Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Arthropoden-übertragene Krankheitserreger bei Hunden und Füchsen in Brandenburg

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jana Marie Liesner

Tierärztin aus Braunschweig

Berlin 2016

Journal-Nr.: 3866

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Marcus Fulde

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
dogs, foxes, Culicidae, Dirofilaria repens, Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis, Dirofilaria immitis, Acanthocheilonema reconditum, Rickettsia felis, Sarcocystis arieticanis, Babesia, vector-borne diseases, zoonoses, dirofilariasis, babesiosis, anaplasmoses, ehrlichioses, polymerase chain reaction, Brandenburg

Tag der Promotion: 01.07.2016

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

ISBN: 978-3-86387-735-4
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

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 2016
Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern

Inhalt

Inhalt I
Abbildungsverzeichnis VI
Tabellenverzeichnis VIII
Abkürzungsverzeichnis IX
1. Einleitung 1
2. Literatur 2
2.1 Arthropoden-übertragene Krankheitserreger (VBDs) 2
2.1.1 Die Ausbreitung von Vector-borne diseases - aktuelle Entwicklungen 3
2.2 Untersuchte Erreger 5
2.2.1 *Dirofilaria* spp. 6
2.2.1.1 Taxonomische Einordnung und Morphologie: 6
2.2.1.2 Wirtsspektrum und Vektoren: 6
2.2.1.3 Entwicklungszyklus 7
2.2.1.4 Klinisches Bild, Diagnostik,Therapie und Prophylaxe 8
2.2.1.5 Verbreitung und Epidemiologie 11
2.2.1.6 Zoonotisches Potenzial 12
2.2.1.7 Weitere Filarienarten 13
2.2.2 *Anaplasma phagocytophilum* 14
2.2.2.1 Taxonomische Einordnung und Morphologie 14
2.2.2.2 Wirtsspektrum und Vektoren 14
2.2.2.3 Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie 14
2.2.2.4 Verbreitung und Epidemiologie 15
2.2.2.5 Zoonotisches Potenzial 16
2.2.3 *Ehrlichia canis* 16
2.2.3.1 Taxonomische Einordnung und Morphologie 16
2.2.3.2 Wirtsspektrum und Vektoren 16
2.2.3.3 Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie 17
2.2.3.4 Verbreitung und Epidemiologie 17
2.2.3.5 Zoonotisches Potenzial 18
2.2.4 *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis 18
2.2.5 *Rickettsia* spp. 19
2.2.6 Piroplasmen 20
3. Material und Methoden 23

3.1 Aufbau der Studie 23
3.1.1 Standortwahl 23
3.1.2 Probengewinnung und –lagerung 24
3.1.3 Fragebogen für Patientenbesitzer 25
3.2 Material 26
3.2.1 Chemikalien 26
3.2.2 Einwegartikel 27
3.2.3 Enzyme 27
3.2.4 Geräte 28
3.2.5 Lösungen, Puffer und weitere Flüssigkeiten 29
3.2.6 Marker 29
3.2.7 Reaktionskits 30
3.2.8 Software 30
3.2.9 Weitere Laborartikel 31
3.2.10 Herstellung von Lösungen, Puffern und Reagenzien 31
3.2.10.1 50 × TAE Puffer 31
3.2.10.2 100 bp, 1 kb und λ*Eco*RI/HindIII Marker 31
3.2.10.3 LB-Agar 31
3.2.10.4 6 × Loading Dye 31
3.2.10.5 Einfache Phosphatgepufferte Salzlösung (1 × PBS) 32
3.3. Methoden 32
3.3.1 DNA Isolation 32
3.3.1.1 DNA Isolation aus Blutproben mit Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit 32
3.3.1.2 DNA Isolation aus Blutproben mittels innuPREP Blood DNA mini Kit 33
3.3.1.3 DNA Isolation aus Fuchsmilzproben mit innuSPEED Tissue DNA Kit 34
3.3.2 Messung von DNA mit Epoch® Biotek Spektralphotometer 35
3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion 36
3.3.3.1 Primer 36
3.3.3.2 Polymerasen 37
3.3.3.3 Konventionelle PCR zur Untersuchung auf Dirofilarien 37
3.3.3.4 High Resolution Melt PCR zur Untersuchung auf *Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis* und *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis 40
3.3.3.5 Konventionelle PCR zur Untersuchung auf Piroplasmen 41
3.3.3.6 Konventionelle PCR zur Untersuchung auf *Rickettsia* spp. 42
3.3.4 Agarosegelelektrophorese 42

3.3.5 Sequenzierung von DNA 43
3.3.6 Aufreinigung von DNA und Plasmiden 44
3.3.6.1 Aufreinigung mit DNA cleaner and concentrator™- 5 Kit 44
3.3.6.2 Aufreinigung von PCR Produkten mittels Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit 44
3.3.7 Klonierung 45
3.3.7.1 Vektoren 45
3.3.7.2 Klonierung von DNA in *E. coli* Top 10 kompetente Zellen mittels Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit 48
3.3.7.3 Klonierung von DNA in *E. coli* Top 10 kompetente Zellen mittels TOPO® TA PCR Cloning Kit 49
3.3.7.4 Klonierung von DNA in StrataClone SoloPack kompetente Zellen mittels StrataClone Blunt PCR Cloning Kit 49
3.3.7.5 Retransformation von Plasmiden 50
3.3.7.6 Isolation von Plasmiden 50
3.3.7.6.1 Aufreinigung von Plasmiden mittels NucleoSpin® Plasmid 50
3.3.7.6.2 Aufreinigung mit EasyPrep® Pro Kit 51
3.3.8 Restriktionsenzyme 51
3.3.8.1 Restriktionsverdau von Plasmiden mit *Eco*RI Enzym 51
3.3.8.2 Restriktionsverdau von PCR Produkten mit *Vsp*I (*Ase*I) Enzym 52
3.3.9 Giemsa-Färbung von Blutausstrichen 52
3.3.10 Saure Phosphatase Färbung 53
3.3.11 Modifizierter Knott-Test 53
3.3.12 Berechnung der Kopienzahl von Plasmiden 53
3.3.13 Statistische Auswertung 54
3.3.14 Berechnung der Stichprobengröße 54
4. Ergebnisse 55
4.1 Stichprobengröße 55
4.2 Geographische Herkunft und Verteilung der Proben 56
4.3 Fragebogenauswertung 58
4.3.1 Signalement 58
4.3.2 Herkunft der Hunde 60
4.3.3 Wohnumfeld der Hunde 60
4.3.4 Reisegewohnheiten 61
4.3.5 Infektionswahrscheinlichkeit mit einem studienrelevanten Erreger 62

4.3.6 Parasitenprophylaxe 63
4.3.7 Mid-p Exact Test 63
4.4 Prävalenzen der Erreger bei Hunden und Füchsen in Brandenburg 63
4.4.1 Nachweis von Filarien 64
4.4.1.1 Nachweis von Filarien-DNA 64
4.4.1.2 Differenzierung von Mf mithilfe der sauren Phosphatase Aktivität 66
4.4.2 *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Candidatus* N. mikurensis 66
4.4.3 Piroplasmen 69
4.4.4 Rickettsia spp. 70
4.5 Einzelfallbeschreibung Hund Nr. 117 71
5. Diskussion 73
5.1 Sammelgebiet und Stichprobengröße 73
5.2 Beurteilung der Fragebogenanalyse 74
5.3 Limitationen der Studie 75
5.4 Beurteilung der Prävalenzen von Krankheitserregern bei Hunden und Füchsen in Brandenburg 76
5.4.1 Dirofilaria spp. 76
5.4.2 A. phagocytophilum, E. canis und Candidatus N. mikurensis 79
5.4.3 *Rickettsia* spp. 81
5.4.4 Piroplasmen 82
5.5 Einflussfaktoren für die Verbreitung von VBDs 84
5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick 85
6. Zusammenfassung 88
7. Summary 90
8. Literaturverzeichnis 92
9. Publikationsverzeichnis 106
10. Anhang 107
10.1 Therapieplan für eine nachgewiesene *D. immitis* Infektion 107
10.2 Fragebogen für Patientenbesitzer 108
10.3 geographische Herkunft der Hunde- und Fuchsproben nach Landkreisen 110
10.3.1 Hundeblutproben 110
10.3.2 Fuchsproben 110

10.4 Parasitenprophylaxe: studienrelevante Wirkstoffgruppen, Beispiele für Wirkstoffe und ihre Wirkung auf Arthropoden 111
10.5 Mid p-Exact Test 112
10.6 Danksagung 113
10.7 Selbstständigkeitserklärung 115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *Dirofilaria* spp., schematisch, modifiziert nach (Deplazes et al., 2012e) 8
Abbildung 2: Landkreise und kreisfreie Städte in Brandenburg (Copyright © NordNordWest) 24
Abbildung 3: ITS- Region, modifiziert nach (Coleman, 2003).....38
Abbildung 4: pcR® 4Blunt-TOPO® Vektorkarte (Copyright: Thermo Fisher Scientific) 46
Abbildung 5: pSC-B-amp/kan Vektorkarte (Copyright Agilent Technologies, Inc. All rights reserved. Image used with permission by Agilent).....47
Abbildung 6: pCR®4-TOPO® Vektorkarte (Copyright: Thermo Fisher Scientific) 47
Abbildung 7: Probenentnahme der Hundeblutproben nach Monaten, 2013 - 2014 56
Abbildung 8: Verteilung der Hundeblutproben aus Brandenburg, in ( ) ist die Anzahl der Landkreise mit der jeweiligen Stichprobengröße angegeben.....57
Abbildung 9: Verteilung der Fuchsproben aus Brandenburg, in ( ) ist die Anzahl der Landkreise mit der jeweiligen Stichprobengröße angegeben.....58
Abbildung 10: Alter der Hunde in Jahren 59
Abbildung 11: Geschlecht der Hunde 59
Abbildung 12: Wohnumfeld der Hunde nach Risikogruppen 61
Abbildung 13: Ergebnis einer ITS-1 PCR. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle, 100 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA), + = positive *D. repens* Probe Hund 117 65
Abbildung 14: Ergebnis einer ITS-1 PCR. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle, 100 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA), + = positive *D. repens* Probe Hund 528, * = positive *A. reconditum* Probe Hund 739.....65
Abbildung 15: *Vsp*I (*Ase*I) Enzymverdau, 100 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA),+ = positive *D. immitis* Probe Hund Nr. 28, PK = Positivkontrolle, 50 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA) 66
Abbildung 16: Amplifikationskurve einer HRM PCR, RFU= Relative Fluorescence Units.....67
Abbildung 17: Schmelzkurve einer High Resolution Melt Analysis, RFU = Relative Fluroescence Units.....68
Abbildung 18: Differenzierung der Erreger durch unterschiedlichen Verlauf der Ableitung der Schmelzkurven nach der Temperatur, rot = positive *A. phagocytophilum* Probe Hund 772, PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle 68
Abbildung 19: Ergebnis einer RLB-PCR. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle, 100 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham USA), + = positive *T. annae* Proben Füchse 69

Abbildung 20: Verteilung positiver Piroplasmen Proben (rote Punkte) von Füchsen in Brandenburg nach Landkreisen.....70
Abbildung 21: Konzentrationsgradient für die Bestimmung der Detektionsgrenze der Rickettsien-PCR: (von links nach rechts) 100 bp Marker, Konzentrationen Plasmid 10^6 bis 10 (je 2 µl).....71
Abbildung 22: Mikrofilarie von D. repens in der Giemsa-Färbung.....72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht vektor-übertragener Erreger beim Hund in Europa, modifiziert nach Deplazes et al. (2011) 3
Tabelle 2: untersuchte Erreger in dieser Studie 5
Tabelle 3: Merkmale von *Dirofilaria* spp., modifiziert nach (Deplazes et al., 2012e) 10
Tabelle 4: verwendete Chemikalien in dieser Arbeit 26
Tabelle 5: verwendete Einwegartikel in dieser Arbeit 27
Tabelle 6: verwendete Enzyme in dieser Arbeit 27
Tabelle 7: verwendete Geräte in dieser Arbeit 28
Tabelle 8: verwendete Lösungen, Puffer und weitere Flüssigkeiten in dieser Arbeit 29
Tabelle 9: verwendete Marker in dieser Arbeit 29
Tabelle 10: verwendete Reaktionskits in dieser Arbeit 30
Tabelle 11: verwendete Software aus dieser Studie 30
Tabelle 12: weitere Laborartikel in dieser Arbeit 31
Tabelle 13: Primer für die PCR-Untersuchungen 37
Tabelle 14: Auswahl der Gelkonzentration nach erwarteter Fragmentlänge 43
Tabelle 15: Fragmentgrößen und Erregerzuordnung bei Restriktionsverdau mit *Vsp*I (*Ase*I) 52
Tabelle 16: Reisegewohnheiten 62
Tabelle 17: genetische Übereinstimmung von positiven *D. repens* Hunden aus dieser Studie mit anderen Sequenzen (Gen ITS-1) 64
Tabelle 18: Prävalenzen von Filarienarten bei Hunden und Füchsen in Brandenburg 65
Tabelle 19: Prävalenzen und 95 % Konfidenzintervalle (KI) für *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Candidatus* N. mikurensis 67
Tabelle 20: Prävalenzen und 95 % Konfidenzintervalle (KI) für Piroplasmen 69
Tabelle 21: Prävalenzen und 95 % Konfidenzintervalle für *Rickettsia* spp. 71
Tabelle 22: Längenmessung der Mf von Blutausstrichen, Hund Nr. 117 72
Tabelle 23: Therapieplan für D. immitis, modiziert nach "Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (D. immitis) infection in dogs" Copyright © 2014 American Heartworm Society 107
Tabelle 24: geographische Herkunft der Hundeblutproben nach Landkreisen und kreisfreien Städten 110
Tabelle 25: geographische Verteilung der Fuchsproben nach Landkreisen und kreisfreien Städten 110
Tabelle 26: studienrelevante Wirkstoffgruppen, Beispiele für Wirkstoffe und ihre Wirkung auf Arthropoden 111
Tabelle 27: Ergebnisse Mid p-Exact Test 112

Abkürzungsverzeichnis

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

bp = Basenpaare

bzw. = beziehungsweise

Cand. = Candidatus

CGA = Canine Granulozytäre Anaplasmose

Cl^- = Chlorid - Ionen

COI = Cytochromoxidase I Gen

CVBDs = Canine Vector Borne Diseases = canine vektor-übertragene Erkrankungen

Da = Dalton (Einheit)

DDU = *Dirofilaria* Developing Units

DEBONEL = *Dermacentor*-borne necrosis erythema lymphadenopathy

DECP = Diethylpyrocarbonat

DNA = Desoxyribonukleinsäure

dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate

ECDC = European Centre for Disease Prevention and Control

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

EFSA = European Food Safety Authority

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EU = Europäische Union

GABA = *gamma*-Aminobutyric acid (γ-Aminobuttersäure)

GIS = Geoinformationssystem

°C = Grad Celsius

× g = Beschleunigung als Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)

HRM = High Resolution Melt

IFAT = indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test

ITS = Internal Transcribed Spacer

i.m. = intramuskulär

KI = Konfidenzintervall

Konz. = Konzentration

KGW = Körpergewicht

L 2 = Larve 2

LB - Medium = lysogeny broth - medium (Nährmedium für Bakterien)

Mf = Mikrofilarien

n = Stichprobengröße

Na^+ = Natrium-Ion

ng = Nanogramm

NCBI = National Center for Biotechnology Information

OD = Optical Density (optische Dichte)

PCR = Polymerase Chain Reaction (Polymerase Ketten Reaktion)

% = Prozent

RLB = Reverse Line Blot

rDNA = ribosomale DNA

rpm = revolutions per minute (Einheit)

SDS = Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)

s.c. = subkutan

s.l. = sensu lato

sp. = Species

spp. = Species pluralis

TIBOLA = Tick Borne Lymphadenopathy (zeckenübertragene Lymphadenopathie)

U = Unit (Einheit)

USA = United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)

VBD = vector borne disease (Vektor-übertragene Erkankung)

ZNS = Zentralnervensystem

1. Einleitung

Hunde (lat. *Canis lupus familiaris*) und Rotfüchse (lat. *Vulpes vulpes*) sind neben anderen Tierarten durch den Zugang zu Feldern, Wiesen, Wäldern und Gewässern potenziellen Vektoren verschiedener Infektionskrankheiten ausgesetzt. Zu diesen Vektoren gehören Zecken, Flöhe und Stechmücken, die während der Blutmahlzeit Pathogene auf ihren Wirt übertragen können. Auf diesem Wege übertragene Infektionen werden als "vector-borne diseases" (VBDs) bezeichnet und können im Endwirt teilweise schwere Krankheitsbilder verursachen. Bei vielen der Erreger handelt es sich zudem um Zoonosen, welche die Gesundheit des Menschen gefährden können.

In den letzten Jahren wird europaweit zunehmend von einer Ausbreitung verschiedener VBDs berichtet (Baneth et al., 2012; Heyman et al., 2010; Otranto et al., 2013; Savic et al., 2014). Die Gründe für die Ausbreitung sind vielschichtig und es werden neben dem Klimawandel auch eine geänderte Landnutzung, sozio-ökonomische Faktoren und gestiegene Reise- und Handelsaufkommen diskutiert.

In Brandenburg wurde vor kurzer Zeit wiederholt von einem vermutlich autochthonen Ausbruch des von Stechmücken übertragenen Nematoden und Zoonoseerregers *Dirofilaria repens* in einem Schlittenhunderudel berichtet (Sassnau et al., 2009; Sassnau et al., 2013a). Außerdem konnte dieser Parasit in heimischen Mückenarten in Brandenburg in den Jahren 2011 und 2012 (Czajka et al., 2014) als auch bei einem Menschen aus Sachsen-Anhalt im Frühjahr 2014 nachgewiesen werden (Tappe et al., 2014). Bisher war *D. repens* in den östlichen und südlichen Regionen Europas endemisch, nicht jedoch in Deutschland. Im Endwirt verursacht dieser Erreger subkutane Hautknoten mit Juckreiz, Entzündung und Hautrötung. Weitere Arthropoden-übertragene Erreger wie Anaplasmataceae, *Babesia* spp., *Borrelia* spp. und *Rickettsia* spp. sind kürzlich mit unterschiedlich hohen Prävalenzen in von Hunden abgesammelten Schildzecken aus Berlin und Brandenburg beschrieben worden (Schreiber et al., 2014).

Zu der eigentlichen Belastung von Hunden aus dieser Region mit VBDs und über die Rolle von Rotfüchsen als potenzielle Reservoirwirte für diese Infektionen liegen bislang kaum Informationen vor. Die vorliegende Doktorarbeit hatte daher das Ziel, die aktuelle epidemiologische Situation zum Vorkommen von *D. repens* sowie von anderen Filariosen, Anaplasmataceae, *Rickettsia* spp. und Piroplasmen bei Hunden und Rotfüchsen aus Brandenburg zu untersuchen und eine mögliche Endemisierung des Erregers *D. repens* zu identifizieren. Ein Fragebogen für teilnehmende Patientenbesitzer sollte zudem Auskunft über Herkunft, Reiseverhalten und Parasitenprophylaxe der Hunde geben und damit mögliche Gründe für die Ausbreitung von VBDs verifizieren.

2. Literatur

2.1 Arthropoden-übertragene Krankheitserreger (VBDs)

VBDs sind Infektionen, die über einen Stich von infizierten Arthropoden wie Zecken, Flöhen und Mücken übertragen werden (Confalonieri et al., 2007). Bei den übertragenen Pathogenen handelt es sich um Viren, Bakterien, Protozoen sowie Helminthen und diese können im Endwirt zu schweren, lebensbedrohlichen Erkrankungen führen.

Zu der Gruppe von caninen VBDs gehören unter anderem die Anaplasmose, Babesiose, Bartonellose, Borreliose, Dirofilariose, Ehrlichiose, Leishmaniose, Rickettsiose und Thelaziose (Baneth et al., 2012). Viele dieser Erreger haben zoonotisches Potenzial und können bei einer Infektion des Menschen auch hier zu schwerwiegenden Krankheitsbildern führen. Aufgrund der Ausbreitung von VBDs in den letzten Jahren in neue geographische Regionen und Klimazonen und die damit verbundene zunehmende Bedrohung für Mensch und Tier (Confalonieri et al., 2007), sind die genannten Erreger in den Fokus aktueller Forschungen im tiermedizinischen, aber auch im humanmedizinischen Bereich gerückt, um die Gründe und Entwicklungen in diesem Feld genauer zu untersuchen sowie Bekämpfungsstrategien zu erstellen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht zu den vektor-übertragenen Erreger beim Hund in Europa (modifiziert nach (Deplazes et al., 2011)).

Tabelle 1: Übersicht vektor-übertragener Erreger beim Hund in Europa, modifiziert nach Deplazes et al. (2011)

Vektor	Pathogen
Rhipicephalus sanguineus	*Ehrlichia canis*
Ixodes ricinus	*Anaplasma phagocytophilum*
R. sanguineus	*Anaplasma platys*
R. sanguineus	*Rickettsia conorii*
Flöhe	*Rickettsia felis*
I. ricinus, Ixodes hexagonus, Ixodes persulcatus, Dermacentor reticulatus	Borrelia-burgdorferi Komplex (*B. garinii* und *B. afzelii*)
Culicidae, *R. sanguineus*	*Acanthocheilonema reconditum*
Culicidae*, R. sanguineus*	*Acanthocheilonema dracunculoides*
R. sanguineus	*Cercopithifilaria grassii*
D. reticulatus	*Babesia canis canis*
R. sanguineus	*Babesia canis vogeli*
R. sanguineus	*Babesia gibsoni*
I. hexagonus	*Theileria annae*
R. sanguineus	*Hepatozoon canis*
Phlebotomen	*Leishmania infantum*
Culicidae	*D. immitis*
Culicidae	*D. repens*
Flöhe, Haarlinge	*Dypilidium caninum*
Muscidae	*Thelazia callipaeda*
Arthropoden	*Bartonella* spp.
Culicidae, Tabaniden	*Francisella tularensis*
Culicidae	West-Nil-Virus
I. ricinus, I. persulcatus	Flavivirus
Ixodes spp. *Dermacentor* spp.	*Coxiella burnetti*

2.1.1 Die Ausbreitung von Vector-borne diseases - aktuelle Entwicklungen

Neben den caninen VBDs sind viele weitere, von Arthropoden-übertragene Krankheitserreger bekannt, die weltweit bei Mensch und Tier eine zunehmende Bedeutung erlangen und die Notwendigkeit von Überwachung und Bekämpfung dieser Krankheiten verdeutlichen.

Die Gefahr der Ausbreitung ist besonders groß, wenn Vektoren, Wirte, klimatische Bedingungen, Pathogene und empfängliche humane Populationen zur selben Zeit am

gleichen Ort existieren (Savic et al., 2014). Wenn diese Faktoren zusammentreffen, kann es auch zu Wiederausbrüchen von bisher als getilgt geltenden Infektionen kommen. Ein Beispiel sind neu auftretende Malaria-Fälle beim Menschen in Griechenland seit dem Jahr 2009, obwohl diese von Moskitos übertragene Erkrankung dort eigentlich seit 1974 als eliminiert galt (Zeller et al., 2013).

Ein Beispiel für die Einschleppung neuer Vektoren ist die asiatische Tigermücke *Aedes albopictus*. Sie gelangte über den interkontinentalen Altreifenhandel von den USA nach Italien, da die Larven in wassergefüllten Hohlräumen leben. Das Vorkommen von *Ae. albopictus* wurde bereits in Deutschland nachgewiesen (Becker et al., 2014; Semenza and Menne, 2009). Findet der Vektor dann passende Umwelt- und Klimabedingungen vor, ist eine Expansion nahezu gesichert (Suk and Semenza, 2014). *Ae. albopictus* überträgt unter anderem die einst nur in den Tropen vorkommenden Viruserkrankungen Dengue-Fieber und Chikungunya auf den Menschen, ist aber auch als Vektor für *D. immitis* und *D. repens* in Italien beschrieben (Gratz, 2004). Auch das West-Nil-Virus, ein weiterer Erreger von VBDs, wird von Wissenschaftlern hierzulande als drohende Gefahr für den Menschen angesehen, da Reisende es aus Endemiegebieten nach Deutschland importieren und hier kompetente Stechmückenarten wie *Culex* oder *Aedes* vorkommen, die das Virus übertragen können (Becker et al., 2014).

Weitere Beispiele sind die sogenannten "tick-borne diseases", also Zecken-übertragene Krankheitserreger wie Borrelia *burgdorferi s.l.*, "tick-borne" und "flea-borne diseases" (von Flöhen übertragene Krankheitserreger) wie bestimmte *Rickettsia* spp. und die von Sandmücken übertragenen Erreger *Leishmania infantum*, die eine zunehmende Rolle bei Mensch und Tier in Europa spielen (Mencke, 2013). Auch die geographische Ausbreitung von Schildzecken wie *Ixodes ricinus* in nördlichere Länder Europas (Semenza and Menne, 2009) und *Dermacentor reticulatus* in bestimmten Regionen Deutschlands (Rubel et al., 2014) sind in den letzten Jahren beschrieben worden.

Als mögliche Gründe für die Ausbreitung von VBDs werden der Klimawandel, globaler Handel, gestiegener Tourismus (mit Hund), Renaturierung landwirtschaftlicher Nutzflächen und daraus folgende Vermehrung von Reservoirwirten und sozioökonomische Faktoren diskutiert (Semenza and Menne, 2009).

Untersuchungen zur epidemiologischen Lage von VBDs sind daher unbedingt notwendig, um das Gefährdungspotenzial für Tier und Mensch besser einschätzen zu können und entsprechende Bekämpfungsmaßnahmen zu ergreifen. Die vorliegende Arbeit hat daher das Vorkommen von bestimmten Arthropoden-übertragenen Krankheitserregern bei Hunden und Füchsen in Brandenburg untersucht. In Tabelle 2 sind die für die Studie relevanten und untersuchten Erreger aufgelistet, die in der folgenden Literaturübersicht genauer vorgestellt werden.

Tabelle 2: untersuchte Erreger in dieser Studie

Vektor	Pathogen
Schildzecken (Ixodidae)	*Anaplasma phagocytophilum*
	Babesia canis canis
	Babesia canis vogeli
	Babesia gibsoni
	Babesia microti
	Babesia vulpes/ B. mikroti- like / Theileria annae
	Ehrlichia canis
	Candidatus Neoehrlichia mikurensis
	Acanthocheilonema dracunculoides
	Rickettsia conorii
	Rickettsia felis
	Rickettsia helvetica
	Rickettsia raoultii
Flöhe (Pulicidae)	*Rickettsia felis*
	Acanthocheilonema reconditum
Stechmücken (Culicidae)	*Dirofilaria repens*
	Dirofilaria immitis
	Acanthocheilonema dracunculoides

2.2 Untersuchte Erreger

Die Auswahl der sowohl autochthon als auch nicht autochthon vorkommenden Erreger dieser Studie erfolgte anhand folgender Überlegungen: In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden die Prävalenzen von u.a. Anaplasmataceae, *Babesia* spp. und *Rickettsia* spp. in von Hunden abgesammelten Schildzecken aus der Region Berlin/Brandenburg untersucht (Schreiber et al., 2014). In Anlehnung an diese Ergebnisse sollten die Prävalenzen dieser und weiterer Erreger in Blutproben von Hunden in Brandenburg bestimmt werden, um die tatsächlichen Infektionen von Hunden in dieser Region beurteilen zu können.

D. repens war bislang in den östlichen und südlichen Regionen Europas endemisch und wurde in den letzten Jahren wiederholt in Mücken (Czajka et al., 2014) und Hunden (Sassnau et al., 2009) aus Brandenburg, als auch kürzlich bei einem Menschen aus Sachsen-Anhalt (Tappe et al., 2014) nachgewiesen. Daher sollte eine mögliche Endemisierung dieses Erregers in Brandenburg mit dieser Studie untersucht werden.

Autochthone kanine Fälle mit *D. immitis* sind bisher in Deutschland noch nicht beschrieben, allerdings wurde der Erreger ebenfalls in Mücken aus Brandenburg entdeckt (Kronefeld et al., 2014).

2.2.1 *Dirofilaria* spp.

2.2.1.1 Taxonomische Einordnung und Morphologie:

Dirofilaria repens und *Dirofilaria immitis* gehören der Familie Onchocercidae und der Ordnung Spirurida an. Sie sind Nematoden, die auch als Faden- oder Rundwürmer bezeichnet werden (Deplazes et al., 2012e).

In ihrem Aussehen sind sie langgestreckt, fadenförmig und ungegliedert, und ihr Körper ist von einer weißen Cuticula umgeben. Sowohl weibliche sowie männliche adulte Vertreter von *D. repens* als auch weibliche adulte *D. immitis* Würmer haben ein stumpfes Ende, der Schwanz von männlichen, adulten *D. immitis* Würmern ist hingegen aufgerollt. Adulte *D. repens* Würmer haben eine Länge von 50 - 170 mm und eine Breite von 3,7 - 6,5 mm, wobei die Männchen (≤ 70 mm) kleiner als die Weibchen sind (≤ 170 mm). Adulte *D. immitis* Würmer sind 120 - 310 mm lang und 0,7 - 1,3 mm breit, auch hier sind die Weibchen größer (≤ 310 mm) als die Männchen (≤ 200 mm) (Manfredi et al., 2007). Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen *D. repens* und *D. immitis* ist die Beschaffenheit der Cuticula (Pampiglione et al., 2009). Während sie bei *D. repens* erhabene Längstleisten aufweist, die im histopathologischen Querschnitt als zackenartige Struktur der Cuticula zu erkennen sind, ist sie bei *D. immitis* von glatter Beschaffenheit.

Die Weibchen beider Arten sind ovovivipar und entlassen nach erfolgter Paarung mit einem Männchen Mikrofilarien (Mf) in das Blut des Wirtes. Die Mf sind unbescheidet und haben eine Größe von 300 - 360 µm × 6 - 8 µm bei *D. repens* (siehe Abb. 22) bzw. 290 - 330 µm × 5 - 7 µm bei *D. immitis* (Manfredi et al., 2007).

Weitere wichtige Vertreter der Spezies *Dirofilaria,* die für die vorliegende Arbeit jedoch aufgrund ihrer geographischen Verbreitung keine Relevanz besitzen, sind *Dirofilaria ursi* und *Dirofilaria tenuis,* die in den USA bei Waschbären, Wildbären und dem Menschen vorkommen (Orihel and Eberhard, 1998).

2.2.1.2 Wirtsspektrum und Vektoren:

Das Wirtsspektrum von *D. repens* und *D. immitis* umfasst zahlreiche Haus- und Wildtierarten, wobei in Europa hauptsächlich der Hund (*Canis lupus familiaris*) und ferner Feliden (*Felis silvestris catus* und *Genetta genetta*) Endwirte darstellen (Manfredi et al., 2007).

Sowohl *D. repens* als auch *D. immitis* sind Zoonoseerreger, die den Mensch infizieren können (Genchi et al., 2011a; Simon et al., 2009). Daneben sind weitere Wirte aus der Familie Canidae, wie beispielsweise Füchse, Wölfe, Kojoten oder Schakale bekannte

Endwirte (Magi et al., 2008; McCall et al., 2008; Penezic et al., 2014; Segovia et al., 2001; Taylor et al., 2007). Die Rolle des Fuchses als möglicher Reservoirwirt für *D. repens* ist bisher in Deutschland in Brandenburg im Jahr 2009 untersucht worden, hier waren alle mittels PCR untersuchten Lungengewebeproben in der PCR negativ für *D. repens* (Härtwig et al., 2015).

Die Dirofilariose ist eine VBD, bei der Stechmücken (Familie Culicidae) als Zwischenwirte agieren (Cancrini and Gabrielli, 2007). Insgesamt gibt es weltweit über 3500 Arten von Stechmücken, allein in Deutschland sind derzeit 50 bekannt (Becker et al., 2014). So gehören Arten der Gattungen *Anopheles*, *Aedimorphus*, *Armigeres*, *Coquillettidia*, *Culex, Ochlerotatus, Mansonia* und *Stegomyia* zu den Zwischenwirten von *D. repens* und *D. immitis,* wobei in Europa hauptsächlich die Gattungen *Aedes*, *Culex* und *Anopheles* eine Rolle spielen (Becker et al., 2010; Deplazes et al., 2011).

In den Jahren 2011 bis 2013 wurde *D. repens* DNA in *Culiseta annulata*, *Aedes vexans* und *Anopheles maculipennis* s.l. in Deutschland, darunter auch in Brandenburg, nachgewiesen (Becker et al., 2014).

Stechmücken sind ektotherm, folglich hängt ihre Körpertemperatur von der Umgebungstemperatur ab. In den tropischen Regionen sind sie daher das ganze Jahr aktiv und in den gemäßigten Klimazonen, wozu auch Deutschland gehört, überwiegend im späten Frühjahr sowie in den Sommermonaten (Becker et al., 2014; Cancrini and Gabrielli, 2007). Für die Eiproduktion ist für die Weibchen, mit wenigen Ausnahmen, Blutnahrung notwendig (Deplazes et al., 2012c).

2.2.1.3 Entwicklungszyklus

Für die Entwicklung von *D. repens* und *D. immitis* sind ein Zwischenwirt und ein Endwirt notwendig (siehe Abbildung 1). Adulte Weibchen entlassen unbescheidete Mikrofilarien (Mf) in das Blut ihres Wirtes. Im peripheren Blut zeigen diese eine erhöhte Anzahl in den Abend- und Nachtstunden (Deplazes et al., 2012d; Di Cesare et al., 2013; Webber and Hawking, 1955). Tagsüber verringert sich die Mikrofilarämie hingegen um 80 - 95 % (Eckert et al., 2005). Der Zwischenwirt, eine Stechmücke, nimmt nun während der Blutmahlzeit Mf auf, die daraufhin in die malphigischen Gefäße der Mücke wandern. Dort entwickeln sie sich zur L2 und weiter zur infektiösen L3. Die L3 wandern von den malphigischen Gefäßen zu der Mundregion der Stechmücke und werden bei der nächsten Blutmahlzeit auf den Endwirt übertragen (Cancrini and Gabrielli, 2007).

Die Entwicklung von der Mf bis zur L3 im Zwischenwirt ist temperaturabhängig und dauert 8 bis 10 Tage bei 28 °C - 30 °C, 11 - 12 Tage bei 24 °C und 16 - 20 Tage bei 22 °C (Cancrini and Gabrielli, 2007). Bei einer Temperatur unter 14 °C findet keine Entwicklung statt (Fortin and Slocombe, 1981). Im Endwirt entwickeln sich die Larven weiter, von der L3 über die L4

bis zu den adulten Würmern. Nach der Paarung entlassen diese neue Mf in das Blut und der Zyklus beginnt von vorn. Die Präpatenzzeit beträgt 6 - 8 Monate und die Patenzzeit mindestens 2 - 3 Jahre (Genchi et al., 2011a; Webber and Hawking, 1955).

Die L4 und Adulten von *D. repens* sind im Endwirt in der Regel in der Subkutis lokalisiert, bei *D. immitis* hingegen in der Aorta pulmonalis und im rechten Herzen (Taylor et al., 2007). Beim Menschen entwickeln sich die Würmer meist nicht bis zur Geschlechtsreife, sondern die Präadulten parasitieren bei *D. repens* in der Subkutis oder Okularregion, bei einer Infektion mit *D. immitis* hingegen in pulmonalen Herden (Simon et al., 2009).

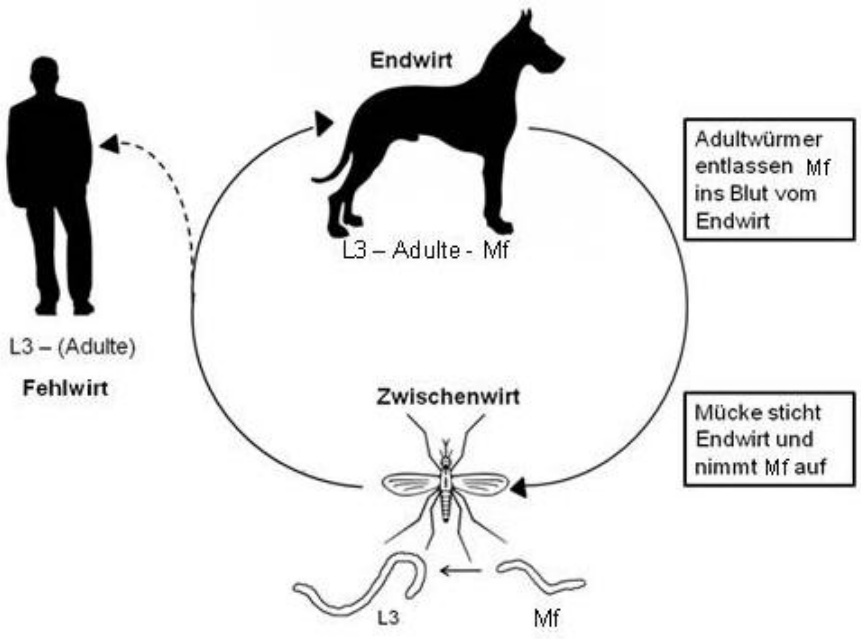

Abbildung 1: Entwicklungszyklus von *Dirofilaria* spp., schematisch, modifiziert nach **(Deplazes et al., 2012d)**

2.2.1.4 Klinisches Bild, Diagnostik,Therapie und Prophylaxe

Klinisches Bild

Die Infektion des Endwirtes mit *D. repens* ist durch das Auftreten von meist schmerzlosen, subkutanen Knoten gekennzeichnet, in denen die adulten Würmer parasitieren (Taylor et al., 2007). Es kann zu Juckreiz, Rötung, Schwellung oder einer Dermatitis kommen, häufig ist die Infektion auch asymptomatisch, was die Diagnose erschwert (Grandi et al., 2007). Überwiegend treten die Knoten in der Subkutis auf, beispielsweise im Konjunktivalbereich am Auge, am Rumpf oder am Scrotum, es sind aber auch Lokalisationen adulter Würmer in der Abdominalhöhle oder entlang muskulärer Faszien in der Literatur beschrieben (Grandi et al., 2007; Hermosilla et al., 2006; McCall et al., 2008; Simon et al., 2012).

Das klinische Bild einer *D. immitis* Infektion ist schwerwiegender, adulte Würmer parasitieren in der Aorta pulmonalis und im rechten Herzen, wo sie Obstruktionen und Schäden der

Gefäßwände (Endarteritis) verursachen (Deplazes et al., 2012d). In der Folge kommt es zu einer pulmonaren Hyptertension, Ödembildung und im weiteren Verlauf zu einer Hypertrophie des rechten Herzens und der Entstehung eines Cor pulmonale ("Lungenherz") (Grandi et al., 2007; Simon et al., 2012). Die Hunde werden mit Dyspnoe, Pneumonie, Husten und Lethargie beim Tierarzt vorgestellt. Ebenso kann aufgrund eines erhöhten Filtrationsdrucks in der Niere eine Glomerulonephritis entstehen, bei den Hunden ist dann häufig eine Proteinurie nachweisbar (Deplazes et al., 2012d; Simon et al., 2012).

Diagnostik

Für die Diagnose ist vorab die lange Inkubationszeit von 6 bis 8 Monaten zu beachten. Bei einer Infektion mit *D. immitis* kann die Verdachtsdiagnose bereits aufgrund einer gründlichen Anamnese (Reisen in Endemiegebiete) und passenden klinischen Symptomen gestellt werden (Deplazes et al., 2012d). Dies ist bei *D. repens* nicht immer möglich, da die Infektion häufig asymptomatisch verläuft.

Die Diagnose von beiden Arten erfolgt einerseits über den mikroskopischen Nachweis von Mf, entweder im Blutausstrich oder mithilfe des Knott-Tests. Bei letzterer Methode werden die Mf aus dem Blut zunächst angereichert (Knott, 1939). Die Blutentnahme sollte aufgrund der Periodizität der Mf in den Abendstunden erfolgen. Die Sensitivität des Mf-Nachweises reicht jedoch nicht aus, um bei einem negativen Ergebnis eine Infektion auszuschließen (Deplazes et al., 2011). Es stehen daher für *D. immitis* kommerzielle Antigen-Tests für Blutplasma oder -serum zur Verfügung, bei denen die Proben auf zirkulierende Antigene von adulten *D. immitis* Weibchen untersucht werden (Atwell et al., 1988; Gillis et al., 1984; Lee et al., 2011). Damit ist bei diesem Erreger der Nachweis während der Präpatenz möglich.

Den direkten Erregernachweis ermöglicht außerdem eine Polymerase-Ketten-Reaktion, sie ist eine sehr sensitive Methode und ermöglicht eine Speziesdifferenzierung (Albonico et al., 2014; Nuchprayoon et al., 2005; Rishniw et al., 2006). Mithilfe einer speziellen histochemischen Färbung können zudem Mf verschiedener Arten aufgrund der Lokalisation der sauren Phosphatase-Aktivität differenziert werden (Peribanez et al., 2001).

Differenzialdiagnostisch sind noch weitere Filarienarten der Carnivoren, wie *Acanthocheilonema reconditum* oder *Acanthocheilonema dracunculoides*, zu beachten. Tabelle 3 fasst die wichtigsten Merkmale der beiden *Dirofilaria* Spezies zusammen.

Tabelle 3: Merkmale von *Dirofilaria* spp., modifiziert nach (Deplazes et al., 2012d)

Merkmal	*D. repens*	*D. immitis*
Größe Mikrofilarien	300 - 360 µm × 6 - 8 µm	290 - 330 µm × 5 - 7 µm
Größe Adulte	50 - 170 mm × 3,7 - 6,5 mm	120 - 310 mm × 0,7 - 1,3 mm
Lokalisation der sauren Phosphatase	nur Analporus	Exkretions- und Analporus
Histologie Adultwürmer (Querschnitt)	Zackenartige Struktur der Cuticula	Glatte Beschaffenheit der Cuticula
Lokalisation Mikrofilarien	Blut	Blut
Lokalisation Adulte	Subkutis	Aorta pulmonalis, re. Herz

Therapie und Prophylaxe

Insbesondere im Hinblick auf das Zoonosepotenzial, zum Abklingen klinischer Symptome und zur Verhinderung einer weiteren Übertragung, ist die Therapie von *D. repens* indiziert (Baneth et al., 2002). In diversen Studien konnte die Wirksamkeit von Moxidectin in der Kombination mit Imidacloprid gegen Mf von *D. repens* bei natürlich infizierten Hunden gezeigt werden (Fok et al., 2010; Hellmann et al., 2011; Traversa et al., 2011). Weiter wurde die Wirksamkeit gegen Mf mit der kombinierten Gabe von Doxycyclin und Ivermectin bei natürlich infizierten Hunden untersucht und bestätigt (Giannelli et al., 2013; Sassnau et al., 2009).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Wirkung von Doxycyclin (ein Antibiotikum aus der Gruppe der Tetrazykline) gegen die gram-negativen Bakterien der Gattung *Wolbachia*. Diese Bakterien leben in Endosymbiose mit verschiedenen Filarienarten (Sironi et al., 1995), darunter *D. repens* und *D. immitis*. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Filarien (Bandi et al., 2001) und sind daher ein potenzielles Ziel der Wirkung von Pharmaka (Taylor and Hoerauf, 1999). Hautknoten mit Adultwürmern von *D. repens* können zudem chirurgisch entfernt werden. Für die Therapie einer nachgewiesenen *D. immitis* Infektion hat die American Heartworm Society (Nelson et al., 2014) ein Behandlungsprotokoll entwickelt (siehe Anhang 10.1 Tabelle 23).

Die Prophylaxe von Dirofilariosen erfolgt in der Regel mit Medikamenten aus der Wirkstoffgruppe der makrozyklischen Laktone (z.B. Ivermectin, Selamectin, Milbemycin oxime, Moxidectin) (Deplazes et al., 2011; Simon et al., 2012). In der Literatur ist die erfolgreiche präventive Wirkung vor der Etablierung adulter *D. repens* bei Hunden in der Anwendung mit einer Kombination aus Imidacloprid 10 %/Moxidectin 2,5 % (Genchi et al., 2013) als auch mit der Kombination aus Milbemycin oxime/Praziquantel (Di Cesare et al., 2014) nachgewiesen worden.

Die American Heartworm Society (https://www.heartwormsociety.org/) empfiehlt in endemischen Gebieten von *D. immitis* eine regelmäßige medikamentöse Prophylaxe, beginnend bereits ab dem Welpenalter (>8 Wochen) sowie ein jährliches Screening auf das Vorhandensein des Erregers (Nelson et al., 2014). Bei Reisen in Endemiegebiete sollte einen Monat vor der Reise bis einschließlich vier Wochen nach Abschluss der Reise eine medikamentöse Prophylaxe bei dem Hund durchgeführt werden (Simon et al., 2012).

2.2.1.5 Verbreitung und Epidemiologie

D. repens kommt in Europa, Afrika und Asien vor, während *D. immitis* weltweit in den tropischen, subtropischen und gemäßigten Klimazonen, vor allem in Nord- und Südamerika, verbreitet ist (McCall et al., 2008; Simon et al., 2009).

Beide Erreger treten mit zunehmender Bedeutung in tropischen und gemäßigten Klimazonen bei Hunden, Katzen und Menschen auf (McCall et al., 2008; Simon et al., 2012). Als mögliche Gründe hierfür werden in der Literatur unter anderem der Klimawandel, eine erhöhte Reisebereitschaft mit Hunden in Endemiegebiete und die gestiegene Aufmerksamkeit unter Wissenschaftlern diskutiert (Genchi et al., 2011a; Genchi et al., 2011b; Simon et al., 2012).

Europäische Endemiegebiete von *D. repens* sind bisher überwiegend südliche und östliche Länder wie Italien, Frankreich, Griechenland, Spanien, Kroatien, Rumänien, Slowakei und die Ukraine (Chauve, 1997; Giannetto et al., 1997; Hamel et al., 2013; Ionica et al., 2015; Mazurkevich et al., 2004; Miterpakova et al., 2010; Pampiglione et al., 2001; Vakalis and Himonas, 1997). So liegt beispielsweise in Italien die Prävalenz für *D. repens* bei Hunden in bestimmten Provinzen zwischen 25,6 % und 30 % (Giannetto et al., 1997; Rossi et al., 1996).

In den letzten Jahren wurde in diversen Publikationen das Vordringen von *D. repens* Infektionen in bisher nicht-endemische, nördlichere Regionen Europas wie Polen, den Niederlanden und auch Deutschland, beschrieben. Galt dieser Erreger im letzten Jahrzehnt in diesen Ländern noch als Import- oder Reisekrankheit, sind mittlerweile eine Vielzahl autochthoner Infektionen bei Caniden und auch beim Menschen in diesen Ländern bekannt (Bajer et al., 2014; Hermosilla et al., 2006; Overgaauw and van Dijk, 2009; Zarnowska-Prymek et al., 2008).

In Deutschland gab es den ersten autochthonen caninen *D. repens* Fall im Jahr 2004 bei einem Jagdhund aus Baden-Württemberg (Hermosilla et al., 2006) und sowohl 2007 als auch 2012 wurden wahrscheinlich autochthone *D. repens* Infektionen in einem Schlittenhunderudel aus Brandenburg nachgewiesen (Sassnau et al., 2009; Sassnau et al., 2013a).

Im März 2014 trat der erste humane autochthone *D. repens* Fall bei einem Mann aus Sachsen-Anhalt auf (Tappe et al., 2014). Weitere Hinweise auf ein endemisches Vorkommen dieses Erregers in Deutschland lieferten die Funde von *D. repens DNA* in heimischen Mückenpopulationen in den Jahren 2011 - 2013 (Czajka et al., 2014; Kronefeld et al., 2014). Czajka et al. detektierten im Rahmen eines Monitoringprogramms mittels PCR Untersuchungen 4 positive *D. repens* Mückenpools aus 1050 deutschlandweit, und alle vier stammten aus Brandenburg. Autochthone Fälle mit *D. immitis* sind bisher in Deutschland noch nicht beschrieben, allerdings wurde der Erreger ebenfalls in Mücken aus Brandenburg entdeckt (Kronefeld et al., 2014).

In europäischen Wildtierpopulationen wurde bisher *D. immitis* in Rotfüchsen (*Vulpes vulpes*) oder Schakalen (*Canis aureus*) nachgewiesen (Manas et al., 2005; Segovia et al., 2001; Tolnai et al., 2014), für *D. repens* dagegen gibt es bisher nur wenige Informationen. In einer Studie aus Italien wurden bei 23 von 132 Rotfüchen Filariosen gefunden, davon bei acht *D. immitis* und bei einem dieser Füchse eine Mischinfektion mit *D. repens* (Magi et al., 2008). In Serbien und Mazedonien konnten 2014 erstmals in einem Rotfuchs und in zwei Wölfen Adultwürmer von *D. repens* entdeckt werden (Cirovic et al., 2014). Die Autoren dieser Studie stellten zudem fest, dass aufgrund der geringen Anzahl an Studien und beprobter Tiere die Rolle von Wildtieren als Reservoirwirte und in der natürlichen Übertragung von *D. repens* weiterhin schwierig zu beurteilen ist.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie aus Deutschland wurde im Jahr 2009 aus dem Havelland, Brandenburg DNA aus Lungengewebe von 122 Füchsen (*Vulpes vulpes*) und von 13 Mardern (*Nyctereutes procyoindes*) mittels PCR auf das Vorkommen von *D. repens* untersucht (Härtwig et al., 2015). In keiner der Proben wurde *D. repens* DNA nachgewiesen. Folglich sind weitere Untersuchungen zur aktuellen Epidemiologie und Verbreitung von *D. repens* im Bundesland Brandenburg bei Hunden und in Rotfüchsen unbedingt notwendig, um eine mögliche Endemisierung von *D. repens*, die Rolle von Wildtieren als potenzieller Reservoirwirte und die Gefahr als Zoonose besser einschätzen zu können.

2.2.1.6 Zoonotisches Potenzial

Humane Fälle von Dirofilariosen treten weltweit auf und in den letzten Jahren wurde parallel zu der steigenden Inzidenz bei Caniden auch zunehmend von humanen Infektionen in Europa mit *D. repens* berichtet (Pampiglione and Rivasi, 2000; Simon et al., 2005). Dabei ist zu beachten, dass *D. repens* vor allem in der Alten Welt (Asien, Afrika, Europa) beim Menschen gegenüber Infektionen mit *D. immitis* dominiert (Bartkova et al., 2011).

In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass in einer Studie diverse bisher als *D. immitis* deklarierte Fälle beim Menschen in der Alten Welt neu überprüft worden sind, und es sich nach Meinung der Autoren stattdessen um *D. repens* handelt (Pampiglione et al., 2009).

Begründet wurde dies durch den morphologischen Nachweis von Längstleisten der Cuticula bei *D. repens* in histopathologischen Querschnittsbildern, die *D. immitis* im Unterschied nicht aufweist.

Klinische Symptome einer *D. repens* Infektion beim Menschen äußern sich meist in subkutanen Knoten oder seltener auch in pulmonalen Herden, in denen der Erreger parasitiert. Oft sind die Hautknoten im Bereich des Auges lokalisiert, so sind 35 % von bisher 847 aufgetretenen humanen *D. repens* Fällen europaweit von 1995 - 2010 in der Okularregion aufgetreten (Genchi et al., 2011a). Auch in der Schläfenregion (Tappe et al., 2014) oder im Nacken (Chan et al., 2013) können die Knoten auftreten und Juckreiz, Entzündungen, Schwellung oder Rötung verursachen (Pampiglione and Rivasi, 2000). Im November 2014 wurde erstmals das kutane Larva migrans Syndrom, verursacht durch *D. repens*, bei einem Menschen aus der Slowakei festgestellt und beschrieben (Antolova et al., 2015). Die Wanderungsgänge der Larven unter der Haut sind hierbei sichtbar und verursachen Brennen, Rötung und Schmerzen. Auch ein schwerer Verlauf der Infektion, z.B. in Form einer Meningoencephalitis, wurde beschrieben (Poppert et al., 2009). Mittlerweile sind autochthone humane Fälle aus Österreich (Auer and Susani, 2008), Frankreich (Khechine-Martinez et al., 2009), Kroatien (Marusic et al., 2008), Italien (Aiello et al., 2005), Griechenland (Maltezos et al., 2002), Polen (Cielecka et al., 2012), Ungarn (Ponyai et al., 2006) und zahlreichen weiteren europäischen Ländern bekannt. In Deutschland trat der erste humane *D. repens* Fall im März 2014 bei einem Mann aus Sachsen-Anhalt im Schläfenbereich auf (Tappe et al., 2014).

2.2.1.7 Weitere Filarienarten

In Europa sind verschiedene Filarienarten beim Hund bekannt, neben Dirofilarien (*D. repens* und *D. immitis*) kommen *Acanthocheilonema reconditum*, *Dipetalonema dracunculoides, Onchocherca lupi* und *Cercopithifilaria* sp. vor (Deplazes et al., 2012d). Im Folgenden wird aufgrund der Relevanz für die vorliegenden Arbeit nur *A. reconditum* kurz beschrieben.

A. reconditum kommt in Europa, Nord- und Südamerika, Asien und Australien vor (Deplazes et al., 2012d). Die Zwischenwirte bei dieser Filarienart sind vor allem Flöhe (*Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, *Pulex irritans*, *Pulex simulans*, *Echidnophaga gallinae*) und Läuse (*Heterodoxus spiniger*, *Linognathus setosus*), aber auch die braune Hundezecke *Rhipicephalus sanguineus*. Die Infestationsrate von Flöhen mit *A. reconditum* betrug in einer Studie 5 % (n = 152 Hunde) (Brianti et al., 2012). Endwirte sind neben Hunden sowohl Wildcaniden als auch der Mensch. *A. reconditum* wird als apathogen eingestuft und parasitiert wie *Dirofilaria spp.* in der Subkutis, aber auch in Körperhöhlen oder inneren Organen (Deplazes et al., 2012d). Die Vorgehensweise in der Diagnostik ist dieselbe wie für Dirofilarien, allerdings haben die Mf eine Länge von 220 - 280 µm und im Unterschied zu *D.*

immitis und *D. repens* zeigt sich in der histochemischen Färbung eine diffuse Lokalisation der sauren Phosphatase (Deplazes et al., 2012d). Adulte Weibchen sind circa 2,5 cm groß, die Männchen 1,5 cm (Taylor et al., 2007). Differenzialdiagnostisch sollte *A. reconditum* bei einer Infektion mit Filarien stets berücksichtigt werden.

2.2.2 *Anaplasma phagocytophilum*

2.2.2.1 Taxonomische Einordnung und Morphologie

Anaplasmen sind von Schildzecken übertragene, gram-negative, obligat intrazellulär parasitierende alpha-Proteobakterien aus der Familie der Anaplasmataceae, die zu der Ordnung Rickettsiales gehören (Dumler et al., 2001). Die Gattungen *Aegyptionella*, *Ehrlichia*, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, *Neorickettsia* und *Wolbachia* sind ebenfalls Teil der Anaplasmataceae (Bowman, 2011). In Europa kommen beim Hund *A. phagocytophilum* und *A. platys* vor (Deplazes et al., 2011). *A. phagocytophilum* infiziert vor allem neutrophile und eosinophile Granulozyten und *A. platys* Thrombozyten, sie bilden in ihnen vakuolenartige Einschlusskörperchen, die sog. Morulae (Rizzoli et al., 2014). Im Untersuchungsgebiet ist aus der Gattung *Anaplasma* nur *A. phagocytophilum* relevant, daher wird dieser Erreger detailliert beschrieben.

2.2.2.2 Wirtsspektrum und Vektoren

A. phagocytophilum kann ein großes Spektrum an Säugetieren infizieren, dazu gehören Schafe, Rinder, Pferde, Hunde, Katzen, Nager und Wildtiere, aber auch der Mensch (Deplazes et al., 2012c). Bei den Wildtieren sind unter anderem Füchse, Bären, Vögel und Rehe als Endwirte bekannt (Stuen et al., 2013). Die Übertragung auf den Endwirt findet über den Stich infizierter Schildzecken statt. In Europa ist *Ixodes ricinius* der Vektor, in den USA *Ixodes scapularis* sowie *Ixodes pacificus* und in Asien *Ixodes persulcatus* (Woldehiwet, 2010). In den Zecken werden die Bakterien transstadial, in Einzelfällen auch transovarial übertragen (Krücken et al., 2013). Die Saugdauer der Zecke beträgt circa 24 - 48 Stunden, bis *A. phagocytophilum* auf den Endwirt übertragen ist (des Vignes et al., 2001; Katavolos et al., 1998). Infiziertes Blut bei einer Transfusion stellt einen weiteren, wenn auch selteneren, Übertragungsweg dar (McQuiston et al., 2000; Sainz et al., 2015).

2.2.2.3 Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie

Die Infektion mit *A. phagocytophilum* wird bei Hunden als Canine Granulozytäre Anaplasmose (CGA) bezeichnet. Nach ein bis zwei Wochen Inkubationszeit (Egenvall et al., 1998) treten unspezifische Symptome wie Lethargie, Inappetenz, Lahmheit, Splenomegalie, Fieber, Vomitus oder Diarrhoe auf (Kohn et al., 2008). Blutbildveränderungen äußern sich vor allem in Thrombozytopenie, Anämie, Lymphopenie, Hypalbuminämie und erhöhten

Leberenzymen (Deplazes et al., 2011; Kohn et al., 2008). In experimentell infizierten Hunden konnte die Infektion unbehandelt über mehrere Monate persistieren (Egenvall et al., 2000). Die Diagnose kann direkt über den Nachweis von Morulae im Blutausstrich erfolgen, nicht immer werden diese jedoch beobachtet, wie eine Studie von Kohn et al. aus dem Jahr 2008 zeigte, in der nur bei 60 % der klinischen Fälle Morulae gefunden wurden. Ein steigender Antikörper-Titer bei wiederholter serologischer Untersuchung (im Abstand von 2 - 4 Wochen) mit einem Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder indirektem Immunfluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) stützt die Diagnose (Sainz et al., 2015). Eine einmalige Untersuchung ist jedoch nicht beweisend, da hohe Titer auch bei vergangenen, inzwischen ausgeheilten *A. phagocytophilum* Infektionen vorliegen können (Deplazes et al., 2011).

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine sensitivere Methode als eine mikroskopische Untersuchung und in der Regel beweisend für eine aktive Infektion (Sainz et al., 2015). Durch Entwicklung einer speziellen real-time-PCR ist es möglich, zeitgleich drei verschiedenen Gattungen, *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, zu detektieren (Krücken et al., 2013).

Die Therapie der Wahl erfolgt mit Doxycyclin (Antibitiokum aus der Gruppe der Tetrazykline) in der Regel über einen Zeitraum von 2 - 3 Wochen in der Dosis 2 × täglich 5 mg/kg KGW (Sainz et al., 2015).

2.2.2.4 Verbreitung und Epidemiologie

A. phagocytophilum wurde bisher in *I. ricinus* Zecken in über 30 Ländern europaweit nachgewiesen (Rizzoli et al., 2014), daher ist der gesamte Kontinent als Endemiegebiet zu betrachten (Deplazes et al., 2011). Die Prävalenz des Erregers in Zecken ist regional unterschiedlich, sie liegt europaweit mittels PCR-Nachweis zwischen 0,8 und 23,6 % (Pusterla et al., 1998; Skarphedinsson et al., 2007) und in Deutschland bei 1,6 - 6,5 % (Fingerle et al., 1999; Leonhard, 2005; Pichon et al., 2006; Schreiber et al., 2014).

Bei Hunden aus Deutschland wurde die Prävalenz von *A. phagocytophilum* ebenfalls durch PCR-Untersuchungen ermittelt, sie lag bei 5,7 % (n=522) (Kohn et al., 2011) bzw. 6,3 % (n=111) (Jensen et al., 2007b). Die Seroprävalenz war dagegen deutlich höher (43 %, n = 522, Kohn et al. 2011), da der Antikörper-Titer auch bei vergangener Infektion weiter hoch sein kann (Sainz et al., 2015).

In Rehen (*Capreolus capreolus*) aus Süddeutschland wurde mittels real-time PCR-Untersuchungen eine Prävalenz von 98,9 % (n=95) ermittelt (Overzier et al., 2013a). In Füchsen (*Vulpes vulpes*) und Marderhunden (*Nyctereutes procyonoides*) aus Brandenburg betrug sie 8,2 % (n=122) bzw. 23 % (n=13) und wurde ebenfalls mittels real-time PCR untersucht (Härtwig et al., 2014).

Die Prävalenz von *A. phagocytophilum* in Zecken aus dem Raum Berlin/Brandenburg wurde vor kurzem mit 6,5 % aus n= 744 in *I. ricinus* und 3,9 % aus n = 152 in *I. hexagonus* mittels PCR Untersuchung bestimmt (Schreiber et al., 2014), es sind jedoch keine aktuellen Daten zu Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in Hunden aus diesem Gebiet vorhanden.
In der vorliegenden Studie wurden Hundeblut- und Fuchsmilzproben aus Brandenburg auf *A. phagocytophilum* untersucht, um die epidemiologische Lage in dieser Region beurteilen zu können.

2.2.2.5 Zoonotisches Potenzial

Der Mensch kann sich über einen Zeckenstich mit *A. phagocytophilum* infizieren, das Krankheitsbild wird als Humane Granulozytäre Anaplasmose bezeichnet (HGA). Nach 1 - 2 Wochen Inkubationszeit treten unspezifische Symptome wie Unwohlsein, Fieber oder Rückenschmerzen auf (Fishbein et al., 1994). Hohe Infektionsraten werden insbesondere aus den USA berichtet, wo allein im Jahr 2009 1161 humane klinische Fälle von *A. phagocytophilum* Infektionen aufgetreten sind (MMWR, 2011). Die Seroprävalenz in Europa beträgt 1 - 20 % (Jin et al., 2012), klinische Fälle wurden in den letzten Jahren erstmals aus vielen verschiedenen Ländern berichtet, so zum Beispiel in Spanien (Oteo et al., 2000), Polen (Tylewska-Wierzbanowska et al., 2001), der Slowakei (Novakova et al., 2010) oder Österreich (Vogl et al., 2010). In einer Studie aus Brandenburg wurden bei 4 von 422 Patienten (0,95 %) in den Jahren 1994 - 2001 Antikörper gegen *A. phagocytophilum* nachgewiesen (Kowalski et al., 2006).

2.2.3 *Ehrlichia canis*

2.2.3.1 Taxonomische Einordnung und Morphologie

Ehrlichia canis ist ein gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium, das zusammen mit den Gattungen *Anaplasma*, *Aegyptionella*, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, *Neorickettsia* und *Wolbachiae* zur Familie der *Anaplasmataceae* gehört (Bowman, 2011). Weitere *Ehrlichia* Spezies sind *Candidatus* Ehrlichia shimanensis, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia ruminantium* und *Ehrlichia muris* (Rar and Golovljova, 2011). Die Bakterien haben einen Tropismus für hämatopoetische Zellen, vor allem für Lympho- und Monozyten (Skotarczak, 2003) und bilden in ihren Wirtszellen Einschlusskörperchen, die sog. Morulae. In Europa ist bisher nur die Spezies *E. canis* in Hunden beschrieben worden (Aguirre et al., 2004; Keysary et al., 1996).

2.2.3.2 Wirtsspektrum und Vektoren

Neben dem Hund sind *E. canis* Infektionen auch bei Rotfüchsen in Europa (Cardoso et al., 2015; Ebani et al., 2011) und bei der Katze beschrieben worden (Breitschwerdt et al., 2002).

Übertragen wird die Infektion durch einen Stich der Schildzecke *Rhipicephalus sanguineus*, die auch als braune Hundezecke bekannt ist. In einer Studie mit künstlich infizierten Hunden fand die Übertragung der Bakterien bereits nach drei Stunden Saugdauer der Zecken statt (Fourie et al., 2013). *R. sanguineus* kommt vor allem in mediterranen Regionen bis zu den Alpen vor, kann aber auch durch Reiseaktivität des Wirtes in Zwinger oder beheizten Wohnräume eingeschleppt werden und dort überleben (Sainz et al., 2015).

2.2.3.3 Klinisches Bild, Diagnostik und Therapie

Die Infektion wird beim Hund als canine monozytäre Ehrlichiose (CME) bezeichnet. Der Krankheitsverlauf lässt sich in drei Phasen einteilen: Nach einer ein- bis dreiwöchigen Inkubationszeit findet die akute Phase statt, hier treten unspezifische Symptome wie Fieber, Anorexie, Schwäche oder blasse Schleimhäute auf (Rolle and Mayr, 2007). Danach folgt die mehrwöchige subakute Phase ohne klinische Anzeichen, im Blutbild sind jedoch häufig Thrombozytopenie und Hypergammaglobulinämie nachweisbar (Deplazes et al., 2011). In der dritten, chronischen Phase kommt es unter anderem zu Blutungen in der Haut und den Schleimhäuten, Anämie, inneren Blutungen, Gewichtsverlust, Lymphknotenschwellungen und Ödemen. Die Diagnose und Therapie erfolgt wie bei *A. phagocytophilum* (siehe 2.2.2.2), allerdings sind im Gegensatz dazu bei *E. canis* nur in 4 - 6 % der klinischen Fälle auch Morulae im Blutausstrich zu finden, daher sollten Ausstriche vom sog. buffy-coat (einer Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten nach Zentrifugation des Blutes) angefertigt werden (Mylonakis et al., 2003).

2.2.3.4 Verbreitung und Epidemiologie

E. canis Infektionen treten bei Hunden in den verschiedensten Ländern Europas auf, darunter vor allem in mediterranen Regionen. So wurde mittels PCR-Untersuchungen in Hunden in Portugal eine Prävalenz von 22 % ermittelt (Alexandre et al., 2009), in Italien 6 % (Trotta et al., 2009) und in Spanien regional eine Prävalenz von 4 % (Tabar et al., 2009). In Deutschland sind *E. canis* Infektionen hingegen bisher nur als Reise- oder Importkrankheit bekannt, so lag die Seroprävalenz bei 4681 untersuchten Import- und Reisehunden aus Deutschland bei 10,1 % (Menn et al., 2010) und in einer weiteren Studie mit 772 beprobten Hunden mit Reise- oder Importvorgeschichte bei 3,1 % (Hamel et al., 2011).

In Wildtierpopulationen lag die Prävalenz in Rotfüchsen aus Sizilien bei 31 % (Torina et al., 2013), in Portugal bei 2,9 % (Cardoso et al., 2015), in Österreich und Italien konnte der Erreger hingegen nicht nachgewiesen werden (Duscher et al., 2014; Ebani et al., 2011). Aus Deutschland liegen bisher noch keine Nachweise für *E. canis* bei Rotfüchsen vor und sind auch nicht zu erwarten, da *R. sanguineus* hier nicht endemisch ist.

2.2.3.5 Zoonotisches Potenzial

E. canis wird nicht als Zoonoseerreger angesehen (Deplazes et al., 2011; Sainz et al., 2015).

2.2.4 *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis

Candidatus Neoehrlichia mikurensis wurde erstmals Ende der 90er Jahre in *I. ricinus* Zecken in den Niederlanden (Schouls et al., 1999), später in Italien (Sanogo et al., 2003), als auch in Wanderratten in China nachgewiesen (Pan et al., 2003) und nach weiteren Funden in I*xodes ovatus* und Wanderratten aus Japan als "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" benannt (Kawahara et al., 2004). Der Status "*Candidatus*" besteht, da das Bakterium bisher noch nicht *in vitro* kultiviert werden konnte (Rizzoli et al., 2014). Es ist ein gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium mit Tropismus zu endothelialen Zellen, das zusammen mit den Gattungen *Anaplasma*, *Aegyptianella*, *Neorickettsia* und *Wolbachia* zur Familie der *Anaplasmataceae* gehört (Bowman, 2011).

Das Wirtsspektrum umfasst neben kleinen Säugetieren (Mäuse, Ratten, Igel) auch Hunde und den Menschen. Das Vorkommen in anderen Widltieren wie Rotfüchsen wurde bisher nicht beschrieben. In Europa ist der Vektor von *Candidatus* N. mikurensis sehr wahrscheinlich die Schildzecke *I. ricinus* (Heyman et al., 2010), die Rolle von Nagetieren als Reservoirwirt ist noch nicht vollständig geklärt (Silaghi et al., 2012). In *I. ricinius* Zecken konnte der Erreger in den verschiedensten Ländern Europas nachgewiesen werden, so zum Beispiel in Italien mit einer Prävalenz von 10,5 % (Capelli et al., 2012), in Österreich mit einer Prävalenz von 4,2 % (Glatz et al., 2014), in Russland lag die Prävalenz bei 7,2 % (Alekseev et al., 2001) und in der Schweiz bei 6,4 % (Lommano et al., 2012). In Nagetieren in Deutschland, insbesondere bei Rötel- und Feldmäusen, wurden hohe Infektionsraten von bis zu 52,7 % mit *Candidatus* N. mikurensis detektiert (Silaghi et al., 2012). In Brandenburg wurde in kleinen Nagetieren eine durchschnittliche Prävalenz von 14,2 % ermittelt (Krücken et al., 2013) und in Hunde assozierten *I. ricinus* bzw. *I. hexagonus* Zecken aus Berlin und Brandenburg wurden Prävalenzen von 4,3 % bzw 5,9 % beschrieben (Schreiber et al., 2014).

Ein klinischer Fall von einer *Candidatus* N. mikurensis Infektion (auch als Neoehrlichiose bezeichnet) bei Hunden ist bisher einmalig und bei einem Hund in Deutschland mit Reisevorgeschichte beschrieben worden (Diniz et al., 2011). Zu seinen Symptomen gehörten eine leichte Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie und die Therapie erfolgte mit Doxycyclin.

Die Diagnose fand in dem Fallbeispiel über einen Erregernachweis in der PCR statt. Speziell entwickelte real-time PCR's bieten eine sehr sensitive Methode für den Erregernachweis (Krücken et al., 2013), die in der Regel beweisend für eine aktuelle Infektion sind.

Beim Menschen sind in Europa in den vergangen Jahren diverse Fälle mit *Candidatus* N. mikurensis vorgekommen, beispielsweise in der Tschechischen Republik (Pekova et al., 2011) in Schweden (Welinder-Olsson et al., 2010) und in Deutschland (von Loewenich et al., 2010). Das Krankheitsbild bei diesen Patienten war durch unspezifische Symptome wie Fieber, Septikämie, Unwohlsein und Gewichtsverlust gekennzeichnet.

Candidatus N. mikurensis wird als "emerging pathogen" (neu auftretende Krankheit) angesehen (Rizzoli et al., 2014), daher sind weitere Untersuchungen zu der Verbreitung und potenziellen Reservoirwirten unbedingt notwendig.

2.2.5 *Rickettsia* spp.

Rickettsien sind gram-negative, obligat intrazelluläre Bakterien, die frei im Cytosol ihrer Wirtszellen leben (Raoult and Roux, 1997). Sie gehören zu der Familie Rickettsiaceae und der Ordnung Rickettsiales. Bei den Rickettsien kann zwischen Vertretern der Typhus-Gruppe, der Spotted Fever-Gruppe, der *Rickettsia bellii* Gruppe und der *Rickettsia canadensis* Gruppe unterschieden werden (Parola et al., 2013). *Rickettsia* spp. der Spotted-Fever Gruppe werden durch einen Stich von Schildzecken übertragen, mit Ausnahme von *R. akari* (übertragen durch Milben) und *R. felis* (übertragen durch Flöhe) (Rizzoli et al., 2014). Weltweit sind über 26 verschiedene *Rickettsia* Spezies bekannt (Parte, 2014), und in Deutschland wurden in durchgeführten Untersuchungen vor allem Vertreter der Spotted-Fever Gruppe (*R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. felis* und *R. massilae*) aus Schildzecken nachgewiesen (Dobler and Wolfel, 2009; Overzier et al., 2013b; Pluta et al., 2010; Silaghi et al., 2008). In einer Studie aus der Region Berlin/Brandenburg konnten *Rickettsia* spp. in 61 % der von Hunden abgesammelten und untersuchten *I. ricinus* Zecken (n = 205), in 41 % der *I. hexagonus* Zecken (n = 151) und in 39,3 % der *D. reticulatus* Zecken nachgewiesen werden, darunter waren *R. helvetica, R. raoultii* und *R. monacensis* (Schreiber et al., 2014). In Deutschland gibt es bisher nur eine Veröffentlichung zum Vorkommen von *Rickettsia* spp. bei Hunden, dort wurden bei 77,9 % von 602 untersuchten Blutproben Antikörper gegen Rickettsien aus der Spotted-Fever Gruppe nachgewiesen (Wächter et al., 2015). Bisher sind keine Informationen zum Vorkommen von *Rickettsia* spp. in Füchsen in Deutschland bekannt.

Rickettsia spp. sind Zoonoseerreger, in Europa treten beim Menschen abhängig von der jeweiligen Erregerspezies vor allem drei verschiedene Krankheitsbilder auf (Oteo and Portillo, 2012): 1. das mediterarean Spotted Fever (MSF), ausgelöst durch *R. conorii conorii* und weitere 2. tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA)/ *Dermacentor*-borne necrosis erythema lymphadenopathy (DEBONEL), verursacht durch *R. slovaca*, *R. raoultii*, *R. rioja* und 3. Lymphangitis-associated rickettioses (LAR), der Erreger ist hier *R. sibirica*

mongolitimonae. Auch *R. helvetica* und *R. monacensis* haben eine Humanpathogenität, das Krankheitsbild ist jedoch uneinheitlich (Jado et al., 2007; Nilsson, 2009; Nilsson et al., 1999).
Die Diagnose von *Rickettsia* spp. Infektionen erfolgt in der Regel über serologische Untersuchungen, jedoch sind Antikörper häufig nicht vor der zweiten Woche *post infectionem* nachweisbar und ein hoher Titer kann auch für eine vergangene Erkrankung sprechen (Boretti et al., 2009). Die PCR Untersuchung stellt eine sehr sensitive Untersuchungsmethode durch den direkten Erregernachweis dar (Stenos et al., 2005).

2.2.6 Piroplasmen

Piroplasmen sind einzellige Mikroorganismen und stellen die wichtigsten Blutparasiten der Haussäugtiere dar (Deplazes et al., 2012b; Homer et al., 2000). Der Ordnung Piroplasmida gehören die Familien Babesiidae und Theileriidae an und die Gattung *Babesia* ist Teil der Familie Babesiidae. Vektoren für die Übertragung von *Babesia* spp. sind Schildzecken. Dabei finden nach der Erregeraufnahme sowohl sexuelle und asexuelle Vemehrungsstadien im Darmlumen und der Speicheldrüse der Zecke und nach Übertragung auf den Endwirt eine asexuelle Vemehrung in den Erythrozyten des Endwirtes statt (Deplazes et al., 2012b). In der Zecke ist neben der transstadialen Übertragung (Larve → Nymphe → Adulte) auch die transovarielle Übertragung (Befall von Ovar und Eiern weiblicher Zecken) möglich (Deplazes et al., 2012b). In den Erythrozyten des Endwirtes bilden die Erreger tropfen- oder birnenförmige Stadien, die sog. Merozoiten.
Babesia spp. sind Zoonoseerreger. In Europa sind bisher circa 50 humane Fälle beschrieben, der Erreger ist hier hauptsächlich *B. divergens*, aber auch Infektionen mit *B. venatorum* und ein Fall mit *B. microti* sind beschrieben worden (Haselbarth et al., 2007; Herwaldt et al., 2003; Hildebrandt et al., 2007; Rizzoli et al., 2014).
In Europa sind für den Hund und andere Caniden die Erreger *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni* und *Babesia microti*-like (*Theileria annae*) relevant (Matijatko et al., 2012).
B. canis canis wird von der Schildzeckenspezies *D. reticulatus* übertragen, die geographische Verbreitung erstreckt sich von Zentral- und Südeuropa bis zum Baltikum (Adaszek and Winiarczyk, 2008; Beck et al., 2009; Cardoso et al., 2008; Foldvari et al., 2005). In Deutschland kommen regional endemische Herde mit *D. reticulatus* im Saarland, Rheinland-Pfalz, Mark Brandenburg und Oberrheingraben vor, daher sind in diesen Gebieten autochthone *Babesia* Infektionen möglich (Deplazes et al., 2012b; Gothe and Wegerdt, 1991). In einer Studie bei Reise- und Importhunden aus Deutschland lag die untersuchte Seroprävalenz mittels IFAT-Test von *B. canis* bei 4,9 % (Hamel et al., 2011) und in einer Fragebogen-basierten Studie zum Vorkommen von klinischer Babesiose bei Hunden wurde für Deutschland im Saarland in Abhängigkeit von der Hundepopulation eine jährliche

Inzidenz von 0,3 % ermittelt (Halos et al., 2014). In Berlin und Brandenburg wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie eine Prävalenz von *Babesia* spp. mit 2,5 % in *I. ricininus* (n = 200), 3 % in *I. hexagonus* (n = 100) und 0 % in *D. reticulatus* (n = 197) nachgewiesen (Schreiber et al., 2014). Der Erreger verursacht eine hämolytische Anämie und es kann zum hypotensiven Schock, blassen Schleimhäuten, Tachykardie, Fieber, Schwäche bis hin zu einem Multiorganversagen mit Koma (Systemic Inflammation Response Syndrom) oder tödlichem Ausgang kommen (Taylor et al., 2007; Welzl et al., 2001).

B. canis vogeli wird von *R. sanguineues* übertragen und kommt in Europa vor allem in den mediterranen Regionen (südliches Frankreich und Italien, Spanien, Portugal, Griechenland) vor (Halos et al., 2014). In der Regel verläuft die Infektion milder und es treten eine leichte Anämie oder Fieber auf (Irwin, 2009).

Vektoren von *B. gibsoni* sind *Haemaphysalis spp*. und *Dermacentor spp.*, der Erreger ist endemisch in Asien, Teilen von Afrika sowie Nordamerika und Südeuropa. Die erste Infektion bei Hunden in Deutschland wurde im Jahr 2007 beschrieben (Hartelt et al., 2007). Die Hunde zeigten Fieber, Splenomegalie, eine hämolytische Anämie und Hämoglobinurie.

In den letzten Jahren häufen sich Berichte zum Vorkommen von einer neuen, "*B. microti* - like" Spezies in Hunden und Füchsen in Europa (Camacho et al., 2001; Farkas et al., 2015; Najm et al., 2014; Simoes et al., 2011). Erstmals wurde diese Spezies im Jahr 2000 bei Hunden in Deutschland beschrieben und erhielt die Bezeichnung "*Theileria annae*" (Zahler et al., 2000). Diese Spezies besitzt phylogenetische Ähnlichkeit mit der Spezies *B. microti*, einem Erreger der unter anderem von *I. ricinus* übertragen wird und vor allem kleine Nagetiere infiziert (Deplazes et al., 2012b; Gray et al., 2002). Kürzlich wurde von Wissenschaftlern die Reklassifizierung als "*Babesia vulpes sp. nov*." folgend dem Namen des natürlichen Wirtes dieses Erregers, dem Rotfuchs (*Vulpes vulpes*), aufgrund der phylogenetischen Abgrenzung zu Theilerien gefordert (Baneth et al., 2015). In Deutschland wurde in Rotfüchsen aus Thüringen eine Prävalenz von 46,4 % (n=261) mit *Babesia* spp. ermittelt, die Sequenzierungsergebnisse von 44 positiven Proben ergaben 100 % Übereinstimmung mit *Theileria annae* (Najm et al., 2014). In Brandenburg gibt es keine aktuellen Daten zum Vorkommen von *Babesia* spp. bei Hunden und Füchsen.

Die Diagnose der Babesiose erfolgt entweder über einen direkten Erregernachweis im Blutausstrich (Giemsa- oder Diff-Quik-Färbung), serologische Untersuchung oder mittels PCR. Die PCR ist sensitiver als die mikroskopische Untersuchung (Deplazes et al., 2011) und ermöglicht zusätzlich eine Speziesdifferenzierung mit Bedeutung für die Therapie und Prognose.

Eine *B. canis* Infektion bei Hunden wird in der Regel mit Imidocarb-Dipropionat (Dosierung 5-6 mg/kg i.m oder s.c.) behandelt. Weitere Therapeutika sind Doxycyclin,

Phenamidinisothionat und Pentamidin, die wirksam gegen Infektion mit *B. gibsoni* und *T. annae* sind (Deplazes et al., 2011).

3. Material und Methoden

3.1 Aufbau der Studie

Im Zeitraum von 2 Jahren sollten ab März 2013 insgesamt 1000 EDTA-Blutproben von Hunden aus dem Landkreis Havelland in Brandenburg sowie 200 Blut- und Milzproben von Füchsen aus dem Bundesland Brandenburg auf das Vorkommen der Erreger *Anaplasma* spp.*, Babesia* spp.*, Ehrlichia* spp., *Candidatus* N. mikurensis, *Dirofilaria* spp. und *Rickettsia* spp. untersucht werden. Da trotz intensiver Rechercheaktivitäten bis Ende September 2013 nur 123 Proben eingegangen waren, wurde - um das gesetzte Ziel von 1000 Proben in 2 Jahren erreichen zu können - das Sammelgebiet für die Hundeblutproben ab Oktober 2013 auf das gesamte Bundesland Brandenburg ausgedehnt.

Die Fuchsblutproben wurden auf *Babesia* spp. und *Dirofilaria* spp. und die Fuchsmilzproben auf *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Candidatus* N. mikurensis und *Rickettsia* spp. untersucht. Alle Informationen zu den Patienten und die Untersuchungsergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle dokumentiert. Befunde wurden zeitnah an die Tierarztpraxen gesendet. Von sämtlichen Proben wurde zunächst die DNA isoliert und im Anschluss eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Daran schlossen sich weiterführende Untersuchungen an.

3.1.1 Standortwahl

In den Jahren 2007 und 2012 wurden im Havelland in Brandenburg in einem Schlittenhunderudel Infektionen mit *D. repens* festgestellt (Sassnau et al., 2013b). Da sich die Schlittenhunde nur in den Wintermonaten vorübergehend in Endemiegebieten von *D. repens* aufhielten, wurde eine autochthone Infektion vermutet. In Deutschland wurde von einer autochthonen Infektion eines Hundes bisher nur in Süddeutschland berichtet (Hermosilla et al., 2006). Um das endemische Vorkommen von *D. repens* und Prävalenzen anderer Vektor-übertragener Erreger näher zu untersuchen, wurde zunächst der Landkreis Havelland und ab Herbst 2013 das gesamte Bundesland Brandenburg als Untersuchungsgebiet gewählt. Das Bundesland gliedert sich in 14 Landkreise und 4 kreisfreie Städte (Abbildung 2).

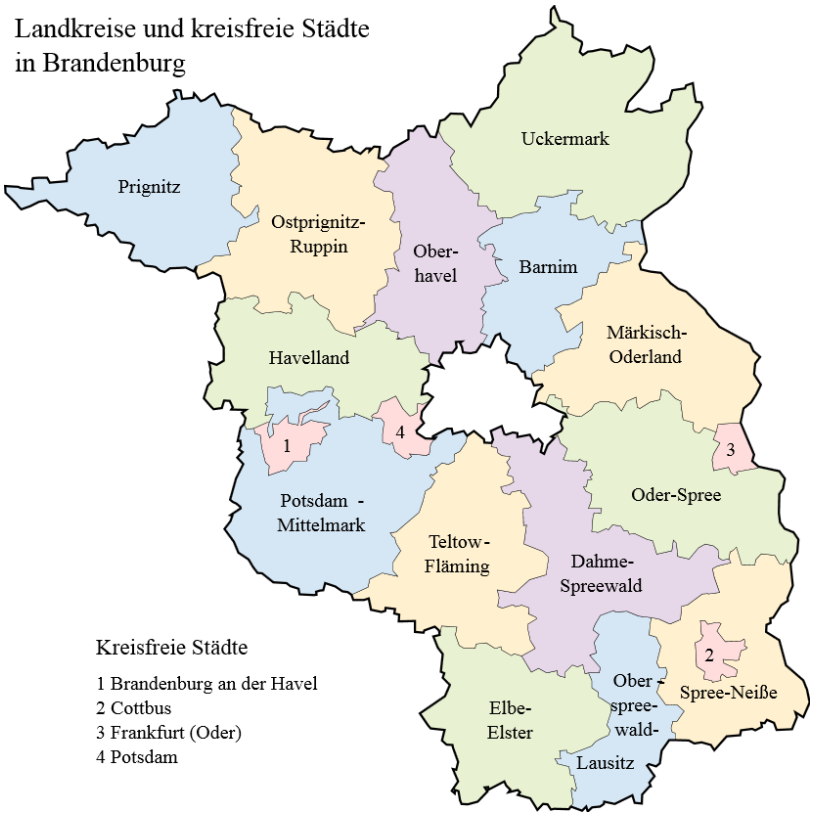

Abbildung 2: Landkreise und kreisfreie Städte in Brandenburg (Copyright © NordNordWest)

3.1.2 Probengewinnung und –lagerung

Die Sammlung der Hundeblutproben verlief in Kooperation mit den im Havelland ansässigen Kleintierpraxen. Hierfür wurde zunächst telefonisch der Kontakt zu den Praxen hergestellt, um sie über die Studie und eine mögliche Teilnahme zu informieren. Bei den Blutproben handelte es sich um Proben, die für andere, z. B. diagnostische Zwecke zuvor von den Tierärzten bei den Hunden entnommen wurden oder um Aliquots dieser Proben. Ebenfalls wurden Fragebögen für die Patientenbesitzer zum Ausfüllen und Informationsbroschüren zum Auslegen im Wartezimmer an die Praxen geschickt. Die Proben wurden zusammen mit den ausgefüllten Fragebögen gesammelt abgeholt oder an das Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin geschickt.

Nach der Ausweitung des Sammelgebietes im Herbst 2013 wurden weitere Kleintierpraxen kontaktiert sowie EDTA-Blutproben von Hunden aus Brandenburg, die Patienten der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität waren, gesammelt. Diese Proben waren ebenfalls zuvor für diagnostische Zwecke entnommen worden und standen im Anschluss für die Untersuchungen dieser Studie zur Verfügung. Zudem begann im Dezember 2013 eine Kooperation mit der Firma LABOKLIN (Bad Kissingen). Tierarztpraxen aus Brandenburg, die zuvor eine Einverständniserklärung unterschrieben hatten, konnten eingeschickte EDTA-Hundeblutproben an LABOKLIN nach Abschluss der dortigen Untersuchungen dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin überlassen, um es hier auf die oben genannten

Erreger untersuchen zu lassen. Diese Proben wurden anschließend von der Firma LABOKLIN an das Institut gesendet. Die Sammlung der Hundeblutproben endete im September 2014.

Die Blut- und Milzproben von Füchsen stellte Herr Dr. Schulze aus dem Landeslabor Berlin-Brandenburg in Frankfurt (Oder) zur Verfügung. Die Proben stammten von erlegten oder verunfallten Füchsen aus dem Zeitraum Februar bis einschließlich September 2014. Alle Proben wurden direkt nach dem Eingang am hiesigen Institut fortlaufend nummeriert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

3.1.3 Fragebogen für Patientenbesitzer

Der Fragebogen für die Patientenbesitzer ist im Anhang angefügt. Ziel war es, Informationen über das Lebensumfeld, die Reisegewohnheiten und mögliche medizinische Vorbehandlungen der Hunde zu erhalten. Dabei war es von besonderem Interesse, ob die Hunde jemals Brandenburg verlassen hatten, um mögliche autochthone Infektionen zu identifizieren. Aufgrund der datenschutzrechtlichen Bestimmungen konnten hingegen die Fragebögen der Proben von LABOKLIN und der Klinik für kleine Haustiere nur mit folgenden Angaben ausgefüllt werden: Name des Hundes, Geschlecht, Alter, Wohnort oder Sitz der Praxis. Alle Daten aus der vorliegenden Arbeit wurden anonymisiert behandelt.

3.2 Material

3.2.1 Chemikalien

Tabelle 4: verwendete Chemikalien in dieser Arbeit

Name	Hersteller
Agar-Agar Kobe I Pulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bacillol® AF Desinfektion	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol reinst. ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Formaldehydlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KgaA, Darmstadt
Glycerin ROTIPURAN® ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LB-Medium (Luria/Müller)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LE Agarose Pulver	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Leucognost® SP Kit	Merck KgaA, Darmstadt
Methanol 100 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid-Plätzchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Puffertabletten (Puffer nach WEISE)	Merck KgaA, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-acetat PUFFERAN®, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

3.2.2 Einwegartikel

Tabelle 5: verwendete Einwegartikel in dieser Arbeit

Name	Hersteller
Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
BZO Seal Film, Adhesive Optical Film	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Deckgläser 22 × 22 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Falcons 50 ml	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
NitriCare® Handschuhe Nitril Größe S	Showa Best Glove S.A.S., Frankreich
Objektträger 76 × 26 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PARAFILM® M	Bemis Company, Inc., Neenah, USA
PCR 96-well TW-MT-Platte, weiß	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
PCR SingleCap 8er – Softstrips 0,2 ml, farblos, dorned cap	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Petrischalen Ø 9 cm	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 5 ml, Typ Eppend.	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Rotilabo® Sterilindikatorband für Dampfsterilisation	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
rotiprotect® Handschuhe Latex Größe S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SafeSeal Gefäße 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Skalpellklingen	Henry Schein Inc., Melville, USA
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG + Co., Nümbrecht
Tissue Box Zellstofftücher	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

3.2.3 Enzyme

Tabelle 6: verwendete Enzyme in dieser Arbeit

Name	Hersteller
*Eco*RI 10 U/µl Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase 5 U/µl	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase 2 U/µl	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
*Vsp*I (*Ase*I) 10 U/µl Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA

3.2.4 Geräte

Tabelle 7: verwendete Geräte in dieser Arbeit

Name	Hersteller
ALC-1100.2 Waage	Acculab, Sartorius AG, Göttingen
Anxiostar plus Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Biofuge 13 Zentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau
Biofuge pico Zentrifuge	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau
C1000™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Digital Graphic UP-D807 Drucker	Sony Corporation, Tokio, Japan
Elektrolux Kühlschrank	Elektrolux AB, Stockholm, Schweden
Epoch BioTek® Instrument	BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA
Eppendorf Research Pipetten 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl und 500 - 5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Forma 900 Series Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Gasprofi 1 micro Bunsenbrenner	WLD-TEC, Arenhausen
G:Box Geldokumentation	SynGene Europe, Cambridge, UK
HI208 Educational pH-Meter	Hanna® Instruments, Woonsocket, USA
IKA® COMBIMAG RCT Magnetrührer	IKA® Works, Inc.,Wilmington, USA
IKA® Vortex Genius 3 Vortexer	IKA® Works, Inc.,Wilmington, USA
LABOKLAV Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
LIEBHERR Gefrierschrank	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
LIEBHERR Kühlschrank	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Max Q 6000 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Maxwell® 16 Research Instrument	Promega Corporation, Madison, USA
Mikrowellengerät	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
PCR Chamber Laborwerkbank mit UV-Licht	PLAS Labs, Inc., Lansing, USA
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH + Co. KG, Eberstadt
Power-Pac™ Universal Power-Supply Netzbetrieb	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
ScanLaf Mars Safety Class 2 Sterilbank	LaboGene Aps, Lynge, Dänemark
Scotsman® AF 100 Flockeneisbereiter	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
SpeedMill Plus Homogenisator	Analytik Jena AG, Jena
Take 3™ Multi-Volume Plate	BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA
TMix Thermomixer	Analytik Jena AG, Jena
Wide Mini-Sub® Cell GT Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
WNE 45 Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach

3.2.5 Lösungen, Puffer und weitere Flüssigkeiten

Tabelle 8: verwendete Lösungen, Puffer und weitere Flüssigkeiten in dieser Arbeit

Name	Hersteller
Aqua bidest – doppelt destilliertes H_2O aus dem TKA-Genpure Reinstwassersystem	Jens Löwe Wasseraufbereitung und Reinigungssysteme, Berlin
DEPC – behandeltes Wasser, Bioscience-Grade, Nuklease frei und autoklaviert	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
dNTP Mix, 10 mM	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
5 × Phusion HF Puffer	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
50 × TAE Puffer	Eigene Herstellung
$MgCl_2$, 25 mM	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
Roti® Nukleinsäurefrei Spray	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
6 × Loading Dye	Eigene Herstellung
10 × Maxima Hot Start Puffer	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
10 × Puffer *Eco*RI mit BSA	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
10 × Puffer O mit BSA 10 U/µl	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
10 × Hot Start PCR Puffer	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
1× PBS Lösung	Eigene Herstellung

3.2.6 Marker

Tabelle 9: verwendete Marker in dieser Arbeit

Name	Hersteller
GeneRuler™ 100 bp Marker	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
GeneRuler™ 50 bp Marker	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
GeneRuler™ 1 kb Marker	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
λ *Eco*RI/HindIII Marker	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA
GR Green Nucleic Acid Stain 10.000 × stock	LABGENE Scientific, Châtel-St-Denis, Schweiz
EvaGreen® Fluorescent DNA Stain 50 × conc.	Biotium, Inc., Hayward, USA

3.2.7 Reaktionskits

Tabelle 10: verwendete Reaktionskits in dieser Arbeit

Name	Hersteller
DNA Clean & Concentrator™-5	ZYMO RESEARCH CORP., Irvine, USA
EasyPrep Pro Plasmid Miniprep Kit	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
innuPREP Blood DNA Mini Kit	Analytik Jena AG, Jena
innuSPEED Tissue DNA Kit	Analytik Jena AG, Jena
Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit	Promega Corporation, Madison, USA
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen™ by Life technologies™, Carlsbad, USA
StrataClone Blunt PCR Cloning Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Zero Blunt® TOPO® PCR Kloning Kit	Invitrogen™ by life technologies™, Carlsbad, USA
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	ZYMO RESEARCH CORP., Irvine, USA

3.2.8 Software

Tabelle 11: verwendete Software aus dieser Studie

Name	Hersteller
BLAST Software	(Altschul et al., 1990) National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
Bio-Rad CFX Manager 2.0	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Bio-Rad Precision Melt Analysis™ 1.0	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Endnote X5	Thomson Reuters, New York, USA
Gen5™ Datenanalyse	BioTek® Instruments, Inc.,Winooski, USA
GeneSnap Version 7.09.06	SynGene Europe, Cambridge, UK
IBM SPSS Statistics 20	IBM® Corporation, Armonk, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Open Epi Statistikprogramm Version 3.03 www.OpenEpi.com	Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version. (Sullivan et al., 2009)

3.2.9 Weitere Laborartikel

Tabelle 12: weitere Laborartikel in dieser Arbeit

Name	Hersteller
Chemikalienlöffel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Drigalski Spatel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Gelschlitten, Gießstände und Gelkämme	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Laborglasflaschen 500ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnetrührstäbe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand	Promega Corporation, Madison, USA
Reagenzgläser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäßhalter	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG + Co, Nümbrecht
Trichter aus Kunststoff	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
UV- Gesichtsschutzvisier	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Weithals-Erlenmeyerkolben 25ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wiegeschälchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

3.2.10 Herstellung von Lösungen, Puffern und Reagenzien

3.2.10.1 50 × TAE Puffer

Hierfür wurden 242 g Tris-Puffer über einen Trichter in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben überführt. Um das 500 mM EDTA Dinatriumsalz Dihydrat herzustellen, wurden 186,1 g EDTA auf 800 ml Aqua bidest in einem Erlenmeyerkolben aufgefüllt und Natriumhydroxid-Plätzchen hinzugefügt, bis ein pH-Wert von 8,0 erreicht war. Anschließend wurden 100 ml 500 mM EDTA in den Erlenmeyerkolben hinzugefügt. Darauf folgten 57,1 ml Essigsäure, und das Gemisch wurde auf 1000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt. Vor Benutzung wurde der Puffer 1:50 mit Aqua bidest verdünnt.

3.2.10.2 100 bp, 1 kb und λ*Eco*RI/HindIII Marker

94 µl Aqua bidest wurden mit 20 µl Loading Dye × 6 und 6 µl des jeweiligen Markers zusammen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit einem Vortexer vermischt.

3.2.10.3 LB-Agar

10 g Agar-Agar Pulver wurden mit 12,5 g LB-Medium auf 500 ml Aqua bidest in einer Laborglasflasche aufgefüllt und diese anschließend autoklaviert.

3.2.10.4 6 × Loading Dye

60 ml 100 % Glycerin wurden mit 1 ml 3 % Bromphenolblau sowie 10 ml Tris-Puffer (pH-Wert 7,6) in einen Erlenmeyerkolben gegeben, auf 100 ml mit Aqua bidest aufgefüllt und mit dem

Magnetrührer vermischt, bis das Gemisch homogen war. Anschließend wurde der Loading Dye in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert.

3.2.10.5 Einfache Phosphatgepufferte Salzlösung (1 × PBS)

Es wurden 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 und 0,24 g KH_2PO_4 abgewogen und in einen Erlenmeyerkolben überführt, der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und der Erlenmeyerkolben mit Aqua bidest auf 1 Liter aufgefüllt.

3.3. Methoden

3.3.1 DNA Isolation

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

3.3.1.1 DNA Isolation aus Blutproben mit Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit

Die verwendeten Reagenzien aus dem Extraktionskit wurden gemäß den Angaben aus dem Benutzerhandbuch des Herstellers vorbereitet und aufbewahrt. Mit dieser Methode wurden die ersten 175 Hundeblutproben aus dieser Arbeit bearbeitet.

Zunächst wurden die EDTA-Blutproben aus dem - 20 °C Gefrierschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut, bis das Blut vollständig flüssig war. In der Zwischenzeit wurde der Heizblock auf 56 °C vorgeheizt. Das Blut wurde im Anschluss mit einem Vortexer für mindestens 5 min gemischt, um mögliche Verklumpungen zu lösen und vorhandene Mikrofilarien vom Bodensatz aufzuwirbeln. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden danach 300 µl Lysepuffer (aus dem Reaktionskit), 300 µl EDTA-Blut und 30 µl Proteinase K (aus dem Reaktionskit) pipettiert. Das Gefäß wurde verschlossen und für 10 s mit dem Vortexer gemischt. Nun erfolgte die Inkubation der Proben im Heizblock bei 56 °C für 20 min. In der Zwischenzeit wurde die Arbeitsplattform aus dem Maxwell® 16 Research Instrument für die nachfolgende automatische Isolation vorbereitet. Hierfür wurden vorgefertigte Kartuschen (aus dem Reaktionskit) mit den darin enthaltenen Waschpuffern in die Arbeitsplattform eingesetzt und die Schutzfolie abgezogen. Die Kartuschen enthielten insgesamt 8 Wannen. In Wanne 1 war der Bindungspuffer, in denen das Probengemisch pipettiert wurde. In Wanne 2 befanden sich paramagnetische Zellulosepartikel. Die Wannen 3 bis 7 dienten für die einzelnen Waschschritte und in Wanne 8 wurde vor Beginn der Isolation ein Kunststoffkolben zum Schutz der Magnetstäbe des Automaten eingebracht. Weiter wurden 0,5 ml

Reaktionsgefäße in die dafür vorgesehene Position auf der Plattform gesetzt und mit 50 µl Elutionspuffer (aus dem Reaktionskit) gefüllt. Die Deckel der Gefäße wurden entsprechend den Nummern der Blutproben beschriftet und blieben während der Isolation im Automaten geöffnet, da dort die extrahierte DNA hinein eluiert wurde.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde das lysierte Probengemisch in Wanne 1 einer Kartusche pipettiert. Pro Isolationsvorgang konnten bis zu 16 Proben in folglich 16 Kartuschen bearbeitet werden. Das Maxwell® 16 Research Instrument wurde eingeschaltet, die mit Kartuschen und Reaktionsgefäßen befüllte Arbeitsplattform aktiviert und das Programm „Run“ → „DNA“ → „Blood“ gestartet. Nach Ende des Programms wurden die Kartuschen und die Schutzkolben aus der Plattform entfernt und einer sachgerechten Entsorgung zugeführt. Die 0,5 ml Reaktionsgefäße mit der fertig isolierten DNA wurden aus der Plattform entnommen und verbliebene Magnetpartikel mithilfe des MagneSphere® Trennstandes entfernt: Hierzu wurde die extrahierte DNA in den Elutionsgefäßen in den Stand gestellt. Die Magnetpartikel wanderten daraufhin an den Innenrand der Gefäße und die partikelfreie DNA konnte vorsichtig abpipettiert und in neue, beschriftete 0,5 ml Reaktiongefäße überführt werden. Bis zur weiteren Verwendung lagerte die DNA bei –20 °C.

3.3.1.2 DNA Isolation aus Blutproben mittels innuPREP Blood DNA mini Kit

Alle weiteren Blutproben von Hunden und Füchsen aus dieser Arbeit wurden mit dem innuPREP Blood DNA mini Kit bearbeitet. Bei der Isolation mit dem Maxwell® 16 konnten die paramagnetischen Zellulosepartikel in der extrahierten DNA trotz Trennstand teilweise nicht vollständig entfernt werden, was Messfehler bei der Prüfung von Quantität und Qualität der DNA verursachte. Zudem waren teilweise Hämoglobinreste in der extrahierten DNA bei Verwendung von älteren Blutproben vorhanden. Dies begründete den Wechsel auf das innuPREP Blood DNA mini Kit für alle weiteren Blutproben. Die verwendeten Reagenzien dieses Extraktionskits wurden gemäß den Angaben aus dem Benutzerhandbuch vorbereitet und aufbewahrt.

Die Blutproben wurden aus dem -20 °C Gefrierschrank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut, bis das Blut vollständig flüssig war. Anschließend wurde das Blut für mindestens 5 min mit dem Vortexer gemischt, um Verklumpungen zu lösen und vorhandene Mikrofilarien vom Bodensatz aufzuwirbeln. Der Heizblock wurde auf 60 °C gestellt und eine bestimmte Menge des Elutionspuffers (aus dem Reaktionskit), abhängig von der Probenanzahl, auf 60 °C erwärmt. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 200 µl SLS Lösung (aus dem Reaktionskit), 100 µl EDTA Blut, 100 µl 1 × PBS Lösung und 20 µl Proteinase K (aus dem Reaktionskit) pipettiert. Laut Herstellerangaben sollen 200 µl Blut verwendet werden, was aber in dieser Arbeit bei älteren Blutproben zu einer Verstopfung der Filtersäule führte. Daher wurde in Rücksprache mit dem Hersteller das Protokoll auf 100 µl Blut und 100 µl 1 ×

PBS Lösung festgelegt. Das Probengemisch wurde 10 s mit dem Vortexer gemischt und bei 60 °C und 300 rpm für 15 min im Heizblock inkubiert. Anschließend folgte die Bindung der DNA auf der Filtersäule. Hierfür wurden 350 µl Bindungslösung (aus dem Reaktionskit) zu dem Probengemisch hinzugefügt und durch wiederholtes Aufziehen und Ablassen mit der Pipette vermengt. Als nächstes wurde das gesamte Volumen auf eine Filtersäule in einem 2 ml Auffanggefäß gegeben. Es folgte die Zentrifugation der Probe für 1 min bei 11.000 × g. Der Überstand wurde verworfen und die Filtersäule auf ein neues 2 ml Auffanggefäß gesteckt. Für den ersten Waschschritt wurden 400 µl Waschlösung C (aus dem Reaktionskit) auf die Filtersäule gegeben und diese anschließend erneut für 1 min bei 11.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und ein neues Auffanggefäß für die Filtersäule bereitgestellt. Nun folgte der zweite Waschvorgang mit 600 µl Waschlösung BS (aus dem Reaktionskit). Die beladene Filtersäule im Auffanggefäß wurde erneut bei 11.000 × g für 1 min zentrifugiert. Um Ethanolreste aus den vorherigen Waschschritten zu entfernen, schloss sich eine Zentrifugation der Filtersäule in einem neuen Auffgangefäß für 3 min bei maximaler Zentrifugengeschwindigkeit an. Daraufhin wurde die Filtersäule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und mit 50 µl des auf 60 °C vorgewärmten Elutionspuffers beladen. Es folgte eine abschließende Zentrifugation für 1 Minute bei 8.000 × g, die Filtersäule wurde verworfen und die DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei -20 °C eingefroren.

3.3.1.3 DNA Isolation aus Fuchsmilzproben mit innuSPEED Tissue DNA Kit

Bei dieser Methode fand zunächst eine mechanische Zerkleinerung des Zielgewebes statt, gefolgt von der eigentlichen DNA Extraktion. Diese Methode wurde für die Isolation von DNA aus Fuchsmilzproben angewendet.

Die Milzproben wurden aus dem -20 °C Gefrierschrank entnommen und jeweils bis zu 50 mg (circa 5 mm × 5 mm × 5 mm Quader) Milz mit einer Skalpellklinge kleingeschnitten und in beschriftete Lysisröhrchen Typ P (aus dem Reaktionskit) gegeben. Die Lysisröhrchen enthielten spezielle Kügelchen, welche im Homogenisator hochbeschleunigt wurden, so dass das mit im Röhrchen enthaltene Gewebe zerkleinert wurde. Der Heizblock wurde auf 50 °C eingestellt und die Reagenzien aus dem Extraktionskit gemäß Benutzerhandbuch des Herstellers vorbereitet. Nachdem 50 µl DEPC-Wasser in die Lysisröhrchen hinzugefügt wurden, wurden diese in den Probenhalter des SpeedMillPLUS Homogenisators eingesetzt und der Deckel verschlossen. Nach Einschalten des Gerätes wurde im Menü das Programm „Quick Mode“ gewählt, die Homogenisierungszeit auf 30 s gestellt und gestartet. Nach Ende des Programms wurde überprüft, ob noch unzerkleinerte Milzstückchen vorhanden waren. Gegebenenfalls wurde die Homogenisierung wiederholt. Im Anschluss an diesen Schritt folgte die Lyse der Gewebezellen. Hierzu wurden 250 µl TLS Lösung und 25 µl Proteinase K (beides aus dem Reaktionskit) in die Lysisröhrchen hinzu pipettiert und für 10 s mit dem

Vortexer gemischt. Daran schloss sich eine Inkubationszeit von 30 min bei 50 °C im Heizblock an. Um inhibierende Proteine aus dem Probengemisch zu entfernen, wurden nach der Inkubation 75 µl Präzipitationspuffer (aus dem Reaktionskit) in die Lysisröhrchen gegeben, mit dem Vortexer für 10 s gemischt und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit für 3 min zentrifugiert. Der klare Überstand aus dem Lysisröhrchen wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Um die Nukleinsäuren zu binden, wurden 500 µl 70 % Ethanol in die 1,5 ml Gefäße hinzugefügt und durch Auf- und Ablassen mit der Pipette mit der Probe vermengt. Das gesamte Probenvolumen wurde auf eine Filtersäule in einem 2 ml Auffanggefäß überführt. Nach einer Zentrifugationszeit von 2 min bei 10.000 × g wurde der Überstand im Auffanggefäß verworfen und die Filtersäule auf ein neues Auffanggefäß gesteckt. Es folgte der erste Waschschritt mit 500 µl HS Lösung (aus dem Reaktionskit), welche auf die Filter pipettiert wurde. Die Proben wurden danach für 1 min bei 10.000 × g zentrifugiert und der Überstand aus den Auffanggefäßen verworfen. Nachdem die Filtersäulen auf neue 2 ml Auffanggefäße gesteckt wurden, wurden im zweiten Waschschritt 700 µl MS Lösung (aus dem Reaktionskit) auf die Filter pipettiert und die Proben danach für 1 min bei 10.000 × g zentrifugiert. Nachdem die Filtersäulen ein weiteres Mal auf neue 2 ml Auffanggefäße gesteckt wurden, schloss sich eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min an, um Ethanolreste zu entfernen. Abschließend wurden die Filtersäulen auf beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße gesteckt, mit 100 µl Elutionspuffer (aus dem Reaktionskit) beladen, für 1 min bei 6.000 × g zentrifugiert, die Filtersäule danach verworfen und die DNA bei -20 °C weggefroren.

3.3.2 Messung von DNA mit Epoch® Biotek Spektralphotometer

Die aus Blut- und Milzproben extrahierte DNA diente in dieser Arbeit als Ausgangsmaterial für sämtliche molekularbiologischen Untersuchungen. Zu hohe Konzentrationen oder unreine DNA mit beispielsweise Proteinresten können Enzymreaktionen bei der Polymerase-Ketten-Reaktion hemmen (Reinard, 2010). Daher war es eine Grundvoraussetzung für die Analyse, vor und während der Untersuchungen die Qualität und Quantität der DNA zu überprüfen. Hierzu wurde das Epoch® Biotek Spektralphotometer mit der Software Gen5™ verwendet. Die Funktionsweise eines Photometers beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus der Physik, welches besagt, dass monochromatisches Licht bei Durchdringen eines absorbierenden Stoffes abnimmt. Aus der Differenz der Lichtintensität vor und nach Durchdringen der Probe (hier DNA) kann die optische Dichte und damit die Konzentration der Probe ermittelt werden, wenn der Extinktionskoeffizient bekannt ist (Reinard, 2010). Nukleinsäuren absorbieren Licht maximal bei einer Wellenlänge von 260 nm, daher wird die Messung bei dieser Wellenlänge durchgeführt (OD_{260}) und die Absorption in eine Konzentration mit der Einheit ng/µl umgerechnet. Aus dem Verhältnis $OD_{260/280}$ kann auf die

Reinheit der Probe geschlossen werden, so wird eine $OD_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,0 als „rein“ für DNA angesehen (Wilfinger et al., 1997). Um das Photometer zu kalibrieren und damit einen Ausgangs- bzw. Nullwert zu erhalten, wurden auf zwei der insgesamt 16 Felder der Take 3 Platte nebeneinander je 2 µl Elutionspuffer aufgetragen und die Konzentrationsmessung mit dem Programm Gen5™ gestartet. Anschließend wurden 2 µl einer DNA Probe auf die Take 3 Platte pipettiert und die Konzentration gemessen. Proben mit einer DNA Konzentration unter 10 ng/µl wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen, ebenso wie Proben mit einer $OD_{260/280}$ unter 1,6 oder über 2,0. Bei Proben mit DNA-Gehalten zwischen 10 ng/µl – 20 ng/µl wurde 3 µl statt 2 µl Template DNA in der PCR eingesetzt.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifizierung von bestimmten Genabschnitten (Mullis et al., 1986). Dabei werden die DNA-Doppelstränge aufgetrennt. An die entstandenen Einzelstränge binden spezielle Moleküle (Primer), die als Start- und Endpunkte für eine neue, identische Doppelstrangbildung dienen. Es findet eine exponentielle Vervielfältigung der DNA statt (Mülhardt, 2013a). Die Reaktion wird von einem speziellen Enzym (Polymerase) katalysiert. Sie lässt sich in mehrere Schritte unterteilen. 1. Denaturierung: Die DNA-Doppelstränge werden unter hohen Temperaturen (95 °C - 98 °C) aufgetrennt. 2. Annealing: Die Temperatur wird abhängig vom jeweiligen Primerpaar auf 55 °C - 68 °C heruntergesetzt, damit diese an die DNA- Einzelstränge binden können. Die Elongation beginnt bereits in dieser Phase. 3. Elongation: Die Temperatur wird so erhöht, dass die Polymerase optimal für die Zweitstrangsynthese arbeiten kann (Mülhardt, 2013a).
Neben der thermostabilen Polymerase und einem Primerpaar werden grundsätzlich folgende weitere Komponenten bei der PCR eingesetzt: Puffer für das richtige pH-Millieu, MgCl, Nukleotide für die Zweitstrangbildung und die zu vervielfältigende DNA aus Ausgangsmaterial.

3.3.3.1 Primer

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 13: Primer für die PCR-Untersuchungen

Name	Gen	Sequenz	Quellenangabe
ITS-1	ITS-1	5’ GGTGAACCTGCGGAAGGATC 3’ 5’ CTCAATGCGTCTGCAATTCGC 3‘	(Nuchprayoon et al., 2005)
ITS-2	ITS-2	5‘ AGTGCGAATTGCAGACGCATTGAG 3‘ 5‘ AGCGGGTAATCACGACTGAGTTGA 3‘	(Rishniw et al., 2006)
RLB2	18 S rRNA (V4)	5’GACACAGGGAGGTAGTGACAAG 3‘ 5’ CTAAGAATTTCACCTCTGACAGT 3‘	(Nijhof et al., 2003)
A/E	16S rRNA	5’ GGGGATGATGTCAARTCAGCAY 3’ 5‘ CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT 3‘	(Krücken et al., 2013)
COI	Cytochromoxi-dase I	5‘ TGATTGGTGGTTTTGGTAA 3’ 5‘ ATAAGTACGAGTATCAATATC 3‘	(Casiraghi et al., 2001)
Rick. PCR	gltA	5‘GCTAAAGCTAAGGATAAAAATGAT 3‘ 5’ TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC 3’	(Schreiber et al., 2014)

3.3.3.2 Polymerasen

Es wurden zwei verschiedene Polymerasen für die PCR Reaktionen eingesetzt, um die Zweitstrangsynthese zu katalysieren. Zum einen die Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase und zum anderen die Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase.

Bei der Phusion® handelt es sich um eine *Pyrococcus* DNA Polymerase, genauer gesagt ein Fusionsprotein mit einem DNA-bindendem Protein. Sie besitzt eine Kontrollfunktion (High-Fidelity), bei der fälschlich eingesetzte Nukleotide während der Zweitstrangbildung gegen korrekte ausgetauscht werden (Johnson, 2010). Das Enzym produziert bei der Amplifizierung der DNA sogenannte „blunt ends“, was bei einer späteren Klonierung für die Auswahl des richtigen Vektors (siehe 3.3.7.1) eine Rolle spielt. Die Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase hingegen stammt aus *E. coli* Zellen, die ein kloniertes *pol* Gen von dem Bakterium *Thermus aquaticus* tragen. Sie bildet an der vervielfältigten DNA „sticky ends“ in Form zusätzlicher Adenin Basen am 3‘ Ende des Produktes und hat aufgrund fehlender Kontrollfunktion eine höhere Fehlerrate.

3.3.3.3 Konventionelle PCR zur Untersuchung auf Dirofilarien

Als Zielregion für die Untersuchung auf *Dirofilaria* spp. wurde die Internal Transcribed Spacer Region 1 (ITS-1) gewählt. Dieser Bereich liegt innerhalb der genomischen, ribosomalen DNA und kommt in nahezu allen Eukaryoten vor. Die rDNA-Region ist bei jedem Erreger

individuell und setzt sich aus mehreren konservierten Genabschnitten (18S, ITS-1, 5.8S, ITS-2, 28S) zusammen, die für den Aufbau von Ribosomen kodieren (Abbildung 3):

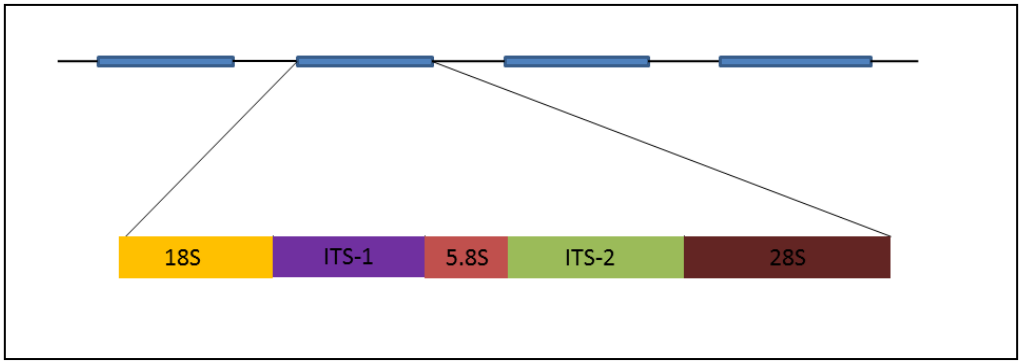

Abbildung 3: ITS- Region, modifiziert nach (Coleman, 2003)

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

Pro 20 µl Ansatz wurden folgende Komponenten in beschriftete 0,2 ml PCR Reaktionsgefäße pipettiert (Mastermix):

12,4 µl DEPC-Wasser
4,0 µl 5 × Phusion HF Puffer
0,4 µl dNTPmix 10 mM
0,5 µl Primer ITS-1 Filarien-ITS1-Forw (5' GGTGAACCTGCGGAAGGATC 3') 10 µM
0,5 µl Primer ITS-1 Filarien-ITS1-Rev (5' CTCAATGCGTCTGCAATTCGC 3') 10 µM
0,2 µl Phusion Hot Start II High- Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)
2,0 µl Template DNA (20 – 100 ng/µl)

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

Nach Durchführung eines Temperaturgradienten, mit dem die optimale Annealing Temperatur für die Primerbindung herausgefunden wurde, konnte folgendes Protokoll für die PCR festgelegt werden: Die initiale Denaturierung fand bei 98 °C für 30 s statt, gefolgt von 40 Zyklen mit 98 °C für 10 s und 68 °C für 45 s. Danach folgte die abschließende Elongationsphase bei 72 °C für 5 min.

Die PCR Produkte wurden durch Auftragen auf ein 1,5 % Agarosegel ausgewertet. Positive Proben wurden aufgereinigt und zur Sequenzierung für die Spezies-Bestimmung an LGC Genomics (Berlin) geschickt.

Außerdem wurden für eine Bestätigung positiver Proben aus der ITS-1 PCR weitere PCRs durchgeführt. Zum einen wurde eine PCR mit der Zielregion Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) ausgewählt (siehe Abbildung 4). Die Primersequenzen hierfür stammten aus einer Veröffentlichung (Rishniw et al., 2006). Der Ansatz für diese PCR setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

12,4 µl DEPC-Wasser
4,0 µl 5 × Phusion HF Puffer
0,4 µl dNTPmix 10 mM
0,5 µl Primer ITS-2 DIDR-F1 (5'AGTGCGAATTGCAGACGCATTGAG 3') 10 µM
0,5 µl Primer ITS-2 DIDR-R1 (5' AGCGGGTAATCACGACTGAGTTGA 3') 10 µM
0,2 µl Phusion Hot Start II High- Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)
2,0 µl Template DNA (20 – 100 ng/µl)

Das Protokoll lautete wie folgt: 98 °C für 30 s und 40 Zyklen mit 98 °C für 10 s, 60 °C für 30 s und 72 °C für 30 s. Abschließend folgte die Elongation für 5 min bei 72 °C. Die gesuchten Fragmentgrößen betrugen für *D. repens* 484 bp und für *D. immitis* 542 bp. Die Detektionsgrenze dieser PCR lag bei 20 Kopien, ermittelt mit einer Verdünnungsreihe.

Zudem wurde für die Bestätigung positiver Proben aus der ITS-1 PCR eine PCR mit dem mitochondrialen Cytochromoxidase I Gen (COI) als Zielregion bestimmt. Dieses Gen kodiert für ein Enyzm in der mitochondrialen Atmungskette in Zellen von Eukaryoten. Die Primersequenzen wurden bereits in der Vergangenheit veröffentlicht (Casiraghi et al. 2011). Hiermit können Genabschnitte von elf verschiedenen Filarien Spezies sowie von einem weiteren, zur Ordnung der Spiruridae gehörenden Nematoden detektiert und amplifiziert werden. Pro Ansatz wurden folgende Komponenten in ein 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß zusammen pipettiert:

12,4 µl DEPC-Wasser
4,0 µl 5 × Phusion HF Puffer
0,4 µl dNTPmix 10 mM
0,5 µl Primer COIfor (5' TGATTGGTGGTTTTGGTAA 3') 10 µM
0,5 µl Primer COIrev (5' ATAAGTACGAGTATCAATATC 3') 10 µM
0,2 µl Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)
2,0 µl Template DNA (20 - 100 ng/µl)

Nach einer initialen Denaturierung bei 98 °C für 30 s folgten 40 Zyklen mit 98 °C für 10 s, 60 °C für 30 s und 72 °C für 15 s. Die Elongationszeit im Anschluss daran betrug 5 min bei 72 °C. Als Positivkontrolle wurden 200 Kopien eines *D. immitis* Plasmids verwendet, welches

aus dem PCR Produkt im Rahmen der Etablierung dieser PCR kloniert wurde (siehe Abschnitt 3.7). Die DNA hierfür wurde von Frau Anja Barnikol aus ihrer Doktorarbeit am hiesigen Institut zur Verfügung gestellt. Die Detektionsgrenze der PCR lag bei 20 Kopien und wurde mit einem Konzentrationsgradienten ermittelt. Die Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese. Positive Proben wurden aufgereinigt und für die Sequenzierung zu LGC Genomics geschickt.

3.3.3.4 High Resolution Melt PCR zur Untersuchung auf *Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis* und *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis

Bei dieser Methode findet zunächst eine real-time PCR in Gegenwart seines Fluoreszenzfarbstoffs statt, der nur an doppelsträngige DNA bindet. An diese schließt sich eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse („High Resolution Melting Analysis“, Abkürzung HRM) an (Wittwer et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde sie für die Identifizierung von drei verschiedenen Erregern, *A. phagocytophilum, E. canis* und *Candidatus* N. mikurensis, eingesetzt und ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Krücken et al., 2013). Während der konventionellen PCR wird das gesuchte DNA Fragment mit einer Größe von 257 bp amplifiziert und der Fluoreszenzstoff Eva Green® bindet an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA Helix und erzeugt dadurch ein detektierbares Signal. Darauf folgt die eigentliche Schmelzkurvenanalyse in Echtzeit: Durch eine kontinuierliche Erhitzungkommt es zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge, der Fluoreszenzstoff löst sich und das Signal nimmt ab.

Es entstehen entsprechend der Nukleotidzusammensetzung und Länge der DNA-Fragmente erregerspezifische Schmelzkurven, die mit der Bio-Rad Precision Melt Analysis™ 1.0 Software analysiert wurden und durch ihre unterschiedlichen Verläufe mit dem Vergleich von mitgeführten Positivkontrollen einem Erreger zugeordnet werden konnten.

Während der gesamten Vorbereitungs- und Pipettierphase wurde sorgfältig darauf geachtet, dass das Umgebungslicht gedimmt war, da der Fluoreszenzstoff lichtempfindlich ist. Folgende Bestandteile wurden pro Ansatz in dafür vorgesehene Felder von weißen 96-well PCR-Platten pipettiert:

15,1 µl DEPC-Wasser
5,0 µl 5 × Phusion HF Puffer
0,75 µl Primer A/E for (5’ GGGGATGATGTCAARTCAGCAY 3’) 10 µM
0,75 µl Primer A/E rev (5’ CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT 3’) 10 µM
0,75 µl dNTPmix 10 mM
0,25 µl Phusion Hot Start II High- Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)
0,4 µl Eva Green DNA stain (50 × conc.)
2,0 µl Template DNA (20-100 ng/µl)

Die Platte wurde mit BZO Seal Film verschlossen und in den CFX96™ Real-Time System Cycler gestellt.

Folgendes PCR-Programm wurde durchlaufen: 98 °C für 30 s, gefolgt von 50 Zyklen mit 98 °C für 15 s, 70 °C für 30 s und 72 °C für 30 s. Im Anschluss fand die kontinuierliche Erhitzung statt, beginnend bei 72 °C und endend bei 94,2 °C. Die Temperatur stieg dabei um 0,1 °C je 10 s. Als Positivkontrolle wurden im Doppelansatz Plasmide mit 300 und 200 Kopien von *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Candidatus* N. mikurensis verwendet. Die Detektionsgrenze lag bei 200 Kopien und wurde mit einer Verdünnungsrenze ermittelt. Nach der Auswertung mit der Bio-Rad Precision Melt Analysis™ 1.0 Software wurden alle nicht völlig eindeutig positiven Proben auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen, aufgereinigt und für eine Sequenzierung an LGC Genomics (Berlin) geschickt.

3.3.3.5 Konventionelle PCR zur Untersuchung auf Piroplasmen

Diese PCR diente der Untersuchung auf *Theileria* spp. und *Babesia* spp.. Als Zielregion wurde das 18S rRNA Gen gewählt, genauer die V4 Region auf diesem Gen. Diese Genregion kodiert ebenfalls für den Aufbau von Ribosomen und kommt bei Eukaryoten vor. Die gesuchten DNA-Fragmentgrößen lagen zwischen 460 - 540 bp. Folgender PCR Ansatz wurde pro 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß pipettiert:

14,35 µl DEPC-Wasser
2,5 µl 10 × Maxima Hot Start Puffer
2,5 µl $MgCl_2$ 25 mM
0,2 µl Primer RLB-F2 (5‘-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG-3‘) 10 µM
0,2 µl Primer RLB-R2 (5’-CTAAGAATTTCACCTCTGACAGT-3’) 10 µM
2,5 µl dNTPmix 2 mM
2,5 µl Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
2,5 µl Template DNA (20 – 100 ng/µl)

Die verwendeten Primer und das Touch-Down PCR Protokoll stammten aus der Veröffentlichung von (Nijhof et al., 2003). Es wurde folgendermaßen modifiziert:

Ein Zyklus für 4 min bei 95 °C, gefolgt von 10 Zyklen für 20 s bei 95 °C, 30 s bei 67 °C und 30 s bei 72 °C, wobei die Annealing-Temperatur nach jedem zweiten Zyklus um 2 °C gesenkt wurde. Danach folgten 35 Zyklen für 20 Sekunden bei 95 °C, 30 s bei 57 °C und 30 s bei 72 °C. Abschließend fand eine Inkubation für 7 Minuten bei 72 °C statt.

Bei jedem Durchgang wurde eine Negativkontrolle und ein *Babesia venatorum* Plasmid mit 200 Kopien als Positivkontrolle mitgeführt. Das Plasmid wurde zuvor über eine Klonierung gewonnen, die DNA hierfür wurde von Frau Dr. Cécile Schreiber aus ihrer Doktorarbeit am hiesigen Institut zur Verfügung gestellt (Schreiber et al., 2014). Die Detektionsgrenze für diese PCR lag bei 25 Kopien und wurde mit einer Verdünnungsreihe bestimmt. Die

Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese und ein Teil der positiven Proben wurde für eine Sequenzierung zu LGC Genomics (Berlin) geschickt.

3.3.3.6 Konventionelle PCR zur Untersuchung auf *Rickettsia* spp.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Hundeblutproben und Fuchsmilzproben auf *Rickettsia spp*. untersucht. Als Zielregion für diese PCR wurde das gltA Gen gewählt. Dieses Gen codiert im Rahmen der Zellatmung im Citratzyklus für das Enzym Citratsynthase. Die gesuchte Fragmentgröße betrug 203 bp und die verwendeten Primer sowie das PCR-Protokoll kamen aus dem hiesigen Institut und wurden bereits veröffentlicht (Schreiber et al., 2014).

Der Ansatz für die PCR enthielt folgende Komponenten und wurde in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert:

15,75 µl DEPC-Wasser
5,0 µl 5× Phusion HF Puffer
0,5 µl dNTPmix 10 mM
1,25 µl Primer RickRmasglta863up (5’ GCTAAAGCTAAGGATAAAAATGAT 3’) 10 µM
1,25 µl Primer RickRmasglta1065 lo (5’ TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC 3’) 10 µM
0,25 µl Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl)
2,0 µl Template DNA (20 – 100 ng/µl)

Folgendes Protokoll wurde angewandt: Die initiale Denaturierung erfolgte bei 98 °C für 30 s, darauf folgten 50 Zyklen mit 98 °C für 10 s, 60 °C für 30 s und 72 °C für 15 s. Die anschließende Elongationszeit betrug 5 min bei 72 °C. Die optimale Annealing-Temperatur für die Primer wurde mittels eines Temperaturgradienten ermittelt. Bei jeder Durchführung wurde eine Negativkontrolle mit 2,0 µl DEPC-Wasser statt Template DNA im Ansatz mitgeführt sowie eine Positivkontrolle mit 200 Kopien. Diese war ein Plasmid von *Rickettsia africae*, das mittels Klonierung gewonnen wurde. Die hierfür verwendete DNA wurde von Herrn Tiago Mota aus seiner Arbeit am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin zur Verfügung gestellt. Die Detektionsgrenze der PCR lag bei 20 Kopien und wurde mittels eines Konzentrationsgradienten ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte auf einem 1,5 % Agarosegel. Positive Proben wurden aufgereinigt und für die Sequenzierung an LGC Genomics geschickt.

3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle durch die Erzeugung eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach auf einem Agarosegel aufgetrennt und mittels eines Farbstoffes sichtbar gemacht (Mülhardt, 2013b). Die DNA-Moleküle sind durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen und wandern daher im Gel von der Anode zur Kathode. Das Agarosegel bietet aufgrund seiner Porenbeschaffenheit kleinen Molekülen weniger Widerstand, so dass

große DNA-Fragmente langsamer wandern. Moleküle mit gleicher Größe und Laufgeschwindigkeit sammeln sich in Banden auf dem Gel. Anhand der Länge der DNA-Fragmente können dann bestimmte Erreger identifiziert werden.
Als erstes wurde das Agarosegel hergestellt. Abhängig von der erwarteten DNA-Fragmentgröße wurde die passende Gelkonzentration gewählt (Mülhardt, 2013b) :

Tabelle 14: Auswahl der Gelkonzentration nach erwarteter Fragmentlänge

Fragmentlänge	Gelkonzentration
0,8 bis 12 kb	0,7 %
0,2 bis 3 kb	1,5 %
0,1 bis 3 kb	2,0 %

Für die Herstellung des Gels wurden auf 100 ml 1 × TAE-Puffer jeweils 0,8 g (für 0,8 % Gel), 1,5 g (für 1,5 % Gel) oder 2,0 g (für 2 % Gel) Biozym LE Agarose Pulver abgewogen, beide Komponenten in eine 500 ml Laborglasflasche überführt und in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Lösung wurde dann auf 65 °C im Wasserbad temperiert. Anschließend wurde die gewünschte Menge in ein 120 ml Gefäß aus Kunststoff abgefüllt, pro 100 ml Agaroseflüssigkeit 10 µl GR Green Farbstoff hinzu pipettiert und das Gefäß vorsichtig geschwenkt, damit sich der Farbstoff gleichmäßig verteilt. Ein Kamm mit der Größe entsprechend der Probenzahl wurde in einen Gelschlitten eingesetzt, dieser in einem Gießstand beidseitig befestigt und die Gelflüssigkeit in den Schlitten gegossen. Die Vorratsflaschen mit flüssigem Gel wurden bei 65 °C in einem Wasserbad gelagert. Nachdem das Gel fest war, wurde der Kamm entfernt und der Gelschlitten in eine horizontale Elektrophoresekammer, die mit 1 × TAE Puffer befüllt war, eingesetzt. Im Anschluss wurden die Geltaschen mit einem Gemisch aus jeweils 5 µl PCR Produkt, 5 µl Aqua bidest und 2 µl Loading Dye × 6 beladen. Zum Ablesen der Bandengrößen wurde ein Marker am Rande des Gels aufgetragen. Anschließend wurde die Gelkammer verschlossen und an Elektroden in Verbindung zu einem Netzgerät angeschlossen und bei 3 - 4 V pro 1 cm Elektrodenabstand angestellt. Die Auswertung des Gels erfolgte in der G:Box Geldokumentation mit der GeneSnap Version 7.09.06 Software.

3.3.5 Sequenzierung von DNA

Um Erreger eindeutig zu identifizieren, können die einzelnen Basen der amplifizierten DNA-Abschnitte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) entschlüsselt und anschließend mit der Software BLAST = Basic Local Alignment Search Tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast) (Altschul et al., 1990) im Internet abgeglichen werden. In dieser Arbeit wurden die zu sequenzierenden Proben zu LGC Genomics (Berlin)

geschickt und dort analysiert. Hierzu wurde zunächst das PCR Produkt aufgereinigt und anschließend 1 µl PCR Produkt, 9 µl Aqua bidest und 2 µl Loading Dye × 6 auf ein 1,5 % Gel aufgetragen, um das Vorhandensein von ausreichend DNA zu überprüfen. Zusätzlich wurde die aufgereinigte DNA auf Qualität und Quantität überprüft. Für die Sequenzierung wurden 20 µl einer 1:10 Verdünnung von der Stammlösung einer der verwendeten Primer aus der PCR in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und zusammen mit 20 µl der aufgereinigten DNA in ein weiteres, beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und an die Firma LGC Genomics gesendet.

3.3.6 Aufreinigung von DNA und Plasmiden

3.3.6.1 Aufreinigung mit DNA cleaner and concentrator™- 5 Kit

Die Aufreinigung dient der Entfernung von Inhibitoren und qualitätsmindernden Substanzen wie beispielsweise DNA Polymerasen, Fluoreszenzfarbstoffen, Primern, Pyrrophosphat oder freien dNTPs. So kann die Reinheit der Proben für die weiteren Untersuchungen sichergestellt werden.

Hierzu wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß die gewünschte Menge an Ausgangsprodukt (zum Beispiel DNA, PCR-Produkt oder Plasmid) pipettiert und entsprechend den Vorgaben aus dem Benutzerhandbuch des Herstellers mit DNA Bindungspuffer (aus dem Reaktionskit) gemischt. Bei Plasmiden und genomischer DNA größer als 2 kb wurde die doppelte Menge an DNA Bindungspuffer zur Ausgangsmenge der Probe gegeben und mit einem Vortexer gemischt. Bei PCR Produkten und DNA Fragmenten wurde Bindungspuffer im Verhältnis 5:1 zur Probe hinzugefügt. Im Anschluss daran wurde das Probengemisch auf die Zymo-Spin™ Filtersäule in einem 2 ml Auffanggefäß überführt und für 30 s bei 11.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf die Filtersäule 200 µl DNA Waschpuffer (aus dem Reaktionskit) pipettiert. Hierauf folgte eine Zentrifugation bei derselben Geschwindigkeit für 30 s. Dieser Waschschritt mit anschließender Zentrifugation wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die Filtersäule wurde dann auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, mit 25 µl Elutionspuffer (aus dem Kit) beladen, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und mittels Zentrifugation für 30 s bei 10.000 × g die fertige DNA gewonnen.

3.3.6.2 Aufreinigung von PCR Produkten mittels Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit

Mit dieser Methode können gezielte DNA Fragmente bei Vorhandensein mehrerer Banden im Agarosegel getrennt ausgeschnitten und aufgereinigt werden.

Hierzu wurde das gewünschte DNA Fragment unter Blaulichtanregung in der G:Box Geldokumentation aus dem Gel mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zuvor wurde das Leergewicht des Reaktionsgefäßes mit einer Laborwaage bestimmt. Danach wurde es mit Inhalt erneut gewogen und so das Gewicht des

Gelstückes bestimmt. Der Heizblock wurde auf 55 °C eingestellt, die dreifache Gewichtsmenge des Gelstückes an ADB Puffer (aus dem Reaktionskit) zu dem Reaktionsgefäß gegeben und das Probengemisch solange im Heizblock Tmix bei 300 rpm inkubiert und geschüttelt bis das Gelstück vollständig aufgelöst war. Anschließend wurde das Probengemisch auf eine Zymo-Spin™ Filtersäule (aus dem Kit), die auf einem 2 ml Auffanggefäß steckte, überführt und für 30 s bei 10.000 × g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 200 µl DNA Waschpuffer auf die Filtersäule pipettiert und die Probe danach bei derselben Geschwindigkeit erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Probe zentrifugiert. Abschließend wurde die Filtersäule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, 24 µl Elutionspuffer (aus dem Reaktionskit) darauf pipettiert und für 30 s bei 10.000 × g zentrifugiert. Um den Erfolg der Aufreinigung aus dem Gel zu überprüfen, wurde im Anschluss ein Gemisch aus 9 µl H_2O bidest, 2 µl 6 × Loading Dye und 1 µl aufgereinigtes PCR Produkt auf ein 1,5 % Gel aufgetragen und bei 3 – 4 V pro 1 cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Das Vorhandensein der erwünschten Banden wurde in der G:Box Geldokumentation überprüft. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.7 Klonierung

In der vorliegenden Arbeit wird mit einer Klonierung die Erzeugung eines Vektors bezeichnet, der ein Ziel-DNA-Fragment enthält und zur Vervielfältigung verwendet werden kann, gefolgt von der Einschleusung in Empfängerorganismen (hier Bakterien), die dann klonal vermehrt werden. Hierbei werden zunächst DNA-Fragmente (Inserts) in ein Plasmid eingefügt, was als Ligation bezeichnet wird. Dieser Schritt wird von einem Enzym katalysiert, welches kovalent an das Plasmid gebunden ist, der Topoisomerase aus dem *Vaccinia*-Virus. Danach wird dieses Plasmid in spezielle *E. coli* Zellen, die als Empfänger dienen, eingeschleust.

Plasmide (Vektoren) sind zirkuläre DNA-Moleküle, die in die Lage versetzt werden, externe DNA aufzunehmen. Diese Plasmide mit eingefügten DNA-Fragmenten können dann aus den *E. coli* Zellen isoliert und so beliebig oft vervielfältigt werden.

Auf diese Weise erzeugte Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl für die Sequenzierung als auch für die Herstellung von Positivkontrollen verwendet. Sie enthalten jeweils eine bestimmte Sequenz und die Konzentration der Plasmidkopien ist berechenbar, so dass sie für die Prüfung der Sensitivität in der PCR geeignet waren.

3.3.7.1 Vektoren

Die Auswahl des Vektors und damit des Klonierungskits erfolgte in Abhängigkeit von der Polymerase, die zuvor in der PCR eingesetzt wurde. Bei Gebrauch der Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase wurde für eine darauf folgende Klonierung das Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit oder das StrataClone Blunt PCR Cloning Kit verwendet.

Der pCR® 4Blunt-TOPO® Vektor aus dem Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Abbildung 4) hat eine Größe von 3956 bp und besitzt Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin. Um das Wachstum unerwünschter Zellen, die nicht mit dem Plasmid transformiert waren, zu hemmen, wird daher während des Klonierungsvorgangs gezielt eines dieser Antibiotika zu dem Nährmedium für die Bakterien gegeben. Das Plasmid besitzt definierte Schnittstellen für das Restriktionsenzym *Eco*RI, die das eingefügte Insert beidseitig umgeben. Daher kann das Insert mittels Restriktionsverdau durch dieses Enzym aus dem Plasmid ausgeschnitten und damit der Erfolg der Klonierung geprüft werden.

Der pSC-B-amp/kan Vektor (Abbildung 5) aus dem StrataClone PCR Cloning Kit hat eine Größe von 4300 bp und trägt ebenfalls Resistenzen gegenüber Ampicillin und Kanamycin. Es können Inserts auf dem Plasmid mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI aufgrund der definierten Erkennungsstellen herausgeschnitten und identifiziert werden.

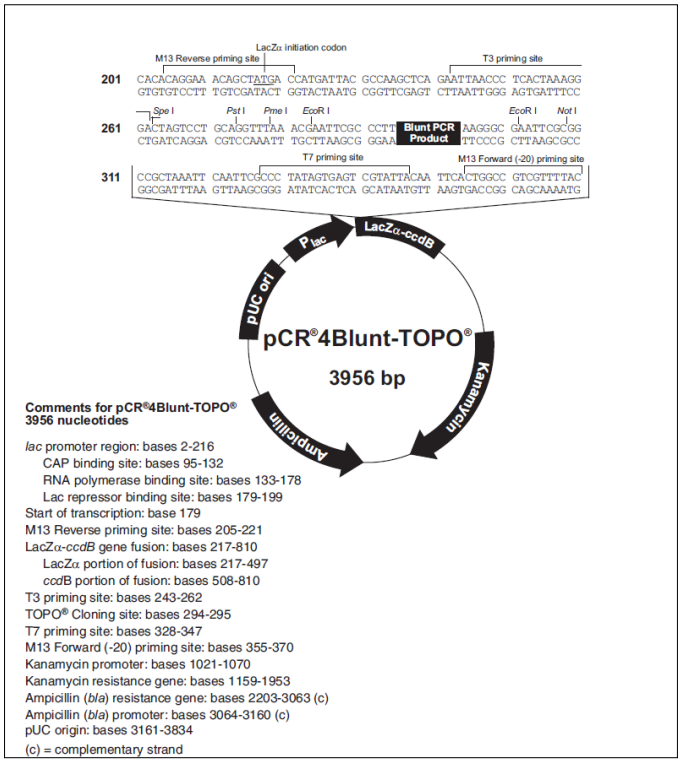

Abbildung 4: pcR® 4Blunt-TOPO® Vektorkarte (Copyright: Thermo Fisher Scientific)

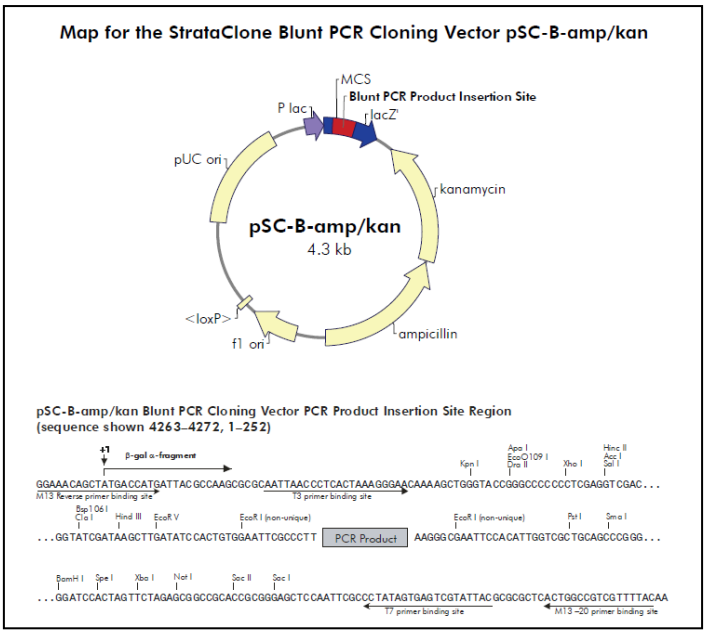

Abbildung 5: pSC-B-amp/kan Vektorkarte (Copyright Agilent Technologies, Inc. All rights reserved. Image used with permission by Agilent)

Bei Einsatz der Maxima Hot Start II Taq Polymerase wurde das TOPO® TA Cloning Kit verwendet. Da diese Polymerase „sticky ends“ in Form eines zusätzlichen Adenins am 3‘ Ende des PCR-Produktes bildet, besitzt der Vektor an den Ligationsstellen für das Insert komplementäre Thymin Basen (Abbildung 6). Ebenfalls ist das Plasmid Träger von Resistenzen gegenüber Ampicillin und Kanamycin.

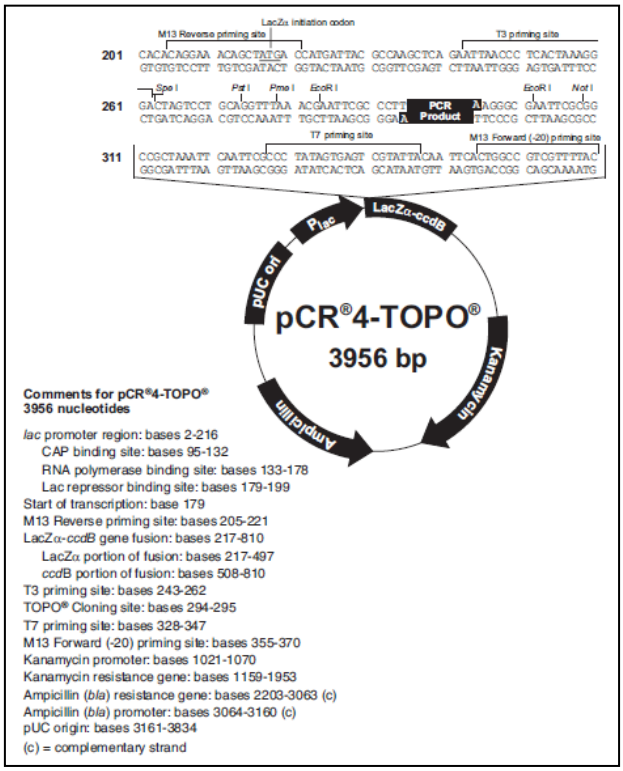

Abbildung 6: pCR®4-TOPO® Vektorkarte (Copyright: Thermo Fisher Scientific)

3.3.7.2 Klonierung von DNA in *E. coli* Top 10 kompetente Zellen mittels Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit

Zunächst wurde eine PCR durchlaufen und das PCR Produkt auf ein 1,5 % Gel aufgetragen, bei 3 – 4 V pro 1 cm Elektrodenabstand in der Gelelektrophoresekammer aufgetrennt und ausgewertet. War die gewünschte Bande vorhanden, konnte das PCR Produkt im Anschluss aufgereinigt werden. Um den Erfolg der jeweiligen Aufreinigung zu überprüfen, wurde das PCR Produkt erneut auf ein 1,5 % Gel aufgetragen, in der Gelkammer aufgetrennt und im Anschluss ausgewertet. Danach wurde der Ligationsansatz für das Einsetzen des DNA Fragments in den Vektor vorbereitet. Hierfür wurden 4 µl PCR Produkt, 1 µl Salzlösung und 1 µl pCR® 4 Blunt-TOPO® Vektor (beides aus dem -20 °C Gefrierschrank) in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurden das Wasserbad und das S.O.C. Medium aus dem Kit auf 42 °C vorgewärmt. Zudem wurden entsprechend der Probenanzahl Reaktionsgefäße mit *E. coli* Top 10 chemisch kompetenten Zellen aus dem -80 °C Gefrierschrank auf Eis aufgetaut. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 3 µl des Ligationsansatzes in das Reaktionsgefäß mit Top 10 Zellen pipettiert und für 10 bis 30 min auf Eis inkubiert. Als nächstes folgte ein Hitzeschock für die Zellen bei 42 °C für 30 s, um die Empfänger *E. coli* Zellen für den Vektor zugänglich zu machen. Direkt danach wurden die Proben wieder auf Eis gestellt und dort für 1 bis 2 min belassen. Nun wurden 250 µl vorgewärmtes S.O.C. Medium zu den Proben pipettiert und diese für 1 h bei 37 °C und 250 rpm in einen Inkubator gestellt. In der Zwischenzeit wurden Petrischalen mit je 20 ml flüssigen LB-Agar und 10 µl Kanamycin (Konz. 0,1 g/ml) unter der Sterilbank vorbereitet. Nach Aushärten der Platten wurden diese bis zur weiteren Nutzung bei 37 °C geschlossen aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Agarplatten mit den Zellen beimpft, das heisst mit einem vorher abgeflammten Drigalski-Spatel ausplattiert. Es wurden 2 Platten pro Probe beimpft, eine mit 90 % und eine mit 10 % Probenvolumen, um später zumindest auf einer Platte einzelne Kolonien in ausreichendem Abstand zueinander für die weitere Bearbeitung zu erhalten. Die Platten wurden über Nacht in einen 37 °C Inkubator gestellt. Am nächsten Morgen wurde überprüft, ob Kolonien gewachsen waren und die Platten dann mit Parafilm verschlossen und in einem Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt. Einige Stunden später wurden Reagenzgläser entsprechend der Probenzahl mit jeweils 5 ml LB-Medium und 2,5 µl Kanamycin (Konz. 0,1 g/ml) unter der Sterilbank vorbereitet. Danach wurden mit einer 10 µl Pipettenspitze einzelne Kolonien von der Platte gepickt und diese mitsamt Pipettenspitze in jeweils ein beschriftetes Reagenzglas hineingegeben. Über Nacht wurden die befüllten Reagenzgläser dann in einem 37 °C Inkubator bei 250 rpm belassen. Am nächsten Morgen wurden die Reagenzgläser aus dem Inkubator entnommen und geprüft, ob die enthaltene Flüssigkeit trüb geworden war, was als Indikator für ein Bakterienwachstum galt. Im Anschluss wurden die Proben

aufgereinigt, um die transformierten, amplifizierten Plasmide aus den *E. coli* Zellen zu isolieren.

3.3.7.3 Klonierung von DNA in *E. coli* Top 10 kompetente Zellen mittels TOPO® TA PCR Cloning Kit

Bei der Anwendung dieses Klonierungskits erfolgten alle Arbeitsschritte identisch zu der Beschreibung aus 3.3.7.2, mit dem Unterschied der Verwendung des Vektors TOPO® TA für den Ligationsansatz.

3.3.7.4 Klonierung von DNA in StrataClone SoloPack kompetente Zellen mittels StrataClone Blunt PCR Cloning Kit

Für den Ligationsansatz wurden 2 µl aufgereinigtes Produkt aus einer zuvor durchgeführten Polymerase-Ketten-Reaktion mit 3 µl StrataClone Blunt Klonierungspuffer und 1 µl StrataClone Blunt Vektor Mix amp/kan in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, sorgfältig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Entsprechend der Probenanzahl StrataClone SoloPack wurden kompetente Zellen in Reaktionsgefäßen aus dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und auf Eis aufgetaut. 1 µl des Ligationsansatzes wurde zu den Zellen gegeben und das Probengemisch für 20 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden das Wasserbad und das LB Medium auf 42 °C sowie der Inkubator auf 37 °C vorgeheizt. Nach der Inkubationszeit wurden die Probenmixturen für einen Hitzeschock 45 s ins Wasserbad gestellt und für 2 min auf Eis belassen. Danach wurden 250 µl vorgewärmtes LB Medium zu den Proben gegeben und diese für 1 h bei 37 °C und 250 rpm im Inkubator belassen. Pro Probenansatz wurden zwei Petrischalen mit je 20 ml LB Agar und 20 µl Kanamycin (Konz. 0,1 g/ml) unter der Sterilbank vorbereitet. Nach Erkalteten wurden diese geschlossen und bis zur weiteren Nutzung bei 37 °C gelagert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden von jedem Probenansatz 5 µl und 100 µl auf jeweils eine Agarplatte mit einem vorher abgeflammten Drigalski Spatel ausplattiert und über Nacht im 37 °C Inkubator belassen. Am nächsten Morgen wurden die Platten aus dem Inkubator entnommen, auf Koloniewachstum geprüft, mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank bei +4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden mit einer 10 µl Pipettenspitze einzelne Kolonien von den Platten gepickt und diese mitsamt Pipettenspitze in vorbereitete, beschriftete Reagenzgläser mit je 5 ml LB Medium und 5 µl Kanamycin (0,1 g/ml) überführt. Über Nacht wurden die Reagenzgläser im 37 °C Inkubator bei 250 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Reagenzgläser aus dem Inkubator entnommen und bis zur weiteren Nutzung im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

3.3.7.5 Retransformation von Plasmiden

Mit der Retransformation können Plasmide, die bereits ein Insert aufgenommen haben, amplifiziert werden. Diese Methode wurde eingesetzt, um fast aufgebrauchte Plasmide wieder aufzufüllen, wenn keine Dauerkulturen angelegt wurden. Alle Schritte erfolgten hierbei identisch zu den beschriebenen Schritten aus der Klonierung mit dem jeweiligen Kit, allerdings wurde die Erstellung des Ligationsansatzes ausgelassen und direkt 1 µl des Plasmids in auf Eis gestellte *E. coli* Top 10 Zellen beziehungsweise StrataClone SoloPack kompetente Zellen pipettiert.

3.3.7.6 Isolation von Plasmiden

Bei der Isolation werden Plasmide aus den *E. coli* Zellen isoliert und weitere Zellbestandteile entfernt. Alle verwendeten Reagenzien und Puffer wurden gemäß der Anleitung aus dem Benutzerhandbuch der Reaktionskits vorbereitet und gelagert.

3.3.7.6.1 Aufreinigung von Plasmiden mittels NucleoSpin® Plasmid

Hierfür wurden beschriftete 2 ml Reaktionsgefäße mit den über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen in LB Flüssigmedium, wie unter 3.3.7.2 – 3.3.7.4 beschrieben, befüllt und bei 11.000 × g für 90 s zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und im Pellet befanden sich nun die Bakterienzellen. Um die *E. coli* Zellen zu lysieren, wurden im nächsten Schritt 250 µl A1 Puffer (aus dem Reaktionskit) zu den Zellpellets in den Reaktionsgefäßen pipettiert und resuspendiert. Im Anschluss wurden 250 µl A2 Puffer (aus dem Kit) hinzu gegeben, die Reaktionsgefäße verschlossen und diese vorsichtig sechs- bis achtmal invertiert. Die Proben wurden dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, als nächstes 300 µl A3 Puffer (aus dem Kit) in die Reaktionsgefäße gegeben, diese verschlossen und erneut vorsichtig sechs- bis achtmal invertiert. Danach folgte eine Zentrifugation der Proben für 5 min bei 11.000 × g. Als nächstes wurden entsprechend der Probenzahl NucleoSpin® Plasmid Filtersäulen (aus dem Kit) auf beschriftete 2 ml Auffanggefäße gesteckt, der Überstand von den zentrifugierten Proben vorsichtig abpipettiert und auf jeweils eine Filtersäule überführt. Diese wurden dann bei 11.000 × g für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss aus dem Auffanggefäß verworfen und die Filtersäule auf ein neues, beschriftetes 2 ml Auffanggefäß gesteckt. Als nächstes wurden 600 µl A4 Puffer (aus dem Kit) auf die Filtersäulen gegeben und für 1 min bei 11.000 × g zentrifugiert. Die Filtersäule wurde im Anschluss auf neue 2 ml Auffanggefäße gesteckt und für 2 min bei 11.000 × g zentrifugiert. Abschließend wurden die Filtersäulen auf beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße gesteckt, mit 50 µl Elutionspuffer AE (aus dem Kit) beladen, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 11.000 × g 1 min zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die aufgereinigten Plasmide bei –20 °C gelagert.

3.3.7.6.2 Aufreinigung mit EasyPrep® Pro Kit

Zunächst wurden beschriftete 2 ml Reaktionsgefäße mit den Bakterienkulturen im LB Medium, welche wie unter 3.3.7.2 – 3.3.7.4 beschrieben gewonnen wurden, gefüllt und für 1 min bei 11.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 250 µl B1 Puffer (aus dem Reaktionskit) zu den Zellpellets hinzugefügt und diese resuspendiert. Im Anschluss wurde 250 µl B2 Puffer hinzugegeben und vermischt, danach 350 µl B3 Puffer (beide aus dem Kit). Das Probengemisch wurde für 7 min bei 11.000 × g zentrifugiert, danach der klare Überstand in Mini Spin Filtersäulen auf 2 ml Auffanggefäßen pipettiert und für 30 s bei 11.000 × g zentrifugiert. Als nächstes wurden 700 µl B4 Puffer (aus dem Kit) auf die Filtersäulen in neuen 2 ml Auffanggefäßen pipettiert und für 30 s bei 11.000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Filtersäulen auf neue 2 ml Auffanggefäße gesteckt und bei 11.000 × g für 30 s zentrifugiert. Abschließend wurden die Filtersäulen auf beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße gesteckt, 50 µl B5 Elutionspuffer (aus dem Kit) hinzu pipettiert, bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert und danach bei 11.000 × g für 1 min zentrifugiert. Die nun aufgereinigten Plasmide wurden bei –20 °C gelagert.

3.3.8 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme haben die Eigenschaft, DNA in Fragmente an definierten Schnittstellen zu zerlegen. Anhand der Länge der entstandenen DNA-Fragmente lassen sich diese DNA Abschnitte identifizieren. So kann mithilfe von Restriktionsenzymen Erreger-DNA identifiziert werden oder es kann geprüft werden, ob ein gewünschtes DNA Fragment (Insert) nach der Klonierung erfolgreich in ein Plasmid aufgenommen wurde.

3.3.8.1 Restriktionsverdau von Plasmiden mit *Eco*RI Enzym

In dieser Arbeit wurde für den Verdau von Plasmiden das Enzym *Eco*RI verwendet. Um den Verdau anzusetzen, wurden 16 µl Aqua bidest, 2 µl *Eco*RI Puffer, 2 µl *Eco*RI Enzym (10 U/µl) und 1 µl aufgereinigtes Plasmid zusammen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 37 °C für mindestens 3 bis maximal 16 Stunden im Wasserbad belassen. Für die Auswertung wurden 4 µl 6 × Loading Dye zu dem Verdau gegeben und das gesamte Volumen auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. 5 µl des *Eco*RI Markers wurden ebenfalls auf das Gel aufgetragen, um damit die Größen der Banden und damit der DNA Fragmente abzulesen. Das Gel wurde dann in der Elektrophoresekammer bei 3 – 4 V pro 1 cm Elektrodenabstand aufgetrennt und im Anschluss in der G:Box Geldokumentation ausgewertet.

3.3.8.2 Restriktionsverdau von PCR Produkten mit *Vsp*I (*Ase*I) Enzym

Dieses Enzym schneidet das PCR Produkt aus der Filarien ITS-1 PCR abhängig vom Vorhandensein des jeweiligen Erregers in folgende Fragmentgrößen (Nuchprayoon et al., 2005):

Tabelle 15: Fragmentgrößen und Erregerzuordnung bei Restriktionsverdau mit *Vsp*I (*Ase*I)

Erreger	Fragmentgrößen
Dirofilaria immitis	390, 205
Acanthocheilonema reconditum	347, 99
Dirofilaria repens	599
Brugia pahangi	292, 218
Brugia malayi	217, 153, 133
Mansonella ozzardi	262, 198, 100
Onchocerca volvolus	319, 198
Wucheria bancrofti	202, 104, 100, 64, 12

Für den Verdau wurden 15 µl PCR Produkt, 9 µl Aqua bidest, 3 µl 10 × Puffer O und 3 µl Restriktionsenzym *Vsp*I (*Ase*I) in ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für mindestens 1 bis maximal 16 Stunden bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach dem Verdau wurden 5 µl 6 × Loading Dye zu dem Gesamtvolumen hinzugefügt, dieses auf ein 2 % Gel aufgetragen und ein 100 bp Marker am Rande des Gels zur Abschätzung der Fragmentgrößen in eine Geltasche hinzu pipettiert. Das Gel lief bei 3 – 4 V pro 1 cm Elektrodenabstand und die Auswertung erfolgte in der G:Box Geldokumentation.

3.3.9 Giemsa-Färbung von Blutausstrichen

Mit der Giemsa-Färbung können Mikrofilarien im Blut gefärbt und danach unter dem Lichtmikroskop untersucht werden. Hierfür wurde zunächst auf einem Objektträger am Rand ein Tropfen Blut mit einer Transferpipette getropft. Auf diesen Tropfen wurde ein Deckgläschen im 45° Winkel angesetzt, so dass sich das Blut entlang der Deckgläschenkante verteilte. Dann wurde das Deckgläschen in einem Schwung im 45° Winkel über den Objektträger vom Tropfen weg gezogen und der Blutausstrich für 10 min an der Raumluft getrocknet. Anschließend wurde der Objektträger auf eine Färbewanne gelegt, mit 100 % Methanol beträufelt und für 10 min an der Raumluft getrocknet. Schließlich wurde der Objektträger mit einem Zellstofftuch abgetupft und erneut auf die Färbewanne gelegt. Im Anschluss folgte das Beträufeln des Objektträgers mit Giemsa-Färbelösung, bestehend aus Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaufärbung 1:10 verdünnt mit Puffer nach Weise (Herstellung des Puffers: eine Tablette in 1 Liter Aqua bidest). Diese wirkte für 40 min ein und wurde dann

vom Objektträger mit Aqua bidest abgespült. Der Objektträger wurde abschließend mit einem Zellstofftuch vorsichtig trocken getupft und vorhandene Mikrofilarien konnten in der zehnfachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop untersucht werden.

3.3.10 Saure Phosphatase Färbung

Mithilfe dieser speziellen histochemischen Färbung können Mf verschiedener Arten aufgrund der Lokalisation der sauren Phosphatase-Aktivität differenziert werden. Dafür wurde das Leucognost® SP Kit (Merck KgaA, Darmstadt) gemäß Herstellerangaben auf Mf positiven Blutausstriche angewendet und anschließend unter dem Mikroskop die Aktivität der sauren Phosphatase bei den Mf untersucht. Die Erkennungsmerkmale der sauren Phosphatase Aktivität bei den unterschiedlichen *Dirofilaria* spp. sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

3.3.11 Modifizierter Knott-Test

Mithilfe des modifizierten Knott-Tests können Mf am Boden eines Falcons durch Zentrifugation angereichert werden. Hierfür wurden 1 ml EDTA-Blut und 9 ml 2 % Formaldehyd (in H_2O) in einem 15 ml Plastikfalcon mit dem Vortexer vermischt und 5 min bei 400 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde danach vorsichtig abgegossen und es wurden je 10 µl des Sediments am Boden des Falcons mit einer Pipette aufgezogen, auf Objektträger aufgebracht und diese mit einem Deckgläschen bedeckt. Anschließend konnten die Mikrofilarien unter einem Lichtmikroskop in der 4-, 10- oder 20-fachen Vergrößerung untersucht werden.

3.3.12 Berechnung der Kopienzahl von Plasmiden

Wenn die Ausgangskonzentration von Plasmiden mit dem gesuchten Insert bekannt ist, kann damit die Sensitivität von einer PCR beurteilt werden: Je geringer die Ausgangskonzentration der Plasmide ist, mit der das gewünschte Insert in der PCR noch amplifiziert und bei der Gelelektrophorese als Bande sichtbar wird, desto sensitiver ist die PCR.

Die Kalkulation der Kopienzahl beruht darauf, dass das durchschnittliche Molekulargewicht eines DNA-Basenpaares 650 Dalton (Da) beträgt. Es gilt außerdem, dass 1 Da = 1 u = 1,6605 x 10^{-24} g (Masse eines Wasserstoffatoms). Die Masse eines Basenpaares in Gramm beträgt demnach 650 Da x 1,6605 x 10^{-24} g = 1,079325 x 10^{-21} g. Wenn nun die Basenpaarlänge des Plasmids (Vektorlänge addiert mit Insertlänge) bekannt ist, kann damit die Gesamtmasse des Plasmids berechnet werden. Als weitere Komponente wird der Gehalt an DNA von ng/µl auf g/µl umgerechnet, also mit 10^{-9} multipliziert. Dann wird der DNA-Gehalt in g/µl durch das Gesamtgewicht des Plasmids geteilt und man erhält die Kopienzahl.

3.3.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten aus dieser Studie erfolgte mit den Programmen IBM SPSS Statistics Version 20 und OpenEpi Version 3.03. Dafür wurden die Daten aus der Exceltabelle in Zahlenwerte kodiert, damit sie für SPSS einlesbar waren. Die Prävalenzen der verschiedenen Erreger wurden unter Angabe des 95 % Konfidenzintervalles ermittelt. Hierbei wurde das Wilson Score Interval angegeben. Weiter konnten mögliche Zusammenhänge zwischen den einzelnen Variablen mittels Kreuztabellen ermittelt werden. Aufgrund der insgesamt relativ niedrigen Infektionsrate und der geringen Anzahl ausgefüllter Fragebogen war dies nur bedingt möglich.

Es lagen für circa ein Viertel der Hundeblutproben vollständig ausgefüllte Fragebögen am Ende der Studie vor, sodass sich die bei der Auswertung verwendeten Prozentwerte nur auf die circa 250 ausgefüllten Fragebögen beziehen. Fehlende Angaben und Fragebögen von Proben mit zu schlechter Qualität wurden nicht mit in die Berechnung eingeschlossen. Weiterhin wurde mittels des Mid-p-Exact Tests der Zusammenhang zwischen Risikofaktoren und Infektionshäufigkeit untersucht.

3.3.14 Berechnung der Stichprobengröße

Die Stichprobengröße von n = 1000 wurde mithilfe der Statistik Software OpenEpi Version 3.03 nach der Formel Stichprobengröße $\boldsymbol{n = [DEFF*Np(1-p)]/ [(d^2/Z^2_{1-\alpha/2}*(N-1)+p*(1-p)]}$ berechnet.

Dabei steht **DEFF** für den Design Effekt = 1 (Verhältnis der Varianz der Stichprobe zur Varianz einer zufälligen Stichprobe, hier angenommen als 1), **d** für Konfidenzgrenzen als % von 100 (absolute +/- %) = 5 %, **p** für die hypothetische % Frequenz des gesuchten Faktors in der Population, wenn unbekannt 50 % = 50 % (+/- 5) und **N** für die Populationsgröße = 121.224 Hunde aus dem Bundesland Brandenburg (Quelle: Innenministerium Brandenburg, Stand 2012).

4. Ergebnisse

4.1 Stichprobengröße

Im Zeitraum von März 2013 bis September 2014 wurden 1087 EDTA-Blutproben von Hunden aus Brandenburg für die vorliegende Arbeit gesammelt. Bei 64 der Hundeblutproben war die Qualität und/oder die Quantität der DNA nach Messung mit dem Epoch® Biotek Spektralphotometer zu gering, sodass die Proben von den Untersuchungen und bei der weiteren statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden (n = 1023). Bei der Untersuchung auf *Rickettsia* spp. fehlte bei zwei weiteren Hundeblutproben ausreichend Material für eine erneute DNA Isolation, sodass keine PCR Untersuchung für diese Erreger durchgeführt werden konnte (n_2 = 1021).

Im Zeitraum von Februar 2014 bis September 2014 wurden Blut- und Milzproben von 204 Füchsen aus Brandenburg gesammelt. Davon wurden 5 Füchse wegen zu schlechter Qualität beider Proben (DNA aus Milz und Blut) ausgeschlossen (n = 199). Bei einigen Füchsen konnte nach der Qualitäts- und Quantitätsprüfung nur eine der beiden DNA-Proben, also Blut oder Milz, für die weiteren Untersuchungen verwendet werden, sodass n_B = 179 Blutproben und n_M = 195 Milzproben von insgesamt 199 verschiedenen Füchsen in die Wertung mit eingingen.

Die eingegangene Blutprobenanzahl, geordnet nach Entnahmedatum, ist in Abbildung 7 dargestellt. Der Sammelzeitraum betrug 19 Monate. Von 1023 Hundeblutproben lag zu 984 das genaue Entnahmedatum vor. Die höchste Probenzahl stammte aus dem Monat März 2014 mit 150 Proben (15,2 %), die niedrigste Anzahl aus dem Monat Juni 2013 mit nur 2 Proben (0,2 %). Der Mittelwert für die Probenanzahl pro Monat lag bei 12,86.

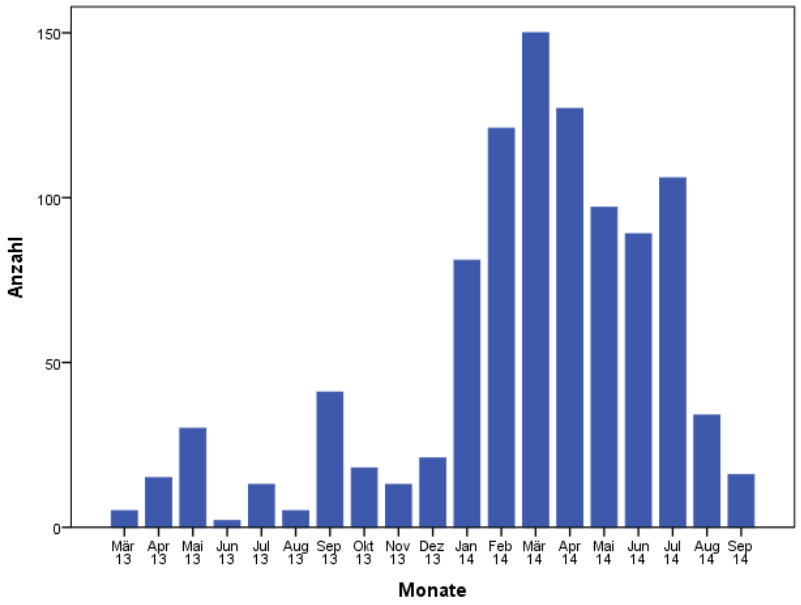

Abbildung 7: Probenentnahme der Hundeblutproben nach Monaten, 2013 - 2014

Bei den Füchsen lagen 189 Angaben zum Schuss-/Funddatum vor, die höchste Probenzahl stammte aus Juni 2014 mit 54 (28,6 %), die niedrigste aus Februar 2014 mit 2 Proben (1,1 %). Der Mittelwert lag bei 15,52 Proben.

Nachdem von allen Proben die DNA isoliert war, fanden im Anschluss Untersuchungen auf das Vorkommen der Erreger *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp., *Candidatus* N. mikurensis, *Dirofilaria* spp. und *Rickettsia* spp. mittels PCR oder HRM PCR statt. Dabei wurden die Hundeblutproben auf alle genannten Erreger untersucht, die Fuchsblutproben auf *Babesia* spp. und *Dirofilaria* spp. sowie die Fuchsmilzproben auf das Vorkommen von *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Candidatus* N. mikurensis und *Rickettsia* spp..

4.2 Geographische Herkunft und Verteilung der Proben

Die geographische Verteilung der Hundeblutproben (n=1023) aus der vorliegenden Arbeit nach Landkreisen in Brandenburg ist in Abbildung 8 dargestellt. Aus 13 Landkreisen und den 4 kreisfreien Städten stammten Hundeblutproben (siehe Tabelle 24 und 25 Anhang 10.3). Aus dem Landkreis Elbe-Elster stammte keine Probe. Die meisten Proben kamen mit einer Anzahl von 423 (41,3 %) aus dem Havelland. In diesem Landkreis wurde mit der Sammlung begonnen und die anderen Landkreise Brandenburgs wurden ab Herbst 2013 in die Studie einbezogen. Die geringste Anzahl von Hundeblutproben kam aus der kreisfreien Stadt Cottbus mit 2 Proben (0,2 %).

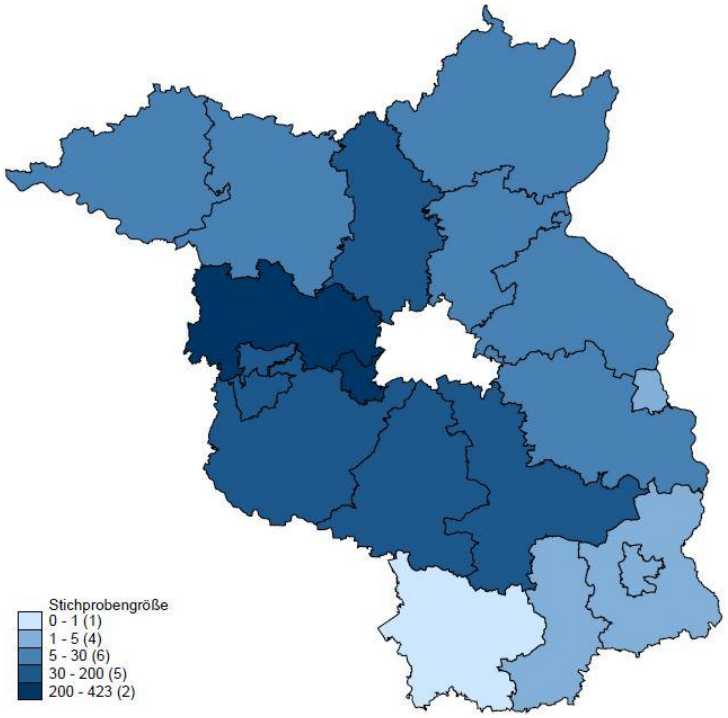

Abbildung 8: Verteilung der Hundeblutproben aus Brandenburg, in ( ) ist die Anzahl der Landkreise mit der jeweiligen Stichprobengröße angegeben

Die geographische Herkunft und Verteilung der Fuchsproben (Blut und/oder Milz, n=199) nach Landkreisen in Brandenburg ist in Abbildung 9 dargestellt. Aus allen 14 Landkreisen und den 4 kreisfreien Städten stammten Fuchsproben. Die höchste Anzahl von 30 (15,1 %) stammte aus dem Landkreis Elbe-Elster und die geringste Anzahl aus der kreisfreien Stadt Potsdam mit einer Anzahl von 1 (0,5 %).

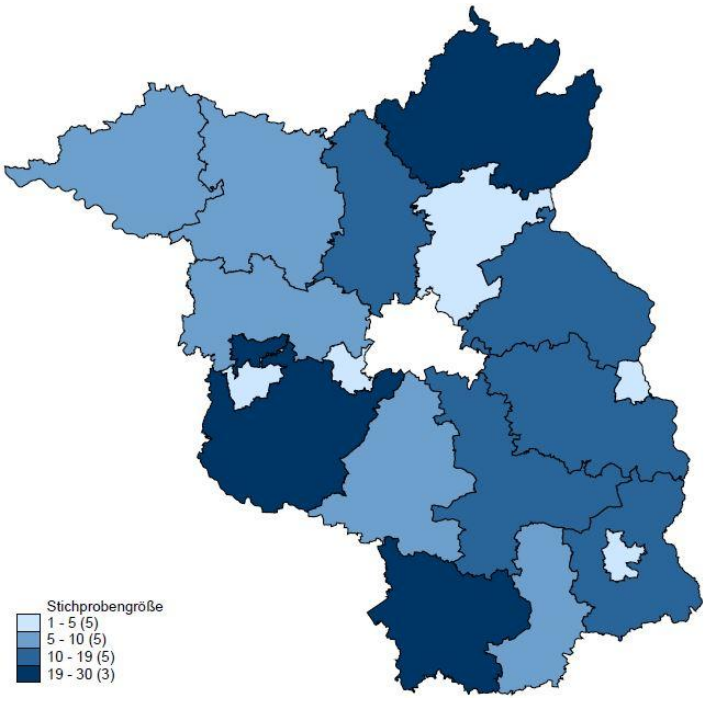

Abbildung 9: Verteilung der Fuchsproben aus Brandenburg, in ( ) ist die Anzahl der Landkreise mit der jeweiligen Stichprobengröße angegeben

4.3 Fragebogenauswertung

Die Fragebögen wurden von den Patientenbesitzern ausgefüllt. Aufgrund der rechtlichen Bestimmungen des Datenschutzes konnten die Fragebögen der Proben von der Firma LABOKLIN (Bad Kissingen) und der Klinik für kleine Haustiere (Berlin) lediglich mit folgenden Angaben ausgefüllt werden: Name des Hundes, Geschlecht, Alter, Wohnort oder Sitz der Tierarztpraxis. Von den Füchsen lagen nur Angaben zum Fund- oder Abschussdatum und zur Postleitzahl des Fund- oder Abschussortes vor. Nicht zu allen Proben lagen vollständig ausgefüllte Fragebögen vor (siehe 3.1.3).

4.3.1 Signalement

Die Besitzer wurden um Auskunft zum Geschlecht, der Rasse und dem Alter ihres Hundes gebeten. Es zeigten sich eine ähnliche Anzahl männlicher und weiblicher Hunde aus der Studie, sowie von männlich kastrierten und weiblich kastrierten Hunden. Die überwiegende Zahl an Hunden waren reinrassige Hunde. Der jüngste Hund aus der Studie war 0,16 Jahre alt und der älteste 21 Jahre (Abbildung 10), bei einer Spannweite von 20,84 Jahren. Der Mittelwert für das Alter der Hunde lag bei 6,9 Jahren und der Median bei 7. Insgesamt wurden 986 gültige Angaben zum Alter erfasst (n = 1023). Sowohl 190 (19,3 %) junge (0 bis 2 Jahre) als auch 335 (34,0 %) Hunde mittleren Alters (3 bis 7 Jahre) waren in der

vorliegenden Arbeit vertreten, die Mehrheit an Hunden mit einer Anzahl von 461 (46,7 %) war zwischen 8 - 21 Jahre alt.

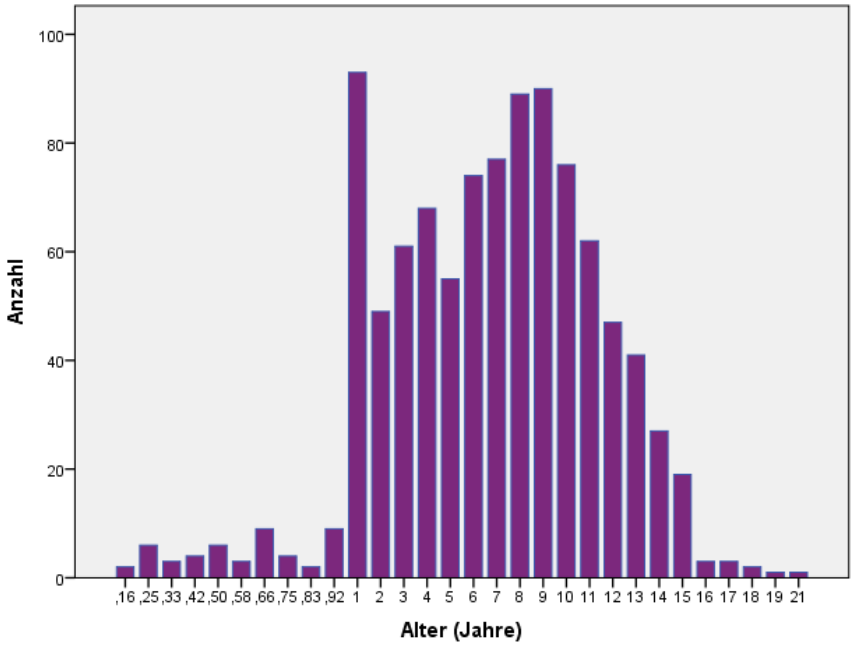

Abbildung 10: Alter der Hunde in Jahren

Aus der Studie lagen zu 990 Hunden Angaben zu ihrem Geschlecht vor (n=1023). Davon waren 314 (31,7 %) männlich, 158 (16,0 %) männlich kastriert, 327 (33,0 %) weiblich und 191 (19,3 %) weiblich kastriert (Abbildung 11).

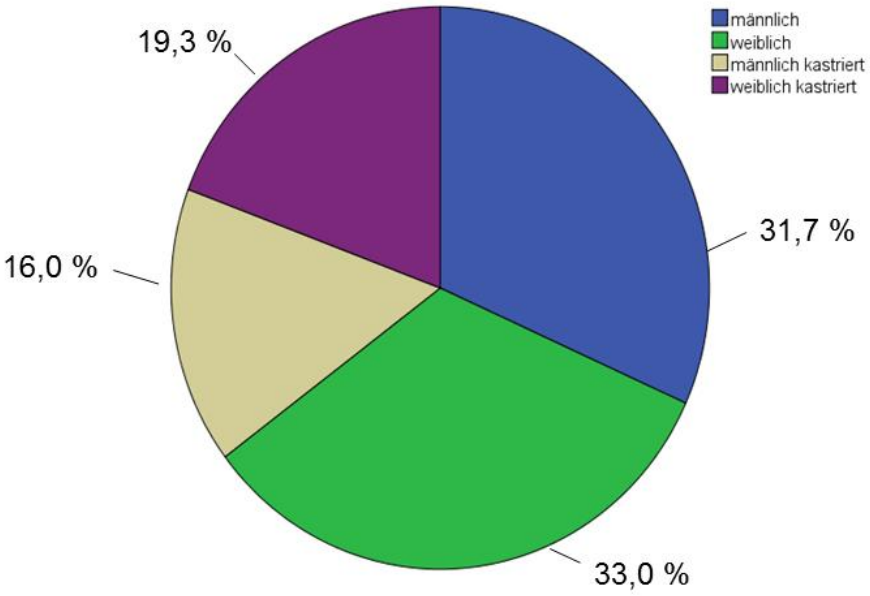

Abbildung 11: Geschlecht der Hunde

Zu der Angabe "Rasse" lagen 993 Angaben vor 667 Hunde (67,2 %) waren reinrassig und 326 (32,8 %) Mischlinge, insgesamt waren 130 verschiedene Hunderassen in der Studie vertreten. Am häufigsten kamen Hunde der Rasse Labrador Retriever mit einer absoluten Zahl von 52 vor, gefolgt von 46 Golden Retrievern und 33 Yorkshire Terriern.

4.3.2 Herkunft der Hunde

Die Herkunft der Hunde war für eine Import- oder Reisevergangenheit interessant, um mögliche autochthone Infektionen der Hunde zu identifizieren oder auszuschließen.

Es zeigte sich, dass circa die Hälfte der Hunde in Deutschland geboren war sowie ein weiterer Teil aus Tierheimen im In- oder Ausland stammte. Zur Herkunft lagen nur bei 236 Hunden Angaben vor (n = 1023). Von diesen 236 Hunden waren 132 (55,9 %) in Deutschland geboren und 37 (15,7 %) stammten von eingetragenen Züchtern in Deutschland. 50 Hunde (21,2 %) hatten ihre Herkunft in Tierheimen, davon 15 (6,4 %) in Tierheimen aus dem Ausland. 12 Hunde (5,1 %) stammten aus privater Hand im Ausland und 5 Hunde (2,1 %) waren ohne festen Wohnsitz oder die Herkunft war nicht definiert (Antwortmöglichkeit „Sonstiges“).

4.3.3 Wohnumfeld der Hunde

Das Wohnumfeld wurde in zwei Risikogruppen eingeteilt. Die Einteilung erfolgte nach der Annahme, dass Hunde, die sich viel im Freien aufhalten (zum Beispiel jagdlich eingesetzte Hunde) ein größeres Risiko für einen Parasitenbefall haben (Bauer et al., 2009). Es wurde daher unterschieden, ob sich die Hunde nur in der Wohnung / im Haus und auf dem Grundstück / im Garten aufhielten (Risikogruppe 1) oder ob sie auch regelmäßig Zugang zu Wasser (Fließgewässer, Kanal, Teich), Wald, Wiesen oder Feldern sowie zu Tierhaltungen haben (Risikogruppe 2). Hierzu lagen 238 Angaben vor (n = 1023), davon lebten 15 Hunde (6,3 %) in Risikogruppe 1 und 223 Hunde (93,7 %) in Risikogruppe 2 (Abbildung 12).

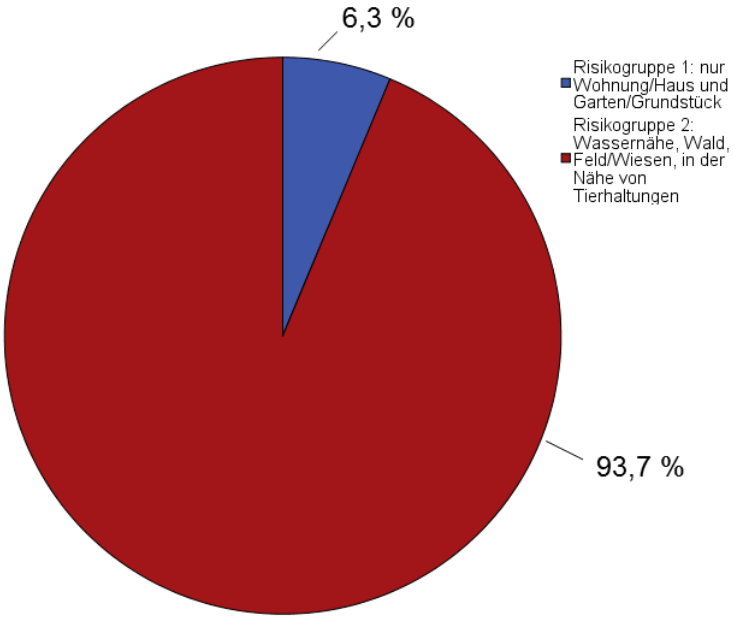

Abbildung 12: Wohnumfeld der Hunde nach Risikogruppen

4.3.4 Reisegewohnheiten

Es sollte herausgefunden werden, ob Reisen mit dem Hund unternommen wurden und ob diese Reisen in oder außerhalb Brandenburgs bzw. Deutschlands erfolgten. Dies gab eine Auskunft über mögliche autochthone Infektionen der Hunde. Zudem war es von Interesse, zu welcher Jahreszeit die Hunde verreisten.

Zusammengefasst fand für circa die Hälfte dieser Hunde keine Änderung des gewohnten Lebensumfeldes und die Reisen nur innerhalb Brandenburgs (zum Beispiel zum Tierarzt) statt. Die andere Hälfte der Hunde hingegen ging auf Reisen, davon wiederum die Mehrheit innerhalb Deutschlands oder der EU. Ein geringer Anteil verreiste auch außerhalb der EU (siehe Tabelle 16). Bei den Reisen nach Jahreszeiten zeigte sich, dass knapp die Hälfte der Hunde im Frühjahr, Sommer und/oder Herbst verreisten und die andere Hälfte nur im Winter oder gar nicht. Ingsgesamt machten von 1023 Besitzern 245 eine Angabe hierzu.

Tabelle 16: Reisegewohnheiten

Reisegewohnheit	Anteil Besitzer (n = 245)
Reisen mit Hund	
Ja, jede Reise	38 (15,5 %)
zum Teil	64 (26,1 %)
Nein	143 (58,4 %)
Reiseziel mit Hund	
nur in Brandenburg	148 (60,4 %)
nur innerhalb Deutschland	50 (20,4 %)
innerhalb der EU	44 (18,0 %)
außerhalb der EU	3 (1,2 %)

Das Risiko der Übertragung studienrelevanter Krankheitserreger auf Hunde ist im Frühjahr bis zum Herbst höher als für Hunde, die nur im Winter oder gar nicht verreisen, da die Umgebungstemperatur direkten Einfluss auf die Überlebenszeit der Vektoren hat (Kramer and Mencke, 2011). Daher wurden die Besitzer gefragt, zu welcher Jahreszeit sie mit ihrem Hund verreisen. Es wurden zwei Risikogruppen gebildet: Zu Risikogruppe 1 gehörten Hunde, die nie oder nur im Winter verreisten und zu Risikogruppe 2 diejenigen Hunde, die im Frühjahr, Sommer und/oder Herbst in eine der vier Regionen (Brandenburg, Deutschlandweit, innerhalb oder außerhalb der EU) verreisten. Es lagen 243 Angaben hierzu vor (n = 1023), davon gehörten 139 Hunde (57,2 %) zu Risikogruppe 1 und 104 (42,8 %) zu Risikogruppe 2.

4.3.5 Infektionswahrscheinlichkeit mit einem studienrelevanten Erreger

Die Besitzer wurden um Auskunft gebeten, ob sich ihr Hund zum Zeitpunkt der Blutentnahme mit einem studienrelevanten Erreger infiziert hat oder haben könnte. Es konnten auch Angaben zu klinischen Symptomen gemacht werden. 230 Besitzer gaben eine Antwort auf diese Frage (n = 1023).

Die Auswertung ergab, dass circa die Hälfte dieser Hunde keine klinischen Symptome zum Zeitpunkt der Blutentnahme zeigte, die andere Hälfte jedoch schon. Bei einigen war sogar bereits eine Infektion mit einem studienrelevanten Erreger nachgewiesen worden. Als häufigstes klinisches Symptom wurde der Zeckenbefall bei circa einem Drittel genannt.

Eine Mehrheit von 118 Hunden (51,3 %) zeigte sich klinisch unauffällig, 104 Hunde (45,2 %) zeigten sich laut Angaben der Besitzer klinisch verdächtig, bei 4 Hunden (1,7 %) wurde vorberichtlich eine Infektion nachgewiesen (Anaplasmose oder Babesiose) und 2 Hunde (0,9 %) waren vorberichtlich infiziert und erkrankt (Anaplasmose, Babesiose, Leishmaniose).

2 Besitzer (0,9 %) gaben für ihre Hunde unter der Antwortmöglichkeit „Sonstiges“ Zeckenbefall an.

120 Besitzer machten Angaben zu klinischen Symptomen bei ihrem Hund, Mehrfachnennungen waren möglich. Als häufigstes Symptom wurde bei 87 Hunden (72,5 %) Zeckenbefall genannt, bei 40 Hunden (33,3 %) gab es Blutbildveränderungen (z.B. Anämie), 37 (30,8 %) zeigten eine Apathie, Bewegungsprobleme oder / und Inappetenz, und 17 Hunde (14,2 %) hatten eine Dermatitis und / oder Hautprobleme. Sechs Hunde (5,0 %) zeigten neurologische Symptome und ein Hund (0,83 %) hatte Ohrrandveränderungen.

4.3.6 Parasitenprophylaxe

Hierzu machten 233 Besitzer eine Angabe, davon behandelten 173 (74,2 %) ihre Hunde nicht prophylaktisch gegen studienrelevante Parasiten. 60 Besitzer (25,8 %) hatten in den letzten 4 oder 8 Wochen, abhängig von der Wirkungsdauer des jeweiligen Präparats (siehe Tabelle 26 unter 10.4 im Anhang), ihren Hund gegen studienrelevante Erreger oder ihre Vektoren behandelt.

4.3.7 Mid-p Exact Test

Nicht zu allen auf Erreger positiv getesteten Hunden lag auch ein (vollständig) ausgefüllter Fragebogen vor. Daraus resultierte eine unterschiedliche Anzahl an Antworten von Frage zu Frage. Die Zusammenhänge der Risikofaktoren wie z.B. Reisen, Prophylaxe und Wohnumfeld und der nachgewiesenen Infektionshäufigkeit (in der Gesamtsumme aller positiven Erreger) wurden mittels des Mid-p Exact Tests untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass signifikant mehr Mischlinge mit Erregern aus dieser Studie infiziert waren als reinrassige Hunde, der p-Wert lag bei 0,015.

Alle weiteren Ergebnisse zeigen p-Werte > 0,1 und können daher als nicht signifikant betrachtet werden, das heißt es besteht kein Zusammenhang zwischen den jeweils untersuchten Gruppen. Eine Tabelle mit den Ergebnissen des Mid-p Exact Tests ist im Anhang unter 10.5 (Tabelle 27) zu finden. Da bereits bei der Berechnung unter einheitlicher Betrachtung aller positiven Proben, unabhängig vom Erreger, kein Zusammenhang zwischen den Gruppen nachgewiesen wurde, wurde auf die Betrachtung der einzelnen Erreger verzichtet, da hier die Anzahl der positiven Proben je Erreger sehr niedrig war.

4.4 Prävalenzen der Erreger bei Hunden und Füchsen in Brandenburg

Die Prävalenzen für Filarien-DNA, *A. phagocytophilum*, *E. canis*, Piroplasmen und *Rickettsia* spp. wurden mit verschiedenen PCR Untersuchungen und anschließender Sequenzierung oder einem Restriktionsenzymverdau ermittelt.

Für mögliche Hinweise auf eine Saisonalität studienrelevanter Erreger wurde zudem untersucht, zu welcher Jahreszeit die positiven Fälle auftraten. So konnte mit Kreuztabellen

ermittelt werden, dass im Monat August 2013, zwischen Oktober 2013 und Januar 2014 sowie im August 2014 keine positiven Proben auftraten.

4.4.1 Nachweis von Filarien

4.4.1.1 Nachweis von Filarien-DNA

Es konnten drei verschiedene Filarienarten in der DNA aus Hundeblutproben mittels PCR Untersuchung sowie anschließender Sequenzierung nachgewiesen werden. Insgesamt waren 6 von 1023 Hunden (0,6 %) mit Filarien infiziert. Zwei dieser Hunde wiesen in der ITS-1 PCR DNA von *A. reconditum* auf.

Bei vier weiteren der sechs Hunde wurde in der ITS-1 PCR DNA von Dirofilarien detektiert, davon bei zwei Hunden *D. immitis* und bei zwei weiteren Hunden *D. repens.*

Einer der mit *D. repens* infizierten Hunde stammte aus einem Tierheim in Brandenburg und wies eine Koinfektion mit *E. canis* auf, zu dem anderen *D. repens* positiven Hund lagen keine weiteren Informationen bezüglich Reisevorgeschichte oder der Herkunft vor. Alle weiteren positiven Hunde hatten eine Import- oder Reisevorgeschichte.

Die Sequenzen beider *D. repens* positiver Hunde (Hund Nr. 117 und Hund Nr. 528) zeigten in der BLAST-Datenbank eine 100 prozentige Übereinstimmung mit einer Sequenz von *D. repens*, die von einem infizierten Menschen aus Japan nach einer Reise durch Europa isoliert wurde (Suzuki et al., 2015). Beide Sequenzen hatten zudem eine hohe genetische Ähnlichkeit mit der bislang nur aus Hongkong bei Mensch und Hund beschriebenen Spezies *Dirofilaria hongkongensis* (To et al., 2012).

Tabelle 17: genetische Übereinstimmung von positiven *D. repens* Hunden aus dieser Studie mit anderen Sequenzen (Gen ITS-1)

	D. repens (AB973229.1)	*D. sp. hongkongensis* (JX290195.1)
Hund Nr.	Übereinstimmung	Übereinstimmung
117	100 % (517/517)	97 % (368/379)
528	100 % (208/208)	98 % (227/231)

*Anmerkung: **blau:** BLAST-Datenbank Zugangsnummer zu der Sequenz*

Interessanterweise konnten in der BLAST-Datenbank keine hohe Übereinstimmungen (>80 % Übereinstimmung) bei beiden Sequenzen mit weiteren *D. repens* Fällen gefunden werden. Alle drei in GenBank abgelegten *D. repens* Sequenzen stammen allerdings aus Thailand.

Für Hund Nr. 117 war ausreichend DNA-Material vorhanden, sodass zur Bestätigung die ITS-2 und die COI-PCR mit anschließender Sequenzierung durchgeführt wurden. In beiden

PCRs wurde die Probe ebenfalls als *D. repens* identifiziert. Zu Probe Nr. 528 war kein zusätzliches Material für weitere PCRs vorhanden.

In der DNA aus Fuchsblut (n_B = 179) konnte keine Filarien-DNA mittels PCR detektiert werden. Es wurde jedoch bei einem Fuchs in der ITS-1 PCR DNA des Spulwurms *Toxascaris leonina* nachgewiesen. Die Ergebnisse für die Prävalenzen von Filarien und die dazugehörigen 95 % Konfidenzintervalle (KI) sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Prävalenzen von Filarienarten bei Hunden und Füchsen in Brandenburg

Tierart	Prävalenz absolut	Prävalenz relativ (%)	KI (95 %)
Hund (n = 1023)	6	0,6	0,27 - 1,27
Fuchs (n_B = 179)	0	0,0	0,00 - 2,10

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen Beispiele für positive Ergebnisse der ITS-1 PCR-Untersuchung auf dem Agarosegel in der G:Box Geldokumentation. Die Bandengröße der aufgetragenen Proben wurde mithilfe des 100 bp Markers abgelesen.

Abbildung 13: Ergebnis einer ITS-1 PCR. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle, 100 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA), + = positive *D. repens* Probe Hund 117

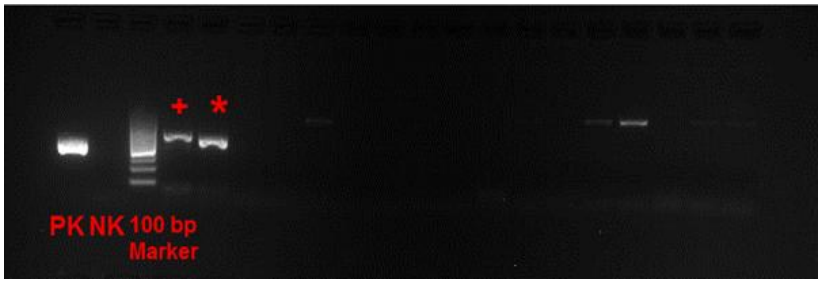

Abbildung 14: Ergebnis einer ITS-1 PCR. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle, 100 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA), + = positive *D. repens* Probe Hund 528, * = positive *A. reconditum* Probe Hund 739

Neben der Sequenzierung wurde für die Bestätigung positiver Proben aus den PCR-Untersuchungen auch der Verdau von PCR-Produkten mit Restriktionsenzymen durchgeführt (siehe 3.3.8). Abbildung 15 zeigt das Ergebnis des Verdaus eines positiven *D. immitis* PCR-Produktes von Hund Nr. 28 aus der vorliegenden Arbeit mit dem *Vsp*I (*Ase*I) Restriktionsenzym. Dieser Hund stammte aus einem Tierheim in Rumänien.

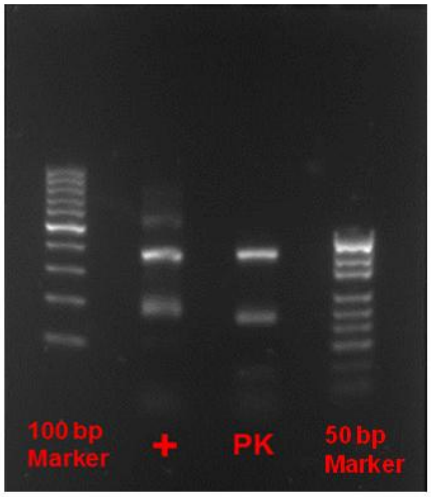

Abbildung 15: *Vsp*I (*Ase*I) Enzymverdau, 100 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA),+ = positive *D. immitis* Probe Hund Nr. 28, PK = Positivkontrolle, 50 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham, USA)

4.4.1.2 Differenzierung von Mf mithilfe der sauren Phosphatase Aktivität

Die Färbung der Poren der Mf durch die Aktivität der sauren Phosphatase zeigte sich unter dem Mikroskop nicht eindeutig, sodass auch im wiederholten Versuch keine Differenzierung oder Zuordnung der Mf zu einer Filarienspezies möglich war.

4.4.2 *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Candidatus* N. mikurensis

Mit der HRM PCR konnten drei verschiedene Erreger zeitgleich detektiert werden: *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Candidatus* N. mikurensis. Die Nachweisgrenze dieser PCR betrug 200 Kopien und wurde mit einem Konzentrationsgradienten ermittelt.

Bei 15 von 1023 Hunden (1,5 %) konnte *A. phagocytophilum* in der DNA aus Blutproben nachgewiesen werden und ein weiterer Hund (0,1 %) war mit *E. canis* infiziert. Dieser Hund wies zudem Koinfektionen mit *D. repens* auf und stammte aus einem Tierheim in Brandenburg. *Candidatus* N. mikurensis wurde bei 3 Hunden (0,3 %) in der PCR detektiert. Von den Füchsen wurden die Milzproben (n_M=195) ebenfalls mit der HRM PCR untersucht, hierfür waren alle PCR Ergebnisse für die drei Erreger negativ. Tabelle 19 zeigt die Prävalenzen und die 95 % Konfidenzintervalle (KI) zusammengefasst.

Tabelle 19: Prävalenzen und 95 % Konfidenzintervalle (KI) für *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Candidatus* N. mikurensis

	A. phagocytophilum		*E. canis*		*Cand. N. mikurensis*	
Prävalenz	Abs.	(%)	Abs.	(%)	Abs.	(%)
Hund (n=1023)	15	1,5	1	0,1	3	0,3
Fuchs (n_M=195)	0	0,0	0	0,0	0	0,0
KI (95 %)						
Hund (n=1023)	0,89 - 2,41		0,02 - 0,55		0,10 - 0,90	
Fuchs (n_M= 195)	0,00 - 1,93		0,00 - 1,93		0,00 - 1,93	

Die Abbildungen 16, 17 und 18 zeigen die Auswertung der HRM PCR mit der Software Bio-Rad Precision Melt Analysis™ 1.0. Während der Amplifikation der DNA in der real-time PCR erfolgt die Anlagerung des Fluoreszenzstoffes EvaGreen® an die DNA-Doppelbindungen. Die Intensität der Fluoreszenz wird in Relative Fluorescence Units (RFU) gemessen (Abbildung 16).

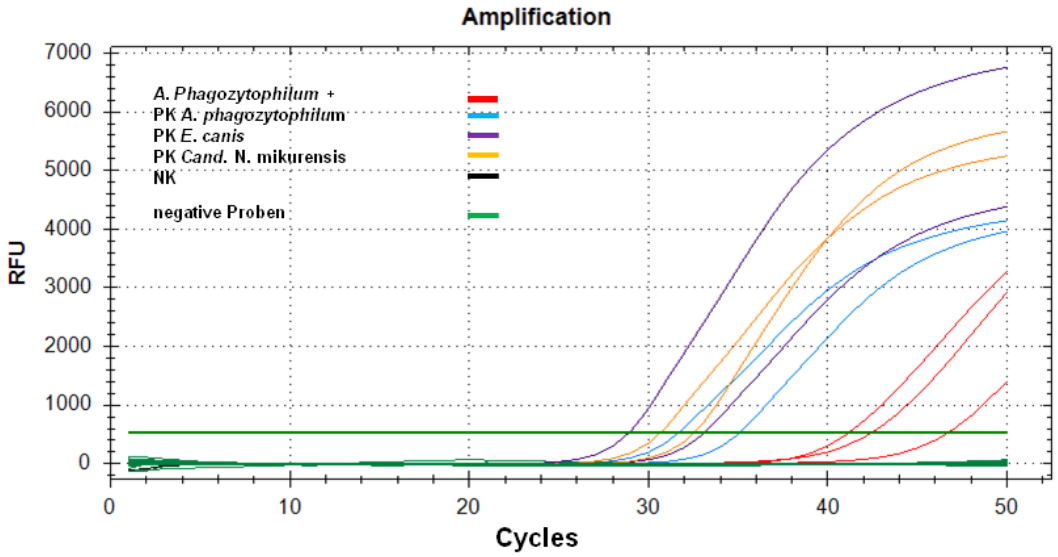

Abbildung 16: Amplifikationskurve einer HRM PCR, RFU= Relative Fluorescence Units

Abbildung 17 zeigt die sich anschließende hochauflösende Schmelzkurve. Mit steigender Temperatur schmelzen die DNA-Doppelbindungen, der Fluoreszenzstoff löst sich und die Intensität der Fluoreszenz (gemessen in RFU) nimmt ab. Mit dem Erreichen des Schmelzpunktes sind 50 % der DNA - Moleküle nicht mehr doppelsträngig.

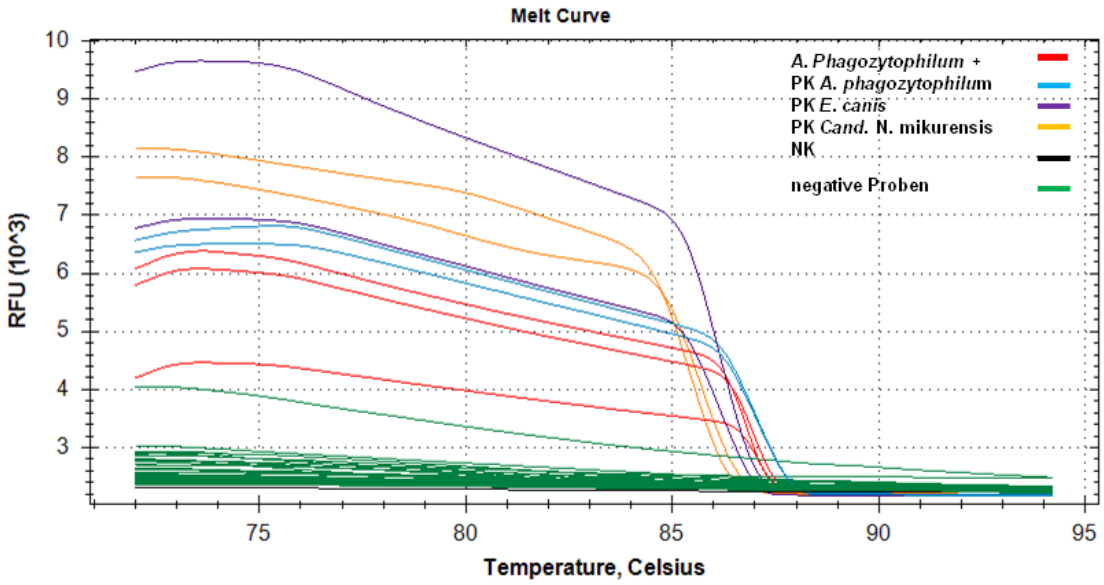

Abbildung 17: Schmelzkurve einer High Resolution Melt Analysis, RFU = Relative Fluroescence Units

Durch die unterschiedlichen Schmelzpunkte erfolgte eine Differenzierung der drei Erreger, hier dargestellt in der ersten negativen Ableitung der Fluoreszenz (-d(RFU)dT) gegenüber der Temperatur in °C (Abbildung 18). Bei jeder PCR wurden Positivkontrollen mitgeführt, um sich an deren Schmelzpunkten zu orientieren. Die Negativkontrolle diente dem Ausschluss von falsch positiven Proben durch Kontamination. Im Anschluss wurde ein Teil der positiven Proben zur Bestätigung sequenziert.

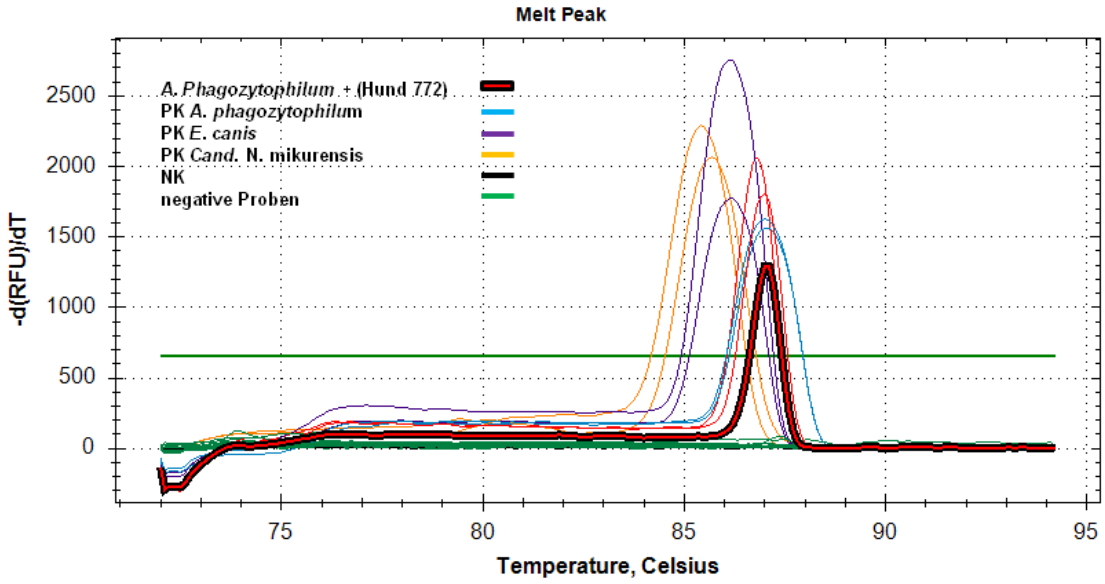

Abbildung 18: Differenzierung der Erreger durch unterschiedlichen Verlauf der Ableitung der Schmelzkurven nach der Temperatur, rot = positive *A. phagocytophilum* Probe Hund 772, PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle

4.4.3 Piroplasmen

Die DNA Proben von Hunde- und Fuchsblut wurden mit der RLB-PCR (siehe 3.3.3.5) auf das Vorkommen von Piroplasmen untersucht. Die Detektionsgrenze für diese PCR lag bei 25 Kopien und wurde mit einer Verdünnungsreihe bestimmt.

Bei einem Hund (0,1 %) wurde *B. canis* nachgewiesen. Der Hund war zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits stationär in einer Kleintierklinik in Brandenburg aufgenommen worden. Er zeigte unter anderem als Symptome eine aregenerative Anämie, schwankenden Gang und Schwäche. In der Klinik wurde bei dem Hund ebenfalls *B. canis* diagnostiziert, wie sich in einem späteren Telefonat mit einem der Kliniktierärzte herausstellte, so dass die hier gestellte Diagnose bestätigt wurde. Zu einer möglichen Reise- oder Importvorgeschichte lagen keine Informationen vor.

85 (47,5 %) DNA Proben, die aus Fuchsblut isoliert wurden, zeigten positive Ergebnisse in der RLB-PCR (siehe positive Beispiele aus Abbildung 19). Elf der positiven Proben wurden zur Sequenzierung geschickt, das Ergebnis zeigte 10 Proben mit positiver *T. annae* DNA und eine weitere Probe mit *Sarcocystis arctica* positiver DNA.

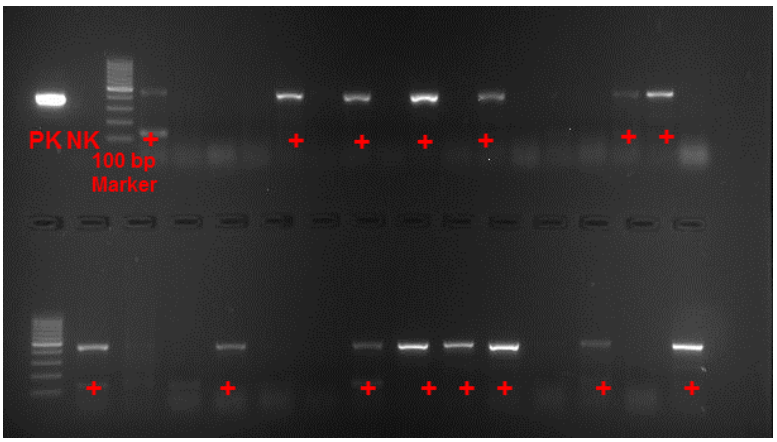

Abbildung 19: Ergebnis einer RLB-PCR. PK = Positivkontrolle, NK = Negativkontrolle, 100 bp Marker (GeneRuler™, Thermo Fisher Scientific, Inc, Waltham USA), + = positive *T. annae* Proben Füchse

Tabelle 20 zeigt die Prävalenzen sowie die 95 % Konfidenzintervalle für das Vorkommen von Piroplasmen bei Hunden und Füchsen aus dieser Studie.

Tabelle 20: Prävalenzen und 95 % Konfidenzintervalle (KI) für Piroplasmen

Tierart	Prävalenz absolut	Prävalenz relativ (%)	KI (95 %)
Hund (n = 1023)	1	0,1	0,02 - 0,55
Fuchs (n_B = 179)	85	47,5	40,30 - 54,78

Abbildung 20 zeigt die geographische Verteilung der positiven Piroplasmen Proben von Füchsen in Brandenburg, aus allen 14 Landkreisen und aus 3 kreisfreien Städten stammen positive Proben.

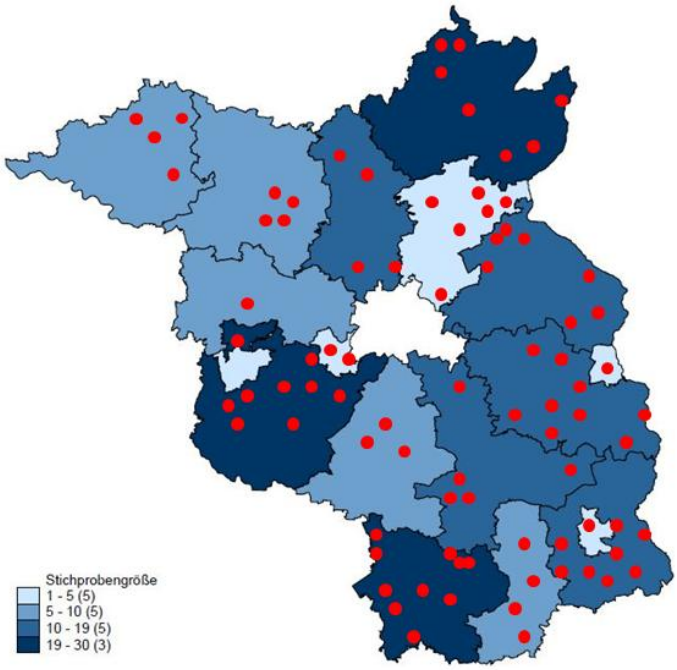

Abbildung 20: Verteilung positiver Piroplasmen Proben (rote Punkte) von Füchsen in Brandenburg nach Landkreisen

4.4.4 Rickettsia spp.

Die DNA von Hundeblut- und Fuchsmilzproben wurde mit einer PCR, die das gltA-Gen als Zielregion verwendet, untersucht. Die Sensitivität der PCR lag bei 20 Kopien.

Es konnte bei 8 Hunden (0,8 %) eine Infektion mit *Rickettsia* spp. nachgewiesen werden. Die positiven Proben wurden für die Bestimmung der Spezies zur Sequenzierung an LGC Genomics (Berlin) geschickt. Sieben der Proben konnten als *R. raoultii* und eine Probe als *R. felis* identifiziert werden. Insgesamt wurden 1021 Proben (= n_2) untersucht.

Die DNA von 195 Fuchsmilzproben wurde ebenfalls auf *Rickettsia* spp. untersucht, hierfür waren alle Proben negativ. Das 95 % Konfidenzintervall für *Rickettsia* spp. betrug für die Hunde aus der vorliegenden Arbeit 0,40 - 1,54 und für die Füchse 0,00 - 1,93. Die Sensitivität der PCR wurde mit einem Konzentrationsgradienten ermittelt und lag bei 20 Kopien mit einem *R. africae* Plasmid, wie Abbildung 21 zeigt:

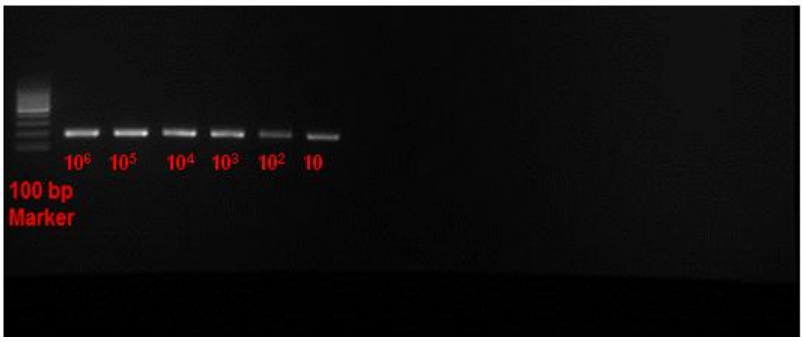

Abbildung 21: Konzentrationsgradient für die Bestimmung der Detektionsgrenze der Rickettsien-PCR: (von links nach rechts) 100 bp Marker, Konzentrationen Plasmid 10^6 bis 10 (je 2 µl)

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse für das Vorkommen von *Rickettsia* spp. bei Hunden und Füchsen aus der vorliegenden Studie zusammengefasst.

Tabelle 21: Prävalenzen und 95 % Konfidenzintervalle für *Rickettsia* spp.

Tierart	Prävalenz absolut	Prävalenz relativ (%)	KI (95 %)
Hund (n_2 = 1021)	8	0,8	0,40 - 1,54
Fuchs (n_M = 195)	0	0,0	0,00 - 1,93

4.5 Einzelfallbeschreibung Hund Nr. 117

Bei nur 2 von insgesamt 1023 untersuchten Hundeblutproben konnte *D. repens* in der PCR Untersuchung und mit anschließender Sequenzierung nachgewiesen werden.

Einer dieser positiven Hunde, Hund Nr. 117, stammte aus einem Tierheim in Brandenburg und war in den Untersuchungen aus der vorliegenden Arbeit sowohl *D. repens* als auch für *E. canis* positiv.

Bei dem Hund handelte es sich um einen ca. 8 Jahre alten, männlichen Hovawart Mischling, der als Fundtier ins Tierheim kam. Es waren keine Informationen zu einer Reise- oder Importvorgeschichte vorhanden. Bei der klinischen Untersuchung zeigte der Hund keine Symptome. Von der erhaltenen Blutprobe wurden Ausstriche mit Giemsa-Färbung (siehe 3.3.9) angefertigt und im Anschluss vorhandene Mf unter dem Mikroskop untersucht.

Um die Morphologie der *D. repens* Mf näher zu bestimmen, wurde die Länge von elf verschiedenen Mf gemessen (siehe Tabelle 22 und Abbildung 22). Es zeigte sich ein Längenunterschied von bis zu 109,46 µm. Die kleinste Mf hatte eine Länge von 293,73 µm und die größte Mf eine Länge von 403,19 µm. Die Durchschnittslänge betrug 346,92 µm. Bei sechs der Mf lag die Länge im Bereich 350 - 365 µm.

Tabelle 22: Längenmessung der Mf von Blutausstrichen, Hund Nr. 117

Hund Nr. 117, Blutausstrich Nr.	Länge µm
1	403,19
2	354,14
3	337,54
4	352,96
6	365,25
7	356,67
8	355,92
25	293,73
29	325,38
30	314,86
31	356,49

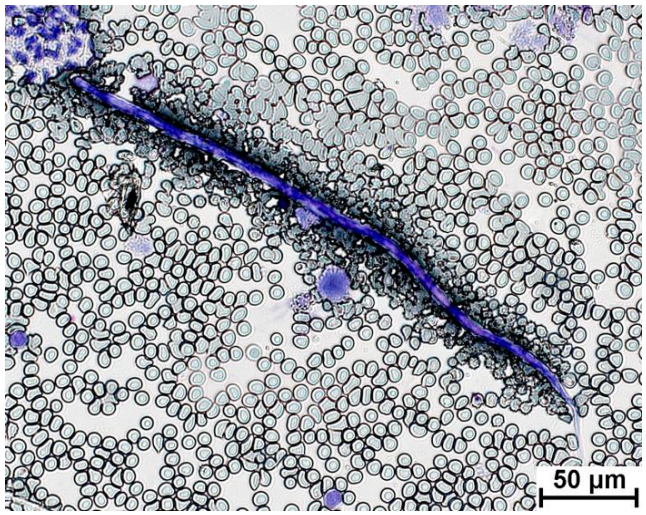

Abbildung 22: Mikrofilarie von D. repens in der Giemsa-Färbung

Der Hund wurde nach der Diagnosestellung für 6 Monate alle 4 Wochen mit Advocate® (100 mg/ml Imidacloprid und 25 mg/ml Moxidectin) behandelt. Vor jeder Behandlung fand eine klinische Untersuchung statt und eine erhaltene Blutprobe wurde in der ITS-1 PCR auf Filarien-DNA untersucht. Vor der ersten Behandlung war die ITS-1 PCR für *D. repens* positiv, nach einmaliger Behandlung und bei den weiteren 5 monatlich erhaltenen Proben war die PCR negativ. Als weitere diagnostische Maßnahme wurde der modifizierte Knott Test durchgeführt, dieser war vor der ersten Behandlung positiv (Nachweis von Mf im Ausstrich) und bei den nächsten 6 Proben negativ. Bei keiner der klinischen Untersuchungen zeigte der Hund Symptome. Der Hund wurde von der Tierärztin im Tierheim zudem gegen die *E. canis* Infektion mit Doxycyclin für 28 Tage behandelt.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war das Vorkommen der Krankheitserreger *A. phagocytophilum*, *Candidatus* N. mikurensis, *Dirofilaria* spp., *E. canis*, *Rickettsia* spp. und der Piroplasmen bei Hunden und Füchsen in Brandenburg zu untersuchen, um die epidemiologische Situation in dieser Region zu beurteilen und das Gefährdungspotenzial für Tier und Mensch einzuschätzen. Der Fokus lag dabei auf der Identifizierung möglicher autochthoner Infektionen mit dem Erreger *D. repens*, der in den vergangenen Jahren sowohl in heimischen Mückenpopulationen als auch wiederholt in Hunden aus dem Bundesland Brandenburg nachgewiesen wurde (Czajka et al., 2014; Sassnau et al., 2009; Sassnau et al., 2013a). Die Rolle des Rotfuchses (*V. vulpes*) als möglicher Reservoirwirt für die genannten Erreger sollte dabei ebenfalls geklärt werden.
Dafür wurden Blutproben von Hunden und Blut- und Milzproben von Füchsen aus Brandenburg in Kooperation mit Tierarztpraxen und dem Landeslabor in Frankfurt (Oder) gesammelt, die DNA hieraus isoliert und im Anschluss mittels konventioneller Polymerase-Ketten-Reaktion oder HRM real-time PCR untersucht.

5.1 Sammelgebiet und Stichprobengröße

Aufgrund des Ausbruchs von *D. repens* in einem Schlittenhunderudel im Landkreis Havelland im Jahr 2007 und 2012 (Sassnau et al., 2009; Sassnau et al., 2013a) wurde das Sammelgebiet von Hundeblutproben zunächst auf den Landkreis Havelland festgelegt, da hier die Chance, positive Hunde zu finden, als besonders hoch eingeschätzt wurde.

Trotz intensiver Bemühungen und Kontaktpflege zu den teilnehmenden Tierarztpraxen waren bis Ende September 2013 nur 123 Blutproben eingegangen. Um die Zielgröße von 1000 Hundeblutproben innerhalb des geplanten Zeitraums von 2 Jahren dennoch erreichen zu können, wurde das Sammelgebiet ab Oktober 2013 auf das gesamte Bundesland Brandenburg ausgeweitet und eine Kooperation mit der Firma LABOKLIN (Bad Kissingen) und der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin für den Bezug weiterer Blutproben begonnen. Zudem erschien Anfang 2014 eine Publikation, in der Wissenschaftler *D. repens* DNA in den Jahren 2011 und 2012 in Stechmücken in Oderaue und nahe Bad Freienwalde (Oder) im Landkreis Märkisch Oderland nachgewiesen haben (Czajka et al., 2014).
Daher wurde die Möglichkeit weiterhin als hoch angesehen, auch außerhalb des Havellandes im Bundesland Brandenburg positive *D. repens* Hunde oder Füchse zu finden. Die Fuchsproben wurden ab Februar 2014 vom Landeslabor Berlin Brandenburg (Frankfurt (Oder)) bezogen und bei Betrachtung der geographischen Herkunft der Proben sind alle

Landkreise und kreisfreien Städte vertreten, am stärksten der Landkreis Elbe-Elster mit 15,1 % der Fuchsproben (vollständige Auflistung der Probenverteilung siehe Anhang 10.3).

Bei der Auswertung der geographischen Verteilung der gesammelten Hundeblutproben zeigt sich zwar, dass aus dem Havelland mit 41,3 % die meisten Proben stammten. Dennoch kamen aus 13 Landkreisen und den 4 kreisfreien Städten Proben (siehe Abb. 8) sodass eine Einschätzung des Infektionsrisikos für das gesamte Bundesland Brandenburg möglich ist.
Die Stichprobe von 1000 wurde aufgrund der Größe der Hundepopulation mit einer Anzahl von 121.224 in Brandenburg (Stand 2012, Quelle: Innenministerium Land Brandenburg) mithilfe der Statistik Sofware OpenEpi Version 3.03 berechnet. Allerdings konnten nur Tiere an der Studie teilnehmen, die in einer Tierarztpraxis vorstellig waren, da hier das Blut entnommen wurde. Somit ist die Stichprobe nicht mehr zufällig erfolgt, sondern vorselektiert und damit nicht repräsentativ für Brandenburg. Eine weitere Überlegung ist, dass die Untersuchungsergebnisse aus dieser Studie eine Überrepräsentativität der jeweiligen Krankheitserreger in Hunden darstellen, da erkrankte Hunde mit vorhandenen klinischen Symptomen eher einen Tierarzt aufsuchen als gesunde, erregerfreie Hunde. Die Sammlung von einer so großen Probenzahl außerhalb von Tierarztpraxen wäre nicht umsetzbar gewesen. Da aber laut Fragebogenanalyse 93,7 % (n = 238) der Hunde Zugang zu Wasser, Wald, Wiesen, Feldern und anderen Tierhaltungen haben, ist das Expositionsrisiko gegenüber Vektoren wie Zecken, Stechmücken und Flöhen unbeeinträchtigt gegeben.

5.2 Beurteilung der Fragebogenanalyse

Der Fragebogen für die Patientenbesitzer sollte neben Grunddaten wie Alter, Geschlecht und Rasse vor allem Auskunft über eine Reise- oder Importvorgeschichte des Hundes geben, um mögliche autochthone Infektionen zu identifizieren oder auszuschließen und Risikofaktoren für die Infektionen zu erkennen.
Aufgrund der datenschutzrechtlichen Bestimmungen konnten zu Proben, die aus der Klinik für kleine Haustiere und von der Firma LABOKLIN (Bad Kissingen) stammten, nur Informationen zu Alter, Name, Geschlecht und Wohnort des Hundes bzw. Sitz der Tierarztpraxis erfasst werden. Insgesamt waren ausgefüllte Fragebögen für nur knapp ein Viertel aller teilnehmenden Hunde am Ende der Studie vorhanden (mit Ausnahme für die Angaben Alter, Geschlecht, Entnahmedatum der Probe) was die Aussagekräftigkeit insbesondere für Herkunft, Reisegewohnheiten und Parasitenprophylaxe bezogen auf eine Allgemeinaussage schmälert.
Dennoch konnten die Daten genutzt werden, um bestimmte Tendenzen zu erkennen. Zum Beispiel stammten 21,2 % (n = 236) der Hunde aus Tierheimen im In- oder Ausland, hier war

eine Import- oder Reisevorgeschichte häufig nicht bekannt und die Gefahr der Einschleppung u.a. von VBDs war gegeben.
Zu den Fuchsproben aus der Studie lagen nur Angaben zum Fund- oder Schießort und Datum vor. Hier war eine Beurteilung von autochthonen Infektionen schwierig, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Füchse aus Nachbarländern wie Polen oder der Tschechischen Republik nach Brandenburg gewandert sind. Dennoch konnte die Rolle als Reservoirwirt bewertet werden, da die Füchse in Brandenburg lebten und hier Krankheitserreger übertragen.

5.3 Limitationen der Studie

An dieser Studie nahmen nur Hunde teil, die zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme in einer Tierarztpraxis vorstellig waren. Damit erfolgte keine zufällige Ziehung einer Stichprobe, sondern eine Vorauswahl. Bei den Blutproben aus der Studie handelte es sich um Proben, die für andere, z. B. diagnostische Zwecke zuvor von den Tierärzten bei den Hunden entnommen wurden oder um Aliquots dieser Proben. Da Hunde meistens aufgrund von klinischen Symptomen beim Tierarzt vorstellig werden, könnte dies in einer Überrepräsentativität positiver, d.h. infizierter Hunde in dieser Studie resultieren.
Mikrofilarien weisen eine Periodizität auf, die ihren Höhepunkt im peripheren Blut in den Abendstunden hat (Webber and Hawking, 1955) und tagsüber um bis zu 80 - 95 % verringert ist (Eckert et al., 2005). Die Tierarztpraxen sind in der Regel tagsüber geöffnet und der Zeitpunkt der Blutentnahme erfolgte zufällig, je nach Erscheinen der Hunde in der Praxis. Die Wahrscheinlichkeit, Blutproben mit Mikrofilarien zu detektieren, könnte dadurch verringert sein.
Zu beachten ist zudem die Herkunft und der Lebensraum der Rotfüchse. Im Rahmen dieser Studie war es nicht kontrollierbar, ob die Rotfüchse außerhalb von Brandenburg oder sogar außerhalb von Deutschland entstammten und lebten. Alle Fuchsproben wurden jedoch ausschließlich von in Brandenburg gefundenen Rotfüchsen entnommen und lassen daher einen Rückschluss auf die aktuelle epidemiologische Situation in Brandenburg zu.

Es wurden von knapp einem Viertel der teilnehmenden Besitzer Fragebögen ausgefüllt (mit Ausnahme für die Angaben Alter, Geschlecht, Entnahmedatum der Probe), was die Aussagekraft u.a. für Herkunft, Reisegewohnheiten und Parasitenprophylaxe bezogen auf eine Allgemeinaussage schmälert. Dennoch konnten die Daten genutzt werden, um bestimmte Tendenzen zu erkennen.

5.4 Beurteilung der Prävalenzen von Krankheitserregern bei Hunden und Füchsen in Brandenburg

5.4.1 Dirofilaria spp.

Es wurden Blutproben von 1023 Hunden und 179 Füchsen mittels der ITS-1 PCR untersucht. Die Detektionsgrenze dieser PCR lag bei 2 Kopien und wurde mit einer Verdünnungsreihe ermittelt. Insgesamt wurde bei 6 von 1023 Hunden (0,6 %) Filarien-DNA nachgewiesen. Davon wurde bei zwei Hunden *A. reconditum*, bei zwei weiteren *D. immitis* und bei noch zwei Hunden *D. repens* nachgewiesen.

Die positiven *D. repens* Fälle aus der vorliegenden Arbeit zeigten wider Erwarten keine hohe Ähnlichkeit zu anderen, in Europa gefundenen *D. repens* Spezies. Stattdessen wiesen sie eine hohe genetische Übereinstimmung (97 - 98 %) zu der Spezies *D. hongkongensis*, die bisher nur einmalig in Hong Kong, China beschrieben wurde, auf (To et al., 2012). Außerdem zeigten sie eine 100 prozentige Übereinstimmung zu einer *D. repens* Sequenz bei einer infizierten, durch Europa gereisten Japanerin, und diese Sequenz wies auch eine 96,7 prozentige Ähnlichkeit zu *D. hongkongensis* auf. Es stellt sich daher die Frage, ob es sich bei *D. repens* möglicherweise um einen kryptischen Spezieskomplex handelt, worunter Vertreter eingestuft werden, die fälschlicherweise (und versteckt) unter einem Spezies-Namen eingestuft sind (Bickford et al., 2007). Hier bedarf es weiterer phylogenetischer Analysen unter Hinzuziehung weiterer Gene, um die Spezies *D. repens* genetisch näher zu charakterisieren.

Da vier der sechs positiven Hunde eine Reise- oder Importvorgeschichte hatten und ein weiterer positiver Hund aus einem Tierheim in Brandenburg mit unbekannter Herkunft stammte, verdeutlicht dieses Ergebnis die Notwendigkeit von medikamentöser Parasitenprophylaxe sowie Untersuchungen auf VBDs von Reise- und Importhunden. Dies ist von großer Bedeutung, um die Gesundheit der Tiere zu schützen und eine Übertragung und damit weitere Ausbreitung dieser Krankheitserreger zu verhindern.

In einer Studie wurden zwischen 2008 und 2010 8545 Blutproben von Importhunden in Deutschland auf das Vorhandensein von Filarien untersucht. Die Hunde stammten aus insgesamt 11 verschiedenen Ländern (Pantchev et al., 2011). Es zeigte sich, dass bei 127 Hunden (1,49 %) *D. immitis* Antigen nachgewiesen wurde, davon hatten 38 Hunde eine Mikrofilarämie. Weitere 73 positive Blutproben wurden von Tierärzten zur Speziesdifferenzierung in einer PCR untersucht, dabei wurde bei 35 Hunden *D. repens* DNA, bei 15 *D. immitis* und bei 13 Hunden *A. reconditum* nachgewiesen.

In einer anderen Untersuchung wurde bei 3 von 44 getesteten Jagdhunden ohne Reisevorgeschichte aus Baden-Württemberg *D. repens* in der PCR detektiert, bei 288

weiteren getesteten Blutproben auf *D. immitis* Antigen waren alle Proben negativ (Pantchev et al., 2009a).

Neuere Studienergebnisse legen nahe, dass *D. repens* endemisch in Deutschland und insbesondere in Brandenburg vorkommen könnte. Bisher galt der Erreger vor allem in den südlichen und östlichen Regionen Europas endemisch (Trotz-Williams and Trees, 2003), nicht jedoch in Deutschland.

Der erste canine *D. repens* Fall in Deutschland wurde bei einem Jagdhund aus Karlsruhe, Baden-Württemberg im Jahr 2004 beschrieben (Hermosilla et al., 2006).Des weiteren konnte in einem Schlittenhunderudel aus Brandenburg 2007 und 2012 *D. repens* nachgewiesen werden (Sassnau et al., 2009; Sassnau et al., 2013a), diese Hunde hatten Deutschland nur in den Wintermonaten vorübergehend verlassen.

Für das Bestehen einer endemischen Situation sprechen auch Funde von *D. repens* (und auch *D. immitis*) DNA in heimischen Mückenpopulationen aus Baden-Württemberg (Kronefeld et al., 2014) in den Jahren 2011 bis 2013 und in Brandenburg 2011 und 2012 (Czajka et al., 2014). Zudem trat der erste autochthone humane klinische Fall mit *D. repens* im März 2014 bei einem Mann aus Sachsen-Anhalt auf (Tappe et al., 2014).

Damit sich VBDs verbreiten können, müssen neben dem eigentlichen Pathogen und einem empfänglichen Endwirt auch geeignete Umweltbedingungen für die Entwicklung des Erregers im Vektor vorherrschen. Daher wurden Wetterdaten aus Baden-Württemberg und Brandenburg vor dem Hintergrund der sog. Dirofilaria Developing Units (DDU) untersucht, um die Länge von möglichen Übertragungsperioden in den letzten Jahren von *D. repens* (und auch *D. immitis)* zu analysieren.

Die DDU sind dabei definiert als die tägliche Summe von Grad Celsius oberhalb der Grenze von 14 °C, da sich unter 14 °C Larven von *Dirofilaria* spp. nicht in Stechmücken entwickeln können (Fortin and Slocombe, 1981). Weiter wurde von diesen Wissenschaftlern angenommen, dass mindestens 130 DDU innerhalb von 30 Tagen (maximal erwartete Lebensspanne einer Stechmücke) notwendig sind, um die Entwicklung von den Mf bis zur infektiösen L3 in der Mücke abzuschließen (130 $DDU_{/30}$).

Wissenschaftler untersuchten Wetterdaten auf Basis der Berechnung von 130 $DDU_{/30}$ und es konnte gezeigt werden, dass in den Jahren 1984 bis 2012 in Karlsruhe (Baden-Württemberg) in jedem Jahr mindestens einmal 130 $DDU_{/30}$ erreicht wurden und damit die Entwicklung von Mf zur infektiösen L3 stattfinden konnte (Sassnau et al., 2014a). Für Brandenburg erlaubten die Wetterdaten aus dem gleichen Zeitraum keine Entwicklung in den Jahren 1985 - 1986, 1988, 1994 und 2001, jedoch in der restlichen Untersuchungsperiode bis 2012. In einer deutschlandweiten Untersuchung der Wetterdaten wurde für den Zeitraum 2004 bis 2013 mindestens einmal die 130 $DDU_{/30}$ für Regionen im Westen, Süden, Südwesten, Südosten,

Osten (damit auch Brandenburg) und Nordosten Deutschlands erreicht (Sassnau et al., 2014b) und somit die potenzielle Entwicklung bis zur L3 und damit die weitere Übertragungsmöglichkeit des Erregers bestätigt.

Dennoch konnte in der vorliegenden Studie nur bei 2 von 1023 Hunden und in keiner der Fuchsblutproben *D. repens* nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund hierfür ist zum einen die lange Präpatenzzeit der Infektion, in der der Erreger nicht im Blut detektierbar ist (27 - 34 Wochen) (Sassnau and Genchi, 2013). Hinzu kommt die Periodizität der Mikrofilarien, die ihren Höhepunkt im peripheren Blut in den Abendstunden hat (Webber and Hawking, 1955) und tagsüber um bis zu 80 - 95 % verringert ist (Eckert et al., 2005).
Die Tierarztpraxen haben jedoch generell tagsüber geöffnet und der Zeitpunkt der Blutentnahme erfolgte zufällig, je nach Erscheinen der Hunde in der Praxis. Somit dürfte sich die Wahrscheinlichkeit, Blutproben mit Mikrofilarien zu detektieren, um Einiges verringert haben.
D. immitis wurde ebenfalls in Mücken in Deutschland nachgewiesen, bisher ist hierzulande jedoch noch keine autochthone Erkrankung bei Hunden beschrieben worden. Aufgrund der Bedeutung als Reise- oder Importkrankheit (Pantchev et al., 2009b) und im Hinblick auf den Klimawandel (Sassnau et al., 2014b) ist die Gefahr der Endemisierung dieses Erregers in Deutschland in jedem Fall gegeben. Das gleiche gilt in hohem Maß für *D. repens*, auch hier ist die Endemisierung aufgrund der bisherigen Untersuchungsergebnisse als sehr wahrscheinlich anzusehen, da Voraussetzungen wie geeignete Umwelt- und Klimabedingungen für den Vektor, Vorhandensein des Pathogens und empfängliche Endwirte gegeben sind.

Die Rolle des Fuchses als Reservoirwirt für Filariosen wurde bereits in der Literatur diskutiert und sowohl *D. repens* als auch *D. immitis* in Rotfüchsen in Serbien und in den Balkanländern nachgewiesen (Cirovic et al., 2014; Magi et al., 2008; Penezic et al., 2014). In Brandenburg konnte in einer kürzlich veröffentlichte Studie, bei der Lungengewebe von 122 Füchsen und 13 Mardern auf *D. repens* mittels PCR untersucht wurde, keine *D. repens* DNA nachgewiesen werden (Härtwig et al., 2015).

Es ist daher unbedingt notwendig, die Entwicklungen und das Vorkommen von *D. repens* und *D. immitis* in weiteren Studien bei Hunden und Wildtieren zu untersuchen und Tierärzte dazu anzuhalten, die Besitzer über die notwendige Parasitenprophylaxe bei Hunden aufzuklären, da nur so eine Übertragung (auch auf den Menschen) vermieden werden kann.
Um die Diagnostik der zum Teil okkulten Infektionen mit *D. repens* zu erleichtern, wäre zudem ein Antigen-Test für den kommerziellen Gebrauch in Tierarztpraxen wünschenswert,

um insbesondere klinisch unauffällige Reise- oder Importhunde schnell und einfach auf diesen Erreger zu untersuchen und falls notwendig eine Therapie einzuleiten.

5.4.2 A. phagocytophilum, E. canis und Candidatus N. mikurensis

Die Untersuchung auf diese Erreger fand mittels einer HRM PCR statt. Hierbei wurden Positivkontrollen mit 200 Kopien in jeder PCR mitgeführt, die das Funktionieren eines Durchgangs anzeigten. *A. phagocytophilum* konnte bei 15 von 1023 Hunden (1,5 %) nachgewiesen werden, *E. canis* bei einem Hund (0,1 %) der zudem eine Koinfektion mit *D. repens* aufwies und *Candidatus* N. mikurensis wurde bei 3 Hunden (0,3 %) in der PCR detektiert. Von den Füchsen waren alle 195 untersuchten Milzproben negativ auf diese Erreger.

In Studien über das Vorkommen von *A. phagocytophilum* bei Hunden in Deutschland zeigen sich deutliche Unterschiede in den Untersuchungsergebnissen der Seroprävalenz (indirekter Nachweis durch Bestimmung des Antikörper-Titers) gegenüber der mittels PCR ermittelten Prävalenz (direkter Erregernachweis).

So wurde bei 522 untersuchten Hunden aus Deutschland eine Seroprävalenz mit *A. phagocytophilum* von 43 % ermittelt, jedoch lag die Prävalenz mittels PCR Untersuchung nur bei 5,7 % (Kohn et al., 2011). In einer weiteren Studie aus Deutschland betrug die Seroprävalenz bei 111 untersuchten Hunden 43,2 %, hingegen die Prävalenz mit der PCR 6,3 % (Jensen et al., 2007a). Aufgrund der Fähigkeit des Erregers, im Wirt über Monate zu persistieren (Egenvall et al., 2000), sind die Antikörpertiter in diesem Zeitraum und auch nach Abklingen der Infektion hoch, sodass diese Diagnostikmethode nicht als alleiniger Beweis für eine aktuelle Infektion ausreicht (Deplazes et al., 2011).

Daher bietet die PCR den Vorteil, den Erreger direkt, d.h. über das Vorkommen seiner DNA im Wirt, zu detektieren und gilt darum als beweisend für eine aktuelle Infektion.

In aktuellen Untersuchungen aus der Region Berlin/Brandenburg zeigten Schreiber et al. (2014) mittels PCR Untersuchung eine Prävalenz mit *A. phagocytophilum* von 6,5 % in *I. ricinius* bzw. 3,9 % in *I. hexagonus*. Krücken et al. veröffentlichten zudem 2013 Ergebnisse, wonach *A. phagocytophilum* mit einer Prävalenz von bis zu 8,2 % in *I. ricinus* bzw. 3,3 % in *I. hexagonus* und in verschiedenen Nagetieren mit durchschnittlich 2,8 % vorkam, nachgewiesen mittels PCR Untersuchung.

Im Vergleich zu der tatsächlichen Belastung von Hunden sind die Befallsraten von Schildzecken (und Nagetieren) mit *A. phagocytophilum* also höher. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Zecken sich im Laufe ihrer Entwicklung an verschiedenen Wirten infizieren können und daher die Erregerprävalenz in ihnen höher ist oder sie die Erreger bereits auf

andere Wirte zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei den Hunden übertragen haben (Sood et al., 1997). Außerdem können sie zwar die Pathogene beherbergen, jedoch war möglicherweise die Saugdauer am Hund nicht ausreichend, um die Erreger zu übertragen.
Da die Symptome bei Hunden zum größten Teil unspezifisch sind oder auch ganz fehlen können (Sainz et al., 2015), wird eine Infektion mit *A. phagocytophilum* häufig von Tierärzten nicht erkannt und die Tiere bleiben als positive Carrier (Träger der Erreger) weiterhin eine Gefahr für die Weiterverbreitung. Dies gilt vor allem für die Bedeutung als Zoonose zu beachten.
Zusätzlich begünstigen die warmen klimatischen Verhältnisse der letzten Jahre mit warmen, feuchten Sommern und milden Herbst- und Wintermonaten sowie weitere Faktoren wie Reforestierung und Renaturierung die Lebensbedingungen und damit die Verbreitung des Vektors *I. ricinus* europaweit (Rizzoli et al., 2014), sodass mit einer Zunahme von tick-borne diseases zu rechnen ist.

E. canis ist bei Hunden in Deutschland bisher nur als Reise- und Importkrankheit bekannt, da der Vektor *R. sanguineus* in Deutschland in natürlichen Habitaten nicht endemisch ist. Daher ist es nicht verwunderlich, dass in der vorliegenden Studie nur bei einem von 1023 Hunden *E. canis* nachgewiesen wurde.
Der Hund stammte aus einem Tierheim und eine Reisevorgeschichte konnte nicht ermittelt bzw. ausgeschlossen werden. Andere Wissenschaftler wiesen mittels PCR Untersuchung eine Prävalenz von 5,3 % nach, jedoch ausschließlich bei Reise- und Importhunden (Rohrig et al., 2011). Der *E. canis* positive Hund aus der vorliegenden Arbeit hatte bei der klinischen Untersuchung keine Symptome, allerdings wurden seine Blutbildparameter nicht auf Veränderungen untersucht.

Eine Infektion mit *Candidatus* N. mikurensis ist nur einmalig bei einem Hund aus Deutschland beschrieben worden (Diniz et al., 2011). Der Erreger konnte aber bereits mehrfach in Schildzecken und kleinen Nagern und insbesondere in der Region Berlin/Brandenburg mit einer Prävalenz von 4,3 % in *I. ricinus* und 5,9 % in *I. hexagonus* nachgewiesen werden (Schreiber et al., 2014).
Die in der vorliegenden Arbeit erhobene Prävalenz von 0,3 % bei Hunden aus Brandenburg ist zwar niedrig, da sie jedoch mittels PCR ermittelt wurde, handelt es sich bei den positiven Fällen um aktuelle Infektionen und damit um einen sehr relevanten Nachweis. Es handelt sich zudem bei dem Ergebnis aus der hiesigen Studie dem aktuellen Wissensstand nach erst um den zweiten Bericht von positiven *Candidatus* N. mikurensis infizierten Hunden deutschlandweit. Im Jahr 2011 war erstmalig ein Fallbericht von einem Hund mit *Candidatus* N. mikurensis Infektion veröffentlicht wurden (Diniz et al., 2011). Es bestätigt zudem die

erfolgreiche Übertragung des Erregers durch infizierte Zecken auf den Hund und damit auch die potenzielle Gefahr als Zoonose für den Menschen in dieser Region. Bereits in der Vergangenheit sind Infektionen beim Menschen in Deutschland beschrieben worden (von Loewenich et al., 2010).

Interessanterweise wurde bei keiner der 195 untersuchten Fuchsmilzproben *A. phagocytophilum*, *E. canis* oder *Candidatus* N. mikurensis in der PCR detektiert. Mögliche Fehler während der Untersuchung der Proben wurden durch folgende Maßnahmen kontrolliert: Bei jeder PCR wurde eine Positivkontrolle von 200 und 300 Kopien mitgeführt, die das Funktionieren des Durchgangs anzeigt. Da mit einem lichtempfindlichen Fluoreszenzstoff gearbeitet wurde, wurde in allen Arbeitsräumen das Licht während der Arbeitszeit gedimmt. Bei den verwendeten DNA-Proben wurde die Qualität und Quantität vor und während der Untersuchungen gemessen. Andere Wissenschaftler untersuchten Lungenmaterial von Füchsen aus Brandenburg mittels PCR auf *A. phagocytophilum* und ermittelten eine Prävalenz von 8,2 % (n =122) (Härtwig et al., 2014).
Zwar können alle Füchse aus der hiesigen Untersuchung frei von Infektionen mit *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *Candidatus* N. mikurensis sein. Sie könnten allerdings auch eine intermittierende oder zu geringe Bakteriämie der Erreger aufgewiesen haben, die daher nicht detektiert wurde. Es wurden maximal 50 mg Milz als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolation eingesetzt, bei geringem Vorkommen des Erregers im Wirt könnte gerade diese kleine Menge an Gewebe erregerfrei sein. Jedoch wurde in der Studie von Hartwig et al. aus dem Jahr 2014 maximal 30 mg Lungengewebe eingesetzt, sodass im Vergleich dazu der Materialeinsatz in der hiesigen Arbeit ausreichend war. Es ist außerdem nicht anzunehmen, dass 195 Füchse eine intermittierende oder zu geringe Bakteriämie aufweisen. Gewebetropismus des Erregers könnte ein Grund sein, dass der Erreger die Lunge gegenüber der Milz bevorzugt.
Wünschenswert wäre hier eine serologische Vergleichsuntersuchung mit einem ELISA oder IFAT gewesen, um das Vorhandensein von Antikörpern im Fuchsblut zu testen. Da im Rahmen der Studie nur Vollblut und kein Serum gesammelt wurde, war dies leider nicht möglich. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet bei Füchsen sind unbedingt notwendig, um die Rolle als potenzielle Reservoirwirte für diese Erreger zu klären.

5.4.3 *Rickettsia* spp.

Die Untersuchung von Hundeblut- und Fuchsmilzproben auf *Rickettsia* spp. fand mittels einer PCR-Untersuchung statt und die Nachweisgrenze lag bei 20 Kopien. Es konnte bei 8 von 1021 Hunden (0,8 %) eine Infektion mit *Rickettsia* spp. nachgewiesen werden, sieben davon wurden durch Sequenzierung als *R. raoultii* und eine Probe als *R. felis* identifiziert. Es

handelt sich dem aktuellen Wissensstand nach um den ersten Nachweis von *R. raoultii* mittels PCR in einem Hund in Deutschland.
Schreiber et al. ermittelten 2014 eine Prävalenz von *Rickettsia* spp. in Schildzecken, die von Hunden abgesammelt worden waren, in der Region Berlin/Brandenburg. Diese lag abhängig von der Zeckenspezies zwischen 39,3 - 61 %. Weiter wurde in Deutschland die Seroprävalenz bei Hunden mit einem micro-IFAT untersucht. Sie betrug 66 % für *R. helvetica*, 2,8 % für *R. raoultii* und 1,6 % für *R. slovaca* (n = 605) (Wächter et al., 2015).

Die hiesige Studie liefert eine wichtige Erkenntnis über die tastächliche Belastung von Hunden mit *Rickettsia* spp.. Es zeigt sich, dass die aktuell bestehenden Infektionsraten bei Hunden in Brandenburg deutlich niedriger sind als die gefundenen Infektionsraten in Zecken aus dieser Region. Beachtet werden sollte hier als wichtiger Aspekt die vertikale Übertragung der Erreger in Zecken, welche die Verbreitung auf Tochtergenerationen ermöglicht.
Die Bakteriämie im Endwirt ist sehr variabel und daher zeigen negative PCR Ergebnisse lediglich an, dass die gesuchte DNA nicht in der Probe detektiert wurde. Dies gilt nicht beweisend für eine Infektionsfreiheit (Allison and Little, 2013). Die sicherste Diagnose ist daher die Kombination aus PCR, Serologie und Untersuchung von Blutausstrichen (Allison and Little, 2013).
In 195 untersuchten Milzproben von Rotfüchsen aus der vorliegenden Arbeit wurden *Rickettsia* spp. nicht detektiert. Es gibt keine Vergleichsstudien bei dieser Tierart aus Deutschland. In Sizilien wurden Milzproben von 13 Rotfüchsen und 110 abgesammelte Flöhe dieser Tiere mittels PCR u.a. auf *Rickettsia* spp. untersucht. Dabei wurde kein Erreger in den Fuchsmilzen gefunden, obwohl in zwei abgesammelten *C. felis* Flöhen der Füchse *R. felis* in der PCR nachgewiesen wurde (Torina et al., 2013). Weitere Untersuchungen sind wünschenswert, um die Rolle des Rotfuchses als möglichen Reservoirwirt für *Rickettsia* spp. zu beschreiben.

5.4.4 Piroplasmen

Es wurden 179 Fuchs- und 1023 Hundeblutproben auf das Vorkommen von Piroplasmen mittels der RLB-PCR untersucht. Die Nachweisgrenze lag bei 25 Kopien.
Bei einem Hund (0,1 %) konnte *B. canis* nachgewiesen werden. Zu diesem Patient waren keine Informationen zu einer Reise- oder Importvorgeschichte bekannt. Der Vektor für *B. canis*, die Schildzecke *D. reticulatus*, hat sich in den letzten Jahren innerhalb Deutschlands in verschiedenen Regionen ausgebreitet, darunter auch in Brandenburg (Beck et al., 2014; Dautel et al., 2006). Für Berlin/Brandenburg wurde von Dautel et al. (2006) eine Prävalenz mit *D. reticulatus* von 9,1 % (n = 1155), abgesammelt von Hunden, bestimmt und von Beck

et al. (2014) eine Prävalenz mit *D. reticulatus* von 45,1 % (n = 1728), ebenfalls abgesammelt von Hunden. Es ist daher zu erwarten, dass autochthone *B. canis* Fälle in diesem Gebiet bei Hunden auftreten werden.
Schreiber et. al (2014) ermittelten eine Prävalenz von *Babesia* spp. in *I. hexagonus* Zecken mit 3 % (n = 100) bzw. 2,5 % (n=200) in *I. ricinus*. Bei Reise- und Importhunden aus Deutschland wurde eine Prävalenz von 3,7 % (n = 508) durch direkten Nachweis im Blutausstrich mit *B. canis* ermittelt (Hamel et al., 2011).

Die Gründe für die Ausbreitung des Vektors *D. reticulatus* sind vielseitig, es werden neben Klimawandel, Änderungen der Landschaftsnutzung (Urbanisierung), gestiegenem Import und Reiseverkehr von/mit Hunden und damit der Vektoren, auch eine erhöhte Wirtsdichte diskutiert (Barutzki et al., 2007; Dautel et al., 2006). Da *B. canis* ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit Hämolyse, Anämie bis hin zu einem komatösen Zustand oder sogar dem Tod verursachen kann, ist eine Parasitenprophylaxe unerlässlich.

Bei 85 Rotfüchsen (47,5 %) aus der vorliegenden Arbeit zeigten sich positive Ergebnisse in der RLB-PCR. Die Sequenzierung ergab bei 10 von 11 Proben die Spezies *Theileria annae.*
Bei einer weiteren Probe handelte es sich um *Sarcocystis arctica*, hier wird die Injektion durch die Muskulatur während der Blutabnahme beim Fuchs als Grund für das Finden dieses Erregers vermutet. Zudem haben Sarcocystis Arten auch eine Phase in Blutzellen während ihres Entwicklungszyklus (Deplazes et al., 2012a).
In einer Studie aus Thüringen bei Rotfüchsen wurde eine ähnlich hohe Prävalenz von *B. cf. microti/T. annae* mit 46,4 % (n = 261) mittels PCR-Untersuchung von Milzgewebe detektiert (Najm et al., 2014). Auch aus Ungarn berichten Wissenschaftler von einer Prävalenz mit 20 % (n = 404) bei Rotfüchsen (Farkas et al., 2015).

Der Rotfuchs kann daher als natürlicher Reservoirwirt für *B. cf. microti/T. annae* angesehen werden, und der Erreger scheint eine relativ hohe Wirtsspezifität zu haben, da er in dieser Studie mit hoher Prävalenz in Füchsen, nicht jedoch bei Hunden aus Brandenburg nachgewiesen wurde. In Hunden aus Spanien und Portugal wurden allerdings *T. annae* Infektionen beschrieben (Miro et al., 2015; Simoes et al., 2011).
Die Pathogenität des Erregers in Rotfüchsen ist bisher weitgehend unbekannt, in einem Fallbericht aus Kanada wurden Schwäche, blasse Schleimhäute, Meningoencephalitits, Bronchopneumonie und eine Hepatopathie bei einem infizierten Rotfuchs festgestellt (Clancey et al., 2010). Allerdings ist hier zu hinterfragen, ob die Symptome im alleinigen Zusammenhang mit der *T. annae* Infektion stehen. Daher sollte die Pathogenität des

Erregers aufgrund der hohen Prävalenz in Füchsen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Bisher herrscht Uneinigkeit unter Wissenschaftlern, den Erreger zur Gattung *Babesia* oder *Theileria* zuzuordnen, daher wird *B. cf. microti* mit den Synonymen *T. annae*, *Babesia* spanish dog und *B. microti*-like verwendet. Vor kurzem wurde jedoch gefordert, aufgrund der phylogenetisch engen Verwandtschaft zu *B. microti* und klarer Abgrenzung zu *Theileria* spp. den Erreger als *B. vulpes*, benannt nach seinem natürlichen Reservoirwirt, dem Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) zu reklassifizieren (Baneth et al., 2015).

5.5 Einflussfaktoren für die Verbreitung von VBDs

Um die Ausbreitung von VBDs nachvollziehen zu können, ist eine einheitliche Betrachtung von Mensch, Tier und Umwelt wichtig, das sog. "One Health" Prinzip (http://www.onehealthinitiative.com/): Durch das Wachstum der Weltbevölkerung werden neue geographische Areale erschlossen und als Folge leben Mensch, Wild- und Haustiere (und auch Vektoren) auf engerem Raum zusammen. Der Kontakt begünstigt die gegenseitige Übertragung von Krankheitserregern.

Neben des Einflussfaktors Klimawandel auf die Ausbreitung von VBDs (Beugnet and Chalvet-Monfray, 2013) ist auch die geänderte Landschaftsnutzung von Bedeutung: Die Intensivierung der Landwirtschaft erfordert eine Anpassung von Tieren und Vektoren an neue Umweltbedingungen. Habitate werden einerseits zerstört aber es werden auch neue Lebensareale aufgrund milder Klimabedingungen zugänglich.

Ein Beispiel hierfür ist die Ausbreitung der Schildzecke *D. reticulatus* (siehe Kapitel 5.3.4). Hinzu kommt das weltweit gestiegene Reise- und Handelsaufkommen. Beispielsweise fliegen über 100 Millionen Passagiere pro Jahr nach Europa (Semenza and Zeller, 2014) und ermöglichen damit neue Übertragungswege von Krankheitserregern.

In der hiesigen Studie gaben 102 von 245 Besitzern (41,6 %) an, mit ihrem Hund zu verreisen (regelmäßige und teilweise Mitnahme auf Reisen eingeschlossen). Diese Angabe bezieht sich jedoch nur auf circa ein Viertel der Studienpatienten und kann daher nicht als Allgemeinaussage gewertet werden.

Internationale Tierschutzorganisationen bewirken den Import von potenziell infizierten Hunden aus Endemiegebieten von VBDs (z.B. Mittelmeerländer). Auch die Zunahme von Resistenzen gegen Antiparasitika, die Zunahme von "Outdoor"-Aktivitäten und eine wachsende Wildtierpopulation (z.B. Rehe, Waschbären, Füchse, Nager) als natürliche Reservoirwirte für Arthropoden und VBDs spielen eine wichtige Rolle (Harrus and Baneth, 2005).

Von großer Bedeutung für die Ausbreitung ist zudem die Vektor- und Pathogenpräsenz. Am Beispiel von *D. repens* und *D. immitis* zeigt sich, dass die Pathogene (Mf) bereits in heimischen Mückenpopulationen in Deutschland vorkommen. Da in den Mücken jedoch nur DNA und nicht spezifisch infektiöse L3 nachgewiesen wurden, ist es von großer Wichtigkeit autochthon infizierte Hunde zu identifizieren, da nur dieser Nachweis bestätigt, dass eine Endemisierung stattfindet. Die untersuchte Region, das Bundesland Brandenburg, liegt im Einzugsgebiet des Flusses Oder mit vielen naheliegenden überschwemmten Wiesen, Feldern und damit idealen Brutgelegenheiten für Stechmücken.

Ein weiterer, wenn nicht sogar wichtigster Einflussfaktor ist der Tierarzt und beim Menschen der Humanmediziner, der neben einer korrekten Diagnosestellung und Therapie vor allem die Aufklärung und Prophylaxe des Patienten in seiner Verantwortung hat. Dies ist besonders wichtig, weil viele Erkrankungen, wie beispielsweise eine Infektion mit *D. repens*, aufgrund fehlender klinischer Symptome über längere Zeit nicht erkannt werden und sich ungehindert weiter verbreiten können.
In der vorliegenden Arbeit gaben 45,2 % von 230 Besitzern an, dass ihr Hund klinisch verdächtig auf studienrelevante Erreger sei. Im Verhältnis zu den gefundenen niedrigen Prävalenzen verdeutlicht dies einerseits die Problematik der Unspezifität von Symptomen bestimmter Infektionen. Andererseits spiegeln diese Angaben nur den subjektiven Eindruck der Patientenbesitzer wieder und hatten keine Bestätigung durch den Tierarzt. Hier wäre es wünschenswert gewesen, wenn diese Angaben vom Tierarzt und nicht von den Besitzern ausgefüllt werden.

Neben allen Einflussfaktoren sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass verbesserte Diagnosetechniken und nicht zuletzt die gestiegene Aufmerksamkeit von Wissenschaftlern ihren Beitrag zu der hohen Anzahl von Publikationen über das Vorkommen und die Ausbreitung von VBDs geleistet haben.

5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Studie hat erstmals großflächig das Vorkommen von *D. repens* bei Hunden und Füchsen im Bundesland Brandenburg untersucht, zusätzlich wurden Untersuchungen auf *A. phagocytophilum, E. canis, Dirofilaria* spp., *Candidatus* N. mikurensis, Piroplasmen und *Rickettsia* spp. bei Hunden und Füchsen durchgeführt.
Ein wichtiges Ziel konnte dabei schon während des Aufbaus der Studie erreicht werden: die Aufmerksamkeit von Tierärzten aus der Region Brandenburg wurde auf die Thematik von VBDs sowie ihre Prävention und Therapie gelenkt.

Dabei wurde für die Untersuchungen eine sehr sensitive Methode, die Polymerase-Ketten-Reaktion, ausgewählt und somit konnte die aktuelle Belastung der Hunde angegeben werden, um das Infektionsrisiko in dieser Region möglichst genau einzuschätzen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich feststellen, dass *D. repens* bei Hunden oder Füchsen derzeit sehr wahrscheinlich nicht endemisch in Brandenburg vorkommt. Die Gefahr der Endemisierung ist jedoch als hoch anzusehen, da der Erreger insbesondere in Import- und Reisehunden, in Mücken und auch beim Menschen bereits nachgewiesen wurde.
Der Rotfuchs konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse als Reservoirwirt für *T. annae* bestätigt werden. Auch das Vorkommen weiterer "emerging pathogens", wie *Candidatus* N. mikurensis, wurde bei Hunden nachgewiesen und der Erreger ist daher als potenzielles Risiko für den Hund, aber auch für den Menschen in dieser Region anzusehen.

Die mögliche Endemisierung von *D. repens*, aber auch von *D. immitis* sollte Gegenstand weiterer, wenn möglich deutschlandweiter Untersuchungen sein, um das Infektionsrisiko für Mensch und Tier genauer einschätzen zu können.

Interessant ist die laut Fragebogen angegebene hohe Belastung der Hunde mit Zecken (72 %, n = 120) im Verhältnis zu dem geringen Schutz vieler Hunde vor VBDs. So erfolgte bei 173 (74,2 %) (n = 233) der teilnehmenden Hunde keine Parasitenprophlyaxe gegen studienrelevante Erreger. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, dass der Tierarzt den Besitzer über den Schutz seines Hundes vor Vektoren wie Zecken, Flöhen und Stechmücken informiert. Insbesondere bei Reisen mit Hunden in Endemiegebiete oder bei dem Import von Hunden aus dem Ausland ist dies von Bedeutung. Der Besitzer muss erkennen, dass er bei fehlender Prophylaxe nicht nur seinen Hund, sondern auch sich selbst einer Infektionsgefahr mit VBDs aussetzt, da es sich bei vielen Erregern um Zoonosen handelt und die Vektoren neben Hunden auch den Menschen befallen. Eine erfolgreiche Prävention ist daher das erste Mittel zum Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier.

Die Zusammenarbeit zwischen Tierärzten, Humanmedizinern und der Behörden ist bei der Bekämpfung essentiell. So wurde im Mai 2014 ein neues Projekt, "VectorNet", von der European Food Safety Authority (EFSA) und dem European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ins Leben gerufen, das die geographische Verteilung von Vektoren festhalten soll, um das Infektionsrisiko für Mensch und Tier rechtzeitig zu erkennen und als Basis für die Bekämpfung dieser Erreger zu dienen. Geoinformationssysteme (GIS) bieten eine gute Möglichkeit, die Ausbreitung verschiedener Erreger und Vektoren zu erkennen und zeitnah zu reagieren. Dies sollte als eine von vielen Chancen genutzt werden, um der

Ausbreitung von VBDs angemessen entgegen zu treten und die Gesundheit von Tier und Mensch zu schützen.

6. Zusammenfassung

Arthropoden-übertragene Krankheitserreger bei Hunden und Füchsen in Brandenburg

Der von Stechmücken übertragene Zoonoseerreger *Dirofilaria repens* kommt bisher in östlichen und südlichen Regionen Europas vor, ist jedoch noch nicht endemisch in Deutschland. Dieser Parasit wurde in den letzten Jahren wiederholt in Hunden aus Brandenburg und Baden-Württemberg sowie in heimischen Mückenarten nachgewiesen.

Ziel dieser Studie war es, das Vorkommen von *D. repens* und weiteren von Flöhen, Zecken oder Stechmücken übertragenen Erregern im Bundesland Brandenburg bei Hunden und Rotfüchsen zu untersuchen. Es sollten Hinweise bezüglich der aktuellen epidemiologischen Situation in dieser Region gewonnen werden und die Frage einer möglichen Endemisierung von *D. repens* untersucht werden. Insgesamt wurden 1023 Hundeblutproben sowie 195 Fuchsmilz- und 179 Fuchsblutproben im Zeitraum April 2013 bis September 2014 untersucht. Bei allen Proben erfolgte eine DNA-Isolation und im Anschluss verschiedene Polymerase-Kettenreaktionen (PCR), um das Vorkommen von Filarien, *Anaplasma phagozytophilum*, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia* spp. und Piroplasmen zu untersuchen.

In sechs von ingesamt 1023 untersuchten Hundeblutproben (0,6 %) wurde mittels PCR Filarien-DNA nachgewiesen, darunter in zwei Hunden *D. repens*, in zwei *D. immitis* und in zwei weiteren *Acanthocheilonema reconditum*. Einer der zwei positiven *D. repens* Hunde stammte aus einem Tierheim in Brandenburg, bei dem anderen Hund ist die Herkunft unbekannt.

Interessanterweise wiesen beide ITS-1 Sequenzen von *D. repens* 100 % Übereinstimmung mit *D. repens* bei einer durch Europa gereisten Japanerin auf. Zudem zeigten diese ITS-1 Sequenzen von *D. repens* eine 97 % bzw. 98 % genetische Ähnlichkeit zu der bisher nur in Hong Kong, China beschriebenen Spezies *Dirofilaria hongkongensis*. *A. phagocytophilum* wurde in 15 Hunden (1,5 %), *Candidatus* N. mikurensis in drei Hunden (0,3 %) und *E. canis* in einem Hund (0,1 %) detektiert. Letzterer wies zudem eine Koinfektion mit *D. repens* auf. Eine Infektion mit *Rickettsia* spp. wiesen 0,8 % der Hunde auf, darunter sieben mit *Rickettsia raoultii* und einer mit *Rickettsia felis*. Bei einem Hund (0,1 %) wurde *Babesia canis* nachgewiesen, es lagen jedoch keine weiteren Informationen zu der Herkunft vor.

In 85 (47,5 %) von insgesamt 179 untersuchten Rotfuchsblutproben wurden Piroplasmen nachgewiesen und dabei wurden 10 von 11 mittels Gensequenzierung weiter untersuchten positiven Proben als *Theileria annae* identifiziert. Bei einer weiteren Probe lag eine Kreuzreaktivität der PCR mit einer Kokzidie vor' diese Probe wurde als *Sarcocystis arctica*

identifiziert. Der Rotfuchs kann somit auch hierzulande als Reservoirwirt für *T. annae* angesehen werden. Für alle anderen Erreger aus der Studie waren die Fuchsproben negativ.

Ein Fragebogen für die Besitzer diente der Auskunft über Herkunft, erfolgte Reisen mit Hund und Parasitenprophylaxe. Insgesamt lagen Angaben hierzu von circa einem Viertel aller Besitzer aus der Studie vor. Es wurde bei der Auswertung ein hoher Anteil von hinsichtlich der Infestation mit Ektoparasiten ungeschützten Hunden mit 74,2 % (n = 233) identifiziert, da bei diesen Hunden keine Parasitenprophylaxe erfolgte. Bei der Herkunft der Hunde zeigte sich, dass 21,2 % (n = 236) der Hunde aus Tierheimen im In- oder Ausland stammten. Bei diesen Hunden konnte eine Herkunft aus potenziellen Endemiegebieten nicht ausgeschlossen werden. 102 Besitzer (41,6 %) gaben an, mit ihrem Hund (zum Teil) auf Reisen zu gehen (n = 245), 47 Besitzer (19,2 %) sind zudem mit ihrem Hund außerhalb von Deutschland auf Reisen (innerhalb und außerhalb der EU, n = 245).

Ein endemisches Vorkommen von *D. repens* bei Hunden oder Füchsen in Brandenburg konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Die Gefahr der Endemisierung ist jedoch als hoch anzusehen, da der Erreger wiederholt in Hunden und in Mücken aus dieser Region nachgewiesen wurde. Auch das Vorkommen weiterer "emerging pathogens", wie *Candidatus* N. mikurensis, wurde bei Hunden in dieser Studie nachgewiesen und der Erreger ist daher als potenzielles Risiko für den Hund, aber auch für den Menschen in dieser Region anzusehen.
Die mögliche Endemisierung von *D. repens* sowie aktuelle Prävalenzen von VBDs sollten Gegenstand weiterer, möglichst deutschlandweiter Untersuchungen sein, um das Infektionsrisiko für Mensch und Tier genauer einschätzen zu können.

Tier- als auch Humanmedizinern kommt dabei in der Forschung, Prophylaxe, Diagnostik sowie in der Therapie von VBDs eine zentrale Rolle zu. Die Basis hierfür stellt von tierärztlicher Seite die Aufklärung der Tierbesitzer über die Infektionen und über die Bedeutung einer medikamentösen Prophylaxe bei ihren Haustieren dar, die proaktiv angegangen werden sollte.

7. Summary

Vector-borne diseases in dogs and foxes from the federal state of Brandenburg, Germany

The zoonotic pathogen *Dirofilaria repens*, which is transmitted by mosquitos, has been found to date in eastern and southern regions of Europe. It is not considered to be endemic in Germany yet. In recent years, this parasite was found repeatedly in dogs from Brandenburg and Baden-Württemberg as well as in local mosquito species, amongst others in Brandenburg.

This situation was the starting point for the present study with the aim to examine the occurrence of *D. repens* and other pathogens transmitted by fleas, ticks or mosquitoes in dogs and red foxes from the federal state of Brandenburg. Particularly indications concerning the epidemiological situation and a possible endemisation of *D. repens* were obtained. During a time period from April 2013 to September 2014, a total of 1023 dog blood samples as well as 195 fox spleen- and 179 fox blood samples were examined. Therefore, DNA isolation was performed for all samples followed by different polymerase chain reactions (PCR) to detect filarial species, *Anaplasma phagozytophilum*, *Candidaus* Neoehrlichia mikurensis, *Ehrlichia canis, Rickettsia* spp. and piroplasms.

Filarial species were detected in six (0.6%) out of 1023 dogs, including two infected with *D. repens*, two harbouring *Dirofilaria immitis* and two other with *Acanthocheilonema reconditum*. One of the two positive *D. repens* dogs originated from an animal shelter in Brandenburg, but for the other one origin remained unknown.

Interestingly, both ITS-1 *D. repens* sequences showed a 100% identity to a *D. repens* sample obtained from a Japanese woman that travelled in Europe. They also showed 97% and 98% identity to a new species *Dirofilaria hongkongensis* that was so far only described from HongKong, China. An endemic occurence of *D. repens* in dogs or foxes in the federal state of Brandenburg was not confirmed in this study. Nevertheless, the risk remains high due to previous findings of the pathogen in mosquitoes and dogs. *A. phagocytophilum* was found in 15 dogs (1.5%), *Candidatus* N. mikurensis in three dogs (0.3%) and *E. canis* in one dog (0.1%). The *E. canis* positive dog (no. 117) also had a co-infection with *D. repens*. *Rickettsia* spp. were found with a frequency of 0.8% in dogs, confirming seven samples as *Rickettsia raoultii* and one as *Rickettsia felis*.

In 85 (47.5 %) out of 179 fox blood samples piroplasms were found and in 10 of 11 which were furthermore examined by gene sequencing, *Theileria annae* was identified. Another positive sample showed cross-reactivity to Coccidiae in the PCR and was then confirmed as *Sarcocystis arctica*. Thus, the red fox was confirmed as a reservoir host for *T. annae*, but fox

samples were negative for all the other pathogens of interest in the present study. In one dog (0.1 %), *Babesia canis* was detected but there was no further information about its origin.

A questionnaire for owners of patients should provide information about the origin, past journeys and parasite prevention measures. The evaluation identified a high proportion of 74.2 % (n = 233) of the dogs that were not protected from ectoparasite infestation by using an ectoparasiticide. 21.2 % (n = 236) of the dogs originated from inland or abroad shelters, and therefore might potentially come from endemic areas. 41.6 % of the owners were travelling (also partly) with their dog (n = 245) and 19.2% were travelling outside Germany (within or outside the European Union, n = 245).

An endemisation of *D. repens* in dogs and foxes from Brandenburg was not confirmed in this study. Nevertheless, the risk of endemisation is high since the pathogen was detected repeatedly in dogs and mosquitoes from this area. In addition, presence of other emerging pathogens as Candidatus N. mikurensis were detected in dogs in this study and must therefore be regarded as a potential risk for dogs and also for people in this region.
An endemisation of *D. repens* and current prevalences of VBDs should become subject of further investigations in order to assess the risk of infection for humans and animals more closely.

Veterinarians and also doctors of human medicine have a key role in research, prevention, diagnosis and therapy of VBDs. Especially veterinarians are responsible to inform owners about drugs preventing parasite infections in their dogs in a proactive way.

8. Literaturverzeichnis

Adaszek, L., Winiarczyk, S., 2008. Molecular characterization of Babesia canis canis isolates from naturally infected dogs in Poland. Veterinary parasitology 152, 235-241.

Aguirre, E., Sainz, A., Dunner, S., Amusategui, I., Lopez, L., Rodriguez-Franco, F., Luaces, I., Cortes, O., Tesouro, M.A., 2004. First isolation and molecular characterization of Ehrlichia canis in Spain. Veterinary parasitology 125, 365-372.

Aiello, A., Aiello, P., Aiello, F., 2005. A case of palpebral dirofilariasis. European journal of ophthalmology 15, 407-408.

Albonico, F., Loiacono, M., Gioia, G., Genchi, C., Genchi, M., Mortarino, M., 2014. Rapid differentiation of Dirofilaria immitis and Dirofilaria repens in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolution melting analysis. Veterinary parasitology 200, 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. Journal of clinical microbiology 39, 2237-2242.

Alexandre, N., Santos, A.S., Nuncio, M.S., Sousa, R., Boinas, F., Bacellar, F., 2009. Detection of Ehrlichia canis by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. Veterinary journal (London, England : 1997) 181, 343-344.

Allison, R.W., Little, S.E., 2013. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology 42, 127-144.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology 215, 403-410.

Antolova, D., Miterpakova, M., Paralicova, Z., 2015. Case of human Dirofilaria repens infection manifested by cutaneous larva migrans syndrome. Parasitology research.

Atwell, R.B., Sheridan, A.B., Baldock, F.C., 1988. An evaluation of the Dirochek test for detection of Dirofilaria immitis antigen in dogs. Australian veterinary journal 65, 161-162.

Auer, H., Susani, M., 2008. [The first autochthonous case of subcutaneous dirofilariosis in Austria]. Wiener klinische Wochenschrift 120, 104-106.

Bajer, A., Mierzejewska, E.J., Rodo, A., Bednarska, M., Kowalec, M., Welc-Faleciak, R., 2014. The risk of vector-borne infections in sled dogs associated with existing and new endemic areas in Poland: Part 1: A population study on sled dogs during the racing season. Veterinary parasitology 202, 276-286.

Bandi, C., Dunn, A.M., Hurst, G.D., Rigaud, T., 2001. Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. Trends in parasitology 17, 88-94.

Baneth, G., Bourdeau, P., Bourdoiseau, G., Bowman, D., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Dantas-Torres, F., Day, M., Dedet, J.P., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Kempf, V., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Maggi, R., Miro, G., Naucke, T., Oliva, G., Otranto, D., Penzhorn, B., Pfeffer, M., Roura, X., Sainz, A., Shaw, S., Shin, S., Solano-Gallego, L., Straubinger, R., Traub, R., Trees, A., Truyen, U., Demonceau, T., Fitzgerald, R., Gatti, D., Hostetler, J., Kilmer, B., Krieger, K., Mencke, N., Mendao, C., Mottier, L., Pachnicke, S., Rees, B., Siebert, S., Stanneck, D., Mingote, M.T., von Simson, C., Weston, S., Forum, C.W., 2012. Vector-borne diseases--constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. Parasites & vectors 5, 55.

Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L., Schnittger, L., 2015. Reclassification of Theileria annae as Babesia vulpes sp. nov. Parasites & vectors 8, 207.

Baneth, G., Volansky, Z., Anug, Y., Favia, G., Bain, O., Goldstein, R.E., Harrus, S., 2002. Dirofilaria repens infection in a dog: diagnosis and treatment with melarsomine and doramectin. Veterinary parasitology 105, 173-178.

Bartkova, A.D., Poliakova, L.F., Ermolenko, A.V., 2011. [Human dirofilariasis in the Primorye Territory]. Meditsinskaia parazitologiia i parazitarnye bolezni, 47-48.

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.

Bauer, C., Brahm, R., Daugschies, A., Kietzmann, M., Röcken, F.E., Schein, E., Schnieder, T., Wendland, B. 2009. ESCCAP - Deutsche Adaption der ESCCAP-Empfehlung Nr. 3, April 2009 : Bekämpfung von Ektoparasiten (Flöhe, Zecken, Läuse, Haarlinge, Sand- und Stechmücken) bei Hunden und Katzen.

Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculic, A., Beck, A., Zivicnjak, T., Caccio, S.M., 2009. Diversity of Babesia and Theileria species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. International journal for parasitology 39, 843-848.

Beck, S., Schreiber, C., Schein, E., Krucken, J., Baldermann, C., Pachnicke, S., von Samson-Himmelstjerna, G., Kohn, B., 2014. Tick infestation and prophylaxis of dogs in northeastern Germany: a prospective study. Ticks and tick-borne diseases 5, 336-342.

Becker, N., Kruger, A., Kuhn, C., Plenge-Bonig, A., Thomas, S.M., Schmidt-Chanasit, J., Tannich, E., 2014. [Mosquitoes as vectors for exotic pathogens in Germany]. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz 57, 531-540.

Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., Kaiser, A., 2010. Mosquitoes and Their Control, 2 Edition. Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Beugnet, F., Chalvet-Monfray, K., 2013. Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 36, 559-566.

Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in ecology & evolution 22, 148-155.

Boretti, F.S., Perreten, A., Meli, M.L., Cattori, V., Willi, B., Wengi, N., Hornok, S., Honegger, H., Hegglin, D., Woelfel, R., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2009. Molecular Investigations of Rickettsia helvetica Infection in Dogs, Foxes, Humans, and Ixodes Ticks. Applied and Environmental Microbiology 75, 3230-3237.

Bowman, D.D., 2011. Introduction to the alpha-proteobacteria: Wolbachia and Bartonella, Rickettsia, Brucella, Ehrlichia, and Anaplasma. Topics in companion animal medicine 26, 173-177.

Breitschwerdt, E.B., Abrams-Ogg, A.C., Lappin, M.R., Bienzle, D., Hancock, S.I., Cowan, S.M., Clooten, J.K., Hegarty, B.C., Hawkins, E.C., 2002. Molecular evidence supporting Ehrlichia canis-like infection in cats. Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine 16, 642-649.

Brianti, E., Gaglio, G., Napoli, E., Giannetto, S., Dantas-Torres, F., Bain, O., Otranto, D., 2012. New insights into the ecology and biology of Acanthocheilonema reconditum (Grassi, 1889) causing canine subcutaneous filariosis. Parasitology 139, 530-536.

Camacho, A.T., Pallas, E., Gestal, J.J., Guitian, F.J., Olmeda, A.S., Goethert, H.K., Telford, S.R., 2001. Infection of dogs in north-west Spain with a Babesia microti-like agent. The Veterinary record 149, 552-555.

Cancrini, G., Gabrielli, S. 2007. Vectors of Dirofilaria nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships (Naples, Veterinary Parasitology and Parasitic Diseases), pp. 47-58.

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. Parasites & vectors 5, 61.

Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2008. Babesia canis canis and Babesia canis vogeli infections in dogs from northern Portugal. Veterinary parasitology 156, 199-204.

Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H.C., Nachum-Biala, Y., Lopes, A.P., Vila-Vicosa, M.J., Simoes, M., Rodrigues, P.A., Baneth, G., 2015. First report of Anaplasma platys

infection in red foxes (Vulpes vulpes) and molecular detection of Ehrlichia canis and Leishmania infantum in foxes from Portugal. Parasites & vectors 8, 144.

Casiraghi, M., Anderson, T.J., Bandi, C., Bazzocchi, C., Genchi, C., 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. Parasitology 122 Pt 1, 93-103.

Chan, C.C., Kermanshahi, M.S., Mathew, B., England, R.J., 2013. A rare case of Dirofilaria repens infection. The Journal of laryngology and otology 127, 607-609.

Chauve, C.M., 1997. Importance in France of the infestation by Dirofilaria (Nochtiella) repens in dogs. Parassitologia 39, 393-395.

Cielecka, D., Zarnowska-Prymek, H., Masny, A., Salamatin, R., Wesolowska, M., Golab, E., 2012. Human dirofilariosis in Poland: the first cases of autochthonous infections with Dirofilaria repens. Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM 19, 445-450.

Cirovic, D., Penezic, A., Pavlovic, I., Kulisic, Z., Cosic, N., Burazerovic, J., Maletic, V., 2014. First records of Dirofilaria repens in wild canids from the region of Central Balkan. Acta veterinaria Hungarica 62, 481-488.

Clancey, N., Horney, B., Burton, S., Birkenheuer, A., McBurney, S., Tefft, K., 2010. Babesia (Theileria) annae in a red fox (Vulpes vulpes) from Prince Edward Island, Canada. Journal of wildlife diseases 46, 615-621.

Coleman, A.W., 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends in genetics : TIG 19, 370-375.

Confalonieri, U., Menne, B., Akhtar, R., Ebi, K.L., Hauengue, M., Kovats, R.S., Revich B, A., W., 2007. Human Health, In: Parry, M.L., Canziani, O.F., Palutikof, J.P., van der Linden, P.J., Hansson, C.E. (Eds.) Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 391-431.

Czajka, C., Becker, N., Jost, H., Poppert, S., Schmidt-Chanasit, J., Kruger, A., Tannich, E., 2014. Stable transmission of Dirofilaria repens nematodes, northern Germany. Emerging infectious diseases 20, 328-331.

Dautel, H., Dippel, C., Oehme, R., Hartelt, K., Schettler, E., 2006. Evidence for an increased geographical distribution of Dermacentor reticulatus in Germany and detection of Rickettsia sp. RpA4. International journal of medical microbiology : IJMM 296 Suppl 40, 149-156.

Deplazes, P., Bauer, C., Brahm, R., Daugschies, A., Kietzmann, M., Kohn, B., Moritz, A., Schnieder, T., Wendland, B. 2011. ESCCAP-Empfehlung zur Bekämpfung von durch Vektoren übertragenen Krankheiten bei Hunden und Katzen.

Deplazes, P., Eckert, J., Von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012a. Gattung Sarcocystis, In: Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Stuttgart, pp. 101 - 106.

Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012b. Ordnung Piroplasmida, In: Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Stuttgart, pp. 114-123.

Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012c. Stamm Arthropoda (Gliederfüßer), In: Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Stuttgart, pp. 372-492.

Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012d. Stamm Nematoda, In: Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag Stuttgart, pp. 340 - 346.

Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012e. Stamm Nematoda, In: Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin.Enke Verlag Stuttgart, pp. 235-239.

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. The Journal of infectious diseases 183, 773-778.

Di Cesare, A., Braun, G., Di Giulio, E., Paoletti, B., Aquilino, V., Bartolini, R., La Torre, F., Meloni, S., Drake, J., Pandolfi, F., Avolio, S., Traversa, D., 2014. Field clinical study evaluating the efficacy and safety of an oral formulation containing milbemycin oxime/praziquantel (Milbemax(R), Novartis Animal Health) in the chemoprevention of the zoonotic canine infection by Dirofilaria repens. Parasites & vectors 7, 347.

Di Cesare, A., Otranto, D., Di Giulio, E., Simonato, G., Latrofa, M.S., La Torre, F., Coccia, G., Traversa, D., 2013. Microfilarial periodicity of Dirofilaria repens in naturally infested dogs. Parasitology research 112, 4273-4279.

Diniz, P.P., Schulz, B.S., Hartmann, K., Breitschwerdt, E.B., 2011. "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" infection in a dog from Germany. Journal of clinical microbiology 49, 2059-2062.

Dobler, G., Wolfel, R., 2009. Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. Deutsches Arzteblatt international 106, 348-354.

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. International journal of systematic and evolutionary microbiology 51, 2145-2165.

Duscher, G., Fuehrer, H.P., Kubber-Heiss, A., 2014. Fox on the run inverted question mark molecular surveillance of fox blood and tissue for the occurrence of tick-borne pathogens in Austria. Parasites & vectors 7, 521.

Ebani, V.V., Verin, R., Fratini, F., Poli, A., Cerri, D., 2011. Molecular survey of Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia canis in red foxes (Vulpes vulpes) from central Italy. Journal of wildlife diseases 47, 699-703.

Eckert, J., Friedhoff, K.T., Deplazes, P., Zahner, H., 2005. Lehrbuch für Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Stuttgart.

Egenvall, A., Bjoersdorff, A., Lilliehook, I., Olsson Engvall, E., Karlstam, E., Artursson, K., Hedhammar, A., Gunnarsson, A., 1998. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish Ehrlichia species isolate. The Veterinary record 143, 412-417.

Egenvall, A., Lilliehook, I., Bjoersdorff, A., Engvall, E.O., Karlstam, E., Artursson, K., Heldtander, M., Gunnarsson, A., 2000. Detection of granulocytic Ehrlichia species DNA by PCR in persistently infected dogs. The Veterinary record 146, 186-190.

Farkas, R., Takacs, N., Hornyak, A., Nachum-Biala, Y., Hornok, S., Baneth, G., 2015. First report on Babesia cf. microti infection of red foxes (Vulpes vulpes) from Hungary. Parasites & vectors 8, 55.

Fingerle, V., Munderloh, U.G., Liegl, G., Wilske, B., 1999. Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with Borrelia burgdorferi in Ixodes ricinus from Southern Germany. Medical microbiology and immunology 188, 145-149.

Fishbein, D.B., Dawson, J.E., Robinson, L.E., 1994. Human ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. Annals of internal medicine 120, 736-743.

Fok, E., Jacso, O., Szebeni, Z., Gyorffy, A., Sukosd, L., Lukacs, Z., Schaper, R., 2010. Elimination of Dirofilaria (syn. Nochtiella) repens microfilariae in dogs with monthly treatments of moxidectin 2.5%/imidacloprid 10% (Advocate, Bayer) spot-on. Parasitology research 106, 1141-1149.

Foldvari, G., Hell, E., Farkas, R., 2005. Babesia canis canis in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. Veterinary parasitology 127, 221-226.

Fortin, J.F., Slocombe, J.O.D., 1981. Temperature requirements for the development of *Dirofilaria immitis* in *Aedes triseriatus* and *Ae. vexans*. Mosq. News 41, 625-633.

Fourie, J.J., Stanneck, D., Luus, H.G., Beugnet, F., Wijnveld, M., Jongejan, F., 2013. Transmission of Ehrlichia canis by Rhipicephalus sanguineus ticks feeding on dogs and on artificial membranes. Veterinary parasitology 197, 595-603.

Genchi, C., Genchi, M., Petry, G., Kruedewagen, E.M., Schaper, R., 2013. Evaluation of the efficacy of imidacloprid 10 % / moxidectin 2.5 % (Advocate(R), Advantage(R) Multi, Bayer) for the prevention of Dirofilaria repens infection in dogs. Parasitology research 112 Suppl 1, 81-89.

Genchi, C., Kramer, L.H., Rivasi, F., 2011a. Dirofilarial infections in Europe. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 11, 1307-1317.

Genchi, C., Mortarino, M., Rinaldi, L., Cringoli, G., Traldi, G., Genchi, M., 2011b. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of Dirofilaria in Europe. Veterinary parasitology 176, 295-299.

Giannelli, A., Ramos, R.A., Traversa, D., Brianti, E., Annoscia, G., Bastelli, F., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2013. Treatment of Dirofilaria repens microfilariaemia with a combination of doxycycline hyclate and ivermectin. Veterinary parasitology 197, 702-704.

Giannetto, S., Pampiglione, S., Santoro, V., Virga, A., 1997. Research of canine filariasis in Trapani province (western Sicily). Morphology on SEM of male Dirofilaria repens. Parassitologia 39, 403-405.

Gillis, J.M., Smith, R.D., Todd, K.S., Jr., 1984. Diagnostic criteria for an enzyme-linked immunosorbent assay for occult heartworm disease: standardization of the test system in naturally exposed dogs. American journal of veterinary research 45, 2289-2292.

Glatz, M., Mullegger, R.R., Maurer, F., Fingerle, V., Achermann, Y., Wilske, B., Bloemberg, G.V., 2014. Detection of Candidatus Neoehrlichia mikurensis, Borrelia burgdorferi sensu lato genospecies and Anaplasma phagocytophilum in a tick population from Austria. Ticks and tick-borne diseases 5, 139-144.

Gothe, R., Wegerdt, S., 1991. [Babesiosis of dogs in Germany: epidemiologic case analysis]. Tierarztliche Praxis 19, 170-173.

Grandi, G., Zivicnjak, T., Beck, R. 2007. Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. infections. In Mappe Parassitologiche 8, Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections (Naples, Italy, G. Cringoli), pp. 59-66.

Gratz, N.G., 2004. Critical review of the vector status of Aedes albopictus. Medical and veterinary entomology 18, 215-227.

Gray, J., von Stedingk, L.V., Gurtelschmid, M., Granstrom, M., 2002. Transmission studies of Babesia microti in Ixodes ricinus ticks and gerbils. Journal of clinical microbiology 40, 1259-1263.

Halos, L., Lebert, I., Abrial, D., Danlois, F., Garzik, K., Rodes, D., Schillmeier, M., Ducrot, C., Guillot, J., 2014. Questionnaire-based survey on the distribution and incidence of canine babesiosis in countries of Western Europe. Parasite (Paris, France) 21, 13.

Hamel, D., Rohrig, E., Pfister, K., 2011. Canine vector-borne disease in travelled dogs in Germany--a retrospective evaluation of laboratory data from the years 2004-2008. Veterinary parasitology 181, 31-36.

Hamel, D., Silaghi, C., Zapadynska, S., Kudrin, A., Pfister, K., 2013. Vector-borne pathogens in ticks and EDTA-blood samples collected from client-owned dogs, Kiev, Ukraine. Ticks and tick-borne diseases 4, 152-155.

Harrus, S., Baneth, G., 2005. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. International journal for parasitology 35, 1309-1318.

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 and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 7, 163-166.

Härtwig, V., Schulze, C., Pfeffer, M., Daugschies, A., Dyachenko, V., 2015. No evidence of Dirofilaria repens infection in red foxes (Vulpes vulpes) and raccoon dogs (Nyctereutes procyonoides) from Brandenburg, Germany. Parasitology research.

Härtwig, V., von Loewenich, F.D., Schulze, C., Straubinger, R.K., Daugschies, A., Dyachenko, V., 2014. Detection of Anaplasma phagocytophilum in red foxes (Vulpes vulpes) and raccoon dogs (Nyctereutes procyonoides) from Brandenburg, Germany. Ticks and tick-borne diseases 5, 277-280.

Haselbarth, K., Tenter, A.M., Brade, V., Krieger, G., Hunfeld, K.P., 2007. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. International journal of medical microbiology : IJMM 297, 197-204.

Hellmann, K., Heine, J., Braun, G., Paran-Dobesova, R., Svobodova, V., 2011. Evaluation of the therapeutic and preventive efficacy of 2.5 % moxidectin / 10 % imidacloprid (Advocate((R)), Bayer animal health) in dogs naturally infected or at risk of natural infection by Dirofilaria repens. Parasitology research 109 Suppl 1, S77-86.

Hermosilla, C., Pantchev, N., Dyachenko, V., Gutmann, M., Bauer, C., 2006. First autochthonous case of canine ocular Dirofilaria repens infection in Germany. The Veterinary record 158, 134-135.

Herwaldt, B.L., Caccio, S., Gherlinzoni, F., Aspock, H., Slemenda, S.B., Piccaluga, P., Martinelli, G., Edelhofer, R., Hollenstein, U., Poletti, G., Pampiglione, S., Loschenberger, K., Tura, S., Pieniazek, N.J., 2003. Molecular characterization of a non-Babesia divergens organism causing zoonotic babesiosis in Europe. Emerging infectious diseases 9, 942-948.

Heyman, P., Cochez, C., Hofhuis, A., van der Giessen, J., Sprong, H., Porter, S.R., Losson, B., Saegerman, C., Donoso-Mantke, O., Niedrig, M., Papa, A., 2010. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. Expert review of anti-infective therapy 8, 33-50.

Hildebrandt, A., Hunfeld, K.P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H.J., Straube, E., 2007. First confirmed autochthonous case of human Babesia microti infection in Europe. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 26, 595-601.

Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., 3rd, Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. Clinical microbiology reviews 13, 451-469.

Ionica, A.M., Matei, I.A., Mircean, V., Dumitrache, M.O., D'Amico, G., Gyorke, A., Pantchev, N., Annoscia, G., Albrechtova, K., Otranto, D., Modry, D., Mihalca, A.D., 2015. Current surveys on the prevalence and distribution of Dirofilaria spp. and Acanthocheilonema reconditum infections in dogs in Romania. Parasitology research 114, 975-982.

Irwin, P.J., 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. Parasites & vectors 2 Suppl 1, S4.

Jado, I., Oteo, J.A., Aldamiz, M., Gil, H., Escudero, R., Ibarra, V., Portu, J., Portillo, A., Lezaun, M.J., Garcia-Amil, C., Rodriguez-Moreno, I., Anda, P., 2007. Rickettsia monacensis and human disease, Spain. Emerging infectious diseases 13, 1405-1407.

Jensen, J., Simon, D., Murua Escobar, H., Soller, J.T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K., Nolte, I., 2007a. Anaplasma phagocytophilum in dogs in Germany. Zoonoses Public Health 54, 94-101.

Jensen, J., Simon, D., Murua Escobar, H., Soller, J.T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K., Nolte, I., 2007b. Anaplasma phagozytophilum in dogs in Germany. Zoonoses and Public Health 54, 94-101.

Jin, H., Wei, F., Liu, Q., Qian, J., 2012. Epidemiology and control of human granulocytic anaplasmosis: a systematic review. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 12, 269-274.

Johnson, K.A., 2010. The kinetic and chemical mechanism of high-fidelity DNA polymerases. Biochimica et biophysica acta 1804, 1041-1048.

Katavolos, P., Armstrong, P.M., Dawson, J.E., Telford, S.R., 3rd, 1998. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. The Journal of infectious diseases 177, 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. International journal of systematic and evolutionary microbiology 54, 1837-1843.

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. Veterinary parasitology 62, 331-340.

Khechine-Martinez, R., Doucet, C., Blanchard, S., Rouland, J.F., Labalette, P., 2009. [Subconjunctival dirofilariasis: a case report]. Journal francais d'ophtalmologie 32, 350.e351-354.

Knott, J., 1939. A method for making microfilarial survey on day blood Med. Hyg. 33, 191-196.

Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., Pfister, K., 2008. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine 22, 1289-1295.

Kohn, B., Silaghi, C., Galke, D., Arndt, G., Pfister, K., 2011. Infections with Anaplasma phagocytophilum in dogs in Germany. Research in veterinary science 91, 71-76.

Kowalski, J., Hopfenmuller, W., Fingerle, V., Malberg, H., Eisenblatter, M., Wagner, J., Miksits, K., Hahn, H., Ignatius, R., 2006. Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 12, 924-927.

Kramer, F., Mencke, N., 2011. [Climate change - a pioneer for the expansion of canine vector-borne diseases?]. Tierarztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere 39, 31-37.

Kronefeld, M., Kampen, H., Sassnau, R., Werner, D., 2014. Molecular detection of Dirofilaria immitis, Dirofilaria repens and Setaria tundra in mosquitoes from Germany. Parasites & 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". Journal of clinical microbiology 51, 1958-1961.

Lee, A.C., Bowman, D.D., Lucio-Forster, A., Beall, M.J., Liotta, J.L., Dillon, R., 2011. Evaluation of a new in-clinic method for the detection of canine heartworm antigen. Veterinary parasitology 177, 387-391.

Leonhard, S., 2005. Untersuchungen zur Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagozytophilum* und *Babesia spp.* in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg. LMU München, München.

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, 4606-4612.

Magi, M., Calderini, P., Gabrielli, S., Dell'Omodarme, M., Macchioni, F., Prati, M.C., Cancrini, G., 2008. Vulpes vulpes: a possible wild reservoir for zoonotic filariae. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 8, 249-252.

Maltezos, E.S., Sivridis, E.L., Giatromanolaki, A.N., Simopoulos, C.E., 2002. Human subcutaneous dirofilariasis: a report of three cases manifesting as breast or axillary nodules. Scottish medical journal 47, 86-88.

Manas, S., Ferrer, D., Castella, J., Maria Lopez-Martin, J., 2005. Cardiopulmonary helminth parasites of red foxes (Vulpes vulpes) in Catalonia, northeastern Spain. Veterinary journal (London, England : 1997) 169, 118-120.

Manfredi, M.T., Cerbo, A.d., Genchi, M. 2007. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats (Naples, Veterinary Parasitology and Parasitic Diseases), pp. 39-45.

Marusic, Z., Stastny, T., Kirac, I., Stojcevic, D., Kruslin, B., Tomas, D., 2008. Subcutaneous dirofilariasis caused by Dirofilaria repens diagnosed by histopathologic and polymerase chain reaction analysis. Acta dermatovenerologica Croatica : ADC 16, 222-225.

Matijatko, V., Torti, M., Schetters, T.P., 2012. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? Trends in parasitology 28, 99-105.

Mazurkevich, A., Vasylyk, N., Avramenko, T., Velichko, S., Tarello, W., Varodi, E., 2004. Adult Dirofilaria repens nematodes in a cat from Kiev, Ukraine. The Veterinary record 155, 638-639.

McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. Advances in parasitology 66, 193-285.

McQuiston, J.H., Childs, J.E., Chamberland, M.E., Tabor, E., 2000. Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States. Transfusion 40, 274-284.

Mencke, N., 2013. Future challenges for parasitology: vector control and 'One health' in Europe: the veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis. Veterinary parasitology 195, 256-271.

Menn, B., Lorentz, S., Naucke, T.J., 2010. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. Parasites & vectors 3, 7.

Miro, G., Checa, R., Paparini, 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. Parasites & vectors 8, 217.

Miterpakova, M., Antolova, D., Hurnikova, Z., Dubinsky, P., Pavlacka, A., Nemeth, J., 2010. Dirofilaria infections in working dogs in Slovakia. Journal of helminthology 84, 173-176.

MMWR, 2011. Summary of notifiable diseases - United States, 2009. Morb. Mortal. Wkly Rep. 58, 20.

Mülhardt, C., 2013a. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), In: Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics.Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 81-112.

Mülhardt, C., 2013b. Gele, In: Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics. Springer Spektrum Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 58-65.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 51 Pt 1, 263-273.

Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Billinis, C., Leontides, L.S., Kontos, V., Papadopoulos, O., Rallis, T., Fytianou, A., 2003. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a comparison between five methods. Veterinary microbiology 91, 197-204.

Najm, N.A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Herb, I., Fensterer, V., Pfister, K., Silaghi, C., 2014. A molecular survey of Babesia spp. and Theileria spp. in red foxes (Vulpes vulpes) and their ticks from Thuringia, Germany. Ticks and tick-borne diseases 5, 386-391.

Nelson, C.T., McCall, J.W., Carithers, D., Jones, S., Graham, W., von Simson, C., Stannard, R., Payne, P., Rehm, C., Smith-Blackmore, M., Clyde, E., Zaffarano, B., Miller, M., Atkins, C., Loenser, M., Rumschlag, T. 2014. Current Canine Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection in Dogs.

Nijhof, A.M., Penzhorn, B.L., Lynen, G., Mollel, J.O., Morkel, P., Bekker, C.P., Jongejan, F., 2003. Babesia bicornis sp. nov. and Theileria bicornis sp. nov.: tick-borne parasites associated with mortality in the black rhinoceros (Diceros bicornis). Journal of clinical microbiology 41, 2249-2254.

Nilsson, K., 2009. Septicaemia with Rickettsia helvetica in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia. The Journal of infection 58, 79-82.

Nilsson, K., Lindquist, O., Pahlson, C., 1999. Association of Rickettsia helvetica with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. Lancet 354, 1169-1173.

Novakova, M., Vichova, B., Majlathova, V., Lesnakova, A., Pochybova, M., Petko, B., 2010. First case of human granulocytic anaplasmosis from Slovakia. Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM 17, 173-175.

Nuchprayoon, S., Junpee, A., Poovorawan, Y., Scott, A.L., 2005. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. The American journal of tropical medicine and hygiene 73, 895-900.

Orihel, T.C., Eberhard, M.L., 1998. Zoonotic filariasis. Clinical microbiology reviews 11, 366-381.

Oteo, J.A., Blanco, J.R., Martinez de Artola, V., Ibarra, V., 2000. First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). Emerging infectious diseases 6, 430-432.

Oteo, J.A., Portillo, A., 2012. Tick-borne rickettsioses in Europe. Ticks and tick-borne diseases 3, 271-278.

Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petric, D., Genchi, C., Capelli, G., 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. Parasites & vectors 6, 16.

Overgaauw, P., van Dijk, E., 2009. Autochthonous case of Dirofilaria repens in a dog in the Netherlands. The Veterinary record 164, 158.

Overzier, E., Pfister, K., Herb, I., Mahling, M., Bock, G., Jr., Silaghi, C., 2013a. Detection of tick-borne pathogens in roe deer (Capreolus capreolus), in questing ticks (Ixodes ricinus), and in ticks infesting roe deer in southern Germany. Ticks and tick-borne diseases 4, 320-328.

Overzier, E., Pfister, K., Thiel, C., Herb, I., Mahling, M., Silaghi, C., 2013b. Diversity of Babesia and Rickettsia species in questing Ixodes ricinus: a longitudinal study in urban, pasture, and natural habitats. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 13, 559-564.

Pampiglione, S., Rivasi, F., 2000. Human dirofilariasis due to Dirofilaria (Nochtiella) repens: an update of world literature from 1995 to 2000. Parassitologia 42, 231-254.

Pampiglione, S., Rivasi, F., Angeli, G., Boldorini, R., Incensati, R.M., Pastormerlo, M., Pavesi, M., Ramponi, A., 2001. Dirofilariasis due to Dirofilaria repens in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. Histopathology 38, 344-354.

Pampiglione, S., Rivasi, F., Gustinelli, A., 2009. Dirofilarial human cases in the Old World, attributed to Dirofilaria immitis: a critical analysis. Histopathology 54, 192-204.

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. Annals of the New York Academy of Sciences 990, 107-111.

Pantchev, N., Etzold, M., Daugschies, A., Dyachenko, V., 2011. Diagnosis of imported canine filarial infections in Germany 2008 - 2010. Parasitology research 109 Suppl 1, S61-76.

Pantchev, N., Norden, N., Lorentzen, L., Rossi, M., Rossi, U., Brand, B., Dyachenko, V., 2009a. Current surveys on the prevalence and distribution of Dirofilaria spp. in dogs in Germany. Parasitology research 105 Suppl 1, S63-74.

Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M., Lorentzen, L., 2009b. Occurrence of Dirofilaria immitis and tick-borne infections caused by Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi sensu lato and Ehrlichia canis in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. Parasitology research 105 Suppl 1, S101-114.

Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. Clinical microbiology reviews 26, 657-702.

Parte, A.C., 2014. LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Nucleic acids research 42, D613-616.

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. Diagnostic microbiology and infectious disease 69, 266-270.

Penezic, A., Selakovic, S., Pavlovic, I., Cirovic, D., 2014. First findings and prevalence of adult heartworms (Dirofilaria immitis) in wild carnivores from Serbia. Parasitology research 113, 3281-3285.

Peribanez, M.A., Lucientes, J., Arce, S., Morales, M., Castillo, J.A., Gracia, M.J., 2001. Histochemical differentiation of Dirofilaria immitis, Dirofilaria repens and Acanthocheilonema dracunculoides microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP. Veterinary parasitology 102, 173-175.

Pichon, B., Kahl, O., Hammer, B., Gray, J.S., 2006. Pathogens and host DNA in Ixodes ricinus nymphal ticks from a German forest. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 6, 382-387.

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 and tick-borne diseases 1, 145-147.

Ponyai, K., Wikonkal, N., Bottlik, G., Harsing, J., Kucsera, I., Horvath, A., Karpati, S., 2006. Dirofilaria repens infection case in Hungary: a case report. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG 4, 1051-1053.

Poppert, S., Hodapp, M., Krueger, A., Hegasy, G., Niesen, W.D., Kern, W.V., Tannich, E., 2009. Dirofilaria repens infection and concomitant meningoencephalitis. Emerging infectious diseases 15, 1844-1846.

Pusterla, N., Huder, J.B., Lutz, H., Braun, U., 1998. Detection of Ehrlichia phagocytophila DNA in Ixodes ricinus ticks from areas in Switzerland where tick-borne fever is endemic. Journal of clinical microbiology 36, 2735-2736.

Raoult, D., Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clinical microbiology reviews 10, 694-719.

Rar, V., Golovljova, I., 2011. Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 11, 1842-1861.

Reinard, T., 2010. Quantifizierung von Nukleinsäuren, In: Molekularbiologische Methoden. Ulmer UTB Verlag, Stuttgart, pp. 75-78.

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. Veterinary parasitology 135, 303-314.

Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubalek, Z., Foldvari, G., Plantard, O., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Spitalska, E., Kazimirova, M., 2014. Ixodes ricinus and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. Frontiers in public health 2, 251.

Rohrig, E., Hamel, D., Pfister, K., 2011. Retrospective evaluation of laboratory data on canine vector-borne infections from the years 2004-2008. Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift 124, 411-418.

Rolle, M., Mayr, A., 2007. 5.1.9 Rickettsiales, In: Mayr, A. (Ed.) Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart, pp. 554-555.

Rossi, L., Pollono, F., Meneguz, P.G., Gribaudo, L., Balbo, T., 1996. An epidemiological study of canine filarioses in north-west Italy: what has changed in 25 years? Veterinary research communications 20, 308-315.

Rubel, F., Brugger, K., Monazahian, M., Habedank, B., Dautel, H., Leverenz, S., Kahl, O., 2014. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. Parasites & vectors 7, 477.

Sainz, A., Roura, X., Miro, G., Estrada-Pena, A., Kohn, B., Harrus, S., Solano-Gallego, L., 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasites & vectors 8, 75.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74, 5463-5467.

Sanogo, Y.O., Parola, P., Shpynov, S., Camicas, J.L., Brouqui, P., Caruso, G., Raoult, D., 2003. Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in northeastern Italy. Annals of the New York Academy of Sciences 990, 182-190.

Sassnau, R., Czajka, C., Kronefeld, M., Werner, D., Genchi, C., Tannich, E., Kampen, H., 2014a. Dirofilaria repens and Dirofilaria immitis DNA findings in mosquitoes in Germany: temperature data allow autochthonous extrinsic development. Parasitology research 113, 3057-3061.

Sassnau, R., Daugschies, A., Lendner, M., Genchi, C., 2014b. Climate suitability for the transmission of Dirofilaria immitis and D. repens in Germany. Veterinary parasitology 205, 239-245.

Sassnau, R., Dyachenko, V., Pantchev, N., Stöckel, F., Dittmar, K., Daugschies, A., 2009. Dirofilaria-repens-Befall in einem Schlittenhunde-Rudel im Land Brandenburg - Diagnose und Therapie der kaninen kutanen Dirofilariose. Tierärztliche Praxis Kleintiere 37, 95-101.

Sassnau, R., Genchi, C., 2013. Qualitative risk assessment for the endemisation of Dirofilaria repens in the state of Brandenburg (Germany) based on temperature-dependent vector competence. Parasitology research 112, 2647-2652.

Sassnau, R., Kohn, M., Demeler, J., Kohn, B., Muller, E., Krucken, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2013a. Is Dirofilaria repens endemic in the Havelland district in Brandenburg, Germany? Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 13, 888-891.

Sassnau, R., Kohn, M., Demeler, J., Kohn, B., Muller, E., Krucken, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2013b. Is Dirofilaria repens Endemic in the Havelland District in Brandenburg, Germany? Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.).

Savic, S., Vidic, B., Grgic, Z., Potkonjak, A., Spasojevic, L., 2014. Emerging Vector-Borne Diseases - Incidence through Vectors. Frontiers in public health 2, 267.

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. Journal of clinical microbiology 37, 2215-2222.

Schreiber, C., Krucken, 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. Parasites & vectors 7, 535.

Segovia, J.M., Torres, J., Miquel, J., Llaneza, L., Feliu, C., 2001. Helminths in the wolf, Canis lupus, from north-western Spain. Journal of helminthology 75, 183-192.

Semenza, J.C., Menne, B., 2009. Climate change and infectious diseases in Europe. The Lancet Infectious Diseases 9, 365-375.

Semenza, J.C., Zeller, H., 2014. Integrated surveillance for prevention and control of emerging vector-borne diseases in Europe. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 19.

Silaghi, C., Gilles, J., Hohle, M., Pradel, I., Just, F.T., Fingerle, V., Kuchenhoff, H., Pfister, K., 2008. Prevalence of spotted fever group rickettsiae in Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in southern Germany. Journal of medical entomology 45, 948-955.

Silaghi, C., Woll, D., Mahling, M., Pfister, K., Pfeffer, M., 2012. Candidatus Neoehrlichia mikurensis in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks Ixodes ricinus and Dermacentor reticulatus, Germany. Parasites & vectors 5, 285.

Simoes, P.B., Cardoso, L., Araujo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2011. Babesiosis due to the canine Babesia microti-like small piroplasm in dogs-first report from Portugal and possible vertical transmission. Parasites & vectors 4, 50.

Simon, F., Lopez-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Morchon, R., Martin-Pacho, J.R., 2005. What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? Veterinary parasitology 133, 181-189.

Simon, F., Morchon, R., Gonzalez-Miguel, J., Marcos-Atxutegi, C., Siles-Lucas, M., 2009. What is new about animal and human dirofilariosis? Trends in parasitology 25, 404-409.

Simon, F., Siles-Lucas, M., Morchon, R., Gonzalez-Miguel, J., Mellado, I., Carreton, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. Clinical microbiology reviews 25, 507-544.

Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Di Sacco, B., Damiani, G., Genchi, C., 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont Wolbachia in a filarial worm. Molecular and biochemical parasitology 74, 223-227.

Skarphedinsson, S., Lyholm, B.F., Ljungberg, M., Sogaard, P., Kolmos, H.J., Nielsen, L.P., 2007. Detection and identification of Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi, and Rickettsia helvetica in Danish Ixodes ricinus ticks. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 115, 225-230.

Skotarczak, B., 2003. Canine ehrlichiosis. Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM 10, 137-141.

Sood, S.K., Salzman, M.B., Johnson, B.J., Happ, C.M., Feig, K., Carmody, L., Rubin, L.G., Hilton, E., Piesman, J., 1997. Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic. The Journal of infectious diseases 175, 996-999.

Stenos, J., Graves, S.R., Unsworth, N.B., 2005. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae. The American journal of tropical medicine and hygiene 73, 1083-1085.

Stuen, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013. Anaplasma phagocytophilum--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Frontiers in cellular and infection microbiology 3, 31.

Suk, J.E., Semenza, J.C., 2014. From global to local: vector-borne disease in an interconnected world. European journal of public health 24, 531-532.

Sullivan, K.M., Dean, A., Soe, M.M., 2009. OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health. Public health reports (Washington, D.C. : 1974) 124, 471-474.

Suzuki, J., Kobayashi, S., Okata, U., Matsuzaki, H., Mori, M., Chen, K.R., Iwata, S., 2015. Molecular analysis of Dirofilaria repens removed from a subcutaneous nodule in a Japanese woman after a tour to Europe. Parasite (Paris, France) 22, 2.

Tabar, M.D., Francino, O., Altet, L., Sanchez, A., Ferrer, L., Roura, X., 2009. PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. The Veterinary record 164, 112-116.

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 surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 19, 2-4.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. Parasites of Dogs and Cats, In: Veterinary Parasitology. Blackwell Publishing, p. 435.

Taylor, M.J., Hoerauf, A., 1999. Wolbachia bacteria of filarial nematodes. Parasitology today (Personal ed.) 15, 437-442.

To, K.K., Wong, S.S., Poon, R.W., Trendell-Smith, N.J., Ngan, A.H., Lam, J.W., Tang, T.H., AhChong, A.K., Kan, J.C., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2012. A novel Dirofilaria species causing human and canine infections in Hong Kong. Journal of clinical microbiology 50, 3534-3541.

Tolnai, Z., Szell, Z., Sproch, A., Szeredi, L., Sreter, T., 2014. Dirofilaria immitis: an emerging parasite in dogs, red foxes and golden jackals in Hungary. Veterinary parasitology 203, 339-342.

Torina, A., Blanda, V., Antoci, F., Scimeca, S., D'Agostino, R., Scariano, E., Piazza, A., Galluzzo, P., Giudice, E., Caracappa, S., 2013. A Molecular survey of Anaplasma spp., Rickettsia spp., Ehrlichia canis and Babesia microti in foxes and fleas from Sicily. Transboundary and emerging diseases 60 Suppl 2, 125-130.

Traversa, D., Aste, G., Di Cesare, A., Paoletti, B., Di Tommaso, M., Di Giulio, E., Pampurini, F., Tunesi, C., Boari, A., 2011. Efficacy of a single administration of a spot-on solution containing imidacloprid 10%/moxidectin 2.5% in eliminating Dirofilaria repens microfilariae in naturally infected dogs. Veterinary parasitology 179, 107-112.

Trotta, M., Fogliazza, A., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., 2009. A molecular and serological study of exposure to tick-borne pathogens in sick dogs from Italy. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15 Suppl 2, 62-63.

Trotz-Williams, L.A., Trees, A.J., 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. The Veterinary record 152, 97-105.

Tylewska-Wierzbanowska, S., Chmielewski, T., Kondrusik, M., Hermanowska-Szpakowicz, T., Sawicki, W., Sulek, K., 2001. First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 20, 196-198.

Vakalis, N.C., Himonas, C.A., 1997. Human and canine dirofilariasis in Greece. Parassitologia 39, 389-391.

Vogl, U.M., Presterl, E., Stanek, G., Ramharter, M., Gattringer, K.B., Graninger, W., 2010. First described case of human granulocytic anaplasmosis in a patient in Eastern Austria. Wiener medizinische Wochenschrift (1946) 160, 91-93.

von Loewenich, F.D., Geissdorfer, W., Disque, C., Matten, J., Schett, G., Sakka, S.G., Bogdan, C., 2010. Detection of "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. Journal of clinical microbiology 48, 2630-2635.

Wächter, M., Pfeffer, M., Schulz, N., Balling, A., Chirek, A., Bach, J.P., Moritz, A., Kohn, B., Pachnicke, S., Silaghi, C., 2015. Seroprevalence of spotted Fever group rickettsiae in dogs in Germany. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 15, 191-194.

Webber, W.A., Hawking, F., 1955. Experimental maintenance of Dirofilaria repens and D. immitis in dogs. Experimental parasitology 4, 143-164.

Welinder-Olsson, C., Kjellin, E., Vaht, K., Jacobsson, S., Wenneras, C., 2010. First case of human "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. Journal of clinical microbiology 48, 1956-1959.

Welzl, C., Leisewitz, A.L., Jacobson, L.S., Vaughan-Scott, T., Myburgh, E., 2001. Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. Journal of the South African Veterinary Association 72, 158-162.

Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P., 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. BioTechniques 22, 474-476, 478-481.

Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Pryor, R.J., 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. Clinical chemistry 49, 853-860.

Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of Anaplasma phagocytophilum. Veterinary parasitology 167, 108-122.

Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., Gothe, R., 2000. Detection of a new pathogenic Babesia microti-like species in dogs. Veterinary parasitology 89, 241-248.

Zarnowska-Prymek, H., Cielecka, D., Salamatin, R., 2008. [Dirofilariasis--Dirofilaria repens--first time described in Polish patients]. Przeglad epidemiologiczny 62, 547-551.

Zeller, H., Marrama, L., Sudre, B., Van Bortel, W., Warns-Petit, E., 2013. Mosquito-borne disease surveillance by the European Centre for Disease Prevention and Control. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 19, 693-698.

9. Publikationsverzeichnis

Publikation

Liesner, J.M., Krücken, J., Schaper, R., Pachnicke, S., Kohn, B., Müller, E., Schulze, C., von Samson-Himmelstjerna, G., 2016. Vector-borne pathogens in dogs and red foxes from the federal state of Brandenburg, Germany. Veterinary parasitology 224, 44-51.

Conference Proceedings

Liesner, J.M., Krücken, J., Schaper, R., Pachnicke, S., Kohn, B., Müller, E., Schulze, C., von Samson-Himmelstjerna, G., 2015. Arthropoden-übertragene Krankheitserreger bei Hunden und Füchsen aus Brandenburg. In: Tagungsband zur Tagung der DVG-Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten" 29. Juni bis 1. Juli 2015 in Stralsund - Veterinärparasitologie heute: Aktuelle Probleme, neue Forschungsergebnisse, Konsequenzen für die Praxis, Stralsund. ISBN 978-3-86345-261-2 S. 39-40

Vortrag

Liesner, J.M., Krücken, J., Schaper, R., Pachnicke, S., Kohn, B., Müller, E., Schulze, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Arthropoden-übertragene Krankheitserreger bei Hunden und Füchsen aus Brandenburg. Tagung der DVG-Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten" 29. Juni bis 1. Juli 2015 in Stralsund - Veterinärparasitologie heute: Aktuelle Probleme, neue Forschungsergebnisse, Konsequenzen für die Praxis, Stralsund.

10. Anhang

10.1 Therapieplan für eine nachgewiesene *D. immitis* Infektion

Tabelle 23: Therapieplan für D. immitis, modiziert nach "Current canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (D. immitis) infection in dogs" Copyright © 2014 American Heartworm Society

Therapieplan bei nachgewiesener *D. immitis* Infektion
Tag 0
Hund mit klinischen Symptomen: Prednison 0,5 mg/kg 2 × tägl. in der 1. Woche, 0,5 mg/kg 1 × tägl. in der 2. Woche, jeden 2. Tag 0,5 mg/kg in der 3.- 4. Woche, Bewegungsrestriktion sowie ggf. weitere unterstützende Maßnahmen
Tag 1
Herzwurm-Prophylaxe (Makrozyklisches Lakton) bei Nachweis von Mf: zuvor Gabe von Antihistamin und Glucocortikosteroid, falls noch kein Prednison verabreicht wurde. Beobachtung des Patienten (mind. 8 Stunden)
Tag 1 - 28
Doxycyclin 10 mg/kg 2 × tägl. für 4 Wochen
Tag 30
Herzwurm-Prophylaxe (Makrozyklisches Lakton)
Tag 60
Herzwurm-Prophylaxe (Makrozyklisches Lakton) 1. Gabe von Melarsamin 2,5 mg/kg i.m. Prednison 0,5 mg/kg 2 × tägl. 1. Woche, 0,5 mg/kg 1 × tägl. 2. Woche, 0,5 mg/kg jeden 2. Tag in der 3. und 4. Woche, Boxenruhe
Tag 90
Herzwurm-Prophylaxe (Makrozyklisches Lakton) 2. Gabe von Melarsamin 2,5 mg/kg i.m.
Tag 91
3. Gabe von Melarsamin 2,5 mg/kg i.m. Prednison 0,5 mg/kg 2 × tägl. 1. Woche, 0,5 mg/kg 1 x tägl. 2. Woche, 0,5 mg/kg jeden 2. Tag in der 3. und 4. Woche, Bewegungsrestriktion 6 - 8 Wochen
Tag 120
Test auf Nachweis von Mf, wenn positiv: Makrozylisches Lakton, Test nach 4 Wochen wiederholen, ganzjährige Herzwurm-Prophylaxe
Tag 271 Antigen-Test und Test auf Nachweis von Mf

10.2 Fragebogen für Patientenbesitzer

Fragebogen

1 Startseite

Vorkommen und Saisonalität von durch Arthropoden übertragenen Krankheitserregern bei Hunden

2 Demographie

Patient

Welches Geschlecht hat der Hund? Ist der Hund kastriert?

Bitte kreuzen Sie das zutreffende an!

männlich | weiblich | männlich kastriert | weiblich kastriert

Wann ist der Hund geboren?

Geben Sie das Geburtsdatum wie folgt DD/MM/JJJJ an.

Bitte benennen Sie die Rasse des Hundes!

Woher stammt der Hund?

Bitte benennen Sie entsprechendes in der dafür vorgesehenden Zeile!

Geburtsort (wenn bekannt)	
Tierheim (Inland)	
eingetragener Züchter	
Tierheim (Ausland)	
sonstiges	

3 Lebensumfeld

In welchem Ort lebt der Hund?

Bitte Postleitzahl angeben!

In welchem Wohnumfeld hält sich der Hund auf?

Bitte kreuzen Sie alles Zutreffende an! Mehrfachnennungen sind möglich.

- in Wohnung/ Haus
- Garten/ Grundstück
- Wassernähe (Fließgewässer, Kanal, Teich)
- Wald
- Feld/ Wiesen
- in der Nähe von Tierhaltungen (z.B. landwirtschaftliche Nutztiere)
- anderes Umfeld und zwar:

4 Reisegewohnheiten

Werden Reisen mit Ihrem Hund unternommen?

Bitte ein Kreuz an der entsprechenden Stelle machen

- ○ Ja, jede Reise wird mit Hund unternommen
- ○ zum Teil mit Hund, zum Teil ohne Hund
- ○ nein für den Hund gibt es keine Änderung des gewohnten Umfeldes

Auf welchen Reisen begleitet Sie der Hund?

Bitte ein Kreuz machen und entsprechendes in die Zeile eintragen.

nur in Brandenburg	
außerhalb Brandenburg (Inland)	
außerhalb Brandenburg (EU-Land)	
außerhalb Brandenburg (nicht EU-Land)	

Zu welcher Jahreszeit verreisen Sie mit ihrem Hund?

	nie	eher selten	eher häufig	sehr häufig
Frühjahr	○	○	○	○
Sommer	○	○	○	○
Herbst	○	○	○	○
Winter	○	○	○	○

5 Behandlungen

Ist es wahrscheinlich, dass der Hund mit einem der studienrelevanten Erreger infiziert ist?
Und wenn ja, warum?

Bitte entsprechendes mit Begründung markieren
(z.B. Zeckeninfestation und Auslandsaufenthalt)!

klinisch unauffällig	
klinisch verdächtig	
Infektion nachgewiesen	
infiziert und erkrankt	
sonstiges	

Wurde in letzter Zeit gegen Parasiten behandelt?

Bitte tragen Sie die Zeit der Behandlung und das Präparat ein!

Bitte tragen Sie das Datum der Probenentnahme ein!

6 Endseite

Das war's!

10.3 geographische Herkunft der Hunde- und Fuchsproben nach Landkreisen

10.3.1 Hundeblutproben

Tabelle 24: geographische Herkunft der Hundeblutproben nach Landkreisen und kreisfreien Städten

Landkreis	Probenanzahl
Brandenburg an der Havel	32
Cottbus	2
Frankfurt (Oder)	3
Potsdam	226
Barnim	8
Dahme-Spreewald	36
Elbe-Elster	0
Havelland	423
Märkisch-Oderland	23
Oberhavel	36
Oberspreewald-Lausitz	3
Oder-Spree	8
Ostprignitz-Ruppin	16
Potsdam-Mittelmark	121
Prignitz	21
Spree-Neiße	3
Teltow-Fläming	52
Uckermark	10

10.3.2 Fuchsproben

199 Angaben

Tabelle 25: geographische Verteilung der Fuchsproben nach Landkreisen und kreisfreien Städten

Landkreis	Probenanzahl
Brandenburg an der Havel	2
Cottbus	2
Frankfurt (Oder)	3
Potsdam	1
Barnim	4
Dahme-Spreewald	15
Elbe-Elster	30
Havelland	6
Märkisch-Oderland	16
Oberhavel	11
Oberspreewald-Lausitz	9
Oder-Spree	15
Ostprignitz-Ruppin	9
Potsdam-Mittelmark	20
Prignitz	10
Spree-Neiße	18
Teltow-Fläming	7
Uckermark	21

10.4 Parasitenprophylaxe: studienrelevante Wirkstoffgruppen, Beispiele für Wirkstoffe und ihre Wirkung auf Arthropoden

Tabelle 26: studienrelevante Wirkstoffgruppen, Beispiele für Wirkstoffe und ihre Wirkung auf Arthropoden

Wirkstoffgruppe und Beispiele für Wirkstoffe	Wirkung auf Arthropoden
Isoxazoline - Afoxolaner	Hemmung des prä- und postsynaptischen Chloridionenaustausches, insb. an GABA-gesteuerten Chloridkanälen -> gestörte ZNS-Aktivität -> Tod
Formamidine - Amitraz	Wirkung auf Oktopamin-Rezeptoren im Nervensystem (vermutlich)
Makrozyklische Laktone Avermectine - Ivermectin, Selamectin Milbemycine - Milbemycinoxim, Moxidectin	Wirkstoffe binden selektiv an Glutamat-kontrollierte Chloridkanäle -> Cl^- - Einstrom -> Hyperpolarisation -> Paralyse -> Tod
Nikotinoide - Imidacloprid	Nikotinartige Acetylcholin-Rezeptoren werden blockiert (cholinerger Agonist)
Phenylpyrazole - Fipronil	Wirkstoff bindet an GABA-gesteuerte Chloridkanäle -> Übererregung -> Paralyse
Pyrethroide - Deltamethrin, Flumethrin, Permethrin	Na^+ - Kanäle bleiben geöffnet -> Einströmen von Na^+ -> Depolarisation verzögert -> Erregung -> Paralyse -> Tod

10.5 Mid p-Exact Test

Tabelle 27: Ergebnisse Mid p-Exact Test

miteinander verglichene Gruppen	p-Wert
weiblich/männlich	0,120
nicht-kastriert/kastriert	0,242
männlich: nicht kastriert/kastriert	0,125
weiblich: nicht kastriert/kastriert	0,286
Alter: jung/mittel	0,167
Alter: jung/alt	0,452
Alter: mittel/alt	0,378
Risikogruppe Wohnumfeld	
Haus/ draußen	0,406
Risikogruppe Reisen ja (egal wann)/ nie	0,719
Rasse Mischling/reinrassig	0,015
Parasitenprophylaxe nein/ja	0,210
Infektionswahrscheinlichkeit	
Unauffällig/verdächtig	0,218
Unauffällig/ verdächtig + nachgewiesen + erkrankt	0,183

10.6 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. von Samson-Himmelstjerna möchte ich mich für die Vergabe dieser interessanten Doktorarbeit sowie für das entgegengebrachte Vertrauen in mich als Mitarbeiterin und den stets freundlichen, wertschätzenden und motivierenden Umgang bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Krücken, der mit großem Einsatz und noch viel größerer Geduld jederzeit meine Fragen rund um die Laborarbeit beantwortete und darüber hinaus viele hilfreiche Anregungen bei der Korrektur dieses Skripts gegeben hat.

Frau Juniorprofessorin Dr. Demeler danke ich für ihre zahlreichen konstruktiven Vorschläge während der gesamten Studie.

Bei Frau Professorin Dr. Kohn sowie den Labormitarbeitern aus der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin möchte ich mich für die Bereitstellung der Hundeblutproben für diese Studie herzlich bedanken.
Ein großes Dankeschön geht außerdem an Frau Dr. Müller und Frau Dr. Wölms von der Firma LABOKLIN GmbH und Co. KG, die eine Einsendung von weiteren Hundeblutproben ermöglicht haben. Herrn Dr. Schulze vom Landeslabor Berlin-Brandenburg danke ich sehr für die Sammlung der Fuchsproben. Allen teilnehmenden Tierarztpraxen und Hundebesitzern aus Brandenburg einen herzlichen Dank für eingesandte Proben und die freundliche Zusammenarbeit.

Meinen Mitdoktoranden danke ich für die tolle und lustige Zeit am Institut, die von großem Zusammenhalt und gegenseitiger Motivation (und mit Motivation meine ich manchmal auch Ablenkung) geprägt war. Hier möchte ich insbesondere Basti, Sofia und JaJa erwähnen. Es war schön mit euch!
Auch den anderen Mitarbeitern am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin danke ich für den stets kollegialen Umgang miteinander, besonders Frau Ramünke für die Einarbeitung im Labor sowie Frau Seidl für ihre Fotografierkünste der Mikrofilarien. Louise, die vielen Office-Stunden mit dir haben mir auch sehr viel Freude bereitet!

Auf meinem Weg zur Tierärztin und während meiner Doktorarbeit haben mich weitere, großartige Menschen begleitet und unterstützt, darunter die Vetihopper, Fine, Daniel, Kathrin, Andi und Ivo. Danke für die vielen Gespräche zum Thema Durchhalten, weiter Durchhalten, und nochmals Durchhalten! Es hat sich gelohnt!

Malte, ich danke dir für deine Liebe, deinen Humor insbesondere nach frustrierenden Labortagen und dass du immer an meiner Seite bist.

Mein Fels in der Brandung ist meine Familie, Mama, Papa, Louisa und Henrik, Oma Anni und Oma Hilli, ich danke euch für eure Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Träume und dafür, dass ihr immer an mich und meine Fähigkeiten glaubt.

Ich möchte außerdem von ganzem Herzen Frau Hanke für ihren Rückhalt und ihre Ratschläge während meiner Doktorarbeit danken, ich werde das nie vergessen!

Ich danke der Firma Bayer Animal Health und meinem dortigen Ansprechpartner Herrn Dr. Schaper für die Unterstützung bei der Finanzierung dieses Projektes und die stets motivierenden Rückmeldungen.

10.7 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 01.07.2016

Jana Liesner