unterscheidet die größere retikuläre Form und die kleinere dichte Kernform mit ihrem kondensierten

Protoplasma. Erstere vermehrt sich intrazellulär und reift zur Kernform heran, die bei der Lyse der Wirtszelle freigesetzt wird, um sich dann an Oberflächenstrukturen neuer Zellen zu heften und durch Phagozytose oder Endozytose aufgenommen zu werden. Mit dieser Strategie umgeht das Bakterium die phagolysosomale Kaskade und somit seine Zerstörung (Carrade et al. 2009). Die Vermehrung läuft als einfache Querteilung ab (Dumler et al. 2001). Beim Saugakt nehmen die adulten Zecken oder die Nymphen die mit Anaplasmen infizierten Wirtszellen auf. Die Erreger überleben in den Speicheldrüsen und Darmzellen der Zecken und werden bei der nächsten Blutmahlzeit an einen neuen Wirt weitergegeben (Severo et al. 2012; Nicholson et al. 2010). Das Bakterium gelangt nach ungefähr 24-48 Stunden nach dem Zeckenstich in den Wirt und breitet sich dort über die Blut- und Lymphgefäße aus, bevor es die Zellen befällt (des Vignes et al. 2001; Katavolos et al. 1998).

2.2.2 Geographische Verbreitung

A. phagocytophilum ist in vielen Regionen der Welt vertreten, da auch seine verschiedenen Vektoren in unterschiedlichen Klimazonen endemisch sind. Der Erreger kommt in Europa, Asien und den USA vor. Berichte über klinische Infektionen von Caniden in Europa gibt es für Italien, Österreich, Schweden, Polen, die Schweiz, das Vereinigte Königreich und auch für Deutschland (Chirek et al. 2018; Carrade et al. 2009; Kohn et al. 2008). In verschiedenen deutschen Regionen wurde der Nachweis des Pathogens in Zecken erbracht, darunter in Berlin/Brandenburg, Bayern, Baden-Württemberg und in der Stadt Hanover, was für ein endemisches Vorkommen von *A. phagocytophilum* hierzulande spricht (Kohn et al. 2019; Blazejak et al. 2017; Krücken et al. 2013; Hartelt et al. 2004; von Loewenich et al. 2003).

2.2.3 Vektoren und Wirte

Die Überträger von *A. phagocytophilum* sind vorwiegend Zecken der Gattung *Ixodes* und vereinzelt der Gattung *Dermacentor*, die zu der Familie Ixodidae (Schildzecken) gehören. Je nach Region stellen verschiedene Zeckenspezies die Vektoren des Bakteriums dar. In den USA übertragen *Ixodes pacificus* und *Ixodes scapularis*, in Asien *Ixodes persulcatus* sowie *Dermacentor salivarum* und in Europa *Ixodes trianguliceps*, *I. hexagonus*, *Ixodes ventalloi* sowie *I. ricinus* den Erreger (Carrade et al. 2009; Cao et al. 2000; Richter et al. 1996). Auch in *D. reticulatus* wurde *A. phagocytophilum* nachgewiesen, ob *D. reticulatus* aber auch als Vektor fungieren kann ist bislang unklar (Kohn et al. 2019; Földvári et al. 2016). Darüber hinaus wurde

der Erreger auch mit anderen Zeckenarten wie *R. sanguineus*, *Haemaphysalis punctata* und *I. persulcatus* in Verbindung gebracht. *Ixodes ricinus*, auch als Gemeiner Holzbock bekannt, ist als hauptsächlicher Überträger von *A. phagocytophilum* in ganz Europa verbreitet und kommt auch in Deutschland endemisch vor (Strle 2004). Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass sich die Populationen dieser Zeckenspezies in Europa in den letzten Jahren vergrößert haben. Das ist einerseits auf Klimaveränderungen, andererseits auf ökologische Veränderungen in Verbindung mit menschlichem Einwirken zurückzuführen. Die Wirte für *I. ricinus* variieren je nach Habitat, angefangen bei kleinen Säugern über Vögel bis hin zu Großtieren wie Rindern und Wildwiederkäuern (Medlock et al. 2013). Da diese Zeckenspezies ein sehr breites Wirtsspektrum besitzt, befällt sie auch Menschen (Parola and Raoult 2001). Wildtiere stellen ein wichtiges Reservoir für die Zecken dar. Dabei wird die Expansion der Rehpopulationen in Europa als Hauptgrund für die Vermehrung von *I. ricinus* betrachtet (Medlock et al. 2013). Auch die sich vergrößernde Wildschweinpopulation in Deutschland wird als Ursache für die Vermehrung dieser Zeckenspezies hierzulande diskutiert (Schwarz et al. 2009). Viele Wildtiere sind durch ihre Bedeutung als Wirte für *I. ricinus* auch Reservoirwirte für *A. phagocytophilum* (Carrade et al. 2009; Ebani et al. 2008). Menschen, genauso wie Hunde, sind Fehlwirte des Erregers. Die Bakteriämie dauert bei ihnen nur wenige Wochen an. Damit sind sie an der Übertragung auf andere Organismen kaum beteiligt (Bakken and Dumler 2008; Ebani et al. 2008). Es ist bekannt, dass die oben genannten Fehlwirte anders auf eine Infektion mit *A. phagocytophilum* reagieren als die Reservoirwirte (Levin et al. 2004). Auch der Bakterienstamm spielt eine Rolle bei der Ausprägung der Erkrankung. In den verschiedenen Reservoirwirten, Fehlwirten und Zeckenspezies wurden unterschiedliche 16S rRNA-Varianten von *A. phagocytophilum* isoliert. Es ist möglich, dass ein Wirt verschiedene genetische Varianten des Bakteriums in sich trägt (Stuen et al. 2005). Zusätzlich konnten aufgrund phylogenetischer Untersuchungen klinische und nicht-klinische Stämme des Erregers voneinander unterschieden werden (Severo et al. 2012). Auch in Infektionsversuchen wurde beispielsweise gezeigt, dass Rinder infolge einer Infektion mit einem equinen Stamm nicht klinisch erkranken (Hoar et al. 2008).

2.2.4 Symptomatik und Diagnose

Symptomatik

Beim Fehlwirt Hund löst *A. phagocytophilum* die sogenannte Canine Granulozytäre Anaplasmosenose (CGA) aus (Ebani et al. 2008). Die durch das Pathogen verursachten Krankheitsbilder bei weiteren Fehlwirten wie dem Menschen (Humane Granulozytäre Ehrlichiose), den kleinen und großen Wiederkäuern (Weidefieber) und dem Pferd (Equine Granulozytäre Anaplasmosenose) werden hier nicht weiter erläutert, ähneln in ihrer Symptomatik jedoch der CGA (Carrade et al. 2009; Stuen 2007). Bei Hunden wurden klinische Symptome fast ausschließlich während der akuten, bakteriämischen Phase der Infektion beobachtet, die nach ein bis zwei Wochen Inkubationszeit eintritt. Die Erkrankung scheint selbstlimitierend zu verlaufen (Egenvall et al. 1998). Eindeutige Hinweise für chronische Infektionen gibt es bislang nicht. Die Symptome, zu denen unter anderem Lethargie, Fieber, Inappetenz sowie Schmerzen im Bewegungsapparat einhergehend mit Lahmheit gehören, sind unspezifisch. In einigen Fällen können auch respiratorische, gastrointestinale sowie neurologische Symptome, Splenomegalie, Ikterus oder Petechien auf Schleimhäuten auftreten (Carrade et al. 2009; Egenvall and Egenvall 2002). Hämatologische Untersuchungen zeigen häufig eine Anämie, Thrombozytopenie und Lymphopenie sowie erhöhte Leberenzymwerte (Chirek et al. 2018). Durch die Leukopenie und die dadurch herabgesetzte Immunabwehr kann es zu Sekundärinfektionen kommen (Carrade et al. 2009).

Diagnose

Infektionen mit *A. phagocytophilum* können direkt durch Mikroskopie oder PCR und indirekt durch die Bestimmung von Antikörpertitern diagnostiziert werden (Chapman et al. 2006). Mikroskopisch können Morulae in den befallenen Zellen, vor allem den neutrophilen Granulozyten, aus peripherem Blut nachgewiesen werden. Dafür werden Blutaussstriche mit der Giemsa-Färbung angefärbt. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass auch *Ehrlichia* spp., beispielsweise der in den USA verbreitete Erreger *E. ewingii*, Morulae in neutrophilen Granulozyten produzieren kann (Carrade et al. 2009). Zudem ist ein mikroskopischer Nachweis von Morulae nur in der akuten Phase der Infektion möglich. Bei unter Laborbedingungen infizierten Hunden wurde beobachtet, dass Morulae ab 4 Tage nach Infektion auftreten und 4-8 Tage nachweisbar sind (Egenvall et al. 1998). Auch in der akuten Phase können falsch-negative Ergebnisse bei der mikroskopischen Nachweismethode auftreten. Es konnte gezeigt

werden, dass in PCR-positiven Hunden Morulae nicht immer nachweisbar sind (Kohn et al. 2008). Es gibt verschiedene konventionelle und real-time PCR-Assays für den Nachweis von jeweils unterschiedlichen Genensequenzen. Die 16S rRNA-Genesequenz und die *msp2* (p44)-Genesequenz sind die am häufigsten gewählten Zielsequenzen, wobei ersteres häufig den Nachweis auf Gattungsebene und letzteres den Nachweis auf Spezies- sowie Genotypebene ermöglicht. Peripheres Blut, Buffy Coat, Knochenmark oder Milzgewebe können dabei als Probenmaterial verwendet werden (Carrade et al. 2009). Die PCR ist zu Beginn der akuten Krankheitsphase, insbesondere vor der Serokonversion, sensitiver als die serologischen Verfahren. IgG-Antikörper konnten unter Laborbedingungen ab ca. acht Tagen nach Infektion nachgewiesen werden (Carrade et al. 2009; Egenvall et al. 1998). Die serologische Diagnostik wird oft mittels IFAT-Verfahren durchgeführt (Carrade et al. 2009). Zusätzlich sind ELISA-Tests entwickelt worden, die rekombinante p44-Antigene zur Detektion von *A. phagocytophilum* nutzen. Allerdings sind serologische Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen *Anaplasma* spp. sowie zwischen *A. phagocytophilum* und *E. canis* bekannt (Sainz et al. 2015; Carrade et al. 2009). Zudem zeigt ein positives ELISA- oder IFAT-Ergebnis lediglich an, dass in der Vergangenheit Erregerkontakt bestand. Um den aktuellen Infektionsstatus bzw. den Infektionsverlauf abbilden zu können, sind zwei oder mehr Tests im zeitlichen Abstand von zwei bis vier Wochen notwendig. Eine vierfache Erhöhung des IgG-Antikörpertiters gilt als Nachweis einer aktiven Infektion (Sainz et al. 2015). Die Diagnostikverfahren werden weiterführend in Kapitel II 4 besprochen.

2.3 Ehrlichia canis

2.3.1 Morphologie und Vermehrungszyklus

In Morphologie und Vermehrungszyklus ähneln sich *Ehrlichia canis* und *Anaplasma phagocytophilum* (Kapitel II 2.2.1). Der Erreger ist ein pleomorphes, meist kokkoides Bakterium aus der Ordnung Rickettsiales. Das gramnegative Bakterium wird von Zecken übertragen und befällt die Monozyten bzw. Makrophagen eines Wirtes. Dort liegen meist mehrere Organismen zusammen als sogenannte Morulae in membranständigen, intrazytoplasmatischen Vakuolen vor (Rikihisa 1991). Diese Vakuolen haben gewöhnlich einen Durchmesser von 2 µm – 4 µm. In ihnen findet man, so wie bei *A. phagocytophilum*, die kleinere dichte Kernform und die größere retikuläre Form, welche sich durch Querteilung innerhalb der Morulae vermehrt (Popov et al. 1998). Die Zecke nimmt den Erreger zusammen

mit dem Wirtsblut auf. Anschließend entwickelt er sich in den Hämozyten, dem Darm und den Speicheldrüsen des Vektors und wird beim nächsten Saugakt an einen neuen Wirt weitergegeben (Smith et al. 1976).

2.3.2 Geographische Verbreitung

Der zunächst in Algerien, dann dem Mittleren Osten und Orient entdeckte Erreger *E. canis* gilt als nahezu weltweit verbreitet (Waner and Harrus 2013; Rikihisa 1991). Nachweise zu autochthonen Fällen bei Hunden in Deutschland gibt es bislang nicht. Die Vektorzecke *R. sanguineus* ist in Deutschland aufgrund der klimatischen Bedingungen nicht endemisch. Allerdings ist das Überleben bei kälteren Temperaturen von importierten *R. sanguineus* in beheizten Gebäuden oder Zwingern aufgrund der endophilen Lebensweise dieser Zeckenart (Kapitel II 1.2.3) nicht auszuschließen (Sainz et al. 2015; Gray et al. 2009).

2.3.3 Vektoren und Wirte

E. canis ist ein Erreger, der Haushunde und wilde Caniden infiziert. Dabei werden wilde Caniden als Reservoirwirte diskutiert (Fishman et al. 2004). Aufgrund der subklinischen Krankheitsphase der *E. canis*-Infektion sowie einer möglichen Erregerpersistenz bei Hunden, wird eine Reservoirfunktion von Haushunden ebenfalls in Betracht gezogen (Waner and Harrus 2000). Auch bei Menschen wurden Fälle von klinischer Ehrlichiose, ausgelöst von *E. canis*, dokumentiert (Perez et al. 2006). Als hauptsächliche Vektoren gelten Nymphen oder Adulte der Zeckenspezies *R. sanguineus*, die sich während des Larven- oder Nymphenstadiums infizieren und den Erreger transstadial weitergeben (Groves et al. 1975). Diese Zeckenart ist, wie in Kapitel II 1.2.3 beschrieben, aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit in vielen Regionen der Welt verbreitet (Gray et al. 2009; Parola et al. 2008). Eine in den USA vorkommende Schildzeckenart, *Dermacentor variabilis*, wurde in einer Studie unter Laborbedingungen als weiterer, potentieller Vektor identifiziert (Johnson et al. 1998).

2.3.4 Symptomatik und Diagnose

Symptomatik

E. canis löst bei Caniden die Canine Monozytäre Ehrlichiose (CME) aus, deren Inkubationszeit 8–20 Tage beträgt. Die Ausprägung der Symptome wird von der Immunkompetenz des Tieres beeinflusst (Waner and Harrus 2000). Die akute Phase dieser systemischen Infektion ist meist durch unspezifische Symptome wie hohes Fieber, Lethargie, Depression und Anorexie gekennzeichnet. Ebenfalls oft zu sehen sind Einblutungen in Haut und Schleimhäuten sowie Epistaxis, Schwellungen der Lymphknoten, Splenomegalie, Meningitis und okuläre Läsionen. Hämatologische Veränderungen in der akuten Krankheitsphase sind Leukozytopenie und Anämie. Es wird diskutiert ob die genannten pathologischen Veränderung von den Erregern selbst oder von hyperergischen Immunreaktionen, unter anderem im Zusammenhang mit freien Antikörpern und Immunkomplexen, ausgelöst werden (Waner and Harrus 2013). Eine Thrombozytopenie, hauptsächlich immunassoziiert und durch Anti-Thrombozyten-Antigene verursacht, ist bei vielen erkrankten Tieren zu finden (Harrus, Waner et al. 1996). Zudem wird eine vermehrte Aktivität von B-Lymphozyten und Plasmazellen unter anderem als Ursache für pathologische Veränderungen wie Lymphknotenschwellung und okuläre Läsionen vermutet (Waner and Harrus 2013). Des Weiteren wird laut einer Studie von Harrus et al. (1998) vermutet, dass die Milz als wichtige Komponente in der Immunantwort Einfluss auf die Pathogenese und die klinische Ausprägung der *E. canis*-Erkrankung hat, da in der genannten Studie splenektomierte Hunde einen mildereren Infektionsverlauf zeigten als Hunde, deren Milz nicht entfernt wurde. Während der subklinischen Krankheitsphase findet man kaum Veränderungen des Blutbildes, mit Ausnahme einer leichten Thrombozytopenie bei einigen Tieren (Waner et al. 1997). Diese Phase tritt nach zwei bis vier Wochen ein und dauert in der Regel 40-120 Tage an, in einigen Fällen aber auch Jahre lang (Codner and Farris-Smith 1986). In der chronischen Infektionsphase, die sich im Anschluss entwickeln kann, beobachtet man ebenfalls Lethargie, Anorexie und Depression. Hämatologische Untersuchungen zeigen oft eine Panzytopenie aufgrund von Knochenmarksaplasie. Neben der daraus resultierenden Anämie, kommt es durch eine Thrombozytopenie oft zu Hämorrhagien. Außerdem werden Sekundärinfektionen durch einen Mangel an Leukozyten begünstigt. Zusätzlich entsteht in vielen Organsystemen eine Vaskulitis gefolgt von Degenerationen und Nekrosen des Gewebes, die mit Blutungen, Ödemen sowie Plasmazell-, Lymphozyten-, und Makrophageninfiltrationen einhergehen (Waner and Harrus 2013; de Castro et al. 2004). Daher können in der chronischen Phase, neben der oft schon in der akuten Phase vorhandenen Splenomegalie, auch Meningitis,

Hepatitis oder okuläre Läsionen unterschiedlicher Ausprägung auftreten (Waner and Harrus 2013).

Diagnose

Für die Diagnose der caninen Ehrlichiose stehen serologische, molekularbiologische und mikroskopische Diagnostikverfahren zur Verfügung (Mylonakis et al. 2004). Mikroskopisch können Giemsa-gefärbte Ausstriche von peripherem Blut, Buffy Coat, Knochenmark oder Lymphknoten nach Morulae durchsucht werden. Dieses Verfahren ist allerdings nur in der akuten Krankheitsphase erfolgversprechend und hat selbst dann eine geringe Sensitivität (Mylonakis et al. 2003). Das serologische Verfahren IFAT ist, aufgrund seiner Sensitivität, der meist genutzte Test zur Diagnostik von *E. canis*-Infektionen. Allerdings birgt dieser Test die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen aufgrund der Kreuzreaktionen von *E. canis* mit *E. ewingii*, *E. chaffeensis* oder anderen *Ehrlichia* spp. und ebenso mit *A. phagocytophilum*, soweit diese Erreger in den jeweiligen Regionen endemisch sind (Carrade et al. 2009; Wen et al. 1997). Zudem ist es mit einem einzelnen Testergebnis nicht möglich zwischen einem aktuellen Infektionsgeschehen und behandelten bzw. genesenen Tieren zu unterscheiden (Wen et al. 1997). Auch falsch-negative Ergebnisse sind möglich, da es bis zu 28 Tagen dauern kann bis die Serokonversion einsetzt, Symptome sich aber bereits weitaus früher ausbilden können (Neer et al. 2002; Waner and Harrus 2000). Daher ist es notwendig, zwei oder mehr serologische Untersuchungen im zeitlichen Abstand von zwei bis vier Wochen durchzuführen, um zwischen aktiven Infektionen und Erregerkontakten in der Vergangenheit zu unterscheiden. Eine vierfache Erhöhung des IgG-Antikörpertiters gilt als Nachweis einer aktiven Infektion (Sainz et al. 2015). Zusätzlich zum IFAT-Verfahren stehen ELISA-Tests, darunter auch kommerziell verfügbare Tests zur Detektion von IgG-Antikörpern zur Verfügung (Harrus and Waner 2011). Trotz der oben genannten Nachteile der serologischen Tests gelten das IFAT- sowie das ELISA-Verfahren als wertvolle Diagnostikmethoden für den Nachweis von *E. canis*. Vor allem das IFAT-Verfahren wird weiterhin aufgrund seiner Sensitivität als „Goldstandard“ betrachtet (von Samson-Himmelstjerna 2019; Harrus and Waner 2011). Zusätzlich zu den genannten serologischen Nachweismethoden kann das Western-Blot-Verfahren zur Detektion von entsprechenden Antikörpern verwendet werden (Rikihisa et al. 1992). Auf molekularbiologischer Ebene wurden ebenfalls verschiedene Verfahren zur Detektion von *E. canis* entwickelt. Mittels verschiedener PCR-Tests ist ein spezifischer Nachweis des Erregers möglich. Dabei wurden unterschiedliche Genabschnitte verwendet. Wen et al. (1997)

beispielsweise benutzte die 16S rRNA-Gensequenz und etablierte eine spezifische nested PCR. Aber auch mit der *gltA*- und der p30-Gensequenz wurden *E. canis*-spezifische PCR-Verfahren entwickelt (Stich et al. 2002; Inokuma et al. 2001). Weitere Aspekte zu Diagnostikverfahren sind im Kapitel II 4 enthalten.

2.4 *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

2.4.1 Morphologie und Vermehrungszyklus

Cand. Neoehrlichia mikurensis gehört zu den *Anaplasmataceae*, genau wie die Gattungen *Ehrlichia* und *Anaplasma*. Der Erreger ist ein gramnegatives, pleomorphes Bakterium, welches sich intrazytoplasmatisch in membranständigen Vesikeln vermehrt. Der ca. 0,5-1,2 µm große Erreger befällt größtenteils Endothelzellen (Kawahara et al. 2004). Bei Menschen wurde das Bakterium auch in Granulozyten nachgewiesen (Pekova et al. 2011).

2.4.2 Geographische Verbreitung

Cand. Neoehrlichia mikurensis wurde zuerst in Japan entdeckt (Kawahara et al. 2004). Weitere Nachweise des Erregers unter anderem Namen gab es in China (*Ehrlichia*-like „Rattus strain“) und Italien (*Cand. Ehrlichia walkerii*) (Brouqui et al. 2003; Pan et al. 2003). Das Bakterium *Ehrlichia schotti* gleicht dem asiatischen Fund von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* in der 16S rRNA-Gensequenz zu 99% und lässt vermuten, dass es sich bei beiden um denselben Erreger handelt (Jahfari et al. 2012; Schouls et al. 1999). *E. schotti* wurde zuerst in den Niederlanden, dann in Russland und Deutschland entdeckt (von Loewenich et al. 2003; Alekseev et al. 2001). In den USA wurde ein Erreger bei Waschbären nachgewiesen, der *Cand. Neoehrlichia mikurensis* ähnelt und *Cand. Neoehrlichia lotoris* genannt wurde (Dugan et al. 2005). Unter dem Namen *Cand. Neoehrlichia mikurensis* wurde das Pathogen in den folgenden Jahren wiederholt in verschiedenen Ländern Eurasiens, auch in Deutschland, beschrieben (Rar et al. 2010; von Loewenich et al. 2010; Spitalska et al. 2008; Beninati et al. 2006; Naitou et al. 2006). Das Bakterium gehört zu den Erregern mit den höchsten Prävalenzen in der Zeckenspezies *I. ricinus* im europäischen Raum (Capelli et al. 2012; Jahfari et al. 2012; Lommano et al. 2012; Richter and Matuschka 2012). In Deutschland wurde *Cand. Neoehrlichia mikurensis* in Zecken, Nagetieren und Hunden nachgewiesen und gilt

daher als endemisch (Galfsky et al. 2019; Liesner et al. 2016; Krücken et al. 2013; Richter and Matuschka 2012).

2.4.3 Vektoren und Wirte

Als Vektor für *Cand. Neoehrlichia mikurensis* gelten Zecken der Gattung *Ixodes* (Kawahara et al. 2004). Zuerst wurde das Bakterium in der Zeckenspezies *I. ovatus* in Japan nachgewiesen, später auch in *I. persulcatus* in Russland sowie in *I. ricinus* in diversen europäischen Ländern, einschließlich Deutschland (Schreiber et al. 2014; Krücken et al. 2013; Jahfari et al. 2012; Lommano et al. 2012; Richter and Matuschka 2012; Spitalska et al. 2008; Kawahara et al. 2004). Zunächst wurden Nagetiere als Wirte identifiziert, da das Bakterium erstmals in *Rattus norvegicus* nachgewiesen wurde (Kawahara et al. 2004). Bislang konnte der Erreger in verschiedenen Spezies der Gattungen *Apodemus*, *Myodes* und *Microtus* nachgewiesen werden (Portillo et al. 2018). Es wird davon ausgegangen, dass Nagetiere als Reservoirwirte für den *Cand. Neoehrlichia mikurensis* fungieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine transplazentale Übertragung bei Nagetieren möglich ist (Obiegala et al. 2014). Berichte über Infektionen beim Menschen wurden ebenfalls publiziert (Grankvist et al. 2015; Fehr et al. 2010; Pekova et al. 2011; von Loewenich et al. 2010; Welinder-Olsson et al. 2010). Dabei handelt es sich meist um Sekundärinfektionen bei Patienten mit hämatologischen oder immunologischen Erkrankungen (Silaghi et al. 2016). Verschiedene Studien beschreiben den Nachweis des Pathogens in Zecken, die von Hunden abgesammelt wurden oder direkt in von Hunden stammenden Blutproben (Liesner et al. 2016; Potkonjak et al. 2016; Schreiber et al. 2014; Kamani et al. 2013). Ebenfalls nachgewiesen wurde der Erreger von Diniz et al. (2011) bei einem klinisch erkrankten Hund.

2.4.4 Symptomatik und Diagnose

Symptomatik

Bei dem von Diniz et al. (2011) beschriebenen Fall eines mit *Cand. Neoehrlichia mikurensis* infizierten Hundes wurden Lethargie, Hämorrhagien und starke subkutane Ödeme festgestellt. Die hämatologische Untersuchung zeigte geringgradige Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie. Als Auslöser für diese Symptome werden ein chirurgischer Eingriff und eine damit einhergehende Schwächung des Immunsystems diskutiert. Es besteht die Vermutung, dass der Hund bis zu dieser Operation asymptomatischer Träger des Erregers war (Diniz et al.

2011). Bei den humanen Infektionen dominierten Symptome wie Fieber, Gelenkschmerzen, Thrombembolien sowie multifokale Ödeme und Erytheme. Anämie, Leukozytose und geringgradige Thrombozytopenie wurden ebenfalls in fast allen Fällen festgestellt. Alle Patienten hatten einen Anstieg des C-reaktiven Proteins gemein. Wie bei dem erkrankten Hund, war möglicherweise auch bei den humanen Patienten eine Immunsuppression der Auslöser der klinischen Symptome (Silaghi et al. 2016; Pekova et al. 2011; Welinder-Olsson et al. 2010; von Loewenich et al. 2010). Bei Ratten wurde der Befall von Endothelzellen des Venensinus der Milz durch das Pathogen nachgewiesen (Kawahara et al. 2004). Daraus resultiert die Vermutung, dass die Symptome der Patienten auf den Endothelzelltropismus von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* zurück zu führen sind (Fehr et al. 2010; von Loewenich et al. 2010).

Diagnose

Cand. Neoehrlichia mikurensis bildet intrazytoplasmatischen Einschlüsse in den befallenen Zellen, die für Vertreter der Familie Anaplasmataceae charakteristisch sind (Kawahara et al. 2004; Rikihisa 1991). Elektronenmikroskopisch ist eine dünne innere und eine gewellte äußere Membran der intrazytoplasmatischen Vakuolen, welche die Bakterien enthalten, zu erkennen. Der Erreger ist mikroskopisch typischerweise in Endothelzellen zu finden, wurde aber bei einem humanen Krankheitsfall auch in Granulozyten des peripheren Blutes nachgewiesen (Pekova et al. 2011; Kawahara et al. 2004). Für die speziesspezifische Diagnostik auf molekularbiologischer Ebene wurden PCR-Verfahren zur Detektion des Citratsynthase-Gens *gltA*, des 16S rRNA-Gens und des Chaperonin-Gens *GroEL* entwickelt (Jahfari et al. 2012; Diniz et al. 2011; von Loewenich et al. 2010). Serologische Diagnostikmethoden wurden bisher nicht etabliert (Portillo et al. 2018). In einer humanmedizinischen Studie aus dem Jahr 2018 wurde berichtet, dass bei Patienten, die mittels PCR positiv auf *Cand. Neoehrlichia mikurensis* und negativ auf *A. phagocytophilum* getestet wurden, in einem IFAT-Verfahren Antikörper gegen *A. phagocytophilum* nachgewiesen wurden. Neben dem Nachweis von Erregerkontakten mit *A. phagocytophilum* in der Vergangenheit als ein möglicher Grund für dieses Ergebnis, könnten diese Befunde auch auf eine Kreuzreaktion zwischen den beiden Erregern hinweisen (Wass et al. 2018). Weitere Punkte zu Diagnostikverfahren sind in Kapitel II 4 enthalten.

2.5 *Rickettsia* spp.

2.5.1 Morphologie und Vermehrungszyklus

Erreger der Gattung *Rickettsia* sind pleomorphe, gramnegative Bakterien mit einer Länge von 0,3–2,0 µm und einer Breite von 0,2–0,5 µm (Dantas-Torres 2007). *Rickettsia* spp. der SFG werden meist durch Larven, Nymphen oder adulte Zecken während des Saugaktes auf Säugetiere übertragen (Parola et al. 2005). Die Erreger sind in den Zecken vorrangig im Verdauungstrakt und den Ovarien zu finden. Innerhalb der Zeckenpopulation können die Erreger transovariell auf die Eier und transstadial auf das nächste Entwicklungsstadium weitergegeben werden (Azad and Beard 1998). Im Falle von *R. rickettsii* wurde zusätzlich die Übertragung beim sogenannten „co-feeding“ dokumentiert, welches die Blutaufnahme am Wirt durch mehrere Zecken in unmittelbarer Nähe zueinander beschreibt (Philip 1959). Die Angaben zur benötigten Zeit für die Freisetzung aus den Speicheldrüsen der Zecke und die Übertragung auf den Säugetierwirt nach Beginn des Saugaktes variieren in der Literatur. Die Zeitspanne reicht von 2-10 Stunden bis 10-20 Stunden für *R. rickettsii* (Chapman et al. 2006). Im Falle von *R. rickettsii* wurde von zusätzlichen Infektionswegen durch den Kontakt mit Zeckenausscheidungen und –gewebe, Bluttransfusionen und unter Laborbedingungen auch durch Inhalation von Aerosolen berichtet (Dantas-Torres 2007; Wells et al. 1978; Oster et al. 1977). Bei *R. conorii* geht man von einer Transmission durch Kontakt des Bakteriums mit den Schleimhäuten des Wirtes aus (Nicholson et al. 2010). *R. felis* wird, im Gegensatz zu vielen anderen *Rickettsia* spp., mit den Ausscheidungen des Katzenflohs (*Ctenocephalides felis*) als Vektor über Hautläsionen übertragen (Azad and Beard 1998). In den letzten Jahren wurde *R. felis* zusätzlich auch in einer Vielzahl von Zecken-, Milben-, Mücken- und Flohspezies nachgewiesen, deren Rolle als mögliche Vektor bislang nicht geklärt wurde (Brown and Macaluso 2016; Reif and Macaluso 2009). Im Wirt gelangen die Erreger über das Blut oder die Lymphe in Gefäßendothelzellen und glatte Muskelzellen der Gefäßwände (Lacz et al. 2006). Die Erreger heften sich an die Oberfläche der Zelle und dringen in diese mit Hilfe ihrer Oberflächenproteine und Phospholipase ein (Thorner et al. 1998). Im Zellinneren sind sie entweder im Zytoplasma oder im Nukleus zu finden und nicht, wie viele andere intrazelluläre Bakterien, in Vakuolen der Wirtszellmembran (Lacz et al. 2006). Dort teilen sich die Mikroorganismen durch Querteilung (Walker 1995). Der Übergang auf benachbarte Zellen erfolgt über filopodienartige Ausstülpungen der Wirtszelle (Gouin et al. 2004). Auf infizierte Endothel- und Muskelzellen haben die Erreger der SFG einen zytopathischen Effekt (Walker et al. 1997).

2.5.2 Geographische Verbreitung

Das Vorkommen der Vertreter der SFG-Rickettsien wurden bis heute auf jedem Kontinent außer der Antarktis dokumentiert (Mahajan 2012). *R. rickettsii* wurde bei klinisch erkrankten Haushunden in den USA diagnostiziert, ist aber als Erreger des humanen RMSF in ganz Nord- und Südamerika endemisch (Nicholson et al. 2010; Thorner et al. 1998). *R. parkeri* wurde im Blut von Hunden in Brasilien gefunden und ist ein erst kürzlich entdecktes Humanpathogen, verantwortlich für Rickettsiosefälle in den USA und Uruguay (Labruna et al. 2007; Paddock et al. 2004). Für *R. felis* sind subklinisch infizierte Hunde in Brasilien und Australien sowie eine klinische Infektion bei einem Hund in Spanien bekannt (Hii et al. 2013; Labruna et al. 2007; Oteo et al. 2006). Über humane Rickettsiosefälle mit diesem Pathogen in Nord- und Südamerika, Afrika, Europa sowie Asien wurde in den vergangenen Jahren berichtet (Perez-Osorio et al. 2008). Für die in diesem Projekt beprobten Mittelmeerländer (Tabelle III-5) ist *R. conorii* endemisch und wurde bereits in Portugal und Italien bei erkrankten Hunden nachgewiesen (Alexandre et al. 2011; Solano-Gallego et al. 2006). Dieser Erreger ist ebenfalls in Afrika, dem Mittleren Osten und Asien verbreitet und ist dort für das Mediterranean Spotted Fever beim Menschen verantwortlich. Die Seroprävalenz für *R. conorii* bei Hunden liegt in südeuropäischen Regionen bei 20-60 %. Infektionen bleiben aufgrund ihrer meist subklinischen Ausprägung jedoch vielfach unerkant (Mahajan 2012; Solano-Gallego et al. 2006). Für Deutschland selbst liegen bislang keine Berichte über einen Nachweis von *R. conorii* bei Hunden vor. SFG-Erreger wie *R. slovaca*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, *R. helvetica* und *R. raoultii* wurden serologisch bei Hunden in Deutschland nachgewiesen sowie bei Zecken in Deutschland identifiziert und gelten hierzulande als endemisch (Wächter et al. 2015a; Schicht et al. 2012; Pluta et al. 2010).

2.5.3 Vektoren und Wirte

Zecken der Familie Ixodidae, darunter *Dermacentor* spp., *Amblyomma* spp., *Ixodes* spp. und *Rhipicephalus* spp. sind Vektoren und Reservoir der meisten SFG-*Rickettsia* spp. (Parola et al. 2005). Während einige Rickettsien wie *R. rickettsii* und *R. raoultii* mit verschiedenen Zeckenspezies als Vektoren assoziiert werden, gilt für *R. conorii* bislang *R. sanguineus* als einziger Vektor (Hamel et al. 2013; Pluta et al. 2010). Eine Ausnahme bei den Rickettsien bezüglich des Vektors bildet *R. felis*, welches nicht von Zecken sondern vom Katzenfloh *Ctenocephalides felis* übertragen wird (Angelakis et al. 2016). Zusätzlich werden seit Kurzem

verschiedene Mückenspezies als Überträger diskutiert. Mit *Anopheles gambiae* konnte unter Laborbedingungen gezeigt werden, dass diese Mückenspezies einen möglichen Vektor für *R. felis* darstellt (Dieme et al. 2015). Arthropodenvektoren zählen zu den Reservoirwirte für *Rickettsia* spp. (Dantas-Torres 2007). Auch der Haushund wird als Reservoirwirt in Betracht gezogen (Hii et al. 2013; Levin et al. 2012).

2.5.4 Symptomatik und Diagnose

Symptomatik

R. rickettsii löst beim Hund Fieber, Lethargie, Erbrechen und Anorexie aus. Im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf können okuläre Läsionen, Blutungsstörungen, Gelenkschmerzen sowie neurologische Störungen auftreten. Schwere und tödliche Krankheitsverläufe sind die Folge von unzureichender oder zu spät einsetzender Behandlung (Nicholson, Allen et al. 2010). Bei dem im mediterranen Raum verbreiteten humanpathogenen Erreger *R. conorii* konnten nach experimentellen Infektionen von Hunden ausschließlich an den Injektionsstellen Ödeme, Schmerzen, Rötung sowie regionale Lymphknotenschwellung festgestellt werden (Kelly, Matthewman et al. 1992). Allerdings berichteten Solano-Gallego et al. (2006) erstmals von Fällen natürlich infizierter Haushunde in Italien. Bei diesen Tieren wurden Lethargie, Anorexia, Vomitus und Lahmheit beobachtet. Auch Alexandre et al. 2011 vermuten in ihrer Studie klinische *R. conorii*-Infektionen aufgrund von positiven serologischen und molekularbiologischen Nachweisen bei klinisch auffälligen Hunden aus Portugal. Meist verläuft die Infektion mit *R. conorii* bei Hunden jedoch subklinisch (Nicholson, Allen et al. 2010). Mit dem ebenfalls im Mittelmeerraum vorkommenden Erreger *R. felis* wird bis heute ein einziger dokumentierter klinischer Krankheitsfall eines spanischen Hundes assoziiert. Dieser zeigte ein schlechtes Allgemeinbefinden mit Vomitus, Anorexie und Diarrhoe, wies allerdings kein Fieber auf (Oteo et al. 2006). Für die SFG-Rickettsien, *R. slovaca*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, *R. helvetica* und *R. raoultii*, die in Deutschland in Zecken nachgewiesen wurden (Kapitel II 2.5.2), sind bislang keine klinischen Infektionen bei Hunden bekannt (Wächter et al. 2015b). Bei engem Kontakt mit Haushunden besteht für den Menschen die Gefahr sich mit *Rickettsia* spp. zu infizieren (Levin et al. 2012; Nicholson et al. 2010; Paddock et al. 2002).

Diagnose

Die Möglichkeiten *Rickettsia* spp. mikroskopisch zu diagnostizieren sind aufgrund der kurzen und oft geringgradigen Bakteriämie beschränkt. Die Anzucht und der Nachweis mittels Zellkultur ist möglich, allerdings sind aufgrund des humanpathogenen Charakters vieler *Rickettsia* spp. entsprechende Sicherheitsvorkehrungen nötig (Nicholson et al. 2010; Chapman et al. 2006). Als „Goldstandard“ in der Humanmedizin gilt der serologische Nachweis mittels IFAT-Verfahren, das neben dem ELISA-Verfahren auch in der Tiermedizin oft verwendet wird (Reif and Macaluso 2009; Chapman et al. 2006). Frühestens ab dem siebten Tag nach der Erstinfektion steigen die Antikörpertiter an (Reif and Macaluso 2009). Um ein akutes Infektionsgeschehen zu bestätigen, wird empfohlen, zwei oder mehr Untersuchungen im Abstand von 2 bis 3 Wochen durchzuführen. Ein vierfacher Titeranstieg gilt als Nachweis einer akuten Erkrankung (Chapman et al. 2006). In serologischen Tests sind bislang Kreuzreaktionen bei verschiedenen SFG-Rickettsien untereinander sowie zwischen SFG- und TG-Rickettsien möglich, welche die Spezifität dieser Verfahren mindern können (Wächter et al. 2015b; La Scola and Raoult 1997). Kommerziell erhältliche serologische Tests sind bisher nur für die Unterscheidung zwischen *Rickettsia* der SFG und der TG geeignet (Wächter et al. 2015b). Eine Studie von Wächter et al. (2015b) konnte zeigen, dass eine Differenzierung verschiedener *Rickettsia* spp. aus der SFG mittels eines micro-IFAT-Verfahrens möglich ist. Verschiedene PCR-Assays für Blutproben, Hautbiopsien und Zecken sind etabliert und in der Humanmedizin zum Teil auch kommerziell verfügbar (Angelakis et al. 2012; Wen and Zhang 2012; Chapman et al. 2006; Ereemeeva et al. 2003). Da die Bakteriämie mit *Rickettsia* spp. nur von kurzer Dauer ist und auch während dieser Phase meist wenig Erreger im Blutkreislauf zirkulieren, wird es als sinnvoll erachtet, die PCR mit Gewebeproben und nicht mit Blut durchzuführen (Nicholson et al. 2010; Chapman et al. 2006). Weitere Aspekte zu Diagnostikverfahren sind in Kapitel II 4 enthalten.

3 Onchocercidae

3.1 Allgemeines

Die Überfamilie der Filarioidea gehört zum Stamm der Nematoda und unterteilt sich in die Familien Filariidae und Onchocercidae. Letztere ist mit mehr als 70 Gattungen bei Reptilien, Vögeln, Amphibien und Säugern verbreitet (Deplazes et al. 2013b). Viele Vertreter dieser Familie tragen Endobakterien der Gattung *Wolbachia* in sich (Ferri et al. 2011).

Untersuchungen zu dieser Symbiose haben bereits einige Erkenntnisse zur Biologie und zu den Pathogenitätsmechanismen der Onchocercidae erbracht, lassen jedoch Raum für weitere Forschung (Simon et al. 2012). Bei Haushunden in Europa kommen die zu den Onchocercidae zählenden *Dirofilaria immitis* und *Dirofilaria repens* am häufigsten vor (Genchi et al. 2011). Die zu der gleichen Unterfamilie gehörenden *Acanthocheilonema reconditum*, *Cercopithifilaria* spp. und *Acanthocheilonema dracunculoides*, die milde subcutane bzw. intraperitoneale Filariosen verursachen, sind dagegen bislang seltener bei Haushunden nachgewiesen worden (Tahir et al. 2019; Tarello 2011). Auch *Onchocerca lupi*, der okuläre Läsionen unter anderem bei Hunden sowie Menschen verursacht, ist in Europa endemisch (Tahir et al. 2019). In Deutschland wurde ein autochthoner Fall von Onchocercose eines Hundes nachgewiesen (Hodžić et al. 2018). Autochthone canine Infektionen mit dem Erreger *D. repens*, der im Unterhautgewebe parasitiert und dort Entzündungen auslöst, wurden im Norden und Süden Deutschlands ebenfalls nachgewiesen (Sassnau et al. 2013; Pantchev et al. 2009; Hermosilla et al. 2006). Für *D. immitis*, einem Parasiten des kardiovaskulären Systems, sind bislang keine autochthonen Infektionen von Hunden in Deutschland bekannt. Allerdings konnten sowohl *D. repens* als auch *D. immitis* in Mücken in Deutschland nachgewiesen werden (Kronefeld et al. 2014; Sassnau et al. 2014). Im Rahmen dieser Dissertation wurden Untersuchungen von Onchocercidae durchgeführt, die oben genannten und für Europa bedeutsamen Spezies eingeschlossen. Jedoch lag der besondere Fokus auf *D. immitis*, da dieser Parasit Krankheitsverläufe mit schweren kardiovaskulären Symptomen bei Hunden hervorrufen kann und der Nachweis des Erregers in Vektormücken in Deutschland vermuten lässt, dass eine natürliche Vermehrung und Übertragung von *D. immitis* hierzulande stattfinden kann (Kronefeld et al. 2014; Sassnau et al. 2014). Dieser Erreger wurde bereits im 17. Jahrhundert von Franco Birago zum ersten Mal erwähnt (Birago 1626). *D. immitis*, umgangssprachlich Herzwurm genannt, und *D. repens* sind nicht nur für Hunde pathogen sondern unter anderem auch für Menschen und daher für die Veterinär- und Humanmedizin relevant (Simon et al. 2012; Colwell et al. 2011; Genchi et al. 2011).

3.2 *Dirofilaria immitis*

3.2.1 Morphologie und Entwicklungszyklus

Die etwa 1 mm dicken, fadenartigen Nematoden besitzen am apikalen Ende eine Mundöffnung, um die sechs Papillen angeordnet sind. Das Männchen, dessen Hinterende spiralg aufgerollt

ist, kann bis zu 18 cm lang werden. Es trägt 2×5 präanale und 2×6 postanale Papillen am hinteren Ende. Die asymmetrischen Spiculae sind 180-300 µm und 300-375 µm lang. Das bis zu 30 cm lange Weibchen besitzt ein stumpfes Hinterende und eine ca. 3 mm vom apikalen Ende entfernt liegende Vulva. Die unbescheideten Mikrofilarien sind 220-340 µm lang und besitzen ein konisches Vorderende sowie ein gerades Hinterende. Diese Merkmale sind wichtige Kriterien zur morphologischen Unterscheidung von anderen bei Karnivoren vorkommenden Onchocercidae. Die Mikrofilarien von *D. immitis* sind unbescheidete Larven. Das erste Larvenstadium (L1) zirkuliert im Blut des Wirtes. Sie werden von Stechmücken (Culicidae) während einer Blutmahlzeit aufgenommen (Deplazes et al. 2013b). Stechmücken sind die Vektoren des Erregers, welcher sich in ihnen zur dritten Larve (L3) entwickelt. Die dafür benötigte Zeit ist abhängig vom Klima. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung des L1- zum L3-Stadium beispielsweise bei 27 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 80 % 10-14 Tage dauert. Unter 14 °C findet keine Weiterentwicklung statt (Morchon et al. 2012; Nelson et al. 2005). Die L3 werden beim nächsten Stechakt auf den neuen Wirt übertragen. Der Entwicklungszyklus in den Reservoirwirten, den wilden und domestizierten Caniden beginnt nach drei bis sieben Tagen mit der Häutung der L3 zur L4 im subkutanen Gewebe des Wirtes nahe der Einstichstelle. Nach 50-70 Tagen entwickelt sich daraus im Muskelgewebe das präadulte Stadium. Kurz darauf erreicht der Erreger über Venen die Arteria pulmonalis und den rechten Ventrikel des Herzens. Die Geschlechtsreife erreicht er ungefähr 120 Tage nach der Übertragung auf den Wirt. Nach sechs bis neun Monaten beginnen die weiblichen *D. immitis* Mikrofilarien zu produzieren. Diese L1 brauchen den Mückenvektor als Zwischenwirt, um sich in ihm zur infektiösen L3 weiterentwickeln zu können (Simon et al. 2012; Nelson et al. 2005). Dabei konzentrieren sich die Mikrofilarien in der Zeit der höchsten Flugaktivität der Vektoren, dem späten Nachmittag und frühen Abend, im peripheren Blut und außerhalb dieses Zeitraums in parenchymalen Blutgefäßen des Wirtes (Deplazes et al. 2013b). Die adulten Würmer bleiben vor allem in den pulmonalen Arterien. Zum Teil breiten sie sich bis in die rechte Herzkammer und die kraniale und kaudale Vena cava aus. Abgeschwemmte *D. immitis* sind selten auch in anderen Organen wie dem Gehirn, der Aorta oder den Augen zu finden (Venco and Vezzoni 2001).

3.2.2 Geographische Verbreitung

Endemisch ist *D. immitis* ursprünglich in warmen Klimazonen wie den tropischen, subtropischen oder mediterranen Regionen (Deplazes et al. 2013b). In den USA haben sich die

endemischen Gebiete von den Südstaaten aus in den Norden ausgedehnt. Heute sind sie in allen 50 US-Bundesstaaten endemisch (Nelson et al. 2005). In Europa war das Vorkommen des Erregers bis vor einigen Jahren zumeist auf südeuropäische Regionen wie Italien, Südfrankreich, Spanien, Portugal, Griechenland und die Türkei beschränkt (Morchon et al. 2012). Von sporadischen Fällen wurde in Russland sowie einigen ost- und zentraleuropäischen Ländern, darunter auch Deutschland, berichtet. Die meisten dieser Infektionen wurden jedoch bei importierten Tieren festgestellt, so dass bei diesen Ländern nicht von Endemiegebieten gesprochen werden konnte (Morchon et al. 2012; Zahler et al. 1997). Vermehrter Tourismus und Tiertransport, sowie die globale Erwärmung führten in der Vergangenheit jedoch zu einem Anstieg der Prävalenz von Infektionen mit *D. immitis* in Ländern, in denen der Erreger bis dahin nur sporadisch oder gar nicht zu finden war (Kronefeld et al. 2014; Giangaspero et al. 2013; Genchi et al. 2009). Dazu gehören Tschechien, Ungarn, Kroatien, Rumänien, Serbien, Bulgarien und Albanien (Morchon et al. 2012). Laut einer Studie basierend auf einer Befragung von Tierärzten werden auch in den baltischen Ländern Estland, Litauen und Lettland autochthone Infektionen mit *D. immitis* bei Hunden vermutet (Tiškina and Jokelainen 2017). Bei in verschiedenen Regionen Deutschlands gefangenen Vektormücken wurde ebenfalls *D. immitis* nachgewiesen (Kronefeld et al. 2014). Untersuchungen von Genchi et al. (2009) prognostizieren, dass die steigenden Temperaturen die Ausbreitung von *Dirofilaria* spp. zukünftig in Europa begünstigen können. In Deutschland wurde bei einer Studie im Bundesland Brandenburg DNA von *D. immitis* und *D. repens* in endemischen Mückenspezies nachgewiesen (Sassnau et al. 2014). Genchi und Kramer (2020) vergleichen in ihrer Publikation aktuelle Daten und beschreiben, dass Infektionszahlen in einigen westeuropäischen Ländern stagnieren oder sinken. Das begründen die Autoren damit, dass in den vergangenen Jahren viele Tierärzten und Tierbesitzer ein stärkeres Bewusstsein für Infektionen mit *D. immitis* bei Hunden entwickelt haben. In einigen mittel- und osteuropäischen Ländern wird hingegen ein Anstieg der Infektionszahlen beschrieben. Als Ursachen hierfür werden unter anderem fehlende Behandlung und Prävention, möglicherweise aus ökonomischen Gründen, sowie die große Anzahl an unbehandelten Straßenhunden in östlichen Regionen Europas vermutet (Genchi and Kramer 2020).

3.2.3 Vektoren und Wirte

D. immitis kann eine verschiedene Säugetieren infizieren, wobei das Pathogen am besten an Wild- und Haushunde angepasst ist. Diese stellen das Reservoir des Erregers dar (Simon et al.

2012). In nicht-caninen Wirten verläuft der Entwicklungszyklus zum Teil anders als beim Hund und bei wilden Caniden (Morchon et al. 2012; McCall et al. 2008). Beispielsweise in Katzen, Frettchen und Menschen erreichen die Nematoden oft nicht das adulte Stadium, produzieren also meist keine Mikrofilarien. Deshalb wird ihnen als Reservoirwirte keine große Bedeutung zugemessen (Genchi et al. 2009; Nelson et al. 2005). Als Zwischenwirte und Vektoren von *D. immitis* können fast 70 Arten der Familie Culicidae fungieren (Ludlam et al. 1970). Dazu zählen Mücken der Gattungen *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* und *Coquilletida*, wobei bei vielen Spezies von einer Vektorkompetenz ausgegangen wird, der experimentelle Beweis dafür aber noch nicht endgültig erbracht ist (Morchon et al. 2012; Cancrini et al. 2006). Im Mittelmeerraum sind vor allem *Culex pipiens* und *Aedes albopictus* als Vektoren relevant (Cancrini et al. 2006; Cancrini et al. 2003). Eine neue und invasive Mückenspezies, *Aedes koreicus*, wurde in Europa bislang in Italien, Belgien und dem südlichen europäischen Teil Russlands nachgewiesen. Die Vektorkompetenz für *D. immitis* wurde unter Laborbedingungen bestätigt (Montarsi et al. 2015).

3.2.4 Symptomatik und Diagnose

Symptomatik

Während Katzen und Menschen vorwiegend keine Mikrofilariämie aufweisen, meist asymptomatisch sind oder unspezifische respiratorische Symptome zeigen, sind beim Hund eine Vielzahl klinischer Ausprägungen der Infektion zu beobachten (Simon et al. 2009; Litster and Atwell 2008). Die canine kardiopulmonale Dirofilariose wird vor allem von adulten Würmern sowie ihre Symbionten *Wolbachia* ausgelöst und entwickelt sich meist zu einer chronischen Erkrankung (McCall et al. 2008; Kramer et al. 2005). Am häufigsten zeigen infizierte Hunde chronischen unproduktiven Husten mit Dys- oder Tachypnoe. Epistaxis oder Hämoptyse in Folge von pulmonalen Blutungen, die bis zum hypovolämischen Schock führen können, sind ebenfalls möglich (Simon et al. 2012). Die Ursache dafür ist eine durch die Erreger ausgelöste Vaskulitis der Lungenarterien. Entzündungsprozesse, Ödeme und Blutungen im Lungenparenchym sind eine direkte Folge der Vaskulitis und veränderten Permeabilität der Lungengefäße. Die Gefäßschäden können zu einem Stau im rechten Herzen mit Hypertrophie und Dilatation führen. Die Folgen sind Aszites, Hydrothorax, Hydroperikard und periphere Ödeme (Venco and Vezzoni 2001). Auch in anderen Organen wie Gehirn, Milz oder Augen können venöse Kongestionen durch abgeschwemmte Erreger auftreten. Die Leber kann

ebenfalls betroffen sein. Die dadurch entstehenden Hepathopathien können Ikterus und Koagulationsstörungen mit sich bringen (Simon et al. 2012). Die Antigene der verschiedenen Wurmstadien bewirken die Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen, die sich in der Niere ablagern und eine Glomerulonephritis einschließlich Folgeerscheinungen bis hin zur Niereninsuffizienz und Azotämie verursachen können (Paes-de-Almeida et al. 2003). Vor allem bei kleinen Hunden kann das sogenannte Vena-Cava-Syndrom auftreten, bei dem die rechte Herz-Vorhof und die kaudale Vena cava durch Würmer verstopfen und die Trikuspidalklappe behindern. Das führt zu einem Anstieg des venösen Drucks sowie Zirkulationsstörungen und kann eine Hämolyse mit Hämoglobinurie sowie einen plötzlichen Tod durch DIC auslösen. Ein plötzlicher Tod kann auch durch Thrombembolien aufgrund von abgeschwemmten Wurmern, durch Herzinsuffizienz, Lungeninsuffizienz oder Kachexie eintreten (Venco and Vezzoni 2001). Zusammenfassend werden die erkrankten Tiere je nach Schweregrad und Ausprägung ihrer Symptome in vier klinische Stadien, hier als Klassen bezeichnet, eingeteilt. Dabei beschreibt Klasse 1 eine milde Symptomatik und Klasse 4 die schwerste Form der Erkrankung, das Vena Cava Syndrom. Diese Einteilung ist bei der Wahl der Therapie zu berücksichtigen (Nelson et al. 2005).

Diagnose

Eine gängige, spezifische und sensitive Methode der Diagnose von *D. immitis* ist die Detektion von Antigenen der adulten weiblichen Würmer im Blut des infizierten Tieres. ELISA Tests und immunochromatographische Assays, die Infektionen mit adulten *D. immitis* ohne Mikrofilarien, mit mindestens einem adulten weiblichen Erreger erkennen, sind verfügbar und sehr sensitiv (Nelson et al. 2005). Basierend auf dem selben Prinzip sind auch verschiedene Schnelltests kommerziell erhältlich, bei denen in einem Vergleich zu einem etablierten ELISA eine hohe Sensitivität festgestellt wurde (Henry et. Al 2018). Trotzdem kann die Diagnose bei einer Infektion mit einer geringen Wurmzahl und damit wenig zirkulierenden Antigenen problematisch sein. Eine Detektion von zirkulierendem Antigen ist bei Infektionen mit ausschließlich männlichen Erregern nicht möglich. Bei der Untersuchung sollte bedacht werden, dass Antigene sowie Mikrofilarien frühestens fünf bis sechs Monate nach der Infektion zuverlässig detektierbar sind (Simon et al. 2012; Nelson et al. 2005). Mikrofilarien können mikroskopisch im Blut nachgewiesen werden nachdem sie durch den modifizierten Knott's Test konzentriert wurden. Bei diesem Verfahren werden die Erythrozyten in der Blutprobe durch Zugabe von 2 % Formalin lysiert. Das Gemisch wird zentrifugiert und im Anschluss wird

nur das zuvor mit Methylenblau gefärbte Sediment mikroskopisch nach L1 abgesucht (Nelson et al. 2005). Die Mikrofilarien der verschiedenen Onchocercidae besitzen zwar am zephalen und am hinteren Ende morphologische Unterschiede, trotzdem kann eine mikroskopische Speziesbestimmung schwierig sein (Deplazes et al. 2013b; Simon et al. 2012). Die histochemische Färbung der sauren Phosphatase-aktiven Regionen der Larven mit dem Farbstoff α -Naphthyl-AS-TR-Phosphat bietet eine Möglichkeit der morphologischen Unterscheidung (Tarello 2011; Chalifoux and Hunt 1971). Auch die Speziesdifferenzierung von *D. immitis* und *D. repens* sowie deren Unterscheidung von *Acanthocheilonema* spp. durch Vermessung der Mikrofilarien ist laut Magnis et al. (2013) möglich. Jedoch liegt nicht in jedem Infektionsfall eine Mikrofilariämie vor, beispielsweise bei einer Behandlung mit makrozyklischen Laktonen, bei einer geringen Wurmbürde oder bei einer Infektion mit nur männlichen Würmern (Nelson et al. 2005). PCR-Tests können auch bei geringgradiger Mikrofilariämie eine Infektion diagnostizieren. Es wurden bereits neben der konventionellen PCR auch Real-Time, High Resolution Melt Analysis (HRMA) und Multiplex-PCR-Tests zur Detektion von Filarieninfektionen bei Hunden entwickelt (Albonico et al. 2014; Latrofa et al. 2012a; Latrofa et al. 2012b; Gioia et al. 2010; Rishniw et al. 2006). Diese Verfahren, bei denen bisher vor allem Primer für die Genregionen ITS-1, ITS-2, 12S und coxI verwendet wurden, sind sensitiv und differenzieren *D. immitis* von anderen Onchocercidae des Hundes wie *D. repens* und *Acanthocheilonema reconditum* (Casiraghi et al. 2006; Rishniw et al. 2006; Mar et al. 2002; Favia et al. 1996). Neben der Labordiagnostik sind das Röntgen und die Echokardiographie ebenfalls Möglichkeiten die Erkrankung zu bestätigen und ihre kardiopulmonalen Auswirkungen zu beurteilen (Nelson et al. 2005). In Kapitel II 4 werden weitere Aspekte zu Diagnostikverfahren besprochen.

3.2 *Dirofilaria repens*

3.2.1 Morphologie und Entwicklungszyklus

Adulte *D. repens* mit ihren deutlichen kutikulären Längsstreifen sind kleiner als *D. immitis*. Die weiblichen Nematoden sind 100-170 mm lang und 4,6-6,5 mm breit. Die Männchen sind 50-70 mm lang und 3,7-4,5 mm breit. Bei beiden Geschlechtern biegt sich das kaudale, stumpfe Ende nach ventral. Das Männchen besitzt zwei laterale Schwanzflügel und je eine präanale und postanale gestielte Papille sowie zwei asymmetrische Spikulae am Hinterende. Die Vulva des Weibchens liegt 1,84-1,92 mm vom Kopfende entfernt. *D. repens* sind vivipar und produzieren

unbescheidete Mikrofilarien (L1). Diese sind 300-360 µm lang und 6-8 µm breit und haben ein spitzes Vorderende sowie ein stumpfes gebogenes Hinterende (Manfredi et al. 2007).

Die Mikrofilarien zirkulieren im Blut des Wirtes und werden mit der Blutmahlzeit von Mücken, die als Vektoren fungieren, aufgenommen. In ihren Malphigischen Gefäßen entwickeln sich die L1 zu den infektiösen L3 weiter. Danach wandern sie innerhalb der Mücke zu den Stechorganen. Beim Stechakt werden sie auf die Haut des Wirtes entlassen, von wo aus sie aktiv über die Stechwunde in die Wirtshaut eindringen. Im subkutanen Gewebe entwickeln sie sich innerhalb von 27 bis 34 Wochen zu Adulten. Die Patenzzeit beträgt 5-7 Jahre (Sassnau and Genchi 2013). Wie für *D. immitis* ist auch hier das Klima der ausschlaggebende Faktor für die Entwicklung innerhalb des Vektors. Dies kann je nach Temperatur und Luftfeuchtigkeit variieren und dauert 8–10 Tage bei 28–30 °C, 11–12 Tage bei 24 °C und 16–20 Tage bei 22 °C (Bockova et al. 2013).

3.2.2 Geographische Verbreitung

D. repens gilt in Afrika, Asien sowie im mediterranen Ost- und Südeuropa als endemisch (Capelli et al. 2018; Trotz-Williams and Trees 2003). Von autochthone Infektionen bei Hunden in verschiedenen süd-, mittel- und osteuropäischen Ländern wurde bereits berichtet (Capelli et al. 2018). Entsprechend der Ergebnisse einer Studie aus 2016 basierend auf einer Befragung von Tierärzten in den baltischen und skandinavischen Ländern Estland, Litaunien, Lettland, Schweden, Norwegen und Finnland, werden in den baltischen Ländern autochthone Infektionen mit *D. repens* bei Hunden vermutet (Tiškina and Jokelainen 2017). Der Parasit verbreitet sich zunehmend in Europa. Als Ursachen hierfür werden unter anderem der oft subklinische Infektionsverlauf bei Hunden sowie ein mangelndes Bewusstsein für den Erreger *D. repens* in nicht-endemischen Regionen Europas genannt (Genchi and Kramer 2020; Capelli et al. 2018). In Deutschland wurden ein autochthone Fall in Baden-Württemberg sowie drei autochthone Krankheitsfälle bei Hunden im Rheintal beschrieben (Pantchev et al. 2009; Hermosilla et al. 2006). Auch in Brandenburg gab es Berichte über Erkrankungen in einem Schlittenhunderudel, in dem autochthone Infektionen vermutet wurden (Sassnau et al. 2013; Sassnau et al. 2009). Der erste autochthone Fall eines infizierten Menschen in Deutschland (Sachsen-Anhalt) wurde von Tappe et al. (2014) beschrieben. Sowohl *D. repens* als auch *D. immitis* wurden bei endemischen Mückenspezies in Brandenburg nachgewiesen (Czajka et al. 2014). Die Analyse deutscher Wetterdaten von Sassnau et al. (2014) sowie eine weitere Studie von Sassnau et al.

(2013) ergaben, dass die klimatischen Bedingungen für eine Entwicklung des Erregers vom L1- zum L3-Stadium in den Vektoren in bestimmten nordöstlichen und südwestlichen Regionen Deutschlands, speziell in den Bundesländern Brandenburg und Baden-Württemberg, ausreichen und damit die Vermehrung von *D. repens* in Deutschland möglich sein könnte.

3.2.3 Vektoren und Wirte

Mücken der Gattungen *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* und *Coquillettidia* sind als Vektoren für *D. repens* bekannt (Capelli et al. 2018; Sassnau and Genchi 2013). *Cx. pipiens pipiens* und *Ae. albopictus* gelten als hauptsächliche Vektormücken in Südeuropa. In Mitteleuropa werden die Mückenart *Ae. vexans* und Stechmücken aus dem *Cx. pipiens*-Komplex als Vektoren vermutet. Weitere in Europa heimische Mückenarten, die ebenfalls potentiell als Vektoren für *D. repens* fungieren könnten, sind *Anopheles algeriensis*, *Anopheles daciae*, *Anopheles maculipennis* (s.l.), *Aedes caspius* und *Culiseta annulata* (Capelli et al. 2018). Wirte sind Hunde und andere Caniden sowie Katzen und Menschen (Manfredi et al. 2007). *D. repens* gilt weltweit als Auslöser der häufigsten zoonotischen Dirofilariose (Albanese et al. 2013; Colwell et al. 2011). Menschen sind jedoch Fehlwirte, in denen sich die Nematoden nur sehr selten zur Geschlechtsreife entwickeln und vermehren können (Melsom et al. 2011). Daher bilden die betroffenen Personen in vielen Fällen keine spezifischen Symptome aus und die Infektion bleibt unentdeckt (Capelli et al. 2018).

3.2.4 Symptomatik und Diagnose

Symptomatik

Infektionen mit *D. repens* bei Hunden verlaufen oft subklinisch. Allerdings können auch unspezifische Symptome wie Juckreiz, Rötung, Pusteln, Unterhautknötchen, Hyperpigmentierung oder Alopezie auftreten (Albanese et al. 2013). Auch Konjunktivitiden ausgelöst durch die Ansiedlung der Nematoden in den Bindehäuten wurden beschrieben (Hermosilla et al. 2006). Von gastrointestinalen Symptomen, Anorexie und Lethargie wurden ebenfalls berichtet (Tarello 2002; Tarello 1999). Die Symptome werden durch toxische und mechanische Veränderungen im Unterhautgewebe oder die immunologische Reaktion des Wirtes auf den Parasiten ausgelöst (Tarello 2002).

Diagnose

Mikroskopisch ist eine Diagnose nach vorangegangenem Knott's Test (Kapitel II 3.2.4) unter Verwendung von Blutproben aus der Körperperipherie möglich. Dabei kann anhand der Maße der Mikrofilarien zwischen *Acanthocheilonema* spp., *D. immitis* und *D. repens* unterschieden werden (Magnis et al. 2013). Bei der Entnahme von Blutproben ist zu beachten, dass die Anzahl der im Blut zirkulierenden Mikrofilarien von *D. repens* im Wirt saisonal variiert, wobei bei höheren Außentemperaturen, vorwiegend im Spätsommer, mit einer größeren Anzahl Mikrofilarien im Blut zu rechnen ist (Tarello 2011; Cancrini et al. 1975). Die histochemische Färbung wird, wie bereits in Kapitel II 3.2.4 erwähnt, ebenfalls zur morphologischen Unterscheidung beider Nematodenspezies verwendet (Tarello 2011). Serologische Tests zur Detektion von im Blut zirkulierenden Antigenen weiblicher adulter Würmer sind bislang nur für den Nachweis von adulten weiblichen *D. immitis* etabliert (Capelli et al. 2018). Wie in Kapitel II 3.2.4 erwähnt, existieren verschiedene sensitive PCR-Tests zum Nachweis von *D. repens*, darunter Multiplex-Methoden sowie Real-Time und High Resolution Melt Analysis (HRMA) (Albonico et al. 2014; Latrofa et al. 2012a; Latrofa et al. 2012b; Gioia et al. 2010; Rishniw et al. 2006). Weitere Punkte zu Diagnostikverfahren werden in Kapitel II 4 besprochen.

4 Diagnostikverfahren

4.1 Mikroskopie

Die gängige Diagnostikmethode für die in der vorliegenden Arbeit relevanten Erreger ist, neben den verschiedenen serologischen und molekularbiologischen Verfahren, die Mikroskopie. Der lichtmikroskopische Nachweis mit Blut, Buffy Coat und anderem Probenmaterial ist meist in seiner Spezifität und Sensitivität limitiert, wenn auch einfach und kostengünstig durchführbar. Außerdem ist die Anwendung in den chronischen oder subklinischen Krankheitsphasen, in denen die Erreger kaum im Blut zirkulieren, wenig sinnvoll. Falsch-negative Ergebnisse sind daher möglich (Buchan et al. 2019). Die Speziesdifferenzierung der meisten Erreger, wie beispielsweise von „kleinen“ *Babesia* spp. und „großen“ *Babesia* spp. ist mit dieser Methode nicht möglich (Irwin 2009). Auch die Unterscheidung zwischen *Anaplasma* spp. und *Ehrlichia* spp. ist lichtmikroskopisch nicht durchführbar (Carrade et al. 2009). Das gleiche gilt für den Nachweis von *Rickettsia* spp. und anderen Erregern die aufgrund ihres Gewebetropismus nur kurze Zeit oder in geringer Anzahl im Blutkreislauf zu finden sind (Chapman et al. 2006).

4.2 Serologische Diagnostikverfahren

Serologische Nachweismethoden für vektorübertragene Erreger sind in der chronischen Krankheitsphase sensitiv und nur eingeschränkt in der akuten Krankheitsphase anwendbar (Carrade et al. 2009). Für die oben genannten Pathogene sind verschiedene serologische Testverfahren etabliert (Kapitel II, Abschnitte zur Symptomatik und Diagnose). Allerdings sind nicht alle serologischen Methoden gleich effizient. Der ELISA, mit dem zeitgleich eine hohe Probenanzahl mit Hilfe von automatisierten Pipettier-, Wasch- und Auslesemethoden untersucht werden kann, ist gegenüber dem IFAT weniger zeit- und arbeitsaufwendig. Zudem sind einheitlich maschinell ausgelesene Testergebnisse weniger anfällig für Auslesefehler des Laborpersonals (Josko 2012; Mosqueda et al. 2012). Während das IFAT-Verfahren eine quantitative Auswertung verschiedener Antikörpertiter eines Patienten ermöglicht, steht beim ELISA-Verfahren die Messung der optischen Dichte zur Verfügung. Eine Titration der Seren ist im ELISA ebenfalls grundsätzlich möglich, bei der Etablierung und Evaluierung der Tests auch wichtig, in der diagnostischen Praxis aber unüblich (Kemeny 1992). Kommerzielle qualitative ELISA-Schnelltests für den Nachweis von *Anaplasma* spp. und *Ehrlichia* spp. sowie *D. immitis* sind verfügbar, geben aber ausschließlich eine „Ja/Nein-Antwort“ (Sainz et al. 2015; Nelson et al. 2005). Generell sind quantitative Laborverfahren, wie die für den Nachweis von Anaplasmen und Ehrlichien verfügbare IFAT-Methode, sensitiver im Vergleich zu den bislang kommerziell erhältlichen Schnelltests (Sainz et al. 2015; Harrus and Waner 2011). Zusätzlich zu den genannten serologischen Nachweismethoden kann das Western-Blot-Verfahren zur Detektion von entsprechenden Antikörpern und zur Differenzierung von Erregern verwendet werden (La Scola and Raoult 1997; Rikihisa et al. 1992). Nachteile dieser Methode sind die hohen Kosten und der hohe Zeit- sowie Arbeitsaufwand im Vergleich zum IFAT und ELISA, die gegen den Einsatz als routinemäßige Diagnostikmethode sprechen (Iqbal et al. 1994). Zum Nachweis von *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. sowie *Rickettsia* spp. werden serologische Verfahren verwendet, mit denen die Detektion von IgG- und IgM-Antikörpern möglich ist (Chapman et al. 2006; La Scola and Raoult 1997). Allerdings gelten IgM-Antikörper, die auf eine frische Infektion hinweisen, bei der *E. canis*-Diagnostik nicht als verlässliche Indikatoren, da diese Antikörper möglicherweise aufgrund des nur kurzzeitigen Titeranstiegs zu Beginn der Infektion schwierig zu detektieren sind (McBride et al. 2003). Auch für *A. phagocytophilum* wird der Nachweis von IgG-Antikörpern empfohlen, da der Nachweis von IgM-Antikörpern laut einer Studie von Walls et al. (1999) nur während der ersten 40 Tage nach Erstkontakt mit dem Erreger möglich ist und auch in diesem Zeitfenster als wenig sensitiv gilt (Bakken and

Dumler 2008). Der Körper benötigt je nach Erreger einige Tage bis Monate, um die Serokonversion abzuschließen. Somit sind häufig bereits Krankheitssymptome vorhanden, bevor die nachzuweisenden Antikörper produziert wurden (Mosqueda et al. 2012; Carrade et al. 2009; Nelson et al. 2005). Bei der serologischen Diagnostik von *Babesia* spp. ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass Hunde Impfantikörper aufweisen können, die dazu führen, dass die serologischen Testergebnisse nicht aussagekräftig sind (von Samson-Himmelstjerna 2019; Mosqueda et al. 2012). Mittels Nachweis von Antikörpern ist eine Unterscheidung zwischen aktiven Infektionen und Erregerkontakt in der Vergangenheit bzw. die Darstellung des Infektionsverlaufes und eine Therapiekontrolle nur durch zwei oder mehr serologische Untersuchung des Patienten im Abstand von mehreren Wochen möglich (Solano-Gallego et al. 2016; Sainz et al. 2015; Chapman et al. 2006). Erst ab einem vierfachen Titeranstieg wird beim serologischen Nachweis von *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. und *Rickettsia* spp. von einer akuten Erkrankung ausgegangen (Sainz et al. 2015; Chapman et al. 2006). Ausgenommen hiervon ist der Nachweis des Erregers *D. immitis* über zirkulierendes Antigen, der unabhängig von der Serokonversion des Patienten durchgeführt wird (Kapitel II 3.3.4). Bei diesem Erreger ist ein serologisches Testergebnis erst fünf bis sechs Monate nach Infektion aussagekräftig (Simon et al. 2012; Nelson et al. 2005). Ein weiterer Aspekt, der zu berücksichtigen ist, sind mögliche Kreuzreaktionen in den ELISA- und IFAT-Verfahren, wie beispielsweise zwischen einigen *Ehrlichia* spp., zwischen *Anaplasma* spp. und *E. canis*, zwischen SFG-Rickettsien untereinander sowie zwischen verschiedenen *Babesia* spp. (Solano-Gallego et al. 2016; Wächter et al. 2015b; Carrade et al. 2009; Wen et al. 1997). Aus den oben genannten Gründen kann es zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnisse bzw. Falschinterpretationen der Testergebnisse bei serologischen Untersuchungsmethoden kommen. Daher kann es notwendig sein andere Diagnostikverfahren anzuwenden oder gegebenenfalls Verfahren zu kombinieren (von Samson-Himmelstjerna 2019; Sainz et al. 2015; Nelson et al. 2005; Reif and Macaluso 2009).

4.3 Molekularbiologische Diagnostikverfahren

Neben den serologischen gibt es molekularbiologische Diagnostikmethoden, die ebenfalls bei den Erregern zur Anwendung kommen, die in diesem Projekt thematisiert wurden (Kapitel II Abschnitte zur Symptomatik und Diagnose). Ein mögliches Verfahren ist die Anzucht des Erregers in einer Zellkultur mit anschließendem Nachweis. Beispielsweise bei der Anzucht von

E. canis werden Monozyten aus dem Blut des zu untersuchenden Tieres separiert und in eine Makrophagenzellkultur eingebracht (Iqbal et al. 1994). Diese Methode ist zwar zuverlässig und sensitiv aber sehr zeitaufwendig und kostspielig. Bei der Anzucht von humanpathogenen Erregern mittels Zellkultur ist zu beachten, dass entsprechende Sicherheitsvorkehrungen im Labor nötig sind (Nicholson et al. 2010; Chapman et al. 2006). Zudem ist diese Methode zum Nachweis von *Rickettsia* spp. laut Angelakis et al. (2012) weniger sensitiv im Vergleich zu serologischen Verfahren und dem direkten Nachweis mittels PCR. Mittlerweile stehen auf molekularbiologischer Ebene einfachere, sensitive und spezifische Tests zur Verfügung (Wen et al. 1997). PCR-Verfahren bieten die Möglichkeit einer sensitiven und spezifischen Diagnostik von Erregern direkt aus Blut- oder Gewebeproben und werden vermehrt als Methode zum Nachweis und zur Differenzierung verschiedener vektorübertragener Krankheitserreger empfohlen (Tahir et al. 2019; Albonico et al. 2014; Mosqueda et al. 2012). Der direkte Nachweis von Erregern in Probenmaterial mittels PCR ermöglicht neben der Diagnose eines aktuellen Infektionsgeschehens auch die Bestätigung einer Genesung bzw. die Bestätigung, dass ein Therapieansatz erfolgreich war. PCR-Verfahren können bereits zu Beginn einer Infektion und zum Teil auch vor dem Einsetzen der Symptome, sensitive Ergebnisse liefern während serologische Verfahren in der Regel ab einem späteren Zeitpunkt im Infektionsverlauf verlässliche Nachweise liefern können (Buchan et al. 2019; Mosqueda et al. 2012; Carrade et al. 2009). Zusätzlich bietet die PCR-Methode den Vorteil, dass auch eine geringe Anzahl von Erregern in Probenmaterial detektiert werden kann (Buchan et al. 2019). In diesem Zusammenhang konnte in einer humanmedizinischen Studie von Schotthoefer et al. (2013) gezeigt werden, dass, bei Verwendung eines PCR-Verfahrens anstatt der mikroskopischen Nachweismethode, das Zeitfenster für eine Diagnose von *A. phagocytophilum* um bis zu 30 Tage erweitert werden konnte. Trotz der genannten Vorteile bleiben die PCR-Verfahren zum Nachweis von vektorübertragenen Erkrankungen größtenteils spezialisierten Laboren vorbehalten, in denen die PCR-Assays von speziell ausgebildetem Personal durchgeführt werden müssen (Buchan et al. 2019; Mosqueda et al. 2012). Zudem sind auch bei PCR-Verfahren falsch-negative Ergebnisse beispielsweise durch Medikamentengaben oder intermittierender Bakteriämie sowie falsch-positive Ergebnisse beispielsweise durch die Verwendung von unspezifischen Primern möglich (Sainz et al. 2015; Angelakis et al. 2012). Aufgrund der beschriebenen Einschränkungen bei den einzelnen molekularbiologischen, serologischen sowie mikroskopischen Testmethoden besteht generell die Möglichkeit von falsch-negativen oder falsch-positiven Testergebnissen. Daher kann eine Kombination der verschiedenen Verfahren sinnvoll sein (von Samson-Himmelstjerna 2019; Sainz et al. 2015;

Reif and Macaluso 2009; Nelson et al. 2005). Speziell um den Nachweis einer aktiven Infektion zu erbringen, kann die PCR verwendet werden, da die Detektion von Erreger-DNA im Probenmaterial auf eine aktive Infektion hinweist (Sainz et al. 2015). Zudem wird empfohlen, die Therapieentscheidung nicht ausschließlich anhand dieser Verfahren zu treffen, sondern auch auf die Anamnese und die klinischen Symptome zu stützen (Nicholson et al. 2010).

4.4 Multiplex-Diagnostikverfahren

4.4.1 Die Multiplex-PCR

Ein weiterer Vorteil der PCR-Methode ist die Möglichkeit des Multiplex-Ansatzes, d.h. die gleichzeitige Untersuchung verschiedener Erreger in Patientenproben innerhalb einer Reaktion. Die erste Multiplex-PCR wurde bereits im Jahre 1988 beschrieben (Chamberlain et al. 1988). Seitdem wurden Verfahren dieser Art für DNA-Nachweise in verschiedenen molekularbiologischen Bereichen verwendet, da sie neben Zeit- und Arbeitsaufwand auch Proben- und Labormaterial einsparen und somit effektive Diagnostikmethoden zur Untersuchung einer größeren Probenanzahl darstellen (Sint et al. 2012). Neben den genannten Vorteilen sind allerdings Komplikationen möglich, wenn mehrere Primerpaare in einer Reaktion kombiniert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass einige DNA-Fragmente bevorzugt und andere dafür weniger effektiv amplifiziert werden. Das kann reduzierte Sensitivität und Spezifität der Multiplex-PCR verursachen. Dies muss im Etablierungsprozess beachtet und gegebenenfalls optimiert werden (Wen and Zhang 2012; Markoulatos et al. 2002).

4.4.2 Der Reverse Line Blot (RLB)

Ein weiteres Multiplex-Verfahren ist der RLB. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Identifizierung der Unterschiede von PCR-Sequenzen mittels spezifischer Sonden, die auf einer Membran immobilisiert wurden. Dabei können verschiedene Amplikons simultan mit unterschiedlichen Sonden getestet werden (Gubbels et al. 1999). Mittels RLB ist die simultane Detektion von 43 verschiedenen PCR-Sequenzen auf einem 45-reihigen Membranformat möglich. Damit handelt es sich um ein zeit- und materialsparendes Verfahren, das für eine Vielzahl an epidemiologischen und klinischen Untersuchungen geeignet ist. Nachteile dieser Methode sind, dass geschultes Personal und eine sorgfältiges Design von Sonden und PCR-Sequenzen nötig sind, um die gewünschten Ergebnisse zu erzielen (Kong and Gilbert 2006).

Die verwendeten PCR-Sequenzen müssen die gleichen Temperaturen für die Kopplung an die Sonden aufweisen, da unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen zu einer verringerten Sensitivität des RLB führen können (Georges et al. 2012). Für vektorübertragene canine Pathogene wie *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. und *Reickettsia* spp. wurden RLB-Assays bereits etabliert (Matjila et al. 2008; Matjila et al. 2005; Matjila et al. 2004)

4.4.2 Bead-basiertes Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®)

Eine weitere Methode, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (Kapitel III 2.4) und wie der RLB ebenfalls auf dem Prinzip der Kopplungsreaktion zwischen einer Sonde und einem PCR-Produkt beruht, ist das neuartige Bead-basiertes Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®). Das Verfahren basiert auf der Luminex®-xMAP®-Technologie und nutzt Mikrosphären, sogenannte Beads, mit deren Hilfe Erregernachweise mittels Farbdetektion sowie Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden. Diese Technologie bietet die Möglichkeit einer qualitativen und quantitativen Untersuchung von Probenmaterial. Die Beschaffenheit der Mikrosphären-Oberfläche ermöglicht eine Kopplung von spezifischen Oligonukleotidsequenzen, welche die Analyte binden (Houser 2012). Damit ist es möglich bis zu 100 verschiedene Analyte innerhalb eines Reaktionsansatzes nachzuweisen. Deshalb bietet sich das Luminex®-xMAP®-Verfahren als Routinediagnostikmethode bei hohem Probenaufkommen an und wird dafür bereits in der veterinärmedizinischen und humanmedizinischen Diagnostik genutzt (Reslova et al. 2017; Chen et al. 2015; Dunbar 2006). Serologische Multiplex-Assays basierend auf der Luminex®-Technologie zur Detektion von Antikörpern sowie Zytokinen und anderen Proteinen existieren bereits seit einigen Jahren (Karanikola et al. 2015; Lin et al. 2015; Houser 2012; de Jager and Rijkers 2006; Waterboer et al. 2006). Auch verschiedenste Multiplex-Verfahren zur Detektion von Nukleinsäuren sind etabliert und werden unter anderem in der Routinediagnostik verwendet (Chen et al. 2015; Ros-Garcia et al. 2013; Zubach et al. 2012; Dunbar 2006; Schmitt et al. 2006). Zusammengefasst stellt das Luminex®-xMAP®-Verfahren aufgrund der Möglichkeit eines simultanen Nachweises einer Vielzahl von Analyten innerhalb eines Reaktionsansatzes eine kosten- zeit-, sowie probenmaterialsparende Diagnostikmethode dar, die bei Bedarf flexibel erweitert und angepasst werden kann (Reslova et al. 2017).

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Verbrauchsmaterialien

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland	0,2 ml Soft Tubes, PCR Single Cap 8er-Soft Strips 0,2 m
Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	FTA® CLASSIC Karten, FTA®-Taschen MAXI, FTA® Harris Uni-Core™ Stanze 1,2mm, FTA® Harris Schneidematte 6, 25 cm x 7,6cm Chemikalienlöffel (verschiedene Größen), Gewindeflaschen (0,1 l, 0,25 l, 0,5l, 1 l), KIMTECH® Pure Mehrfachwischtücher, Parafilm® M, Rotibo®-Skalpellen-Klingen, Rotilabo®- Einmal-Wägeschalen (verschiedene Größen), Rotilabo®-Sterilindikatorbänder, Rotiprotect®-Latexhandschuhe Typ 1 puderfrei , Rotiprotect®-Nitrilhandschuhe puderfrei, Rotizell® Tissue-Tücher
HJ-Bioanalytik GmbH, Mönchengladbach, Deutschland	Aluminium-Abdeckfolie

Nerbe Plus, Winsen/Luhe, Deutschland	<p>Filterspitze PP natur 0,5 - 10 µl, extra lang (Typ Eppendorf)</p> <p>Filterspitze PP natur 0 - 200 µl, graduiert</p> <p>Filterspitze PP natur 100 - 1000 µl</p>
Pall GmbH, Dreieich, Deutschland	Biodyne ® C Membran, Nylon, 0.45 µm
Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland	<p>Pipettenspitzen farblos 10 µl (Typ Gilson, lang), Pipettenspitzen gelb 200 µl,</p> <p>Pipettenspitzen blau 1000 µl,</p> <p>Pipettenspitzen 5 ml (Typ Eppendorf),</p> <p>Reagenz- und Zentrifugenröhren (50 ml, 120 ml),</p> <p>Safe Seal – Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)</p>
Sigma-Aldrich, München, Deutschland	BILATEST™ magnetic separator

1.2 Reagenzien

BD, Heidelberg, Deutschland	Bacto™ Agar
Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	<p>Chelex 100® Resin (sodium form, 100–200 mesh)</p> <p>Sheath-Flüssigkeit</p>
BODE Chemie, Hamburg, Deutschland	Bacillol® plus
Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland	<p>2-Propanol ROTISOLV®, ≥99,95 %, LC-MS-Grade,</p> <p>Bromphenolblau 3,3',5,5'-</p> <p>Tetrabromphenolsulfonphthalein, BPB,</p>

	<p>DEPC ≥ 97 %, für die Biochemie und Molekularbiologie,</p> <p>FTA® Aufreinigungsreagenz,</p> <p>Carbenicillin Dinatriumsalz > 90 % für die Biochemie,</p> <p>EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III) ≥ 99 %, p.a., ACS,</p> <p>Ethanol ROTIPURAN®, $\geq 99,8$ %, p.a., Ethylalkohol,</p> <p>Essigsäure Supra Qualität Rotipuran® Supra, 100%,</p> <p>Glycerin ROTIPURAN®, $\geq 99,5$ %, p.a.,</p> <p>LB-Medium (Luria/Miller),</p> <p>Natriumhydroxid ≥ 99 %, p.a., ISO,</p> <p>Natriumhydroxid ≥ 98 %, ISO, in Plätzchen,</p> <p>Roti®-Lumin 1, Roti®-Lumin 2</p> <p>Roti®-Nukleinsäurefrei,</p> <p>SDS, ultra pure,</p> <p>TRIS- Hydrochlorid, PUFFERAN®, ≥ 99 %,</p> <p>Wasser, Nuklease-frei, steril-filtriert und autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser,</p>
<p>Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland</p>	<p>Amin-C6-modifizierte Oligonukleotide;</p> <p>Amin-C12-modifiziertes Oligonukleotid</p>

III Material und Methoden

Fermentas, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland	dNTP Mix (10 mM), Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Glycogen RNA Grade, Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker
Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	Oligonukleotide, S.O.C.-Medium (TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing)
Labgene Scientific SA, Chatel-St-Denis, Schweiz	GRGreen Nucleic Acid Gel Stain, 10.000× in H ₂ O
Lonza, Basel, Schweiz	SeaKem® LE - Agarose
Luminex®, Oosterhout, Niederlande	Mag Plex Low Concentration Microspheres™ (Regionen 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 25)
Lysoform, Berlin, Deutschland	Händedesinfektionsmittel AHD 2000®
Merck Chemicals GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland	Natriumdihydrogencarbonat di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei Streptavidin, Peroxidase Conjugated (1 ml) Streptavidin, Phycoerythrin Conjugate (1 ml)
Sigma-Aldrich, München, Deutschland	Casein Hydrolysat, MES Hydrat (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDAC),

	<p>N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz – Lösung (Sulfo-NHS),</p> <p>20 % N-Lauroylsarcosinnatriumsalz – Lösung,</p> <p>10 % Natriumdodecylsulfat - Lösung (SDS)</p> <p>Tetramethylammoniumchlorid – Lösung, 5 M (TMAC)</p> <p>Tween® 20</p>
Qiagen, Hilden, Deutschland	Q-Solution (5×)

1.3 Puffer und Lösungen

Agarosegel, 0,8 %, 1 %, 1,5 %, 2 %	Die LE-Agarose in 1×TAE-Puffer aufgekocht bis sie sich vollständig gelöst hat. Das Gel wurde bei 65 °C im Wasserbad gelagert.
Chelex 100®Resin (sodium form, 100–200 mesh), 5 %	5 g Chelex 100®Resin in 100 ml DEPC-Wasser lösen.
DEPC – Wasser	Aqua bidest. mit 0,1 % DEPC versetzen, 12 h rühren und anschließend autoklavieren.
EDTA – Lösung, 0,5 M, pH 8,0	18,6 g EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat in Aqua bidest. auflösen, den pH-Wert mit festem NaOH einstellen und mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen. Das EDTA löst sich kurz bevor der pH-Wert 8,0 erreicht wird.
Ladungspuffer für Agarosegele (6-fach Loading Dye)	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 60 % Glycerol,

	0.03 % Bromphenolblau und 60 mM EDTA miteinander vermischen und bei 4-8 °C lagern.
MES Hydrat (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure), 0.1 M, pH 4,5	Von MES Hydrat werden 1,95 g in ca.80 ml Aqua bidest gelöst. Dann wird der pH-Wert mit flüssigem HCl eingestellt und auf 100 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt.
Natriumacetat-Lösung, 3 M, pH 6	24,61 g Natriumacetat (reinst) in Aqua bidest. lösen, pH-Wert mit 100%iger Essigsäure einstellen, 0,1 ml DEPC hinzufügen und auf 100 ml Aqua bidest. auffüllen. Anschließend 12 h rühren und danach autoklavieren.
Natriumhydroxid-Lösung, 100 mM	4 G Natriumhydroxid in 1000 ml Aqua bidest. lösen.
Natriumhydrogencarbonat, 500 mM, pH 8,4	42 g Natriumhydrogencarbonat in 800 ml Aqua bidest. lösen, den pH-Wert von 8,4 mit 100%iger Essigsäure einstellen und alles mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen. Im Anschluss autoklavieren.
PBS-Konzentrat (Phosphatgepufferte Salzlösung), 10×, pH 7,2	In ca.800 ml Aqua bidest. 80 g NaCl (reinst), 14,24 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (reinst), 2 g KCl (reinst) und 2 g KH ₂ PO ₄ (reinst) lösen. Anschließend den pH-Wert mit festem NaOH einstellen und mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.
PBS-Casein-Puffer, pH 7,4 ± 0,1	Zehnfach konzentrierte PBS-Lösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen und 1 mg

	Casein/ml PBS darin lösen. Danach den pH-Wert mit festem NaOH einstellen.
SSPE – Lösung (Natrium-Chlorid Phosphat-EDTA), 20×	175,3 g NaCl, 27,6 g NaH ₂ PO ₄ und 9,4 g EDTA-Dinatriumsalz vermischen, auf 800 ml auffüllen und den pH-Wert auf 7,4 mit festem NaOH einstellen. Im Anschluss das Gemisch mit Aqua bidest. bis 1000 ml ergänzen und autoklavieren.
SSPE – Lösung, 2×	100 ml der 20×SSPE – Lösung mit 1000 ml Aqua bidest. mischen und autoklavieren.
SSPE/ 0,1 % SDS – Lösung und SSPE/ 0,5 % SDS - Lösung	175,3 g NaCl, 27,6 g NaH ₂ PO ₄ , 9,4 g EDTA-Dinatriumsalz und mit 1 ml oder 5 ml einer 10%igen SDS-Lösung vermischen, auf 800 ml auffüllen und den pH-Wert auf 7,4 mit festem NaOH einstellen. Im Anschluss das Gemisch auf 1000 ml ergänzen und autoklavieren.
TAE – Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer), 50×	242 g TRIS, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 57 ml Essigsäure vermischen und mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen.
TAE – Puffer, 1×	Den 50× TAE – Puffer 1:50 in Aqua bidest. verdünnen.
TE ⁻¹ Puffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA), pH 8,0	0,12 g TRIS und 3,4 mg EDTA Dinatriumsalz mit 80 ml Aqua bidest. vermischen. Anschließend den pH-Wert mit flüssigem HCl einstellen. Das EDTA löst sich kurz bevor der pH-Wert 8,0 erreicht wird. Mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen.

III Material und Methoden

TE – Puffer (10 mM TRIS-HCl 1 mM EDTA) pH 8,0	0,15 g TRIS-HCl und 0,37 g EDTA Dinatriumsalz in 80 ml Aqua bidest. lösen, Den pH-Wert mit festem NaOH einstellen. Das EDTA löst sich kurz bevor der pH-Wert 8,0 erreicht wird. Auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen.
TMAC – Lösung, 1×	Für 250 ml werden 150 ml 5M TMAC, 1,25 ml 20% Sarkosyllösung, 12,5 ml 1M Tris- HCl, und 2 ml 0,5 M EDTA mit 84,25 ml Aqua bidest. vermischt.
TMAC – Lösung, 1,5×	Um 250 ml zu erhalten, werden 225 ml 5 M TMAC, 1,88 ml 20%iger Sarkosyllösung, 18,75 ml 1 M Tris-HCl, 3 ml 0,5 M EDTA und 1,37 ml Aqua bidest. vermischt.
Tween® 20, 0,02%	100 µl Tween® 20 werden mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

1.4 Medien und Mikroorganismen

One Shot® TOP10 Zellen (Invitrogen) chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lac</i> Z Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> (Transformationseffizienz > 1×10^9)</i>
LB-(Luria/ Bertani)-Medium	25 g Medium (entspricht 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) in 1000 ml Aqua bidest. unter Rühren auflösen lassen, pH-Wert 7 einstellen und autoklavieren.
LB-(Luria/ Bertani)-Agar	15 g Bacto™- Agar in 1000 ml LB-Medium einrühren und autoklavieren.

1.5 Reaktionskits und Enzyme

Fermentas, Thermo Fisher Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland	Maxima™ Hot Start PCR Master Mix (2×), Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase 100 units(5 u/μl), EcoRI, Puffer EcoRI,
Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	Phusion® Blood Direct PCR Kit, Phusion GC Buffer Pack, Phusion® Hot Start II DNA Polymerase
Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing
Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	NucleoSpin® Plasmid,

	NucleoSpin® Blood, NucleoSpin® Tissue
Promega GmbH, Mannheim, Deutschland	Pure Yield™ Plasmid Midiprep System
Qiagen, Hilden, Deutschland	QIAGEN® Multiplex PCR Plus Kit
Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland	High Pure PCR Product Purification Kit

1.6 Primer

Alle verwendeten Primer wurden bei Invitrogen, Darmstadt synthetisiert. Es wurden Primerpaare für die Erregergruppen Anaplasmataceae (*Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp./ *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, A/E-FP, A/E-RP), Piroplasmida (bathF-kurz-R, bathR-kurz), Onchocercidae (DIDR-F1, DIDR-R1) und *Rickettsia* spp. (CS409d/ RmasgltA1065lo) verwendet. Die Quellen der Primer sind unterhalb der Tabelle III-1 aufgeführt.

Tabelle III-1 Verwendete Primer für Anaplasmataceae (*Anaplasma* spp./ *Ehrlichia* spp./ *Cand. Neoehrlichia mikurensis*), Piroplasmida, Onchocercidae und *Rickettsia* spp.

Primer	Sequenz	Gen	Tm (°C)*
A/E-FP ¹	5'-GGGGATGATGTCAARTCAGCAY	16S rRNA	52 °C
A/E-RP ¹	5'-CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT		55 °C
bathF-kurz-R ²	5'-ACACRGGGAGGTAGTGACAA	18S rRNA	51 °C
bathR-kurz ²	5'-TAAGAATTTACCTCTGACAGT		49 °C
DIDR-F1 ³	5'-AGT GCG AAT TGC AGA CGC ATT GAG	ITS-2 rRNA	57 °C
DIDR-R1 ³	5'-AGC GGG TAA TCA CGA CTG AGT TGA		57 °C
CS409d ⁴	5'-CCTATGGCTATTATGCTTGC	<i>gltA</i>	50 °C
RmasgltA1065lo ⁵	5'-TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC		49 °C

Quellen: ¹ Martin et al. (2005), Tabar et al. (2008)

² Matjila et al. (2004), modifiziert

³ Rishniw et al. (2006)

⁴ Sullivan et al. (2009)

⁵ Schreiber et al. (2014)

* Berechnet mit BioMath Calculator, Promega

1.7 Oligonukleotidsonden

Die Sonden ohne Quellenangaben für das Bead-basierte Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®) wurden mit Primer3Plus und Clone Manager Professional 9 konstruiert (Kapitel III 1.10). Mit Hilfe von Nucleotide BLAST (BLASTn) wurden verschiedene, repräsentative Gensequenzen der relevanten Erreger aus der NCBI-Gendatenbank herausgesucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass darin diejenigen Genfragmente enthalten waren, welche von den Primern aus Tabelle III-1 amplifiziert werden. Mit diesen Genfragmenten wurden in Clone Manager Professional 9 für jeden Erreger und jede Erregergruppe Alignments erstellt. Diese wurden nach möglichen Sondensequenzen abgesucht unter Berücksichtigung der Vorschläge des Programms Primer3Plus. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Länge jeder Sonde 20 ± 3 Basen nicht unter- und überschreitet. Außerdem wurden mit dem BioMath Calculator (Kapitel III 1.10) die Schmelztemperaturen (T_m) der Sequenzen überprüft. Es wurde sichergestellt, dass diese nicht mehr als ± 1 °C von 42 °C abweichen. Dies ist die Hybridisierungstemperatur der bereits etablierten Sonden aus den unter Tabelle III-2 genannten Publikationen. Mit dem Programm BLASTn der NCBI-Gendatenbank wurden die Sonden schließlich hinsichtlich ihrer Sequenzidentität überprüft, um „Mismatches“ möglichst auszuschließen.

Alle Sonden sind am 5'-Ende mit einer Aminogruppe und einem C-6-Spacer, einem Verbindungsstück aus sechs C-Atomen, versehen und wurden bei Eurofins, Hamburg synthetisiert.

Tabelle III-2 Oligonukleotidsonden für das Bead-basierte Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®)

Erreger	Sonden	Sequenz	Gen
Anaplasmataceae	A/E- catch all*	5'-CATGAAGTCGGAATCGCT	16S rRNA
<i>A. phagocytophilum</i>	A. p.*	5'-GAGCTAATCCGTAAAAGTCA	16S rRNA
<i>B. canis</i>	B. c. alt ¹	5'-TGCGTTGACGGTTTGAC	18S rRNA
<i>B. canis</i>	B. c. neu ²	5'-GGTTGGTTATTTTCGTTTTTCGC	18S rRNA
<i>B. gibsoni</i>	B. g. ³	5'-TACTTGCCTTGTCTGGTTT	18S rRNA
<i>B. vogeli</i>	B. v. ³	5'-AGCGTGTTTCGAGTTTGCC	18S rRNA
<i>Babesia</i> spp.	B.-catch all ¹	5'-TAATGGTTAATAGGA(AG)C(AG)GTT	18S rRNA
<i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i>	N. m.*	5'-GATCGCAAGATTGAGCTA	16S rRNA
<i>D. immitis</i>	D. i.*	5'-GCTATAATTATTATCCTGCTTG	ITS-2 rRNA
<i>E. canis</i>	E. c.*	5'-ACCGCAAGGTTTAGCTAAT	16S rRNA
Onchocercidae.	Filaria-catch all*	5'-TTGAGCACAAAGATTTTCGAA	ITS-2 rRNA

Quellen: ¹ Matjila et al. (2005)

² Nijhof, A. M., Ph.D.

³ Matjila et al. (2008)

* konstruiert mit BioMath Calculator und Primer3Plus,

Tabelle III-3 Oligonukleotidsonden für den Reverse Line Blot (RLB)

Erreger	Sonden	Sequenz	Gen
<i>Babesia</i> spp./ <i>Theileria</i> spp.	Theileria / Babesia catch- all ¹	5'-CTGTCAGAGGTGAAATTCT	18S rRNA
<i>Babesia</i> . spp.	Babesia catch- all ¹²	5'-ACTAGAGTGTTTCAAACAGGC	18S rRNA
<i>Babesia</i> . spp	Babesia catch- all ²²	5'-ACTAGAGTGTTTCAAACAGGC	18S rRNA
<i>B. bigema</i>	Babesia bigemina ³	unveröffentlicht	18S rRNA
<i>B. bovis</i>	Babesia bovis ³	unveröffentlicht	18S rRNA
<i>B. caballi</i>	Babesia caballi ³	unveröffentlicht	18S rRNA
<i>B. canis</i>	Babesia canis ³	5'-GGTTGGTTATTTTCGTTTTTCGC	18S rRNA
<i>B. divergens</i>	Babesia divergens ³	unveröffentlicht	18S rRNA
<i>B. gibsoni</i>	Babesia gibsoni Japan ²	5'-TACTTGCCTTGTCTGGTTT	18S rRNA
<i>B. microti</i>	Babesia microti ³	5'-GCTT(CT)CGAGCGTT(TA)TTTTATTG	18S rRNA
<i>B. venatorum</i> .	Babesia venatorum ⁴	5'-CGATTTTCGCTTTTGGGATT	18S rRNA
<i>B. vogeli</i>	Babesia vogeli ²	5'-AGCGTGTTTCGAGTTTGCC	18S rRNA

Quellen: ¹Gubbels et al. (1999)

² Matjila et al. (2008)

³ Nijhof, A. M., Ph.D.

⁴Nijhof et al. (2007)

1.8 Positivkontrollen

Tabelle III-4 Positivkontrollen

Erreger	Gen	Länge der Sequenz
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	16S rRNA	258 bp
<i>Babesia canis</i>	18S rRNA	414 bp
<i>Babesia gibsoni</i>	18S rRNA	412 bp
<i>Babesia rossi</i>	18S rRNA	413 bp
<i>Babesia vogeli</i>	18S rRNA	422 bp
<i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i>	16S r RNA	257 bp
<i>Dirofilaria immitis</i>	ITS2 rRNA	540 bp
<i>Dirofilaria repens</i>	ITS2 rRNA	492 bp
<i>Ehrlichia canis</i>	16S rRNA	257 bp
Mikrofilarie „greek dog“	ITS2 rRNA	547 bp
<i>Rickettsia raoultii</i>	<i>gltA</i>	677 bp

1.9 Laborgeräte

ANALYTIK JENA, Jena, Deutschland	Thermomixer TMix 220
BIOMETRA, Göttingen, Deutschland	Mini-Hybridisierungsöfen OV1, Voltmeter Standard Power Pack P25, Power Pack P25 T,
BIO-RAD, München, Deutschland	Thermal Cycler C1000™, Thermal Cycler S1000™, Voltmeter Power Pac™ Universal Supply, Gelelektrophoresekammern (Sub Cell GT, Mini Sub Cell GT, Wide Mini Sub Cell GT) Bio-Plex ® 200 System
BIOSAN, Riga, Litauen	Environmental Shake Incubator ES20
BIOTEK, Bad Friedrichshall, Deutschland	Synergy™ 4,
ELMA HANS SCHMIDBAUER GmbH & Co. KG, Singen, Deutschland	Multifrequenz Ultraschall-Reiniger TI-H10 MF2
EPPENDORF, Hamburg, Deutschland	Centrifuge 5415 R, Centrifuge 5430 R (Rotoren: FA-45-30-11, A-2-MTP, F-35-6-30), Kolbenhubpipetten Eppendorf Research® (variable): 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 5 ml
IMMUNETICS, Boston, Massachusetts, USA	Miniblotter 45

HEIDOLPH, Schwabach, Deutschland	Vortexer REAX 2000
HERAEUS SEPATECH, Osterode, Deutschland	Biofuge pico, Biofuge 13
IKA, Staufen, Deutschland	Magnetrührer IKAMAG®RET, IKA® Vortex GENIUS 3, MS1 Minishaker
INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland	Chemolumineszenz Imager CHEMOCAM HR 16 3200 ChemoStar Bildaufnahme-Software
KNICK, Berlin, Deutschland	pH-Meter 761 Calimatic
LMS-GROUP, Tokyo, Japan	Minizentrifuge MCF-2360
MEMMERT, Schwabach, Deutschland	Wasserbäder Modell WNE7, Modell WNE 45
SCOTSMAN, Mailand, Italien	Flockeneisbereiter Scotsman® AF 100
SHARP, Hamburg, Deutschland	Großraummikrowelle
SHP STERILTECHNIK AG, Magdeburg, Deutschland	Autoklav
SONY, Stuttgart, Deutschland	Digital Graphic Printer UP-D897 Black and White A6 Digital USB Printer
SYNGENE, Cambridge, Großbritannien	Geldokumentation G:Box, Blue Light Converter
THERMO SCIENTIFIC, Bonn, Deutschland	Sicherheitswerkbank MSC-Advantage,

	Wärmeschüttelschrank MAX Q 6000,
TKA WASSERAUFBEREITUNGSSYSTEME, Niederelbert, Deutschland	TKA-Gen Pure
VWR, Darmstadt, Deutschland	Pipettierhilfe Pipetus®, Gas-Sicherheitsbrenner, Gasprofi 1 SCS micro
WELCH-ILMVAC, Ilmenau, Deutschland	Ölfreie Vakuumpumpe

1.10 Software

Software	Version	Hersteller/ Entwickler
BioEdit	7.053	(Leschnik et al. 2008)
BioMath Calculator, T _m Calculations for Oligos	1.1.1	BioMath Calculator, Promega, Madison, USA
Bio-Plex Manger™- Software	6.1	Bio-Rad, München, Deutschland
Blast Software, NCBI		(Taniuchi et al. 2011)
ChemoStar Bildaufnahme-Software	2.1	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Clone Manager Professional 9	9.41	Scientific & Educational Software, Cary, USA
End Note X8	8.1	Thomson Reuters, San Francisco, USA
Gene Snap	7.09.06	Syngene, Cambridge, UK
Mfold Web Server	3.3	(Zuker 2003)
Microsoft Office 2010	14.0.7128.5	Microsoft, Redmond, USA
OpenEpi	2.3.1	(Sullivan et al. 2009)
Primer3Plus	2.1.6	(Untergasser et al. 2012)

2 Methoden

2.1 Probenmaterial

In den Jahren 2011 und 2012 wurden Blutproben von Hunden aus verschiedenen Ländern der Mittelmeerregion sowie Ungarn gesammelt, um sie später im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin auf die für diese Dissertationsarbeit ausgewählten caninen vektorübertragenen Krankheitserreger (Kapitel II) zu untersuchen. Für die Beprobung wurden Länder bestimmt, in denen diese Erreger endemisch vorkommen (Tabelle III-5).

2.1.1 Gewinnung der Blutproben

In den ausgewählten Ländern verliefen die Probennahmen unter der Aufsicht und Anleitung von Kollegen an den parasitologischen Instituten der dortigen veterinärmedizinischen Fakultäten. Von insgesamt 246 Hunden wurde Blut in veterinärmedizinischen Universitätskliniken oder in verschiedenen Tierarztpraxen entnommen und dem jeweiligen parasitologischen Institut zugesendet. Davon stammten 234 Proben von Hunden, die unter Verdacht standen mit einem oder mehreren caninen vektorübertragenen Erregern infiziert zu sein. Bei zwölf weiteren Hunden, die aus Israel stammten, lag zum Beprobungszeitpunkt bereits die Diagnose über eine vektorübertragene Erkrankung vor. Bei den Blutproben handelte es sich zum einen um Frischblut, zum anderen wurde Blut verwendet, dem entweder Heparin oder EDTA zugesetzt war, um eine Koagulation zu verhindern. Die Kollegen überführten die Proben vor Ort auf FTA®-Filterkarten (Kapitel III 2.1.2) und schickten diese an das Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität in Berlin. Tabelle III-5 zeigt die Anzahl der verwendeten Proben aus den jeweiligen Ländern.

Tabelle III-5 Blutproben von Hunden aus Süd- und Südosteuropa

Jahr	Land	Anzahl der Blutproben	Probennahmen unter Anleitung von:
2011	Israel	12	Gad Baneth, DVM, Ph.D, Hebrew University, Jerusalem
	Ungarn	100	Dr. Róbert Farkas, Szent István University, Budapest
2012	Griechenland	48	Socratis Ptochos, DVM Dr. Sofia Karanikola Aristotle University of Thessaloniki
	Mazedonien	30	Jovana Stefanovska, DVM, MSc, Ph.D., University "Ss.Cyril & Methodius", Skopje
	Bosnien- Herzegowina	56	Jasmin Omeragic, DVM, MS, Ph.D., University of Sarajevo

2.1.2 Transport und Lagerung

Um die Blutproben und die enthaltene Erreger-DNA über einen langen Zeitraum zu konservieren und den Transport sowie die Lagerung zu vereinfachen, wurden für die Archivierung FTA® CLASSIC Karten (Carl ROTH®) gewählt. Das Blut wurde nach Anleitung des Herstellers auf die markierten Felder aufgetragen und bei Raumtemperatur zum Trocknen offen liegen gelassen. Eine Mischung aus Chemikalien, mit der die Karten beschichtet sind, lysiert Zellmembrane, denaturiert Proteine und bindet die freigesetzten Nukleinsäuren. Gleichzeitig schützt diese Beschichtung vor äußeren Einflüssen wie mikrobiellem Befall oder UV-Strahlen. Auf diese Weise ist eine platzsparende Lagerung von Probenmaterial bei Raumtemperatur bis zu 14 Jahre lang möglich. Voraussetzung dafür ist eine Aufbewahrung in trockener Umgebung. Dafür wurden die verschließbaren FTA® Taschen MAXI (Carl ROTH®) verwendet, da sie die Karten vor allem beim Transport vor Feuchtigkeit schützen. Außerdem ist durch die Deaktivierung der Pathogene der gefahrlose Transport oder postalische Versand unter Standardbedingungen möglich (Picard-Meyer et al. 2007).

Im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin wurden die Karten in trockener Umgebung bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.1.3 Isolierung der DNA aus den Blutproben

Bevor die Erreger im Hundeblood nachgewiesen werden konnten, musste die DNA aus der Matrix des FTA®-Papiers herausgelöst werden. Alle Schritte der DNA-Isolation wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das verwendete Protokoll wurde bereits von Becker et al. (2004) beschrieben und ist eine Modifikation des Protokolls des FTA®-Herstellers Whatman®.

Zuerst wurden zwei kreisrunde Scheiben mit Probenmaterial und einem Durchmesser von je 1,2 mm aus der FTA®-Karte ausgestanzt (FTA® Harris Uni-Core™ Stanze 1,2 mm, Carl ROTH® und FTA® Harris Schneidematte 6,25 cm x 7,6 cm, Carl ROTH®). Diese wurden in ein Safe Seal-Reaktionsgefäß gelegt, um sie dann 5 min mit 250 µl FTA® Aufreinigungsreagenz (Carl ROTH®) inkubieren zu lassen. Nach Entfernung der Flüssigkeit wurde der Schritt weitere zweimal wiederholt. Danach wurden die Scheiben dreimal 5 min lang mit 250 µl TE-1 Puffer inkubiert. Auch hier musste jedes Mal nach Beendigung der Inkubationszeit die gesamte Flüssigkeit entfernt werden. Im Anschluss daran wurden die Scheiben mindestens 1 h lang bei Raumtemperatur oder 30 min bei 50 °C getrocknet. Nun wurden 30 µl 5%iger Chelex 100® Resin-Lösung auf die Scheiben gegeben, um sie 30 min bei

90 °C inkubieren zu lassen. Zuletzt wurde alles 10 s durchmischt und danach 20 s zentrifugiert (Becker et al. 2004). Der Überstand enthielt die DNA und wurde bei - 20 °C gelagert.

2.1.4 Untersuchung der Blutproben

Die aus den Blutproben isolierte DNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion untersucht (Kapitel III 2.2). Alle 246 Proben wurde mit einer zu diesem Zweck entwickelten Triplex-PCR getestet (Kapitel III 2.2.1.3). Außerdem wurden 204 Blutproben aus Griechenland, Ungarn und Bosnien-Herzegowina mit einer zusätzlich entwickelten Quadruplex-PCR analysiert (Kapitel III 2.2.1.4). Die durch die PCR-Verfahren erhaltenen Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet (Kapitel III 2.5). Dabei wurden die 12 israelischen Proben nicht berücksichtigt, da es sich bei den beprobten Hunden um bereits diagnostizierte Tiere handelte. Diese Blutproben wurden ausschließlich zur Erstellung von Positivkontrollen sowie zur Etablierung der DNA-Extraktion (Kapitel III 2.1.3) und der Multiplex-PCR (Kapitel III 2.2.1) verwendet. Nach Abschluss dieser Untersuchungen, welche Erregerfamilien und -ordnungen identifizierte, sollte die Speziesdifferenzierung mit einem Bead-basierten Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®-xMAP®-Technologie) erfolgen (Kapitel III 2.4).

2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient dazu DNA-Sequenzen zu vervielfältigen, indem Kopien dieser Sequenzen erstellt werden. Dazu benötigt man DNA-Mutterstränge, die als Vorlage für die Synthese dienen und Template genannt werden. Daran binden spezifische Primer. Das sind Oligonukleotide, die komplementär zum Mutterstrang sind und den Startpunkt der Replikation bilden. Sie begrenzen das Fragment, das amplifiziert werden soll. Dabei ist der Vorwärts-Primer komplementär zum 3'-Ende des anti-„sense“-Strangs, so wie der Rückwärts-Primer zum 3'-Ende des „sense“-Strangs. Die Primer sind die Ansatzstellen für die DNA-Polymerase, das Enzym, welches die Replikation katalysiert. Seine Aufgabe ist die Verlängerung des Stranges in 5' → 3'- Richtung durch die Bindung von freien Nukleotiden an 3'-OH-Enden (McPherson and Möller 2006a). Meist wird eine sogenannte Taq-Polymerase verwendet, die aus der in heißen Quellen lebenden, hitzestabilen Bakterienspezies *Thermus aquaticus* stammt (Innis et al. 1988). Neben dem Template, den Primern, der Polymerase und den vier Desoxynucleosid-

Triphosphaten (dNTPs) werden außerdem ein Puffer und MgCl₂ benötigt, um optimale Bedingungen für die Polymerase zu gewährleisten (Sambrook and Russell 2001a).

Die PCR besteht aus Wiederholungen von Temperaturzyklen, die in einem Thermocycler ablaufen. Dabei wird die DNA exponentiell vermehrt. Wenn mit einer Hot Start Taq-Polymerase gearbeitet wird, muss diese zunächst bei 94 °C einige Minuten lang hitzeaktiviert werden (McPherson and Møller 2006b). Dabei erfolgt die Denaturierung der DNA, bei der sich der Doppelstrang in zwei Einzelstränge teilt. Das geschieht gewöhnlich bei 94 - 95 °C und dauert etwa 15 s. Die Anlagerung der Primer erfolgt, indem die Temperatur ca. 10 - 60 s auf etwa 2 - 10 °C unter die Schmelztemperatur der Primer gesenkt wird. Im Elongationsschritt bei 72 – 78 °C werden die zur Zielsequenz komplementären Stränge synthetisiert, wobei die Primer als Startpunkt dienen. Dabei lagert die Polymerase die dNTPs an die 3'-Enden der Primer an. Die Länge des gewünschten Zielfragments bestimmt die Elongationszeit. Am Ende eines Zyklus sollten wieder Doppelstränge vorliegen und die Anzahl der zu amplifizierenden DNA-Fragmente sollte sich idealerweise verdoppelt haben. Die Denaturierungs-, Anlagerungs- und Elongationsschritte werden mehrere Male wiederholt. Die Anzahl der Wiederholungen richtet sich nach der Menge des Templates zu Beginn der Reaktion und der Spezifität sowie Sensitivität der Reaktion. Anschließend kann im letzten Zyklus ein weiterer Schritt bei 72 – 75 °C durchgeführt werden. Hier soll sichergestellt werden, dass an eventuell übrig gebliebenen Einzelsträngen noch eine Verlängerung der Primer stattfindet (Sambrook and Russell 2001b). Neben Singleplex-PCR-Verfahren, in denen ein DNA-Fragment mit Hilfe eines Primerpaares nachgewiesen wird, sind auch Multiplex-PCR-Verfahren möglich. Dabei werden mehrere Primerpaare verwendet und verschiedene DNA-Segmente innerhalb einer Reaktion detektiert (Markoulatos et al. 2002).

2.2.1 Entwicklung und Durchführung der PCR

2.2.1.1 Singleplex-PCR

In den Singleplex-PCR-Verfahren wurde jeweils DNA von Arten der Piroplasmida, Anaplasmatataceae oder Onchocercidae (Primer in Tabelle III-1) amplifiziert. Die Amplifikation wurde mit Hilfe des Maxima™ Hot Start PCR Master Mix (2×) durchgeführt.

25 µl Ansatz für den Maxima™ Hot Start – Mastermix:

- 16,8 µl DEPC-Wasser
- 2,5 µl 10× Hot Start PCR Puffer
- 2,5 µl (2,5 mM) Mg²⁺
- 0,5 µl (10 mM) dNTPs
- 0,75 µl (10 µM) Vorwärts-Primer
- 0,75 µl (10 µM) Rückwärts-Primer
- 0,2 µl (5 U/µl) Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase

Zum Schluss wurde 1 µl Template einer Positivkontrolle (Tabelle III-4) pro Master Mix – Ansatz hinzu pipettiert. Zusätzlich gab es bei jeder Singleplex-PCR eine Negativkontrolle, deren Reaktionsansatz 1 µl DEPC-Wasser anstatt Template enthielt.

Das Programm für den Thermocycler richtete sich nach den Herstellerangaben von Maxima™ Hot Start (Tabelle III-6). Für die Hybridisierungstemperatur im Anlagerungsschritt wurde sich zunächst an den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer orientiert (Tabelle III-1). Die endgültige Hybridisierungstemperatur von 58 °C wurde schließlich experimentell ermittelt.

Tabelle III-6 Thermocyclerprogramm für die Singleplex-PCR

Hitzeaktivierung der Polymerase	95 °C	4 min
Denaturierungsschritt	95 °C	15 s
Anlagerungsschritt	58 °C	30 s
Elongationsschritt	72 °C	30 s
Finale Elongation	72 °C	10 min
Kühlung	4 °C	∞

Die Denaturierungs-, Anlagerungs-, und Elongationsschritte wurden 40 Mal wiederholt.

2.2.1.2 Duplex-PCR

Hierbei wurden die Primer zur Detektion von Piroplasmida und Onchocercidae (Tabelle III-1) kombiniert. Es wurden ebenfalls der Maxima™ Hot Start PCR Master Mix (2×) und die Hybridisierungstemperatur von 58 °C verwendet. Die Durchführung orientierte sich an der Singleplex-PCR.

25 µl Ansatz für den Maxima™ Hot Start – Mastermix:

- 15,3 µl DEPC-Wasser
- 2,5 µl 10× Hot Start PCR Puffer
- 2,5 µl (2,5 mM) Mg²⁺
- 0,5 µl (10 mM) dNTPs
- 0,5 µl (0,2 µM) pro Vorwärts-Primer
- 0,5 µl (0,2 µM) pro Rückwärts-Primer
- 0,2 µl (5 U/µl) Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase

Zuletzt wurden je 1µl Template der Erregergruppen Piroplasmida und Onchocercidae hinzugefügt als Positivkontrolle (Tabelle II-4). Bei jeder Duplex PCR gab es eine Negativkontrolle, welche 2µl DEPC-Wasser anstatt Template enthielt.

Das Programm im Thermocycler wurde von der Singleplex-PCR übernommen (Tabelle III-6). Die Denaturierungs,- Anlagerungs,- und Elongationsschritte wurden bei der Duplex-PCR 40 Mal wiederholt.

2.2.1.3 Triplex-PCR

Dieses Nachweisverfahren wurde zur Untersuchung der insgesamt 246 Blutproben von Hunden aus süd- und südosteuropäischen Ländern genutzt (Kapitel III 2.1). Bei den Primern handelt es sich um die in Tabelle III-1 aufgeführten DNA-Sequenzen zur Detektion von Piroplasmida, Anaplasmataceae sowie Onchocercidae. Zunächst wurde versucht die Triplex-PCR, so wie auch schon die Duplex-PCR, mit dem Maxima™ Hot Start PCR Master Mix (2×) durchzuführen. Da es mit diesem Ansatz nicht gelang die Banden aller drei Erregergruppen darzustellen, wurden verschiedene Primerkonzentrationen (0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM, 0,4 µM, 0,5 µl, 0,6µM) sowie unterschiedliche viele Wiederholungen der Thermocyclerzyklen (35 – 50

Wiederholungen) getestet. Zusätzlich wurden die Q-Solution und verschiedene Konzentrationen von Mg^{2+} (1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM) verwendet. Anstatt Maxima™ Hot Start wurde schließlich das QIAGEN® Multiplex PCR Plus Kit verwendet. Die Orientierung an den Herstellerempfehlungen für den Mastermix-Ansatz führte zu den gewünschten Ergebnissen (Kapitel V1.1).

25 µl Ansatz für den QIAGEN® Multiplex PCR Plus –Mastermix:

- 4 µl DEPC-Wasser
- 12,5 µl 2× Multiplex PCR Master Mix
- 0,5 µl (0,2 µM) pro Primer
- 2,5 µl 5× Q-Solution

Es wurden 3 µl Template pro Reaktionsansatz hinzugefügt, das bedeutet je ein 1 µl Template der Erregergruppen Piroplasmida, Anaplasmatataceae sowie Onchocercidae als Positivkontrolle (Tabelle III-4). Für die Untersuchung der Blutproben wurden 3 µl des DNA-Eluats der Extraktion aus den FTA-Karten verwendet (Kapitel III 2.1.3). Bei jeder Triplex-PCR gab es eine Negativkontrolle, die 3 µl DEPC-Wasser anstatt DNA-Eluat oder Positivkontrolle enthielt.

Für das Thermocyclerprogramm wurde sich an den Herstellerangaben des QIAGEN® Multiplex PCR Plus Kits sowie an den Hybridisierungstemperaturen der Primer in den Singleplex-PCR-Verfahren orientiert. Zusätzlich wurden Temperaturgradienten (57 °C - 65 °C) durchgeführt, um zu bestätigen, dass die gewählte Temperatur optimal ist.

Tabelle III-7 Thermocyclerprogramm für die Triplex-PCR

Hitzeaktivierung der Polymerase	95°C	5 min
Denaturierungsschritt	95 °C	30 s
Anlagerungsschritt	58 °C	90 s
Elongationsschritt	72 °C	30 s
Finale Elongation	68 °C	10 min
Kühlung	4 °C	∞

Die Denaturierungs-, Anlagerungs-, und Elongationsschritte wurden bei dieser PCR 40 Mal wiederholt.

2.2.1.4 Quadruplex-PCR

Die Blutproben von Hunden aus Ungarn und Griechenland wurden zusätzlich zur Triplex-PCR auch mit diesem Nachweisverfahren untersucht. Für diese PCR wurden alle vier Primerpaare zur Detektion von Piroplasmida, *Rickettsia* spp., Anaplasmataceae sowie Onchocercidae (Tabelle III-1) kombiniert und das QIAGEN® Multiplex PCR Plus Kit verwendet.

25 µl Ansatz für den QIAGEN® Multiplex PCR Plus –Mastermix:

- 2 µl DEPC-Wasser
- 12,5 µl 2× Multiplex PCR Master Mix
- 0,5 µl (10 µM) pro Vorwärts-Primer
- 0,5 µl (10 µM) pro Rückwärts-Primer
- 2,5 µl 5× Q-Solution

In jeden Reaktionsansatz wurden je 1 µl Template pro Erregergruppe Piroplasmida, *Rickettsia* spp., Anaplasmataceae sowie Onchocercidae als Positivkontrolle (Tabelle III-4) verwendet. Also wurden insgesamt 4 µl Template pro Reaktionsansatz hinzugefügt. Es wurde

die gleiche Menge an DNA-Eluat pro Reaktionsansatz aus der Extraktion der FTA-Karten (Kapitel III 2.1.3) verwendet. Zusätzlich gab es bei jeder Quadruplex-PCR eine Negativkontrolle, die 4 µl DEPC-Wasser anstatt der Positivkontrollen oder des DNA-Eluats enthielt.

Das Programm für den Thermocycler wurde nach Durchführung einiger Temperaturgradienten vom Triplex-PCR-Verfahren übernommen (Tabelle III-7) und orientierte sich wieder an den Herstellerangaben des QIAGEN® Multiplex PCR Plus Kits sowie an den Hybridisierungstemperaturen der Primer in den Singleplex-PCRs. Der zweite, dritte und vierte Schritt des Thermocyclerprogramms wurde, wie bei der Triplex-PCR, auch bei der Quadruplex-PCR 40 Mal wiederholt.

2.2.1.5 Ermittlung der Nachweisgrenzen der Singleplex-, Duplex-, Triplex- und Quadruplex-PCRs

Um die Sensitivität der Singleplex- und Duplex-PCRs zu testen, wurden Verdünnungsreihen mit den Plasmidpositivkontrollen angefertigt. Dafür wurde zunächst der DNA-Gehalt der einzelnen Positivkontrollen mit in einer TAKE3 Platte im Photometer Synergy 4 (BIOTEK) gemessen (Kapitel III 2.3.5). Anhand der Ergebnisse wurde die Anzahl der DNA-Moleküle/µl errechnet (Kapitel III 2.3.8) und mit der entsprechenden Menge DEPC-Wasser so verdünnt, dass die Verdünnungsstufen 10^6 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 , 2×10^1 , 10^1 und 5 DNA-Moleküle/µl entstanden. Diese wurden dann als Template in den Singleplex- und Duplex-PCRs verwendet. Auf die gleiche Weise wurden Sensitivitätstests bei den Triplex- und Quadruplex-PCRs durchgeführt. Dabei wurden Verdünnungsreihen der Plasmidpositivkontrollen mit den Verdünnungsstufen 10^8 , 10^6 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 , 2×10^1 und 10^1 DNA-Moleküle/µl für die Triplex-PCR sowie 10^6 , 4×10^3 , 4×10^1 und 10^1 DNA-Moleküle/µl für die Quadruplex-PCR getestet.

2.2.2 Gelelektrophorese

Um PCR Produkte sichtbar zu machen, verwendet man die Gelelektrophorese. Dabei läuft DNA in einem Agarosegel durch ein elektrisches Feld und wird mit einem Farbstoff markiert, der unter UV-Licht bzw. Blaulicht fluoresziert. Die DNA bewegt sich durch ihre negative Ladung weg von der Katode in Richtung der Anode, wird aber dabei durch die gitterartige Struktur des

Agarosegels behindert. Kleine Fragmente wandern daher schneller durch das Agarosegel als große. Somit wird eine Auftrennung der DNA nach Anzahl der Basenpaare im Gel erzielt (Weiher et al. 2006).

Die Gen-Fragmente wurden mit Hilfe des Farbstoffes GRGreen unter UV-Licht sichtbar gemacht. Dieser Farbstoff bindet an die DNA, ist jedoch, nach Herstellerangaben, deutlich weniger zytotoxisch und mutagen als das häufig verwendete Ethidiumbromid. Unter UV-Licht fluoreszierten die gefärbten DNA-Fragmente und wurden als Banden sichtbar. Die Banden wurden mit einem standardisierten Marker abgeglichen, der neben den PCR-Produkten auf das Agarosegel aufgetragen wurde. Somit konnte die Anzahl der Basenpaare einer Bande abgeschätzt werden.

Die Gele wurden hergestellt, indem Agarosepulver in 1× TAE-Puffer gekocht und GRGreen (10.000× in H₂O) in der Konzentration 1 µl/10 ml dem Gel hinzugefügt wurde. Das noch flüssige Gel wurde in eine Form gegossen. Die Taschen für die PCR-Produkte und Marker wurden durch einen Kamm geformt, der in das flüssige Agarosegel gesteckt wurde. Nach Aushärtung wurde das Gel mit seiner Form in eine Gelkammer, gefüllt mit 1× TAE-Puffer, gelegt und mit den Proben und Markern beladen. Jede Probe wurde zuvor mit 6-fach konzentriertem Ladungspuffer versetzt, so dass sich eine einfache Endkonzentration des Puffers in der Probe ergab. Dann wurde eine elektrische Spannung von 3 - 4 V/cm in der Gelkammer angelegt, um die DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Anschließend war das Ergebnis unter UV-Licht zu sehen und konnte fotografiert werden.

Nach den hier beschriebenen PCR-Verfahren (Kapitel III 2.2.1) wurden die Amplikons stets auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen.

2.3 Erstellung der Plasmidpositivkontrollen

Um falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse der PCR-Reaktion auszuschließen und eine Aussage über die Sensitivität der Methode treffen zu können, werden, neben einer Negativkontrolle, entsprechende Positivkontrollen benötigt. Die in dieser Studie verwendeten Positivkontrollen waren DNA-Proben von *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, *R. raoultii* (Rickettsiales), *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. rossi*, *B. vogeli* (Piroplasmidae), *D. immitis*, *D. repens*, Mikrofilarie „greek dog“ (Onchocercidae) (Tabelle III-4). Obwohl *R. raoultii* im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht für die speziesspezifischen Untersuchungen der caninen Blutproben verwendet wurde, wurde die

DNA-Probe als Positivkontrolle für die Rickettsiales genutzt, da entsprechendes Probenmaterial im Labor für die Verwendung in verschiedenen Projekten vorlag.

Im Folgenden werden die Schritte zur Erstellung der verwendeten Plasmidpositivkontrollen beschrieben.

2.3.1 Gewinnung der DNA

Die Erreger-DNA wurde entweder durch andere Forschungsprojekte zur Verfügung gestellt (*D. repens*, Mikrofilarie „greek dog“, *A. phagocytophilum*, *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, *R. raoultii*, *B. rossi*, *B. vogeli*) oder musste mit unterschiedlichen Methoden aus Probenmaterial isoliert werden (*D. immitis*, *B. canis*, *B. gibsoni*, *E. canis*).

***Dirofilaria immitis*: Isolierung von DNA mit Nucleo Spin® Tissue**

Hier wurde eine Menge von 25 mg Probenmaterial nach Herstellerangaben mit dem kommerziell erwerblichen Kit Nucleo Spin® Tissue (MACHEREY-NAGEL) verarbeitet. Das verwendete Probenmaterial entsprach einem Wurm und stammte aus der Doktorarbeit von Dr. rer. nat. Daniel Kulke am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin. Die gewonnene DNA wurde zum Schluss in 100 µl Elutionspuffer des Herstellers eluiert und bei -20 °C gelagert.

***Babesia canis* und *Babesia gibsoni*: Isolierung von DNA mit Nucleo Spin® Blood**

DNA der Erreger *B. canis* und *B. gibsoni* wurden aus EDTA-Blutproben mit dem kommerziell erhältlichen Kit Nucleo Spin® Blood (MACHEREY-NAGEL) isoliert. Das verwendete EDTA-Blut stammte aus dem Probenbestand des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin und war bereits zu einem früheren Zeitpunkt positiv auf die genannten Erreger getestet worden. Bei der DNA-Isolierung wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die in 100 µl Elutionspuffer gelöste DNA wurde anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

***Ehrlichia canis*: Isolierung von DNA aus FTA-Karten**

Hier wurden Blutproben von Hunden aus Israel mit einer bestätigten *E. canis* Infektion verwendet, die auf FTA-Karten archiviert waren (Tabelle III-5). Die Isolierung der DNA aus Blutproben von FTA-Karten wurde in Kapitel III 2.1.3 beschrieben.

2.3.2 Fällung und Aufreinigung von PCR-Produkten

Das gewünschte DNA-Fragment aus dem Genom des Erregers wurde zunächst mittels PCR amplifiziert und nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht überprüft. Da das UV-Licht bei den Nukleinbasen Cytosin und Thymin im PCR-Produkt zu Dimeren führen kann, musste nach der Überprüfung erneut eine Gelelektrophorese durchgeführt werden, um die Gensequenz unbeschadet aus dem Agarosegel herauszulösen. Bei der Dimerisation verknüpfen sich benachbarte Thymin- oder Cytosin-Reste und verhindern die DNA-Replikation (Diniz et al. 2011). Zunächst wurde das Gel auf den Blue Light Converter (SYNGENE) gelegt, der das UV-Licht in Blaulicht umwandelt. Dort konnte die Bande mit einer Skalpellklinge herausgeschnitten werden. Das so gewonnene Gelstück mit dem PCR-Produkt wurde auf den Filter einer 1000 µl Filterspitze gelegt, die in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß stand und deren Spitze zuvor abgetrennt wurde. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei ca. $5345 \times g$ wurde die Filterspitze mit dem Gelrest verworfen. Es wurde nur mit dem Durchfluss, der das PCR-Produkt enthielt, weiter gearbeitet. Die nun folgende Aufreinigung wurde während dieses Forschungsprojektes mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Bei der weniger aufwendigen Variante wurde das High Pure PCR Product Purification Kit von ROCHE nach Herstelleranweisungen verwendet. Bei einer anderen, ebenfalls angewandten, Methode wurden zu der Menge des Durchflusses 1 µl Glycogen, 3 M Natriumacetat-Lösung im Verhältnis 1:10 und -20 °C kaltes Isopropanol im Verhältnis 1:1 in der gegebenen Reihenfolge hinzugefügt. Alles wurde vorsichtig vermischt und mindestens 12 h bei -20 °C gelagert. Im Anschluss an diese Lagerung folgte die Aufreinigung des PCR-Produktes indem die Flüssigkeit 30 min bei $14000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert wurde. Danach wurde 1 ml -20 °C kalter 70%iger Ethanol dazu gegeben, gemischt und 10 min bei $14000 \times g$ sowie 4 °C zentrifugiert. Es bildete sich ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes, das die DNA enthielt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 bis 30 µl autoklaviertem Aqua bidest. gelöst. Die DNA konnte nun bei -20 °C gelagert werden.

2.3.3 Klonierung

Zur Vervielfältigung der PCR-Moleküle wurde die Methode der Klonierung verwendet. Der Vorgang wurde mit Hilfe eines Plasmid-Vektors in kompetenten *E.-coli*-Zellen durchgeführt. Das hier verwendete Plasmid pCR®4-TOPO® TA mit 3957 bp wurde speziell für die Klonierung von PCR-Fragmenten entwickelt, die mit einer Taq Polymerase amplifiziert worden sind (Abbildung III-1). Es diente während dieses Projektes als Vektor. Als Selektionsmarker besitzt pCR®4-TOPO® ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen. Außerdem besitzt es das *ccdB*-Gen, welches inhibierende Wirkung auf die bakterielle Gyrase hat und Bakterien zum Absterben bringt. Dieses Gen wird ausschließlich in den *E. coli*-Zellen, in denen das PCR-Fragment nicht eingebaut wurde, exprimiert. Zusätzlich verfügt der Vektor über Schnittstellen für das Restriktionsenzym EcoRI, mit deren Hilfe der eingefügte Genabschnitt wieder herausgelöst werden kann (LifeTechnologiesCorporation 2012).

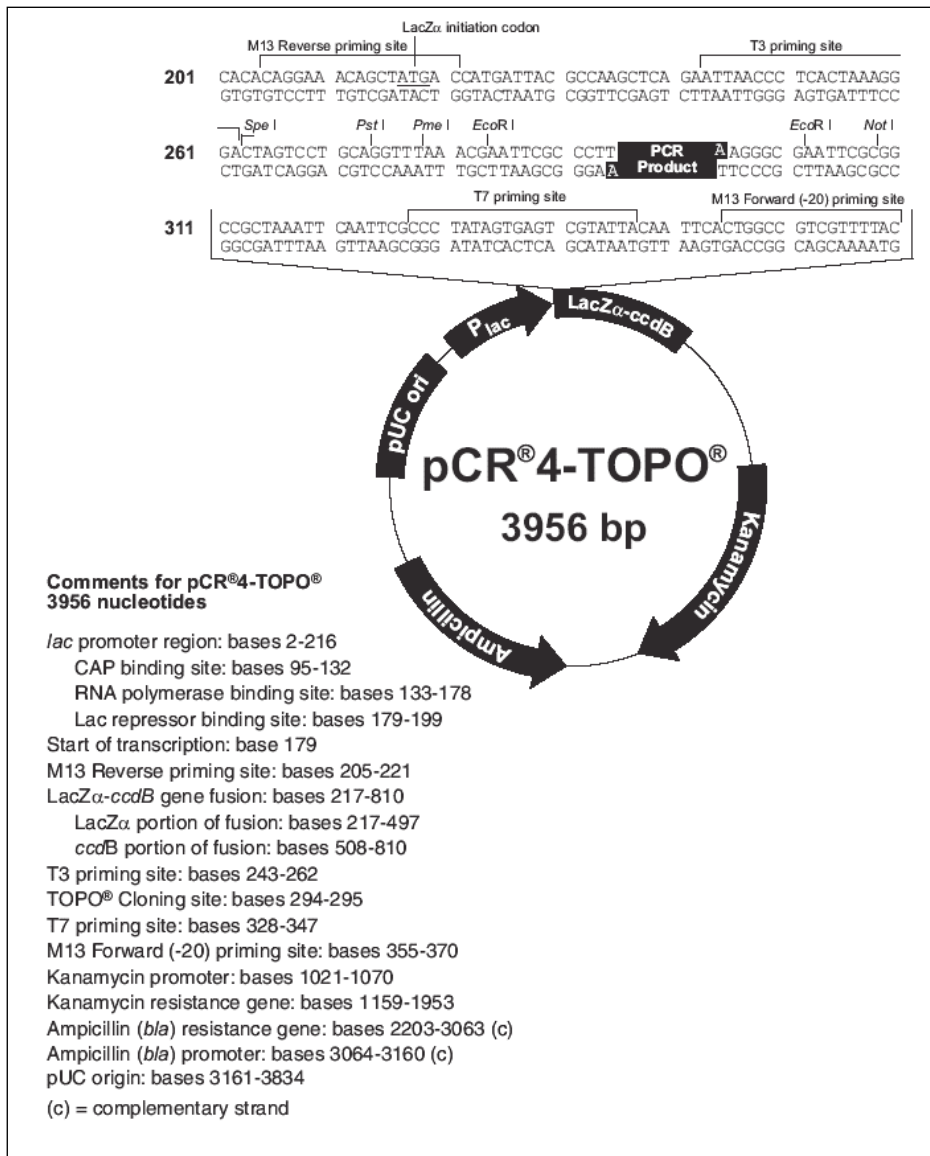


Abbildung III-1: TOPO TA Cloning® Vektor PCR 4 TOPO (Copyright Thermo Fisher Scientific)

Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning® for Sequencing Kit benutzt und mit wenigen Modifikationen nach Herstellerangaben vorgegangen.

Ansatz zur Ligation des DNA-Fragments in den Plasmidvektor:

- 2 µl des PCR-Fragmentes
- 0,5 µl Salt Solution (Puffer) (Invitrogen)
- 0,5 µl pCR®4-TOPO®- Vektor (Invitrogen)

Alles wurde vorsichtig in einem Reaktionsgefäß vermischt. Darauf folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur. Da das PCR-Produkt durch die Amplifizierung mit einer Taq-Polymerase eine überhängende Nukleinbase Adenin am 3'-Ende aufweist, kann es während dieses Schrittes mit dem Thymin-Überhang am 5'-Ende der Vektorschnittstelle ligieren. Die Topoisomerase I, die an das Plasmid gebunden ist, fungiert hierbei als Ligase (LifeTechnologiesCorporation 2012). Um die Reaktion zu beenden, wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Für die Transformation des Vektors in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (One Shot® TOP10) wurden 2 µl des Ansatzes mit den zuvor auf Eis aufgetauten Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Während des sich anschließenden Hitzeschocks für 30 sek bei 42 °C wurde das Plasmid in die *E. coli*- Zellen aufgenommen. Dann folgte die Vermischung der Zellen mit etwa 37 °C warmem S.O.C.-Medium sowie die Kultivierung für eine Stunde im Wärmeschüttelschrank MAX Q 6000 bei 37 °C und 200 rpm. Im Anschluss wurden die Zellen auf LB-Agar, dem Kanamycin (0,1 g/ml) zugefügt wurde, über Nacht selektiert. Das gewährleistet, dass nur Kolonien wachsen, die das Plasmid mit seinem integrierten Selektionsmarker aufgenommen haben. Die anschließende Kultivierung von ausgewählten Kolonien, die mit Pipettenspitzen von der Platte in Flüssigmedium überführt wurden, fand ebenfalls über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in LB-Medium mit Kanamycin (0,1 g/ml) statt.

2.3.4 Isolierung des Plasmids

Die Präparation des Plasmids erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit, welches das Plasmid aus den *E. coli* – Zellen herauslöst. Dazu wurden ca. 2 ml der Zellsuspension 30 s lang bei Raumtemperatur und $11\,000 \times g$ zentrifugiert. Das aus *E. coli* - Zellen bestehende Pellet wurde

dann mit dem Kit nach Herstellerangaben weiter bearbeitet. Im letzten Schritt wurde das gewonnene Plasmid mit 50 µl autoklaviertem Aqua bidest. gelöst.

Wenn ein größeres Volumen an Plasmid gewünscht wurde, stand die Plasmidpräparation mit dem Pure Yield™ Plasmid Midiprep System zur Verfügung. Dafür benötigte man 50 ml LB-Medium mit Kanamycin (0,1 g/ml). Diese Menge wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei $5000 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nach Herstellerangaben bearbeitet. Das isolierte Plasmid wurde zum Schluss mit 500 µl autoklaviertem Aqua bidest. eluiert.

2.3.5 Quantifizierung des DNA-Gehalts

Nach der DNA-Isolierung wurde jedes eluierte Plasmid hinsichtlich der Menge und Qualität seines Nukleinsäuregehaltes im Plattenphotometer Synergy 4 (BIOTEK) untersucht. Dazu wurden jeweils 2 µl im Doppelansatz auf die Take3™ Multi-Volume Platte (BIOTEK) aufgetragen und die gesuchten Parameter durch Messungen der Absorption bei 260, 280 und 320 nm ermittelt.

Im Wellenlängenbereich von 260 nm absorbieren die Basen der Nukleinsäuren. Die optische Dichte reiner doppelsträngiger DNA mit einem Gehalt von 50 µg/ml bei dieser Wellenlänge und 1 cm optischem Weg wird hier mit dem Wert 1 angegeben. Dadurch ergibt sich folgende Formel zur Berechnung des DNA-Gehalts:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = ((\text{OD} \cdot 260 - \text{OD} \cdot 320) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml})$$

* OD = optical density (optische Dichte)

Das Absorptionsoptimum für verschiedene aromatische Aminosäuren liegt bei 280 nm. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt den Reinheitsgrad der eluierten Plasmide an. Idealerweise liegt dieser Quotient im Bereich zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung der Proben mit Proteinen hin, höhere Werte lassen eine Verunreinigung mit Substanzen vermuten, die Carboxylgruppen enthalten, welche ebenfalls bei 260 nm absorbieren. Die Messung der Absorption bei 320 nm liefert eine weitere Aussage über die Verunreinigung insbesondere mit partikulären Material und fungiert als Maß für unspezifische

(Wellenlängen-unabhängige) Streuung. Je dichter dieser Messwert an Null liegt, desto weniger Verunreinigungen sind in der Probe enthalten.

2.3.6 Überprüfung der Plasmid-DNA

Zur Prüfung, ob das gewünschte DNA-Fragment in den Vektor integriert wurde, wurde es aus diesem wieder herausgeschnitten. Das geschah mit Hilfe des Restriktionsenzym EcoRI. Die Schnittstellen dafür flankieren die eingefügte Sequenz auf dem Plasmid.

Ansatz für den EcoRI Restriktionsenzymverdau:

- 16,5 µl autoklaviertes Aqua bidest.
- 2,5 µl 10×Puffer (Fermentas)
- 0,5 µl EcoRI (10 U/µl) (Fermentas)
- 100 ng DNA

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die PCR Produkte aus den Proben wurden dann hinsichtlich ihrer Größe (Menge der Basenpaare) analysiert.

2.3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der gewonnenen Genfragmente wurden bei GATC Biotech AG in Konstanz (Deutschland) durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit Hilfe von Clone Manager Professional 9 sowie der Blast-Analyse mit der NCBI Datenbank ausgewertet.

2.3.8 Verdünnung und Lagerung

Die Plasmide, welche die gewünschte Erreger-DNA enthielten, wurden als Positivkontrollen für diese Forschungsarbeit verwendet. Dazu war es nötig Lösungen mit einer definierten Kopienmenge der Plasmid-DNA pro µl zu erstellen. Anhand der photometrisch bestimmten DNA-Gehalte (µg/µl) (Kapitel III 2.3.5) sowie der Anzahl der Basenpaare des Plasmids

inklusive der integrierten Erreger-DNA wurde rechnerisch die Anzahl der DNA-Moleküle/ μl ermittelt. Dafür ging man von folgender Gleichung aus:

$$1 \mu\text{g eines } 1000 \text{ bp Plasmids} = 9,1 \times 10^{11} \text{ Moleküle}$$

Anhand dieser Grundlage wurde mittels Dreisatz die Anzahl der DNA-Moleküle/ μg unter Einbeziehung der Länge des Plasmids (bp) berechnet.

Darauf folgte die Berechnung der DNA-Moleküle/ μl anhand der oben genannten Parameter:

$$\text{DNA-Moleküle}/\mu\text{l} = \text{Konzentration der DNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{DNA-Moleküle}/\mu\text{g}$$

Im Anschluss an diese Berechnung wurden Verdünnungen der Plasmid-DNA mit DEPC-Wasser von 10^9 und 10^8 DNA-Molekülen/ μl erstellt und bei -20°C gelagert.

2.4 Entwicklung eines Bead-basierten Multiplex-Diagnostikverfahrens (Luminex®-xMAP®-Technologie)

Die in der PCR auf Gattungsebene diagnostizierten Pathogene sollten mit einem neuartigen Verfahren auf Basis der Luminex®-xMAP®-Technologie speziesspezifisch differenziert werden. Dieser Erregernachweis beruht auf Farbdetektion sowie Fluoreszenzmessungen von Mikrosphären, den sogenannten Beads, und bietet die Möglichkeit einer qualitativen und quantitativen Untersuchung von Probenmaterial. Die Beschaffenheit der Mikrosphären-Oberfläche mit ihren Carboxyl-Gruppen ermöglicht eine Kopplung von spezifischen Oligonukleotidsequenzen, welche die Analyte binden und als Sonden bezeichnet werden (Houser 2012). Die hier nachzuweisenden Analyte waren die in den PCR-Verfahren amplifizierten Erreger-Sequenzen. Um die PCR-Produkte im Luminex®-Verfahren sichtbar zu machen, war eine Markierung nötig. Dafür wurden die Amplikons mit Amin-Biotin versehen und konnten im Anschluss den Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin-Phycoerythrin (Streptavidin-PE) binden. Nach der Kopplung der Oligonukleotidsonden an die Beads erfolgte die Bindung des PCR-Produktes an die komplementäre Sonde durch den Vorgang der direkten Hybridisierung. Die Farbanalyse der Beads identifiziert diese anhand ihrer Färbung und die Fluoreszenzmessung mit Streptavidin-PE ermöglicht die quantitative Erfassung der PCR-Produkte (Dunbar 2006). Beides fand während dieses Projektes im Bio-Plex® 200 System statt.

2.4.1 Luminex®-Beads

Bei den Beads handelt es sich um carboxylierte Polystyren-Mikropartikel, die mit einer spezifischen Mischung aus Rot und Infrarot gefärbt sind. Beide Farbstoffe gibt es in unterschiedlichen Schattierungen. Das ermöglicht insgesamt 100 verschiedene Bead-Färbungen, welche Regionen genannt werden. Jede Region steht für einen möglichen Einzeltest. Das bedeutet, dass bis zu 100 verschiedene Analyte in einer Reaktion nachgewiesen werden können (Dunbar 2006). In dieser Forschungsarbeit wurde mit den Regionen 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22 und 25 gearbeitet. Die hier verwendeten 6,5 µm großen MagPlex®-Mikrosphären von Luminex® enthalten magnetisches Material. Diese Eigenschaft verringerte den Arbeitsaufwand, da im Vergleich zu nicht-magnetischen Beads keine Vakuumstation und die Verwendung von Filtermembranen zum Separieren der Mikrosphären nötig sind (Houser 2012).

2.4.2 Oligonukleotidsonden für das Luminex®-Verfahren

Die Oligonukleotidsonden wurden zum Teil für dieses Dissertationsprojekt generiert oder stammten aus anderen Quellen (Tabelle III-2). Die dafür verwendeten Genabschnitte der Erreger, welche innerhalb der Primersequenzen lagen, wurden in einem Alignment gegenübergestellt und verglichen. Dazu wurden die Programme Primer3Plus und Clone Manager Professional 9 verwendet. Mit dem Programm Mfold wurden dann die Sekundärstrukturen der Sonden und der verwendeten PCR-Fragmente mit der gewählten Hybridisierungstemperatur überprüft. Die Sonden sind jeweils mit einer Aminogruppe und einem C-6-Spacer versehen. Die Aminogruppen waren zur Kopplung der Sonden an die Mikrosphären nötig. Der C-6-Spacer bestand aus einer Kette von sechs Kohlenstoffatomen und diente als Abstandhalter zwischen der Sonde und dem Amin.

2.4.3 Kopplung der Luminex®-Beads

Erregerspezifische Oligonukleotidsonden (Tabelle III-2) wurden mit Hilfe eines modifizierten Protokolls von Luminex® an die Beads gekoppelt. Die Modifikationen beruhten auf dem Protokoll der Arbeitsgruppe für Tumorummunologie der Charité, Berlin (Dr. rer. nat. Andreas Kaufmann). Jeder Sonde wurde einer Bead-Region zugewiesen. Bei den verwendeten Mag Plex Low Concentration Microspheres™ stellte Luminex® ausschließlich die zehn in Tabelle III-8

aufgeführten Regionen zur Verfügung. Die Zuordnung erfolgte so, dass Sonden einer Erregergruppe möglichst weit voneinander entfernten Regionen zugeordnet waren.

Tabelle III-8 Zuordnung der Oligonukleotidsonden zu den Luminex®-Bead-Regionen

Sonde	Bead-Region
A/E- catch all	25
A. p.	13
B. c.	15
B. g.	19
B. v.	21
Babesia-catch all	12
D. i.	14
E. c.	18
Filaria-catch all	20
N. m.	22

A/E-catch all: *Anaplasma* spp./*Ehrlichia* spp., A.p.: *Anaplasma phagocytophilum*, B.c.: *Babesia canis*, B.g.: *Babesia gibsoni*, B.v. *Babesia vogeli*, Babesia-catch all: *Babesia* spp., D.i.: *Dirofilaria immitis*, E.c.: *Ehrlichia canis*, Filaria-catch all: Filarioidea, N.m.: *Cand. Neoehrlichia mikurensis*

Zunächst mussten die Beads, die Sonden und das später benötigte EDAC ca. 30 min lang bei Raumtemperatur aufgewärmt werden. Dabei war es wichtig die Beads stets vor direktem Licht zu schützen und vor jedem Gebrauch gründlich zu mischen, um Verklumpungen zu vermeiden. Sobald die Beads Raumtemperatur erreicht hatten, wurden sie ca. 30 s auf dem Vortex-Rüttler gemischt und ca.20 s bei 45-55 kHz in einem Ultraschallwasserbad beschallt, um mögliche Bead-Aggregate zu auflösen. Danach wurden 200 µl der Stammsuspension einer Bead-Sorte ($2,5 \times 10^6$ Beads/ml) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und 30-60 s in einem Magnetseparator platziert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen. Nach dem Entfernen des Reaktionsgefäß vom Magneten und der Zugabe von 25 µl MES-Lösung (0,1 M, pH 4,5), wurde das Gefäß ca.20 s auf dem Vortex-Rüttler gemischt und anschließend bei 45-55 kHz beschallt. Danach wurden 4 µl der Sondenlösung (0,1 nmol/µl) hinzugefügt und

vermischt. Ein frisches EDAC-Alliquot (10 mg/ml) wurde hergestellt. Davon wurden 2,5 µl in das Reaktionsgefäß pipettiert. Das Bead-Sonden-Gemisch wurde nun 30 min bei 300 rpm in einem Schüttelinkubator von Licht abgeschirmt inkubiert. Nach 15 min wurde das Gemisch erneut kurz und vorsichtig gemischt, um Bead-Aggregaten vorzubeugen. Danach wurde ein neues EDAC-Alliquot (10 mg/ml) vorbereitet und alle Schritte ein zweites Mal, wie beschrieben, wiederholt. Nun wurde 1 ml einer 0.02 % Tween® 20-Lösung hinzupipettiert. Auf dem Magnetseperator wurde der Überstand nach 30-60 s abgenommen. Das Reaktionsgefäß wurde anschließend vom Magnetseperator entfernt. Die oben beschriebene Inkubation auf dem Schüttelinkubator mit anschließendem vorsichtigem Mischen wurde danach als Wasch-Schritt mit 1 ml einer 0,1 % SDS-Lösung wiederholt. Nachdem auf dem Magnetseperator so viel Flüssigkeit wie möglich entfernt wurde, konnten die Beads, an die nun die entsprechenden Sonden gekoppelt waren, mit 100 µl einer TE-Lösung (pH 8,0) resuspendiert werden. Die Suspension, die eine Konzentration von 5000 Beads/µl haben sollte, wurde wieder 30 s auf dem Vortex-Rüttler gemischt, 20 s bei 45-55 kHz beschallt und im Anschluss daran nach Herstellerangaben bei 2-8 °C gelagert.

2.4.4 Verifizierung der Sonden und Überprüfung der Kopplungsreaktion

Um die Kopplung der Sonden an die Beads zu überprüfen, wurden Oligonukleotide von EUROFINs, Hamburg verwendet, die in Länge und Sequenz kompatibel zu den Sonden (Kapitel III 1.7) und am 5'-Ende mit Biotin versehen waren. Diese Oligonukleotide wurden mit den entsprechend gekoppelten Beads hybridisiert (Kapitel III 2.4.7). Damit konnte die reine Kopplungsreaktion, unter Ausschluss anderer beeinflussender Faktoren wie Erfolg der PCR und eventuelle Sekundärstrukturen der Amplikons, getestet werden.

2.4.5 Biotinylierung der PCR-Produkte

Damit der Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin-PE die gesuchten PCR-Sequenzen markieren kann, müssen diese zuvor mit einem Epitop versehen werden, welches die Fähigkeit hat den Farbstoff zu binden. Dafür wurde Biotin verwendet, da dieses mit Streptavidin eine starke Bindung eingeht (Bailey et al. 2008). Die Biotinylierung wurde erzielt indem für die PCR Rückwärts-Primer (Tabelle III-1) verwendet wurden, die am 5'-Ende mit Biotin versehen waren. Somit war das Biotin an die PCR-Produkte gebunden, die mit den Rückwärts-Primern

amplifiziert wurden. Die biotinylierten Rückwärts-Primer wurden bei Invitrogen, Darmstadt synthetisiert.

2.4.6 Reverse Line Blot (RLB) zur Verifikation der Biotinylierung

Um festzustellen, ob die Biotinylierung der PCR-Produkte erfolgreich war, wurde eine bereits etablierte Methode, der RLB nach Nijhof et al. (2005) angewandt. Einige zuvor biotinylierte PCR-Produkte von Plasmidpositivkontrollen wurden mit dieser Methode getestet. Dafür wurden die in Tabelle III-3 aufgelisteten Oligonukleotidsonden verwendet.

2.4.6.1 Oligonukleotidsonden für den Reverse Line Blot (RLB)

Hier handelte es sich um Oligonukleotidsonden, die aus einem Verfahren stammen, welches zur Speziesdifferenzierung von PCR-amplifizierter Erreger-DNA dient (Matjila et al. 2008). In diesem Disserationsprojekt wurden die Sonden jedoch zum Nachweis der Biotinylierung der PCR-Produkte verwendet. Die Sonden besitzen eine Aminogruppe sowie einen C-6-Spacer am 5'-Ende und sind in Tabelle III-2 dargestellt.

2.4.6.2 Der Reverse Line Blot (RLB)

Der RLB wurde, wie in Nijhof et al. (2005) beschrieben, durchgeführt. Zuerst wurden die RLB-Sonden vorbereitet, indem jeweils 400 pmol mit 150 µl 0,5 M Natriumhydrogenkarbonat (pH 8,4) gemischt wurden. Dann folgte die Vorbereitung der Nylonmembran (Pall GmbH). Dazu wurde sie zur Orientierung an den Ecken markiert und im Anschluss 10 min bei Raumtemperatur mit frisch zubereiteten 10 ml EDAC (0,16 mg/ 10 ml Aqua bidest.) aktiviert. Danach wurde die Membran mit Aqua bidest. abgespült und in einen Miniblottter auf eine stabilisierende Schaumstoffmatte gelegt. Noch vorhandenes Wasser in den Vertiefungen wurde mit einer Vakuumpumpe mit aufgesetzter Pipettenspitze abgesaugt. In die Vertiefungen wurden 150 µl des Natriumhydrogenkarbonats mit den gelösten Sonden gefüllt und mindestens 1 min inkubiert. Die erste und letzte Vertiefung wurde mit Tinte markiert, die zuvor 1:1000 in 2×SSPE-Puffer gelöst wurde. In dieser Zeit verteilten sich die Sonden auf einer senkrechten Linie unter der Vertiefung, in die sie eingefüllt wurden und banden durch die Aktivierung mit EDAC mit ihrer Aminogruppe an die Nylonmembran. Danach wurden die überschüssigen

Sonden in den Vertiefungen mittels Vakuumpumpe wieder abgesaugt und die Membran mit einer Pinzette aus dem Miniblotter entfernt. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe von 8 min mit 100 ml einer frischen 100 mM Natriumhydroxidlösung und von 5 min mit 100 ml eines 2×SSPE/0,1 % SDS – Puffers bei 60 °C. Die Temperatur wurde im Biometra Mini Hybridisierungsofen erzeugt. Diese Schritte dienten der Entfernung nicht gebundener Sonden und der Inaktivierung der Membran.

Zur Hybridisierung der PCR-Produkte an die auf der Nylonmembran gebundenen Sonden wurden zunächst 10 µl der biotinylierten Amplikons mit jeweils 150 µl 2×SSPE/0,1 % SDS - Puffer gemischt. Danach wurden sie 10 min bei 100 °C in einem Thermocycler denaturiert, sofort im Anschluss auf Eis abgekühlt und dann mit einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. Die Membran wurde 5 min in ca. 10 ml 2×SSPE/0,1 % SDS inkubiert und anschließend, in Relation zur Position der aufgetragenen Sonden, um 90° gedreht in den Miniblotter eingespannt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Tintenlinien direkt unter den Öffnungen des Miniblotters liegen, um ein akkurates Auftragen der Amplikons im 90°-Winkel zu den Sonden zu gewährleisten. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einer Vakuumpumpe entfernt und die 160 µl der verdünnten PCR-Produkte wurden jeweils in eine Vertiefung unter Vermeidung von Luftblasen eingefüllt. Um ein versehentliches horizontales Verteilen der PCR-Produkte zu vermeiden, wurden die nicht benutzten Vertiefungen mit 2×SSPE/0,1 % SDS – Puffer gefüllt. Die Hybridisierung fand bei einer Temperatur von 42 °C statt. Dafür wurde der Miniblotter mit der Membran 60 min horizontal in den Hybridisierungsofen gestellt. Während dieser Zeit verteilten sich die PCR-Produkte linear senkrecht auf der Membran unter der Vertiefung, in welche sie eingefüllt wurden. Dabei kam es zur Hybridisierung zwischen Amplikon und komplementärer Sonde an den Stellen, an denen sich ihre Verteilungslinien kreuzten. Überschüssiges PCR-Produkt in den Vertiefungen wurde anschließend mit einer Vakuumpumpe entfernt und die Membran aus dem Miniblotter entnommen. Sie wurde dann ca. 10 min lang bei 50 °C in einer Schale mit 10 ml 2×SSPE/0,5 % SDS – Puffer im Wasserbad unter leichtem Schwenken gewaschen, um nicht gebundene PCR-Produkte zu entfernen. Die Markierung der hybridisierten Amplikons erfolgte durch das dreißigminütige Inkubieren der Membran in 10 ml 2×SSPE/0,5 % SDS – Puffer mit 2,5 µl des Enzyms Streptavidin-Peroxidase (Streptavidin-POD) bei 42 °C im Hybridisierungsofen. Dabei band das Streptavidin an das Biotin der Amplikons. Anschließend wurde das nicht gebundene Enzym 10 min im Wasserbad bei 42 °C mit vorerhitztem 2×SSPE/0,5 % SDS-Puffer unter leichtem Schwenken abgewaschen. Die Lumineszenzreaktion wurde mittels Chemolumineszenzsubstrat Roti®-

Lumin 1 und 2 ausgelöst. Die Chemikalien reagieren laut Angaben des Herstellers Carl Roth mit der Meerrettichperoxidase (HRP), die an das Streptavidin gekoppelt ist. Dadurch wird Licht emittiert. Von beiden Chemikalien wurden jeweils 5 ml laut Herstellerangaben gemischt und auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden 10 ml der Arbeitslösung auf die Nylonmembran, die vorher auf eine Klarsichtfolie gelegt wurde, aufgetragen, mit einer zweiten Klarsichtfolie ohne Lufteinschlüsse abgedeckt und ca. 1 min einwirken lassen. Für die Visualisierung und Bildgebung wurde die ChemoCam von INTAS verwendet. Die Chemolumineszenz erreicht ihren Höhepunkt nach ca. 20 min. Danach verringert sich die Signalstärke schnell und stetig.

2.4.7 Luminex®-Hybridisierungsreaktion

Das verwendete Protokoll von Luminex® wurde mit einigen Änderungen durchgeführt. Hier beruhten die Modifikationen auf dem Protokoll der Arbeitsgruppe für Tumorummunologie der Charité, Berlin (Arbeitsgruppenleiter: Dr. rer. nat. Andreas Kaufmann).

Die gekoppelten Mikrosphären wurden zunächst ca. 30 min bei Raumtemperatur aufgewärmt, 30 s geschüttelt und 20 s bei 45-55 kHz im Ultraschallwasserbad beschallt, um aggregierte Mikrosphären von einander zu lösen. Dabei mussten sie stets vor direktem Licht geschützt werden. Die Hybridisierung fand in einer 96-Well-Mikrotiterplatte statt. Es konnten also bis zu 96 Reaktionen pro Platte durchgeführt werden. Alle Reaktionen und Negativkontrollen wurden in Doppel- oder Dreifachansätzen durchgeführt. Für jede Reaktion wurden vom Hersteller 150 Mikrosphären/ μ l von allen verwendeten Regionen empfohlen. Dafür musste eine Verdünnung der gekoppelten Beads mit 1,5facher TMAC-Lösung angefertigt werden. Diese Verdünnung wurde ebenfalls 30 s gemischt und 20 s bei 45-55 kHz im Ultraschallwasserbad beschallt. Für jede Reaktion mit PCR-Produkten wurden 12 μ l TE-Puffer (pH 8,0), 5 μ l biotinyliertes PCR-Produkt und 33 μ l der Bead-Verdünnung benötigt. Bei der Verifizierung der Bead-Kopplung wurden 2 μ l der zu den Sonden komplementären und biotinylierten Oligonukleotide (100 pmol/ml) verwendet. Entsprechend wurden 15 μ l TE-Puffer (pH 8,0) und 33 μ l der Bead-Verdünnung eingesetzt. Die Negativkontrollen bestanden aus 12 μ l TE-Puffer (pH 8,0), 5 μ l der Negativkontrolle aus der PCR und 33 μ l der Bead-Verdünnung bzw. aus 17 μ l TE-Puffer und 33 μ l der Bead-Verdünnung. Ein Vermischen der Komponenten wurde durch vorsichtiges Hoch- und Herunterpipettieren oder Mischen mit einem Vortex-Rüttler auf niedriger Stufe erzielt. Die Mikrotiterplatte wurde mit lichtundurchlässiger, selbstklebender Aluminium-

Abdeckfolie bedeckt und anschließend erst 5 min bei 95 °C, dann 45 min bei einer festgelegten Hybridisierungstemperatur und 300 rpm inkubiert. Der erste Schritt diente der Denaturierung der biotinylierten DNA aus der PCR und wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Während des zweiten Schritts fand die Hybridisierung der DNA an die Oligonukleotidsonden der Beads statt. Als Hybridisierungstemperatur wurde 42 °C bestimmt. Auch andere Temperaturen und Inkubationszeiten wurden getestet (Kapitel III 2.4.7.1). Dabei wurde ein Schüttelinkubator benutzt, um ein Absinken und Verklumpen der Beads zu vermeiden. Danach wurde die Mikrotiterplatte 30-60 s auf einem Magnetseparator platziert. Beim anschließenden Herausschütten der Flüssigkeit verblieben die Beads durch den Magneten am Boden der Wells. Nun wurde die Platte wieder vom Magneten entfernt. Die im Folgenden verwendete Färbelösung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin-PE in 1facher TMAC-Lösung wurde stets frisch angesetzt (0,63 µg/ml). Davon wurden 75 µl für jede Reaktion und Negativkontrolle verwendet. Nach Zugabe der Färbelösung und vorsichtigem Mischen wurde die Platte erneut mit Aluminium-Abdeckfolie abgedeckt und weitere 30 min bei der festgelegten Hybridisierungstemperatur und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit wieder mit Hilfe des Magnetseparators entfernt. Danach folgte ein Waschgang mit einem PBS-Casein-Puffer. Dabei wurden 75 µl dieses Puffers für jede Reaktion und Negativkontrolle verwendet, auf dem Vortex-Gerät vorsichtig mit den Beads vermischt und mit Hilfe des Magneten wieder von den Beads entfernt. Dieser Waschschrift wurde im Anschluss noch zweimal wiederholt. Zur Analyse im Bio-Plex®-System wurden 75 µl des PBS-Casein-Puffers zu jeder Reaktion und Negativkontrolle hinzugefügt. Ein gründliches Durchmischen des Mediums und der Beads ist laut Herstellerangaben direkt vor der Analyse durchzuführen.

2.4.7.1 Optimierung der Hybridisierungsreaktion

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden Temperatur, Hybridisierungsdauer, Menge des eingesetzten PCR-Produktes sowie des Fluoreszenzfarbstoffes Streptavidin-PE, Art des Waschpuffers sowie Anzahl der Waschschrte variiert. Bezüglich der Hybridisierungstemperatur wurde sich zunächst an den für die Sonden B. c. alt, B. g., B. v. und B.-catch all (Tabelle III-2) erprobten und publizierten 42 °C orientiert (Matjila et al. 2008; Matjila et al. 2005). Zusätzlich wurden Gradienten mit 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 42 °C und 43 °C sowie 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C, 48 °C und 50 °C getestet. Die Dauer des Hybridisierungsvorgangs wurde zunächst basierend auf dem Protokoll der Arbeitsgruppe Tumorummunologie, Charité Berlin auf 45 min festgelegt (Kapitel III 2.4.7). Inkubationszeiten von 30 min sowie 60 min wurden am Beispiel der Sonden A/E-catch all und E.c. (Tabelle III-2) zusammen mit den entsprechenden PCR-Produkten ebenfalls getestet. Die Menge des Streptavidin-PE in einer 1fachen TMAC-Lösung zur Herstellung der Fluoreszenzfarbstofflösung betrug zuerst, wie im Luminex®-Hybridisierungsprotokoll vorgeschrieben, 2 µl/ml. Dann wurde sie entsprechend des Hybridisierungsprotokolls der Arbeitsgruppe Tumorummunologie der Charité Berlin auf 0,63 µl/ml herabgesetzt. Die Konzentration von 0,63 µl/ml wurde schließlich für das hier verwendete Protokoll beibehalten (Kapitel III 2.4.7). Um eine Inhibierung der Reaktion aufgrund einer zu großen Menge PCR-Produkt auszuschließen, wurden Testreaktionen mit einem Gesamtvolumen der PCR-Produkte von 2 µl, 5 µl und 10 µl eingesetzt. Außerdem wurden die Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 und 1:30 der PCR-Produkte von Plasmidpositivkontrollen erstellt. Alternativ zu den eingesetzten 75 µl PBS-Casein-Puffer als Waschmedium für die hybridisierten Beads wurde Sheath-Flüssigkeit (Bio-Rad, München) in gleicher Menge getestet (mündliche Kommunikation mit dem technischen Kundenservice von Luminex® und mit der Arbeitsgruppe Tumorummunologie der Charité Berlin). Außerdem wurde die Auswirkung von ein, zwei und drei Waschschrten nach der Färbung mit Streptavidin-PE untersucht. Zusätzlich wurde am Beispiel der Sonde B.c. (Tabelle III-2) getestet ob höhere Signale erzielt werden können, wenn anstatt des hier verwendeten C-6-Spacers ein C-12-Spacer mit den Sonden verbunden wird (Kapitel III 2.4.2). Dabei wurde sich an einigen Publikationen orientiert, in denen die erfolgreiche Durchführung des Luminex®-Assays mit einem C-12-Spacer beschrieben wird (Zubach et al. 2012; Taniuchi et al. 2011; Schmitt et al. 2008; Schmitt et al. 2006).

2.4.8 Bio-Plex®-System (Bio-Rad)

Zur Analyse wurde das Bio-Plex ® 200 -Gerät zunächst auf die Hybridisierungstemperatur erhitzt. Die Flüssigkeit in den einzelnen Wells mit den enthaltenen Mikrossphären wurde angesaugt und zur Messeinheit geleitet. Dabei wurden die Beads durch die sogenannte Sheath-Flüssigkeit umhüllt, die durch das System fließt und als Beförderungsmedium dient. Die Analyse verläuft nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie. Die Beads wurden nacheinander einzeln durch das Detektionssystem geleitet. Ein roter Laser (635 nm) regte die interne Rot- und Infrarotfärbung der Mikrosphären dazu an Licht zu emittieren und ermöglichte so ihre Zuordnung zu einer Region. Ein grüner Laser (532 nm) regte fluoreszierende Farbstoffe wie Streptavidin-PE im orangen Spektralbereich des Lichtes an, um damit die Feststellung der Menge an gebundenem PCR-Produkt zu ermöglichen. Eine Photodiode maß das emittierte Licht, welches dann digitalisiert und von der Bio-Plex Manger™- Software verarbeitet wurde (Dunbar 2006).

Die Anzahl der pro Well ausgelesenen Beads, kann im Protokoll der Software vor jedem Durchlauf individuell festgelegt werden. In dem vorliegenden Projekt wurden stets 100 Beads pro Region und Well ausgewertet. Die Intensität der Fluoreszenz wird in der Einheit MFI (Median Fluorescence Intensity) angegeben. Jede Bead-Region hat ein unspezifisches Hintergrundsignal, auch Background genannt. Das Hintergrundsignal einer Bead-Region sollte sich in jedem Assay ähneln, kann aber im ein- bis zweistelligen Dezimalbereich variieren. Deshalb wird es durch die Verwendung von Negativkontrollen für jede Bead-Region und jeden Assaydurchlauf erneut bestimmt. Der erhaltene Wert wird vom Signal der Positivkontrollen und Proben subtrahiert, um deren spezifisches MFI-Wert festzustellen. Nur der so erhaltene korrigierte MFI-Wert, wird in der Auswertung betrachtet. Ab wann eine Probe als positiv gilt, muss mittels Festlegung eines sogenannten Cut-Off-Wertes für jede Bead-Region separat ermittelt werden. In den Assays wurde jede Reaktion und Negativkontrolle doppelt oder dreifach angesetzt und verglichen. Aus den Signalen dieser Mehrfachansätze wurde das arithmetische Mittel gebildet.

2.5 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung wurde in enger Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Jürgen Krücken (Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin) durchgeführt. Obwohl von Beginn an klar war, dass die gesammelten Proben nicht repräsentativ für das jeweilige Land

waren und Untersuchungsergebnisse daher nicht auf die jeweiligen Populationen übertragbar sein würden, wurde entschieden, eine vorläufige, monovariante Analyse der Vorkommenshäufigkeiten durchzuführen, um zumindest auf Unterschiede zwischen den eingesendeten Proben aus den verschiedenen Ländern aufmerksam zu werden. Untersuchungen zur Häufigkeit der Detektion von Mischinfektionen wurden außerdem durchgeführt, da eine Häufung von Mischinfektionen neben biologischen auch technische Gründe, wie Kreuzreaktivität der Assays, haben könnte. Aufgrund der fehlenden Repräsentativität der Proben ist im Folgenden ausschließlich von Häufigkeit (im Probensatz) und nie von einer Prävalenz die Rede.

Für die Ergebnisse der Triplex- und Quadruplex-PCR-Verfahren wurde der Signifikanzwert (p-Wert) berechnet, um das Erregervorkommen der beprobten Länder innerhalb des untersuchten Probenumfangs zu vergleichen (Kapitel IV1.5). Der Vergleich wurde mit dem exakten Mid-P-Test durchgeführt, einer Modifikation des exakten Tests nach Fischer. Damit ist es möglich auch kleine Datenmengen zu berechnen und die Beziehung zweier Datenkategorien untereinander zu untersuchen. Zunächst wird von der Nullhypothese H_0 ausgegangen, die besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den zu vergleichenden Daten gibt. Der errechnete p-Wert gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Verwerfen dieser Hypothese falsch ist und variiert zwischen 0 und 1. Je kleiner p ist, desto signifikanter ist der Unterschied zwischen den Daten, in diesem Fall das Erregervorkommen in den einzelnen Ländern. Ab einem Wert von $\leq 0,05$ wird hier von einem signifikanten Unterschied gesprochen. Dies ist ein verbreiteter Grenzwert für Signifikanz. Weitere Definitionen für p-Werte wurden für diese statistischen Auswertungen wie folgt festgelegt:

$<0,001$ höchst signifikant

$>0,001-0,01$ hoch signifikant

$>0,01-0,05$ signifikant

$>0,05$ nicht signifikant

Die Berechnung des p-Wertes erfolgte mit dem Open Source Programm OpenEpi 2.3.1 (Kapitel III 1.10). Zusätzlich zum p-Wert wurden für die Mischinfektionen, die mit den verwendeten PCR-Verfahren detektiert wurden, Erwartungswerte für jedes Land kalkuliert. Der Erwartungswert wurde hier wie folgt berechnet:

$$\mathbf{E(X)} = (\mathbf{x_1} \times \mathbf{x_2}) \times \mathbf{N} = \boldsymbol{\mu}$$

$E(X) = \mu$ = Erwartungswert

x_1 = Prozentualer Anteil positiver Proben
pro Land (Erregergruppe 1)

x_2 = Prozentualer Anteil positiver Proben
pro Land (Erregergruppe 2)

N = Anzahl der untersuchten
Blutproben pro Land

Dies soll einen Vergleich zwischen den aufgrund des prozentualen Anteils der Einzelinfektionen erwarteten Werten und den tatsächlich detektierten Mischinfektionen pro Land ermöglichen.

Die Ergebnisse des Luminex®-Verfahrens werden mit der Einheit MFI (Median Fluorescence Intensity) angegeben. Dafür wird der Medianwert aus allen pro Reaktionsansatz gemessenen Beads vom Bio-Plex®-Gerät automatisch errechnet. Für jede Reaktion gab es Mehrfachansätze, aus deren Signalen jeweils ein arithmetisches Mittel und eine Standardabweichung berechnet wurden (Kapitel IV 2).

IV Ergebnisse

1 Ergebnisse der Polymerasekettenreaktionen (PCR)

Die Erstellung der Positivkontrollen wurde in Kapitel III 1.8 beschrieben. Dabei konnten die relevanten Genabschnitte der verwendeten Erreger in einen Plasmidvektor integriert und in kompetenten *E. coli*-Zellen durch Klonierung vervielfältigt werden. Anschließend wurden die Plasmide erfolgreich aus den Zellen isoliert und konnten für das PCR-Verfahren als Positivkontrollen verwendet werden. Damit wurde die Sensitivität der Primerpaare einzeln in Singleplex-Ansätzen und zusammen im Triplex- und Quadruplex-Ansatz getestet. Die PCR-Verfahren wurden in mehreren Schritten etabliert: zuerst als Duplex-, dann als Triplex- und anschließend als Quadruplex-PCR. Dabei wurde zunächst der Maxima™ Hot Start PCR Master Mix (2×) zusammen mit verschiedenen Primer- und Mg²⁺-Konzentrationen sowie Temperaturgradienten verwendet. Außerdem wurde die Anzahl der Thermocyclerzyklen variiert und die Zugabe von Q-Solution getestet. Als das nicht die gewünschten Ergebnisse zeigte, wurde das QIAGEN® Multiplex PCR Plus Kit verwendet, womit die Triplex- und Quadruplex-PCR erfolgreich durchgeführt werden konnte (Kapitel III 2.2.1). Die Multiplex-PCR-Verfahren wurden dann dazu benutzt, Blutproben von Hunden aus den verschiedenen süd- und südosteuropäischen Ländern (Kapitel III 2.1) zu untersuchen.

1.1 Nachweisgrenzen der Singleplex-PCR-Verfahren

1.1.1 Piroplasmida

Für diese Singleplex-PCR wurde das Primerpaar bathF-kurz-R und bathR-kurz verwendet, welches eine Sequenz der 18S-Genregion amplifiziert (Tabelle III-1). Die Primer für die Detektion von Erregern der Ordnung Piroplasmida wurde mit den Plasmid-Positivkontrollen von *B. canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli* und *B. rossi* getestet (Tabelle III-4). Dabei entstanden Amplikons mit der Länge von 414 bp für *B. canis*, 412 bp für *B. gibsoni*, 422 bp für *B. vogeli* und 413 bp für *B. rossi*. Die PCR wurde wie in Kapitel III 2.2.1.1 beschrieben mit der Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase durchgeführt. Um die Sensitivität der PCR zu bestimmen, wurden von den Plasmiden der Erreger *B. canis* und *B. rossi* Verdünnungsreihen mit den folgenden Verdünnungsstufen angefertigt: 10⁶, 4×10³, 4×10², 4×10¹, 2×10¹ und 10¹

DNA-Moleküle/ μl . Die Nachweisgrenze unter Verwendung von $1 \mu\text{l}$ Template pro Reaktionsansatz lag hier bei 2×10^1 DNA-Molekülen/Reaktionsansatz (Abbildung IV-1).

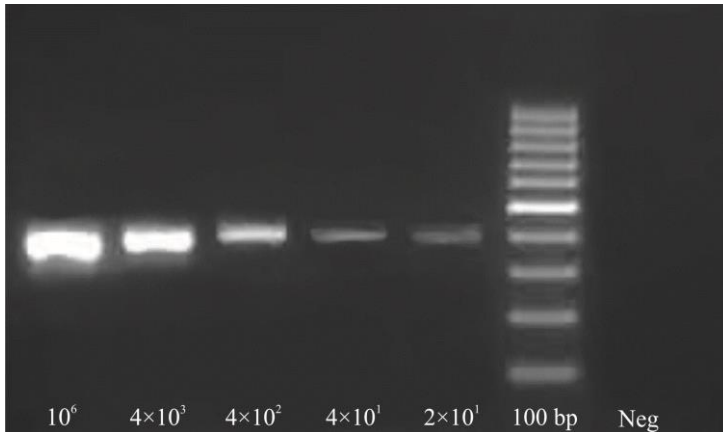


Abbildung IV-1: Nachweisgrenze der Singleplex-PCR mit dem Primerpaar bathF-kurz-R und bathR-kurz am Beispiel von *B. canis*.

1.1.2 Anaplasmataceae (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. und *Cand. Neoehrlichia mikurensis*)

Mit dieser PCR wurde eine Sequenz des 16 S-Gens mit dem Primerpaar A/E-FP und A/E-RP (Tabelle III-1), wie in Kapitel III 2.2.1.1 erläutert, amplifiziert. Unter Verwendung der Plasmidpositivkontrollen entstanden folgende Amplikons: *A. phagocytophilum* mit einer Länge von 258 bp, *E. canis* mit 257 bp und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* mit 256 bp (Tabelle III-4). Die Sensitivität wurde in verschiedenen Verdünnungsreihen mit den Verdünnungsstufen 10^6 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 , 2×10^1 und 10^1 DNA-Moleküle/ μl getestet. Ein zuverlässiger Nachweis ab 10^1 DNA-Moleküle/Reaktionsansatz unter Verwendung von $1 \mu\text{l}$ Template pro Reaktionsansatz war möglich (Abbildung IV-2).

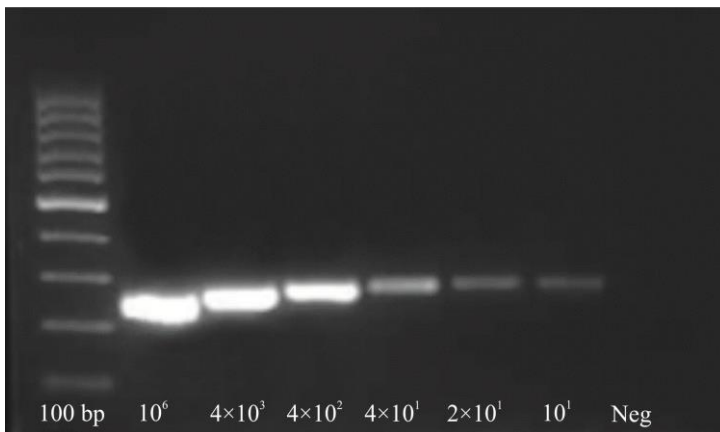


Abbildung IV-2: Nachweisgrenze der Singleplex-PCR mit dem Primerpaar A/E- FP und A/E-RP am Beispiel von *A. phagocytophilum*.

1.1.3 Onchocercidae

Hier wurde das Primerpaar DIDR-F1 und DIDR-R1 (Tabelle III-2) zur Amplifizierung einer Zielsequenz im ITS-2-Gen verwendet. Wie die oben beschriebenen Singleplex-PCR-Verfahren wurde auch diese PCR mit der Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase durchgeführt (Kapitel III 2.2.1.1) Dabei entstanden Amplikons der Positivkontrollen von 540 bp für *D. immitis*, von 492 bp für *D. repens*, und von 547 bp von der Mikrofilarie „greek dog“. Die Nachweisgrenze wurde ebenfalls mit Hilfe einer Verdünnungsreihen ermittelt. Auch hier wurde 1 µl des Templates pro Reaktionsansatz verwendet. Ab 2×10^1 Molekülen/Reaktionsansatz konnte ein zuverlässiger Erregernachweis erbracht werden (Abbildung IV-3).

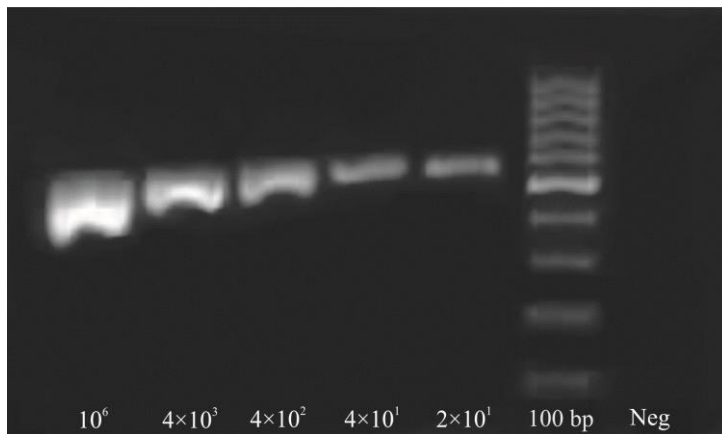


Abbildung IV-3: Nachweisgrenze der Singleplex-PCR mit dem Primerpaar DIDR-F1 und DIDR-R1 am Beispiel von *D. immitis*.

1.1.4 *Rickettsia* spp.

Die Singleplex-PCR wurde mit dem Primerpaar CS409d und RmasgltA1065lo (Tabelle III-1) und dem Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase durchgeführt (Kapitel III 2.2.1.1). Bei dem Zielgen handelte es sich um einen Abschnitt im *gltA*-Gen. Die Amplikons der Positivkontrolle *R. raoulti* hatten eine Größe von 677 bp. Auch hier wurde die Nachweisgrenze wieder durch eine Verdünnungsreihe bestimmt. Davon wurde wieder 1 µl Template pro Reaktionsansatz verwendet. Ein zuverlässiger Nachweis war ab einer DNA-Menge von 2×10¹ Molekülen/Reaktionsansatz möglich.

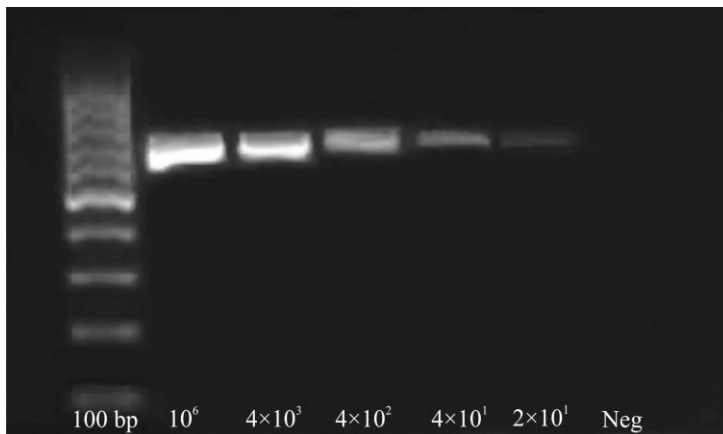


Abbildung IV-4: Nachweisgrenze der Singleplex-PCR mit dem Primerpaar CS409d und Rmasglta1065lo am Beispiel von *R. raoulti*.

1.2 Nachweisgrenze der Duplex-PCR

Bei dem in Kapitel III 2.2.1.2 beschriebenen PCR-Verfahren wurden die Primerpaare bathF-kurz-R und bathR für die Piroplasmida sowie DIDR-F1 und DIDR-R1 für die Onchocercidae kombiniert. Die Duplex-PCR wurde mit der Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase und mit Verdünnungsreihen der Positivkontrollen von *B. canis*, *B. gibsoni* oder *B. rossi* zusammen mit *D. immitis* durchgeführt. Verschiedene Testläufe mit den Verdünnungsstufen 10^6 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 , 2×10^1 und 10^1 Molekülen/ μl zeigten, dass ein zuverlässiger Nachweis beider Erregergruppen ab 2×10^1 DNA Molekülen/ Reaktionsansatz unter Verwendung von $1 \mu\text{l}$ Template pro Erreger und Reaktionsansatz möglich war.

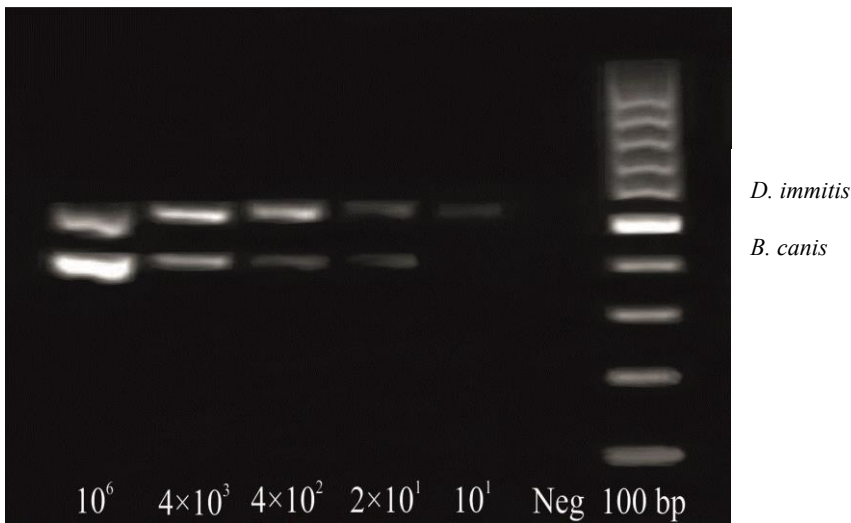


Abbildung IV-5: Nachweisgrenze der Duplex-PCR mit den Primerpaaren bathF-kurz-R und bathR-kurz sowie DIDR-F1 und DIDR-R1 am Beispiel von *B. canis* und *D. immitis*.

1.3 Nachweisgrenze der Triplex-PCR

Die Primerpaare bathF-kurz-R und bathR-kurz für die Piropasmida, A/E-FP und A/E-RP für die Anaplasmatataceae sowie DIDR-F1 und DIDR-R1 für die Onchocercidae wurden in einer Triplex-PCR kombiniert. Die Durchführung mit dem QIAGEN® Kit für Multiplex-PCR-Verfahren ist in Kapitel III 2.2.1.3 beschrieben. Ebenso wie bei der Singleplex- und Duplex-PCR wurden Verdünnungsreihen mit den Positivkontrollen *B. canis*, *B. gibsoni* oder *B. rossi* zusammen mit *A. phagocytophilum*, *E. canis* oder *Cand. Neoehrlichia mikurensis* und *D. immitis* zur Feststellung der Sensitivität angefertigt. Tests mit den Verdünnungsstufen 10^8 , 10^6 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 , 2×10^1 und 10^1 DNA-Moleküle/ μl , von denen jeweils $1 \mu\text{l}$ Template pro Reaktionsansatz und Erreger verwendet wurden, zeigten, dass ein simultaner Nachweis der Erregergruppen ab 10^1 Molekülen/Reaktionsansatz pro Erreger möglich war (Abbildung IV-6

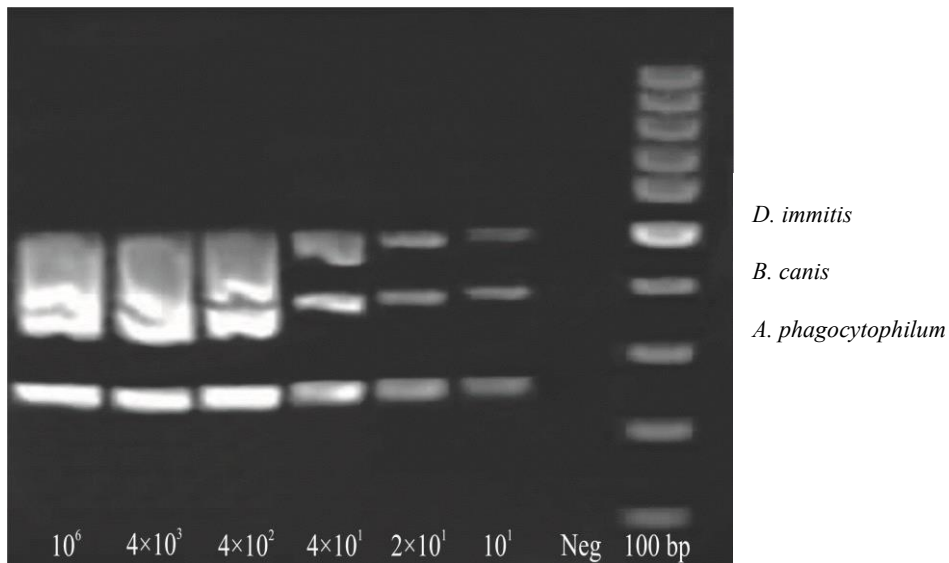


Abbildung IV-6: Nachweisgrenze der Triplex-PCR mit den Primerpaaren A/E- FP und A/E-RP, bathF-kurz-R und bathR-kurz, DIDR-F1 und DIDR-R1 am Beispiel von *A. phagocytophilum*, *B. canis* und *D. immitis*.

1.4 Nachweisgrenze der Quadruplex-PCR

Hier wurden der etablierten Triplex-PCR das Primerpaar CS409d und RmasgltA10651o (Tabelle III-1)) zum Nachweis von *Rickettsia* spp. hinzugefügt. Eine Beschreibung der Durchführung ist in Kapitel III 2.2.1.4 zu finden. Um auch hier Aussagen zur Sensitivität des Verfahrens treffen zu können, wurden folgende Verdünnungsstufen mit DNA der Positivkontrollen *B. canis*, *A. phagocytophilum*, *D. immitis* und *R. raoultii* erstellt: 10^6 , 4×10^3 , 4×10^1 und 10^1 DNA-Moleküle/ μl . Unter Verwendung von $1 \mu\text{l}$ Template pro Reaktionsansatz und Erreger war ein simultaner Nachweis der vier Erregergruppen ab 10^1 DNA-Molekülen/Reaktionsansatz und Erreger möglich.

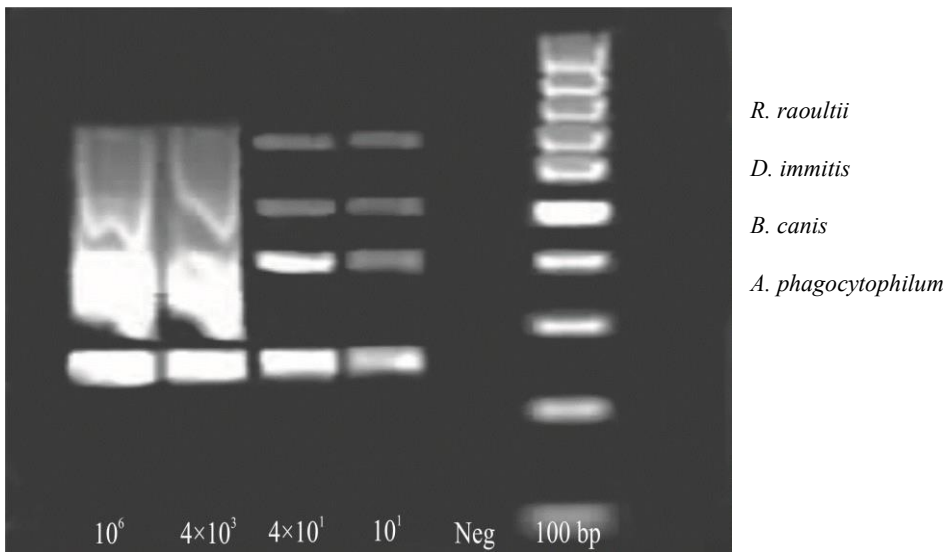


Abbildung IV-7: Nachweisgrenze der Quadruplex-PCR mit den Primerpaaren A/E-FP und A/E-RP, bathF-kurz-R und bathR-kurz, DIDR-F1 und DIDR-R1 sowie CS409d und Rmasglta1065lo mit *A. phagocytophilum*, *B. canis*, *D. immitis* und *R. raoultii*.

1.5 Untersuchung der Blutproben

Die aus Israel, Ungarn, Griechenland, Mazedonien und Bosnien-Herzegowina stammenden Blutproben von Hunden mit dem Verdacht auf mindestens eine canine vektorübertragene Erkrankung (Tabelle III-5) wurden auf Piroplasmida, Anaplasmataceae sowie Onchocercidae und zum Teil auf *Rickettsia* spp. untersucht. Nach der Archivierung auf FTA®-Karten wurde die DNA aus den 246 Proben isoliert (Kapitel III 2.1.3) und mit Hilfe der beschriebenen Triplex-PCR getestet (Kapitel III 2.2.1.3). Außerdem wurden die Proben aus Griechenland, Ungarn und Bosnien-Herzegowina mit der Quadruplex-PCR auf *Rickettsia* spp., Piroplasmida, Anaplasmataceae sowie Onchocercidae untersucht (Kapitel III 2.2.1.4). Die Proben wurden größtenteils mehrfach untersucht, um die Ergebnisse zu verifizieren. Da es sich bei den Blutproben nicht um randomisierte Proben handelte, können die daraus gewonnenen Daten nicht als repräsentativ betrachtet werden. Bei den Proben aus Israel handelt es sich nicht um Verdachtsfälle, sondern um bestätigte canine vektorübertragene Erkrankungen. Diese wurden zur Erstellung der *E. canis*-Plasmidpositivkontrollen und zur Etablierung des DNA-

Extraktionsverfahrens sowie der Multiplex-PCR verwendet und werden daher nicht in der statistischen Auswertung berücksichtigt.

1.5.1 Ergebnisse der Triplex-PCR

In Tabelle IV-1 sind die positiv getesteten Blutproben von Hunden aus den oben genannten Ländern aufgeführt. Die Anzahl sowie der prozentuale Anteil der infizierten Tiere (Konfidenzintervall: 95 %) aus dem Probenumfang der verschiedenen Länder wurden dargestellt. Dabei wurden Einzel- und Mischinfektionen unterschieden. Für die statistischen Berechnungen wurde das Open Source Programm OpenEpi 2.3.1 verwendet (Kapitel III 1.10). Die Prozentwerte wurden auf die erste Stelle nach dem Komma aufgerundet, bei den Konfidenzintervallen wurde auf die zweite Stelle nach dem Komma gekürzt.

Tabelle IV-1. Anzahl und prozentualer Anteil (KI: 95 %) der positiv getesteten Proben aus 246 caninen Blutproben, untersucht mittels Triplex-PCR.

		Bosnien- Herzegowina	Griechenland	Mazedonien	Ungarn	Israel*
		n = 56	n = 48	n = 30	n = 100	n = 12
Einzelinfektionen gesamt	Pos.	14	13	22	25	10
	%	25,0	27,1	73,3	25,0	83,3
	KI	(15,0-34,5)	(16,0-40,9)	(55,6-86,8)	(17,3-34,2)	
Piroplasmida	Pos.	3	1	17	7	0
	%	5,4	2,1	56,7	7,0	0,0
	KI	(1,4-13,9)	(0,1-9,9)	(38,7-73,7)	(3,1-13,4)	
Anaplasmataceae	Pos.	2	2	1	8	10
	%	3,6	4,2	3,3	8,0	83,3
	KI	(0,6-11,3)	(0,7-13,1)	(0,2-15,4)	(3,8-14,6)	
Onchocercidae	Pos.	9	10	4	10	0
	%	6,1	20,83	13,3	10,0	0,0
	KI	(8,1-27,5)	(11,1-34,0)	(4,4-29,1)	(5,2-17,1)	
Mischinfektionen gesamt	Pos.	2	3	1	2	1
	%	3,6	6,3	3,3	2,0	8,3
	KI	(0,6-11,3)	(1,6-16,1)	(0,2-15,4)	(0,3-6,5)	
Anaplasmataceae + Piroplasmida	Pos.	0	0	0	1	1
	%	0,0	0,0	0,0	1,0	8,3
	KI	(0,0-5,2)	(0,0-6,1)	(0,0-9,5)	(0,1-4,8)	
Anaplasmataceae + Onchocercidae	Pos.	0	3	0	1	0
	%	0,0	6,3	0,0	1,0	0,0
	KI	(0,0-5,2)	(1,6-16,1)	(0,0-9,5)	(0,1-4,8)	
Piroplasmida + Onchocercidae	Pos.	2	0	1	0	0
	%	3,6	0,0	3,3	0,0	0,0
	KI	(0,6-11,3)	(0,0-6,1)	(0,2-15,4)	(0,0-3,0)	
Einzel- und Mischinfektion, gesamt	Pos.	16	16	23	27	11
	%	28,6	33,3	76,7	27,0	91,7
	KI	(17,9-41,4)	(21,1-47,5)	(59,2-89,2)	(19,0-36,3)	

n: Anzahl untersuchter Proben; Pos.: Anzahl positiv getesteter Proben; %: prozentualer Anteil der positiv getesteten Proben; KI: Konfidenzintervall, 95%; * nicht bei der statistischen Auswertung berücksichtigt

Mit dem exakten Mid-P Test, einer Modifikation des exakten Tests nach Fisher, wurde die Häufigkeit der Einzel- sowie der Mischinfektionen der Proben aus den verschiedenen Ländern verglichen (Kapitel III 2.5). Die Ergebnisse dieser statistischen Berechnungen in Form von Signifikanzwerten (p-Werte) sind in Tabelle IV-2 (Einzelfinfektionen) und Tabelle IV-3 (Mischinfektionen) zusammengefasst. Hier wurde auf drei Nachkommastellen gerundet.

Tabelle IV-2. Vergleich der länderspezifischen Häufigkeiten bezüglich der Einzelfinfektionen innerhalb der untersuchten Hundeblutproben (Triplex-PCR).

	p-Wert*		
	Piroplasmida	Anaplasmataceae	Onchocercidae
B.-H./Griechenland	0,449	0,883	0,933
B.-H./Mazedonien	< 0,001 (0,15/1)**	0,993	0,762
B.-H./Ungarn	0,721	0,304	0,281
Griechenland/Mazedonien	< 0,001 (0,04/1)**	0,899	0,717
Griechenland/Ungarn	0,242	0,419	0,263
Mazedonien/Ungarn	< 0,001 (8,1/1)**	0,426	0,603

* p-Wert: Signifikanzwert, $p < 0,05$; ** Häufigkeitsverhältnis der verglichenen Länder bezüglich des Erregervorkommens (angegeben, wenn $p < 0,05$); B.-H.: Bosnien-Herzegowina

Tabelle IV-3. Vergleich der länderspezifischen Häufigkeiten bezüglich der Mischinfektionen innerhalb der untersuchten Hundeb Blutroben (Triplex-PCR).

	p-Wert*		
	Anaplasmataceae + Piroplasmida	Anaplasmataceae + Onchocercidae	Piroplasmida + Onchocercidae
B.-H./Griechenland	1,000	0,094	0,299
B.-H./Mazedonien	1,000	1,000	0,710
B.-H./Ungarn	0,641	0,641	0,127
Griechenland/Mazedonien	1,000	0,227	0,384
Griechenland/Ungarn	0,675	0,110	1,000
Mazedonien/Ungarn	0,769	0,769	0,230

* p-Wert: Signifikanzwert, $p < 0,05$; B.-H.: Bosnien-Herzegowina

Zusätzlich zu den Signifikanzwerten wurden Erwartungswerte (Kapitel III 2.5) zum Auftreten der Mischinfektionen innerhalb des Probenumfangs, die auf den detektierten Einzelinfektionswerten beruhen (Tabelle IV-1), kalkuliert, um diese dann mit der Anzahl der tatsächlich nachgewiesenen Mischinfektionen zu vergleichen. Zu jedem Erwartungswert wurde, sofern möglich, Signifikanzwerte berechnet. Diese wurden auf drei Kommastellen gekürzt. Die Erwartungswerte wurden mit zwei Kommastellen angegeben.

Tabelle IV-4. Erwartungswerte der Mischinfektionen in Bezug auf die Untersuchungsergebnisse der Triplex-PCR.

	Erwartungswert μ		
	(p-Wert)		
	Anaplasmataceae + Piroplasmida	Anaplasmataceae + Onchocercidae	Piroplasmida + Onchocercidae
Bosnien- Herzegowina	0,11 (1,000)	0,36 (1,000)	0,45 (0,248)
Griechenland	0,04 (1,000)	0,33 (0,121)	0,16 (1,000)
Mazedonien	0,55 (1,000)	0,13 (1,000)	2,36 (0,619)
Ungarn	0,56 (0,500)	0,8 (0,500)	0,7 (1,000)

* p-Wert: Signifikanzwert, $p < 0,05$;

1.5.2 Ergebnisse der Quadruplex-PCR

Wie bei den Ergebnissen der Triplex-PCR wurde auch hier eine Übersicht der Anzahl und des prozentualen Anteils (Konfidenzintervall: 95 %) der positiven Hundebloodproben erstellt (Tabelle IV-2). Hier wurden die 95%-Konfidenzintervalle wieder auf die zweite Stelle nach dem Komma gerundet und die prozentualen Werte mit einer Kommastelle angegeben. Die Proben aus den Ländern Israel und Mazedonien wurden jedoch ausschließlich mit der Triplex-PCR, nicht mit der Quadruplex-PCR untersucht und sind deshalb in den folgenden Tabellen nicht enthalten. Ebenso wurden *Rickettsia* spp. in den Tabellen nicht aufgeführt, da bei keiner der Proben ein Nachweis dieser Erregerspezies geliefert werden konnte.

Tabelle IV-5. Anzahl und prozentualer Anteil (95 % Konfidenzintervall: KI) der positiv getesteten Proben aus 204 caninen Blutproben, untersucht mittels Quadruplex-PCR.

		Bosnien-Herzegowina	Griechenland	Ungarn
		n = 56	n = 48	n = 100
Einzelinfektionen, gesamt	Pos.	15	18	27
	%	26,8	37,5	27,0
	KI	(16,5-39,5)	(24,7-51,8)	(19,0-36,2)
Piroplasmida	Pos.	4	2	10
	%	7,1	4,2	10,0
	KI	(2,3-16,3)	(0,7-13,1)	(5,2-17,1)
Anaplasmataceae	Pos.	2	3	7
	%	3,6	6,3	7,0
	KI	(0,6-11,3)	(1,6-16,1)	(3,1-13,5)
Onchocercidae	Pos.	9	13	10
	%	16,1	27,1	10,0
	KI	(8,1-27,5)	(16,0-40,9)	(5,2-17,1)
Mischinfektionen, gesamt	Pos.	1	3	5
	%	1,8	6,3	5,0
	KI	(0,1-8,5)	(1,6-16,1)	(1,9-10,7)
Anaplasmataceae + Piroplasmida	Pos.	0	1	4
	%	0,0	2,1	4,0
	KI	(0,0-5,2)	(0,1-9,9)	(1,3-9,4)
Anaplasmataceae + Onchocercidae	Pos.	1	2	1
	%	1,8	4,2	1,0
	KI	(0,1-8,5)	(0,7-13,1)	(0,1-4,8)
Piroplasmida + Onchocercidae	Pos.	0	0	0
	%	0,0	0,0	0,0
	KI	(0,0-5,2)	(0,0-6,1)	(0,0-3,0)
Einzel- und Mischinfektion gesamt	Pos.	16	21	32
	%	28,6	43,8	32,0
	KI	(17,9-41,4)	(30,3-58,0)	(23,4-41,6)

n: Anzahl untersuchter Proben; Pos.: Anzahl positiv getesteter Proben; %: prozentualer Anteil der positiv getesteten Proben; KI: Konfidenzintervall, 95%

Die Berechnung der Signifikanzwerte (p-Werte) erfolgte wieder mit dem exakten Mid-P Test (Kapitel III 2.5), um einen Vergleich der Häufigkeiten innerhalb der gesammelten Proben zu erhalten. Die p-Werte der Einzelninfektionen sind in Tabelle IV-6 und der Mischinfektionen in Tabelle IV-7 aufgeführt.

Tabelle IV-6 Vergleich der länderspezifischen Häufigkeiten bezüglich der Einzelninfektionen innerhalb der untersuchten Hundebloodroben (Quadruplex-PCR)

	p-Wert*		
	Piroplasmida	Anaplasmatataceae	Onchocercidae
B.-H./ Griechenland	0,558	0,564	0,182
B.-H./Ungarn	0,577	0,413	0,282
Griechenland/ Ungarn	0,241	0,898	0,011 (0,42/1)**

* p-Wert: Signifikanzwert, $p < 0,05$; ** Häufigkeitsverhältnis der verglichenen Länder bezüglich des Erregervorkommens (wenn $p < 0,05$); B.-H.: Bosnien-Herzegowina

Tabelle IV-7. Vergleich der länderspezifischen Häufigkeiten bezüglich der Mischinfektionen innerhalb der untersuchten Hundebloodroben (Quadruplex-PCR).

	p-Wert*		
	Anaplasmatataceae + Piroplasmida	Anaplasmatataceae + Onchocercidae.	Piroplasmida + Onchocercidae
B.-H./ Griechenland	0,462	0,537	1,000
B.-H./Ungarn	0,165	0,718	1,000
Griechenland/ Ungarn	0,613	0,278	1,000

* p-Wert: Signifikanzwert, $p < 0,05$; Häufigkeitsverhältnis der verglichenen Länder bezüglich des Erregervorkommens nur angegeben, wenn $p < 0,05$; B.-H.: Bosnien-Herzegowina

Neben der Berechnung der Signifikanzwerte wurden auch hier Erwartungswerte (Kapitel III 2.5) zum Auftreten der Mischinfektionen innerhalb der Menge der untersuchten Hundebloodproben anhand des Anteils der Einzelinfektionen erstellt (Tabelle IV-8).

Tabelle IV-8. Erwartungswerte der Mischinfektionen in Bezug auf die Untersuchungsergebnisse der Quadruplex-PCR.

	Erwartungswert μ		
	(p-Wert)*		
	Anaplasmatataceae + Piroplasmida	Anaplasmatataceae + Onchocercidae	Piroplasmida + Onchocercidae
Bosnien- Herzegowina	0,14 (1,00)	0,32 (0,50)	0,64 (1,00)
Griechenland	0,12 (0,50)	0,82 (0,247)	0,55 (1,00)
Ungarn	0,7 (0,06)	0,7 (0,50)	1,0 (0,50)

* p-Wert: Signifikanzwert, $p < 0,05$

2 Ergebnisse des Bead-basierten Multiplex-Diagnostikverfahrens (Luminex®-xMAP®-Technologie)

2.1 Konstruktion der Oligonukleotidsonden

Die in Tabelle III-2 aufgeführten Sonden für das Luminex®-Verfahren wurden größtenteils speziell für dieses Forschungsprojekt konstruiert. Die Software von Primer3Plus und Clone Manager Professional 9 wurde verwendet, um Alignments zu erstellen und mögliche Sonden innerhalb der von den Primern begrenzten Genfragmente zu finden. Abbildung IV-8 zeigt beispielhaft ein Alignment der hier relevanten Vertreter der Familie Anaplasmatataceae. Einige repräsentative Abschnitte des 16S rRNA-Gens der Erreger *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* sind hier abgebildet. Sie wurden der NCBI Gendatenbank entnommen und sind mit ihren Zugriffsnummern aufgeführt. Die Sequenzen der Vorwärtsprimer A/E-FP und Rückwärtsprimer A/E-RP (Tabelle III-1) sowie der Sonden A/E-catch all, A. p, E. c. und N. m. sind farbig gekennzeichnet (Tabelle III-2).

```

A.p. KC470064.1      1  ggggatgatgtcaagtcagcaaggcccttatggggtgggctacacacgtg
A.p. JN990106.1     1  ggggatgatgtcaagtcagcaaggcccttatggggtgggctacacacgtg
A.p. CP006618.1     1  ggggatgatgtcaagtcagcaaggcccttatggggtgggctacacacgtg
E.c. AF373613       1  ggggatgatgtcaaatcagcaaggcccttatagggtgggctacacacgtg
E.c. EF011111.1     1  ggggatgatgtcaaatcagcaaggcccttatagggtgggctacacacgtg
E.c. EF195135.1     1  ggggatgatgtcaaatcagcaaggcccttatagggtgggctacacacgtg
N.m. AB074460.1     1  ggggatgatgtcaagtcagcaaggcccttataagggtgggctacacacgtg
N.m. GU724964.1     1  ggggatgatgtcaagtcagcaaggcccttataagggtgggctacacacgtg
N.m. JQ359045.1     1  ggggatgatgtcaagtcagcaaggcccttataagggtgggctacacacgtg

A.p. KC470064.1     51  ctacaatggtgactacaataggttgcaatgtcgtaaggctgagctaatcc
A.p. JN990106.1     51  ctacaatggtgactacaataggttgcaatgtcgcaaggctgagctaatcc
A.p. CP006618.1     51  ctacaatggtgactacaataggttgcaatgtcgcaaggctgagctaatcc
E.c. AF373613       51  ctacaatggcaactacaataggttgcaagccgcaaggctttagctaatcc
E.c. EF011111.1     51  ctacaatggcaactacaataggttgcaagccgcaaggctttagctaatcc
E.c. EF195135.1     51  ctacaatggcaactacaataggttgcaagccgcaaggctttagctaatcc
N.m. AB074460.1     51  ctacaatggtaactacaataggttgcaagatcgcaaggctttagctaatcc
N.m. GU724964.1     51  ctacaatggtaactacaataggttgcaagatcgcaaggctttagctaatcc
N.m. JQ359045.1     51  ctacaatggtaactacaataggttgcaagatcgcaaggctttagctaatcc

A.p. KC470064.1     101 gtaaaagtcattctcagttcggattgtcctctgcaactcgagggcatgaag
A.p. JN990106.1     101 gtaaaagtcattctcagttcggattgtcctctgcaactcgagggcatgaag
A.p. CP006618.1     101 gtaaaagtcattctcagttcggattgtcctctgcaactcgagggcatgaag
E.c. AF373613       101 ataaaagttgtctcagttcggattgttctctgaaactcgagagcatgaag
E.c. EF011111.1     101 ataaaagttgtctcagttcggattgttctctgaaactcgagagcatgaag
E.c. EF195135.1     101 ataaaagttgtctcagttcggattgttctctgaaactcgagagcatgaag
N.m. AB074460.1     101 ataaaagttatctcagttcggattgttctctgtaactcgagagcatgaag
N.m. GU724964.1     101 ataaaagttatctcagttcggattgttctctgtaactcgagagcatgaag
N.m. JQ359045.1     101 ataaaagttatctcagttcggattgttctctgtaactcgagagcatgaag

A.p. KC470064.1     151 tcggaatcgctagtaatcgtggatcagcatgccacgggtaatacgtttctc
A.p. JN990106.1     151 tcggaatcgctagtaatcgtggatcagcatgccacgggtaatacgtttctc
A.p. CP006618.1     151 tcggaatcgctagtaatcgtggatcagcatgccacgggtaatacgtttctc
E.c. AF373613       151 tcggaatcgctagtaatcgtggatcatcacgccacgggtaatacgtttctc
E.c. EF011111.1     151 tcggaatcgctagtaatcgtggatcatcacgccacgggtaatacgtttctc
E.c. EF195135.1     151 tcggaatcgctagtaatcgtggatcatcacgccacgggtaatacgtttctc
N.m. AB074460.1     151 ccggaatcgctagtaatcgtggatcagcatgccacgggtaatacgtttctc
N.m. GU724964.1     151 ccggaatcgctagtaatcgtggatcagcatgccacgggtaatacgtttctc
N.m. JQ359045.1     151 ccggaatcgctagtaatcgtggatcagcatgccacgggtaatacgtttctc

A.p. KC470064.1     201 gggctctgtacacactgcccgtaacgccaatgggaattggcttaactcgaa
A.p. JN990106.1     201 gggctctgtacacactgcccgtaacgccaatgggaattggcttaactcgaa
A.p. CP006618.1     201 gggctctgtacacactgcccgtaacgccaatgggaattggcttaactcgaa
E.c. AF373613       201 gggctctgtacacactgcccgtaacgccaatgggaattggcttaactcgaa
E.c. EF011111.1     201 gggctctgtacacactgcccgtaacgccaatgggaattggcttaactcgaa
E.c. EF195135.1     201 gggctctgtacacactgcccgtaacgccaatgggaattggcttaactcgaa
N.m. AB074460.1     201 gggctctgtacacactgcccgtaacgccaatgggaattggcttaactcgaa
N.m. GU724964.1     201 gggctctgtacacactgcccgtaacgccaatgggaattggcttaactcgaa
N.m. JQ359045.1     201 gggctctgtacacactgcccgtaacgccaatgggaattggcttaactcgaa

A.p. KC470064.1     251 gctggtg
A.p. JN990106.1     251 gctggtg
A.p. CP006618.1     251 gctggtg
E.c. AF373613       251 gctggtg
E.c. EF011111.1     251 gctggtg
E.c. EF195135.1     251 gctggtg
N.m. AB074460.1     251 gctggtg
N.m. GU724964.1     251 gctggtg
N.m. JQ359045.1     251 gctggtg

```

Abbildung IV-8: Beispiel eines Alignments einiger Sequenzen von *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* zur Darstellung der Primer und Sonden.

Primer: ■ A/E-FP, ■ A/E-RP, Sonden: ■ A/E- catch all, ■ A.p., ■ E.c., ■ N.m.

2.2 Die Bead-Kopplung und ihre Verifizierung

Die Kopplungsreaktion, bei der Oligonukleotidsonden Tabelle III-2 an die Luminex®-Beads gebunden wurden, sind in Kapitel III 2.4.3 beschrieben. Der Erfolg der Kopplung von Beads und Oligonukleotidsonden konnte durch die Hybridisierung mit entsprechend kompatiblen, biotinylierten Oligonukleotiden (Kapitel III 2.4.4) verifiziert werden. Die Analyse im BioPlex®-Gerät ergab für die meisten Oligonukleotide in verschiedenen Testdurchläufen Signale im vierstelligen Dezimalbereich (Tabelle IV-9). Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte der Mehrfachansätze einschließlich ihrer Standardabweichung (SD), die in jedem Assaydurchlauf von allen Reaktionen und Negativkontrollen verwendet wurden. Die zu Beginn verwendete Sonde für *B. canis* (B.c. alte) erwies sich während der ersten Tests als fehlerhaft. Das zeigte sich deutlich bei der Kopplungsverifizierung, bei der niedrige Signale für die Reaktionen mit der genannten Sonde erzielt wurden (Tabelle IV-9). Daher wurden für diesen Erreger eine neue Sonde gewählt (B.c. neu), gekoppelt und auf die gleiche Weise getestet (Kapitel III 2.4.4). Bei den Negativkontrollen lagen die Fluoreszenzsignale im zweistelligen Dezimalbereich (Tabelle IV-9). Durch den Vergleich zwischen den Signalen der Negativkontrollen und der Oligonukleotide konnte zunächst gezeigt werden, dass eine Hybridisierung mit dem verwendeten Protokoll (Kapitel III 2.4.3) erfolgreich durchführbar ist. Außerdem konnten das Gelingen der Kopplungsreaktionen sowie die generelle Tauglichkeit der Sonden bestätigt werden.

Tabelle IV-9. Beispiele von Luminex®-Ergebnissen nach der Hybridisierung der Beads mit kompatiblen biotinylierten Oligonukleotiden zur Verifizierung der Kopplungsreaktion.

Sonde	Signal (SD)*	HS (SD)**	Signal - HS (SD)***
A/E-catch all ¹	2973,5 (12,02)	24,8 (0,35)	2948,8 (12,37)
A. p	2332,8 (83,34)	24,8 (2,47)	2308,0 (85,81)
B. c. alt	70,5 (4,94)	47,3 (29,81)	23,2 (34,75)
B. c. neu	1804,3 (302,29)	14,3 (1,26)	1790,0 (303,55)
B.-catch all ²	2736,8 (25,10)	36,0 (4,24)	2700,8 (29,34)
B. g.	2929,1 (72,12)	12,3 (1,06)	2916,8 (73,18)
B. v.	2497 (143,54)	18,1 (1,31)	2478,9 (144,85)
D. i.	1033,1 (29,00)	11,3 (1,71)	1021,8 (30,71)
E. c.	2228,6 (28,28)	20,8 (0,35)	2207,8 (28,63)
Filaria-catch all ³	2901,1 (6,36)	18,8 (3,18)	2882,3 (9,64)
N. m.	1928,5 (186,90)	22,5 (4,59)	1906,0 (197,49)

* Mittelwert der Signale in der Einheit Median Fluorescence Intensity (MFI) mit Standardabweichung (SD)

** Mittelwert der Hintergrundsignale (HS) in der Einheit Median Fluorescence Intensity (MFI) mit Standardabweichung (SD)

*** Mittelwert der Signale abzüglich der Mittelwerte der Hintergrundsignale (HS) in der Einheit Median Fluorescence Intensity (MFI) mit Standardabweichung (SD)

In diesem Testdurchlauf wurden die jeweiligen „catch all“-Sonden mit den folgenden Oligonukleotiden hybridisiert:

¹ A/E-catch all mit *A. phagocytophilum*

² B.-catch all mit *B. canis*

³ Filaria-catch all mit *D. immitis*

2.3 Der Reverse Line Blot (RLB)

Im RLB-Verfahren (Kapitel III 2.4.6.2) wurden PCR-Produkte der Positivkontrollen von *B. canis*, *B. gibsoni* und *B. vogeli*, die mit biotinylierten Rückwärts-Primern amplifiziert wurden, getestet (Abbildung IV-9). Damit sollte gezeigt werden, dass die Biotin-markierten PCR Produkte an die Sonden hybridisieren können und eine Detektion mittels des Streptavidin-HRP-Konjugats in einer Chemilumineszenz-Reaktion möglich ist. Die genannten PCR-Produkte wurden mit den im Kapitel III 2.4.6.1 und Tabelle III-3 dargestellten RLB-Sonden

getestet. Dabei reagierten sie in folgender Weise miteinander: *B. canis* hybridisierte mit den RLB-Sonden Theileria/Babesia catch-all, Babesia catch-all 1 und *B. canis* new. *B. gibsoni* zeigte zusammen mit den RLB-Sonden Theileria/Babesia catch-all und Babesia catch-all 1 positive Signale. *B. vogeli* reagierte positiv mit den RLB-Sonden Theileria/Babesia catch-all, Babesia catch-all 1 und *B. vogeli* old. Außerdem zeigten sich unspezifische Bindungen von *B. canis* an die RLB-Sonden *B. venatorum* und *B. caballi* sowie von *B. vogeli* an die RLB-Sonde *B. caballi* und *B. canis*. *B. gibsoni* hybridisierte nicht mit der Sonde für den asiatischen Genotyp von *B. gibsoni*.

Der Test zeigte, dass eine Bindung der PCR-Produkte mit den entsprechenden Sonden stattfand und der Nachweis mittels Chemilumineszenzdetektion der Biotinylierung möglich war.

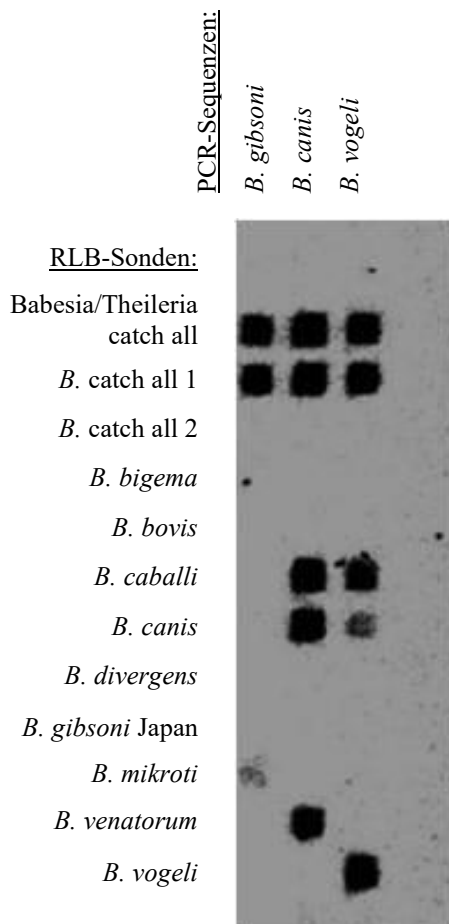


Abbildung IV-9. RLB mit PCR-Produkten von *B. gibsoni*, *B. canis* und *B. vogeli* (vertikal) und spezifischen Oligonukleotidsonden (horizontal).

2.4 Hybridisierung der Beads mit PCR-Produkten

Nach der Verifizierung der Bead-Kopplung und der Biotinylierung, wurden die Beads zusammen mit PCR-Produkten der Plasmidpositivkontrollen getestet. Die Signale der hybridisierten Positivkontrollen sollten als Richtwerte für spätere Untersuchungen der caninen Blutproben dienen. Dazu wurde in wiederholten Assays sowie Mehrfachansätzen eine Hybridisierungsreaktion zwischen dem jeweiligen Amplikon einer Positivkontrolle und der passenden Bead-Region durchgeführt. Die Negativkontrollen wurden ebenfalls im Mehrfachansatz analysiert. Die Signale der Mehrfachansätze wurden arithmetisch gemittelt und mit ihrer Standardabweichung (SD) angegeben. Repräsentative Beispiele von Ergebnissen dieser Assays sind in Tabelle IV-10 abgebildet. Die Hybridisierung wurde mit den unverdünnten PCR-Produkten der Positivkontrollen und nur einer Bead-Region pro Reaktionsansatz durchgeführt. Anders als bei den Reaktionen mit den Sonden-kompatiblen Oligonukleotiden (Kapitel IV 2.2) wurden hier in den meisten Fällen keine Signale festgestellt, die eindeutig als positiv zu deuten waren. Das heißt es konnte aufgrund der Signalstärke im Vergleich zum Hintergrundsignal keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine ausreichende Bindung zwischen Sonde und PCR-Produkt stattfand. Eine Ausnahme stellt die Sonde *B. c.* neu dar, die nach der Hybridisierung mit dem PCR-Produkt von *B. canis* wiederholt ein Signal erzeugte, das um ein Mehrfaches höher war als das Hintergrundsignal.

Tabelle IV-10 Beispiel eines Testassays: Luminex®-Ergebnisse nach der Hybridisierung der Beads mit PCR-Produkten der Positivkontrollen

Sonde	PCR-Produkt	Signal (SD)*	HS (SD)**	Signal-HS (SD)
A/E-catch all	<i>A. phagocytophilum</i>	64,3 (1,77)	15,5 (0,71)	48,8 (2,48)
	<i>E. canis</i>	47,5 (0,71)	15,5 (0,71)	32,0 (1,42)
	<i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i>	26,3 (1,06)	15,5 (0,71)	10,8 (1,77)
A. p.	<i>A. phagocytophilum</i>	63,0 (11,67)	47,0 (2,83)	16,0 (14,5)
B. c. neu	<i>B. canis</i>	178,3 (35,81)	22,3 (1,06)	156,0 (36,87)
B.-catch all	<i>B. canis</i>	220,0 (15,56)	86,7 (26,56)	133,3 (42,12)
	<i>B. gibsoni</i>	214,0 (15,13)	86,7 (26,56)	127,3 (41,69)
B. g.	<i>B. gibsoni</i>	57,3 (22,27)	13,3 (0,35)	44,0 (22,63)
D. i.	<i>D. immitis</i>	78,5 (24,04)	18,3 (3,89)	60,2 (27,93)
E. c.	<i>E. canis</i>	15,5 (0,71)	17,5 (0,00)	-2,0 (0,71)
Filaria-catch all	<i>D. immitis</i>	32,3 (13,79)	17,5 (0,00)	14,8 (13,79)
	<i>D. repens</i>	28,0 (1,41)	17,5 (0,00)	10,5 (1,41)
N. m.	<i>Cand. Neoehrlichia mikurensis</i>	12,3 (1,13)	7,0 (4,95)	5,3 (6,08)

* Mittelwert der Signale in der Einheit Median Fluorescence Intensity (MFI) mit Standardabweichung (SD)

** Mittelwert der Hintergrundsignale (HS) der Einheit Median Fluorescence Intensity (MFI) mit Standardabweichung (SD)

2.4.1 Optimierungsansätze

Wie in Kapitel III 2.4.7.1 beschrieben wurden verschiedene Modifikationsversuche unternommen, um die Ergebnisse der Hybridisierungsreaktionen zu optimieren. Die Hybridisierungstemperaturen 38 °C, 39 °C, 40 °C, 41 °C, 43 °C, 44 °C, 46 °C, 48 °C und 50 °C wurden zusätzlich zu 42 °C in verschiedenen Gradientenreihen getestet. Bei der Auswertung zeigten sich jedoch keine temperaturabhängigen Unterschiede zwischen den jeweiligen MFI-Werten. Deshalb wurden die Hybridisierungstemperatur 42 °C, welche sich an den Schmelztemperaturen der Sonden orientiert, festgelegt. Auch die Variation der Hybridisierungszeiten von 30 min, 45 min und 60 min zeigte keine Verbesserung der Hybridisierungsergebnisse. Bei 60 min wurde lediglich eine geringfügige, generelle Erhöhung der MFI-Werte bei den Negativkontrollen und den Testreaktionen im Vergleich zu den anderen Hybridisierungszeiten festgestellt. Die Menge des Fluoreszenzfarbstoffes Streptavidin-PE in einer 1fachen TMAC-Lösung zur Herstellung der Fluoreszenzfarbstofflösung wurde von 2 µl/ml auf 0,63 µl/ml verringert. Letztere Konzentration führte in der Arbeitsgruppe der Tumorummunologie der Charité Berlin zu deutlicheren Ergebnissen aufgrund von geringeren Hintergrundsignalen bei gleichbleibender Signalstärke der Proben (mündliche Kommunikation Dr. rer. nat. Andreas Kaufmann). Da die Signalstärke in dieser Forschungsarbeit trotz der Modifikation unverändert blieb, wurde entschieden die geringere Menge, wie auch im Protokoll der Tumorummunologie der Charité Berlin vorgegeben, zu verwenden. Zusätzlich wurden unterschiedliche Gesamtvolumen der PCR-Produkte von 2 µl, 5 µl und 10 µl eingesetzt. Außerdem wurden Verdünnungen der Amplikons der Positivkontrollen von 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 und 1:30 mit den entsprechenden Sonden getestet, um auszuschließen, dass eine zu große Menge der PCR-Produkte die Bindungsreaktion inhibiert. Dabei fielen die MFI-Werte mit sinkendem Gesamtvolumen und mit steigender Verdünnung der Amplikons. Ein Austausch des PBS-Casein-Puffers als Waschmedium für die hybridisierten Beads im Bio-Plex® 200 –Gerät mit Sheath-Flüssigkeit (Bio-Rad, München) zeigte keine Unterschiede bei der Analyse. Der Waschschrift nach der Färbung mit Streptavidin-PE wurde entweder ein-, zwei- oder dreimal durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei einigen Reaktionen eine Erhöhung des Hintergrundsignals, wenn der Waschschrift nur ein- oder zweimal durchgeführt wurde. Deshalb wurden drei Waschdurchgänge festgelegt. Jedoch hatte auch das keinen Einfluss auf die Fluoreszenzsignale der PCR-Produkte. Die Verwendung eines C-12-Spacers anstatt eines C-6-Spacers zeigt im Versuch mit der Sonde B.c. (Tabelle III-2) ebenfalls keinen Unterschied bei der Auswertung der MFI-Signale.

V Diskussion

Canine vektorübertragene Krankheitserreger verursachen Infektionen, die bei Hunden unter Umständen schwere Krankheitsverläufe auslösen und letal verlaufen können. Durch verschiedene klimatisch und ökologisch bedingte Faktoren erweitern diese Pathogene zunehmend ihre Verbreitungsgebiete in Europa (Beugnet and Marie 2009). Viele Erreger werden durch das Reisen mit Haustieren in nicht endemische Regionen eingeschleppt. Dabei spielt für Europa unter anderem der Tourismus in mediterranen Ländern eine Rolle. Auch der Import von Haustieren aus dem Ausland, beispielsweise durch Tierschutzorganisationen, stellt ein Risiko dar (Beugnet and Marie 2009; Menn et al. 2010; Schäfer et al. 2019). Zudem begünstigt der Klimawandel die Ansiedlung von Pathogenen und ihren Vektoren in neuen Regionen. Somit könnten sich verschiedene canine vektorübertragene Erreger auch in nördlich gelegenen Habitaten ansiedeln, für die bis vor einigen Jahren noch nicht die dafür erforderlichen klimatischen Voraussetzungen bestanden (Beugnet and Marie 2009). Zu den caninen vektorübertragenen Krankheitserregern gehören unter anderem die Pathogene, auf die sich in diesem Dissertationsprojekt vorwiegend konzentriert wurde: *B. canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni*, *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, *R. conorii*, *D. repens* und *D. immitis*. Die Erreger *B. canis*, *A. phagocytophilum* und *Cand. Neoehrlichia mikurensis* gelten in Deutschland als endemisch (Beelitz et al. 2012; Richter and Matuschka 2012; Kohn et al. 2011; Trotz-Williams and Trees 2003). Bislang konnte der Nachweis über zwei autochthone Infektionen mit *B. gibsoni* (asiatischer Genotyp) bei Hunden in Deutschland erbracht werden (Hartelt et al. 2007). Obwohl bisher keine autochthonen Erkrankungen mit *D. immitis*, *E. canis* und *R. conorii* in Deutschland nachgewiesen wurden, sind diese Erreger in mediterranen Regionen endemisch und unter anderem im Hinblick auf mögliche canine Reiseerkrankungen ebenfalls von Interesse für die Veterinärmedizin in Deutschland (Schäfer et al. 2019; Genchi et al. 2011; Menn et al. 2010). *D. immitis* kann schwere Krankheitsverläufe verursachen, die tödlich enden können (Morchon et al. 2012). Die Erregernachweise in nördlicheren, nicht endemischen Regionen Europas werden unter anderem mit Tiertransporten und dem Reisen mit Haustieren in endemische Gebiete in Verbindung gebracht (Genchi et al. 2011). Darüber hinaus wurde der Erreger bei Vektormücken in Deutschland nachgewiesen. Deshalb und aufgrund der klimatischen Voraussetzungen wird eine langfristige Endemisierung hierzulande als möglich erachtet (Kronefeld et al. 2014; Sassnau et al. 2014). Nachweise

vereinzelter autochthoner Infektionen bei Hunden in Deutschland mit dem Erreger *D. repens* wurden bereits publiziert (Sassnau et al. 2013; Pantchev et al. 2009; Hermosilla et al. 2006). Da bei diesem Erreger von vermehrten humanen Infektionen berichtet wird, eine Ausbreitung in ganz Europa zu beobachten ist und eine zukünftigen Endemisierung in Deutschland als möglich erachtet wird, sollte *D. repens* trotz seiner vergleichsweise niedrigen Pathogenität bei zukünftigen epidemiologischen Studien in der Human- und Veterinärmedizin berücksichtigt werden (Genchi and Kramer 2020; Kronefeld et al. 2014; Sassnau et al. 2013; Genchi et al. 2011). *R. conorii* ist ebenfalls in verschiedenen mediterranen Ländern endemisch, wenn auch für Hunde generell weniger pathogen als die oben genannten Erreger (Nicholson et al. 2010). Trotzdem ist dieses Bakterium aufgrund seines zoonotischen Potentials von Bedeutung für die Human- und Tiermedizin (Mahajan 2012; Nicholson et al. 2010). Es wird davon ausgegangen, dass sich in Zukunft durch vektorübertragene Pathogene ausgelöste Krankheitsfälle in Zentral- und Nordeuropa, einschließlich Deutschland, häufen könnten. Tierärzte sollten folglich sensibilisiert werden, um eine entsprechende Beratung der Tierbesitzer und Prophylaxemaßnahmen anbieten zu können. Aber auch die Nachweisverfahren sollten den Bedürfnissen angepasst und weiterentwickelt werden, um eine sichere Diagnose der erkrankten Tiere und damit eine angemessene Therapie zu ermöglichen (Kronefeld et al. 2014; Otranto et al. 2013; Trotz-Williams and Trees 2003).

1 Die Multiplex-Polymerasekettenreaktion

1.1 Entwicklung und Anwendung der Multiplex-PCR

Für die in dieser Arbeit thematisierten caninen vektorübertragenen Krankheitserreger sind bereits verschiedene Singleplex- sowie einige Multiplex-PCR-Verfahren etabliert (Albonico et al. 2014; Krücken et al. 2013; Angelakis et al. 2012; Costa et al. 2012; Jahfari et al. 2012; Latrofa et al. 2012b; Kledmanee et al. 2009; Eremeeva et al. 2003; Stich et al. 2002). In diesem Projekt wurden jedoch erstmals Primer zum Nachweis von Piroplasmida, Anaplasmatataceae und Onchocercidae in einer Triplex-PCR kombiniert. Mit dieser Multiplex-PCR können innerhalb eines Reaktionsansatzes „kleine“ und „große“ Babesien einschließlich *Theileria* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Cand. Neoehrlichia mikurensis* sowie verschiedene Filariengattungen einschließlich *Dirofilaria* spp. diagnostiziert werden. Hierfür wurden für dieses Projekt passend erscheinende Primer aus der Literatur gewählt. Das Primerpaar zum Nachweis von Piroplasmida wurden modifiziert (Kapitel III 1.6). Die Eignung der Primer zur

Entwicklung einer Multiplex-PCR wurde im Singleplex-Ansatz getestet, indem ihre Fähigkeit die gewünschte Erreger-DNA zu amplifizieren bestätigt wurde (Kapitel III 2.2.1.1). Anschließend wurden Plasmidverdünnungsreihen verwendet, um ihre Sensitivität zu bestimmen. Die Quadruplex-PCR enthält ein zusätzliches Primerpaar zum Nachweis von *Rickettsia* spp. (Kapitel III 1.6), welches ebenfalls im Singleplex-Ansatz auf seine Eignung zur weiteren Verwendung getestet wurde (Kapitel III 2.2.1.1). Als Positivkontrolle wurde die DNA des bislang als nicht hundepathogen geltenden Erregers *R. raoultii* eingesetzt, welche durch die Verwendung in anderen institutseigenen Projekten zur Verfügung stand. Im weiteren Verlauf sollte sich jedoch vorrangig auf den Nachweis des im Mittelmeerraum verbreiteten Pathogens *R. conorii* konzentriert werden (Kapitel II 2.5).

Zunächst wurde versucht die Triplex-PCR mit dem bei der Singleplex- und bei der Duplex-PCR verwendeten Maxima™ Hot Start PCR Master Mix (2×) zu etablieren. Da dies nicht gelang, wurden verschiedene Primerkonzentrationen (0,1 µM, 0,2 µM, 0,3 µM, 0,4 µM, 0,5 µM, 0,6 µM), Q-Solution und verschiedene Konzentrationen von Mg²⁺ (1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM) sowie unterschiedlich viele PCR-Zyklen (35 – 50 Wiederholungen) getestet. Schließlich führte die Umstellung auf das QIAGEN® Multiplex PCR Plus Kit zu den gewünschten Ergebnissen in den Multiplex-Ansätzen (Kapitel III 2.2.1.3).

Die Versuche mit Verdünnungsreihen der Positivkontrollen von *B. canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni*, *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, *R. raoultii*, *D. immitis* und *D. repens* zeigten, dass ein Nachweis mit der Triplex- und Quadruplex-PCR ab 10¹ DNA-Molekülen/Reaktionsansatz möglich war (Kapitel III 2.2.1).

Die 246 aus Süd- und Südosteuropa stammenden Hundebloodproben sollten mit Hilfe der Multiplex-PCR-Methoden untersucht werden (Kapitel III 1.5). Dabei wurde deutlich, dass es eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Triplex-PCR (Tabelle IV-4) und denen der Quadruplex-PCR gab (Tabelle IV-5). Bei der Gegenüberstellung der genannten Tabellen wird erkennbar, dass mit der Quadruplex-PCR zunächst insgesamt mehr positive Proben zu finden waren als mit der Triplex-PCR. Allerdings waren die Ergebnisse beider Methoden im Vergleich uneinheitlich. Einige der Proben, die mit der Quadruplex-PCR untersucht wurden, wiesen im Gegensatz zur Triplex-PCR, ein negatives Ergebnis auf. Andere Proben, die in der Quadruplex-PCR auf eine Erregergruppe positiv getestet wurden, waren in der Triplex-PCR erregerefrei. Zum Abgleich beider PCR-Verfahren wurden die 100 Proben aus Ungarn zweimal hintereinander mit der Triplex-PCR und im Anschluss mit der Quadruplex-PCR untersucht. Dabei bestätigten sich die Reproduzierbarkeit der Triplex-PCR sowie die oben erwähnten

uneinheitlichen Ergebnisse beider PCR-Verfahren im Vergleich. Die Quadruplex-PCR schien anhand der Gesamtanzahl der positiven Proben zunächst sensitiver zu sein (Tabellen IV-1 und IV-5), konnte allerdings im Gegensatz zur Triplex-PCR nicht zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse liefern. Das ließ Zweifel an der Sensitivität und Spezifität der Quadruplex-Methode entstehen. Die Vorgehensweise war jedoch während beider Verfahren bei der DNA-Extraktion (Kapitel III 2.1.2 und 2.1.3) sowie der PCR-Durchführung (Kapitel III 2.2.1.3 und 2.2.1.4) stets gleich. Eine Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Verfahren könnten Interaktionen der verwendeten Primer aufgrund des vierten hinzugefügten Primerpaares für *Rickettsia* spp. in der Quadruplex-PCR sein (Sint et al. 2012). Die Sensitivität der Quadruplex-Methode wurde mit Plasmidpositivkontrollen in mehreren Wiederholungen getestet. Dabei bestätigte sich die Nachweisgrenze von 10^1 DNA-Molekülen/Reaktionsansatz für alle vier Erregergruppen (Kapitel III 2.2.1.4). Als Positivkontrolle wurde die DNA des bislang als nicht hundepathogen geltenden Erregers *R. raoultii* eingesetzt, welche durch die Verwendung in anderen institutseigenen Projekten zur Verfügung stand. Mit DNA aus Blutproben konnten die gewünschten Ergebnisse im Quadruplex-Verfahren allerdings nicht erzielt werden. In keiner der untersuchten Proben war ein Nachweis von *Rickettsia* spp. möglich. Die zur Identifizierung von *Rickettsia* spp. eingesetzten Primer konnten im Singleplex-Ansatz mit Plasmidpositivkontrollen von *R. raoultii* einen sensitiven Nachweis ab 10^1 DNA-Moleküle/ Reaktionsansatz liefern. Zudem wurden diese Primer auch in einem anderen institutseigenem Projekt verwendet (Liesner et al. 2016). Vor diesem Hintergrund wurde versucht diese Primer bei der Etablierung des Multiplex-Verfahrens im Rahmen dieses Projektes zu integrieren. Dieser Versuch war nicht erfolgreich und wurde deshalb abgebrochen. Es ist bekannt, dass die Bakteriämie der *Rickettsia* spp. aufgrund ihres Zelltropismus von kurzer Dauer ist und während dieser Phase gewöhnlich nur wenige Erreger im Blut zirkulieren. Deshalb kann der molekularbiologische Nachweis dieser Pathogene im Blut schwierig sein (Nicholson et al. 2010; Chapman et al. 2006). Zudem kann es bei der Etablierung einer Multiplex-PCR durch die Kombination von Primerpaaren zu Komplikationen kommen. Einige Primer binden effektiver an die komplementären DNA-Sequenzen als andere. Dies kann zu unterschiedlichen Amplifizierungseffektivitäten und Nachweisgrenzen innerhalb einer PCR-Reaktion führen. Auch Primer, die verschiedene Spezies detektieren können, weisen unter Umständen nicht jede dieser Spezies mit gleicher Sensitivität nach. Unspezifische Reaktionen sowie verringerte Sensitivität im Vergleich zur Singleplex-Reaktion sind damit möglich (Sint et al. 2012; Sipos et al. 2007; Markoulatos et al. 2002). Deshalb sind die Primerkonzentration und das Primer-Template-Verhältnis neben einigen anderen Faktoren im Optimierungsprozess

einer Multiplex-PCR zu berücksichtigen (Sint et al. 2012). Komplikationen bei der Etablierung und Anwendung eines solchen Verfahrens sind aufgrund der Komplexität einzukalkulieren (Wen and Zhang 2012).

Aus den im obigen Absatz genannten Gründen wurden lediglich 204 der 246 Hundeblutproben mit der Quadruplex-PCR getestet. Im Gegensatz dazu wurde die Triplex-PCR zur Untersuchung der Gesamtanzahl der Proben verwendet. Trotzdem wurden die Ergebnisse beider PCR-Verfahren statistisch bearbeitet und die Datensätze tabellarisch aufgeführt (Kapitel IV 1.5.1 und 1.5.2).

1.2 Untersuchung der Blutproben mittels Multiplex-PCR

1.2.1 Probenmaterial

Tierärzte aus parasitologischen Instituten verschiedener süd- und südosteuropäischer Länder haben sich im Jahr 2011 dazu bereit erklärt, Blutentnahmen von Hunden zu koordinieren und die gewonnenen Proben dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin im Rahmen dieses Projektes zu übermitteln. Parasitologen aus Griechenland, Ungarn, Bosnien-Herzegowina, Mazedonien und Israel akquirierten praktizierende Tierärzte vor Ort, welche die Blutentnahmen durchführten. Sie ließen die Proben in parasitologischen Laboren oder in den Tierarztpraxen auf FTA®-Karten archivieren (Kapitel III 2.1.1). Eine große Anzahl an Tierärzten und Laborpersonal wirkten bei der Probengewinnung mit. Es wurde darum gebeten, klinisch erkrankte Hunde auszuwählen, bei denen der Verdacht auf eine Infektion mit caninen vektorübertragenen Erkrankungen bestand. Dabei sind die Kriterien der Auswahl der erkrankten Hunde, beispielsweise Art und Stärke der Symptome, nicht schriftlich festgelegt worden. Weiterhin handelte es sich bei den Absprachen zur Probenentnahme meist um Email-Kontakt oder mündliche Kommunikation mit den Koordinatoren der kooperierenden parasitologischen Institute. Ein direkter Kontakt zu den ausführenden Tierärzten bestand nicht. Deshalb ist nicht bekannt in wie weit die Anweisungen zur Auswahl der Tiere an die Tierärzte vor Ort weitergegeben wurden bzw. ob die Tierärzte eigene Beprobungskriterien festgelegt haben. Zudem wurden in jedem Land verschiedene Probenmengen gesammelt und weitergeleitet. Da die Blutentnahmen einen zusätzlichen Arbeitsaufwand für die Tierärzte bedeuteten, konnte nicht in jedem Fall die gewünschte Kooperation und Probenanzahl in dem hier vorgegebenen Zeitrahmen erzielt werden. Die Instruktionen des Herstellers bezüglich der Archivierung der Proben auf den FTA®-Karten wurden den Koordinatoren in den jeweiligen

Ländern separat schriftlich zugesandt, mit der Bitte diese an die Tierärzte oder das Laborpersonal weiter zu leiten. Es konnte jedoch nicht überprüft werden, ob sich in jedem Fall an die übermittelten Vorgaben bezüglich der Probenarchivierung gehalten wurde. Die untersuchten Blutproben wurden nicht stichprobenartig von zufällig ausgewählten Hunden entnommen, sondern es erfolgte zunächst eine Vorauswahl anhand von klinischen Symptomen. Diese Vorgehensweise wurde zu Beginn der Promotionsarbeit festgelegt, um sicherzustellen, dass verwendbares Probenmaterial zur Etablierung des Luminex®-Diagnostikverfahrens zur Verfügung stehen wird. Die Blutentnahme bei randomisierten Tieren für Prävalenzstudien hätte bei entsprechendem Voranschreiten des Projektes zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen können. Im Rahmen einer weiteren Dissertation kann dies nachträglich durchgeführt werden. Die genannten Gegebenheiten führen dazu, dass vergleichende Schlussfolgerungen hinsichtlich der Untersuchungsergebnisse und des Erregervorkommens in den einzelnen Ländern erschwert sind. Aus diesen Gründen gelten die in Tabelle IV-1 und Tabelle IV-5 gelisteten Erregerhäufigkeiten nicht als repräsentativ für die Länder Ungarn, Griechenland, Mazedonien und Bosnien-Herzegowina sondern können als Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen betrachtet werden. Bei den Proben aus Israel handelt es sich nicht um Verdachtsfälle, sondern um bestätigte Fälle von caninen vektorübertragenen Erkrankungen. Deshalb sind in diesem Projekt keine Schlussfolgerungen bezüglich des Erregervorkommens in Israel zu ziehen (Kapitel III 2.1.4). Diese Blutproben wurden ausschließlich zur Erstellung von Positivkontrollen sowie zur Etablierung des Verfahrens zur DNA-Extraktion aus den FTA®-Karten und der Triplex-PCR (Kapitel III 2.1, 2.2 und 2.3) genutzt. Die Untersuchungsergebnisse für Israel sind dennoch aus Gründen der Vollständigkeit in der Tabelle IV-1 aufgeführt.

1.2.2 Erregernachweis mittels Triplex-PCR und Quadruplex-PCR

Bislang existieren wenige Studien zu Prävalenzen der hier untersuchten caninen vektorübertragenen Krankheitserreger in Ungarn, Griechenland, Mazedonien und Bosnien-Herzegowina. Für Untersuchungen von *B. canis* bei Hunden in Ungarn wurden randomisierte Proben genommen und es wurde eine Seroprävalenz von 5,7 % festgestellt (Hornok et al. 2006). Seroprävalenzen der Erreger *A. phagocytophilum* (7,9 %), *E. canis* (0,16 %) und *D. immitis* (2,4 %) in zufällig ausgewählten klinisch unauffälligen Hunden in Ungarn wurden ebenfalls publiziert (Farkas et al. 2014). Zu Erreger- oder Seroprävalenzen von *B. canis*, *E. canis* und *A. phagocytophilum* bei Hunden in Mazedonien und Bosnien-Herzegowina sind bislang keine Publikationen bekannt. Angelou et al. (2019) veröffentlichte eine Studie, in der Seroprävalenzen von 6,2 % für *Anaplasma* spp. und 12,5 % für *Ehrlichia* spp. bei klinisch unauffälligen griechischen Hunden festgestellt wurden. Daten von Erreger- und Seroprävalenzen von *B. canis* bei Hunden in Griechenland sind bislang nicht bekannt. Im Gegensatz dazu wurden zur Erregerprävalenz von *D. immitis* bei Hunden bereits verschiedene Studien, meist in den nördlichen Regionen Griechenlands, durchgeführt. Dabei wurden Prävalenzen von 5 % bis 34 % ermittelt (Angelou et al. 2019; Diakou et al. 2016). Angaben für Erregerprävalenzen zu *D. repens* in Griechenland liegen zwischen 18 % und 33 % (Diakou et al. 2016). Die Prävalenz für beide *Dirifilaria* spp. ist im Norden Griechenlands höher, während die Erreger im Süden nur sporadisch diagnostiziert wurden (Diakou et al. 2016). Für die Balkanregion wurden verschiedene Studien über Infektionen von Hunden mit *D. repens* veröffentlicht. Darin wird eine Prävalenz von 21 % für Mazedonien und 1,9 % für Bosnien-Herzegowina angegeben (Capelli et al. 2018). Prävalenzen von *D. immitis* bei Hunden in Mazedonien und Bosnien Herzegowina wurden bislang nicht veröffentlicht. Erreger- oder Seroprävalenzen von *Cand. Neoehrlichia mikurensis* bei Hunden in allen genannten Ländern liegen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nicht vor. In diesen Gebieten besteht weiterhin der Bedarf für Prävalenzuntersuchungen bezüglich vektorübertragener caniner Krankheitserreger, um Risikoanalysen im veterinärmedizinischen und, unter dem Aspekt des „One Health“ Prinzips, gegebenenfalls auch im humanmedizinischen Bereich zu ermöglichen (Asokan 2015; Destoumieux-Garzon et al. 2018). Die in diesem Projekt erlangten Ergebnisse der Blutuntersuchungen könnten als Anhaltspunkte für zukünftige Prävalenzuntersuchungen dienen.

In dieser Dissertationsarbeit wurden 100 Hundebloodproben aus Ungarn untersucht. In der Triplex-PCR waren davon 7 % positiv für Piroplasmida, 8 % für *Anaplasma* spp./*Ehrlichia*

spp./*Cand.* *Neoehrlichia mikurensis* und 10 % für Onchocercidae (Tabelle IV-1). In der Quadruplex-PCR war die Verteilung ähnlich und betrug 10 % für Piroplasmida, 7 % für Anaplasmataceae und 10 % für Onchocercidae (Tabelle IV-5). Diese nicht repräsentativen Ergebnisse ähneln den oben genannten Seroprävalenzen in den Studien von Angelou et al. (2019), Farkas et al. (2014) und Hornok et al. (2006) obwohl zu berücksichtigen ist, dass dort zufällig ausgewählte, klinisch unauffällige Hunde beprobt wurden und dass zum Teil auf Speziesebene untersucht wurde. Dagegen wurde in diesem Projekt eine Untersuchung auf Gattungsebene von nicht randomisierten Proben durchgeführt. Bei 20,83 % der beprobten griechischen Hunde wurde im Triplex-PCR-Verfahren ein Nachweis von Onchocercidae im Blut erbracht (Tabelle IV-1). Die oben genannten Publikationen von Capelli et al. (2018) und Diakou et al. (2016) enthalten Prävalenzdaten verschiedener griechischer Studien, die zu ähnlichen Ergebnissen kamen. Da in allen beprobten Ländern ähnlich günstige klimatische Bedingungen für die relevanten Vektoren herrschen und sich damit auch das Vektorvorkommen kaum unterscheidet, ist von ähnlichen Prävalenzen der vektorübertragenen caninen Erreger auszugehen (Gray et al. 2013; Medlock et al. 2013; Gray et al. 2009). Das spiegelt sich auch größtenteils in den Ergebnistabellen der Triplex- und Quadruplex-PCR wieder (Tabelle IV-1 und Tabelle IV-5). Die Vergleiche der Vorkommenshäufigkeiten der Länder untereinander bezüglich der Einzelinfektionen lieferten dementsprechend in den meisten Fällen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Eine Ausnahme bildet der Vergleich zwischen den Proben aus Mazedonien und den aus den anderen beprobten Länder. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die mazedonischen Tierärzte im Gegensatz zu den Kollegen der anderen Beprobungsländer Hunde auswählten, die sehr deutliche klinische Symptome einer caninen vektorübertragenen Erkrankung zeigten. Da nicht überprüft werden konnte, welche Kriterien in Mazedonien für die Auswahl der beprobten Hunde angesetzt wurden, erscheint das Erregervorkommen, verglichen mit den anderen Ländern, innerhalb des Probenumfangs erhöht (Tabelle IV-2). Das gleiche gilt für die Mischinfektionen. Es werden in Abhängigkeit zu den Einzelinfektionen ähnliche Verteilungen in allen beprobten Ländern erwartet (Tabelle IV-3). Das verdeutlicht Tabelle IV-4, in der die Erwartungswerte für das Vorkommen von Mischinfektionen basierend auf den ermittelten Häufigkeiten der Einzelinfektionen der einzelnen Länder miteinander verglichen werden. Die dort dargestellten p-Werte liegen über dem Schwellenwert $p < 0,05$. Somit wurde keine über dem erwarteten Wert liegende Häufigkeit bei Mischinfektionen in den Proben festgestellt. Da ein vermehrtes Auftreten von Mischinfektionen unter anderem auch durch Kreuzreaktivität zwischen den Erregern innerhalb der PCR verursacht werden kann, lässt eine geringe Häufigkeit von Mischinfektionen den

Rückschluss zu, dass die verwendeten Primer ausreichend spezifisch sind. Ausnahmen bilden hier wieder die Erwartungswerte für die Vergleiche zwischen Mazedonien und den restlichen beprobten Ländern aus dem oben genannten Grund.

Da die Ergebnisse der Quadruplex-PCR ähnlich ausfielen, gab es auch dort kaum signifikante Unterschiede bei den länderspezifischen Häufigkeiten innerhalb des Probenumfangs. Die einzige Ausnahme bildete hier der Vergleich zwischen Griechenland und Ungarn bezüglich des Vorkommens von Onchocercidae. Dabei wurde festgestellt, dass in den Blutproben aus Ungarn eine signifikant höhere Häufigkeit dieser Erregergruppe vorliegt. Dies wurde aber in der Triplex-PCR nicht bestätigt. Auch hier liegen die Signifikanzwerte für die Erwartungswerte bezogen auf das Vorkommen von Mischinfektionen in den beprobten Ländern über dem Schwellenwert von $p < 0,05$ und zeigen damit, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den länderspezifischen Erregervorkommen innerhalb des Probenumfangs gefunden wurden.

2 Das Bead-basierte Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®-xMAP®-Technologie)

2.1 Entwicklung des Verfahrens

In der Molekularbiologie, welche zum Verständnis von Krankheitsbildern sowie zur Diagnose und Therapiewahl beiträgt, sind schnelle und kostengünstige Methoden mit hohem Probendurchsatz gefragt, die spezifisch und zuverlässig arbeiten. Eine Methode, die diese Anforderungen erfüllen kann, ist das neuartige Luminex-®-xMAP®-Verfahren. Aufgrund der in Kapitel II 4.4.2 genannten Vorteile des Verfahrens sollte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit erstmalig ein spezifisches und zuverlässiges Multiplex-Diagnostikverfahren auf Basis der Luminex®-xMAP®-Technologie zum speziesspezifischen Nachweis von caninen vektorübertragenen Pathogenen etabliert werden. Dafür wurden die in der Triplex-PCR amplifizierten DNA-Sequenzen der Plasmidpositivkontrollen von *B. canis*, *B. vogeli*, *B. gibsoni*, *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *Cand. Neoehrlichia mikurensis*, *D. immitis* und *D. repens* verwendet (Kapitel III 2.4).

2.1.1 Die Beads

Die ausgewählten Erregerspezies sollten in diesem Projekt mit der Luminex®-Technologie erstmals simultan nachgewiesen werden. Diese Methode bietet die Möglichkeit zwischen

verschiedenen Beads und Verfahrensprotokollen zu wählen. Für die vorliegende Arbeit wurde sich für die magnetischen Beads entschieden (Kapitel III 2.4.1). Diese Beads ermöglichen eine einfache und effektive Trennung der Mikrosphären von Lösungsmitteln, Puffern und Mikropartikeln durch die Verwendung eines Magneten. Im Vergleich mit der Verwendung der nicht-magnetischen Beads, die mit Vakuumpumpe, Filtermembranen und zusätzlichen Waschschritten behandelt werden müssen, besteht bei dem hier gewählten Protokoll eine zusätzliche Zeit- und Materialersparnis (Houser 2012).

2.1.2 Die Oligonukleotidsonden

Die verwendeten Oligonukleotidsonden für das Luminex®-Verfahren (Tabelle III-2) wurden bis auf die Sonden B.c. B.g. und B.v. eigens für dieses Dissertationsprojekt erstellt. Dabei wurde mit Hilfe von Alignments darauf geachtet, dass die Sondensequenzen innerhalb der DNA-Fragmente liegen, die mit der Triplex-PCR amplifiziert wurden (Kapitel IV 2.1). Durch das Alignment der Sequenzen konnten die Kompatibilität der Sonden überprüft und eventuelle Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden. Mit dem Open Source Programm Primer3Plus (Kapitel III 1.10) wurden die Schmelztemperaturen aller Sonden aufeinander abgestimmt, um eine einheitliche Hybridisierungstemperatur im Luminex®-Assay zu ermöglichen. Beim Entwurf der Sonden wurde sich bezüglich der Schmelztemperaturen an den publizierten Sonden B.c. alt, B.g., B.v. und B.-catch all (Tabelle III-2) orientiert, da diese mit ihrer Hybridisierungstemperatur von 42 °C bereits in einem publizierten RLB erfolgreich verwendet wurden (Matjila et al. 2008; Matjila et al. 2005). Zusätzlich wurden die Sonden und verwendeten PCR-Sequenzen mit dem Programm Mfold (Kapitel III 1.10) auf Sekundärstrukturen getestet, die bei der gewählten Hybridisierungstemperatur von 42 °C entstehen. Es wurden einige mögliche Sekundärstrukturen innerhalb der amplifizierten DNA-Sequenzen angezeigt. Diese wurde allerdings zunächst als vernachlässigbar bewertet.

2.1.3 Die Bead-Kopplung

Die Oligonukleotidsonden wurden an die Beads unter Verwendung des Luminex® Kopplungsprotokolls für magnetische Beads gebunden. Dabei wurde jeder Sonde eine spezifische Bead-Region zugeordnet (Kapitel III 2.4.3). Dieses Protokoll wurde mit Modifikationen der Arbeitsgruppe für Tumormunologie der Charité, Berlin durchgeführt, da dort auf diese Weise stabilere Kopplungserfolge erzielt wurden (mündliche Kommunikation

Dr. rer. nat. Andreas Kaufmann). Luminex® bietet die Alternative Beads zu bestellen, die bereits vom Hersteller, also von Luminex® selbst, gekoppelt wurden. Dabei kann man zwischen fertigen Sets für die Diagnostik einiger Humanpathogene oder speziell für die jeweiligen Projektanforderungen gekoppelten Bead-Sonden-Sets wählen. Das dafür verwendete Verfahren wird xTAG® genannt (Luminex®, Niederlande). In einigen Studien werden die vom Hersteller gekoppelten Beads verwendet, da dies einige Vorteile bietet (Valera-Lopez et al. 2017; Borrelli et al. 2015; Deleré et al. 2014). Zum einen erhält man unter optimalen Bedingungen gekoppelte Beads und somit den bestmöglichen Kopplungserfolg unter Einsparung von Arbeitszeit. Zum anderen eliminiert dieses Verfahren mögliche Fehlerquellen während der Kopplung, die im Umgang mit den Beads, den Sonden und den Reagenzien entstehen können. Dazu gehören eine zu geringe oder zu große Menge der Sonden, die in der Kopplungsreaktion verwendet wird (Kapitel V 2.1.6). Zusätzlich kann es zu Fehlern bei der Herstellung oder Aufbewahrung der Puffer sowie zu wiederholter Lichtexposition der Beads oder Kontaminationen während der Arbeitsvorgänge kommen. Zudem entfallen beim xTAG®-Verfahren die Markierung der Primer mit Biotin sowie die Anpassung der Hybridisierungstemperatur, da bei dieser Methode die Amplikons nicht direkt an die Sonden binden sondern an sogenannte universelle TAG-Sequenzen. Durch einen Zwischenschritt im Verfahren werden die gesuchten PCR-Produkte am 5'-Ende mit einer weiteren Sequenz versehen. Diese Sequenz ist kompatibel zu den TAG-Einheiten und ermöglicht die Hybridisierung an die Beads (Dundas et al. 2011). Allerdings verringert die Benutzung der vom Hersteller gekoppelten Beads die zeitliche Flexibilität beim Arbeiten mit dem Luminex®-System, da die Kopplungsassays bei Bedarf nicht spontan wiederholt werden können. Außerdem stellt das xTAG®-Verfahren einen höheren Kostenfaktor als das xMAP®-Verfahren dar. Aus diesen zuletzt genannten Gründen wurde die Option der Kopplung durch den Hersteller in diesem Projekt nicht genutzt. Dadurch kann ein Einfluss der selbst durchgeführten Kopplung auf die Probleme im Hybridisierungsassay nicht ausgeschlossen werden, obwohl die Verifizierung der Kopplungsreaktionen nach Erneuerung der Sonde B.c. (Tabelle III-2) in allen Fällen erfolgreich verlief (Kapitel IV 2.4).

2.1.4 Verifizierung der Bead-Kopplung

Für die Kopplungsverifizierung wurden biotinylierte Oligonukleotidsonden im Hybridisierungsassay verwendet. Diese sind komplementär zu den Sonden, welche an die Beads gekoppelt wurden (Kapitel IV 2.2). Es ergaben sich deutliche Fluoreszenzsignale,

angegeben in der Einheit MFI (Median Fluorescence Intensity). Sie lagen bei den Kopplungsverifikationsreaktionen im vierstelligen Dezimalbereich und bei den Negativkontrollen im zweistelligen Dezimalbereich (Tabelle IV-9). Bei den Signalen der Hybridisierungsreaktionen werden stets nur die korrigierten Werte (MFI abzüglich der Hintergrundsignale) betrachtet. Sowohl die Reaktionen mit den sondenkomplementären Oligonukleotiden als auch die Negativkontrollen wurden in jedem Assaydurchlauf und für jede Bead-Region mehrfach angesetzt, damit eventuelle Kontaminationen, Fehler im Lesevorgang des Analysegerätes und ausreißende Werte sichtbar werden konnten. Aus den Mehrfachansätzen pro Reaktion mit einer Bead-Region wurde dann ein repräsentativer Mittelwert gebildet, der den Ergebniswert darstellte.

Bezüglich der Höhe der MFI-Werte und der angestrebten Cut-Off-Werte wurde sich an der Arbeitsgruppe für Tumormunologie der Charité Berlin (mündliche Kommunikation Dr. rer. nat. A. Kaufmann) und an verschiedenen Publikationen über Luminex®-Assays zur DNA-Detektion orientiert. Dort sind für die untersuchten Proben MFI-Werte im mittleren dreistelligen bis vierstelligen Dezimalbereich erzielt worden, wohingegen die Negativkontrollen im einstelligen oder niedrigen zweistelligen Dezimalbereich lagen (Liu et al. 2012; Zubach et al. 2012; Schmitt et al. 2008; Schmitt et al. 2006). Der Cut-Off für dieses Luminex®-Assay im Entwicklungszeitraum wurde zunächst in Anlehnung an Delere et al. (2011) sowie in Absprache mit dem technischen Kundenservice von Luminex® und Dr. rer. nat. A. Kaufmann für jede Bead-Region auf das Dreifache des jeweiligen Hintergrundsignals festgelegt. Dieser Schwellenwert wurde bei der Verifizierung der Kopplungsreaktionen bei jeder getesteten Bead-Region überschritten. Dabei lagen die MFI-Werte der Bead-Regionen nach jeder erfolgreichen Kopplung im vierstelligen Dezimalbereich (Tabelle IV-9). Damit wurden diese Ergebnisse aufgrund der deutlichen Überschreitung der Cut-Off-Werte als eindeutig positiv im Hinblick auf die gelungenen Kopplungsreaktionen bewertet (Kapitel IV 2.2).

2.1.5 Hybridisierung der Beads mit PCR-Produkten

Die Hybridisierung der biotinylierten PCR-Fragmente der Plasmidpositivkontrollen an die gekoppelten Beads wurde durchgeführt, um sondenspezifische Ergebnisse zu erhalten und damit Cut-Off- Werte zu generieren (Kapitel IV 2.4). Zusätzlich sollten damit Mischungen der Bead-Regionen getestet werden, um eine Multiplex-Reaktion zu testen. Dafür sollte im

Vergleich mit den Ergebnissen der Singleplex-Reaktionen mit den Plasmidpositivkontrollen überprüft werden, ob im Multiplex-Ansatz unvorhergesehene Kreuzreaktionen oder inhibierende Einflüsse auftreten. Allerdings wurden in keinem der Singleplex-Ansätze eindeutig positive Ergebnisse erzielt. Die Differenzen zwischen Signalen der Proben und der Negativkontrollen ließen größtenteils keine positive Bewertung zu. Der hier festgelegte Cut-Off-Wert konnte ausschließlich bei der Sonde B.c. neu knapp erreicht werden. Bei den Sonden B.g. und D.i. sowie A/E-catch all in Verbindung mit dem Amplikon von *A. phagocytophilum* war dies nur in jeweils einem Testassay möglich und nicht reproduzierbar. Bei den restlichen Sonden konnte der Cut-Off in keinem der durchgeführten Assays erreicht werden (Tabelle IV-10). Mögliche Gründe hierfür werden in den nachfolgenden Ausführungen erörtert.

2.1.6 Ansätze zur Überprüfung und Optimierung des Verfahrens

Zunächst sollte ausgeschlossen werden, dass die Biotinkopplung der PCR-Produkte fehlerhaft verlief und deshalb im Luminex®-Verfahren geringe MFI-Werte erzeugt wurden. Das könnte bei der Amplifizierung mit biotinylierten Rückwärts-Primern aufgrund mangelhafter Primerqualität oder Fehlern in der Durchführung geschehen. Deshalb wurde ein zusätzliches Verfahren, der RLB, zu Hilfe genommen (Kapitel III 2.4.6). Das bereits für Babesien-, Anaplasmen- und Theilerienspezies etablierte RLB-Verfahren wurde hier mit spezifischen Sonden für die Detektion von Babesien und Theilerien angewandt (Matjila et al. 2008). Es wurden speziesspezifische sowie auch gattungsspezifische Piroplasma-Sonden zum Nachweis von einigen zufällig ausgewählten, biotinylierten PCR-Produkten der Plasmidpositivkontrollen verwendet. Dabei handelte es sich um biotinylierte Amplikons von *B. canis*, *B. gibsoni* und *B. vogeli* (Abbildung IV-9). Ergeben haben sich dabei wenige unspezifische Kreuzreaktionen von *B. canis* mit den RLB-Sonden *B. venatorum* und *B. caballi* sowie von *B. vogeli* mit den Sonden *B. canis* und *B. caballi*, bei denen von Kontaminationen während des RLB-Verfahrens ausgegangen wird, da die Sonden in der Vergangenheit zuverlässig und spezifisch funktionierten (Matjila et al. 2008; Matjila et al. 2005; Matjila et al. 2004). Im durchgeführten RLB konnte außerdem das Amplikon von *B. gibsoni* nicht hybridisieren, da die verwendete Sonde für den asiatischen Genotyp von *B. gibsoni* konstruiert wurde und höchst spezifisch an diesen bindet. Eine Hybridisierung an die gattungsspezifischen Sonden Babesia/Theileria catch-all und Babesia catch-all1 fand jedoch bei allen verwendeten Amplikons statt. Generell konnte eine Hybridisierung der PCR-Fragmente von *B. canis*, *B. gibsoni* und *B. vogeli* mit den entsprechenden RLB-Sonden nachgewiesen werden. Somit wurde verifiziert, dass die

Biotinylierung der Amplikons erfolgreich verlief (Kapitel IV 2.3). Deshalb ist darauf zu schließen, dass alle PCR-Produkte, die auf die gleiche Weise mittels biotinylierten Rückwärts-Primern amplifiziert wurden, erfolgreich mit Biotin versehen werden konnten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Hybridisierung der Amplikons an die jeweiligen Sonden möglich ist. Da die Sondensequenzen im Fall von *B. canis*, *B. gibsoni* und *B. vogeli* im RLB- und Luminex®-Assay aus Publikationen stammen und bei beiden Verfahren übereinstimmen (Tabelle III-2 und Tabelle III-3), ist somit grundsätzlich eine Hybridisierung der Amplikons an die Sonden auch im Luminex®-Assay möglich.

Da mangelnde Biotinylierung der Primer als Verursacher für die Komplikationen im Etablierungsprozess des Luminex®-Verfahrens ausgeschlossen war, wurden verschiedene Modifikations- und Optimierungsversuche der Hybridisierungsreaktion durchgeführt. Dabei wurden die Hybridisierungstemperatur und –zeit, die eingesetzte Menge der PCR-Produkte und die Menge des Fluoreszenzfarbstoffes Streptavidin-PE sowie zwei verschiedene Waschpuffer und die Anzahl der damit durchgeführten Waschschrte variiert. Außerdem wurde eine Sonde mit einem C-12-Spacer anstatt mit einem C-6-Spacer getestet (Kapitel III 2.4.7.1). Diese Optimierungsansätze wurden basierend auf mündlichen Hinweisen des technischen Kundenservice von Luminex® gewählt, von denen zwei Mitarbeiter aufgrund der genannten Schwierigkeiten persönlich vor Ort waren, um mögliche Fehler zu korrigieren und Hilfestellung zu geben. Außerdem gab es Gespräche mit Dr. rer. nat. A. Kaufmann, dem Leiter der Tumormunologie der Charité Berlin und dem Technischen Kundenservice von Luminex® bezüglich der Probleme mit dem Luminex®-Assay sowie Dr. T. Kayadmir, Mitarbeiter bei Bio-Rad, bezüglich der Benutzung des Bio-Plex®-Systems (Bio-Rad, München) und der Interpretation der vom Gerät ausgegebenen Werte. Allerdings ergaben die Modifikationen der Hybridisierungsreaktion für die Singleplex-Ansätze sowie die Anleitung und Hilfe von oben genannten erfahrenen Kollegen nicht die gewünschten Ergebnisse in Form von Signalen über dem minimalen Cut-Off-Wert bei der Hybridisierung mit PCR-Produkten (Kapitel IV 2.4). Aus diesem Grund konnte die Etablierung eines Multiplex-Diagnostikverfahrens mittels Luminex®-xMAP®-Technologie in dem für dieses Dissertationsprojekt vorgegebenen Zeitrahmen nicht abgeschlossen werden. Es war bis zu diesem Zeitpunkt nicht möglich vollständig zu klären, weshalb die PCR-Produkte der Plasmidpositivkontrollen im Gegensatz zu den sondenkompatiblen Oligonukleotiden nur unzureichend an die Sonden hybridisiert werden konnten. Trotz Modifikationsversuchen und externer Hilfestellung von Luminex®- und Bio-Rad – Mitarbeitern wurden die Fehlerquellen

dafür nicht identifiziert. Da die Hybridisierung einiger PCR-Produkte an Sonden im RLB-Verfahren möglich war (Kapitel IV 2.3), ist davon auszugehen, dass eine Ursache für die niedrigen Signale bei den Assay-Protokollen zu finden ist. Beispielsweise könnte die Menge der in der Kopplungsreaktion verwendeten Sonden einen Einfluss auf die Signalstärke haben, da eine zu große Sondenanzahl auf den Beads eine sterische Hinderung bei der Bindung der PCR-Produkte erzeugen könnte. Das würde zu einer Verringerung der Signalstärke führen. Bei einer zu geringen Sondenanzahl auf den Beads kann die Signalstärke ebenfalls herabgesetzt werden (Fei et al. 2008). Zudem sind das Sondendesign, eventuelle Sekundärstrukturen der amplifizierten PCR-Sequenzen sowie die Qualität der verwendeten Puffer als mögliche Problemfaktoren nicht auszuschließen. Die Sequenzen und Längen der PCR-Amplikons sind von entscheidender Bedeutung für den Erfolg des Verfahrens. Somit könnten eine Optimierung und erneute Überprüfung der PCR sowie der Sonden die Ergebnisse möglicherweise verbessern.

Eine Option für zukünftige Versuche wäre die in der Kopplungsreaktion eingesetzte Menge an Sonden zu variieren, um festzustellen welchen Einfluss dies auf die Signalstärke hat. In einem weiteren Schritt könnten die vorhandenen Sondensequenzen vom Hersteller an die Beads gekoppelt werden, um herauszufinden, ob ein bis heute unerkannter Fehler in der Kopplungsdurchführung lag. Außerdem ist es möglich die manuell angesetzten Puffer käuflich zu erwerben, um auszuschließen, dass die Qualität der verwendeten selbst angesetzten Puffer Einfluss auf die Kopplungs- oder Hybridisierungsreaktion hat (Kapitel III 1.3). Ein zusätzliches Risiko bei der erfolgreichen Etablierung des Luminex®-Verfahrens stellen die Primer und die Länge der Amplikons, welche im Luminex®-Verfahren nachgewiesen werden sollen, dar. In diesem Projekt lagen die Amplikons der verwendeten Positivkontrollen bei Längen zwischen 258 bp und 677 bp (Tabelle III-4). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die Länge der Amplikons aufgrund ihrer Tendenz zur Bildung von Sekundärstrukturen ausschlaggebend für eine effiziente Bindung sein kann (Santos et al. 2013; Dunbar 2006). Etienne et al. (2009) erlangten optimale Signale mit Amplikons mit einer Länge von 250 bp, wohingegen dies mit 100 bp und 600 bp großen PCR-Produkte nicht erreicht wurden. In der Studie von Diaz and Fell (2004) wurden bessere Signale mit PCR-Produkten mit einer Länge von über 600 bp als mit denen von unter 600 bp erzielt. Dahingegen werden in einer anderen Publikation erfolgreiche Durchführungen des Assays mit Amplikons zwischen 100 bp und 400 bp beschrieben (Fitzgerald et al. 2007). Die unterschiedlichen Angaben in den einzelnen Projekten lassen erkennen, dass eine individuelle Anpassung der Amplikonlängen in Verbindung mit der

Beschaffenheit der Sonden unter Berücksichtigung der Sekundärstrukturen nötig ist. Auch bei den verwendeten Oligonukleotidsonden mit einer Länge von 18 bp bis 22 bp (Tabelle III-2) wäre eine Sekundärstrukturbildung denkbar. Die Sekundärstrukturen wurden in diesem Projekt mit dem Programm Mfold simuliert (Kapitel III 2.4.2). Allerdings konnte innerhalb der Menge an möglichen Sekundärstrukturen bei den Amplikons und Sonden nicht jede einzelne berücksichtigt werden. Der Grund weshalb mögliche Sekundärstrukturen der Amplikons im Test mit dem RLB-Verfahren weniger Einfluss hatten und ein deutlich positives Signal erzielt wurde (Kapitel IV 2.3), kann die bereits in diesem Kapitel erwähnte Menge an verwendeten Sonden sein, die bei zu großer sowie zu geringer Anzahl auf den Beads zu Verringerung der Signalstärke führen kann (Fei et al. 2008).

2.1.7 Ausblick

Die Triplex-PCR, welche im Zuge dieses Dissertationsprojektes zum Nachweis von Piroplasmida, Anaplasmatataceae und Onchocercidae etabliert wurde, könnte aufgrund ihrer sensitiven und reproduzierbaren Ergebnisse (Kapitel IV 1.3 V 1.1) zum Nachweis dieser Erregergruppen bei Studien zur Prävalenzermittlung oder bei der Diagnostik erkrankter Tiere gegebenenfalls Verwendung finden. Allerdings ist damit ausschließlich der Nachweis auf Ebene der Erregerordnung beziehungsweise -familie möglich. Für die Speziesdifferenzierung ist ein weiterer Schritt nötig. Das kann in Form einer Sequenzierung bei wenigen Proben oder eines weiteren Diagnostikverfahrens bei einer großen Probenanzahl geschehen. In diesem Projekt sollte ein Bead-basiertes Multiplex-Verfahren (Luminex®) für einen Erregernachweis einschließlich Speziesdifferenzierung etabliert werden. Die Primerpaare, die für die Triplex-PCR verwendet wurden, amplifizieren DNA-Segmente, welche innerhalb dieses Dissertationsprojektes im Luminex®-Verfahren nicht ausreichend nachgewiesen werden konnten. Die Hybridisierung der Amplikons an die Oligonukleotidsonden erfolgte offenbar nur unzureichend und somit ist eine speziesspezifische Diagnostik mit dieser Methode zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Für eine Fortführung dieses Projektes könnten die Menge der in der Kopplungsreaktion eingesetzten Sonden variiert werden. Es könnten Beads verwendet werden, die vom Hersteller Luminex® unter optimalen Bedingungen mit den Sonden gekoppelt wurden, um mögliche Fehler in der Durchführung der Kopplungsreaktion sowie im Umgang mit dem Beads oder den verwendeten Reagenzien auszuschließen. Als weiterführenden Schritt könnten die Sonden erneut überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden.

Mittels dieser Anpassungen wäre die Möglichkeit einer erfolgreichen Etablierung des Luminex®-Verfahrens gegeben und damit die speziesspezifische Detektion der in diesem Projekt nachzuweisenden vektorübertragenen caninen Krankheitserregern. Zudem könnten nach erfolgreicher Etablierung des Verfahrens weitere Pathogene der Erregergruppen Piropasmida, Anaplasmatataceae und Onchocercidae hinzugefügt werden, um das diagnostische Spektrum zu erweitern und einen möglichen Ausgangspunkt für künftige Projekte zu schaffen.

VI Zusammenfassung

Entwicklung eines Multiplex-Diagnostikverfahrens zur Detektion von caninen vektorübertragenen Krankheitserregern

Die Weiterentwicklung von Diagnostikmethoden und die Generierung epidemiologischer Daten sind im Zusammenhang mit caninen vektorübertragenen Erkrankungen wichtige Voraussetzungen, um Infektionsrisiken einzuschätzen, geeignete Prophylaxe- und Therapiemaßnahmen zu ergreifen und somit die Verbreitung dieser Krankheitserreger einzudämmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Triplex-PCR zur simultanen Detektion von caninen vektorübertragenen Erregern der Familie Onchocercidae sowie Anaplasmataceae und der Ordnung Piroplasmida entwickelt. Darauf aufbauend wurde mit der Etablierung einer Multiplex-Diagnostikmethode auf Basis der Luminex®-xMAP®-Technologie begonnen. Diese sollte zur Speziesdifferenzierung der Erreger dienen, die mit der Multiplex-PCR nachgewiesen wurden. In diesem Projekt lag der Fokus auf der Differenzierung der caninen Pathogene *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia conorii* und *Dirofilaria immitis*. Der Versuch die Triplex-PCR mit einem zusätzlichen Primerpaar zum Nachweis von *Rickettsia* spp. auf ein Quadruplex-Verfahren zu erweitern, wurde abgebrochen, da die Methode im Vergleich zur Triplex-PCR weniger zuverlässige Ergebnisse liefern konnte. Im Rahmen der Entwicklung der genannten Diagnostikmethoden wurden 246 Blutproben von Hunden aus den Ländern Ungarn, Griechenland, Mazedonien, Bosnien-Herzegowina und Israel gesammelt und zum vereinfachten Transport sowie zur Konservierung auf FTA®-Karten archiviert. Zur Probengewinnung wurden Länder gewählt, in denen die ausgewählten Erreger endemisch sind. Die Beprobung wurde vor Ort bei Hunden durchgeführt, bei denen der Verdacht auf eine Infektion mit einem der hier relevanten Krankheitserreger bestand. Mittels eines DNA-Extraktionsverfahrens wurden die Nukleinsäuren aus der Matrix des FTA®-Papiers isoliert und mit der Triplex-PCR sowie teilweise mit der Quadruplex-PCR untersucht. Aufgrund der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der beiden Verfahren sowie der scheinbar geringeren Sensitivität und Spezifität der Quadruplex-PCR im Vergleich zur Triplex-PCR wurde die Quadruplex-PCR ausschließlich bei 204 der 246 Proben angewandt. Die Blutproben aus Israel waren ausschließlich zur Verwendung im Etablierungsprozess der Diagnostikverfahren

vorgesehen, da sie von Hunden stammten, die zum Beprobungszeitpunkt bereits mit vektorübertragenen Erkrankungen diagnostiziert waren.

Das speziesspezifische Multiplex-Diagnostikverfahren auf Basis der Luminex®-xMAP®-Technologie konnte in dem gegebenen Zeitrahmen nicht vollständig etabliert werden. Nach Durchführung einiger Modifikationen hinsichtlich der Kopplungs- und Hybridisierungsverfahren, wäre jedoch ein sensitiver und spezifischer Nachweis der hier ausgewählten Pathogene sowie eine Erweiterung des Assays auf weitere Erreger, basierend auf der beschriebenen Triplex-PCR, möglich.

VII Summary

Development of a multiplex diagnostic method for detection of canine vector-borne pathogens

In order to assess infection risks, take prophylactic as well as therapeutic measures and thus keep infectious agents from spreading, continued efforts concerning the development of diagnostic methods and generation of epidemiologic data related to canine vector-borne diseases are required. In this study a triplex PCR for the simultaneous detection of canine vector-borne pathogens of the taxonomic family Onchocercidae and Anaplasmataceae as well as the order Piropasmida was developed for the first time. Additionally the establishment of a multiplex diagnostic method based on the Luminex®-xMAP®-Technology was described, aiming at the determination and differentiation of nine canine target species (*Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia conorii* and *Dirofilaria immitis*), previously detected using the multiplex PCR. An effort to extend the triplex PCR into a quadruplex PCR by including an additional pair of primers designed to specifically detect *Rickettsia* spp. was made but discontinued because results obtained with the quadruplex PCR were less reliable compared to the triplex PCR results. In total 246 blood samples, collected from dogs in Hungary, Greece, Macedonia, Bosnia Herzegovina and Israel, were conserved on FTA® Cards in order to achieve easier transport and storage. Countries participating in the sampling procedure were chosen according to the known occurrence of the above mentioned target species in their canine populations. Samples were obtained from dogs that were suspected to be infected with either of the pathogens of interest. Nucleic acids were isolated from the matrix of the FTA® Cards using a DNA extraction method and subsequently examined with the triplex PCR and partly with the quadruplex PCR. Due to mismatching results of the quadruplex-PCR and its suspected lower sensitivity and specificity in comparison to the triplex-PCR only 204 of the 246 samples were examined with the quadruplex method. The non-representative results of both PCR assays were statistically analysed and the frequency of occurrences of the canine pathogens within the samples were compared between different countries, indicating similar levels of infection for all participating regions. This may be explained by similar climatic conditions and similar vector distributions. Blood samples from Israel were used solely for the establishment of the diagnostic assays since they were obtained from dogs previously diagnosed with afore

mentioned canine vector borne pathogens. Therefore, they were not included in the statistical analysis. All collected samples were obtained using a non-randomised sampling procedure and subsequently are not representative regarding country specific prevalences. However, they can be considered as a basis for further epidemiological investigation. The specific multiplex assay using the Luminex® xMAP® technology was not completely established within the timeframe set for this study. However, following further modifications regarding the process of coupling and hybridisation it may be used as a sensitive and specific method for the detection of the target canine pathogens and be extended towards the detection and quantification of more pathogens, using the described triplex PCR as a basis.

VIII Literaturverzeichnis

- Albanese F, Abramo F, Braglia C, Caporali C, Venco L, Vercelli A, Ghibaud G, Leone F, Carrani F, Giannelli A, Otranto D (2013): Nodular lesions due to infestation by *Dirofilaria repens* in dogs from Italy. *Vet Dermatol*, 24(2), 255-e256
- 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(1-2), 128-132
- Alekseev A N, Dubinina H V, Van De Pol I, Schouls L M (2001): Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks in the Baltic regions of Russia. *J Clin Microbiol*, 39(6), 2237-2242
- Alexandre N, Santos A S, Bacellar F, Boinas F J, Nuncio M S, de Sousa R (2011): Detection of *Rickettsia conorii* strains in Portuguese dogs (*Canis familiaris*). *Ticks Tick Borne Dis*, 2(2), 119-122
- Angelakis E, Mediannikov O, Parola P, Raoult D (2016): *Rickettsia felis*: The Complex Journey of an Emergent Human Pathogen. *Trends in Parasitology*, 32(7), 554-564
- Angelakis E, Richet H, Rolain J M, La Scola B, Raoult D (2012): Comparison of real-time quantitative PCR and culture for the diagnosis of emerging rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(3), e1540
- Angelou A, Gelasakis A I, Verde N, Pantchev N, Schaper R, Chandrashekar R, Papadopoulos E (2019): Prevalence and risk factors for selected canine vector-borne diseases in Greece. *Parasit Vectors*, 12, 283
- Asokan G V (2015): One Health and Zoonoses: The Evolution of One Health and Incorporation of Zoonoses. *Cent Asian J Glob Health*, 4(1), 139
- Atkinson S F, Sarkar S, Avina A, Schuermann J A, Williamson P (2012): Modelling spatial concordance between Rocky Mountain spotted fever disease incidence and habitat probability of its vector *Dermacentor variabilis* (American dog tick). *Geospat Health*, 7(1), 91-100
- Ayoob A L, Hackner S G, Prittie J (2010): Clinical management of canine babesiosis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 20(1), 77-89
- Azad A F, Beard C B (1998): Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis*, 4(2), 179-186
- Babes V (1888): Sur l'he'moglobinurie bactérienne du boeuf. *C. R. Acad. Sci*, 107, 692-694
- Bailey L M, Ivanov R A, Wallace J C, Polyak S W (2008): Artifactual detection of biotin on histones by streptavidin. *Anal Biochem*, 373(1), 71-77
- Bakken J S, Dumler S (2008): Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 22(3), 433-448, viii
- Baneth G, Florin-Christensen M, Cardoso L, Schnittger L (2015): Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasit Vectors*, 8, 207

- Barutzki D, Reule M, Scheunemann R, Heile C, Schein E (2007): Die Babesiose des Hundes. Eine autochthone Erkrankung in Deutschland. Dtsch Tierärztebl, 55, 284–293
- Becker S, Franco J R, Simarro P P, Stich A, Abel P M, Steverding D (2004): Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. Diagn Microbiol Infect Dis, 50(3), 193-199
- Beelitz P, Schumacher S, Marholdt F, Pfister K, Silaghi C (2012): [The prevalence of *Babesia canis canis* in marsh ticks (*Dermacentor reticulatus*) in the Saarland]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 125(3-4), 168-171
- Beninati T, Piccolo G, Rizzoli A, Genchi C, Bandi C (2006): Anaplasmataceae in wild rodents and roe deer from Trento Province (northern Italy). Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 25(10), 677-678
- Beugnet F, Marie J L (2009): Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. Vet Parasitol, 163(4), 298-305
- Birago F (1626): Trattato cinegetico, ovvero della caccia. Sfondrato V. Milano, Italien, 77
- Birkenheuer A J, Levy M G, Savary K C, Gager R B, Breitschwerdt E B (1999): *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. J Am Anim Hosp Assoc, 35(2), 125-128
- Birkenheuer A J, Neel J, Ruslander D, Levy M G, Breitschwerdt E B (2004): Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. Vet Parasitol, 124(3-4), 151-160
- Blazejak K, Janecek E, Strube C (2017): A 10-year surveillance of Rickettsiales (*Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum*) in the city of Hanover, Germany, reveals *Rickettsia* spp. as emerging pathogens in ticks. Parasit Vectors, 10(1), 588
- Bockova E, Rudolf I, Kocisova A, Betasova L, Venclikova K, Mendel J, Hubalek Z (2013): *Dirofilaria repens* microfilariae in *Aedes vexans* mosquitoes in Slovakia. Parasitol Res, 112(10), 3465-3470
- Borrelli G M, Kaufmann A M, Abraos M S, Mechsner S (2015): Addition of MCP-1 and MCP-3 β to the IL-8 appraisal in peritoneal fluid enhances the probability of identifying women with endometriosis." J Reprod Immunol, 109, 66-73
- Brouqui P, Sanogo Y O, Caruso G, Merola F, Raoult D (2003): *Candidatus Ehrlichia walkerii*: a new Ehrlichia detected in *Ixodes ricinus* tick collected from asymptomatic humans in Northern Italy. Ann N Y Acad Sci, 990, 134-140
- Brown L D, Macaluso K R (2016): *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. Curr Trop Med, Rep 3, 27-39
- Buchan B W, Jobe D A, Mashock M, Gerstbrein D, Faron M L, Ledebouer N A, Callister S M (2019): Evaluation of a Novel Multiplex High-Definition PCR Assay for Detection of Tick-Borne Pathogens in Whole-Blood Specimens. J Clin Microbiol, 57(11), e00513-19
- Cacciò S M, Antunovic B, Moretti A, Mangili V, Marinculic A, Baric R R, Slemenda S B, Pieniazek N J(2002): Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. Vet Parasitol, 106(4), 285-92
- Camacho A T, Pallas E, Gestal J J, Guitian F J, Olmeda A S, Telford S R, Spielman A (2003): *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain. Vet Parasitol, 112(1-2), 157-163

- Cancrini G, Coluzzi M, Balbo T, Gallo M G (1975): Variazioni stagionali della microfilariaemia ed effetto della temperatura ambientale in cani parassitati da *Dirofilaria repens* [Seasonal variations in microfilariaemia and effects of ambient temperature in dogs parasitized by *Dirofilaria repens*]. *Parassitologia*, 17(1-3), 75–82
- Cancrini G, Frangipane di Regalbono A, Ricci I, Tessarin C, Gabrielli S, Pietrobelli M (2003): *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet Parasitol*, 118(3-4), 195-202
- Cancrini G, Magi M, Gabrielli S, Arispici M, Tolari F, Dell'Omodarme M, Prati M C (2006): Natural vectors of dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan region, central Italy. *J Med Entomol*, 43(3), 574-579
- Cao W C, Zhao Q M, Zhang P H, Dumler J S, Zhang X T, Fang L Q, Yang H (2000): Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. *J Clin Microbiol*, 38(11), 4208-4210
- Capelli G, Genchi C, Baneth G, Bourdeau P., E., Brianti E, Cardoso L, Danesi P, Fuehrer H P, Giannelli A, Ionică A M, Maia C, Modrý D, Montarsi F, Krücken J, Papadopoulos E, Petrić D, Pfeffer M, Savić S, Otranto D, Poppert S, Silaghi C (2018): Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors*, 11 (1), 663
- Capelli G, Ravagnan S, Montarsi F, Ciocchetta S, Cazzin S, Porcellato E, Babiker A M, Cassini R, Salviato A, Cattoli G, Otranto D (2012): Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: a cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy. *Parasit Vectors*, 5, 61
- Carrade D, Foley J E, Borjesson D L, Sykes J E (2009): Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med*, 23(6), 1129-1141
- Casiraghi M, Bazzocchi C, Mortarino M, Ottina E, Genchi C (2006): A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Vet Parasitol*, 141(3-4), 368-372
- Chalifoux L, Hunt R D (1971): Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *J Am Vet Med Assoc*, 158(5), 601-605
- Chapman A S, Bakken J S, Folk S M, Paddock C D, Bloch K C, Krusell A, Sexton D J, Buckingham S C, Marshall G S, Storch G A, Dasch G A, McQuiston J H, Swerdlow D L, Dumler S J, Nicholson W L, Walker D H, Ereemeeva M E, Ohl C A (2006): Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis--United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recomm Rep*, 55(RR-4), 1-27
- Chamberlain J S, Gibbs R A, Ranier J E, Nguyen P N, Caskey C.T (1988): Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, 16(23), 11141–11156
- Chen R, Yu X L, Gao X B, Xue C Y, Song C X, Li Y, Cao Y C (2015): Bead-based suspension array for simultaneous differential detection of five major swine viruses. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(2), 919-928
- Chen S M, Dumler J S, Bakken J S, Walker D H (1994): Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*, 32(3), 589-595

- Chirek A, Silaghi C, Pfister K, Kohn B (2018): Granulocytic anaplasmosis in 63 dogs: clinical signs, laboratory results, therapy and course of disease. *J Small Anim Pract*, 59(2),112-120
- Codner E C, Farris-Smith L L (1986): Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 189(1), 47-50
- Colwell D D, Dantas-Torres F, Otranto D (2011): Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol*, 182(1), 14-21
- Costa L M Jr, Zahler-Rinder M, Ribeiro M F, Rembeck K, Rabelo E M, Pfister K, Passos L M (2012): Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of *Babesia canis*. *Vet Parasitol*, 188(1-2), 160-163
- Czajka C, Becker N, Jost H, Poppert S, J. Schmidt-Chanasit, A. Kruger and E. Tannich (2014): Stable transmission of *Dirofilaria repens* nematodes, northern Germany. *Emerg Infect Dis*, 20(2), 328-331
- Dantas-Torres F (2007). Rocky Mountain spotted fever. *Lancet Infect Dis*, 7(11), 724-732
- Dantas-Torres F (2010): Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors* 3, 26
- Dantas-Torres F and Otranto D (2015): Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Vet Parasitol*, 208(1-2), 9-13
- de Castro, M B, Machado R Z, de Aquino L P, Alessi A C, Costa M T (2004): Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol*, 119(1), 73-86
- de Jager W and Rijkers G T (2006): Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison. *Methods*, 38(4), 294-303
- Deleré Y, Remschmidt C, Leuschner J, Schuster M, Fesenfeld M, Schneider A, Wichmann O, Kaufmann A M (2014): Human papillomavirus prevalence and probable first effects of vaccination in 20 to 25 year-old women in Germany: a population-based cross-sectional study via home-based self-sampling. *BMC Infect Dis*, 19(14), 87
- Delere Y, Schuster M, Vartazarowa E, Hansel T, Hagemann I, Borchardt S, Perlitz H, Schneider A, Reiter S, Kaufmann A M (2011): Cervicovaginal self-sampling is a reliable method for determination of prevalence of human papillomavirus genotypes in women aged 20 to 30 years. *J Clin Microbiol* 49(10), 3519-3522
- Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H (2013a). Stamm Alveolata. In: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin/ Hrsg.: P. Deplazes, J. Eckert, G. v. Samson-Himmelstjerna, H. Zahner. 3. überarbeitete Auflage, S. 114-18. Stuttgart: Enke Verlag - ISBN: 978-3-8304-1135-2*
- Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H (2013b). Stamm Nematoda (Syn. Nematzoa) (Faden- oder Rundwürmer). In: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin/ Hrsg.: P. Deplazes., J. Eckert, G. v. Samson-Himmelstjerna, H. Zahner.: 3. überarbeitete Auflage, S. 340-49. Stuttgart: Enke Verlag - ISBN: 978-3-8304-1135-2.*
- Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H (2013c). Stamm Arthropoda (Gliederfüßer), In: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin/ Hrsg.: Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 3. überarbeitete Auflage, S. 372-91. Stuttgart: Enke Verlag - ISBN: 978-3-8304-1135-2.*

- Destoumieux-Garzon D, Mavingui P, Boetsch G, Boissier J, Darriet F, Duboz P, Fritsch C, Giraudoux P, Le Roux F, Morand S, Paillard C, Pontier D, Sueur C, Voituren Y (2018): The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Front Vet Sci* 12(5), 14
- des Vignes F, Piesman J, Heffernan R, Schulze T L, Stafford K C 3rd, Fish D (2001): Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis*, 183(5), 773–778
- Diakou A, Kapantaidakis E, Tamvakis A, Giannakis V, Strus N (2016): *Dirofilaria* infections in dogs in different areas of Greece. *Parasit Vectors* 9, 508
- Diaz M R, Fell J W (2004): High-throughput detection of pathogenic yeasts of the genus *trichosporon*. *J Clin Microbiol*, 42(8), 3696-3706
- Dieme C, Bechah Y, Socolovschi C, Audoly G, Berenger J M, Faye O, Raoult D, Parola P (2015): Transmission potential of *Rickettsia felis* infection by *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(26), 8088-8093
- Diniz P P, Schulz B S, Hartmann K, Breitschwerdt E B (2011): "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" infection in a dog from Germany. *J Clin Microbiol*, 49(5), 2059-2062
- Donatien A, Lestoquard F (1935): Existence en Algérie d'une rickettsia du chien. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, (28), 418–419
- Dugan V G, Gaydos J K, Stallknecht D E, Little S E, Beall A D, Mead D G, Hurd C C, Davidson W R (2005): Detection of *Ehrlichia* spp. in raccoons (*Procyon lotor*) from Georgia. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 5(2), 162-171
- 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(Pt 6), 2145-2165
- Dunbar S A (2006): Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta*, 363(1-2), 71-82
- Dundas N E, Ziadie M S, Revell P A, Brock E, Mitui M, Leos N K, Rogers B B (2011): A lean laboratory: operational simplicity and cost effectiveness of the Luminex xTAG respiratory viral panel. *J Mol Diagn*, 13(2), 175-179
- Ebani V, Cerri D, Fratini F, Ampola M, Andreani E (2008): Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy. *New Microbiol* 31(3), 371-375
- Egenvall A, Bjoersdorff A, Lilliehook I, Olsson Egenvall 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. *Vet Rec*, 143(15), 412-417
- Egenvall A E, Hedhammar A A, Bjoersdorff A I (1997): Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec*, 140(9), 222-226
- Egenvall E O, Egenvall A (2002): Granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses. *Int J Med Microbiol*, 291 Suppl 33, 100-103

- Eremeeva M E, Dasch G A, Silverman D J (2003): Evaluation of a PCR assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related spotted fever group rickettsiae. *J Clin Microbiol*, 41(12) 5466-5472
- Etienne K A, Kano R, Balajee S A (2009): Development and validation of a microsphere-based Luminex assay for rapid identification of clinically relevant aspergilli. *J Clin Microbiol* 47(4), 1096-1100
- Farkas R, Gyurkovszky M, Lukacs Z, Aladics B, Solymosi N (2014): Seroprevalence of some vector-borne infections of dogs in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14(4), 256-260
- Favia G, Lanfrancotti A, Della Torre A, Cancrini G, Coluzzi M (1996): Polymerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. *Parasitology* 113 (Pt 6), 567-571
- Favia G, Lanfrancotti A, della Torre A, Cancrini G, Coluzzi M (1997): Advances in the identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* by a PCR-based approach. *Parassitologia* 39(4), 401-402
- Fehr J S, Bloemberg G V, Ritter C, Hombach M, Luscher T F, Weber R, Keller P M (2010): Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Emerg Infect Dis*, 16(7), 1127-1129
- Fei X, Pellino A M, Knoll W (2008): Electrostatic repulsion and steric hindrance effects of surface probe density on deoxyribonucleic acid (DNA)/peptide nucleic acid (PNA) hybridization. *Thin Solid Films* 516(23), 8634-8639
- Ferri E, Bain O, Barbuto M, Martin C, Lo N, Uni S, Landmann F, Baccei S G, Guerrero R, de Souza Lima S, Bandi C, Wanji S, Diagne M, Casiraghi M (2011): New insights into the evolution of *Wolbachia* infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. *PLoS One* 6(6), e20843
- 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(1), 21-26
- Fitzgerald C, Collins M, van Duyne S, Mikoleit M, Brown T, Fields P (2007): Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups. *J Clin Microbiol* 45(10), 3323-3334
- Földvári G, Široký P, Szekeres S, Majoros G, Sprong H (2016): *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasit Vectors* 9 (1), 314
- Freeman M J, Kirby B M, Panciera D L, Henik R A, Rosin E, Sullivan L J (1994): Hypotensive shock syndrome associated with acute *Babesia canis* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 204(1), 94-96
- Fritz D (2010): A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitol Res* 106(6), 1339-1342
- Fukumoto S, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X (2005): Fatal experimental transplacental *Babesia gibsoni* infections in dogs. *Int J Parasitol*, 35(9), 1031-1035
- Furlanello T, Fiorio F, Caldin M, Lubas G, Solano-Gallego L (2005): Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet Parasitol* 134(1-2), 77-85

- Galfsky D, Król N, Pfeffer M, Obiegala A (2019): Long-term trends of tick-borne pathogens in regard to small mammal and tick populations from Saxony, Germany. *Parasit Vectors* 12(1), 131
- Genchi C, Kramer L H, Rivasi F (2011): Dirofilariasis infections in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11(10), 1307-1317
- Genchi C, Kramer L H (2020): The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. *Vet Parasitol*, 280, 108995
- Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Cringoli G (2009): Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet Parasitol* 163(4), 286-292
- Georges K, Ezeokoli C, Auguste T, Seepersad N, Pottinger A, Sparagano O, Tasker S (2012): A comparison of real-time PCR and reverse line blot hybridization in detecting feline haemoplasmas of domestic cats and an analysis of risk factors associated with haemoplasma infections. *BMC Vet Res*. 8, 103
- Giangaspero A, Marangi M, Latrofa M S, Martinelli D, Traversa D, Otranto D, Genchi C (2013): Evidences of increasing risk of dirofilarioses in southern Italy. *Parasitol Res* 112(3), 1357-1361
- Gioia G, Lecova L, Genchi M, Ferri E, Genchi C, Mortarino M (2010): Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Vet Parasitol* 172(1-2), 160-163
- Glaser B, Gothe R (1998): Hundetourismus und – import: eine Umfrage in Deutschland zu Ausmaß sowie Spektrum und Präferenz der Aufenthalts- bzw. Herkunftsländer. *Tierärztliche Praxis*(26), 197-202
- Gouin E, Egile C, Dehoux P, Villiers V, Adams J, Gertler F, Li R, Cossart P (2004): The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. *Nature* 427(6973), 457-461
- Grankvist A, Sandelin L L, Andersson J, Fryland L, Wilhelmsson P, Lindgren P E, Forsberg P, Wenneras C (2015): Infections with *Candidatus Neohhrlichia mikurensis* and Cytokine Responses in 2 Persons Bitten by Ticks, Sweden. *Emerg Infect Dis* 21(8), 1462-1465
- Gray J, Dantas-Torres F, Estrada-Pena A, Levin M (2013): Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis* 4(3), 171-180
- 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. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009, 593232
- Groves M G, Dennis G L, Amyx H L, Huxsoll D L (1975): Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am J Vet Res* 36(7), 937-940
- Gubbels J M, de Vos A P, van der Weide M, Viseras J, Schouls L M, de Vries E, Jongejan F (1999): Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 37(6), 1782-1789
- Hamel D, Silaghi C, Pfister K (2013): Arthropod-borne infections in travelled dogs in Europe. *Parasite* 20, 9
- Hansford K M, Pietzsch M E, Cull B, Medlock J M (2014): Importation of *R. sanguineus* into the UK via dogs: tickborne diseases. *Vet Rec* 175(15), 385-386

- 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*. *Vet Microbiol* 86(4), 361-368
- Harrus S, Kass P H, Klement E, Waner T (1997): Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. *Vet Rec* 141(14), 360-363
- Harrus S, Waner T, Weiss D J, Keysary A, Bark H (1996): Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 51(1-2), 13-20
- Harrus S, Waner T (2011): Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J.* 187(3), 292-296
- Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann S O, Hassler D, Kimmig P (2004): Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 86-92
- Hartelt K, Rieker T, Oehme R M, Brockmann S O, Muller W, Dorn N (2007): First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(2), 163-166
- Hermosilla C, Pantchev N, Dyachenko V, Gutmann M, Bauer C (2006): First autochthonous case of canine ocular *Dirofilaria repens* infection in Germany. *Vet Rec* 158(4), 134-135
- Henry L G, Brunson K J, Walden H S, Wenzlow N, Beachboard S E, Barr K L, 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
- Hii S F, Abdad M Y, Kopp S R, Stenos J, Rees R L, Traub R J (2013): Seroprevalence and risk factors for *Rickettsia felis* exposure in dogs from Southeast Queensland and the Northern Territory, Australia. *Parasit Vectors* 6, 159
- Hoar B R, Nieto N C, Rhodes D M, Foley J E (2008): Evaluation of sequential coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Am J Vet Res* 69(9), 1171-1178
- Hodžić A, Hinney B, König S, Naucke T J, Duscher G, Joachim A (2018): A case of ocular infection with *Onchocerca lupi* in a dog from Germany. *Transbound Emerg Dis.* 65(1), e214–e216
- Hornok S, Edelhofer R, Farkas R (2006): Seroprevalence of canine babesiosis in Hungary suggesting breed predisposition. *Parasitol Res* 99(6), 638-642
- Houser B (2012): Bio-Rad's Bio-Plex(R) suspension array system, xMAP technology overview. *Arch Physiol Biochem* 118(4), 192-196
- Ikadai H, Sasaki M, Ishida H, Matsuu A, Igarashi I, Fujisaki K, Oyamada T (2007): Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. *Am J Trop Med Hyg* 76(4), 694-697
- Innis M A, Myambo K B, Gelfand D H, Brow M A (1988): DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(24), 9436-9440

- Inokuma H, Brouqui P, Drancourt M, Raoult D (2001): Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. *J Clin Microbiol* 39(9), 3031-3039
- Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W, Rikihisa Y (1994): Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 32(7), 1658-1662
- Irwin P J (2009): Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors* 2 Suppl 1, 4
- Jahfari S, Fonville M, Hengeveld P, Reusken C, Scholte E J, Takken W, Heyman P, Medlock J, Heylen D, Kleve J, Sprong H (2012): Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe." *Parasit Vectors* 5(1), 74
- Jefferies R, Ryan U M, Jardine J, Broughton D K, Robertson I D, Irwin P J (2007): Blood, Bull Terriers and Babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Aust Vet J* 85(11), 459-463
- Jensen J, Simon D, Schaarschmidt-Kiener D, Müller W, Nolte I (2007): Vorkommen von *Ehrlichia canis* bei Hunden in Deutschland? *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 35(2), 123-128
- Johnson E M, Ewing S A, Barker R W, Fox J C, Crow D W, Kocan K M (1998): Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 74(2-4), 277-288
- Josko D (2012): Updates in immunoassays: parasitology. *Clin Lab Sci* 25 (3), 185-190
- Kamani J, Baneth G, Mumcuoglu K Y, Waziri N E, Eyal O, Guthmann Y, Harrus S (2013): Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. *PLoS Negl Trop Dis* 7(3), e2108
- Karanikola S, Krücken J, Ramünke S, de Waal T, Höglund J, Charlier J, Weber C, Müller E, Kowalczyk S J, Kaba J, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J (2015): Development of a multiplex fluorescence immunological assay for the simultaneous detection of antibodies against *Cooperia oncophora*, *Dictyocaulus viviparus* and *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasit Vectors* 19(8), 335
- 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(5), 1422-1425
- Kawahara M, Rikihisa Y, Isogai E, Takahashi M, Misumi H, Suto C, Shibata S, Zhang C, Tsuji M (2004): Ultrastructure and phylogenetic analysis of '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 5), 1837-1843
- Kelly P J, Matthewman L A, Mason P R, Courtney S, Katsande C, Rukwava J (1992): Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. *J Trop Med Hyg* 95(5), 322-326
- Kemeny D M (1992): Titration of antibodies. *J Immunol Methods* 150 (1), 57-76
- 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(3-4), 331-340

- Kjemtrup A M, Wainwright K, Miller M, Penzhorn B L, Carreno R A (2006): *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Vet Parasitol* 138(1-2), 103-111
- Kledmanee K, Suwanpakdee S, Krajangwong S, Chatsiriwech J, Suksai P, Suwannachat P, Sariya L, Buddhirongawatr R, Charoonrut P, Chaichoun K (2009): Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp and *Hepatozoon canis* in canine blood. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40(1), 35-39
- Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K (2008): Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 22(6), 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(1), 71-76
- Kohn M, Kruecken 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* 10 (1), 191-206
- Kong F, Gilbert G L (2006): Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)--a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nat Protoc* 1(6): 2668-2680
- Kovacova E, Sekeyova Z, Travnicek M, Bhide M R, Mardzinova S, Curlik J, Spanelova D (2006): Monitoring of humans and animals for the presence of various Rickettsiae and *Coxiella burnetii* by serological methods. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 587-589
- Kramer L, Grandi G, Leoni M, Passeri B, McCall J, Genchi C, Mortarino M, Bazzocchi C (2008): *Wolbachia* and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet Parasitol* 158(3), 191-195
- Kramer L, Simon F, Tamarozzi F, Genchi M, Bazzocchi C (2005): Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? *Vet Parasitol* 133(2-3), 133-136
- 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(6), 1958-1961
- La Scola B, Raoult D (1997): Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 35(11), 2715-27
- Labruna M B, Horta M C, Aguiar D M, Cavalcante G T, Pinter A, Gennari S M, Camargo L M (2007): Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(2), 249-255
- Lacz N L, Schwartz R A, Kapila R (2006): Rocky Mountain spotted fever. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20(4), 411-417

- Latrofa M S, Dantas-Torres F, Annoscia G, Genchi M, Traversa D, Otranto D (2012a): 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(2-4), 181-185
- Latrofa M S, Weigl S, Dantas-Torres F, Annoscia G, Traversa D, Brianti E, Otranto D (2012b): A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. *Acta Trop* 122(1), 150-154
- Leschnik M, Kirtz G, Tichy A, Leidinger E (2008): Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *International Journal of Medical Microbiology* 298, Supplement 1(0), 243-248
- Levin M L, Coble D J, Ross D E (2004): Reinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in BALB/c mice and cross-protection between two sympatric isolates. *Infect Immun* 72(8), 4723-4730
- Levin M L, Killmaster L F, Zemtsova G E (2012): Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12(1), 28-33
- Liesner J M, Krücken J, Schaper R, Pachnicke S, Kohn B, Muller 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
- LifeTechnologiesCorporation (2012): TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing. von <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K457502>.
- Lin A, Salvador A, Carter J M (2015): Multiplexed Microsphere Suspension Array-Based Immunoassays. *Methods Mol Biol* 1318, 107-118
- Litster A L, Atwell R B (2008): Feline heartworm disease: a clinical review. *J Feline Med Surg* 10(2), 137-144
- Liu Y, Xu Z Q, Zhang Q, Jin M, Yu J M, Li J S, Liu N, Cui S X, Kong X Y, Wang H, Li H Y, W, Cheng X, Ma X J, Duan Z J (2012): Simultaneous detection of seven enteric viruses associated with acute gastroenteritis by a multiplexed Luminex-based assay. *J Clin Microbiol* 50(7), 2384-2389
- Lommano E, Bertaiola L, Dupasquier C, Gern L (2012): Infections and coinfections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 78(13), 4606-4612
- Ludlam K W, Jachowski L A Jr, Otto G F (1970): Potential vectors of *Dirofilaria immitis*. *J Am Vet Med Assoc* 157(10), 1354-1359
- Magnarelli L A, Ijdo J W, Van Andel A E, Wu C, Fikrig E (2001): Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses. *Am J Vet Res* 62(1), 29-32
- 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
- Mahajan S K (2012): Rickettsial diseases. *J Assoc Physicians India* 60, 37-44
- Manfredi M T, di Cerbo A, Genchi M (2007). Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. *Veterinary Parasitology and Parasitic Diseases* 39-45

- Mar P H, Yang I C, Chang G N, Fei A C (2002): Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). *Vet Parasitol* 106(3) 243-252
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M (2002): Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 16(1), 47-51
- Martin A R, Brown G K, Dunstan R H, Roberts T K (2005): *Anaplasma platys*: an improved PCR for its detection in dogs. *Exp Parasitol* 109(3), 176-180
- Matijatko V, Torti M, Schetters T P (2012): Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends Parasitol* 28(3), 99-105
- Matjila P T, Leisewitz A L, Jongejan F, Penzhorn B L (2008): Molecular detection of tick-borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. *Vet Parasitol* 155(1-2), 152-157
- 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(2), 119-125
- Matjila T P, Nijhof A M, Taoufik A, Houwers D, Teske E, Penzhorn B L, de Lange T, Jongejan F (2005): Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands. *Vet Parasitol* 131(1-2), 23-29
- Matsuu A, Kawabe A, Koshida Y, Ikadai H, Okano S, Higuchi S (2004): Incidence of canine *Babesia gibsoni* infection and subclinical infection among Tosa dogs in Aomori Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci* 66(8), 893-897
- McBride J W, Corstvet R E, Gaunt S D, Boudreaux C, Guedry T, Walker D H (2003): Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect Immun* 71(5), 2516-24
- McCall J W (2001). Experimental infections in animal models. In: Heartworm infection in humans and animals/ Hrsg.: Simón F, Genchi C, Vol. 78, S. 147-150 Salamanca: Ed. Univ. de Salamanca - ISBN 8478008616
- McCall J W, Genchi C, Kramer L H, Guerrero J, Venco L (2008): Heartworm disease in animals and humans. *Adv Parasitol* 66, 193-285
- McPherson M J, Møller S G (2006a). An introduction to PCR. In: PCR - The basics/ Hrsg.: E. Owen. 2. Auflage. S. 1-8 New York, NY: Taylor & Francis Group - ISBN 0-415-35547-8.
- McPherson M J, Møller S G (2006b). Optimization of PCR In: PCR - The basics/ Hrsg.: E. Owen. 2. Auflage. S. 1-8 New York, NY: Taylor & Francis Group - ISBN 0-415-35547-8
- Medlock J M, Hansford K M, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Pena A, George J C, Golovljova I, Jaenson T G, Jensen J K, Jensen P M, Kazimirova M, Oteo J A, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph S E, Rizzoli A, Santos-Silva M M, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W (2013): Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors* 6,1
- Melsom H A, Kurtzhals J A L, Qvortrup K, Bargum R, Barfod T S, la Cour M, Heegaard S (2011): Subconjunctival *Dirofilaria repens* Infestation: A Light and Scanning Electron Microscopy Study. *The Open Ophthalmology Journal* 5, 21-24

- 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
- 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(7), 595-604
- Miro G, Checa R, Papparini A, Ortega N, Gonzalez-Fraga J L, Gofton A, Bartolome A, Montoya A, Galvez R, Mayo P P, Irwin P (2015): *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. *Parasit Vectors* 8, 217
- 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
- Morchon R, Carreton E, Gonzalez-Miguel J, Mellado-Hernandez I (2012): Heartworm Disease (*Dirofilaria immitis*) and Their Vectors in Europe - New Distribution Trends. *Front Physiol* 3, 196
- Moshkovski S D (1945): Cytotropic inducers of infection and the classification of the Rickettsiae with *Chlamydozoa*. *Adv Mod Biol (Moskow)*19, 1-44
- Mosqueda J, Olvera-Ramirez A, Aguilar-Tipacamu G, Canto G J (2012): Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Curr Med Chem* 19(10),1504-18
- Murray G G, Weinert L A, Rhule E L, Welch J J (2016): The Phylogeny of *Rickettsia* Using Different Evolutionary Signatures: How Tree-Like is Bacterial Evolution? *Syst Biol* 65(2), 265-279
- 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. *Vet Microbiol* 91(2-3), 197-204
- Mylonakis M E, Koutinas A F, Breitschwerdt E B, Hegarty B C, Billinis C D, Leontides L S, Kontos V S (2004): Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 40(3), 174-184
- Naitou H, Kawaguchi D, Nishimura Y, Inayoshi M, Kawamori F, Masuzawa T, Hiroi M, Kurashige H, Kawabata H, Fujita H, Ohashi N (2006): Molecular identification of *Ehrlichia* species and '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. *Microbiol Immunol* 50(1), 45-51
- Najm N A, Meyer-Kayser E, Hoffmann L, Herb I, Fensterer V, Pfister K, Silaghi C (2014): 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(4), 386-391
- Neer T M, Breitschwerdt E B, Greene R T, Lappin M R (2002): Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 16(3), 309-315
- Nelson C T, McCall J W, Rubin S B, Buzhardt L F, Dorion D W, Graham W, Longhofer S L, Guerrero J, Robertson-Plouch C, Paul A (2005): 2005 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Vet Parasitol* 133(2-3), 255-266

- Nicholson W L, Allen K E, McQuiston J H, Breitschwerdt E B, Little S E (2010): The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol* 26(4) 205-212
- Nijhof A M, Bodaan C, Postigo M, Nieuwenhuijs H, Opsteegh M, Franssen L, Jebbink F, Jongejan F (2007): Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(4), 585-595
- Nijhof A M, Pillay V, Steyl J, Prozesky L, Stoltsz W H, Lawrence J A, Penzhorn B L, Jongejan F (2005): Molecular characterization of *Theileria* species associated with mortality in four species of African antelopes. *J Clin Microbiol* 43(12), 5907-5911
- Obiegala A, Pfeffer M, Pfister K, Tiedemann T, Thiel C, Balling A, Karnath C, Woll D, Silaghi C (2014): *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and Anaplasma phagocytophilum: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and ixodid ticks. *Parasit Vectors* 7, 563
- Oster C N, Burke D S, Kenyon R H, Ascher M S, Harber P, Pedersen Jr. C E (1977): Laboratory-acquired Rocky Mountain spotted fever. The hazard of aerosol transmission. *N Engl J Med* 297(16), 859-863
- Onishi T, Ueda K, Horie M, Kajikawa T, Ohishi I (1990) Serum hemolytic activity in dogs infected with *Babesia gibsoni*. *J Parasitol.* 76(4), 564-567
- Oteo J A, Portillo A, Santibanez S, Blanco J R, Perez-Martinez L, Ibarra V (2006): Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *J Clin Microbiol* 44(7), 2669-2671
- Otranto D, Dantas-Torres F (2010): Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasit Vectors* 3, 2
- Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt E B (2009): Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol* 25(4), 157-163
- Otranto D, Dantas-Torres F, Brianti E, Traversa D, Petrić D, Genchi C, Capelli G (2013): Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasit Vectors* 6, 16
- Paddock C D, Brenner O, Vaid C, Boyd D B, Berg J M, Joseph R J, Zaki S R, Childs J E (2002): Short report: concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. *Am J Trop Med Hyg* 66(2), 197-199
- Paddock C D, Childs J E (2003): *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin Microbiol Rev* 16(1), 37-64
- Paddock C D, Sumner J W, Comer J A, Zaki S R, Goldsmith C S, Goddard J, McLellan S L, Tamminga C L, Ohl C A (2004): *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin Infect Dis* 38(6), 805-811
- Paes-de-Almeida E C, Ferreira A M, Labarthe N V, Caldas M L, McCall J W (2003): Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Vet Parasitol* 113(2), 157-168
- Pan H, Liu S, Ma Y, Tong S, Sun Y (2003): *Ehrlichia*-like organism gene found in small mammals in the suburban district of Guangzhou of China. *Ann N Y Acad Sci* 990, 107-111
- Pantchev N, Norden N, Lorentzen L, Rossi M, Rossi U, Brand B, Dyachenko V (2009): Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitol Res* 105 Suppl 1, 63-74

- Pantchev N, Pluta S, Huisinga E, Nather S, Scheufelen M, Vrhovec M G, Schweinitz A, Hampel H, Straubinger R K (2015a): Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis. *Parasitol Res* 114 Suppl 1, 19-54
- Pantchev N, Schnyder M, Vrhovec M G, Schaper R, Tsachev I (2015b): Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. *Parasitol Res* 114 Suppl 1, 117-130
- Parola P, Paddock C D, Raoult D (2005): Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 18(4), 719-756
- Parola P, Raoult D (2001): Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol Infect* 7(2), 80-83
- Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier P E, Sotto A, Labauge P, Raoult D (2008): Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis* 2(11), e338
- Pekova S, Vydra J, Kabickova H, Frankova S, Haugvicova R, Mazal O, Cmejla R, Hardekopf D W, Jancuskova T, Kozak T (2011): *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis infection identified in 2 hematooncologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69(3), 266-270
- Perez-Osorio C E, Zavala-Velazquez J E, Arias Leon J J, Zavala-Castro J E (2008): *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerg Infect Dis* 14(7), 1019-1023
- Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y (2006): Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 110-117
- Philip C B (1959): Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever. *Public Health Rep* 74(7), 595-600
- Picard-Meyer E, Barrat J, Cliquet F (2007): Use of filter paper (FTA) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. *J Virol Methods* 140(1-2), 174-182
- Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Mackenstedt U, Kimmig P (2010): Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis* 1(3), 145-147
- Portillo A, Santibáñez P, Palomar A M, Santibáñez S, Oteo J A (2018): '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' in Europe. *New Microbes New Infect.* 22, 30-36
- Popov V L, Han V C, Chen S M, Dumler J S, Feng H M, Andreadis T G, Tesh R B, Walker D H (1998): Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol* 47(3), 235-251
- Potkonjak A, Gutierrez R, Savic S, Vracar V, Nachum-Biala Y, Jurisic A, Kleinerman G, Rojas A, Petrovic A, Baneth G, Harrus S (2016): Molecular detection of emerging tick-borne pathogens in Vojvodina, Serbia. *Ticks Tick Borne Dis* 7(1), 199-203
- Rar V A, Livanova N N, Panov V V, Doroschenko E K, Pukhovskaya N M, Vysochina N P, Ivanov L I (2010): Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in the Asian part of Russia. *Ticks Tick Borne Dis* 1(1), 57-65

- Reif K E, Macaluso K R (2009): Ecology of *Rickettsia felis*: A Review. *Journal of Medical Entomology* 46(4), 723-736
- Rene M, Chene J, Beauvils J P, Valiente Moro C, Bourdoiseau G, Mavingui P, Chabanne L (2012): First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. *Vet Parasitol* 187(3-4), 399-407
- Reslova N, Michna V, Kasny M, Mikel P, Kralik P (2017): xMAP Technology: Applications in Detection of Pathogens. *Front Microbiol* 8, 55
- 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. *J Clin Microbiol* 50(3), 943-947
- Richter P J Jr, Kimsey R B, Madigan J E, Barlough J E, Dumler J S, Brooks D L (1996): *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). *J Med Entomol* 33(1), 1-5
- Ricketts H (1906): The transmission of Rocky Mountain spotted fever by the bite of the wood-tick (*Dermacentor occidentalis*). *JAMA* 47, 358
- Rikihisa Y (1991): The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 4(3), 286-308
- Rikihisa Y, Ewing S A, Fox J C, Siregar A G, Pasaribu F H, Malole M B (1992): Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *J Clin Microbiol* 30(1), 143-148
- Rishniw M, Barr S C, Simpson K W, Frongillo M F, Franz M, Dominguez Alpizar J L (2006): Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 135(3-4), 303-314
- Ros-Garcia A, Barandika J F, Garcia-Perez A L, Juste R A, Hurtado A (2013): Assessment of exposure to piroplasms in sheep grazing in communal mountain pastures by using a multiplex DNA bead-based suspension array. *Parasit Vectors* 6(1), 277
- 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 Tick Borne Dis* 7(1), 224-233
- Sainz Á, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L (2015): Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors* 8, 75
- Sambrook J, Russell D W (2001a). In vitro Amplification of DNA by Polymerase Chain Reaction, In: *Molecular cloning : a laboratory manual*, Vol. 2/ Hrsg: Sambrook J, Russell D W, 3. Auflage, S. 8.4-8.6. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press - ISBN: 0-87969-577-3
- Sambrook J, Russell D W (2001b). In vitro Amplification of DNA by Polymerase Chain Reaction, In: *Molecular cloning : a laboratory manual*, Vol. 2/ Hrsg: Sambrook J, Russell D W, 3. Auflage, S. 8.8-8.9. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press - ISBN: 0-87969-577-3
- Santos H L, Bandyopadhyay K, Bandea R, Peralta R H, Peralta J M, Da Silva A J (2013): LUMINEX(R): a new technology for the simultaneous identification of five *Entamoeba* spp. commonly found in human stools. *Parasit Vectors* 6, 69

- Sassnau R, Czajka C, Kronefeld M, Werner D, Genchi C, Tannich E, Kampen H (2014): *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* DNA findings in mosquitoes in Germany: temperature data allow autochthonous extrinsic development. *Parasitol Res* 113(8), 3057-3061
- Sassnau R, Dyachenko V, Pantchev N, Stöckel F, Dittmar K, Dauschies A (2009): *Dirofilaria-repens*-Befall in einem Schlittenhunde-Rudel im Land Brandenburg - Diagnose und Therapie der kaninen kutanen Dirofilariose. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 37(2), 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. *Parasitol Res* 112(7), 2647-2652
- Sassnau R, Kohn M, Demeler J, Kohn B, Muller E, Krucken J, von Samson-Himmelstjerna G (2013): Is *Dirofilaria repens* endemic in the Havelland district in Brandenburg, Germany? *Vector Borne Zoonotic Dis* 13(12), 888-891
- Schäfer I, Volkman M, Beelitz P, Merle R, Müller E, Kohn B (2019): Retrospective evaluation of vector-borne infections in dogs imported from the Mediterranean region and southeastern Europe (2007-2015). *Parasit Vectors*. 12(1), 30
- Schicht S, Schnieder T, Strube C (2012): *Rickettsia* spp. and coinfections with other pathogenic microorganisms in hard ticks from northern Germany. *J Med Entomol* 49(3), 766-771
- Schmitt M, Bravo I G, Snijders P J, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T (2006): Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 44(2), 504-512
- Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M (2008): Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 46(3), 1050-1059
- Schnittger L, Rodriguez A E, Florin-Christensen M, Morrison D A (2012): *Babesia*: a world emerging. *Infect Genet Evol* 12(8), 1788-1809
- Schotthoefer A M, Meece J K, Ivacic L C, Bertz P D, Zhang K, Weiler T, Uphoff T S, Fritsche T R (2013): Comparison of a real-time PCR method with serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis: importance of infection time course for optimal test utilization. *J Clin Microbiol* 51(7), 2147-2153
- Schouls L M, Van De Pol I, Rijpkema S G, Schot C S (1999): Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 37(7), 2215-2222
- 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
- Schwarz A, Maier W A, Kistemann T, Kampen H (2009): Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. *Int J Hyg Environ Health* 212(1), 87-96
- 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(3), 223-9

- Severo M S, Stephens K D, Kotsyfakis M, Pedra J H (2012): *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiol* 7(6), 719-731
- Shaw S E, Day M J, Birtles R J, Breitschwerdt E B (2001): Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol* 17(2), 74-80
- Silaghi C, Beck R, Oteo J A, Pfeiffer M, Sprong H (2016): Neoehrlichiosis: an emerging tick-borne zoonosis caused by *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Exp Appl Acarol* 68(3), 279-297
- Silaghi C, Nieder M, Sauter-Louis C, Knubben-Schweizer G, Pfister K, Pfeiffer M (2018): Epidemiology, genetic variants and clinical course of natural infections with *Anaplasma phagocytophilum* in a dairy cattle herd. *Parasites Vectors* 11(1), 20
- Simon F, Morchon R, Gonzalez-Miguel J, Marcos-Atxutegi C, Siles-Lucas M (2009): What is new about animal and human dirofilariosis? *Trends Parasitol* 25(9), 404-409
- Simon F, Siles-Lucas M, Morchon R, Gonzalez-Miguel J, Mellado I, Carreton E, Montoya-Alonso J A (2012): Human and animal dirofilariosis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev* 25(3), 507-544
- Sint D, Raso L, Traugott M (2012): Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol Evol* 3(5), 898-905
- Sipos R, Székely A J, Palatinszky M, Révész S, Márialigeti K, Nikolausz M (2007): Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 60(2), 341-350
- Smith R D, Sells D M, Stephenson E H, Ristic M R, Huxsoll D L (1976): Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic *Rickettsia*. *Am J Vet Res* 37(2), 119-126
- Solano-Gallego L, Baneth G (2011): Babesiosis in dogs and cats--expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol* 181(1), 48-60
- Solano-Gallego L, Kidd L, Trotta M, Di Marco M, Caldin M, Furlanello T, Breitschwerdt E (2006): Febrile illness associated with *Rickettsia conorii* infection in dogs from Sicily. *Emerg Infect Dis* 12(12), 1985-1988
- Solano-Gallego L, Sainz A, Roura X, Estrada-Pena A, Miro G (2016): A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasit Vectors* 9(1), 336
- 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. *Vet Parasitol* 157(3-4), 211-221
- Spitalska E, Boldis V, Kostanova Z, Kocianova E, Stefanidesova K (2008): Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. *Acta Virol* 52(3), 175-179
- Stannard A A, Gribble D H, Smith R S (1969): Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. *Vet Rec* 84(6), 149-150
- Stegeman J R, Birkenheuer A J, Kruger J M, Breitschwerdt E B (2003): Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 222(7), 959-963, 952

- Stich R W, Rikihisa Y, Ewing S A, Needham G R, Grover D L, Jittapalapong S (2002): Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a p30-based PCR assay. *J Clin Microbiol* 40(2), 540-546
- Strle F (2004): Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 27-35
- Stuen S, Dahl H, Bergström K, Moum T (2005): Unidirectional suppression of *Anaplasma phagocytophilum* genotypes in infected lambs. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1448-1450
- Stuen S (2007): *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun* 31 Suppl 1, 79-84
- Sullivan K M, Dean A, Soe M M (2009): OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. *Public Health Rep* 124(3), 471-474
- 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(2-4), 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. *Vet Rec* 164(4), 112-116
- Tahir D, Davoust B, Parola P (2019): Vector-borne nematode diseases in pets and humans in the Mediterranean Basin: An update. *Veterinary world* 12(10), 1630-1643
- Taniuchi M, Verweij J J, Noor Z, Sobuz S U, Lieshout L, Petri W A Jr, Haque R, Houpt E R (2011): High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg* 84(2), 332-337
- 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(17), 2-4
- Tarello W (1999): La dirofilariose sous-cutanée à *Dirofilaria (Nochtiella) repens* chez le chien. *Revue bibliographique et cas clinique. Revue de Médecine Vétérinaire* 150, 691-702
- Tarello W (2002): Cutaneous lesions in dogs with *Dirofilaria (Nochtiella) repens* infestation and concurrent tick-borne transmitted diseases. *Vet Dermatol* 13(5), 267-274
- Tarello W (2011): Clinical Aspects of Dermatitis Associated with *Dirofilaria repens* in Pets: A Review of 100 Canine and 31 Feline Cases (1990-2010) and a Report of a New Clinic Case Imported from Italy to Dubai. *J Parasitol Res* 2011, 578385
- Tenter A M, Deplazes P (2006). Befall mit Haematozoa. In: *Veterinärmedizinische Parasitologie/ Hrsg.: T. Schnieder. 6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. S. 439-442. Stuttgart: Parey Verlag - ISBN 9783830441359*
- Tenter A M, Schnieder T (2006). Erreger von Parasitosen: Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale. In: *Veterinärmedizinische Parasitologie/ Hrsg.: T. Schnieder. 6., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. S. 26-60. Stuttgart: Parey Verlag - ISBN 9783830441359*
- Theiler A (1910): *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. Report to the Government, Transvaal, South Africa. *Veterinary Bacteriology, Dept of Agriculture* 1908-9(1910), 7-64

- Thorner A R, Walker D H, Petri W A Jr (1998): Rocky mountain spotted fever. Clin Infect Dis 27(6): 1353-1359; quiz 1360
- Tiškina 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
- Trotta M, Carli E, Novari G, Furlanello T, Solano-Gallego L (2009): Clinicopathological findings, molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. Vet Parasitol 165(3-4), 318-322
- 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. Vet Rec 152(4), 97-105
- Uilenberg G (2006): *Babesia*--a historical overview. Vet Parasitol 138(1-2), 3-10
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth B C, Remm M, Rozen S G (2012): Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 40(15), e115
- Valera-Lopez A, Ochoa J, Llama-Elvira J M, Lopez-Frias M, Planells E, Ramirez-Tortosa C, Ramirez-Tortosa C L, Giampieri F, Battino M, Quiles J L (2017): Age-Related Loss in Bone Mineral Density of Rats Fed Lifelong on a Fish Oil-Based Diet is Avoided by Coenzyme Q10 Addition. Nutrients 9(2), 176
- Van Heerden J (1980): The transmission of *Babesia canis* to the wild dog *Lycaon pictus* (Temminck) and black-backed jackal *Canis mesomelas* Schreber. J S Afr Vet Assoc 51(2), 119-120
- Venco L, Vezzoni A (2001): Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs and cats. In: Heartworm infection in humans and animals/ Hrsg.: Simón F, Genchi C, S. 161-177, Salamanca: Ed. Univ. de Salamanca - ISBN 8478008616
- Verdida R A, Xuan X, Fukumoto S, Huang X, Zhou J, Igarashi I, Claveria F G, Nagasawa H (2005): Development of a practical immunochromatographic test with recombinant P50 for the diagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs. Parasitology 131(Pt 6), 769-774
- von Loewenich F D, Baumgarten B U, Schroppel K, Geissdorfer W, Rollinghoff M, Bogdan C (2003): High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among Ixodes ricinus ticks in Germany. J Clin Microbiol 41(11), 5033-5040
- von Loewenich F D, Geissdorfer W, Disque C, Matten J, Schett G, Sakka S G, Bogdan C (2010): Detection of "*Candidatus* Neohrlichia mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. J Clin Microbiol 48(7), 2630-2635
- von Samson-Himmelstjerna G (2019): Babesiose & Ehrlichiose - ESCCAP-Empfehlungen zu von Zecken übertragenen Krankheiten. Tierärztezeitung 01, 12-16
- Wächter M, Pfeffer M, Schulz N, Balling A, Chirek A, Bach J P, Moritz A, Kohn B, Pachnicke S, Silaghi C (2015a): Seroprevalence of spotted fever group Rickettsiae in dogs in Germany. Vector Borne Zoonotic Dis 15, 191-194
- Wächter M, Wölfel S, Pfeffer M, Dobler G, Kohn B, Moritz A, Pachnicke S, Silaghi C (2015b): Serological differentiation of antibodies against *Rickettsia helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovacica*, *R. monacensis* and *R. felis* in dogs from Germany by a micro-immunofluorescent antibody test. Parasites Vectors 8, 126

- Walker D H (1995): Rocky Mountain spotted fever: a seasonal alert. *Clin Infect Dis* 20(5), 1111-1117
- Walker D H, Popov V L, Crocquet-Valdes P A, Welsh C J, Feng H M (1997): Cytokine-induced, nitric oxide-dependent, intracellular antirickettsial activity of mouse endothelial cells. *Lab Invest* 76(1), 129-138
- Walls J J, Agüero-Rosenfeld M, Bakken J S, Goodman J L, Hossain D, Johnson R C, Dumler J S (1999): Inter- and intralaboratory comparison of *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test. *J Clin Microbiol*, 37(9), 2968–2973
- Waner T, Harrus S (2000). Canine monocytic ehrlichiosis (CME). *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. L. E. Carmichael, International Veterinary Information Service, 431-438
- Waner T, Harrus S (2013): Canine Monocytic Ehrlichiosis - From Pathology to Clinical Manifestations. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 68(1), 12-18
- Waner T, Harrus S, Bark H, Bogin E, Avidar Y, Keysary A (1997): Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Vet Parasitol* 69(3-4), 307-317
- 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*. *Vet Parasitol* 95(1), 1-15
- Wass L, Grankvist A, Mattsson M, Gustafsson H, Krogfelt K, Olsen B, Nilsson K, Mårtensson A, Quarsten H, Henningson A J, Wennerås C (2018): Serological reactivity to *Anaplasma phagocytophilum* in neoehrlichiosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 37(9), 1673–1678
- Waterboer T, Sehr P, Pawlita M (2006): Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays. *J Immunol Methods* 309(1-2), 200-204
- Weiber H, Zwacka R, Herr I (2006). *An Introduction to Molecular Biotechnology*. In: *Molecular Fundamentals, Methods and Applications in Modern Biotechnology/ Hrsg.:* Wink M, S. 172-173, Weinheim: Wiley-VCH - ISBN 3527314121
- Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, Jacobsson S, Wennerås C (2010): First case of human "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol* 48(5), 1956-1959
- Wells G M, Woodward T E, Fiset P, Hornick R B (1978): Rocky mountain spotted fever caused by blood transfusion. *JAMA* 239(26), 2763-2765
- 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. *J Clin Microbiol* 35(7), 1852-1855
- Wen D, Zhang C (2012): Universal Multiplex PCR: a novel method of simultaneous amplification of multiple DNA fragments. *Plant Methods* 8(1), 32
- Wozniak E J, Barr B C, Thomford J W, Yamane I, McDonough S P, Moore P F, Naydan D, Robinson T W, Conrad P A (1997): Clinical, anatomic, and immunopathologic

- characterization of *Babesia gibsoni* infection in the domestic dog (*Canis familiaris*). *J Parasitol* 83(4), 692-699
- Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R (2000a): Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet Parasitol* 89(3), 241-248
- Zahler M, Rinder H, Zwegarth E, Fukata T, Maede Y, Schein E, Gothe R (2000b): '*Babesia gibsoni*' of dogs from North America and Asia belong to different species. *Parasitology* 120 (Pt 4), 365-369
- Zahler M, Steffenz T, Lutz S, Hähnel W-C, Rinder H, Gothe R (2000c): *Babesia canis* und *Dermacentor reticulatus* in München, ein neuer Naturherd in Deutschland. *Tierarztl Prax* 28(K), 116-120
- Zubach V, Smart G, Ratnam S, Severini A (2012): Novel microsphere-based method for detection and typing of 46 mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol* 50(2), 460-464
- Zuker M (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31(13), 3406-15
- Zygner W, Gojska O, Rapacka G, Jaros D, Wedrychowicz H (2007): Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Vet Parasitol* 145(1-2), 146-151

IX Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für seine freundliche Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jürgen Krücken für die engagierte Betreuung, den vielen Hilfestellungen und Ratschlägen von Anfang bis Ende, seine Geduld sowie für seine stets offene Tür.

Ich danke DVM, Ph.D Gad Baneth (Hebrew University, Jerusalem), Dr. Róbert Farkas (Szent István University, Budapest), DVM Socratis Ptochos (Aristotle University of Thessaloniki) und Dr. Sofia Karanikola (Aristotle University of Thessaloniki, FU Berlin), DVM, MSc, Ph.D. Jovana Stefanovska (University "Ss.Cyril & Methodius", Skopje), DVM, MS, Ph.D. Jasmin Omeragic (University of Sarajevo) und all ihren Helfern vor Ort für ihr Engagement beim Sammeln und Aufbereiten der im Projekt verwendeten Blutproben.

Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank Dr. rer. nat. Andreas Kaufmann und seiner Arbeitsgruppe für Tumorummunologie der Charité Berlin für die kompetente Hilfe im Umgang mit dem Luminex®-System.

Außerdem bedanke ich mich bei allen technischen Mitarbeitern des Institutes für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit. Den Paradoxs danke ich dafür, dass sie die besten Arbeitskollegen waren, die man sich wünschen kann. Es war eine tolle Zeit mit Euch!

Ich danke meinen Freunden für die Motivation und die vielen aufmunternden Worte.

Shane, Dir danke ich für deine Liebe und dafür, dass Du immer für mich da bist.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern und Großeltern, danke ich von Herzen für all ihre Liebe und Unterstützung. Vielen Dank dafür, dass Ihr mir ermöglicht habt, meinen Weg zu gehen.

X Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Berlin, 05.08.2021

Anja Barnikol



9 783967 291292
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-129-2