

Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

und

aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Entwicklung eines indirekten ELISA-Testsystems zur Serodiagnostik
der caninen Protothekeninfektion und nachfolgender Untersuchung
der Prävalenz der caninen Protothekose**

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

vorgelegt von
Vanessa Palm
Tierärztin
aus Aachen

Berlin 2014

Journal Nr: 3746

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn
Dritter Gutachter: PD Dr. Rüdiger Hauck

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Dogs, gastrointestinal diseases, Epidemiology, *Prototheca zopfii*, ELISA

Tag der Promotion: 07.05.2015

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: 978-3-86387-600-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

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 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Familie

„Gib jedem Tag die Chance, der schönste Deines Lebens zu werden“

Mark Twain

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	2
2.1	Charakterisierung der Gattung <i>Prototheca</i>	2
2.1.1	Klassifizierung und Taxonomie	2
2.1.2	Morphologie	5
2.1.3	Physiologie	5
2.1.4	Kultivierung	6
2.1.5	Ökologie	7
2.1.6	Diagnostik	8
2.1.7	Therapie und Bekämpfung	9
2.2	Protothekosen	10
2.2.1	Humane Protothekose	10
2.2.2	Bovine Protothekose	11
2.2.3	Feline Protothekose	12
2.2.4	Protothekosen anderer Spezies	13
2.2.5	Canine Protothekose	14
2.2.5.1	Ätiologie und Pathogenese der caninen Protothekose	16
2.2.5.2	Klinik der caninen Protothekose	17
2.2.5.3	Pathomorphologie und –histologie der caninen Protothekose	19
2.2.5.4	Diagnostik der caninen Protothekose	20

2.2.5.5	Therapie und Bekämpfung der caninen Protothekose	21
3.	Material und Methoden	23
3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau	23
3.2	Material	23
3.2.1	Tiere	23
3.2.2	Probenentnahme und –bearbeitung	25
3.3	Methoden	25
3.3.1	Kulturelle Untersuchung der Proben	25
3.3.2	Gewinnung von Blutseren	26
3.3.3	PCR Analyse	26
3.3.4	Western Blot Analyse	27
3.3.5	Entwicklung eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	29
3.3.5.1	Plattencoating	30
3.3.5.2	ELISA Durchführung	31
3.3.5.3	Statistische Auswertung	33
4.	Ergebnisse	35
4.1	Kulturelle Befunde	35
4.2	PCR Analyse	35
4.3	Western Blot Analyse	36
4.4	Entwicklung eines indirekten ELISA-Testsystems	37
4.4.1	Schachbrett-Titration	37

4.4.2	ELISA Testvalidierung	38
4.4.2.1	Intra-Assay-Variationen	38
4.4.2.2	Inter-Assay-Variationen	40
4.5	Auswertung der ELISA´s	42
4.6	Prävalenz der caninen Protothekose	45
4.7	Serokonversion im Verlauf der caninen Protothekose	45
5.	Diskussion	47
5.1	Bisherige Diagnostik und Therapiemaßnahmen der caninen Protothekose	47
5.2	Etablierung eines ELISA-Testsystems zur Detektion der caninen Protothekose	49
5.3	Ätiologie der caninen Protothekose	51
5.4	Detektierte canine Protothekosefälle in dieser Studie	54
5.5	Prävalenz der caninen Protothekose	54
5.6	Limitierung, Ausblick und Schlussfolgerung der Studie	55
6.	Zusammenfassung	57
7.	Summary	59
8.	Literaturverzeichnis	61
9.	Publikationsverzeichnis	72
10.	Danksagung	73
11.	Anhang	75
12.	Selbstständigkeitserklärung	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Identifikationskriterien von <i>P. zopfii</i> und <i>P. blaschkeae</i>	4
Tabelle 2:	Bisherige Falldokumentationen der caninen Protothekose von 1969-2014	15
Tabelle 3:	Übersicht der klinischen Symptomatik der caninen Protothekose	17
Tabelle 4:	Therapie und Verlauf einiger exemplarischer Fälle der bisher dokumentierten caninen Protothekosefälle	21
Tabelle 5:	Eingesetzte Serum- und Konjugatverdünnung	31
Tabelle 6:	Vierfeldertafel für die Bewertung von ELISA-Testsystemen	34
Tabelle 7:	Ergebnisse der Intra-Assay-Variation	39
Tabelle 8:	Intra-Assay-Variationskoeffizienten	39
Tabelle 9:	Ergebnisse der Inter-Assay-Variation für die Blutseren eines positiv getesteten Tieres (FU1) zu verschiedenen Probenentnahmezeitpunkten (1-11)	40
Tabelle 10:	Ergebnisse der Inter-Assay-Variation für die negativen Blutseren ausgewählter Tiere	41
Tabelle 11:	Mittelwert und Standardabweichung der Antikörperaktivitäten der kulturell negativen Hunde (Gr.1) und der hieraus errechnete Cut-off Wert zur Diagnostik der caninen Protothekose	42
Tabelle 12:	Vierfeldertafel zur Darstellung der Untersuchungsergebnisse der Gesamtpopulation (n=364) der kulturellen Befunde im Vergleich zur serologischen Untersuchung	43
Tabelle 13:	Statistische Parameter der durchgeführten ELISA's zum Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen <i>P. zopfii</i> Genotyp 2 der drei untersuchten Versuchsgruppen	44
Tabelle 14:	Auflistung der kulturellen Befunde und der zugehörigen spezifischen Antikörperaktivitäten der einzelnen Gruppen	75

Tabelle 15:	Extinktionswerte zur Prüfung der Intra-Assay-Variation des ELISA für den Nachweis von IgG im Serum	85
Tabelle 16:	Extinktionswerte zur Prüfung der Inter-Assay-Variation des ELISA für den Nachweis von IgG im Serum	85
Tabelle 17:	Liniendiagramm der Schachbrett-Titration (3000/8000)	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Probenauftrags-Schema	31
Abbildung 2:	<i>P. zopfii</i> Genotyp 2 spezifische PCR für die beiden kulturell positiv getesteten Hunde (Fall FU 1 und FU 2)	36
Abbildung 3:	Western Blots der positiven Hundeseren (Fall FU 1 und FU 2)	37
Abbildung 4:	Liniendiagramm der Schachbrett-Titration der gewählten Serumverdünnung 1:2000 und Konjugatverdünnung 1:8000	38
Abbildung 5:	Antikörperantwort im Verlauf der caninen Protothekose	46

Abkürzungsverzeichnis

A.dest	Aqua destillata
A.bidest	Aqua bidestillata
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EU	ELISA Einheiten (ELISA Units)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Ig	Immungobulin
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kDa	Kilodalton
log	Logarithmus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laserdesorption Ionisation-Time of Flight
min	Minuten
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
PAS	Periodic Acid Schiff (Perjodsäure Schiff Reaktion)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PBS-T	PBS-Tween 20 [®]
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PIM	Prototheken-Isolations-Medium
<i>P. blaschkeae</i>	<i>Prototheca blaschkeae</i>
<i>P. cutis</i>	<i>Prototheca cutis</i>
<i>P. moriformis</i>	<i>Prototheca moriformis</i>
<i>P. ulmea</i>	<i>Prototheca ulmea</i>
<i>P. wickerhamii</i>	<i>Prototheca wickerhamii</i>
<i>P. zopfii</i>	<i>Prototheca zopfii</i>
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
U/min	Umdrehung pro Minute
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	Tris buffered saline-Tween 20 [®] (Tris-gepufferte Salzlösung Tween 20 [®])
z.B.	zum Beispiel
u.a.	unter anderem
V.a.	Verdacht auf
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die canine Protothekose ist eine sehr seltene, weltweit verbreitete Infektionskrankheit des Hundes, welche durch die in der Umwelt ubiquitär vorkommende, saprophytäre, achlorophyllogene Alge der Gattung *Prototheca* (*P.*) hervorgerufen wird. Prototheken sind die einzigen bekannten Pflanzen, die bei Mensch und Tier klinische Infektionserkrankungen hervorrufen können. Bei Hunden wurde bisher überwiegend *Prototheca zopfii* Genotyp 2 als pathogenes Agens isoliert. Eingeteilt in drei klinische Erscheinungsformen, 1. kutane, 2. systemische und 3. disseminierte Protothekose, zeigen erkrankte Hunde überwiegend eine therapieresistente, hämorrhagische Enterokolitis, welche regelmäßig im systemischen Verlauf mit einer Netzhautablösung und zentralnervösen Ausfallerscheinungen einhergeht und stets tödlich endet. Zur Therapie der caninen Protothekose wurden diverse Antimykotika und Antibiotika verwendet, jedoch bisher ohne Erfolg. Eine geeignete wirkungsvolle Behandlung ist zurzeit nicht bekannt. Die Pathogenese der Erkrankung ist wenig ergründet. Aufgrund der häufigen Primärinfektion des Gastrointestinaltraktes wird ein oraler Infektionsweg vermutet. Im Hinblick auf das sporadische Auftreten wird eine Immunsuppression bei den betroffenen Hunden diskutiert.

Ziel dieser Studie war die Ermittlung der Prävalenz von Protothekeninfektionen sowohl bei gesunden, akut erkrankten und orthopädisch erkrankten Hunden und bei Hunden mit nachgewiesenen benignen Neoplasien (Gruppe 1), bei Hunden mit gastrointestinaler Symptomatik (Gruppe 2) und bei Hunden mit chronischen, malignen bzw. immun-medierten Erkrankungen ohne gastrointestinale Symptome (Gruppe 3). Hierfür wurde sowohl ein kultureller Ausstrich der Fäzes auf einem Protothekenisolationsmedium (PIM) durchgeführt als auch ein ELISA-Testsystem entwickelt, mit welchem die Protothekenantikörper im Blut nachgewiesen werden konnten.

2. Literaturübersicht

2.1 Charakterisierung der Gattung *Prototheca*

2.1.1 Klassifizierung und Taxonomie

Chlorophyllose, Hefe-ähnliche Mikroalgen der Gattung *Prototheca* wurden erstmals 1894 aus dem Saftfluss von Laubbäumen isoliert und beschrieben (Krueger 1894).

Aufgrund ihrer Chlorophyllosigkeit und ihrer heterotrophen Lebensweise erfolgte die Einordnung zunächst in das Reich der Pilze ohne Mycel und Sprossbildung. In den darauffolgenden Jahren wurde die Stellung der Prototheken im Pflanzenreich immer wieder kontrovers diskutiert. So führte die Ähnlichkeit in der Sporenbildung von Prototheken und der Grünalge *Chlorella* im Jahr 1913 zu einer Reklassifizierung als Alge (Chodat 1913). Aufgrund ihres Thiaminbedarfs und ihres heterotrophen Metabolismus erfolgte einige Jahre später die Zuordnung zu den Hefen (*Saccharomycetales*) (Ciferri 1956). Eine parallele Evolution von *Prototheca* und *Chlorella* aus den Grünalgen (*Chlorophyceae*) wurde von weiteren Autoren angenommen, wobei die Prototheken letztendlich den Pilzen näherstehend zugeordnet wurden (Tubaki und Soneda 1959). Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde das Vorhandensein von Leukoplasten bestätigt und brachte die Protothekeneinordnung wieder der Einordnung als Algenart (*Protococceae*) näher. Dabei ging man davon aus, dass die Fähigkeit zur Pigmentbildung infolge einer Mutation verloren gegangen war (Menke und Fricke 1962). Basierend auf der Untersuchung des Assimilationsmusters von Kohlenhydraten und Alkoholen, wurde die Gattung *Prototheca* als Zwischenglied von Algen und Pilzen, jedoch von den Chlorellen deutlich verschieden, klassifiziert (Arnold und Ahearn 1972). Ein weiterer, entscheidender Hinweis auf eine Verwandtschaft zu den Algen lieferte der ultrastrukturelle Nachweis von Plastiden (Nadakavukaren und McCracken 1973). Ob Prototheken von den Grünalgen der Gattung *Chlorella* abstammen, ist bis heute umstritten. Im nutritiven Vergleich von *Prototheca* spp. mit *Chlorella protothecoides* stellte sich heraus, dass beide sowohl ein Thiamindefizit aufweisen als auch Nitrat nicht als Stickstoffquelle nutzen können. Die asexuelle Reproduktionsweise durch endogene Sporenbildung von *Prototheca* und *Chlorella* stellte ein weiteres Indiz für ein bestehendes Verwandtschaftsverhältnis dar (Pore 1972). Aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeit in Morphologie und Fortpflanzung klassifizierten viele weitere Autoren *Prototheca* als Abkömmling der Grünalge *Chlorella*, welche durch Mutation ihre Chloroplasten verloren hat und demnach keine autotrophe Assimilation mehr durchführen

kann (Anderson 1945a; Ciferri 1956; Cooke 1968; Beer 1987). Diese These wurde im Jahr 1954 durch die Erzeugung chlorophyllloser Mutanten mittels UV-Licht-Bestrahlung von *Chlorella protothecoides* unterstützt (Butler 1954). Andererseits führten Unterschiede in der Ultrastruktur und im Zellwandaufbau, sowie in der Stickstoff- und Kohlenstoffassimilation dazu, dass eine Abstammung der Prototheken von den Chlorellen angezweifelt wurde (Anderson 1945a; Ciferri 1956; Tubaki und Soneda 1959; Casselton 1967; Cooke 1968). Erst mit der fortschreitenden Entwicklung molekularbiologischer Methoden war eine Bestätigung der Zuordnung von *Prototheca* spp. zu den Algen der Abteilung *Chlorophyta* möglich (Huss und Sogin 1990; Tartar et al. 2002; Ueno et al. 2003).

Nach heutigen Erkenntnissen werden Prototheken wie folgt eingeordnet:

Eukaryota (Überreich)

Viridiplantae (Reich)

Chlorophyta (Abteilung)

Trebouxiophyceae (Klasse)

Chlorellales (Ordnung)

Chlorellaceae (Familie)

Prototheca (Gattung)

Die Gattung *Prototheca* beinhaltet derzeit fünf Spezies: *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. stagnora* und *P. ulmea* (Pore 1985; Roesler et al. 2006). Die Existenz einer sechsten Spezies, *P. moriformis*, konnte durch molekularbiologische Untersuchungen der 18 S rDNA widerlegt werden (Sudman und Kaplan 1973; Pore 1985; Ueno et al. 2003).

Eine weitere Differenzierung innerhalb der Gattung *P. zopfii* erfolgte anhand makromorphologischer Merkmale wie Oberflächenstruktur, Form und Farbe auf verschiedenen Agarmedien und mikromorphologischer Merkmale wie Zellgröße und -form, Zellteilungsstadien und Sporangien mit Endsporenbildung. Weiterhin ermöglichte die auxanographische Untersuchung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen und das Vorkommen in verschiedenen Habitaten eine Einteilung von *P. zopfii* in drei Varianten (Blaschke-Hellmessen et al. 1985a). Eine spezifische Clusterbildung innerhalb der *Prototheca* spp. konnte mit der Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie gezeigt werden. Darüber hinaus bestätigte sich hier die Varianteneinteilung von *P. zopfii*, wobei sich die Variante III am deutlichsten von den beiden anderen Varianten unterschied (Schmalreck et al. 1998). Um die intraspezifische taxonomische Position von *P. zopfii* eindeutiger festzulegen, wurden zahlreiche Isolate von *P. zopfii* auxanographisch, genetisch und serologisch untersucht. Im

Hinblick auf die deutlichen biochemischen und serologischen Unterschiede innerhalb der 3 Varianten wurde eine Umbenennung dieser in *P. zopfii* Biotyp I, II und III vorgeschlagen (Roesler et al. 2003). Weiterführende genetische Untersuchungen mit Hilfe der 18 S rDNA Sequenz-Analyse und die Auswertung der zellulären Fettsäurezusammensetzung zeigten abermals deutliche Unterschiede der 3 Biotypen von *P. zopfii*. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte eine Neubezeichnung des Biotyp III in *P. blaschkeae* sp. nov. sowie der Biotypen I und II in *P. zopfii* Genotyp 1 und 2 (Roesler et al. 2006). Eine Bestätigung dieser taxonomischen Positionierung lieferten Ergebnisse einer kürzlich durchgeführten genotypisch-spezifischen PCR-Untersuchung von 75 *Prototheca*-Stämmen (Ricchi et al. 2011). Die nachfolgende Tabelle zeigt die Differenzierungsmerkmale von *P. zopfii* und *P. blaschkeae*.

Tabelle 1: Identifikationskriterien von *P. zopfii* und *P. blaschkeae*

Merkmal	<i>P. zopfii</i> Genotyp I	<i>P. zopfii</i> Genotyp II	<i>P. blaschkeae</i>
Zellform	sphärisch/ zylindrisch	sphärisch/ zylindrisch	sphärisch
Zellgröße der Sporangiosporen (µm)	11 – 30	5 – 15	12 – 22
Anteil der Teilungsformen	15 %	3,4 %	nicht untersucht
Galaktoseassimilation	++	(+)	+
Glycerolassimilation	+++	+++	-
pH-Toleranz	2,4 - 9,5	2,1 - 10,5	4 - 10,5
NaCl-Toleranz	4,0 %	6,0 %	4,0 %
Wachstum bei 37°C	+	++	+
Herkunft	Rinder- und Schweineeställe	Rinderställe oder kommunale Abwässer	Schweineeställe

Eine neue pathogene Spezies der Gattung *Prototheca* wurde im Jahr 2009 beschrieben. Isoliert aus einer Dermatitisinfektion eines Menschen in Japan schlugen die Autoren die Bezeichnung *P. cutis* vor. Ferner ergaben vergleichende Sequenzanalysen der 18 S rDNA und 26 S rDNA Hinweise auf eine phylogenetisch enge Verwandtschaft zwischen *Prototheca wickerhamii* und *Auxenochlorella protothecoides* (Sato et al. 2009).

2.1.2 Morphologie

Kolonien der Gattung *Prototheca* werden als weiß bis cremefarben, weich und hefeartig beschrieben (Sudman 1974; Tyler et al. 1980; Pore 1985). Diese trockenen, wachsartigen Kulturen mit unregelmäßigem Rand und einem hefeähnlichen Geruch (Berkhoff et al. 1982) werden aufgrund ihrer makroskopischen Ähnlichkeit oft mit Hefen der Gattung *Candida* spp. verwechselt (Schönborn und Seffner 1977). Mikromorphologisch sind es hyaline, ovoide oder sphärische Zellen, die in der Größe zwischen 3 und 30 µm variieren (Blaschke-Hellmessen et al. 1985b; Leimann et al. 2004). Form und Größe der Zellen werden von der Zusammensetzung des Nährmediums beeinflusst und sind vom Entwicklungsstadium abhängig (Arnold und Ahearn 1972). Als eukaryonte Zellen sind sie mit einem kleinen, meist zentral gelegenen Zellkern ausgestattet und verfügen über eine Plasmamembran sowie ein Zytoplasma mit vielen Ribosomen. Weitere reguläre Zellorganellen sind Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien (Webster et al. 1967; Nadakavukaren und McCracken 1973; Patni und Aaronson 1974). Ihre Zellwand besteht neben verschiedenen Monosacchariden, Glucosamin und Aminosäuren aus Sporopollenin, einem extrem widerstandsfähigen Biopolymer (Lloyd und Turner 1968; Conte und Pore 1973; Ueno 2009). Außerdem wurde bei *P. zopfii* eine prominente, zwei-schichtige Zellwand nachgewiesen, welche ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal zu den Chlorellen darstellt (Lloyd und Turner 1968). Eine weitere charakteristische Besonderheit sind membrangebundene Plastide, auch Leukoplasten oder Amyloplasten genannt, die Stärkekörner enthalten (Menke und Fricke 1962; Webster et al. 1967; Nadakavukaren und McCracken 1973). Ein wichtiges Identifizierungsmerkmal der Gattung ist ihre endogene Sporenbildung. Je nach Spezies und Entwicklungsstadium ist eine unterschiedlich große Anzahl von Tochterzellen, auch Endo-, Auto- oder Sporangiosporen genannt, innerhalb der Mutterzelle (Sporangium) mikroskopisch auffällig (Janosi et al. 2001).

2.1.3 Physiologie

Prototheken sind aufgrund ihrer Chlorophylllosigkeit auf eine heterotrophe Assimilation angewiesen. Von den organischen Verbindungen werden überwiegend Kohlenstoffe wie Monosaccharide (z.B. Glukose, Fruktose, Galaktose), aber auch Alkohole wie Glycerol und Propanol verstoffwechselt (Anderson 1945b; Kessler 1982). Als Stickstoffquellen können organische Aminosäuren wie Lysin und Arginin gut, Ammoniumsalze nur mäßig und Nitrite gar nicht verwertet werden (Krueger 1894; Casselton und Stacey 1969). Thiamin ist ein essentieller Bestandteil für das Wachstum von Prototheken, da sie es selbst nicht

synthetisieren können (Anderson 1945a; Ciferri 1956). Jedoch reicht allein die Zugabe der Bausteine Vitamin B₁, Thiazol und Pyrimidin, zur Kultivierung von *P. zopfii* aus (Anderson 1945a). Darüber hinaus benötigen Prototheken Sauerstoff, wobei Lichteinfluss keine Auswirkung auf ihr Wachstum hat (Krueger 1894; Anderson 1945a). Die Atmungsaktivität von *P. zopfii* konnte jedoch durch blaue Lichteinstrahlung gehemmt werden (Epel und Krauss 1966). Über ihre Fermentation unter anaeroben Bedingungen ist wenig bekannt. Es wurde beschrieben, dass sie nicht in der Lage sind eine anaerobe Atmung mit Glukose als Kohlenstoffquelle durchzuführen (Pore 1985). Hingegen konnte gezeigt werden, dass der thermotolerante Stamm *P. zopfii* var. *hydrocarbonea* befähigt ist, unter anaeroben Bedingungen und bei Temperaturen von 25°C und 40°C eine nennenswerte Menge von Ethanol und CO₂ zu produzieren (Ueno et al. 2002). Prototheken können darüber hinaus Erdölkomponenten wie n-Alkane und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe abbauen (Walker et al. 1975; Pore et al. 1983) und -immobilisiert in Polyurethanschaum - sind sie in der Lage Erdölverunreinigungen im Wasser zu degradieren (Ueno et al. 2008). Einige Protothekenzellen zeichnen sich durch eine sehr dicke Zellwand ohne Zellteilung aus. Diese Zellen werden als Dauerzellen oder Hypnosporen bezeichnet (Krueger 1894; Vorisek und Kockova-Kratochvilova 1975). In diesen können die Prototheken Reservestoffe wie z.B. Glykogen und Fett in flüssiger Form einlagern. Bei schlechten Wachstumsbedingungen ist dies mikroskopisch als eingelagerter Öltropfen innerhalb dieser Dauerzellen sichtbar (Joshi et al. 1975).

Die Reproduktion der Prototheken erfolgt in Form einer asexuellen, endogenen Sporenbildung. Durch Größenzunahme der Tochterzellen innerhalb der Mutterzelle erfolgt eine passive Ruptur des Sporangiums und die Sporangiosporen werden für einen neuen Zellzyklus freigesetzt (Sudman 1974; Pore 1985).

2.1.4 Kultivierung

Prototheken können auf allen üblichen Pilznährmedien wie z.B. Sabouraud-Glukose-Agar, Sabouraud-Dextrose-Agar oder Kimmig-Agar kultiviert werden (Kaplan et al. 1976; Migaki et al. 1982; Blaschke-Hellmessen et al. 1985b). Aufgrund der häufigen Begleitflora von Pilzen und Bakterien und ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit Hefekolonien ist ein Selektivmedium von Vorteil. Durch Verwendung von Prototheken-Isolations-Medium (PIM), welches über einen Zusatz von Flucytosin und Kaliumhydrogenphthalat verfügt, wird das Wachstum von Kontaminanten wie Hefen, Schimmelpilze und Bakterien weitestgehend unterdrückt (Pore 1973). Als subletales Medium ist bei Proben mit einem geringen Gehalt an Prototheken eine vorherige Anreicherung in Sabouraud-Nährbouillon induziert. Die optimale

aerobe Inkubationstemperatur ist speziesspezifisch und liegt zwischen 20 und 37 °C (Blaschke-Hellmessen et al. 1985a). Bei Temperaturen unter 4 °C und über 45 °C konnte kein Wachstum mehr festgestellt werden (Arnold und Ahearn 1972).

2.1.5 Ökologie

Das Habitat der Prototheken umfasst eine weltweite, omnipräsente Verbreitung innerhalb der natürlichen Umwelt. Erstmals isoliert aus dem Saftfluss von Laubbäumen (Krueger 1894) konnten sie als ubiquitäre Saprophyten aus einer Vielzahl von Quellen wie z.B. dem Erdboden, kommunalen und landwirtschaftlichen Abwässern, Wasserhabitaten wie Brunnen, Bächen, Flüssen und Seen, sowie Tierfäzes und Ölschlamm isoliert werden (Krueger 1894; Kockova-Kratochvilova und Havelkova 1974; de Camargo und Fischman 1979; Pore et al. 1983). Weiterhin sind sie im Trinkwasser, in der Nahrung wie z.B. Eiscreme, Salat und verschiedenen Fleischsorten, aber auch in Meeresfrüchten wie Muscheln und Krabben zu finden. Eine Prototheken-Kontamination von Nahrungsmitteln wurde auf die Kühlung mit Eis zurückgeführt, wobei das Eis als Kontaminationsquelle diskutiert wurde. Andererseits galt der Schlachthof als wichtige Kontaminationsquelle, wobei durch einen unsauberen Schlachtvorgang Tierfäzes als Eintragsquelle in die Lebensmittelkette diskutiert wurden (Pore et al. 1983). Eine mögliche Verbreitung der Algen wird den Insekten zugesprochen, welche häufig auf dem Saftfluss der Laubbäume zu finden sind. Da Prototheken selbst durch Chlorierung des Abwassers nicht vollständig eliminiert werden können und sie oft im Klärschlamm überleben, stellt dies eine weitere Möglichkeit ihrer Weiterverbreitung dar (Pore et al. 1983; Wirth et al. 1999).

Ein zusätzliches natürliches Reservoir der Prototheken ist der Darm von Nutztieren. Studien über das Vorkommen von Prototheken in den Fäzes von Schweinen, Rindern und Pferden zeigte ein latentes Ausscheiden von Prototheken ohne klinische Symptomatik. Deshalb wird die Protothekenbesiedelung des Darmes als physiologisch eingestuft (Weber und Enders 1993; Enders und Weber 1993a; Enders und Weber 1993b). Dagegen konnte ein tierartsspezifisches Vorkommen von *P. zopfii* Genotyp 1 und 2 und *P. blaschkeae* gezeigt werden. *P. zopfii* Genotyp 1 und 2 wurde zu gleichen Teilen aus Rinderfäzes und Rinderstallungen isoliert, wobei nur der Genotyp 2 als pathogenes Agens bei der Protothekenmastitis des Rindes anzutreffen ist. *P. zopfii* Genotyp 2 wird deshalb eine besondere Rolle in der Ätiologie dieser Erkrankung zuteil. *P. blaschkeae*, früher *P. zopfii* Variante III, wurde nur in Kot und Stallproben von Schweinen nachgewiesen, ohne eine pathologische Bedeutung zu haben (Schuster und Blaschke-Hellmessen 1983; Blaschke-Hellmessen et al. 1985a; Janosi et al. 2001). Neueste Untersuchungen bestätigen den

Verdacht, dass der Genotyp 2 von *P. zopfii*, ehemals Variante II, hauptursächlich für die Protothekenmastitis des Rindes ist (Moeller et al. 2007; Jagielski et al. 2011). Ein weiteres natürliches Reservoir der Prototheken bietet zudem der Mensch. Prototheken wurden bei ihm als transiente Besiedler der Haut sowie in Proben von z.B. Fingernägeln oder dem Respirations- und Verdauungstrakt nachgewiesen (Venezio et al. 1982; Huerre et al. 1993).

2.1.6 Diagnostik

Ursprünglich erfolgte der Nachweis von Prototheken ausschließlich kulturell auf standardisierten Pilz-Nährmedien wie z.B. Sabouraud-Dextrose-Agar. Eine zusätzliche mikroskopische Untersuchung verdächtiger Kolonien mittels Lactophenol-Baumwollblau-Färbung (Pore et al. 1987; Baumgärtner 1997) oder Gramfärbung (Greene 2011) stellte charakteristische Sporangien dar (Leimann et al. 2004) und konnte eine erste Verdachtsdiagnose begründen. Da *Prototheca*-Kolonien in ihrem Aussehen, ihrer Farbe und ihrem Geruch *Candida*-Arten oftmals sehr ähneln und sie generell nur sehr langsam wachsen, erwiesen sich diese kulturellen Nachweismethoden jedoch als unsicher und sehr zeitintensiv (von Bergen et al. 2009).

Vor Einführung molekularer Untersuchungsmethoden erfolgte die Speziesidentifikation von Prototheken mittels auxanographischer und biochemischer Analysen (Padhye et al. 1979; Roesler et al. 2006). Beide Methoden sind überaus zeitintensiv und beinhalten starke Einschränkungen, wie z.B. eine schlechte Reproduzierbarkeit, sowie die Schwierigkeit einer hohen intraspezifischen Variabilität einiger biochemischer Eigenschaften (Ricchi et al. 2011). Histopathologisch lassen sich Prototheken nach Anfärbung mit PAS oder Gomori sehr gut darstellen (Salvadori et al. 2008).

Vergleichsuntersuchungen mit Hilfe der Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie konnten deutliche Unterschiede innerhalb aller *Prototheca*-Spezies einschließlich *P. blaschkeae* aufzeigen, wobei eine Differenzierung zwischen *P. zopfii* Genotyp 1 und Genotyp 2 mit dieser Methodik schwierig bleibt (Schmalreck et al. 1998).

Eine schnelle und verlässliche Protothekenidentifikation bietet die Immunfluoreszenz, bei der spezifische Konjugate eine selektive Adsorption gewährleisten. Aufwendige Präparationen sowie die Gefahr einer Artefaktbildung durch unspezifische Bindung der Antikörper schränken jedoch den Einsatz dieses Nachweisverfahrens ein (Sudman und Kaplan 1973).

Molekularbiologische Analysen zur Speziesunterscheidung sind eine weitere Möglichkeit der Protothekenidentifikation in Serumproben, Biopaten und Gewebeschnitten. Die Sequenzierungen der 18 S rDNA (Marques et al. 2008) sowie die Genotypisierung mittels PCR (Roesler et al. 2006; Osumi et al. 2008) und RFLP (Moeller et al. 2007) stellen vielfach etablierte Methoden zur Typisierung von Prototheken dar, welche sehr präzise, allerdings auch relativ kostenintensiv und zeitaufwendig sind. Im Vergleich zur kulturellen Diagnostik bieten sie jedoch eine erhebliche Zeitersparnis und sind auch im fixierten Gewebe möglich. Darüber hinaus bietet die von Ricchi et al. beschriebene real-time PCR eine intraspezifische Protothekendifferenzierung innerhalb kürzester Zeit (2011). Allerdings erfordert auch sie eine gewisse Geräteausstattung und den entsprechenden Arbeitseinsatz.

Eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), bei der rRNA-gerichtete Oligonukleotide zur Darstellung von Protothekenzellen eingesetzt werden (Ueno 2009) kann in der Protothekendiagnostik nützlich sein, ist aber ebenfalls aufwendig und teuer.

2.1.7 Therapie und Bekämpfung

Wie bei anderen seltenen Erkrankungen konnte auch für die Protothekose bisher keine optimale Therapie etabliert werden (Perez et al. 1997; Kantrow und Boyd 2003; Leimann et al. 2004). Verfügbare Informationen veranschaulichen eine große Diskrepanz zwischen der *in vitro* und der *in vivo* Empfindlichkeit der Prototheken gegenüber antimikrobiellen Therapeutika. Nur eine möglichst frühe Diagnose bietet die Option eines Behandlungserfolges, da bei der disseminierten Form Organe wie z.B. die Augen oder das ZNS nur schwer zugänglich sind. Bevorzugt eingesetzte Medikamente sind Antimykotika (z.B. Amphotericin B), Azole (z.B. Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol), sowie diverse Antibiotika, wie z.B. Amikacin und Tetracyclin, wobei eine Kombination der einzelnen Agenzien einer Monotherapie überlegen ist. Die bisher wirksamste Therapie ist durch Amphotericin B belegt. Aufgrund der hohen Nierentoxizität sind alle Antimykotika nur begrenzt einsetzbar. Neuere Amphotericin B-Medikamente mit einer reduzierten Nierentoxizität (z.B. liposomales Amphotericin B) sind verfügbar, jedoch auch sehr kostenintensiv (Stenner et al. 2007). Algizide Wirkstoffe wie Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) zur Medikation sind ebenfalls in der Diskussion. Humane kutane Affektionen können kurativ chirurgisch entfernt werden. Auch topische Anwendungen von Antimykotika (Amphotericin B, Azole) sind in ihrer Wirksamkeit belegt (Lass-Floerl und Mayr 2007).

2.2 Protothekosen

Die Protothekose ist eine sehr seltene Erkrankung, welche speziesspezifisch seit 1952 beschrieben wurde und durch achlorophyllogene Algen der Gattung *Prototheca* hervorgerufen wird (Hollingsworth 2000; Stenner et al. 2007).

P. wickerhamii, *P. zopfii* und *P. blaschkeae* sind die bisher einzigen bekannten Vertreter, welche unter bestimmten Voraussetzungen pathogen für Menschen und Tiere sein können. Prädisponierende Faktoren sind u.a. Immunsuppression oder Epithelverletzungen (Leimann et al. 2004).

2.2.1 Humane Protothekose

Die Protothekosen des Menschen kommen als Einzelerkrankungen bevorzugt in tropischen und subtropischen Gebieten vor (Blaschke-Hellmessen et al. 1985b). Der erste Fall einer humanen Protothekose wurde 1964 beschrieben. Ein Reisfarmer aus Sierra Leone wies eine verruköse Fußläsion mit nachfolgender Generalisierung auf (Davies et al. 1964). Zahlreiche weitere Fälle wurden inzwischen auf allen Kontinenten beschrieben, wobei ein Großteil der Fälle in Asien und Amerika, insbesondere im Südosten der Vereinigten Staaten auftrat. Ursächlich wurde überwiegend *P. wickerhamii* als infektiöses Agens isoliert. *P. zopfii* war sehr viel seltener am Krankheitsgeschehen beteiligt (Lass-Floerl und Mayr 2007). Protothekosen treten entweder lokal oder disseminiert auf und die Erkrankung verläuft akut oder chronisch, wobei chronische Verlaufsformen häufiger sind.

Eingeteilt werden humane Protothekosen anhand ihrer Lokalisation in drei klinische Formen: 1. kutane Läsionen, 2. Schleimbeutel-, Faszien- und Sehnenscheidenentzündungen und 3. disseminierte/systemische Infektionen (Iacoviello et al. 1992; Huerre et al. 1993; Leimann et al. 2004). Der erste Fall einer systemischen Protothekose durch *P. wickerhamii* ereignete sich im Jahr 1974 bei einem jungen Mann mit einem zellulären Immundefekt (Cox et al. 1974). Die Pathogenese der Protothekose ist bis heute im Wesentlichen ungeklärt. Angenommen wird eine Infektion durch Kontakt mit Infektionsquellen wie z.B. kontaminiertes Wasser oder Erde. Auch eine traumatische Algeninokulation der Haut kommt in Betracht (Jones et al. 1983; Kuo et al. 1987; Follador et al. 2001; Leimann et al. 2004). Darüber hinaus werden Insektenstiche als mögliche Ansteckungsquelle diskutiert (Wirth et al. 1999). Die meisten beschriebenen Protothekosen sind Hautaffektionen und es wird angenommen, dass die Algenpenetration der Haut nach vorangegangener Hautschädigung erfolgt. Die Läsionen bleiben meist lokal begrenzt, obgleich sie bei immunsupprimierten Patienten einen Trend zur Dissemination haben (Iacoviello et al. 1992). Die Mehrheit der Protothekosen wird

bei immunsupprimierten Patienten beobachtet, wobei sowohl die iatrogene Glukokortikoidgabe als auch prädisponierende Stoffwechselerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus als Risikofaktoren eingestuft werden (Lass-Floerl und Mayr 2007). Akute und fatale Protothekosen sind bisher selten und treten überwiegend bei schwer immunsupprimierten Patienten auf (Khoury et al. 2004; Lass-Floerl et al. 2004), wobei eine Häufung von lokalen und systemischen Protothekosen bei HIV-Patienten auffällig ist (Kaminski et al. 1992; Woolrich et al. 1994; Carey et al. 1997; Polk und Sanders 1997). Je nach Krankheitsbild und Ausmaß der kutanen Protothekose wird als Therapie eine Kombination der Anwendung von topischen Antimykotika und chirurgischer Exzision der betroffenen Hautstellen vorgenommen. Standardtherapieprotokolle existieren bisher nicht. Bewährt hat sich der Einsatz von Antimykotika wie z.B. Ketokonazol, Itrakonazol, Flukonazol und Amphotericin B, wobei letzteres gegen Prototheken am wirksamsten ist (Kantrow und Boyd 2003; Lass-Floerl et al. 2004; Mathew et al. 2010; Hillesheim und Bahrami 2011). Systemische Protothekosen werden ebenfalls mit Amphotericin B oder liposomalen Amphotericin B, teilweise in Kombination mit Antibiotika, behandelt (Heney et al. 1991; Sands et al. 1991; Lass-Floerl und Mayr 2007; Mathew et al. 2010). Die Heilungschancen und Erfolgsraten sind einerseits abhängig von einer frühen und präzisen Diagnose, andererseits ist der Immunstatus des jeweiligen Patienten entscheidend für das Ansprechen einer Therapie (Mathew et al. 2010; Fong et al. 2014). Die optimale Dosis und Zeitdauer der eingesetzten Antimykotika sind ungewiss. Amphotericin B wird als Erstbehandlung von Protothekosen, insbesondere bei disseminierten Protothekosen und bei Patienten mit schweren Grunderkrankungen oder bei Patienten mit einer Immunsuppression favorisiert (Lass-Floerl und Mayr 2007).

2.2.2 Bovine Protothekose

Die bovine Protothekose ist eine endemische Infektionskrankheit und gewinnt durch die Zunahme der wirtschaftlichen Verluste und als potentielles Risiko für die öffentliche Gesundheit immer mehr an Bedeutung (Marques et al. 2006). Hauptsächlich assoziiert mit *P. zopfii* Genotyp 2 als auslösendes Agens (Moeller et al. 2007; Osumi et al. 2008; Roth 2010) zeigen erkrankte Kühe in der Regel chronische therapieresistente Mastitiden mit Milchverlusten und erhöhten Zellgehalten. Der Entzündungscharakter ist pyogranulomatös (Frank et al. 1969; Schönborn und Seffner 1977; McDonald et al. 1984). Als Ausnahme konnten einzelne Mastitisolat auch als *P. wickerhamii* (Marques et al. 2006) und *P. blaschkeae* identifiziert werden (Marques et al. 2008; Ahrholdt und Roesler 2011). Die Infektion erfolgt überwiegend über den Strichkanal galaktogen-aszendierend, wobei auch Zitzenverletzungen als Eintrittspforte für die Erreger angesehen werden. Eine

Erregermanifestation in sezernierenden Alveolen wird vermutet, da Krankheitsfälle gehäuft bei Kühen in der Hochlaktation beobachtet werden (Lerche 1952; Schiefer und Gedek 1968; Schönborn und Seffner 1977; Dion 1982). Bei klinischen Mastitiden kommt es nur selten zur Störung des Allgemeinbefindens der betroffenen Tiere (Spalton 1985), wobei auch klinisch inapparente Infektionen bei scheinbar eutergesunden Tieren nachgewiesen werden können (Gedek und Weber 1978; Wendt 1994; Baumgärtner 1997). Als Erregerwirkung werden Toxine diskutiert, welche die Alveolarepithelien schädigen und somit die intraalveoläre Ausbreitung der Prototheken begünstigen (Wendt 1994). Eine Erregerübertragung von Tier zu Tier über kontaminiertes Melkwerkzeug wird angenommen. Weiterhin spielen die hygienischen Verhältnisse, die Melkbedingungen sowie die Erregermenge in der Umwelt der Kühe eine wichtige Rolle (Beer 1987; Anderson und Walker 1988). Trotz zahlreicher Therapieversuche gilt die Protothekenmastitis weiterhin als therapieresistent. Nur die Merzung der betroffenen Tiere erweist sich bisher zur Sanierung infizierter Rinderbestände als erfolgreich (Grunert et al. 1996; de Vargas et al. 1998; Buzzini et al. 2008).

2.2.3 Feline Protothekose

Die feline Protothekose ist eine sehr seltene Infektionskrankheit der Katze und es sind bislang nur wenige klinische Fälle beschrieben. Auffällig ist jedoch, dass Katzen, ähnlich der klinischen Erkrankung des Menschen und im Gegensatz zu Hunden, bisher nur an der kutanen Form der Protothekose erkrankten. Stets wurde seither *P. wickerhamii* als Auslöser der Protothekeninfektion dokumentiert. Der erste Fall einer feline Protothekose beschreibt eine Umfangsvermehrung am linken Unterbein einer Katze. Kulturell und histologisch sowie mithilfe der Fluoreszenzdiagnostik konnte *P. wickerhamii* aus der Läsion isoliert werden. Aufgrund der tiefen Nerven- und Blutgefäßbeteiligung war nur eine Teilexzision der Umfangsvermehrung durchführbar und ein Rezidiv bildete sich aus. Pathomorphologisch war hier eine granulomatöse Entzündung vorherrschend (Kaplan et al. 1976). Ein weiterer Fall dokumentiert eine Umfangsvermehrung im Stirnbereich einer Katze. Auch hier konnten aus dem Tumor, welcher histologisch als Granulom eingestuft wurde, Prototheken isoliert werden (Finnie und Coloe 1981). Zwei weitere Fälle beschreiben jeweils knötchenartige Umfangsvermehrungen einmal an der Unterseite des Schwanzes einer Katze und im zweiten Fall auf der Nase einer anderen Katze. In beiden Fällen konnten histologisch in den Knötchen neben Makrophagen und multinukleären Riesenzellen, welche sowohl Dermis als auch Subkutis infiltrierten, auch *P. wickerhamii* nachgewiesen werden (Dillberger et al. 1988). Ebenfalls noduläre Umfangsvermehrungen im Kopfbereich wies eine Katze in Japan auf. Durch eine Exzisionsbiopsie konnte auch hier *P. wickerhamii* isoliert werden. Nach

chirurgischer Entfernung aller Knoten erholte sich die Katze sehr gut und zeigte keine Rezidivbildung (Endo et al. 2010). In allen bisher dokumentierten Fällen war die Protothekeninfektion ausschließlich auf die Haut und Unterhaut beschränkt, wobei eine Katze zusätzlich eine Lymphknotenbeteiligung aufwies (Kaplan et al. 1976; Finnie und Coloe 1981; Coloe und Allison 1982; Dillberger et al. 1988; Endo et al. 2010). Alle Läsionen waren geprägt vom Typ einer granulomatösen Entzündung. Die Pathogenese blieb ungeklärt. In einer Arbeit wurde die traumatische Algeninokulation der Haut analog der Protothekeninfektion des Menschen diskutiert. Ebenso wurde ein alterierter Immunstatus der jeweiligen betroffenen Katzen als prädisponierender Faktor angesprochen und der Autor wies darauf hin, infizierte Katzen hinsichtlich immunsupprimierender Erkrankungen wie z.B. feline Leukose zu testen (Dillberger et al. 1988). Zur Diagnostik und Therapie kommt die Biopsie bzw. -exzision der Umfangsvermehrung zum Einsatz, wobei in einem Fall zusätzlich die orale Gabe von Ketokonazol durchgeführt wurde. Klinisch zeigte diese Katze eine gute Rekonvaleszenz, verstarb jedoch 10 Tage nach der Operation (Dillberger et al. 1988).

2.2.4 Protothekosen anderer Spezies

Über die Protothekenerkrankung wurde in Einzelfällen auch bei anderen Tierarten berichtet. Kutane, lokal begrenzte Läsionen an Kopf und Beinen wurden beispielsweise bei einem Rehbock beschrieben, ausgelöst durch *P. wickerhamii* (Frese und Gedek 1968). Weiterhin ist ein Fall bei einem Flughund dokumentiert, welcher an den Folgen einer systemischen Protothekose in Form einer granulomatösen Meningoenzephalitis und an multifokalen Organläsionen verstorben war. Histologisch wurden eindeutig Protothekenorganismen identifiziert. Eine spezifischere kulturelle Erregerbestimmung war aufgrund von fehlendem unfixiertem Material nicht möglich (Mettler 1975). Abgesehen von den Säugetieren sind Protothekeninfektionen auch bei Fischen beschrieben. Sporadische Ausbrüche einer viszeralen Infektionsform der Protothekose wurden auf einer Lachsfarm beobachtet. Ebenfalls histologisch bestätigt, stimmten die Erreger mit keiner bisherigen bekannten Protothekenart überein und eine neue Art, *P. salmonis sp. nov.*, wurde damals postuliert (Gentles und Bond 1977). Neben den Lachsen ist die Protothekeninfektion bei einer weiteren Fischart belegt. Ein Karpfen wies an verschiedenen inneren Organen, unter anderem der Schwimmblase, eine Protothekeninfektion auf (Loupal et al. 1992). Darüber hinaus ist die Protothekose bei einer weiteren Nutztierart in Brasilien dokumentiert. Eine Ziege litt unter inspiratorischer Dyspnoe, Stertor und ulzerierenden Hautläsionen im Kopfbereich. Als ätiologisches Agens wurde *P. wickerhamii* identifiziert, wobei die Läsionen als nekrotisierende, pyogranulomatöse Dermatitis und Rhinitis charakterisiert wurden (Macedo

et al. 2008). Weiterhin existieren Berichte von Protothekosen bei Exoten, wie z.B. der Protothekenbefall einer Kornnatter (Crispens und Marion 1975).

2.2.5 Canine Protothekose

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Protothekenerkrankungen manifestiert sich die Protothekose beim Hund typischerweise fast immer systemisch mit einem schleichenden Beginn und einem unausweichlich tödlichen Krankheitsverlauf (Hollingsworth 2000; Greene 2011). Größtenteils durch *P. zopfii* Genotyp 2 verursacht (Ribeiro et al. 2009), zeigen erkrankte Hunde in der Regel zunächst hämorrhagischen Dickdarmdurchfall mit Hämatochezie bei einem zumeist ungestörten Allgemeinbefinden. Im weiteren Verlauf kommt es durch die Ausbreitung der Erreger häufig zur Erblindung infolge einer Retinaablösung sowie zu neurologischen Symptomen wie z.B. Ataxie, Taubheit, Vestibulärsyndrom und zentralnervöse Ausfälle (Carlton und Austin 1973; Tyler et al. 1980; Cook et al. 1984; Font und Hook 1984; Fuchs et al. 1996; Schultze et al. 1998; Salvadori et al. 2008; Lane et al. 2012). Darüber hinaus sind sporadische Fälle einer primär kutanen Infektion durch *P. wickerhamii* beschrieben (Macartney et al. 1988; Ginel et al. 1997), wobei der Verlauf der Erkrankung weniger dramatisch im Vergleich zu einer Infektion mit *P. zopfii* ist (Hollingsworth 2000). Bisher sind beim Hund nur 3 Fälle mit einer *P. wickerhamii* assoziierten Infektion dokumentiert. Der erste Fall beschreibt eine generalisierte Protothekose, wobei sowohl *P. wickerhamii* als auch *P. zopfii* als auslösendes Agens isoliert wurden (Tyler et al. 1980). Beim zweiten Fall waren subkutane Läsionen bei einem Hund auffällig (Ginel et al. 1997). Der dritte Fall schildert eine systemische Protothekose eines Maltesers, welcher eine Erregerbesiedelung an verschiedensten Organen, unter anderem der Milz und der Leber, in Form von diffus verteilten weißen Knötchen auf der Organoberfläche aufwies (Tsuji et al. 2006). Erstmalig 1969 von Van Kruiningen beschrieben, sind bisher weltweit über 50 Fälle der caninen Protothekose dokumentiert, davon eine Vielzahl in den USA (Van Kruiningen 1970; Carlton und Austin 1973; Sudman et al. 1973; Buyukmihci et al. 1975; Holscher et al. 1976; Tyler et al. 1980; Migaki et al. 1982; Cook et al. 1984; Font und Hook 1984; Gaunt et al. 1984; Meredith et al. 1984; Rakich und Latimer 1984; Moore et al. 1985; Schultze et al. 1998; Strunck et al. 2004; Gionfriddo 2007). Weiterhin stammen 17 Fälle aus Australien (Wilkinson 1988; Meehan und Pollock 1996; Stenner et al. 2007), sowie weitere wenige Fälle aus Japan (Tsuji et al. 2006), Afrika (Imes et al. 1977) und Europa (Povey et al. 1969; Macartney et al. 1988; Rallis et al. 2002; Salvadori et al. 2008; Márquez et al. 2012; Font et al. 2014). In Deutschland sind bis heute 4

Literaturübersicht

dokumentierte Fälle bekannt (Fuchs et al. 1996; Allgoewer et al. 1998; Birke 2002; Gorissen 2011).

Tabelle 2: Bisherige Falldokumentationen der caninen Protothekose von 1969-2014

Nr	Rasse	Geschlecht	Alter	Klinik	Spezies	Land	Jahr	Referenz
1	Springer Spaniel	n.a.	3,5	Colitis	<i>P. spp</i>	England	1969	Povey et al, 1969
2	Boxer	w	9	PU/PD, OA	<i>P. spp</i>	USA	1969	Van Kruiningen et al, 1969
3	Springer Spaniel	m	3	Colitis	<i>P. spp</i>	USA	1970	Van Kruiningen, 1970
4	Collie	m	5,5	Blindheit	<i>P. spp</i>	USA	1973	Carlton und Austin, 1973
5	Miniature Schnauzer	w	2	Otitis	<i>P. wickerhamii</i>	USA	1973	Sudman et al, 1973
6	Collie	wk	8,5	Colitis	<i>P. spp</i>	USA	1975	Buyukmihci et al, 1975
7	n.a.	m	7	OA	<i>P. zopfii</i>	n.a.	1975	Saunders et al, 1975
8	Collie	w	1,5	Colitis	<i>P. wickerhamii</i>	USA	1976	Holscher et al, 1976
9	Dobermann-Mix	wk	6	OA	<i>P. zopfii</i>	Afrika	1977	Imes et al, 1977
10	Mischling	wk	4	Ataxie	<i>P. zopfii</i> & <i>P. w</i>	USA	1980	Tyler et al, 1980
11	Cocker Spaniel	wk	5	Colitis	<i>P. zopfii</i>	USA	1982	Migaki et al, 1982
12	Mischling	w	3	Colitis	<i>P. zopfii</i>	USA	1982	Migaki et al, 1982
13	Collie	w	3	Colitis	<i>P. zopfii</i>	USA	1984	Cook et al, 1984
14	Vizsla	w	2	Colitis	<i>P. wickerhamii</i>	USA	1984	Font und Hook, 1984
15	Husky	w	4	Lahmheit	<i>P. zopfii</i>	USA	1984	Gaunt et al, 1984
16	Dalmatiner	wk	10	Blindheit	<i>P. zopfii</i>	USA	1984	Meredith et al, 1984
17	Collie	n.a.	3	Colitis	<i>P. zopfii</i>	USA	1984	Rakich und Latimer, 1984
18	Mischling	n.a.	7	Blindheit	<i>P. zopfii</i>	USA	1985	Moore et al, 1985
19	Boxer	wk	1,5	Colitis	<i>P. zopfii</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
20	Boxer	w	2	Colitis	<i>P. wickerhamii</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
21	Boxer	m	2,5	Colitis	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
22	Boxer-Mix	w	3	PU/PD, I	<i>P. zopfii</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
23	Boxer	wk	4	Colitis, PU/PD, I	<i>P. zopfii</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
24	Boxer	wk	4,5	ND	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
25	Boxer	wk	5	Blindheit	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Blogg und Sykes, 1995
26	ECS	mk	4	Fieber	<i>P. zopfii</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
27	ECS	wk	8	Colitis	<i>P. zopfii</i>	Australien	1988-2005	Meehan et al, 1996
28	SBT	w	2	Blindheit	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
29	Collie	w	3,5	Colitis	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Thomas und Preston, 1990
30	DSH	wk	3	Colitis	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
31	Corgie	mk	10,5	Colitis	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
32	Malteser	mk	4	Colitis	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
33	ACD	wk	8	Colitis	<i>P. wickerhamii</i>	Australien	1988-2005	Wilkinson et al, 1988
34	Beagle-Mix	mk	4	HL, PD, OA	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
35	Kelpie-Mix	wk	6	Colitis	<i>P. spp</i>	Australien	1988-2005	Stenner et al, 2007
36	Greyhound	m	10	Hauttumore	<i>P. spp</i>	England	1988	Macartney et al, 1988
37	Berner Sennen	m	1,5	Colitis, RA	<i>P. spp</i>	Österreich	1996	Fuchs et al, 1996
38	Collie	m	4	HL	<i>P. wickerhamii</i>	Spanien	1997	Perez et al, 1997
39	Riesenschnauzer	m	1	Colitis	<i>P. spp</i>	Deutschland	1998	Allgoewer et al, 1998
40	Mischling	w	5	Colitis	<i>P. zopfii</i>	USA	1998	Schultze et al, 1998
41	Mischling	m	8	Colitis, ND	<i>P. spp</i>	USA	1998	Schultze et al, 1998
42	DSH	w	6	Colitis	<i>P. spp</i>	Deutschland	2002	Birke, 2002
43	DSH	m	3,5	Colitis	<i>P. spp</i>	Griechenland	2002	Rallis et al, 2002
44	Mischling	w	10	Colitis	<i>P. zopfii</i>	Japan	2004	Hosaka und Hosaka, 2004
45	Cocker Spaniel	mk	2	Colitis	<i>P. zopfii</i>	USA	2004	Strunck et al, 2004
46	Mischling	wk	8	Uveitis, ND	<i>P. zopfii</i>	USA	2005	Pressler et al, 2005
47	Samojede	wk	10	ANI	<i>P. zopfii</i>	USA	2005	Pressler et al, 2005
48	Cocker Spaniel	wk	14	Blindheit	<i>P. spp</i>	USA	2006	Rizzi et al, 2006
49	Husky	mk	12	Blindheit	<i>P. spp</i>	USA	2007	Gionfriddo et al, 2007
50	Maremmano	m	3	ND	<i>P. spp</i>	Italien	2008	Salvadori et al, 2008
51	Mischling	m	8	Colitis	<i>P. zopfii</i> GT 2	Südamerika	2009	Ribeiro et al, 2009
52	Riesenschnauzer	w	0,5	Colitis	<i>P. zopfii</i>	Deutschland	2011	Gorisson, 2011
53	Boxer	wk	6	ND	<i>P. spp</i>	USA	2011	Gupta et al, 2011
54	Engl. Setter	wk	3	ND, Colitis	<i>P. zopfii</i>	USA	2012	Young et al, 2012
55	Boxer	m	2	ND	<i>P. spp</i>	Spanien	2012	Márquez et al, 2012
56	Sheltie-Mix	wk	5	ND	<i>P. zopfii</i> GT 2	USA	2012	Lane et al, 2012
57	Labrador Retriever	w	5	Paraparese	<i>P. zopfii</i>	Spanien	2014	Font et al, 2014

mk=männlich kastriert, wk=weiblich kastriert, PU/PD=Polydipsie/Polyurie, I=Inkontinenz, HL=Hautläsionen, OA=Okulare Affektionen, RA=Retina Ablation, ND=Neurologische Defizite, ANI=Akute Niereninsuffizienz, n.a.= nicht angegeben, ACD=American Cattle Dog, DSH=Deutscher Schäferhund, ECS=Englischer Cocker Spaniel, SBT=Staffordshire Bullterrier, Mix=Mischling, Engl. Setter= Englischer Setter

2.2.5.1 Ätiologie und Pathogenese der caninen Protothekose

Die Protothekeninfektion des Hundes erfolgt vermutlich hauptsächlich über die orale Aufnahme der Erreger (Povey et al. 1969; Van Kruiningen 1970; Buyukmihci et al. 1975). In Einzelfällen wird auch eine perkutane Algeninokulation (Ginel et al. 1997) oder ein lokales Trauma angenommen (Macartney et al. 1988). In einem kürzlich beschriebenen Fall wurde die nasale Infektion als möglicher Infektionsweg diskutiert, da der Hund multiple pyogranulomatöse Gehirnläsionen ohne Beteiligung anderer Organe aufwies (Márquez et al. 2012). Auch die Inhalation als mögliche Infektionsursache wurde in einem Fall in Erwägung gezogen (Sudman et al. 1973). Da in den meisten Fällen eine Kolitis beschrieben ist, wird als primärer Manifestationsort das Kolon angesehen, wobei die Prototheken initial die Lamina propria und die Submukosa des Darmes infiltrieren (Van Kruiningen 1970; Greene 2011). Dieser Entzündungsprozess führt zu einer Verdickung der Darmwände, fokalen Ulzerationen und einem segmentalen Verlust des Dickdarmepithels (Van Kruiningen 1970). Ein endogener Infektionsweg mit hämatogener und/oder lymphogener Ausbreitung der Erreger wird vermutet (Migaki et al. 1982; Thomas und Preston 1990). Bevorzugte Organbesiedelungen sind somit gut vaskularisierte Organe wie Augen, Nieren, Myokard, zentrales Nervensystem, Knochen und andere Gewebe mit einer guten Blutversorgung (Stenner et al. 2007; Greene 2011). Aufgrund der ubiquitären Protothekenverbreitung in der Umwelt und den im Vergleich dazu nur sehr selten beschriebenen Protothekeninfektionen beim Hund wird als Ursache eine gestörte oder geschwächte Immunabwehr des Patienten angenommen (Sudman 1974; Moore et al. 1985; Thomas und Preston 1990; Hollingsworth 2000; Pressler et al. 2005). Eine Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten scheint bei der disseminierten Form häufig vorzukommen. Im Fall eines 3-jährigen betroffenen Collies wiesen die Autoren eine generalisierte Suppression der T-Lymphozyten-Aktivität anhand einer veränderten Reaktion auf eine Mitogenstimulation mittels Phytohämagglutinin nach (Rakich und Latimer 1984). Da ein gehäuftes Auftreten der Protothekose bei weiblichen Hunden auffällig ist, gehen einige Autoren auch von einer Geschlechtsprädisposition aus (Gaunt et al. 1984; Hollingsworth 2000; Stenner et al. 2007). In Australien waren Boxer überproportional häufig an der caninen Protothekose erkrankt, so dass bei dieser Hunderasse ein Gendefekt als prädisponierender Faktor diskutiert wurde (Stenner et al. 2007). Dagegen waren in Amerika und Europa Collies und Englisch Springer Spaniels überproportional häufig betroffen (Hollingsworth 2000). So wird auch bei den Collies ein hereditär bedingter Defekt der zellulären Immunabwehr angenommen (Cook et al. 1984; Thomas und Preston 1990). Die Annahme, dass es sich bei Prototheken um opportunistische Erreger handelt, welche nur unter bestimmten Faktoren infektiös sind (Buyukmihci et al. 1975), wird einerseits durch das sporadische Auftreten der

Protothekeninfektionen und andererseits durch das zumeist vergebliche Induzieren einer Protothekose bei Labortieren unterstützt (de Camargo et al. 1980). In einer Versuchstierstudie war nur bei einem Teil der Mäuse nach längerer Inokulationsdauer eine Infektion in Form von Epitheloid-Zell-Granulomen möglich (Horiuchi et al. 1991). Weitere Autoren gehen aufgrund der langsamen Verbreitung der Erreger ebenfalls von einer geringen Virulenz der Prototheken aus (Kuo et al. 1987; Otoyama et al. 1989). Im Gegensatz zu Nagern war eine Induktion der Prototheken-Mastitis beim Rind durchaus möglich (Schiefer und Gedek 1968; Frank et al. 1969; Dion 1982; McDonald et al. 1984).

2.2.5.2 Klinik der caninen Protothekose

Eingeteilt wird die canine Protothekose in drei klinische Erscheinungsformen: Die kutane Form (ausschließlich die Haut betreffend), die systemische Form (nur ein Organsystem betreffend) und die disseminierte Form (mit Nachweis der hämatogenen und/oder lymphogenen Streuung), wobei die disseminierte Form bei Hunden am häufigsten anzutreffen ist.

Tabelle 3: Übersicht der klinischen Symptomatik der caninen Protothekose

Organsystem	Symptome/Klinik	Pathologie
Magendarmtrakt (Kolon)	hämorrhagische Diarrhoe, Vomitus, Gewichtsverlust	Protothekeninfiltration der Lamina propria und der Submukosa, Nekrosen, Ulzerationen
Auge	Blindheit	Netzhautablösung (meist beidseitig) infolge Chorioretinitis durch Protothekenimmigration
ZNS	variabel, u.a. Ataxie, Vestibulärsyndrom (Kopfschiefhaltung), Taubheit, Hyperästhesie	zerebrale (Meningo-) Enzephalitis
Haut	Hautläsionen, Umfangsvermehrungen	kutane Pyogranulome
Nieren	Polyurie/Polydipsie, akute Niereninsuffizienz	renale Protothekeninfiltration
Knochen	Schmerzhaftigkeit	Osteomyelitis infolge Protothekenmanifestation

Erste Symptome der disseminierten Form sind intermittierender, hämorrhagischer Durchfall, begleitet von Tenesmus und vereinzelt Vomitus, welcher über Monate hinweg bestehen kann, bevor schließlich weitere Krankheitssymptome durch die Protothekeninfiltration anderer Organe auffällig werden. Diese weiteren Symptome sind in der Regel okulare und zentralnervöse Störungen (Van Kruiningen et al. 1969; Saunders und Rubin 1975; Gaunt et al. 1984; Rakich und Latimer 1984; Thomas und Preston 1990; Hollingsworth 2000; Hosaka und Hosaka 2004; Gupta et al. 2011; Lane et al. 2012; Márquez et al. 2012; Young et al. 2012; Font et al. 2014). In einzelnen Fällen werden darüber hinaus renale Affektionen in Form einer akuten Niereninsuffizienz beschrieben (Pressler et al. 2005). Auch eine Knochenmanifestation in Form einer Osteomyelitis ist möglich (Stenner et al. 2007). Mit Hilfe einer Koloskopie können Primärläsionen, wie z.B. fokale Nekroseareale, Schleimhautulzerationen und ödematisierte, brüchige Schleimhautfalten, welche bei Berührung schnell anfangen zu bluten, gut dargestellt werden. Eine okulare Beteiligung ist zumeist geprägt von geröteten, dolenten Augen mit Blepharospasmus, oftmals bereits von einer akuten Blindheit begleitet. Vielfach stellt sich entweder die Hornhaut oder die Pupille bereits getrübt dar, des Weiteren leiden die betroffenen Tiere an einer Uveitis in Form von Hyphäma, Leukocoria, kornealem Ödem und Kammerwassertrübung. Die akute Blindheit wird durch eine (meist beidseitige) Netzhautablösung infolge einer exsudativen, granulomatösen Chorioretinitis ausgelöst (Stenner et al. 2007). Die kutane Protothekose ist charakterisiert durch pyogranulomatöse Läsionen der Haut. In einem Fallbericht waren Umfangsvermehrungen der Haut im Bereich des Jochbogens und um den Schwanzansatz auffällig. Ein weiterer Fall dokumentierte eine Hautläsion im Skrotalbereich (Macartney et al. 1988; Ginel et al. 1997). Bei einigen Patienten mit zentralnervösen Ausfällen konnten Erreger im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden (Gupta et al. 2011; Lane et al. 2012; Young et al. 2012). Die Untersuchung des Neurokranium mit einem Magnetresonanztomographen (MRT) zeigte bei einem dieser Hunde signalveränderte Läsionen sowohl im Gehirn als auch in den Meningen, welche für eine Entzündung der betroffenen Areale sprach. Weiterhin war eine Vergrößerung des 4. Ventrikels mit nachfolgender Protrusion des Kleinhirnwurms durch das Foramen magnum und eine Syringohydromyelia im kranialen Halsmark auffällig (Young et al. 2012). Bei einem anderen Fall zeigte ein 2-jähriger Boxerrüde eine diffuse paraspinale Hyperästhesie, begleitet von einer mentalen Depression und Anorexie. Läsionen im Gehirn im linksseitigen Frontallappen mit einhergehendem Mittellinienshift und Masseneffekt waren in der MRT-Untersuchung zu beobachten (Márquez et al. 2012). Ein kürzlich veröffentlichter Fallbericht beschreibt eine 5-jährige Labradorhündin mit einer progressiven, nicht mehr gehfähigen Hinterhandparese. In der Myelographie war im Bereich des 4.-7. Lendenwirbels eine Umfangsvermehrung mit resultierender extraduraler Rückenmarkskompression auffällig, welche in einer anschließend

durchgeführten Hemilaminektomie entfernt wurde. Eingesandte Biopsieproben wurden histopathologisch als granulomatöse Entzündungsreaktion in Anwesenheit von *Prototheca* spp. eingestuft. Spätere postmortem Untersuchungen wiesen zusätzliche pyogranulomatöse Entzündungsherde im Bereich der Meningen, des Subarachnoidalraumes und des Chorioidplexus des Gehirns auf (Font et al. 2014).

In der Regel sind bei erkrankten Tieren keine Auffälligkeiten im Blutbild oder in der klinischen Chemie festzustellen. Erst im späten Krankheitsstadium können sich, je nach Organbeteiligung, die Laborparameter verändert darstellen, z.B. erhöhte Nierenwerte im Falle eines akut nierenerkrankten Hundes: BUN (Blut-Harnstoff-Stickstoff): 220 mg/dl (Referenzbereich 8-24 mg/dl), CREA (Kreatinin): 7,3 mg/dl (Referenzbereich 0,0-1,8 mg/dl) und Phosphor: 16,8 mg/dl (Referenzbereich 2,1-6,5 mg/dl) (Pressler et al. 2005). Standardisierte Kot- und Harnanalysen sind meistens unspezifisch, da die intermittierende Protothekenausscheidung einen Nachweis erschwert oder, falls Erreger vorhanden sind, meist übersehen oder missinterpretiert werden (Pressler et al. 2005; Stenner et al. 2007).

2.2.5.3 Pathomorphologie und -histologie der caninen Protothekose

Die Erregerbesiedelung führt zu einer charakteristischen Ausbildung von weißlich bis gräulichen, knötchenartigen Läsionen, welche teilweise auch schlierenartig ausgeprägt sind und eine Größe von ca. 1-3 mm aufweisen. Pathohistologisch handelt es sich bei diesen Läsionen um disseminierte Granulome mit einer Beteiligung von Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, vereinzelt neutrophilen Granulozyten und einer großen Anzahl von Prototheken. Die Prototheken kolonisieren die verschiedensten Gewebearten. Bevorzugte Organe sind Gewebe mit weit verzweigten Kapillargefäßen wie z.B. der uveale Tractus im Auge, die Glomeruli in den Nieren und der Choroidplexus im Gehirn (Stenner et al. 2007; Font et al. 2014). Weiterhin besiedelt wird der Darm (insbesondere das Kolon), die Skelettmuskulatur, das Myokard, die Lymphknoten, die Schilddrüse, das Pankreas, das Peritoneum und das Diaphragma (Stenner et al. 2007; Greene 2011). Es finden sich zusätzliche Ausprägungen im Gehirn (Salvadori et al. 2008; Gupta et al. 2011; Márquez et al. 2012; Young et al. 2012; Font et al. 2014) und im Hörzentrum (Cook et al. 1984). Bei der Augeninfektion ist zumeist eine granulomatöse Chorioretinitis mit Netzhautablösung nachzuweisen, wobei sich die Granulome der Netzhaut und der Aderhaut neben Makrophagen und Lymphozyten ebenfalls aus vielen Prototheken zusammensetzen. In einer Vielzahl der Fälle finden sich zusätzlich Organismen im Glaskörper des Auges (Van Kruiningen et al. 1969; Carlton und Austin 1973; Meredith et al. 1984; Schultze et al. 1998).

2.2.5.4 Diagnostik der caninen Protothekose

Die Diagnose der caninen Protothekose wird durch den zytologischen oder histologischen Nachweis von Prototheken in Flüssigkeits- und Gewebeproben gestellt. Gut geeignet hierfür sind rektale Abschabungen mittels Zytobrush. Weiterhin ist eine Erregerisolierung aus bioptierten Läsionen, Kot, Harn, retinalen Aspiraten und aus Proben wie einer Glaskörperzentese oder einer Liquorpunktion möglich (Rallis et al. 2002). Eine Anzucht von Organismen gelingt auf Nährmedien wie z.B. Sabouraud-Glukose-Agar und Kimmig-Agar. Zur Unterdrückung der bakteriellen Begleitflora eignen sich insbesondere das Selektivmedium PIM, welches zusätzlich mit Antibiotika und spezifischen Hemmstoffen versehen ist (Pore 1973). In der routinemäßigen Diagnostik erfolgt bei einem positiven kulturmorphologischen Befund die mikroskopische Untersuchung verdächtiger Kolonien. Monochromatische Färbemethoden wie Methylenblau oder Lactophenol-Baumwollblau sind zur Darstellung von Protothekenzellen in Nativpräparaten besonders gut geeignet. Pathohistologisch lassen sich die Organismen sehr gut mit der Perjodsäure Schiff Reaktion (PAS) nachweisen. Auch Gomori-Silberimprägnationen oder Gridley- und Giemsa-Färbungen sind gut geeignet für die pathohistologische Darstellung der Prototheken, allerdings lassen sie sich nur mäßig mit Hämatoxylin-Eosin (HE) anfärben (Gaunt et al. 1984; Hollingsworth 2000; Greene 2011).

Eine spezifische Differenzierung der einzelnen Protothekenarten kann durch die Bestimmung der unterschiedlichen Assimilationsmuster von Alkoholen und Zuckern erfolgen (Arnold und Ahearn 1972), wobei indirekte Fluoreszenz-Antikörper-Tests deutlich schneller eine Identifikation ermöglichen (Sudman und Kaplan 1973; Migaki et al. 1982; Font und Hook 1984; Moore et al. 1985; Greene 2011). Kommerziell erhältliche Testkits wie z.B. API 20C[®] und RapID YEAST Plus[®] können eine Differenzierung zwischen *P. zopffii*, *P. wickerhamii* und *P. stagnora* sowie deren Abgrenzung von *Candida*-Arten ermöglichen (Padhye et al. 1979; Aalbaek et al. 1998). Inzwischen kommen aber vermehrt molekularbiologische Methoden wie die PCR (Roesler et al. 2006; Onozaki et al. 2009), Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) (Ueno 2009) oder MALDI-TOF (Murugaiyan et al. 2012) zur Anwendung.

Im Hinblick auf die serologische Diagnostik zum Nachweis der caninen Protothekose ist bisher noch kein ELISA-Testsystem etabliert. Es steht bisher noch kein ELISA zur Verfügung wie er beispielsweise für das Rind zum Nachweis der bovinen Protothekenmastitis eingesetzt wird.

2.2.5.5 Therapie und Bekämpfung der caninen Protothekose

Die canine Protothekose wurde bisher mit Antimykotika, Azolen, sowie diverse Antibiotika versucht zu therapieren. In der Mehrzahl der Fallberichte wurden verschiedene Azole z.B. Nystatin, Ketokonazol, Itrakonazol und Antimykotika, wie z.B. Amphotericin B, oral verabreicht. Weiterhin wurden Antimykotika mit diversen Antibiotika z.B. Amikacin und Tetracyclin oral kombiniert oder intravenös injiziert (Moore et al. 1985). Sogar intrathecale Amphotericin B-Injektionen wurden eingesetzt, um disseminierte Prototheken im zentralen Nervensystem zu eliminieren (Young et al. 2012). Weiterhin wurden Amphotericin B-Klistiere rektal für einen direkten Erregerkontakt mit dem Wirkstoff angewendet (Strunck et al. 2004). Nur sehr vereinzelt gibt es Berichte über erfolgreiche Therapien. Mit Ketokonazol und Nystatin sind Behandlungserfolge bei bisher 2 Hunden beschrieben (Ginel et al. 1997; Ribeiro et al. 2009).

Die Prognose für kutane Verlaufsformen ist eindeutig besser zu stellen als für die systemische und disseminierte canine Protothekenerkrankung, da die Läsionen auf die Haut begrenzt sind und durch chirurgische Maßnahmen kurativ behandelt werden können. Darüber hinaus sind kutane Läsionen durch *P. wickerhamii* ausgelöst, welche im Gegensatz zu *P. zopfii* gut auf Antimykotika ansprechen (Stenner et al. 2007).

Systemische bzw. disseminierte Protothekosen gelten als therapieresistent (Tyler et al. 1980; Moore et al. 1985; Hosaka und Hosaka 2004; Stenner et al. 2007). Die ineffektive Behandlung der Algeninfektion ist vermutlich bedingt durch mehrere Faktoren: Einerseits die verspätete Diagnose aufgrund der unspezifischen Symptomatik und andererseits die Dissemination auf verschiedene Organe. Darüber hinaus wird die Therapie durch die resultierende Granulombildung verkompliziert. Mögliche Koinfektionen durch immunsupprimierende Medikamente (wie z.B. Glukokortikoide) und die Widerstandsfähigkeit der Prototheken gegenüber konventionellen Arzneimitteln erschweren die Therapie der caninen Protothekose zusätzlich (Thomas und Preston 1990; Schultze et al. 1998; Ribeiro et al. 2009).

Tabelle 4: Therapie und Verlauf einiger exemplarischer Fälle der bisher dokumentierten caninen Protothekosen

Fall	Klinik	Nachweis	Therapie	Verlauf	Referenz
Greyhound, 10 J, m	kutane Läsionen Jochbogen und Schwanzansatz+ Weichteil-UV subkutan gelegen	kulturell+auxanographisch: V.a. <i>P. zopfii</i>	Ketokonazol oral (100mg/2 x tägl.)	über 4 Monate gut, danach Verlauf unbekannt	Macartney et al, 1988
Berner Sennen, 1,5 J, m	hämorrhagische Kolitis	pathohistologisch: <i>P. spp</i>	Antibiotikum, Glukokortikoid (ohne Angabe der Dosierung)	keine Verbesserung der klinischen Symptomatik, Euthanasie	Fuchs et al, 1996

Fortsetzung Tabelle 4 (Seite 21):

Fall	Klinik	Nachweis	Therapie	Verlauf	Referenz
Langhaar Collie, 4 J, m	Hautläsion im Skrotalbereich	histopathologisch und biochemisch: V.a. <i>P. wickerhamii</i>	Ketokonazol oral (10 mg/kg/24 h) + Clotrimazol topisch (1 x tägl) + chirurgische Exzision	Rezidiv nach 5 Monaten, erneute Ketokonazol-Therapie, 8 Monate nach Therapie keine Hinweise auf weitere Hautläsionen, eingestuft als geheilt	Perez et al, 1997
Riesenschnauzer, 1 J, m	hämorrhagische Kollitis+Chorioretinitis mit resultierender Netzhautablösung rechtsseitig	zytologisch: <i>P. spp.</i> in rektalen Geschabseln, Lymphknotenpunkaten, Darmbiopaten; histopathologisch: <i>P. spp.</i>	Ketokonazol oral (10 mg/kg/2 x tägl)+liposomales Amphotericin B iv. in kumulativer Gesamtdosierung von 1,2 g über 5 Wochen	10 Wochen nach Therapiebeginn akute Verschlechterung der Klinik, Euthanasie	Allgoewer et al, 1998
DSH, 3,5 J, m	hämorrhagische Kollitis	histopathologisch: <i>P. spp.</i> in Darmbiopaten	Ketokonazol (30 mg/kg/24 h) über 30 Tage	anfängliche Besserung, nach 4 Monaten Rezidiv, Euthanasie	Rallis et al, 2002
DSH, 6 J, w	hämorrhagische Kollitis	zytologisch: <i>P. spp.</i> in rektalen Geschabseln	Enrofloxacin iv.+Metronidazol iv. für 10 Tage+Nystatin iv., dann Nystatin und Ketokonazol (ohne Angabe der Dosierung)	keine Besserung der Klinik, zusätzliche Entwicklung eines Vestibulärsyndroms mit Kopfschiefhaltung, nach Nystatingabe in Kombination mit Ketokonazol anfängliche Besserung für 12 Tage, nach 3 Wochen akute Verschlechterung, Euthanasie	Birke, 2002
Mischling, 10 J, wk	hämorrhagische Kollitis	kulturell+auxanographisch: V.a. <i>P. zopfi</i>	Sulfasalzin (10 mg/kg/2 x tägl), nach 16 Tagen zusätzlich Metronidazol (20 mg/kg/2 x tägl)9	nach 16 Tagen Entwicklung zusätzlicher okulärer Symptome, 52 Tage später verstarb Hündin akut	Hosaka und Hosaka, 2004
Cocker, 2 J, mk	hämorrhagische Kollitis	zytologisch: <i>P. spp.</i> in rektalen Geschabseln	vorbehandelt mit Metronidazol + Sulfamethoxazole-trimethoprim; liposomales Amphotericin B iv. (1 mg/kg) alle 2 Tage + Clotrimazol 1% Klistier 2 x wöchentlich	langsame Verbesserung der Klinik, 2 Monate später Rezidiv: 6 Amphotericin B Klistiere über 2 Wochen, danach Ketokonazol oral, 6 Wochen später verstarb Hund akut	Strunck et al, 2004
Sibirischer Husky, 12 J, mk	Uveitis rechtsseitig	zytologisch: <i>P. spp.</i> (subretinales Aspirat), kulturell: V.a. <i>P. wickerhamii</i>	Prednisolon Acetat Augentropfen 1 % + Deracoxib (2 mg/kg/1 x tägl) für 5 Tage, nach mehreren Wochen Prednisolon 5 mg/Tag + topische Prednisolon-Augentropfen	vollständige Erblindung nach anfänglicher Verbesserung der Klinik, Euthanasie nach 2 Wochen nach Entwicklung hämorrhagischer Kollitis	Gionfriddo et al, 2007
Mischling, 8 J, m	hämorrhagische Kollitis	zytologisch: <i>P. spp.</i> , molekularbiologisch: <i>P. zopfi</i> Genotyp 2	Nystatin oral (initial 500.000 IU, alle 8 h, für 14 Tage, danach 100.000 IU, alle 8 h, für 90 Tage)	90 Tage nach Therapie waren die Rektalabstriche negativ, aufgrund fehlender Rezidive wird Hund als geheilt eingestuft	Ribeiro et al, 2009
Riesenschnauzer, 3 M, w	hämorrhagische Kollitis	pathohistologisch: <i>P. spp.</i> (Kolonbiopate)	Metronidazol+Sulfadiazin-Trimethoprim+Prednisolon (ohne Angabe der Dosierungen), 6 Wochen lang	keine Verbesserung der Klinik, 6 Wochen nach Erstvorstellung Euthanasie	Gorissen, 2011
English Setter, 3 J, wk	hämorrhagische Kollitis, ZNS-Symptome	zytologisch: <i>P. zopfi</i> (Liquor), MRT-Bildgebung: Meningoenzephalitis	Prednisolon (1,25 mg/kg p.o. 1 x tägl)+ Clindamycin (9,3 mg/kg p.o. 2 x tägl.), danach lipid-komplex Amphotericin B intrathecal (0,5 mg in 5 ml Dextrose 10%) alle 2 Tage, insges. 5 Mal, später Prednisolon-Reduktion (0,3 mg/kg p.o. 1 x tägl) und Amphotericin B iv. (2 mg/kg)	2 Wochen nach Beginn der Therapie Patient deutlich gebessert, danach Durchfallepisoden und Ataxie. 4 Wochen später Rezidiv, Kontroll-MRT zeigt Läsionen im Stammhirn progressiv, Euthanasie	Young et al, 2012

3. Material und Methoden

3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Prävalenz von Protothekeninfektionen bei Hunden aus dem Klientel der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin. Es wurde mithilfe des selektiven PIM-Agars eine kulturelle Untersuchung der Fäzes durchgeführt. Des Weiteren galt es herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen kultureller Prävalenz und serologischer Prävalenz gibt. Hierzu wurde die Fragestellung beantwortet, ob der Antikörperstatus der untersuchten Hunde überhaupt für eine serologische Diagnostik geeignet ist. Darauf aufbauend wurde ein ELISA-Testsystem zum Nachweis von Prototheken-Antikörpern im Blutserum von Hunden entwickelt. Abschließend wurden die kulturellen Resultate mit den serologischen Testergebnissen verglichen.

3.2 Material

3.2.1 Tiere

Beprobt wurden Hunde, welche im Zeitraum vom 01.04.2010 - 03.08.2011 in der Kleintierklinik der FU Berlin vorstellig wurden. Weiterhin erfolgte die Untersuchung von Probenmaterial eines enteritisch erkrankten Hundes, welches dem Institut der Tier- und Umwelthygiene der FU Berlin eingesandt wurde (Fall S). Die untersuchten Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 (n=236): gesunde/ akut erkrankte/ orthopädisch erkrankte Patienten sowie Hunde mit benignen Neoplasien, Gruppe 2 (n=66): Hunde mit gastrointestinalen Symptomen und Gruppe 3 (n=62): Patienten mit chronischen/ immunbedingten/ malignen Erkrankungen ohne gastrointestinale Beteiligung. Insgesamt wurden 364 Hunde untersucht. Drei Hunde der Gruppe 2 (Fall FU 1, FU 2 und S) wurden aufgrund ihrer Anamnese und ihres Krankheitsverlaufs als Protothekosefälle eingestuft. Im Fall FU 1 und FU 2 handelt es sich um Überweisungspatienten der Kleintierklinik der FU Berlin. Untersuchungen der Serum- und Kotproben erfolgten im Institut für Tier- und Umwelthygiene der FU Berlin. Im Fall FU 1 wurden zusätzlich auch Harnproben untersucht. Der Fall S wurde extern dem Institut der Tier- und Umwelthygiene der FU Berlin eingesandt. Untersucht wurden Kot- und Serumproben.

Der Fall FU 1 betraf einen 10-jährigen, männlichen Appenzeller, welcher im März 2010 in der Kleintierklinik der FU Berlin wegen einer chronischen hämorrhagischen Diarrhoe und einem akuten rechtseitigen Visusverlust vorstellig wurde. Anamnestisch war der Hund bereits auf dem linken Auge bedingt durch eine Fundusatrophie blind und eine rezidivierende Giardieninfektion wurde für den Durchfall verantwortlich gemacht. Der Patient wies bei der Erstvorstellung ein unbeschwertes Allgemeinbefinden auf, sonografische und röntgenologische Untersuchungen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung unauffällig. Bis auf eine geringgradige Lymphopenie und eine geringgradige Anämie waren die durchgeführten Laboruntersuchungen unauffällig. Die ophthalmologische Untersuchung ergab eine komplette bullöse Netzhautablösung des rechten Auges und eine Retinaablation mit fokalen Infiltraten des linken Auges. Aufgrund der dramatischen Augenbefunde in Verbindung mit der intestinalen Problematik wurde die Verdachtsdiagnose Protothekose geäußert. Eine orale Therapie mit Itrakonazol wurde begonnen, da noch kein Ergebnis des Restistenztests vorlag. Leider waren die Erreger sowohl gegen Azole als auch gegen Amphotericin B resistent und es verblieb nur noch die Möglichkeit der symptomatischen Therapie. Nach acht Monaten wurde der Hund wegen Verschlechterung des Allgemeinbefindens, Gewichtsverlust und Lethargie euthanasiert.

Im Fall FU 2 war eine 4,5-jährige Rhodesian Ridgeback Hündin an einer chronischen hämorrhagischen Diarrhoe erkrankt. Gewichtsverlust und Lethargie mit neurologischen Ausfällen in Form einer linksseitigen Kopfschiefhaltung waren auffällig. Das rechte Auge war infolge einer Uveitis mit partieller Netzhautablösung betroffen. Die Laborergebnisse wiesen eine Monozytose und eine geringgradige Lymphopenie auf. Anamnestisch wurde berichtet, dass eine durchgeführte Glukokortikoidgabe eine kurzzeitige Verbesserung der gastrointestinalen Symptomatik erbrachte, jedoch diätetische Maßnahmen und orale Antibiosen erfolglos blieben. Parasitologische Kotuntersuchungen waren negativ. Eine posteriore Uveitis mit partieller Netzhautablösung, multifokalen Hyperpigmentationsarealen und einem subretinalen, granulomatösen Exsudat wurde im rechtsseitigen Auge in der ophthalmologischen Untersuchung diagnostiziert. Aufgrund des schlechten Allgemeinbefindens, den progressiv verschlechternden neurologischen Symptomen und der infausten Prognose wurde der Hund 5 Tage nach Erstvorstellung eingeschläfert.

Im Fall S handelte es sich um eine 4-jährige Rhodesian Ridgeback Hündin, welche eine hochgradige hämorrhagische Kolitis mit Gewichtsverlust und einem linksseitigen Visusverlust infolge einer Uveitis mit begleitender Netzhautablösung aufwies. Die bisherigen Therapieversuche mit Glukokortikoiden und Antibiotika waren bis auf eine kurzzeitige Verbesserung des Allgemeinzustandes der Hündin frustan. Parasitologische und

mikrobiologische Kotuntersuchungen waren bis auf einen mäßigen Gehalt an *Candida albicans* unauffällig, eine Giardiose wurde ausgeschlossen. Blutuntersuchungen waren ohne besonderen Befund. Hinweise auf eine mögliche Immunsuppression oder Nierenbeteiligung ergaben sich nicht. Durch Glukokortikoidgaben besserten sich die Blutungen im Kot kurzfristig. In der ophthalmologischen Untersuchung wurde auf dem linken Auge eine Erblindung infolge einer Uveitis mit einhergehender Netzhautablösung und Exsudatbildung festgestellt. Das rechte Auge wies eine Chorioretinitis mit bullöser Ablation auf. Eine zeitnahe Probelaparotomie mit Biopsieentnahmen aus Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber und Milz ergab den mikroskopischen Nachweis von verdächtigen PAS-positiven rundlichen Strukturen in Mukosa und Submukosa des Dickdarms. Serum- und Kotproben wurden in das Institut der Tier- und Umwelthygiene eingesandt. Das klinische Bild der Hündin verschlechterte sich akut. Aufgrund der infausten Prognose entschieden sich die Besitzer zur Euthanasie.

3.2.2 Probenentnahme und -bearbeitung

Bei allen Hunden wurden Reste der ohnehin entnommenen Blut-, Kot- und vereinzelt vorhandener Harnproben untersucht. Die Entnahme der Blutprobe erfolgte beim Legen des venösen Zugangs in die *Vena cephalica* nach ordnungsgemäßer Desinfektion oder durch einfache Punktion dieser Vene. Die Kotproben wurden rektal entnommen und bis zu ihrer zeitnahen Untersuchung in Stuhlröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufbewahrt.

3.3 Methoden

3.3.1 Kulturelle Untersuchung der Proben

Von den Kotproben wurde jeweils 1 g für die Voranreicherung abgewogen und in je 9 ml Sabouraud-Bouillon suspendiert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37 °C wurden aerob die Anreicherungen anschließend auf selektivem Prototheken-Isolationsmedium (PIM)-Agar ausgestrichen. Die Agar Platten wurden bei 37 °C aerob inkubiert und täglich über mindestens 10 Tage auf ein Wachstum von Prototheken kontrolliert. Im Falle des Wachstums verdächtiger Kolonien erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Isolate mittels nativer Lactophenol-Baumwollblau-Färbung und die Genotypisierung der Prototheken-Isolate mittels PCR. Zusätzlich zu den Kotproben wurden im Fall FU 1 ebenfalls Proben von Harn, Vollblut, Serum, Speichel und zweier Gegenstände (Tennisball und

Gießkanne) kulturell untersucht. Die Proben wurden mit und ohne Voranreicherung auf PIM ausgestrichen.

3.3.2 Gewinnung von Blutseren

Für die Gewinnung von Blutserum wurden Serumröhrchen (Fa. Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) verwendet. Die Blutproben wurden ca. 30 Minuten nach Blutentnahme bei 3500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert (Labofuge 400, Fa. Thermo Scientific Inc, Soeborg, Dänemark). Anschließend wurde das Serum als Überstand abpipettiert und in 2 ml Mikroröhrchen mit Verschluss (Fa. Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) bis zur serologischen Auswertung bei - 21°C aufbewahrt.

3.3.3 PCR Analyse

Als Bestätigung der kulturell positiv getesteten Kotproben wurde zusätzlich eine PCR-Untersuchung der Isolate nach Roesler et al (2006) durchgeführt. Als Kontrollen dienten die Typstämme SAG 2063 (für *P. zopfii* Genotyp 1), LZ 5 (für *P. zopfii* Genotyp 2) und SAG 2064 (für *P. blaschkeae*) der Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen. Die bei 37 °C aerob über 48 Stunden auf Sabouraud-Glukose-Agar-Platten kultivierten Prototheken-Kulturen wurden mittels Ultraschallbehandlung durch einen Ultraschallprozessor (UP 100 H, Fa. Dr. Hielscher, Teltow, Deutschland) aufgeschlossen. Die weitere DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskit DNeasy Plant Mini Kit™ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerangaben. Basierend auf dem Alignment der 18 S-rDNA-Sequenzen wurden folgende genotyp- bzw. spezie-spezifische Oligonukleotide verwendet (biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland): Proto 18-4 F (5'GACATGGCGAGGATTGACAGA-3') und PZ GT I R (5'GCCAAGGCCCCCGAAG-3') für *P. zopfii* Genotyp 1, Proto 18-4 F und PZ GT II R (5'-GTCGGCGGGGCAAAGC-3') für *P. zopfii* Genotyp 2 und PZGT 3-IK F (5'CAGGGTTCGATTCCGGAGAG-3') und PZ GT III R (5'GTTGGCCCGGCATCGCT-3') für *P. blaschkeae*. Folgende Oligonukleotide dienten als interne Amplifikationskontrollen: Proto 18-4 F und R (5'AGCACACCCAATCGGTAGGA-3') für *P. zopfii* Genotyp 1 und 2 sowie PZGT 3-IK F und R (5'GTTGGCCCGGCATCGCT-3') für *P. blaschkeae*. Die Durchführung der PCRs erfolgte im Thermocycler Tprofessional™ (Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland). Für optimale Zyklusbedingungen wurde eine Denaturierungstemperatur von 95°C für 30 Sekunden bei einer Extension von 72°C für 40 Sekunden gewählt. Die Annealingtemperatur für das

Oligonukleotidpaar I (PZ GT I R und Proto 18-4 F) und II (PZ GT II R und Proto 18-4 F) betrug 58 °C für 30 Sekunden und für das Oligonukleotidpaar III (PZ GT III R und PZGT 3-IK F) 63 °C für 30 Sekunden. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in 2 %igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt und anschließend mit GelRed (Fa. Biotium Inc., California, USA) gefärbt. Der Nachweis der Amplifikate erfolgte im Geldokumentationssystem Chemie DocTM XRS (Bio-Rad Laboratories, California, USA).

3.3.4. Western Blot Analyse

Um zunächst festzustellen, ob überhaupt Antikörper im Blutserum infizierter Hunde gebildet werden bzw. nachzuweisen sind, wurde eine Western Blot Analyse der Serumproben durchgeführt.

Mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch die Anwesenheit von SDS (SodiumDodecylSulfat) erhalten alle Proteine eine negative Ladung (SDS-Bindung) und der Zusatz von 2-Mercaptoethanol verringert die internen Disulfidbrücken. Indem die Charakteristika „Ladung“ und „Form“ so ihren Einfluss bei der elektrophoretischen Auftrennung verlieren, ist das „Molekulargewicht“ die alleinige Eigenschaft, nach der Proteine aufgetrennt werden. Anschließend werden die Proteine aus dem Gel auf eine immobilisierende Membran (Nitrocellulose) transferiert („blotting“) und können hier von spezifischen Antikörpern im Untersuchungsmaterial erkannt werden. Der Vorteil des Verfahrens liegt im Spezifitätsnachweis durch die vorangegangene Protein-Auftrennung (Pezzutto et al. 2006), die eine Identifizierung von Antigenen möglich macht.

Eine Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-Page) wurde unter Verwendung von 4 % igen Sammelgelen und 12 % igen Trenngelen nach Laemmli (1970) durchgeführt. Als Antigen diente das Zelllysate von LZ-5 und als primärer Antikörper das Blutserum der zwei an Protothekose erkrankten Hunde (Fälle FU1 und FU2). Als sekundäre Antikörper wurden Ziege-Anti-Hund-IgG und Ziege-Anti-Hund-IgA eingesetzt. Ein Serum-Pool klinisch und kulturell negativer Tiere diente als Negativkontrolle. Mit Hilfe einer Schachbrett-Titration wurden die geeignete Serum- und Konjugatverdünnung festgelegt. Beste Ergebnisse erzielte eine eingesetzte Serumverdünnung von 1:200 in Kombination mit der Konjugatverdünnung von 1:5000 sowohl für den spezifischen IgG- als auch den IgA-Nachweis. Das analysierte Proteinpräzipitat bestand aus 100 µg Prototheca-Zelllysate (LZ-5) und wurde durch Acetonpräzipitation und anschließender Lufttrocknung hergestellt. Durch Zugabe von 100 µl glycerolhaltigem Probenpuffer (siehe Anhang) wurde das Präzipitat resuspendiert und für 7 min bei 60 °C erhitzt. Nach Abkühlung wurde mit einer Pipette je 10

µl der Resuspension vorsichtig in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Ein vorgefärbter Proteinmarker mit definierten Molulargewichten von 10 - 250 kDa (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Bei einer konstanten Spannung von 15 mA pro Gel betrug die Laufzeit der Elektrophorese ca. 90 Minuten (EPS 301, Fa. GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Nach Auftrennung der Antigenpräparation in der SDS-Gelelektrophorese und kurzer Überführung in eine Transferpufferlösung (siehe Anhang) für 5-10 min, erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Trans Blot Trans Medium Pure Nitrocellulosemembran, Fa. Bio-rad, München, Deutschland) unter Nutzung einer Blottingapparatur (Typ TH 77[®] Semidry, Fa. GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Der Transfer wurde bei 80 mA pro Gel über 90 Minuten durchgeführt. Die Qualität des Transfers auf die Membran wurde mit Hilfe einer kurzen Ponceau-Anfärbung über 30 Sekunden und einer anschließenden Entfärbung mit TBST (siehe Anhang) überprüft. Die Blockierung der unspezifischen und noch freien Antikörper-Bindungsstellen erfolgte über Nacht in einer Inkubation mit einem Blockierungspuffer bestehend aus 1 % Magermilchpulver (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran für 2 x 10 Minuten in 1 x TBST gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit den zu untersuchenden Hundeprobenseren in einer Verdünnung von 1: 200 in 1 x TBST.

Nach kurzer Wässerung mit 1 x TBST und 2 x 10 Minuten waschen mit 1 x TBST, erfolgte eine erneute Inkubation für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit Meerrettichperoxidase-konjugierten, affinitätschromatographisch gereinigten, sekundären Antikörpern: Ziege-Anti-Hund-IgG (Fa. Rockland, Gilbertsville, USA) in einer Verdünnung von 1: 5000. Anschließend wurde die Membran zunächst 2 x 5 Minuten in 1 x TBST und danach für weitere 5 Minuten mit TBS gewaschen. Die Detektion der Antigen-Antikörper Komplexe erfolgte nach Färbung mit 3 ml TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) für 10-15 Minuten und anschließendem Scan mit einem Geldokumentationssystem ChemiDoc XRS Image Systems (Fa. Bio-rad, München, Deutschland).

Die IgA-Antikörper wurden ebenfalls unter Nutzung von Meerrettichperoxidase-konjugierten, affinitätschromatographisch gereinigten, sekundären Antikörpern detektiert: Ziege-Anti-Hund-IgA (Fa. Biomol, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1: 5000. Die Durchführung erfolgte analog zum IgG-Nachweis.

3.3.5 Entwicklung eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA macht sich das immunologische Konzept der spezifischen Antigen-Antikörper Bindung zu Nutzen. Hierbei werden enzymmarkierte Antigene (oder Antikörper) als Nachweis für das Vorhandensein des jeweiligen Bindungspartners (Antikörper oder Antigen) eingesetzt. Substrat wird vom Enzym umgesetzt, als Reaktionsprodukt kann dann ein Farbumschlag oder eine Fluoreszenz beobachtet und gemessen werden. Anhand der Signalstärke kann die jeweilige Antigen- /Antikörperkonzentration gemessen werden, so dass der ELISA auch für quantitative Nachweise geeignet ist (Engvall et al. 1971; Gan und Patel 2013).

Man unterscheidet kompetitive und nicht kompetitive Verfahren. Beim kompetitiven ELISA konkurrieren enzymmarkierte Antikörper und Proben-Antikörper um die Bindung an ein Antigen. Grundsätzlich ist zu sagen, dass hier eine umgekehrte Korrelation zwischen der Konzentration des nachzuweisenden Agens und der zu detektierenden Reaktion besteht. Im Gegensatz dazu ist beim nicht kompetitiven Verfahren die Farbreaktion eine Funktion der Antikörperdichte in dem zu untersuchenden Material. Sowohl für die kompetitiven als auch die nicht kompetitiven Verfahren werden grundsätzlich drei unterschiedliche Varianten beschrieben: der direkte ELISA, der indirekte ELISA und der Sandwich ELISA.

Bei der direkten Testvariante wird ein Antigen auf eine Platte beschichtet. Nach einem Waschschrift wird der enzymmarkierte Antikörper aufgebracht und nach erneutem Waschen entsteht durch Zugabe des Substrates eine messbare Reaktion. Die Farbreaktion wird nach Beendigung der Inkubationszeit durch die Zugabe einer starken Säure gestoppt. Das Beschichten der Platten geschieht durch passive Bindung der Proteine an die Mikrotiterplatte im Rahmen einer definierten Inkubationszeit. Beim indirekten ELISA wird dagegen ein zusätzlicher Schritt zwischen Antigen-Beschichtung und dem Aufbringen des enzymmarkierten Antikörpers eingefügt. Hierbei binden die enzymmarkierten Antikörper nicht an das Antigen. Diese Aufgabe wird von nicht markierten spezifischen Antikörpern (meist aus einer zu untersuchenden Probe) übernommen. Im Anschluss erfolgt die Bindung der markierten Antikörper an die bereits gebundenen Antikörper. Das weitere Vorgehen ist identisch zu dem des direkten ELISA. Durch die Möglichkeit der Detektion einzelner Antikörperklassen (IgA, IgM, IgG) bietet dieses Verfahren einen gewissen Vorteil. Meist sind die enzymmarkierten Antikörper so beschaffen, dass sie z.B. ausschließlich an IgG-Antikörper binden. Die enzymmarkierten Antikörper sind meist Anti-Spezies-Antikörper, welche mit allen Antikörpern einer bestimmten Tierart reagieren und somit variabel eingesetzt werden können. Der Sandwich ELISA umschreibt eine Methode, indem meist 1 Antigen mit 2 Antikörpern oder umgekehrt 1 Antikörper mit 2 Antigenen reagiert. Auch hier wird zwischen einem direkten und indirekten Verfahren unterschieden: beim direkten

Sandwich ELISA wird die Mikrotiterplatte mit einem spezifischen Antikörper beschichtet und eine Bindung des Antigens erfolgt. Durch das Aufbringen eines enzymmarkierten Antikörpers und mit Zugabe von Substrat wird eine messbare Reaktion erzeugt. Der Nachteil dieses Vorgehens besteht darin, dass das Antigen mindestens zwei Epitope, an die die Antikörper binden können, benötigt. Im Gegensatz dazu wird bei dem indirekten Sandwich ELISA wieder ein zusätzlicher spezifischer Antikörper eingesetzt, so dass der enzymmarkierte Antikörper nicht mit dem Antigen, sondern mit dem spezifischen Antikörper eine Bindung eingeht (Crowther 2001). Um die Antikörperantwort der beprobten Hunde zu untersuchen wurde ein nicht kompetitiver indirekter Elisa in Anlehnung an einen bereits erfolgreich eingesetzten ELISA zur Diagnostik der bovinen Protothekenmastitis entwickelt (Roesler et al. 2001).

3.3.5.1 Plattencoating

Als Coating-Antigen diente der Typstamm LZ-5 von *Prototheca zopfii* Genotyp 2 aus der Stammsammlung für Algenkulturen der Universität Göttingen.

Dieser Stamm wurde auf einem Sabouraud-Glukose-Agar aerob bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Die Kulturen wurden mit 4 ml Carbonat-Beschichtungspuffer (siehe Anhang) von der Agarplatte abgeschwemmt und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip, Fa. Digital Bio, Seoul, Korea) wurde die Gesamtkeimzahl der gewonnenen Suspension bestimmt. Durch Verdünnen mit Carbonat-Beschichtungspuffer wurde diese anschließend auf 1×10^7 Protothekenzellen/ml eingestellt. Nachfolgend wurden jeweils 100 µl pro Well in 96-Well-Mikrotiterplatten (NuncTM, F- Maxisorp, Fa. Thermo Fischer Scientific Inc., Søborg, Dänemark) pipettiert. Diese ELISA-Mikrotiterplatten erwiesen sich bereits bei der Entwicklung der ELISA's für die Rinderprotothekenmastitis aufgrund ihrer Hydrophilität und der nachgewiesenen höheren Antigen-Bindungskapazität als diejenigen Platten mit der höchsten Bindungskapazität für Prototheken (Roesler et al. 2001). Die mit Folie versiegelten Platten wurden auf einem Horizontalschüttler (Typ MTS 2, Fa. IKA^R, Staufen, Deutschland) mit 400 U/min für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät (Typ Ultrawash II^R, Fa. Dynex Technologies, Chantilly, USA) viermal mit je 300 µl Waschpuffer (PBS-Tween 20[®], siehe Anhang) gewaschen und auf Zellstoff ausgeklopft. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurden jeweils 110 µl Blockierungspuffer (siehe Anhang) in jedes Well pipettiert. Die Platten wurden erneut 1 Stunde bei 37 °C auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Nachfolgend wurden die Mikrotiterplatten wiederholt viermal gewaschen, ausgeklopft und getrocknet. Zur Aufbewahrung wurden sie mit Folie bedeckt und bei -21 °C eingefroren.

3.3.5.2 ELISA Durchführung

Das Design des ELISA basierte auf der Positiv-Referenz-Standardmethode nach Butler et al. (1978). Als Positivstandard diente ein Serum-Pool von 2 Hunden mit bestätigter Protothekose (Fall FU 1 und FU 2: hämorrhagische Enteritis und Retinaablösung), welche sowohl durch kulturellen Erregernachweis als auch mithilfe eines Western Blots und einer PCR Untersuchung identifiziert werden konnten. Als Negativkontrolle diente ein Serum-Pool von 10 klinisch und kulturell negativen Hunden. Die am besten geeignete Serum- und Konjugatverdünnung wurden mithilfe einer Schachbrett-Titration ermittelt (siehe Anhang). Die folgenden Verdünnungen wurden für den Nachweis spezifischer anti-*Prototheca*-Antikörper vom Typ Immunglobulin-Isotyp G (IgG) verwendet:

Tabelle 5 : Eingesetzte Serum- und Konjugatverdünnung

Konjugat	Proben-Verdünnung	Konjugat-Verdünnung
IgG	1: 2000	1: 8000

Folgendes Probenauftragsschema wurde für den indirekten ELISA angewendet:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Probenverdünnung
A	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1:2000
B													1:4000
C													1:8000
D													1:16000
E	P	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1:2000
F													1:4000
G													1:8000
H													1:16000

Abbildung 1: Probenauftrags-Schema

N: Negativkontrolle

P: Positivkontrolle

S: Proben

Die Serumproben sowie die Positiv- und die Negativkontrolle wurden zunächst mit PBS-Tween 20[®] verdünnt und zu je 100 µl nach dem in Abb. 1 gezeigten Schema in 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Zunächst wurden in jedes Well der Mikrotiterplatte 100 µl PBS-

Tween 20[®] pipettiert. In Reihe A Spalte 1 wurde dann die Negativkontrolle aufgetragen, in Reihe A Spalte 2-12 die zu untersuchenden Serumproben. In Reihe E Spalte 1 die Positivkontrolle und in Reihe E Spalte 2-12 wiederum die zu testenden Seren. Mit einer Mehrkanalpipette wurde anschließend eine geometrische Verdünnungsreihe von Reihe A-D und Reihe E-H pipettiert, so dass in Reihe D und Reihe H eine Verdünnung von 1:16000 vorlag. Darauf folgte eine 1-stündige Inkubation bei Zimmertemperatur auf dem Horizontalschüttler und ein anschließender viermaliger Waschschrift mit PBS (siehe Anhang). Im nächsten Schritt wurde ein polyvalentes, affinitätsgereinigtes, monospezifisches und peroxidasekonjugiertes Hyperimmunserum als sekundärer Antikörper eingesetzt: Ziege-anti-Hund IgG (Fa. Biomol, Hamburg, Deutschland). Dieses wurde wie oben beschrieben mit PBS-Tween 20[®] verdünnt und jedes Well wurde mit 100 µl Gebrauchslösung beschickt. Es folgte eine 30-minütige erneute Inkubation bei Zimmertemperatur auf dem Horizontalschüttler. Die Platten wurden viermal mit PBS gewaschen und anschließend ausgeklopft. Zum Entwickeln der Platten wurde pro Well jeweils 100 µl einer wasserstoffperoxidhaltigen und auf dem Farbstoff TMB- (Tetramethylbenzidin) basierenden Substratlösung (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) pipettiert und die Reaktion nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler mithilfe von 1% Schwefelsäure abgestoppt. Die Farbreaktion wurde automatisch mit einem ELISA Reader (MagellanTM, Fa. Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) mit einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm abgelesen. Die erhobenen Daten wurden mit einem zur ELISA-Auswertung entwickelten Computerprogramm (SalmoSoftTM, Fa. Labor Diagnostik GmbH, Leipzig, Deutschland) auf Basis der Referenz-Standard-Methode berechnet und die Antikörperaktivitäten in ELISA-Units (EU) pro ml angegeben. Zur Bestimmung einer Kalibriergeraden wurde eine lineare Regressionsanalyse der gegen den Leerwert korrigierten und „log-log“ transformierten OD-Werte des positiven Kontrollserums berechnet, wobei dem Positivserum eine Antikörperaktivität von 1000 EU zugeordnet wurde.

Die Aktivität der untersuchten Seren wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität}_{\text{Probe}} = \frac{\text{Aktivität}_{\text{Standard}} \times \text{Verdünnung}_{\text{Probe}}}{10^{\left[\frac{\text{Log}(\text{OD}_{\text{Probe}}) - \text{y-Achsenabschnitt}_{\text{Standard}}}{\text{Steigung}_{\text{Standard}}} \right]}}$$

Sofern sie im linearen Bereich der Titrationskurve des positiven Standards lagen, wurden die ELISA-Aktivitäten für jedes Serum berechnet. Das arithmetische Mittel aller Einzelwerte der Titrationsreihe ergab die Aktivität des Testserums in EU.

3.3.5.3 Statistische Auswertung

Die Ermittlung der Schwellenwerte (Cut-off Werte) für ein positives Testergebnis zur Diagnostik der Infektion mit *P. zopfii* wurden anhand jedes 6. Hundes der 1. Gruppe (gesunde/ akut erkrankte/ orthopädisch erkrankte Patienten sowie Hunde mit benignen Neoplasien) berechnet. Dies wurde im Vorfeld willkürlich festgelegt. Hierfür wurden aus den ELISA-Aktivitäten der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Der Cut-off Wert für ein positives Ergebnis errechnete sich aus der Summe des arithmetischen Mittels und der dreifachen Standardabweichung dieser nicht infizierten, seronegativen Tiere:

$$C_w = M + 3 \times S$$

C_w= Cut-off Wert

M= arithmetisches Mittel

S= Standardabweichung

Anhand der so ermittelten Cut-off Werte wurden die serologischen Testergebnisse der einzelnen Tiere der verschiedenen Protothekengruppen diagnostisch bewertet. Um eine Aussage über die diagnostische Eignung des ELISA-Tests treffen zu können, erfolgte anschließend eine Bewertung der ELISA mittels der Vierfeldertafel nach Tyler und Cullor (1989) (vgl. Tab. 6). Das Prinzip der Evaluierung anhand der Vierfeldertafel stellte sich wie folgt dar:

Tabelle 6: Vierfeldertafel für die Bewertung von ELISA-Testsystemen

Referenztest (hier: kultureller Befund)

		Positiv	Negativ	Summe
Testergebnis des ELISA	Positiv	a	b	a+b
	Negativ	c	d	c+d
	Summe	a+c	b+d	N=a+b+c+d

Die sich anschließende Auswertung erfolgte durch Berechnung der Sensitivität $[a/(a+c)]$, Spezifität $[d/(b+d)]$, des positiven $[a/(a+b)]$ und negativen $[(d/(c+d))]$ prädiktiven Wertes sowie der Prävalenz $[(a+c)/N]$, scheinbaren Prävalenz $[(a+b)/N]$ und Inzidenz $[(a+c)/N]$ pro Zeiteinheit (Tyler und Cullor 1989).

4. Ergebnisse

4.1 Kulturelle Befunde

Von den insgesamt 364 untersuchten Kotproben wiesen drei Proben (Fall FU 1, FU 2 und S) ein kulturelles Wachstum auf PIM auf. Bereits einen Tag nach Ausstrich waren die charakteristischen weißlichen Kolonien mit unregelmäßigem Rand auffällig. Es erfolgte die mikroskopische Untersuchung der Isolate nach Lactophenol-Baumwollblau-Färbung. Hierbei konnten ovoide und sphärische Zellen unterschiedlicher Größe und Form festgestellt werden. Der Zellkern, falls vorhanden, lag meist zentral. Die Zellwand war deutlich angefärbt und teilweise war die typische endogene Sporenbildung erkennbar. Im Fall FU 1 konnten darüber hinaus auch aus zusätzlichen Harnproben Prototheken kulturell nachgewiesen werden. Aus den anderen Proben (Speichel, Tennisball und Gieskanne) ließen sich keine Prototheken isolieren.

4.2 PCR Analyse

Die kulturell positiv getesteten Isolate von FU 1 und FU 2 wurden durch Sequenzanalyse der 18 S rDNA mit den Referenzstämmen *P. zopfii* Genotyp 1 und 2 sowie *P. blaschkeae* verglichen. Diese Sequenzanalyse diente der eindeutigen Speziesidentifikation.

Das 450 bp große PCR-Produkt stellte die unspezifische Amplifikationskontrolle dar, welches sowohl bei den drei Referenzstämmen (*P. zopfii* Genotyp 1 und 2 sowie *P. blaschkeae*) als auch bei den klinischen Isolaten (Fall FU 1 und FU 2) zu erkennen war. Hingegen war das 165 bp große, *P. zopfii* Genotyp 2 spezifische PCR-Produkt nur bei dem Referenzstamm des Genotyps 2 und den Isolaten FU 1 und FU 2 festzustellen. Demzufolge repräsentierten die Isolate FU 1 und FU 2 den Genotyp 2 von *P. zopfii*. Die *P. zopfii* Genotyp 1 spezifische PCR und die *P. blaschkeae* PCR für FU 1 und FU 2 waren negativ (Daten nicht aufgezeigt), so dass eine Mischkolonie ausgeschlossen werden konnte. Zum Zeitpunkt der PCR-Analyse waren nur die Proben von FU 1 und FU 2 zur Untersuchung vorhanden, die Probe S wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt dem Institut der Tier- und Umwelthygiene der FU Berlin eingesandt.

Die *P. zopfii* Genotyp 2 spezifische PCR für die zwei kulturell positiv getesteten Hunde ist in Abbildung 2 dargestellt.

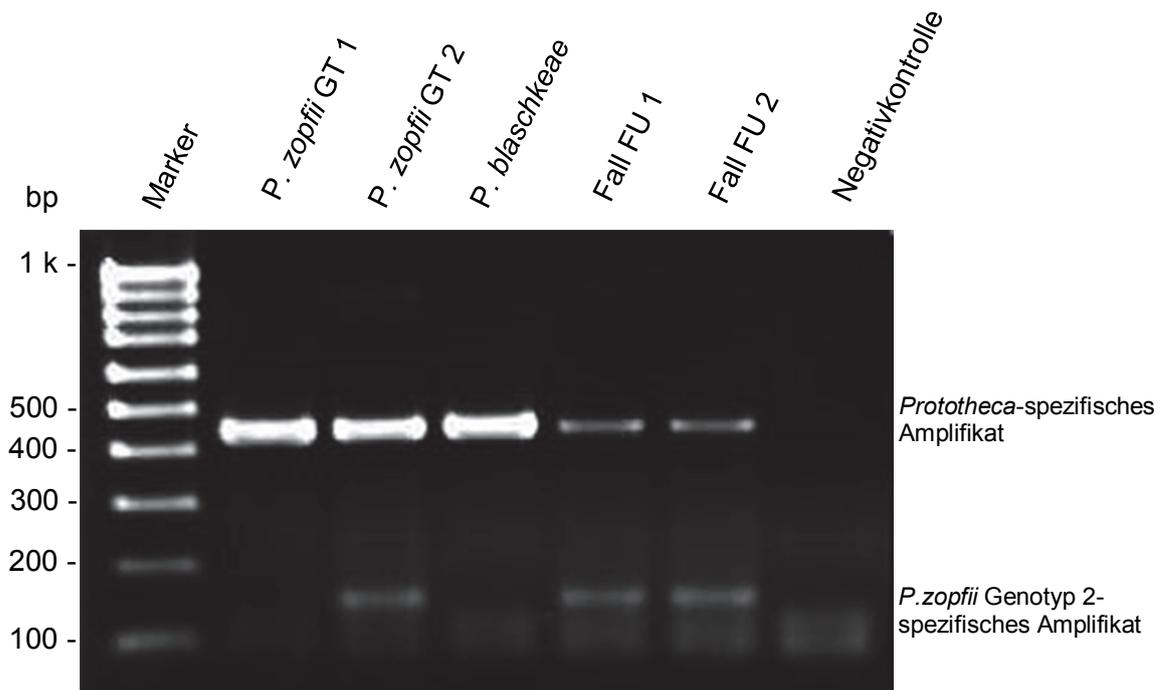


Abbildung 2: *P. zopfii* Genotyp 2 spezifische PCR für die beiden kulturell positiv getesteten Hunde (Fall FU 1 und FU 2)

4.3 Western Blot Analyse

Um festzustellen, ob im Blutserum Prototheken-infizierter Hunde überhaupt IgG- und IgA-Antikörper gegen Protothekenantigene nachzuweisen sind, wurde eine spezifische Western Blot-Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden vier Serumproben von FU 1 und eine Serumprobe von FU 2 untersucht. Ein Serumpool klinisch und kulturell negativer Tiere diente als Negativkontrolle.

Als Ergebnis konnten spezifische Antikörper gegen Antigene im Bereich von 26, 36 und 53 kDa für IgG und 26 sowie 33 kDa für IgA identifiziert werden (siehe Abbildung 3)

Die Untersuchung der Serumproben mittels Immunoblot-Analyse macht deutlich, dass erkrankte Hunde IgG- und IgA-Antikörper gegen Protothekenantigene bilden, die dann im Blutserum nachzuweisen sind. Dies war die wichtigste Voraussetzung für die nachfolgende Entwicklung des indirekten ELISA Testsystems.

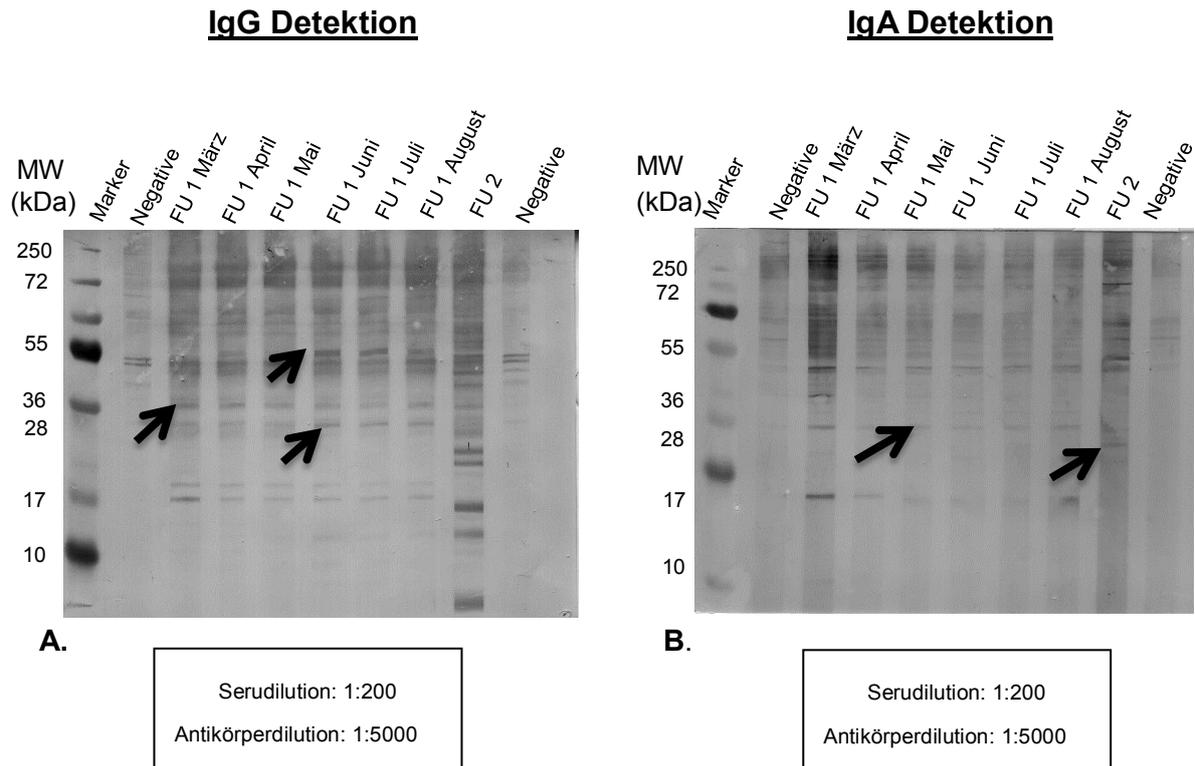


Abbildung 3: Western Blots der positiven Hundeseren (Fall FU 1 und FU 2). Die Pfeile kennzeichnen die Proteingröße der Hauptantigene von IgG (A.) und IgA (B.)

4.4 Entwicklung eines indirekten ELISA-Testsystems

4.4.1 Schachbrett-Titration

Mit Hilfe der in Abschnitt 3.3.5.2 dargestellten Schachbrett-Titration wurden die optimalen Antikörper-Antigen-Konzentrationen ermittelt. Wie in Abbildung 4 dargestellt, konnte bei einer eingesetzten IgG-Konjugatverdünnung von 1:8000 ein sehr guter linearer Abfall zwischen positiven und negativen Serumproben mit einer Serumverdünnung von 1:2000 gezeigt werden. Auf Grund dessen wurden diese Verdünnungsstufen im weiteren Verlauf für den IgG-Nachweis eingesetzt.

Leider konnten mithilfe der Schachbrett-Titration keine auswertbaren Ergebnisse für das eingesetzte Konjugat IgA erzielt werden. Daher war an dieser Stelle keine Entwicklung eines ELISA-Testverfahrens auf der Basis von IgA möglich und die Testsystem-Validierung wurde auf den Nachweis von IgG im Blutserum beschränkt.

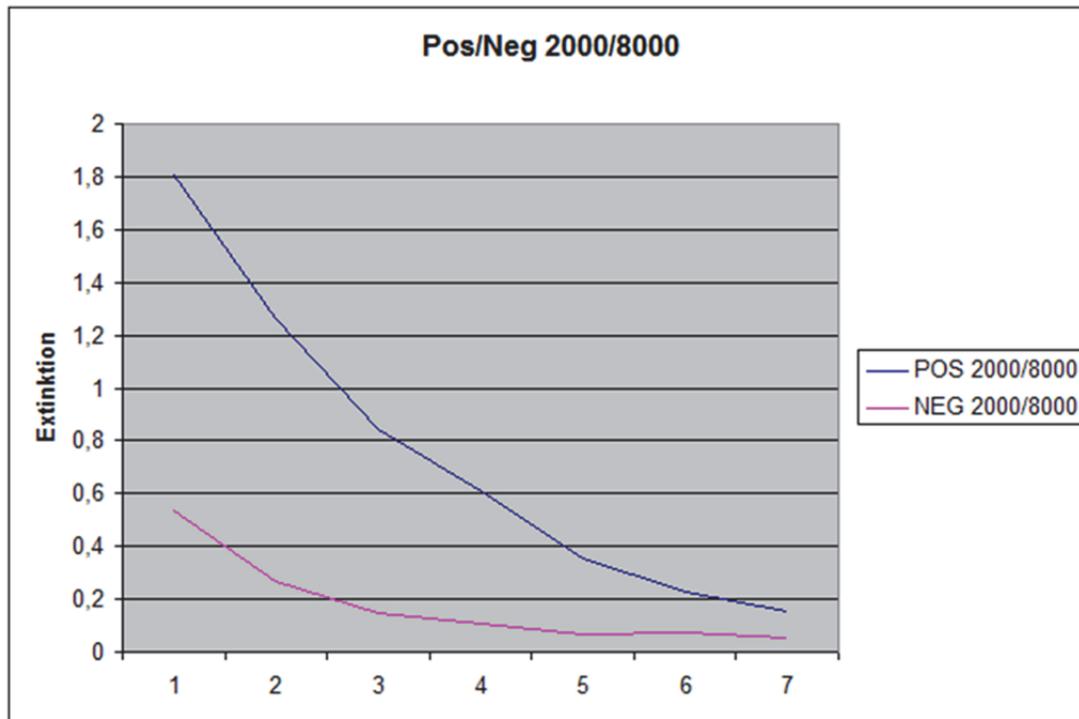


Abbildung 4: Liniendiagramm der Schachbrett-Titration der gewählten Serumverdünnung 1:2000 und Konjugatverdünnung 1:8000 für IgG

4.4.2 ELISA Testvalidierung

4.4.2.1 Intra-Assay-Variationen

Um Aussagen über die Reproduzierbarkeit des entwickelten ELISA-Testsystems treffen zu können, müssen sowohl die Variationen der Extinktionen innerhalb einer Mikrotiterplatte als auch die Variationen der Testergebnisse zwischen voneinander unabhängigen Tests ermittelt werden. Zur Bestimmung der Intra-Assay-Variation wurde innerhalb einer 96-well Mikrotiterplatte ein positives Referenzserum (Fall FU 1) in Reihe A Spalte 2-12 und ein negatives Referenzserum (Fall oB 230) in Reihe E Spalte 2-12 elf Mal nebeneinander aufgetragen. In Reihe A Spalte 1 wurde die Negativkontrolle und in Reihe E Spalte 1 die Positivkontrolle aufgetragen (vgl. Abbildung 1). Die Durchführung des ELISA erfolgte wie unter 3.3.5.2 beschrieben. Die Antikörperaktivitäten wurden mit dem Computerprogramm SalmoSoft™, Fa. Labor Diagnostik GmbH, Leipzig, Deutschland berechnet. Als Referenz dienten dabei die gegen den Leerwert korrigierten und „log-log“ transformierten OD-Werte des positiven Kontrollserums, wobei dem Positivserum eine Antikörperaktivität von 1000 EU zugeordnet wurde.

Ergebnisse

Tabelle 7: Ergebnisse der Intra-Assay-Variation

		ELISA-Aktivität (EU/ml)				ELISA-Aktivität (EU/ml)
Tier-Nr.	Kulturbefund	Untersuchung		Tier-Nr.	Kulturbefund	Untersuchung
FU 1 - 1	positiv	592,88		oB 230	negativ	31,74
FU 1 - 1	positiv	593,75		oB 230	negativ	28,92
FU 1 - 1	positiv	592,42		oB 230	negativ	29,4
FU 1 - 1	positiv	580,7		oB 230	negativ	34,26
FU 1 - 1	positiv	590,87		oB 230	negativ	32,14
FU 1 - 1	positiv	551,51		oB 230	negativ	36,98
FU 1 - 1	positiv	563,04		oB 230	negativ	31,95
FU 1 - 1	positiv	557,8		oB 230	negativ	31,39
FU 1 - 1	positiv	553,75		oB 230	negativ	40,11
FU 1 - 1	positiv	599,04		oB 230	negativ	23,67
FU 1 - 1	positiv	695,86		oB 230	negativ	33,99
	Mittelwert	588,33			Mittelwert	32,23
	Standardabweichung	39,91			Standardabweichung	4,3
	Variationskoeffizient	6,80%			Variationskoeffizient	13,30%

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht betrug der Mittelwert des positiven Referenzserums (FU 1) 588,33 EU/ml. Anhand des berechneten positiven Cut-off Wertes von 138 EU/ml (siehe Tabelle 11 im Abschnitt 4.5) waren die Untersuchungswerte als deutlich positiv einzustufen.

Die Standardabweichung der gemessenen Werte des Serums FU 1 betrug 39,91 EU/ml. Der Mittelwert des negativen Referenzserums oB 230 betrug 32,23 EU/ml und lag deutlich unter 138 EU/ml, so dass diese Untersuchungswerte als negativ eingeordnet wurden.

Anhand der in Tab. 7 dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass sich die gemessenen ELISA-Aktivitäten sowohl für das positive als auch für das negative Referenzserum für alle 11 Ansätze in einer vergleichbaren Größenordnung bewegten (FU-1: 551 – 695 EU/ ml; oB 230: 23 – 40 EU/ ml). Aus den in der Tabelle 7 dargestellten Ergebnissen ergaben sich für den ELISA folgende Variationskoeffizienten, dargestellt in Tabelle 8:

Tabelle 8: Intra-Assay-Variationskoeffizienten

	Serum IgG (FU 1) Positiv (EU/ml)	Serum IgG (oB 230) Negativ (EU/ml)
Mittelwert	588,33	32,23
Standardabweichung	39,91	4,3
Variationskoeffizient (%)	6,8	13,3
Variationskoeffizient insgesamt (%)	10,5	

Mit den oben genannten Mittelwerten und Standardabweichungen konnten die Variationskoeffizienten für das positive und negative Referenzserum errechnet werden. Der Intra Assay des positiven Referenzserums wies mit einem Variationskoeffizienten von 6,8 % innerhalb einer Mikrotiterplatte eine sehr gute Reproduzierbarkeit auf. Mit 13,3 % war die Reproduzierbarkeit des Intra Assays für das negative Referenzserum ebenfalls als sehr gut zu bewerten, wobei der Intra Assay für das positive Referenzserum zum Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern im Blutserum die geringere Schwankungsbreite aufwies.

4.4.2.2 Inter-Assay-Variationen

Zur Ermittlung der „Test-zu-Test“-Variationen wurden die Blutseren von ausgewählten positiven und negativen Serumproben in 5 verschiedenen Ansätzen pipettiert.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Inter-Assay-Variationen für verschiedene positive Blutseren eines an Protothekose erkrankten Hundes (Fall FU 1) dargestellt. Über mehrere Monate hinweg wurde hierzu zu verschiedenen Zeitpunkten im Rahmen der Diagnostik Blutserum entnommen und untersucht (FU1-1 bis FU1-11). Diese unterschiedlichen Blutseren wurden in 5 verschiedenen Ansätzen pipettiert und die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Positivseren miteinander verglichen.

Tabelle 9: Ergebnisse der Inter-Assay-Variation für die Blutseren eines positiv getesteten Tieres (FU 1) zu verschiedenen Probeentnahmezeitpunkten (1-11)

		Antikörperaktivität (EU/ml)								
Tier-Nr.	Kulturbefund	1.	2.	3.	4.	5.	MW	STAW	v	v (%)
FU 1 - 1	positiv	1081,33	1067,99	1016,77	1011,65	1087,24	1053	32,3175	0,03069	3,06
FU 1 - 2	positiv	1119,87	1046,64	1198,47	1059,84	1151,05	1115,17	56,5794	0,05074	5,07
FU 1 - 3	positiv	1044,62	1075,83	1149,92	1105,56	1264,83	1128,15	76,6555	0,06795	6,79
FU 1 - 4	positiv	1123,49	1099,92	1094,05	1314,76	1316,11	1189,67	103,163	0,08672	8,67
FU 1 - 5	positiv	1174,04	1118,24	1253,88	1195,04	1171,27	1182,49	43,7707	0,03702	3,70
FU 1 - 6	positiv	1053,21	1084,16	1025,47	1078,2	1223,92	1092,99	68,6743	0,06283	6,28
FU 1 - 7	positiv	1373,22	1046,65	1148,97	1132,58	1233,46	1186,98	110,401	0,09301	9,30
FU 1 - 8	positiv	1426,83	1454,77	1314,2	1488,05	1532,01	1443,17	73,4051	0,05086	5,09
FU 1 - 9	positiv	1477,51	1417,59	1479,62	1466,67	1571,29	1482,54	49,7609	0,03356	3,36
FU 1 - 10	positiv	1029,99	1074,01	1022,14	1180,87	1295,88	1120,58	104,337	0,09311	9,31
FU 1 - 11	positiv	1349,22	1318,86	1480,92	1079,47	1137,47	1273,19	146,264	0,11488	11,49
									Variationskoeffizient:	6,56

Die Ergebnisse innerhalb der 5-fachen Ansätze variierten größtenteils nur sehr wenig, z.B. wies die Serumprobe FU 1-1 Werte von 1012 bis 1081 EU/ml auf, welche bei einem Mittelwert von 1053 EU/ml einem Variationskoeffizienten von ca. 3 % entsprach.

Ergebnisse

Im Vergleich dazu waren die stärksten Schwankungen innerhalb der Antikörperaktivitäten von Serumprobe FU 1-11 zu verzeichnen. Hier lagen die EU/ml zwischen 1079 und 1481, so dass der Mittelwert mit 1273 EU/ml einen höheren Variationskoeffizienten von ca. 11 % ergab. Somit wies der ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG der positiven Seren mit 6,56 % eine sehr niedrige Inter-Assay-Variation auf, so dass reproduzierbare Werte sicher zu erwarten sind.

Tabelle 10: Ergebnisse der Inter-Assay-Variation für die negativen Blutseren ausgewählter Tiere

Tier-Nr.	Kulturbefund	Antikörperaktivität (EU/ml)					MW	STAW	v	v (%)
		1.	2.	3.	4.	5.				
oB 28	negativ	17,79	22,03	11,91	12,08	17,98	16,358	3,87141	0,23667	23,67
oB 45	negativ	20,73	24,42	15,38	17,23	24,04	20,36	3,59889	0,17676	17,67
oB 84	negativ	13,14	19,77	10,27	9,91	19,62	14,542	4,35406	0,29941	29,94
oB 116	negativ	12,25	17,95	12,94	12,82	18,96	14,984	2,86151	0,19097	19,1
oB 125	negativ	16,53	19,84	19,28	17,15	20,22	18,604	1,48403	0,07977	7,98
oB 153	negativ	18,32	20,99	21,08	17,06	25,1	20,51	2,76847	0,13498	13,5
oB 161	negativ	13,7	17,9	13,27	16	17,02	15,578	1,81675	0,11662	11,66
oB 182	negativ	57,95	49,37	47,91	45,82	48,53	49,916	4,18487	0,08384	8,38
oB 207	negativ	32,75	38,56	34,02	34,72	34,69	34,948	1,94203	0,05557	5,56
oB 226	negativ	25,11	26,42	23,36	20,49	28,14	24,704	2,62601	0,1063	10,63
								Variationskoeffizient:	14,81	

Tabelle 10 veranschaulicht die Untersuchung von willkürlich ausgewählten negativen Hundeseren (oB 1, oB 28, oB 45, oB 84, oB 116, oB 125, oB 153, oB 161, oB 182, oB 207 und oB 226), welche ebenfalls in 5 verschiedenen Ansätzen pipettiert und individuell miteinander verglichen wurden.

Innerhalb der 5-fachen Ansätze offenbarten sich unterschiedliche Schwankungen. So bewegten sich z.B. die Werte der Antikörperaktivität von der Serumprobe oB 207 zwischen 32,75 EU/ml und 38,56 EU/ml. Hieraus ließ sich bei einer Standardabweichung von ca. 1,94 ein Variationskoeffizient von ca. 5 % errechnen. Im Vergleich dazu zeigte die Untersuchung von der Serumprobe oB 84 deutlich höhere Schwankungen innerhalb des 5-fachen Ansatzes. Bei Antikörperaktivitäten zwischen 9,91 EU/ml und 19,77 EU/ml ergab sich bei einem Mittelwert von ca. 14 EU/ml und einer Standardabweichung von ca. 4,35 ein höherer Variationskoeffizient von ca. 29 %. Insgesamt bewegten sich die Mittelwerte der Antikörperaktivitäten zwischen 13 EU/ml (oB 19) und max. 49,9 EU/ml (oB 182). Der ELISA zum Nachweis von spezifischem IgG der negativen Seren wies mit 15,5 % eine etwas höhere Inter-Assay-Variation auf. Da negative Variationskoeffizienten naturgemäß etwas stärker schwanken sind reproduzierbare Werte auch mit diesem Variationskoeffizienten sichergestellt.

Aus den positiven und negativen Variationskoeffizienten ergab sich ein mittlerer Variationskoeffizient von 11,03 % und der entwickelte Protototheken-ELISA wies somit insgesamt eine sehr gute Reproduzierbarkeit auf.

4.5 Auswertung der ELISA's

Um die Aussagekraft des entwickelten ELISA-Testsystems für die Routinediagnostik der caninen Protothekose bewerten zu können, wurde mittels der in Tabelle 14 aufgelisteten kulturellen Befunde und der ermittelten spezifischen Antikörperaktivitäten die Sensitivität und Spezifität des entwickelten Prototheken-ELISA ermittelt. Hierfür erfolgte zuerst die Berechnung des positiven Cut-off Wertes (Schwellenwert), ab dem ein Tier mit dem Test als „seropositiv“ gilt. Wie bereits unter 3.3.5.3 dargestellt, wurde zur Bestimmung des Cut-off Wertes das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der ELISA-Aktivitäten jedes 6. Tieres der 1. Gruppe (kulturell negative Tiere) ermittelt. Für ein positives Testergebnis wurde der positive Cut-off Wert aus dem arithmetischen Mittel plus der dreifachen Standardabweichung dieser Tiere errechnet (vgl. Tab. 11).

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, wurde für die Berechnung des positiven Cut-off Wertes die ELISA-Aktivität jedes 6. Hundes aus Gruppe 1 (n=236) gesunde/ akut erkrankte/ orthopädisch erkrankte Patienten und Hunde mit benignen Neoplasien, welche sowohl kulturell als auch serologisch negativ getestet wurden und eine Population von 236 Hunden beinhaltet, mit einbezogen. Hieraus ergab sich bei einem Mittelwert von 33,93 EU/ml und einer Standardabweichung von 34,55 EU/ml ein positiver Cut-off Wert von 137,58 EU/ml. Für die serologische Untersuchung galten Hunde mit ELISA-Aktivitäten über 137 EU/ml von IgG im Blutserum als positiv.

Tabelle 11: Mittelwert und Standardabweichung der Antikörperaktivitäten der kulturell negativen Hunde (Gr.1, n=236) und der hieraus errechnete Cut-off Wert zur Diagnostik der caninen Protothekose

	Blutserum IgG (EU/ml)
Mittelwert der ELISA-Aktivitäten kulturell negativer Tiere	33,929
Standardabweichng	34,549
3-facher Wert der Standardabweichung	103,647
Cut-off Wert	138

Anhand dieses Cut-off Wertes erfolgte nun die Bewertung der einzelnen ELISA's. Dazu wurden mithilfe der Vierfeldertafel (Tabelle 12) die Ergebnisse der kulturellen Untersuchung mit denen der serologischen Untersuchung verglichen.

Ergebnisse

Tabelle 12: Vierfeldertafel zur Darstellung der Untersuchungsergebnisse der Gesamtpopulation (n=364) der kulturellen Befunde im Vergleich zur serologischen Untersuchung

		<u>Kultureller Befund</u>		Summe
		Positiv	Negativ	
<u>Testergebnis des ELISA</u>	Positiv	3	0	3
	Negativ	0	361	361
	Summe	3	361	364

Aus der Vierfeldertafel ließ sich ableiten, dass innerhalb der untersuchten Gesamtpopulation von 364 Hunden drei Tiere sowohl einen positiven kulturellen Befund als auch übereinstimmend ein positives Ergebnis im ELISA-Testsystem zeigten. Die übrigen 361 Hunde hatten einen kulturell negativen Befund und auch in der serologischen Untersuchung ein negatives Testergebnis. Folglich waren die Ergebnisse vom ELISA und der kulturellen Untersuchung einheitlich, es wurden keine falsch positiven oder falsch negativen Untersuchungsergebnisse erzielt.

Mit Hilfe dieser Daten ließen sich die entscheidenden Parameter berechnen, welche eine Einschätzung der diagnostischen Eignung dieses Testsystems zulässt.

Wie im Teil Material & Methoden (3.3.5.3) beschrieben sind dies: Sensitivität und Spezifität, der positive wie auch der negative prädiktive Wert, die Prävalenz, die scheinbare Prävalenz und die Inzidenz.

Da in der vorliegenden Untersuchung die Tiere nach ihrem Infektionsstatus ausgewählt wurden, konnte auf die Berechnung eines positiven und eines negativen prädiktiven Wertes (d.h. eines Vorhersagewertes für ein positives und negatives Testergebnis in einem speziellen Test) verzichtet werden. Die für die Bewertung von Testsystemen maßgeblichen Parameter, die Sensitivität und Spezifität, sind mit in Tabelle 13 dargestellt:

Tabelle 13: Statistische Parameter der durchgeführten ELISA's zum Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *P. zopfii* Genotyp 2 der untersuchten Versuchsgruppen

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Insgesamt
Positive Identifikation	0	3	0	3
Falsch-positive Identifikation	0	0	0	0
Negative Identifikation	236	63	62	361
Falsch-negative Identifikation	0	0	0	0
Sensitivität [in %]	„-“ ¹	100	„-“	100
Spezifität [in %]	100	„-“	100	100

Wie eingangs erwähnt, wurden die für diese Untersuchung herangezogenen Tiere anhand ihres Infektionsstatus ausgewählt und in drei Gruppen eingeteilt. Die Gruppe 1 entsprach dabei gesunden, akut erkrankten oder orthopädisch erkrankten Patienten und Hunden mit nachgewiesenen benignen Neoplasien und somit der negativen bzw. unverdächtigen Kontrollgruppe. Wie aus Tabelle 12 hervorgeht, konnten in dieser Gruppe weder in der kulturellen Analytik Prototheken isoliert werden, noch wiesen diese 236 Hunde spezifische Antikörper gegen Prototheken auf. Das bedeutete, dass alle 236 Proben als negativ einzustufen sind. Für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität ergaben sich daher Zahlen von 100%.

In der Gruppe der Hunde mit gastrointestinaler Symptomatik (Gruppe 2) konnten drei sowohl im kulturellen Nachweis als auch im ELISA eindeutig als *Prototheca* infizierte Reagenten identifiziert werden. Die verbleibenden 63 Proben waren negativ. Falsch negative Reagenten wurden nicht identifiziert. Infolgedessen ergab sich auch in diesem Fall sowohl eine Sensitivität als auch eine Spezifität von 100 %.

Für die Gruppe 3, Patienten mit chronischen, immunbedingten oder malignen Erkrankungen ohne primäre gastrointestinale Beteiligung, konnten weder kulturell noch serologisch positive Testergebnisse erzielt werden. Somit ergaben sich für die 62 untersuchten Serumproben dieser Tiergruppe ebenfalls eine Sensitivität und Spezifität von 100 %.

Aus diesen Berechnungen ging hervor, dass sowohl die kulturell positiven Hunde als auch die kulturell negativen Hunde zu 100 % korrekt identifiziert wurden.

¹ „-“: es wurden keine falsch positiven oder falsch negativen Tiere identifiziert

Die Sensitivität und die Spezifität lag bei einem Maximalwert von 100 % für den Nachweis von *P. zopfii* Gentoyp 2 spezifischem IgG.

4.6 Prävalenz der caninen Protothekose

Anhand der berechneten Werte ist die diagnostische Eignung dieses entwickelten ELISA Testsystems als sehr gut zu bewerten. Alle an Protothekose erkrankten Hunde wurden korrekt identifiziert, es gab keine falsch positiven oder falsch negativen Befunde.

Die Prävalenz berechnet für das untersuchte Patientengut der Kleintierklinik der FU Berlin lag bei 0,6 %, d.h. zwei von insgesamt 363 Hunden wurden kulturell und serologisch positiv identifiziert. In der Gruppe der enteritisch erkrankten Hunde (Gruppe 2) betrug die Prävalenz 3,1 %, d.h. von 65 enteritisch erkrankten Tieren wurde bei zwei Tieren eine canine Protothekose nachgewiesen. Gleiche Werte galten für die scheinbare Prävalenz und Inzidenz in dem Untersuchungszeitraum, sie lag ebenfalls bei 0,6%.

4.7 Serokonversion im Verlauf einer caninen Protothekose

Eine ansteigende Antikörperaktivität im Verlauf der Protothekenerkrankung im Fall FU 1 konnte innerhalb der verschiedenen Probeentnahmezeitpunkte mit einem Mittelwert von FU1-1 mit 1052 EU/ml und einem Mittelwert von FU1-9 mit max. 1482 EU/ml gezeigt werden. Die beiden später entnommenen Serumproben FU 1-10 und FU1-11 zeigten wieder abfallende Mittelwerte von ca. 1120 EU/ml und 1273 EU/ml. Im Fall FU 2 und S konnte das Serum leider nur einmalig abgenommen werden und somit kann keine Aussage über den Verlauf der jeweiligen Antikörperantwort getroffen werden.

Wie in Abbildung 5 dargestellt, wurden über einen Zeitraum von 5 Monaten zu verschiedenen Zeitpunkten Serumproben des erkrankten Hundes (Fall FU 1) entnommen und im entwickelten indirekten ELISA auf Antikörper getestet. Die 1. Probenentnahme erfolgte am 25.03.2010 bei Erstvorstellung in der Kleintierklinik der FU Berlin. Die initiale Antikörperantwort lag bei 1053 EU/ml. Über 3 Monate hinweg war die Antikörperantwort als Plateau dargestellt, die Werte stagnierten zwischen 1053 EU /ml und 1190 EU/ml. Ende Juni 2010 war ein deutlicher Anstieg auffällig, die Antikörperantwort stieg am 25.06.2010 von 1143 EU/ml auf 1483 EU/ml. Gefolgt von einem Abfall auf 1120 EU/ml einen Monat später lag die Antikörperantwort am 18.08.2010 bei 1273 EU/ml.

Die hier dargestellte Antikörperantwort im Verlauf der Protothekeninfektion lässt für den Fall FU 1 den Schluss zu, dass bereits zu Beginn der Untersuchung im März 2010 das

Immunsystem des Tieres auf die Protothekeninfektion mit vermehrter Bildung von Immunglobulinen der Klasse G reagiert hatte. Daher ist eine von Anfang an hohe Antikörperantwort dieses Immunglobulin-Isotyps zu verzeichnen.

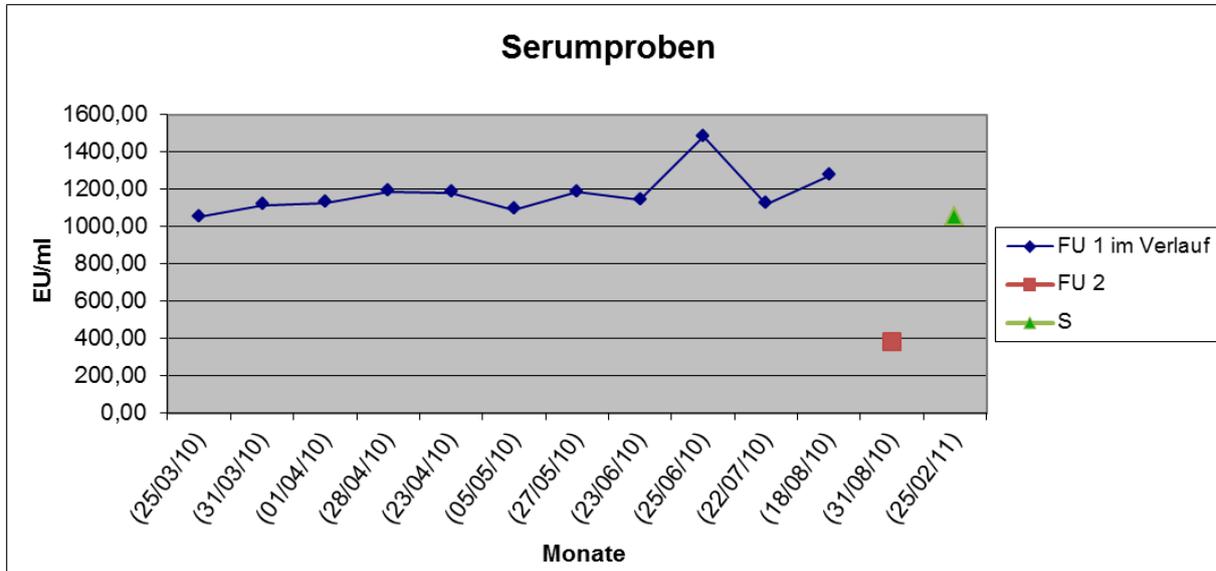


Abbildung 5: Antikörperantwort im Verlauf der caninen Protothekose (Fall FU 1)

5. Diskussion

5.1 Bisherige Diagnostik und Therapiemaßnahmen der caninen Protothekose

Die Schwierigkeit in der Diagnostik der caninen Protothekose liegt in der oftmals unspezifischen Symptomatik der Krankheit wie z.B. chronischer, hämorrhagischer Diarrhoe und Gewichtsverlust (Hollingsworth 2000). Durchgeführte bakteriologische und parasitologische Kotuntersuchungen sind zumeist negativ und vorhandene Prototheken bleiben oftmals unentdeckt (Rizzi et al. 2006; Gorissen 2011) oder werden durch Begleitkeime im kulturellen Ansatz überwuchert (Ribeiro et al. 2009). Auch kann eine geringe Anzahl von aus der Umwelt aufgenommenen Prototheken im Gastrointestinaltrakt von gesunden Hunden vorkommen und so möglicherweise eine exakte Diagnose erschweren (Greene 2011). Hilfreicher sind Rektalabstriche mit einer Abstrichbürste (Thomas und Preston 1990; Rallis et al. 2002; Stenner et al. 2007; Ribeiro et al. 2009), wobei auch hier nicht immer Prototheken nachzuweisen sind (Stenner et al. 2007). Biopsieentnahmen aus der Darmschleimhaut, insbesondere aus der Kolonregion, eignen sich hingegen hervorragend zum pathohistologischen Protothekennachweis, da die Organismen im Verlauf der Infektion von der Schleimhaut in tiefere Darmwandschichten wie z.B. in die Muskelschicht und/oder in die Serosa vordringen und sich sehr gut mit PAS-Reaktion oder Gomori-Färbung darstellen lassen (Stenner et al. 2007). Nachteilig bei dieser Methodik ist die Notwendigkeit einer Narkose, welche nur bei einem sedationsfähigen Hund durchführbar ist. Auch kann anhand der morphologischen Darstellung der Protothekenzellen keine Erregerdifferenzierung erfolgen. Nichtinvasive Maßnahmen wie beispielsweise eine abdominale Röntgenkontrastmittelpassage können zur Erkennung verdickter Darmwände und einer verringerten Darmlumengröße herangezogen werden, welche infolge sich stark vermehrender Prototheken innerhalb der einzelnen Darmsegmente auftreten können (Van Kruiningen 1970; Holscher et al. 1976). Derartige röntgenologische Veränderungen sind jedoch unspezifisch und können auch bei Kolitiden anderer Ursache vorkommen.

Die Diagnostik wird darüber hinaus auch durch die intermittierende Erregerausscheidung erschwert oder vorhandene Prototheken werden missinterpretiert (Pressler et al. 2005). Ist der Gastrointestinaltrakt betroffen, ist die Protothekeninfektion meist bereits disseminiert und die Prognose für den betroffenen Hund infaust (Hollingsworth 2000). Die größte Chance einer Heilung besteht in der Früherkennung der Erkrankung, da eine algenbedingte Kolitis prinzipiell leichter zu behandeln ist als eine disseminierte Protothekose, welche für

antimikrobielle Substanzen schwer zugängliche Organe wie z.B. Auge oder Gehirn beinhaltet (Stenner et al. 2007). Bisher liegen jedoch keine Berichte über eine nachhaltige erfolgreiche Therapie einer Prototheken-Kolitis vor.

Bei okularer Beteiligung können Prototheken sehr gut in retinalen Aspiraten des Auges nachgewiesen werden (Buyukmihci et al. 1975; Schultze et al. 1998; Pressler et al. 2005). Sind zentralnervöse Symptome auffällig, kann zudem eine Liquorpunktion hilfreich sein, um Protothekenzellen im Liquor cerebrospinalis darzustellen (Gupta et al. 2011; Lane et al. 2012; Young et al. 2012). Doch auch in der Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit gelingt der Nachweis von Protothekenzellen nicht immer (Rizzi et al. 2006). Bei beiden Diagnoseverfahren ist allerdings ebenfalls eine Vollnarkose notwendig, die oft erhöhte Narkoserisiken wie z.B. Herzkreislaufversagen mit sich bringt, da die betroffenen Hunde ohnehin oftmals ein gestörtes Allgemeinbefinden aufweisen.

Standardisierte Therapierichtlinien der caninen Protothekose sind aufgrund der Seltenheit der Erkrankung nicht existent. Viele unterschiedliche Therapieansätze wurden jedoch getestet. In der Mehrzahl der Fallberichte wurden verschiedene Antimykotika oral verabreicht (Stenner et al. 2007; Ribeiro et al. 2009), wobei Amphotericin B in Kombination mit oral verabreichten Azolen die beste Option für eine längerfristige Therapie darstellt (Strunck et al. 2004). Generell sind Antimykotika aufgrund ihrer hohen Nierentoxizität nur begrenzt einsetzbar. Diese unerwünschte Nebenwirkung erschwert die Therapie zusätzlich.

Die bisher durchgeführten Therapiemaßnahmen blieben jedoch bis auf kurzweilige Verbesserungen der klinischen Symptomatik (Moore et al. 1985; Schultze et al. 1998; Ribeiro et al. 2009) alle erfolglos. Die meisten Hunde verstarben innerhalb weniger Tage oder wurden aufgrund einer rapiden Verschlechterung des Allgemeinbefindens euthanasiert (Stenner et al. 2007).

Da bisher alle Therapiemaßnahmen im Spätstadium der Erkrankung gescheitert sind, ist eine Früherkennung der caninen Protothekose mit einer nicht invasiven Methodik bedeutend, auch um herauszufinden, ob eine Therapie im Frühstadium gegebenenfalls kurativ sein kann. Ein schnelles, einfach durchzuführendes und sicheres Testsystem wie der in dieser Studie entwickelte ELISA ist wichtig, um etwaige Therapieversuche schnell einleiten zu können oder gegebenenfalls bei gesicherter Diagnose das Tier von weiteren Leiden erlösen zu können.

5.2 Etablierung eines ELISA-Testverfahrens zur Detektion der caninen Protothekose

Bisher existieren in der Diagnostik der caninen Protothekose keine serologischen Nachweismethoden. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, basierend auf dem von Roesler et al. (2001) entwickelten indirekten ELISA zur Diagnostik der Protothekenmastitis des Rindes, einen ELISA zur Diagnostik der caninen Protothekeninfektion zu entwickeln. Roesler et al. (2001) gelang die Entwicklung und Etablierung dreier verschiedener ELISA-Systeme, welche sowohl Immunglobuline der Klasse IgG im Blutserum als auch der Klasse IgA und IgG₁ im Milchserum erfolgreich nachweisen konnten. Hierzu wurde ein modifizierter indirekter ELISA entwickelt. Als positives Referenzserum diente ein Serum-Pool von 15 Kühen mit chronischer Protothekenmastitis, bestätigt durch kulturellen Erregernachweis. Als Negativkontrolle diente ein Serum-Pool aus nachweislich klinisch und kulturell negativ getesteten Tieren. Die ELISA Durchführung erfolgte entsprechend der Positiv-Referenz-Standardmethode nach BUTLER et al (1978). Um die lokale und systemische Antikörperantwort bei der bovinen Protothekenmastitis in Abhängigkeit der jeweiligen Infektionsstadien zu charakterisieren, wurden Blut- und Milchproben von Kühen, eingeteilt anhand ihrer Klinik, aus verschiedenen Beständen kulturell und serologisch untersucht.

Mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % liefert der hier entwickelte ELISA reproduzierbare, verlässliche Ergebnisse und stellt eine schnelle, nicht-invasive diagnostische Methode dar. Auf eine invasive Probenentnahme wie z.B. eine Augenaspiratpunktion, Liquorpunktion oder Biopsieentnahme in Narkose kann verzichtet werden. Die gute Reproduzierbarkeit dieses Testsystems konnte durch die Ermittlung der Intra-Assay und der Inter-Assay-Variationen belegt werden.

Im Vergleich zu dem von Roesler et al. (2001) entwickelten Assay konnte auch für den IgG-Nachweis im Blutserum von Hunden eine Spezifität von 100 % erreicht werden. Das bedeutet, dass auch in dem vorliegenden Testsystem zum Nachweis der bovinen Protothekenmastitis mittels IgG bei laktierenden Milchkühen im Blutserum der ELISA zum Nachweis von IgG im Blutserum von Hunden mit einer Spezifität von 100 % ebenfalls keine falsch-positiven Ergebnisse aufweist. Mit einer Sensitivität von 81,5 % für den Nachweis in Blutserum für das Milchrind wurde im entwickelten Testsystem ein kleiner Teil der infizierten Tiere nicht identifiziert. Im Gegensatz dazu konnte mit dem hier entwickelten ELISA zum Nachweis der caninen Protothekose alle zuvor kulturell positiv getesteten Tiere mit einer Sensitivität von 100 % bestätigt werden. Ein Grund hierfür könnte die sehr unterschiedliche Natur der Protothekeninfektion von Rind und Hund sein. Während es sich beim Rind um eine lokale Infektion der Milchdrüse handelt (Sensitivität in Milchserumproben liegt bei 98%), liegt

beim Hund ein meist disseminiertes Geschehen vor, so dass von einer stärkeren systemischen Antikörperantwort auszugehen ist. Insgesamt weist der in dieser Studie entwickelte ELISA somit für Praxiszwecke eine sehr gute Spezifität und Sensitivität auf.

Seither wurde die Erregerspezifizierung fraglicher Protothekeninfektionen, zusätzlich zur mikroskopischen Untersuchung, mit den handelsüblichen auxanographischen Nachweismethoden (z.B. API 20C[®] oder Vitec[®]) durchgeführt. Das bislang angewendete Testkit API 20C[®] kann zwar den allgemeinen Protothekennachweis leisten, allerdings ist es für eine weitere Speziesdifferenzierung der Prototheken nicht geeignet, da es zwar *P. wickerhamii* enthält, aber *P. zopfii* in seiner Datenbank nicht berücksichtigt. Die bisherigen Protothekosediagnosen sollten hinsichtlich einer Infektion mit *P. wickerhamii* kritisch hinterfragt werden, denn die neu dokumentierten Krankheitsfälle weisen als auslösendes Agens alle ausnahmslos *P. zopfii* Gentotyp 2 auf (Ribeiro et al. 2009; Gorissen 2011; Lane et al. 2012; Young et al. 2012).

Eine weitere mögliche Schwachstelle der kommerziell erhältlichen Identifikationssysteme ist die Notwendigkeit der Verwendung von Reinkulturen. Auch die teilweise variable Assimilation der Prototheken von z.B. Zitrat oder Galaktose kann die auxanographische Analyse verzerren (Marques 2010).

Da die kulturelle Protothekendiagnostik üblicherweise mehrere Tage beansprucht, bietet der entwickelte ELISA zudem eine erhebliche Zeitersparnis. Hunde können innerhalb von 2 Stunden serologisch auf das Vorliegen einer Infektion mit Prototheken untersucht werden. Auf jegliche Schritte einer Vordiagnostik, wie sie im Rahmen dieser Studie durchgeführt wurde, könnte zukünftig in der Routinediagnostik verzichtet werden.

Das entwickelte ELISA-Testsystem ist, wie alle serologischen Nachweismethoden, anfällig für systematische Fehler wie z.B. fehlerhaftes Plattencoating oder individuelle Fehler wie z.B. Pipettierfehler, so dass diese Untersuchungsmethodik eine gewisse Arbeitsroutine voraussetzt.

Warum die Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von IgA in Hundeseren erfolglos war, ist zu diskutieren. Es konnte in der Schachbrett-Titration kein Unterschied beim linearen Abfall zwischen positiven und negativen Serumproben erzielt werden, was eine Voraussetzung für die Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von IgA im Hundeserum gewesen wäre. Möglicherweise liegt die Begründung hierfür in der Antikörperantwort an sich. Immunglobuline vom Isotyp G werden als Teil der humoralen Abwehr nach Kontakt mit

einem Antigen gebildet. Sie sind die dominierende Immunglobulinklasse im Blut und werden im Verlauf der Serokonversion im Anschluss an IgM, welche eine akute Infektion anzeigen, produziert. Immunglobuline vom Isotyp A sind hauptsächlich in externen Körperflüssigkeiten nachzuweisen, sie werden nach Schleimhautkontakt mit Antigenen gebildet und bilden eine bedeutende lokale Abwehrbarriere gegen Krankheitserreger. Zu einem wesentlich kleineren Anteil sind sie auch im Blutserum nachzuweisen und eventuell ist dieser Anteil an Prototheken-spezifischem IgA im Serum nicht ausreichend, um einen ELISA entwickeln zu können. Auch ist nicht geklärt wie intensiv und lange der Antigenkontakt von Prototheken-Antigenen in der Darmschleimhaut infizierter Hunde erfolgt. Ein solcher intensiver, langanhaltender Antigenkontakt in der Darmschleimhaut ist allerdings Voraussetzung für eine zuverlässige Protothekendiagnostik auf der Basis von Prototheken-spezifischem-IgA im Serum.

Weiterhin ist zu beachten, in welchem diagnostischen Zeitfenster eine Protothekeninfektion serologisch in unserem entwickelten ELISA-Testsystem feststellbar ist. Die drei positiv detektierten Hunde (Fall FU 1, FU 2 und S) waren alle bereits generalisiert infiziert und wiesen zusätzlich zu der enteritischen Erregerbeteiligung auch okulare und teilweise neurologische Krankheitsbefunde auf, so dass von einer Erregerdissemination ausgegangen werden kann. Weiterführende pathologische Untersuchungen zur Verifizierung einer disseminierten Protothekose wurden leider nicht durchgeführt. Es bleibt abzuklären, ob auch bereits eine lokal begrenzte Infektion im ELISA zu detektieren ist. Dies müsste in weiterführenden Untersuchungen ermittelt werden. Für die Zukunft würde dies bedeuten, dass auf die zeitaufwendige kulturelle Identifikation von *P. zopfii* verzichtet werden könnte und dadurch Therapiemaßnahmen und Prognosen für den Krankheitsverlauf besser evaluiert werden könnten.

5.3 Ätiologie der caninen Protothekose

Bisher ist über die Ätiologie, warum die ubiquitär vorkommenden Prototheken nur sporadisch zu einer Erkrankung führen und unter welchen genauen Umständen sie eine Infektion auslösen, nur wenig bekannt. Analog der humanen Protothekose wird auch beim Hund eine prädisponierende Immunsuppression diskutiert, da Infektionen beim Menschen mit einer geschwächten Immunabwehr deutlich häufiger vorkommen und schwerwiegender verlaufen. Es wird beim Menschen vermutet, dass sowohl angeborene als auch erworbene oder iatrogene Defizite in der zellulären Immunität mitverantwortlich für die Entstehung einer Protothekeninfektion sind (Lass-Floerl und Mayr 2007). In der zellulären Abwehr ist dabei die

Funktion der neutrophilen Granulozyten entscheidend. Diese polymorphnukleären Leukozyten sind neben Makrophagen hauptverantwortlich für die Phagozytose von Erregern. Ultrastrukturelle Studien zeigten auf, dass eine optimale Eliminierung von Prototheken nur in Anwesenheit von spezifischen Immunglobulinen des Isotyps G und hitzebeständigen Serum-Opsininen stattfindet (Phair et al. 1981). Personen mit defizitären neutrophilen Granulozyten und somit einer Unfähigkeit, Erreger wie z.B. *P. wickerhamii* zu eliminieren, erkrankten an Protothekose (Carey et al. 1997).

In 63 Fällen von humaner Protothekose traten eine Bursitis der Bursa olecrani oder eine lokal begrenzte kutane Protothekose eher bei immunkompetenten Patienten auf, während disseminierte kutane Protothekosen und viszerale Formen überwiegend immundefiziente Patienten betrafen (Wirth et al. 1999). Jedoch konnte die disseminierte Form der Protothekose auch bei immunkompetenten Patienten nachgewiesen werden, wobei allerdings bei immunsupprimierten Personen die Erkrankung florider war (Leimann et al. 2004). In 2 humanen Fällen einer viszeralen Protothekose, ausgelöst durch *P.wickerhamii*, war eine Erhöhung von IgG auffällig. Bei einem dieser Patienten war der IgG-Anstieg mit einer Suppression der zellvermittelten Immunität assoziiert (Cox et al. 1974; Chan et al. 1990).

Die Vermutung, dass Hunde mit einer gestörten Abwehr bzw. mit einer vorliegenden chronischen Erkrankung eher oder nur unterschwellig mit Prototheken infiziert sein könnten, konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Keiner der aus Gruppe 3 (Hunde mit chronischen, malignen bzw. immun-medierten Erkrankungen ohne gastrointestinale Symptome) untersuchten Hunde wurde kulturell oder serologisch positiv auf Protothekose getestet.

Beim Hund konnte in Einzelfällen analog zur humanen Protothekeninfektion ebenfalls Defizite in der zellulären Abwehr als prädisponierende Faktoren für eine Protothekose dargestellt werden. Eine generalisierte Suppression der T-Lymphozyten und eine herabgesetzte Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten waren bei einem Collie mit disseminierter Protothekose auffällig. Ob diese Immunsuppression die Protothekose ausgelöst hat oder ursächlich hierfür war konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden (Rakich und Latimer 1984). In den meisten Fällen konnte keine zugrundeliegende Immunsuppression als Ursache der caninen Protothekose ermittelt werden (Blogg und Sykes 1995; Rallis et al. 2002; Hosaka und Hosaka 2004), wobei einschränkend festzustellen ist, dass eine Überprüfung des Immunstatus nur bei wenigen Hunden erfolgte (Hollingsworth 2000).

Hinweise für eine vorherige Immunsuppression lagen im Fall FU 1 nicht vor, orale Immunsuppressiva wie z.B. Prednisolon wurden nicht gegeben. Demgegenüber war im Fall FU 2 und im Fall S eine durchgeführte Glukokortikoidgabe bekannt. Analog der humanen Protothekose ist auch beim Hund durchaus zu diskutieren, ob die Gabe von Glukokortikoiden in immunsupprimierender Wirkung das Immunsystem dahingehend beeinflusst, dass eine Besiedelung des Darms mit Prototheken begünstigt wird. Inwieweit mit Immunsuppressiva vortherapierte Hunde ein höheres Risiko einer Protothekeninfektion tragen, müsste in weiterführenden Studien untersucht werden.

Im Fall FU1 könnte die Protothekeninvasion durch die anamnestisch beschriebene, vorangegangene, rezidivierende Giardiose und mehrere durchgeführte Antibiosen begünstigt worden sein. Möglicherweise wurde die Vermehrung und Ausbreitung der Prototheken durch eine veränderte Darmflora infolge der Antibiosen gefördert. Eine potentielle Infektionsquelle könnten externe Wasserquellen wie anamnestisch beschrieben eine Gießkanne im Garten gewesen sein. Im Fall S berichteten die Besitzer, dass der Hund gerne aus dem Teich trank. In einigen Fallberichten aus den USA wurde spekuliert, ob Hunde, welche überwiegend draußen leben, Prototheken möglicherweise aus stehenden Gewässern oral aufnehmen (Stenner et al. 2007). Über eine mögliche Infektionsquelle war im Fall FU 2 nichts bekannt. Die Erhebung epidemiologischer Daten z.B. bezüglich der Haltung der Hunde könnte in Folgestudien weitere Aufschlüsse über die Risikofaktoren einer Protothekeninfektion geben.

Weiterhin wurde aufgrund einer Überproportionalität an Boxern eine genetische Rasseprädisposition im Hinblick eines Immundefekts diskutiert (Stenner et al. 2007). Diese Vermutung traf in den Fällen FU 1, FU 2 und S nicht zu, da die erkrankten Hunde anderen Rassen angehörten.

Ein weiteres Merkmal der Protothekeninfektionen ist die überaus milde Entzündungsantwort am Ort des Infektionsgeschehens (Rakich und Latimer 1984; Greene 2011). Leukozytenfunktionstests können dahingehend nicht angewendet werden, um zu unterscheiden, ob die Aktivität der neutrophilen Granulozyten durch die Protothekeninfektion selbst oder durch ein herabgesetztes Immunsystem an sich supprimiert ist (Strunck et al. 2004).

In den 3 Krankheitsfällen wurde leider keine weiterführende pathologische Sektion durchgeführt, so dass über die Erregerdissemination und eine mögliche weitere Organbeteiligung wie z.B. die Nieren oder das ZNS keine weitere Aussage getroffen werden kann.

5.4 Detektierte canine Protothekosefälle in dieser Studie

Die drei an Protothekose erkrankten Hunde (Fall FU 1, Fall FU 2 und Fall S) wiesen eine hämorrhagische Diarrhoe auf und wurden in Gruppe 2 (Hunde mit gastrointestinaler Symptomatik) detektiert.

Im Fall FU 1 wurde die Diagnose mittels rektaler Abstriche in der zytologischen Untersuchung gestellt und Protothekenzellen konnten nach Anfärbung mit Lactophenol-Baumwollblau-Färbung identifiziert werden. Kulturell wurden die Prototheken aus Kot- und Harnproben auf PIM-Agar erfolgreich kultiviert und mittels PCR, Western Blot und dem entwickelten ELISA-Testsystem als *P. zopfii* Genotyp 2 identifiziert.

Im Fall FU 2 konnten ebenfalls Prototheken im Rektalabstrich identifiziert werden. Die kulturelle Anzucht von Prototheken gelang auf PIM-Agar, zusätzlich ergaben die PCR-, Western Blot- und ELISA-Analysen die definitive Diagnose canine Protothekose, ausgelöst durch *P. zopfii* Genotyp 2.

Im Fall S konnte die Verdachtsdiagnose canine Protothekose in unserem entwickelten ELISA-Testsystem als Infektion mit *P. zopfii* Genotyp 2 bestätigt werden. Auch kulturell ließen sich aus der eingesandten Kotprobe Prototheken auf PIM-Agar kultivieren.

Damit konnte gezeigt werden, dass sich bei Hunden mit einer hämorrhagischen Diarrhoe und gleichzeitig vorliegenden okularen Affekten die spezifische kulturelle Untersuchung von Kot- und Harnproben sowie die serologische Untersuchung mittels des entwickelten ELISA sehr gut zur Diagnostik einer manifesten caninen Protothekose im Endstadium eignen.

5.5 Prävalenz der caninen Protothekose

Die in dieser Studie nachgewiesene Prävalenz der caninen Protothekose bei enteritisch erkrankten Hunden beträgt 3,1 %. Es ist davon auszugehen, dass die canine Protothekose bei Hunden mit hämorrhagischer Diarrhoe bisher unterschätzt wurde und häufiger vorkommen kann als bisher angenommen.

Bei therapieresistenten Enteritiden sollte daher differentialdiagnostisch auch die canine Protothekose in Betracht gezogen werden, insbesondere bei vorliegender hämorrhagischer Diarrhoe und gleichzeitig vorhandener okulärer Beteiligung und/oder neurologischen

Ausfällen. Unspezifische Kot-, Blut- und Harnuntersuchungen sind hier jedoch leider nicht zielführend, sondern müssen speziell auf die Isolierung und Identifikation von Prototheken ausgerichtet sein.

5.6 Limitierung, Ausblick und Schlussfolgerung der Studie

Bei dem untersuchten Kollektiv der Kleintierklinik der FU Berlin handelt es sich ausschließlich um das Patientengut einer Universitätsklinik, welches zum größten Teil Überweisungspatienten beinhaltet, und somit als vorselektiert einzustufen ist. Die vorliegende Prävalenzstudie der caninen Protothekose ist demnach nicht uneingeschränkt repräsentativ. Weiterhin lagen zu den untersuchten Patienten zum Teil keine genauen epidemiologischen Daten vor. Klinische Aspekte sollten daher in folgenden Studien systematischer abgeklärt werden.

Um weitere, repräsentative Aussagen über die Prävalenz der caninen Protothekose und zu diesbezüglichen prädisponierenden Faktoren treffen zu können, sollten weiterführende Multicenterstudien in Kleintierpraxen und Kleintierkliniken in Deutschland bzw. Zentraleuropa durchgeführt werden.

Die Pathogenese der caninen Protothekose ist bislang weitestgehend ungeklärt. Ein oraler Infektionsweg wird aufgrund der häufigen Kolonaffektion vermutet (Stenner et al. 2007). Auch die nasale Infektionsroute ist bei intrakraniellen Läsionen in der Diskussion (Márquez et al. 2012, Font et al. 2014). Darüber hinaus wird eine traumatische Algeninokulation bei Umfangsvermehrungen der Haut angenommen (Ginel et al. 1997, Greene et al. 2006).

Um die Pathogenese von Prototheken, hier speziell von *P. zopfii* Genotyp 2, noch weiter zu erforschen, wären experimentelle Infektionsversuche hilfreich. Der Fokus sollte insbesondere auf der Krankheitsentstehung in Abhängigkeit des jeweiligen Immunstatus der Tiere und auf der Infektionsroute mit den resultierenden Organmanifestationen liegen.

Standardisierte Therapieprotokolle sind aufgrund der Seltenheit der Erkrankung nicht existent. Um eine optimale Therapie von Prototheken etablieren zu können, wären weiterführende Studien hinsichtlich der Eignung und Dosierung verschiedenster Therapiemaßnahmen (z.B. der Anwendung von Azol-Antimykotika oder Polyen-Makroliden) ein wichtiger Schritt zur Krankheitsbekämpfung.

Um therapieresistente Enteritiden ätiologisch noch zielgerichteter diagnostisch aufarbeiten zu können, wäre eine Inklusion von *P. zopfii* Genotyp 2 in sogenannten „Durchfallprofilen“,

welche von kommerziellen Untersuchungslaboren angeboten werden, sinnvoll. Diese Profile enthalten spezifische Parameter wie Viren (z.B. Coronaviren, Parvoviren, Rotaviren), Bakterien (z.B. Clostridien, Salmonellen, Yersinien) und Protozoen (z.B. Giardien, Kokzidien), sowohl zur kulturellen Diagnostik im Kot als auch zur Serodiagnostik im Blut. Dies erscheint insbesondere auch aufgrund der in dieser Studie ermittelten Testsensitivitäten und -spezifitäten möglich. Hierzu wäre allerdings eine Vereinfachung des ELISA-Systems hilfreich und anzustreben.

Der in der vorliegenden Studie etablierte ELISA basierte auf der Positiv-Referenz-Standardmethode nach Butler et al (1978), mit der bei einer unbekanntenen Kinetik und Bindungsaffinität spezifischer Antikörper verschiedener Isotypen, wie im vorliegenden Fall gegen Prototheken beim Hund, die aussagekräftigsten Ergebnisse zu erzielen sind. Diese Methode ist jedoch aufgrund des notwendigen Anlegens von Verdünnungsreihen sowohl für die Kontroll- als auch für die Testseren sehr arbeitsintensiv und damit auch vergleichsweise teuer (Faktor 3 bis 5) und setzt eine beträchtliche labortechnische Erfahrung voraus. Zur Optimierung wäre eine Implementierung der Einpunkt-Methode überlegenswert. Hier wird lediglich eine einzelne testspezifische Serumverdünnung für Kontroll- und Testseren eingesetzt. Diese wird anhand bereits vorliegender Erkenntnisse zur Kinetik, Menge und Bindungsaffinität spezifischer Antikörper gegen einen Erreger, wie z.B. in der vorliegenden Studie für die canine Protothekeninfektion, festgelegt. Wobei die dann zu erzielende Testsensitivität und -spezifität die Hauptkriterien für die Auswahl der spezifischen Serumverdünnung sind. Ein solcher auf der Einpunkt-Methode basierender ELISA wäre einfach und kostengünstig in bereits bestehende „Durchfallprofile“ zu integrieren.

Zusammenfassend ist als Ergebnis der vorliegenden Studie festzustellen, dass bei Hunden mit chronischer, therapieresistenter Diarrhoe und Netzhautablösung und/oder zentralnervösen Ausfällen eine Protothekeninfektion als eine Differentialdiagnose zu berücksichtigen ist. Der entwickelte ELISA stellt ein praktikables, einfaches und sehr aussagekräftiges Testsystem zum Nachweis einer Protothekeninfektion beim Hund dar. Der schnelle Erregernachweis bietet die Möglichkeit einer gezielteren Medikation erkrankter Tiere und kann möglicherweise bei früherem Einsatz wirksamer Medikamente nach der Diagnose den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen bzw. die Erregerdissemination einschränken. Zudem ist das entwickelte serologische Testverfahren auch prognostisch ein wichtiges Hilfsmittel.

6. Zusammenfassung

Chlorophylllose, Hefe-ähnliche Mikroalgen der Gattung *Prototheca* (*P.*) sind die einzigen bekannten Pflanzen, welche infektiös für Menschen und Tiere sein können. Bis heute sind 5 verschiedene Spezies beschrieben, wobei *Prototheca zopfii* Genotyp 2 ursächlich für die Protothekenmastitis von Milchkühen und für die sporadisch auftretende Protothekeninfektion beim Hund ist. Das klinische Erscheinungsbild betroffener Hunde ist häufig assoziiert mit einer hämorrhagischen, therapieresistenten Enterokolitis, welche später in der Generalisierung der Erreger mit okularen und zentralnervösen Störungen vergesellschaftet ist.

Da die Hundeprothekose in den meisten Fällen durch *P. zopfii* Genotyp 2 ausgelöst wird, war die Zielstellung der vorliegenden Arbeit die Entwicklung eines ELISA-Testsystems, zum Nachweis von Prototheken-spezifischen Antikörpern der Gattung *P. zopfii* Genotyp 2 in Hundeseren und darauf aufbauend anschließend die Ermittlung der Prävalenz von Protothekeninfektionen in einer größeren Hundepopulation.

Hierzu wurden 363 Hunde aus der Patientenklientel der Kleintierklinik der FU Berlin kulturell und serologisch untersucht. Eingeteilt in 3 Gruppen beinhaltete Gruppe 1 (n=236) als Kontrollgruppe gesunde Hunde, akut erkrankte und orthopädisch erkrankte Patienten sowie Hunde mit nachgewiesenen benignen Neoplasien. Gruppe 2 (n=65) umfasste Hunde mit gastrointestinaler Symptomatik und Gruppe 3 (n=62) involvierte eine Gruppe von Hunden mit chronischen, malignen bzw. immun-medierten Erkrankungen ohne gastrointestinale Symptome.

Zunächst konnte ein indirektes ELISA-Testsystem entwickelt und etabliert werden, mit dem der Nachweis von *P. zopfii* Genotyp 2-spezifischen Antikörpern bei enteritischen, an Protothekose erkrankten Hunden gelang. Dabei wies der entwickelte ELISA mit einer Spezifität und Sensitivität von jeweils 100 % eine sehr gute diagnostische Eignung auf. Im Rahmen des in dieser Studie untersuchten Patientenkollektivs konnte die canine Protothekose sowohl kulturell als auch serologisch bei zwei Hunden (Fälle FU 1 und FU 2) nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Prävalenz von 3,1 % der enteritisch erkrankten Hunde der Gruppe 2. Bei Hunden der Kontrollgruppe 1 und bei chronisch, maligne bzw. immun-mediert erkrankten Hunden (Gruppe 3) konnten keine Prototheken in den Fäzes oder Prototheken-Antikörper im Blutserum nachgewiesen werden. Infolge der in dieser

Studie nachgewiesenen Prävalenz der caninen Protothekose von 3,1 % bei enteritisch erkrankten Hunden, sollte die Protothekeninfektion beim Enteritisgeschehen des Hundes, und hier insbesondere bei therapieresistenten, chronischen, hämorrhagischen Enteritiden, differentialdiagnostisch berücksichtigt werden.

Aufgrund der intermittierenden Erregerausscheidung in den Fäzes und der damit verbundenen Gefahr möglicher falsch negativer Kulturbefunde kann der serologische Nachweis von Prototheken-spezifischen Antikörpern, verglichen mit den bisherigen diagnostischen Möglichkeiten, von großem Nutzen sein. So ermöglicht der entwickelte indirekte Prototheken-ELISA eine schnelle und sichere Identifikation von an Protothekose erkrankten Hunden.

7. Summary

The development of an indirect ELISA test system for serodiagnosis of canine *Prototheca* infection and the subsequent investigation of the prevalence of the canine protothecosis

Achlorophyllous, yeast-like microalgae of the genus *Prototheca* (*P.*) are the only known plants, able to cause infections in humans and animals. Until now five different species have been described. One of them –*Prototheca zopfii* genotype 2– was identified to be responsible for inflammation of the mammary gland in dairy cows as well as for the sporadically occurring *prototheca* infection in dogs. In the case of affected dogs the clinical signs are often associated with hemorrhagic, therapy-resistant enterocolitis, which later, in the generalized manifestation of the pathogens, occur in combination with ocular and central nervous disorders.

Due to these observations, the present study was focused on the following objectives: (1) to develop an ELISA test system in order to detect *prototheca*-specific antibodies of the genus *Prototheca zopfii* genotype 2 in dog serum and based on this (2) to investigate the prevalence of *Prototheca* infection in a large dog population. For this purpose 363 dogs, divided into three groups, were culturally and serologically tested. The first group (n=236) included healthy dogs, acutely ill and orthopedic ill patients as well as dogs with proven benign tumors. The second group (n=65) consisted of dogs with gastrointestinal symptoms and the third group (n=62) involved dogs that had chronic, malign or immune-mediated diseases without any gastrointestinal signs.

In addition an ELISA test system could be established that succeeded in demonstrating species-specific *P. zopfii* genotype 2 antibodies in enteric ill patients suffering from protothecosis. With a specificity and sensitivity of 100 % the developed ELISA test indicated a very good diagnostic suitability. Within the scope of this study, the canine protothecosis was confirmed culturally and serologically in 2 cases (case FU 1 and FU 2) of the investigated dog population. This corresponds to a prevalence of 3.1 % in the enteric dogs from group 2. In dogs from group 1 and 3 no *Prototheca* species were found in the feces or in the blood serum. The proven prevalence of 3.1 % of the canine protothecosis in enteric dogs suggests that the *Prototheca* infection should be considered as one differential diagnosis of dogs showing clinical signs of gastrointestinal disease. Due to intermittent

pathogen shedding in the feces and thereby the possible danger of false negative results, the established serological test can be very useful. Compared to previously described methods, the indirect test system, depicted in this study, enables a fast and secure identification of *Prototheca* antibodies in blood serum and therefore provides a promising tool for *Prototheca* diagnostic in the clinical practice.

8. Literaturverzeichnis

- Aalbaek, B.; Jensen, H. E.; Huda, A. (1998): Identification of *Prototheca* from bovine mastitis in Denmark. *APMIS* 106 (4): 483-488.
- Ahrholdt, J.; Roesler, U. (2011): Genotypical differentiation of *Prototheca* isolates of milk samples from mastitis affected cattle in Germany [German]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124 (3-4): 108-113.
- Allgoewer, I.; Ehrlein, J.; Goebel, T.; Hermanns, W.; Leibold, W.; Schäffer, E.; Stellmacher, H.; Taugner, F.; Brunnberg, L. (1998): Disseminierte Protothekose bei einem Riesenschnauzer. *Kleintierprax* 43: 321-410.
- Anderson, E. H. (1945a): Nature of the growth factor for the colorless alga *Prototheca zopfii*. *J Gen Physiol* 28 (4): 287-296.
- Anderson, E. H. (1945b): Studies on the metabolism of the colorless alga *Prototheca zopfii*. *J Gen Physiol* 28 (4): 297-327.
- Anderson, K. L.; Walker, R. L. (1988): Sources of *Prototheca* spp in a dairy herd environment. *J Am Vet Med Assoc* 193 (5): 553-556.
- Arnold, P.; Ahearn, D. G. (1972): The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *P. filamenta*. *Mycologia* 64: 265-275.
- Baumgärtner, B. (1997): Vorkommen und Bekämpfung der Protothekenmastitis des Rindes im Einzugsgebiet des Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Potsdam. *Prakt Tierarzt* 78 (5): 406-414.
- Beer, J. (1987): Prototheken-Infektionen. In: *Infektionskrankheiten der Haustiere*. Hrsg: W. Seffner und J. Beer, Gustav Fischer Verlag, Jena, 859-861.
- Berkhoff, H. A.; Connelly, M. R.; Lockett, L. J. (1982): Differential microbiological diagnosis of protothecosis from non-human sources. *Am J Med Technol* 48 (7): 609-612.
- Birke, L. (2002): Protothekose bei einem deutschen Schäferhund. *Prakt Tierarzt* 83 (11): 952-957.
- Blaschke-Hellmessen, R.; Schuster, H.; Bergmann, V. (1985a): Differenzierung von Varianten bei *Prototheca zopfii* Krueger 1894. *Arch Exp Veterinarmed* 39 (3): 387-397.
- Blaschke-Hellmessen, R.; Schuster, H.; Schuster, K. (1985b): Chlorophyllose Algen der Gattung *Prototheca* (Krüger) - Saprophyten und Krankheitserreger bei Mensch und Tier. *Z Gesamte Hyg* 31 (10): 561-564.
- Blogg, J. R.; Sykes, J. E. (1995): Sudden blindness associated with protothecosis in a dog. *Aust Vet J* 72 (4): 147-149.
- Butler, E. E. (1954): Radiation-Induced chlorophyll-less mutants of *Chlorella*. *Science* 120 (3111): 274-275.

- Butler, J. E.; Feldbush, T. J.; McGivern, P. L.; Stewart, N. (1978): The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a measure of antibody concentration or affinity. *Immunochemistry* 15: 131-136.
- Buyukmihci, N.; Rubin, L. F.; DePaoli, A. (1975): Protothecosis with ocular involvement in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 167 (2): 158-161.
- Buzzini, P.; Turchetti, B.; Branda, E.; Goretti, M.; Amici, M.; Lagneau, P. E.; Scaccabarozzi, L.; Bronzo, V.; Moroni, P. (2008): Large-scale screening of the in vitro susceptibility of *Prototheca zopfii* towards polyene antibiotics. *Med Mycol* 46 (5): 511-514.
- Carey, W. P.; Kaykova, Y.; Bandres, J. C.; Sidhu, G. S.; Brau, N. (1997): Cutaneous protothecosis in a patient with AIDS and a severe functional neutrophil defect: successful therapy with amphotericin B. *Clin Infect Dis* 25 (5): 1265-1266.
- Carlton, W. W.; Austin, L. (1973): Ocular protothecosis in a dog. *Vet Pathol* 10 (3): 274-280.
- Casselton, P. J. (1967): Influence of the nitrogen source on the adenine reversal of 3-amino-1,2,4-triazole inhibition of *Prototheca zopfii* growth. *Can J Microbiol* 13 (11): 1564-1566.
- Casselton, P. J.; Stacey, J. L. (1969): Observations on the nitrogen metabolism of *Prototheca* Krüger. *New Phytol* 68: 731-749.
- Chan, J. C.; Jeffers, L. J.; Gould, E. W.; Hutson, D.; Martinez, O. V.; Reddy, K. R.; Hassan, F.; Schiff, E. R. (1990): Visceral protothecosis mimicking sclerosing cholangitis in an immunocompetent host: successful antifungal therapy. *Rev Infect Dis* 12 (5): 802-807.
- Chodat, R. (1913): Monographies d'algues en culture pure. *Mat. Crypt. Suisse* 4: 234-241.
- Ciferri, O. (1956): Thiamine-deficiency of *Prototheca*, a yeast like achloric alga. *Nature* 178: 1475-1476.
- Coloe, P. J.; Allison, J. F. (1982): Protothecosis in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 180 (1): 78-79.
- Conte, M. V.; Pore, R. S. (1973): Taxonomic implications of *Prototheca* and *Chlorella* cell wall polysaccharide characterization. *Arch Mikrobiol* 92 (3): 227-233.
- Cook, J. R., Jr.; Tyler, D. E.; Coulter, D. B.; Chandler, F. W. (1984): Disseminated protothecosis causing acute blindness and deafness in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 184 (10): 1266-1272.
- Cooke, W. B. (1968): Studies in the genus *Prototheca*. II. Taxonomy. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 84: 213-216.
- Cox, G.; Wilson, J.; Brown, P. (1974): Protothecosis: a case of disseminated algal infection. *Lancet* 2 (7877): 379-382.
- Crispens, C. G. j.; Marion, K. R. (1975): Algal infection in a corn snake (*Elaphe guttata guttata*). *Lab Anim Sci* 25 (6): 788-789.
- Crowther, J. R. (2001). *The Elisa Guidebook*, 1, Humana Press, New Jersey, 436.
- Davies, R. R.; Spencer, H.; Wakelin, P. O. (1964): a case of human protothecosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 58: 448-451.

- de Camargo, Z.; Fischman, O. (1979): *Prototheca stagnora*, an encapsulated organism. *Sabouraudia* 17 (3): 197-200.
- de Camargo, Z. P.; Fischman, O.; Regis Silva, M. R. (1980): Experimental protothecosis in laboratory animals. *Sabouraudia* 18 (3): 237-240.
- de Vargas, A. C.; Lazzari, A.; Santurio, J. M.; Alves, S. H.; Ferreira, G.; Kreutz, L. C. (1998): Isolation of *Prototheca zopfii* from a case of bovine mastitis in Brazil. *Mycopathologia* 142 (3): 135-137.
- Dillberger, J. E.; Homer, B.; Daubert, D.; Altman, N. H. (1988): Protothecosis in two cats. *J Am Vet Med Assoc* 192 (11): 1557-1559.
- Dion, W. M. (1982): Bovine Mastitis due to *Prototheca zopfi* II. *Can Vet J* 23 (9): 272-275.
- Enders, F.; Weber, A. (1993a): Pilotstudie zum Vorkommen von Prototheken in Kotproben von Pferden. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 106 (8): 264-265.
- Enders, F.; Weber, A. (1993b): Untersuchungen zum Vorkommen von Prototheken in Kotproben von Rindern. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 106 (5): 165-169.
- Endo, S.; Sekiguchi, M.; Kishimoto, Y.; Kano, R.; Aoki, S.; Sichinohe, T.; Hasegawa, A. (2010): The first case of Feline *Prototheca wickerhamii* infection in Japan. *J Vet Med Sci* 72 (10): 1351-1353.
- Engvall, E.; Jonsson, K.; Perlmann, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of Protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* 251 (3): 427-434.
- Epel, B.; Krauss, R. W. (1966): The inhibitory effect of light on growth of *Prototheca zopfii* Kruger. *Biochim Biophys Acta* 120 (1): 73-83.
- Finnie, J. W.; Coloe, P. J. (1981): Cutaneous protothecosis in a cat. *Aust Vet J* 57 (6): 307-308.
- Follador, I.; Bittencourt, A.; Duran, F.; das Gracas Araujo, M. G. (2001): Cutaneous protothecosis: report of the second Brazilian case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43 (5): 287-290.
- Fong, K.; Tee, S. I.; Ho, M. S.; Pan, J. Y. (2014) Cutaneous protothecosis in a patient with previously undiagnosed HIV infection. *Australas J Dermatol* DOI: 10.1111/ajd.12153
- Font, C.; Mascort, J.; Márquez, M.; Esteban, C.; Sánchez, D.; Durall, N.; Pumarola, M.; Luján, A. (2014): Paraparesis as initial manifestation of a *Prototheca zopfii* infection in a dog. *J Small Anim Pract* 55 (5): 282-286.
- Font, R. L.; Hook, S. R. (1984): Metastatic protothecal retinitis in a dog. Electron microscopic observations. *Vet Pathol* 21 (1): 61-66.
- Frank, N.; Ferguson, L. C.; Cross, R. F.; Redman, D. R. (1969): *Prototheca*, a cause of bovine mastitis. *Am J Vet Res* 30 (10): 1785-1794.
- Frese, K.; Gedek, B. (1968): Ein Fall von Protothecosis beim Reh. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 9: 174-178.

- Fuchs, A.; Fidler, G.; Meissel, H. (1996): Protothekose bei einem Hund. Wien Tierarztl Mschr 83: 60-63.
- Gan, S. D.; Patel, K. R. (2013): Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. J Invest Dermatol 133 (9): e12.
- Gaunt, S. D.; McGrath, R. K.; Cox, H. U. (1984): Disseminated protothecosis in a dog. J Am Vet Med Assoc 185 (8): 906-907.
- Gedek, B.; Weber, A. (1978): *Prototheca*-Mastitiden beim Rind als Bestandsproblem. Tierarztl. Prax. 6: 441-150.
- Gentles, J. C.; Bond, P. M. (1977): Protothecosis of atlantic salmon. Sabouraudia 15 (2): 133-139.
- Ginel, P. J.; Perez, J.; Molleda, J. M.; Lucena, R.; Mozos, E. (1997): Cutaneous protothecosis in a dog. Vet Rec 140 (25): 651-653.
- Gionfriddo, J. R. (2007): A challenging case: An unusual cause of blindness in a Siberian husky. veterinary medicine 102 (3): 172-178.
- Gorissen, S. (2011): Protothekose bei einem Riesenschnauzer. Kleintierprax 56: 16-20.
- Greene, C. E. (2011): Protothecosis. In: Infectious disease of the dog and cat. Hrsg: C. E. Greene, P. M. Rakich und K. S. Latimer, 3, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 696-701.
- Grunert, E.; Hoedemarker, M.; Weigt, U. (1996): Algenmastitis. In: Buiatrik. Hrsg: E. Grunert, M. Hoedemarker und U. Weigt, Band 1, Schaper, Hannover, 326.
- Gupta, A.; Gumber, S.; Bauer, R. W.; Royal, A. B. (2011): What is your diagnosis? Cerebrospinal fluid from a dog. Eosinophilic pleocytosis due to protothecosis. Vet Clin Pathol 40 (1): 105-106.
- Heney, C.; Greeff, M.; Davis, V. (1991): Hickman catheter-related protothecal algaemia in an immunocompromised child. J Infect Dis 163 (4): 930-931.
- Hillesheim, P. B.; Bahrami, S. (2011): Cutaneous Protothecosis. Archives of Pathology & Laboratory Medicine Vol. 135 (No. 7): pp. 941-944.
- Hollingsworth, S. R. (2000): Canine protothecosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 30 (5): 1091-1101.
- Holscher, M. A.; Shasteen, W. J.; Powell, H. S. (1976): Disseminated canine protothecosis: A case report. J Am Anim Hosp Assoc 12 (1): 49-52.
- Horiuchi, Y.; Tomizawa, N.; Higuchi, I.; Nagasaka, K. (1991): Experimental cutaneous protothecosis in mice: epithelioid cell granuloma formation. J Dermatol 18 (2): 74-78.
- Hosaka, S.; Hosaka, M. (2004): A case report of canine protothecosis. J Vet Med Sci 66 (5): 593-597.
- Huerre, M.; Ravisse, P.; Solomon, H.; Ave, P.; Briquet, N.; Maurin, S.; Wuscher, N. (1993): Human protothecosis and environment. Bull Soc Pathol Exot 86 (5 Pt 2): 484-488.

- Huss, V. A.; Sogin, M. L. (1990): Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *J Mol Evol* 31 (5): 432-442.
- Iacoviello, V. R.; DeGirolami, P. C.; Lucarini, J.; Sutker, K.; Williams, M. E.; Wanke, C. A. (1992): Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation: case report and literature review. *Clin Infect Dis* 15 (6): 959-967.
- Imes, G. D.; Lloyd, J. C.; Brightman, M. P. (1977): Disseminated protothecosis in a dog. *Onderstepoort J Vet Res* 44 (1): 1-6.
- Jagielski, T.; Lassa, H.; Ahrholdt, J.; Malinowski, E.; Roesler, U. (2011): Genotyping of bovine *Prototheca* mastitis isolates from Poland. *Vet Microbiol* 149 (1-2): 285-287.
- Janosi, S.; Ratz, F.; Szigeti, G.; Kulcsar, M.; Kerenyi, J.; Lauko, T.; Katona, F.; Huszenicza, G. (2001): Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Vet Q* 23 (2): 58-61.
- Janosi, S.; Szigeti, G.; Ratz, F.; Lauko, T.; Kerenyi, J.; Tenk, M.; Katona, F.; Huszenicza, A.; Kulcsar, M.; Huszenicza, G. (2001): *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. *Vet Q* 23 (2): 80-83.
- Jones, J. W.; McFadden, H. W.; Chandler, F. W.; Kaplan, W.; Conner, D. H. (1983): Green algal infection in a human. *Am J Clin Pathol* 80 (1): 102-107.
- Joshi, K. R.; Gavin, J. B.; Wheeler, E. E. (1975): The ultrastructure of *Prototheca wickerhamii*. *Mycopathologia* 56 (1): 9-13.
- Kaminski, Z. C.; Kapila, R.; Sharer, L. R.; Kloser, P.; Kaufman, L. (1992): Meningitis due to *Prototheca wickerhamii* in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 15 (4): 704-706.
- Kantrow, S. M.; Boyd, A. S. (2003): Protothecosis. *Dermatol Clin* 21 (2): 249-255.
- Kaplan, W.; Chandler, F. W.; Holzinger, E. A.; Plue, R. E.; Dickinson, R. O. (1976): Protothecosis in a cat: first recorded case. *Sabouraudia* 14 (3): 281-286.
- Kessler, E. (1982): Physiological and Biochemical Contributions to the taxonomy of the Genus *Prototheca* III. Utilization of Organic Carbon and Nitrogen Compounds. *Arch Mikrobiol* 132: 103-106.
- Khoury, J. A.; Dubberke, E. R.; Devine, S. M. (2004): Fatal case of protothecosis in a hematopoietic stem cell transplant recipient after infliximab treatment for graft-versus-host disease. *Blood* 104 (10): 3414-3415.
- Kockova-Kratochvilova, A.; Havelkova, M. (1974): *Prototheca hydrocarborea* n.sp. - Lebenszyklus, Metabolismus und Feinstruktur. *Z Allg Mikrobiol* 14 (2): 123-134.
- Krueger, W. (1894): Kurze Charakteristik einiger niederer Organismen im Safflusse der Laubbäume. *Hedwigia* 33: 16-24.
- Kuo, T. T.; Hseuh, S.; Wu, J. L.; Wang, A. M. (1987): Cutaneous protothecosis. A clinicopathologic study. *Arch Pathol Lab Med* 111 (8): 737-740.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.

- Lane, L. V.; Meinkoth, J. H.; Brunker, J.; Smith, S. K.; Snider, T. A.; Thomas, J.; Bradway, D.; Love, B. C. (2012): Disseminated protothecosis diagnosed by evaluation of CSF in a dog. *Vet Clin Pathol* 41 (1): 147-152.
- Lass-Floerl, C.; Fille, M.; Gunsilius, E.; Gastl, G.; Nachbaur, D. (2004): Disseminated infection with *Prototheca zopfii* after unrelated stem cell transplantation for leukemia. *J Clin Microbiol* 42 (10): 4907-4908.
- Lass-Floerl, C.; Mayr, A. (2007): Human protothecosis. *Clin Microbiol Rev* 20 (2): 230-242.
- Leimann, B. C.; Monteiro, P. C.; Lazera, M.; Candanoza, E. R.; Wanke, B. (2004): Protothecosis. *Med Mycol* 42 (2): 95-106.
- Lerche, M. (1952): Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastitis der Kuh. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 4: 64-69.
- Lloyd, D.; Turner, G. (1968): The cell wall of *Prototheca zopfii*. *J Gen Microbiol* 50 (3): 421-427.
- Loupal, G.; Kutin, E. S.; Kölbl, O. (1992): Die Schwimmblasenentzündung der Karpfen (*Cyprinus carpio*) - ätiologisches Agens: eine Alge. *Tierarztl. Umschau* 47 (11): 850-854.
- Macartney, L.; Rycroft, A. N.; Hammil, J. (1988): Cutaneous protothecosis in the dog: first confirmed case in Britain. *Vet Rec* 123 (19): 494-496.
- Macedo, J. T.; Riet-Correa, F.; Dantas, A. F.; Simoes, S. V. (2008): Cutaneous and nasal Protothecosis in a goat. *Vet Pathol* 45 (3): 352-354.
- Marques, S. (2010): Protothecosis: agent characterization and pathogenesis. *Vet Med Diss, Universidade do Porto*.
- Marques, S.; Silva, E.; Carvalheira, J.; Thompson, G. (2006): Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *J Dairy Sci* 89 (11): 4202-4204.
- Marques, S.; Silva, E.; Kraft, C.; Carvalheira, J.; Videira, A.; Huss, V. A.; Thompson, G. (2008): Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *J Clin Microbiol* 46 (6): 1941-1945.
- Márquez, M.; Ródenas, S.; Molin, J.; Rabanal, R. M.; Fondevila, D. (2012): Protothecal pyogranulomatous meningoencephalitis in a dog without evidence of disseminated infection. *Vet Rec* 171 (4): 100.
- Mathew, L.; Pulimood, S.; Thomas, M.; Acharya, M.; Raj, P.; Mathews, M. (2010): Disseminated protothecosis. *Indian Journal of Pediatrics* 77 (2): 198-199.
- McDonald, J. S.; Richard, J. L.; Cheville, N. F. (1984): Natural and experimental bovine intramammary infection with *Prototheca zopfii*. *Am J Vet Res* 45 (3): 592-595.
- Meehan, C.; Pollock, J. (1996): *Prototheca zopfii* infection in a cocker dog. *Aust Vet Practit* 26: 146-148.
- Menke, W.; Fricke, B. (1962): Einige Beobachtungen an *Prototheca ciferrii* Port. *Acta Biol* 6 A: 243-251.

- Meredith, R. E.; Gwin, R. M.; Samuelson, D. A. (1984): Systemic protothecosis with ocular manifestations in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 20: 153-156.
- Mettler, F. (1975): Generalisierte Protothekose bei einem Flughund (*Pteropus lylei*). *Vet Pathol* 12: 118.
- Migaki, G.; Font, R. L.; Sauer, R. M.; Kaplan, W.; Miller, R. L. (1982): Canine protothecosis: review of the literature and report of an additional case. *J Am Vet Med Assoc* 181 (8): 794-797.
- Moeller, A.; Truyen, U.; Roesler, U. (2007): *Prototheca zopfii* genotype 2 - the causative agent of bovine protothecal mastitis? *Vet Microbiol* 120 (3-4): 370-374.
- Moore, F. M.; Schmidt, G. M.; Desai, D.; Chandler, F. W. (1985): Unsuccessful treatment of disseminated protothecosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 186 (7): 705-708.
- Murugaiyan, J.; Ahrholdt, J.; Kowbel, V.; Roesler, U. (2012): Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. *Clin Microbiol Infect* 18 (5): 461-467.
- Nadakavukaren, M. J.; McCracken, D. A. (1973): *Prototheca*: an alga or an fungus? *J Phycol* 9: 113-116.
- Onozaki, M.; Makimura, K.; Hasegawa, A. (2009): Rapid identification of *Prototheca zopfii* by nested polymerase chain reaction based on the nuclear small subunit ribosomal DNA. *J Dermatol Sci* 54 (1): 56-59.
- Osumi, T.; Kishimoto, Y.; Kano, R.; Maruyama, H.; Onozaki, M.; Makimura, K.; Ito, T.; Matsubara, K.; Hasegawa, A. (2008): *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Vet Microbiol* 131 (3-4): 419-423.
- Otoyama, K.; Tomizawa, N.; Higuchi, I.; Horiuchi, Y. (1989): Cutaneous protothecosis - a case report. *J Dermatol* 16 (6): 496-499.
- Padhye, A. A.; Baker, J. G.; D'Amato, R. F. (1979): Rapid identification of *Prototheca* species by the API 20C system. *J Clin Microbiol* 10 (4): 579-582.
- Patni, N. J.; Aaronson, S. (1974): The nutrition, resistance to antibiotics and ultrastructure of *Prototheca wickerhamii*. *J Gen Microbiol* 83 (0): 179-182.
- Perez, J.; Ginel, P. J.; Lucena, R.; Hervas, J.; Mozos, E. (1997): Canine cutaneous protothecosis: an immunohistochemical analysis of the inflammatory cellular infiltrate. *J Comp Pathol* 117 (1): 83-89.
- Pezzutto, A.; Ulrichs, T.; Burmeister, G. R. (2006). Taschenatlas der Immunologie, 2, Thieme, Stuttgart, 360.
- Phair, J. P.; Williams, J. E.; Bassaris, H. P.; Zeiss, C. R.; Morlock, B. A. (1981): Phagocytosis and algicidal activity of human polymorphonuclear neutrophils against *Prototheca wickerhamii*. *J Infect Dis* 144 (1): 72-77.
- Polk, P.; Sanders, D. Y. (1997): Cutaneous protothecosis in association with the acquired immunodeficiency syndrome. *South Med J* 90 (8): 831-832.

- Pore, R. S. (1972): Nutritional basis for relating *Prototheca* and *Chlorella*. *Can J Microbiol* 18 (7): 1175-1177.
- Pore, R. S. (1973): Selektive medium for the isolation of *Prototheca*. *Appl Microbiol* 26 (4): 648-649.
- Pore, R. S. (1985): *Prototheca* taxonomy. *Mycopathologia* 90: 129-139.
- Pore, R. S.; Barnett, E. A.; Barnes, W. C., Jr.; Walker, J. D. (1983): *Prototheca* ecology. *Mycopathologia* 81 (1): 49-62.
- Pore, R. S.; Shahan, T. A.; Pore, M. D.; Blauwiel, R. (1987): Occurrence of *Prototheca zopfii*, a mastitis pathogen, in milk. *Vet Microbiol* 15 (4): 315-323.
- Povey, R. C.; Austwick, P. K. C.; Pearson, H.; Smith, K. C. (1969): A case of Protothecosis in a dog. *Pathol Vet* 6: 396-402.
- Pressler, B. M.; Gookin, J. L.; Sykes, J. E.; Wolf, A. M.; Vaden, S. L. (2005): Urinary tract manifestations of protothecosis in dogs. *J Vet Intern Med* 19 (1): 115-119.
- Rakich, P. M.; Latimer, K. S. (1984): Altered immune function in a dog with disseminated protothecosis. *J Am Vet Med Assoc* 185 (6): 681-683.
- Rallis, T. S.; Tontis, D.; Adamama-Moraitou, K. K.; Mylonakis, M. E.; Papazoglou, L. G. (2002): Protothecal colitis in a German shepherd dog. *Aust Vet J* 80 (7): 406-408.
- Ribeiro, M. G.; Rodrigues de Farias, M.; Roesler, U.; Roth, K.; Rodigheri, S. M.; Ostrowsky, M. A.; Salerno, T.; Siqueira, A. K.; Fernandes, M. C. (2009): Phenotypic and genotypic characterization of *Prototheca zopfii* in a dog with enteric signs. *Res Vet Sci* 87 (3): 479-481.
- Ricchi, M.; Cammi, G.; Garbarino, C. A.; Buzzini, P.; Belletti, G. L.; Arrigoni, N. (2011): A rapid real-time PCR/DNA resolution melting method to identify *Prototheca* species. *J Appl Microbiol* 110 (1): 27-34.
- Rizzi, T. E.; Cowell, R. L.; Meinkoth, J. H.; Gilmour, M. A. (2006): More than meets the eye: subretinal aspirate from an acutely blind dog. *Vet Clin Pathol* 35 (1): 111-113.
- Roesler, U. (2001): Immundiagnostische Charakterisierung der bovinen Protothekenmastitis. *Vet Med Diss, VMF Leipzig*.
- Roesler, U.; Moeller, A.; Hensel, A.; Baumann, D.; Truyen, U. (2006): Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56 (Pt 6): 1419-1425.
- Roesler, U.; Scholz, H.; Hensel, A. (2001): Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. *J Clin Microbiol* 39 (2): 539-543.
- Roesler, U.; Scholz, H.; Hensel, A. (2003): Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. *Int J Syst Evol Microbiol* 53 (Pt 4): 1195-1199.
- Roth, K. (2010): Ätiologische Bedeutung von *Prototheca zopfii* Genotyp 2 bei der Protothekenmastitis des Rindes. *Vet Med Diss, FU Berlin*.

- Salvadori, C.; Gandini, G.; Ballarini, A.; Cantile, C. (2008): Protothecal granulomatous meningoencephalitis in a dog. *J Small Anim Pract* 49 (10): 531-535.
- Sands, M.; Poppel, D.; Brown, R. (1991): Peritonitis due to *Prototheca wickerhamii* in a patient undergoing chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Rev Infect Dis* 13 (3): 376-378.
- Satoh, K.; Ooe, K.; Nagayama, H.; Makimura, K. (2009): *Prototheca cutis* sp. nov., a newly discovered pathogen of protothecosis isolated from inflamed human skin. *Int J Syst Evol Microbiol* 60 (Pt 5): 1236-1240.
- Saunders, L. Z.; Rubin, L. F. (1975). *Ophthalmic Pathology of Animals*, New York, 66-67.
- Schiefer, B.; Gedek, B. (1968): Zum Verhalten von *Prototheca* Species im Gewebe von Säugetieren. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 81 (24): 485-490.
- Schmalreck, A. F.; Trankle, P.; Vanca, E.; Blaschke-Hellmessen, R. (1998): Differenzierung und Charakterisierung von humanpathogenen Hefen (*Candida albicans*, *Exophiala dermatidis*) und tierpathogenen Algen (*Prototheca spp.*) mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) im Vergleich zu konventionellen Methoden. *Mycoses* 41 (1): 71-77.
- Schönborn, C.; Seffner, W. (1977): Zur Pathologie und Mikrobiologie einer durch *Prototheca trispora* ausgelösten Mastitis des Rindes. *Mh Vet Med* 32: 685-693.
- Schultze, A. E.; Ring, R. D.; Morgan, R. V.; Patton, C. S. (1998): Clinical, cytologic and histopathologic manifestations of protothecosis in two dogs. *Vet Ophthalmol* 1 (4): 239-243.
- Schuster, H.; Blaschke-Hellmessen, R. (1983): Zur Epidemiologie der Protothekenmastitis des Rindes - Anzüchtung von Algen der Gattung *Prototheca* aus der Umgebung landwirtschaftlicher Nutztiere. *Mh Vet Med* 38: 24-29.
- Spalton, D. E. (1985): Bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii*: A case study. *Vet Rec* 116 (13): 347-349.
- Stenner, V. J.; Mackay, B.; King, T.; Barrs, V. R.; Irwin, P.; Abraham, L.; Swift, N.; Langer, N.; Bernays, M.; Hampson, E.; Martin, P.; Krockenberger, M. B.; Bosward, K.; Latter, M.; Malik, R. (2007): Protothecosis in 17 Australian dogs and a review of the canine literature. *Med Mycol* 45 (3): 249-266.
- Strunck, E.; Billups, L.; Avgeris, S. (2004): Canine Protothecosis. *Compend Contin Educ Vet* 26: 96-102.
- Sudman, M. S. (1974): Protothecosis. A critical review. *Am J Clin Pathol* 61 (1): 10-19.
- Sudman, M. S.; Kaplan, W. (1973): Identification of the *Prototheca* species by immunofluorescence. *Appl Microbiol* 25 (6): 981-990.
- Sudman, M. S.; Majka, J. A.; Kaplan, W. (1973): Primary mucocutaneous protothecosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 163 (12): 1372-1374.
- Tartar, A.; Boucias, D. G.; Adams, B. J.; Becnel, J. J. (2002): Phylogenetic analysis identifies the invertebrate pathogen *Helicosporidium sp.* as a green alga (*Chlorophyta*). *Int J Syst Evol Microbiol* 52 (Pt 1): 273-279.
- Thomas, J. B.; Preston, N. (1990): Generalised protothecosis in a collie dog. *Aust Vet J* 67 (1): 25-27.

- Tsuji, H.; Kano, R.; Hirai, A.; Murakami, M.; Yanai, T.; Namihira, Y.; Chiba, J.; Hasegawa, A. (2006): An isolate of *Prototheca wickerhamii* from systemic canine protothecosis. *Vet Microbiol* 118 (3-4): 305-311.
- Tubaki, K.; Soneda, M. (1959): Cultural and taxonomical studies on *Prototheca*. *Nagoa* 6: 25-34.
- Tyler, D. E.; Lorenz, M. D.; Blue, J. L.; Munnell, J. F.; Chandler, F. W. (1980): Disseminated protothecosis with central nervous system involvement in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 176 (10 Pt 1): 987-993.
- Tyler, J. W.; Cullor, J. S. (1989): Titers, tests, and truisms: Rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J Am Vet Med Assoc* 194 (11): 1550-1558.
- Ueno, R. (2009): Visualization of sporopollenin-containing pathogenic green micro-alga *Prototheca wickerhamii* by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Can J Microbiol* 55 (4): 465-472.
- Ueno, R.; Urano, N.; Suzuki, M. (2003): Phylogeny of the non-photosynthetic green micro-algal genus *Prototheca* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) and related taxa inferred from SSU and LSU ribosomal DNA partial sequence data. *FEMS Microbiol Lett* 223 (2): 275-280.
- Ueno, R.; Urano, N.; Suzuki, M.; Kimura, S. (2002): Isolation, characterization, and fermentative pattern of a novel thermotolerant *Prototheca zopfii* var. *hydrocarborea* strain producing ethanol and CO₂ from glucose at 40°C. *Arch Microbiol* 177 (3): 244-250.
- Ueno, R.; Wada, S.; Urano, N. (2008): Repeated batch cultivation of the hydrocarbon-degrading, micro-algal strain *Prototheca zopfii* RND16 immobilized in polyurethane foam. *Can J Microbiol* 54 (1): 66-70.
- Van Kruiningen, H. J. (1970): Protothecal Enterocolitis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 157 (1): 56-63.
- Van Kruiningen, H. J.; Garner, F. M.; Schiefer, B. (1969): Protothecosis in a dog. *Pathol Vet* 6 (4): 348-354.
- Venezio, F. R.; Lavoo, E.; Williams, J. E.; Zeiss, C. R.; Caro, W. A.; Mangkornkanok-Mark, M.; Phair, J. P. (1982): Progressive cutaneous protothecosis. *Am J Clin Pathol* 77 (4): 485-493.
- von Bergen, M.; Eidner, A.; Schmidt, F.; Murugaiyan, J.; Wirth, H.; Binder, H.; Maier, T.; Roesler, U. (2009): Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS. *Proteomics Clin Appl* 3 (7): 774-784.
- Vorisek, J.; Kockova-Kratochvilova, A. (1975): Ultrastructural distribution of polysaccharides in *prototheca hydrocarborea*. *Z Allg Mikrobiol* 15 (3): 203-209.
- Walker, J. D.; Colwell, R. R.; Petrakis, L. (1975): Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Appl Microbiol* 30 (1): 79-81.
- Weber, A.; Enders, F. (1993): Untersuchungen zum Vorkommen von Prototheken in Kotproben von Haus- und Wildschweinen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 106: 261-263.
- Webster, D. A.; Hackett, D. P.; Park, R. B. (1967): The respiratory chain of colorless algae. 3. Electron microscopy. *J Ultrastuc Res* 21 (5): 514-523.

Wendt, K. (1994): Prototheken-Mastitis. In: Euter- und Gesäugekrankheiten. Hrsg: W. Seffner, K. Wendt, H. Bostedt, H. Mielke und H. W. Fuchs, Gustav-Fischer Verlag, Jena, 431-434.

Wilkinson, G. T. (1988): Protothecosis in a dog. Aust Vet Practit 18: 47-50.

Wirth, F. A.; Passalacqua, J. A.; Kao, G. (1999): Disseminated cutaneous protothecosis in an immunocompromised host: a case report and literature review. Cutis 63 (3): 185-188.

Woolrich, A.; Koestenblatt, E.; Don, P.; Szaniawski, W. (1994): Cutaneous protothecosis and AIDS. J Am Acad Dermatol 31 (5 Pt 2): 920-924.

Young, M.; Bush, W.; Sanchez, M.; Gavin, P.; Williams, M. (2012): Serial MRI and CSF analysis in a dog treated with intrathecal amphotericin B for protothecosis. J Am Anim Hosp Assoc 48 (2): 125-131.

9. Publikationsverzeichnis

Poster

Palm, V.; Volkmann, M., Kohn, B.; Roesler, U. (2012): Prävalenz der caninen Protothekose im Großraum Berlin. Tagung der DVG-Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie", Leipzig.

10. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Uwe Rösler für die Vergabe dieser sehr interessanten Doktorarbeit. Insbesondere dass er mir die Möglichkeit gab, eine Dissertation im Institut für Tier- und Umwelthygiene extern neben meiner praktischen Tätigkeit als Kleintierärztin anfertigen zu können. Recht herzlich möchte ich mich für die stets freundliche und hervorragende Betreuung bedanken.

Daneben geht mein besonderer Dank an Frau Prof. Dr. Barbara Kohn, die es mir ermöglichte, in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin die benötigten Proben zu sammeln und mich mit ihren äußerst zügigen Korrekturen immer konstruktiv und zuverlässig unterstützte.

Ein weiteres besonderes Dankeschön geht an Maria Volkmann, die mir in der Probensammlung in der Kleintierklinik großartig zur Seite stand. Ohne sie wären u.a. die Western Blot Analysen nicht so einfach zu schaffen gewesen, sie war mir wirklich immer eine tolle Hilfe.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei meiner ehemaligen „Protothekenkollegin“ Dr. Jennifer Ahrholdt bedanken, welche mir den Einstieg ins Institutsleben erheblich erleichterte, speziell in die Labortätigkeit. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und unterstützte mich bei sämtlichen anfallenden Laborarbeiten. Das vielfache Ausstreichen der angereicherten Kotproben oder Konservierung dieser war eine enorme Erleichterung.

Dr. Jayaseelan Murugaiyan danke ich für die Hilfe und die Betreuung bei den Western Blot-Analysen und der anschließenden Ergebnisauswertung.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Nicole Rochanski für die immer schnellen, verlässlichen und konstruktiven Korrekturen und Anmerkungen.

Ein weiterer großer Dank gebührt den fleißigen medizinisch-technischen Assistentinnen Heike Jansen, Susann Hänsicke, Karin Fiedler und Maja Thieck für das Gießen vieler PIM's und Bereitstellung anderer benötigter Labormaterialien, insbesondere das Kontrollieren der Platten auf Wachstum von Prototheken.

Darüber hinaus danke ich allen mitstreitenden Doktorandinnen im Institut, vor allem Dr. Katrin Zimmermann, Henriette Laube, Alexandra Irrgang und Christina von Salviati, für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre und Unterstützung so mancher Probenweiterbearbeitung.

Außerdem richtet sich ein riesengroßes Dankeschön an meine tollen Freunde. Hervorheben möchte ich Nine, die schon während des Studiums mit mir durch „Dick und Dünn“ gegangen ist und die mir nun trotz einer Entfernung von über 500 km immer in allen Lebenslagen beistand und -steht und mich stets motivierte durchzuhalten.

Weiterhin danke ich „meinen“ Mädels zutiefst. Ohne Euch -Chrisili, Mone und Nadinsche- wäre ich nicht so weit gekommen. Ich danke euch für eure tolle, immerwährende und innige Freundschaft.

Euch Beiden, liebe Anja und liebe Elisa, möchte ich danken für den steten Beistand, die hilfreichen und konstruktiven Anmerkungen und das offene Ohr zu jeder Zeit. Weiterhin ist

Meike zu nennen, ich danke Dir für unsere tollen Gespräche und die überaus wichtigen abendlichen Ablenkungen. Auch danke ich Kelly. Du hast mir immer toll beigestanden und mich prima unterstützt.

Ferner danke ich meinem Praxisteam, meinen lieben Kolleginnen und insbesondere meinem Chef Dr. Hans Georg König, für die stete Unterstützung, die Flexibilität und den Freiraum, die Dissertation in diesem Rahmen durchführen zu können.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie, insbesondere meiner Mama Margrit, ihrem Ehemann Hans und meiner Lieblingsschwester Rebekka. Ich danke euch von Herzen für den großartigen und immerwährenden konstanten Rückhalt, die steten Aufmunterungen, eure Liebe, euer Vertrauen und eure treue Unterstützung.

Weiterhin bleibt meine liebe Oma Tina nicht unerwähnt, die immer an mich geglaubt hat und die sich schon seit dem Studium darauf freut, mich endlich eines Tages „Frau Doktor“ nennen zu können.

Nicht zu vergessen richtet sich ein ganz besonderer Dank an meinem lieben Freund Nik, ohne den all dies nicht möglich gewesen wäre. Danke dass Du stets meine Launen ertragen hast, mich immer versucht hast aufzumuntern und immer Verständnis für mich hattest, insbesondere in den stressigen Phasen.

Abschließend danke ich meinem Papa. Nur zu gerne hätte ich ihn an diesem besonderen Lebensabschnitt teilhaben lassen wollen.

11. Anhang

Tabellen

Tabelle 14: Kulturelle Nachweise von *Prototheca* spp. und die zugehörigen spezifischen Antikörperaktivitäten der einzelnen Gruppen

Gruppe 1:

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
oB 001	Negativ	8,61
oB 003	Negativ	21,14
oB 006	Negativ	11,94
oB 007	Negativ	44,72
oB 008	Negativ	26,50
oB 010	Negativ	39,32
oB 012	Negativ	57,11
oB 013	Negativ	13,12
oB 014	Negativ	37,11
oB 015	Negativ	37,12
oB 016	Negativ	51,05
oB 017	Negativ	119,42
oB 019	Negativ	5,62
oB 020	Negativ	29,52
oB 021	Negativ	6,68
oB 022	Negativ	1,41
oB 023	Negativ	14,24
oB 026	Negativ	3,28
oB 027	Negativ	22,40
oB 028	Negativ	12,39
oB 029	Negativ	43,69
oB 030	Negativ	52,05
oB 032	Negativ	21,35
oB 033	Negativ	10,67
oB 035	Negativ	12,61
oB 036	Negativ	20,97
oB 038	Negativ	16,76
oB 044	Negativ	62,26
oB 045	Negativ	49,48
oB 046	Negativ	11,11

Tabelle 14: Fortsetzung von Seite 75

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
oB 048	Negativ	5,44
oB 049	Negativ	11,91
oB 050	Negativ	18,00
oB 052	Negativ	124,69
oB 053	Negativ	27,41
oB 054	Negativ	41,02
oB 056	Negativ	45,09
oB 059	Negativ	41,31
oB 060	Negativ	57,30
oB 062	Negativ	16,88
oB 064	Negativ	8,26
oB 068	Negativ	109,26
oB 069	Negativ	45,70
oB 070	Negativ	55,93
oB 072	Negativ	12,97
oB 074	Negativ	31,91
oB 075	Negativ	47,05
oB 077	Negativ	68,79
oB 078	Negativ	36,89
oB 079	Negativ	47,87
oB 080	Negativ	44,78
oB 081	Negativ	50,61
oB 082	Negativ	44,26
oB 083	Negativ	36,25
oB 084	Negativ	52,66
oB 085	Negativ	65,67
oB 087	Negativ	69,24
oB 088	Negativ	51,85
oB 091	Negativ	58,80
oB 092	Negativ	38,63
oB 093	Negativ	30,71
oB 094	Negativ	87,23
oB 095	Negativ	36,50
oB 096	Negativ	118,18
oB 097	Negativ	116,85
oB 098	Negativ	44,44
oB 099	Negativ	55,90
oB 100	Negativ	46,20
oB 101	Negativ	102,73

Anhang

Tabelle 14: Fortsetzung von Seite 76

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
oB 102	Negativ	56,77
oB 105	Negativ	15,00
oB 106	Negativ	71,17
oB 107	Negativ	171,50
oB 108	Negativ	86,47
oB 109	Negativ	103,90
oB 110	Negativ	30,04
oB 114	Negativ	66,30
oB 115	Negativ	96,54
oB 116	Negativ	27,80
oB 118	Negativ	59,27
oB 119	Negativ	65,64
oB 120	Negativ	64,63
oB 121	Negativ	79,86
oB 122	Negativ	109,13
oB 123	Negativ	50,06
oB 124	Negativ	56,50
oB 125	Negativ	37,30
oB 127	Negativ	30,60
oB 128	Negativ	29,78
oB 129	Negativ	98,16
oB 130	Negativ	27,11
oB 131	Negativ	22,86
oB 132	Negativ	44,70
oB 133	Negativ	50,74
oB 134	Negativ	13,18
oB 135	Negativ	14,12
oB 136	Negativ	12,24
oB 137	Negativ	21,34
oB 138	Negativ	9,55
oB 139	Negativ	6,75
oB 140	Negativ	6,65
oB 142	Negativ	19,46
oB 143	Negativ	16,55
oB 144	Negativ	108,26
oB 145	Negativ	15,64
oB 146	Negativ	8,23
oB 147	Negativ	17,21
oB 148	Negativ	10,46

Tabelle 14: Fortsetzung von Seite 77

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
oB 150	Negativ	26,20
oB 151	Negativ	16,97
oB 152	Negativ	34,81
oB 153	Negativ	12,16
oB 154	Negativ	47,31
oB 155	Negativ	19,72
oB 156	Negativ	11,95
oB 157	Negativ	10,29
oB 158	Negativ	23,03
oB 159	Negativ	9,54
oB 160	Negativ	14,77
oB 161	Negativ	6,31
oB 162	Negativ	4,77
oB 163	Negativ	9,11
oB 164	Negativ	7,95
oB 165	Negativ	10,86
oB 166	Negativ	7,18
oB 167	Negativ	11,81
oB 168	Negativ	9,28
oB 169	Negativ	30,74
oB 170	Negativ	8,67
oB 171	Negativ	5,46
oB 172	Negativ	7,55
oB 173	Negativ	2,55
oB 174	Negativ	5,67
oB 175	Negativ	15,94
oB 176	Negativ	8,17
oB 177	Negativ	8,37
oB 178	Negativ	22,19
oB 180	Negativ	38,57
oB 181	Negativ	29,84
oB 182	Negativ	119,66
oB 184	Negativ	56,26
oB 185	Negativ	39,25
oB 186	Negativ	39,96
oB 187	Negativ	39,66
oB 189	Negativ	47,27
oB 190	Negativ	118,89

Anhang

Tabelle 14: Fortsetzung von Seite 78

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
oB 192	Negativ	53,39
oB 193	Negativ	103,32
oB 194	Negativ	49,93
oB 195	Negativ	58,69
oB 196	Negativ	79,62
oB 197	Negativ	86,19
oB 198	Negativ	104,16
oB 200	Negativ	80,03
oB 201	Negativ	47,53
oB 202	Negativ	65,57
oB 203	Negativ	94,96
oB 204	Negativ	15,00
oB 205	Negativ	124,59
oB 206	Negativ	11,47
oB 207	Negativ	16,32
oB 208	Negativ	4,48
oB 209	Negativ	6,86
oB 210	Negativ	21,39
oB 211	Negativ	6,29
oB 213	Negativ	7,23
oB 214	Negativ	9,20
oB 215	Negativ	6,36
oB 216	Negativ	14,16
oB 217	Negativ	8,17
oB 218	Negativ	5,87
oB 219	Negativ	5,81
oB 221	Negativ	9,39
oB 222	Negativ	9,13
oB 223	Negativ	6,18
oB 224	Negativ	6,39
oB 225	Negativ	8,17
oB 226	Negativ	8,08
oB 227	Negativ	5,92
oB 228	Negativ	7,77
oB 229	Negativ	8,67
oB 230	Negativ	3,53
oB 231	Negativ	7,02
oB 232	Negativ	18,22
oB 233	Negativ	5,27

Tabelle 14: Fortsetzung von Seite 79

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
oB 234	Negativ	5,23
oB 235	Negativ	7,61
oB 236	Negativ	12,45
oB 237	Negativ	15,09
oB 238	Negativ	5,07
oB 239	Negativ	4,11
oB 240	Negativ	72,36
oB 241	Negativ	4,41
oB 242	Negativ	6,63
oB 243	Negativ	15,00
oB 244	Negativ	4,06
oB 245	Negativ	15,00
oB 246	Negativ	8,10
oB 247	Negativ	5,98
oB 248	Negativ	4,32
oB 249	Negativ	5,02
oB 250	Negativ	4,73
oB 251	Negativ	7,90
oB 252	Negativ	18,02
oB 253	Negativ	23,28
oB 254	Negativ	42,18
oB 255	Negativ	20,17
oB 256	Negativ	20,58
oB 257	Negativ	11,33
oB 258	Negativ	21,04
oB 259	Negativ	16,89
oB 260	Negativ	42,90
oB 261	Negativ	23,60
oB 262	Negativ	65,95
oB 263	Negativ	7,81
oB 264	Negativ	9,79
oB 265	Negativ	8,38
oB 266	Negativ	70,92
oB 267	Negativ	74,60
oB 268	Negativ	23,71
oB 270	Negativ	23,00
oB 271	Negativ	3,89
oB 272	Negativ	2,79
oB 273	Negativ	7,41

Tabelle 14: Fortsetzung von Seite 80

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
oB 274	Negativ	50,80
oB 275	Negativ	7,07
3	Negativ	5,43
5	Negativ	4,01
7	Negativ	0,98
13	Negativ	4,60
14	Negativ	15,61
16	Negativ	19,15
17	Negativ	0,62
24	Negativ	0,97
25	Negativ	9,16

Tabelle 14

Gruppe 2:

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
E 1	Negativ	74,00
E 2	Negativ	23,59
E 3	Negativ	41,44
E 4	Negativ	5,80
E 5	Negativ	10,47
E 6	Negativ	41,67
E 7	Negativ	7,06
E 8	Negativ	21,87
E 9	Negativ	67,61
E 10	Negativ	11,69
E 11	Negativ	6,11
E 12	Negativ	6,51
E 13	Negativ	7,57
E 14	Negativ	18,67
E 15	Negativ	34,08
E 16	Negativ	10,16
E 17	Negativ	17,77
E 18	Negativ	13,51
E 19	Negativ	13,07
E 20	Negativ	13,04

Tabelle 14 (Gruppe 2): Fortsetzung von Seite 81

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
E 21	Negativ	18,20
E 23	Negativ	21,55
E 21	Negativ	18,20
E 23	Negativ	21,55
E 24	Negativ	18,70
E 25	Negativ	15,00
E 26	Negativ	27,95
E 27	Negativ	17,44
E 28	Negativ	15,25
E 29	Negativ	7,60
E 30	Negativ	36,33
E 31	Negativ	60,81
E 32 (FU 1)	Positiv	1052,99
E 33	Negativ	19,92
E 34	Negativ	56,46
E 35	Negativ	24,60
E 36	Negativ	22,38
E 37	Negativ	14,25
E 38	Negativ	102,73
E 39	Negativ	19,99
E 40	Negativ	15,76
E 41	Negativ	15,08
E 42 (FU 2)	Positiv	384,59
E 43	Negativ	15,98
E 44	Negativ	22,44
E 45	Negativ	32,75
E 46	Negativ	10,37
E 47	Negativ	23,27
E 48	Negativ	13,01
E 50	Negativ	5,79
E 51	Negativ	14,08
E 52	Negativ	11,44
E 53	Negativ	4,70
E 55	Negativ	4,31
E 56	Negativ	14,38
E 57	Negativ	10,39
E 58	Negativ	9,55
E 59	Negativ	5,01
E 60	Negativ	5,15

Anhang

Tabelle 14 (Gruppe 2): Fortsetzung von Seite 82

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
E 61	Negativ	6,10
E 66	Negativ	7,83
E 68	Negativ	4,15
E 69	Negativ	4,15
E 70	Negativ	5,40
E 71	Negativ	4,17
E 72	Negativ	14,83
E 73	Negativ	14,18
S	Positiv	1056,45

Tabelle 14

Gruppe 3:

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
xoB 002	Negativ	93,18
xoB 004	Negativ	106,42
xoB 005	Negativ	45,04
xoB 009	Negativ	10,06
xoB 011	Negativ	25,17
xoB 018	Negativ	11,23
xoB 024	Negativ	123,27
xoB 025	Negativ	10,06
xoB 031	Negativ	52,70
xoB 034	Negativ	65,10
xoB 037	Negativ	38,84
xoB 039	Negativ	46,43
xoB 040	Negativ	101,54
xoB 041	Negativ	93,37
xoB 042	Negativ	44,67
xoB 043	Negativ	8,83
xoB 047	Negativ	76,49
xoB 051	Negativ	3,43
xoB 055	Negativ	57,41
xoB 057	Negativ	40,88
xoB 058	Negativ	17,62
xoB 061	Negativ	105,78

Tabelle 14 (Gruppe 3) : Fortsetzung von Seite 83

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
xoB 063	Negativ	34,78
xoB 065	Negativ	68,05
xoB 066	Negativ	88,59
xoB 067	Negativ	2,77
xoB 071	Negativ	3,16
xoB 073	Negativ	115,44
xoB 076	Negativ	34,99
xoB 086	Negativ	67,54
xoB 089	Negativ	48,02
xoB 090	Negativ	56,19
xoB 103	Negativ	1,15
xoB 111	Negativ	1,49
xoB 112	Negativ	7,05
xoB 113	Negativ	57,76
xoB 117	Negativ	62,49
xoB 126	Negativ	89,21
xoB 141	Negativ	8,37
xoB 149	Negativ	93,41
xoB 179	Negativ	29,62
xoB 183	Negativ	1,90
xoB 188	Negativ	2,16
xoB 199	Negativ	17,62
xoB 212	Negativ	7,42
xoB 220	Negativ	18,69
xoB 269	Negativ	25,74
1	Negativ	4,00
2	Negativ	6,38
4	Negativ	7,07
6	Negativ	7,24
8	Negativ	1,59
9	Negativ	15,43
10	Negativ	27,75
11	Negativ	21,13
12	Negativ	3,54
15	Negativ	13,17
19	Negativ	0,86
20	Negativ	2,89
21	Negativ	5,58
22	Negativ	66,50

Anhang

Tabelle 14 (Gruppe 3) : Fortsetzung von Seite 84

Probe	Kultureller Befund	ELISA-Aktivität [EU/ml]
23	Negativ	0,45

Tabelle 15:

Extinktionswerte zur Prüfung der Intra-Assay-Variation des ELISA für den Nachweis von IgG im Serum. Verwendet wurde eine Mikrotiterplatte vom Typ Maxisorp® sowie das positive Prototheken-Referenzserum und das peroxidasekonjugierte Hyperimmunserum als sekundärer Antikörper : Ziege-anti-Hund IgG.

	- Pool	FU 1 -1										
1	0,228	1,644	1,844	1,813	1,74	1,763	1,716	1,789	1,788	1,79	1,7	1,741
1:2	0,184	1,253	1,247	1,258	1,176	1,218	1,223	1,182	1,185	1,158	1,245	1,338
1:4	0,147	0,964	0,943	0,948	0,934	0,908	0,888	0,858	0,881	0,864	0,933	1,035
1:16	0,139	0,688	0,661	0,658	0,686	0,704	0,637	0,679	0,653	0,663	0,711	0,811
	+ Pool	oB 230										
1	2,486	0,185	0,184	0,187	0,204	0,231	0,201	0,209	0,229	0,205	0,187	0,182
1:2	2,08	0,145	0,14	0,135	0,181	0,166	0,149	0,159	0,159	0,211	0,149	0,158
1:4	1,713	0,136	0,129	0,128	0,151	0,143	0,177	0,142	0,139	0,162	0,14	0,153
1:16	0,623	0,149	0,138	0,142	0,143	0,135	0,153	0,14	0,135	0,16	0,096	0,15

Tabelle 16

Extinktionswerte zur Prüfung der Inter-Assay-Variation des ELISA für den Nachweis von IgG im Serum. Verwendet wurde eine Mikrotiterplatte vom Typ Maxisorp® sowie das positive Prototheken-Referenzserum und das peroxidasekonjugierte Hyperimmunserum als sekundärer Antikörper : Ziege-anti-Hund IgG.

Testansatz 1:

	- Pool	FU1-1	FU1-2	FU1-3	FU1-4	FU1-5	FU1-6	FU1-7	FU1-8	FU1-9	FU1-10	FU1-11
1	0,394	2,195	2,275	2,175	2,189	2,199	2,174	2,195	2,386	2,376	2,122	2,291
1:2	0,268	1,667	1,748	1,676	1,808	1,846	1,701	1,897	1,964	1,944	1,625	1,857
1:4	0,224	1,328	1,308	1,337	1,33	1,356	1,264	1,529	1,514	1,536	1,343	1,452
1:16	0,211	0,946	0,942	0,885	0,929	0,956	0,943	1,058	1,033	1,094	0,907	1,077
1	+ Pool	oB 19	oB 28	oB 45	oB 84	oB 116	oB 125	oB 153	oB 161	oB 182	oB 207	oB 226
1	2,133	0,344	0,436	0,461	0,37	0,339	0,416	0,437	0,35	0,831	0,54	0,409
1:2	1,668	0,244	0,294	0,272	0,232	0,244	0,253	0,266	0,244	0,458	0,337	0,31
1:4	1,323	0,16	0,191	0,251	0,185	0,179	0,212	0,199	0,175	0,311	0,29	0,255
1:16	0,859	0,182	0,164	0,164	0,152	0,147	0,16	0,18	0,169	0,23	0,218	0,219

Tabelle 16: Fortsetzung von Seite 85

Testansatz 2:

	- Pool	FU1-1	FU1-2	FU1-3	FU1-4	FU1-5	FU1-6	FU1-7	FU1-8	FU1-9	FU1-10	FU1-11
1	0,652	2,832	2,888	2,865	2,884	2,904	2,848	2,901	3,127	3,137	2,854	2,949
1:2	0,359	2,328	2,256	2,238	2,328	2,284	2,345	2,329	2,667	2,642	2,315	2,515
1:4	0,35	1,838	1,7	1,81	1,735	1,885	1,763	1,728	2,074	2,051	1,824	2
1:16	0,258	1,301	1,372	1,369	1,418	1,364	1,373	1,315	1,578	1,542	1,323	1,524
	+ Pool	oB 19	oB 28	oB 45	oB 84	oB 116	oB 125	oB 153	oB 161	oB 182	oB 207	oB 226
1	3,06	0,496	0,608	0,61	0,399	0,393	0,512	0,585	0,439	1,07	0,727	0,638
1:2	2,258	0,341	0,345	0,45	0,318	0,338	0,298	0,377	0,302	0,592	0,482	0,36
1:4	1,818	0,229	0,245	0,287	0,285	0,258	0,275	0,246	0,273	0,308	0,363	0,314
1:16	1,141	0,138	0,237	0,196	0,253	0,236	0,237	0,215	0,228	0,217	0,286	0,244

Testansatz 3:

	- Pool	FU1-1	FU1-2	FU1-3	FU1-4	FU1-5	FU1-6	FU1-7	FU1-8	FU1-9	FU1-10	FU1-11
1	0,477	2,322	2,354	2,349	2,3	2,418	1,934	2,117	2,225	2,375	2,195	2,236
1:2	0,295	1,792	1,907	1,996	2,042	2,103	1,72	1,9	1,961	2,021	1,815	1,988
1:4	0,207	1,321	1,549	1,454	1,363	1,401	1,438	1,653	1,609	1,603	1,511	1,725
1:16	0,175	1,151	1,16	1,112	1,086	1,193	1,255	1,094	1,279	1,385	1,054	1,36
	+ Pool	oB 19	oB 28	oB 45	oB 84	oB 116	oB 125	oB 153	oB 161	oB 182	oB 207	oB 226
1	2,298	0,432	0,502	0,534	0,398	0,398	0,586	0,587	0,488	1,032	0,702	0,633
1:2	1,781	0,267	0,29	0,304	0,271	0,278	0,381	0,407	0,328	0,477	0,545	0,406
1:4	1,423	0,262	0,256	0,257	0,243	0,294	0,319	0,3	0,261	0,357	0,36	0,332
1:16	1,07	0,204	0,244	0,29	0,259	0,28	0,274	0,302	0,261	0,312	0,325	0,299

Testansatz 4:

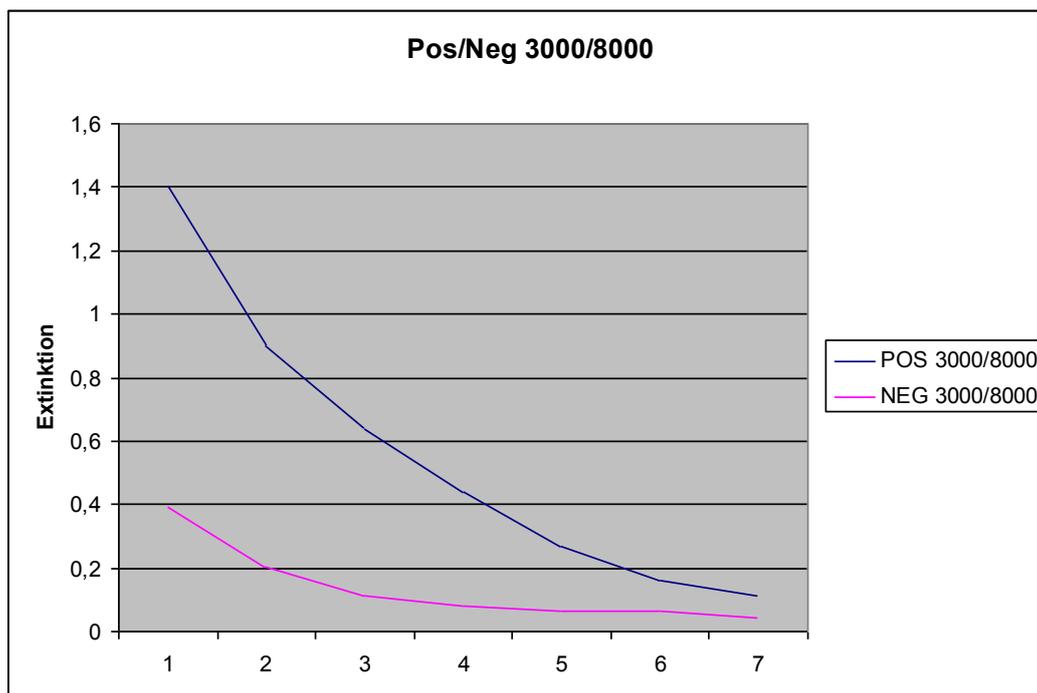
	- Pool	FU1-1	FU1-2	FU1-3	FU1-4	FU1-5	FU1-6	FU1-7	FU1-8	FU1-9	FU1-10	FU1-11
1	0,636	2,772	2,763	2,83	2,974	2,844	2,924	2,825	2,978	2,939	2,838	2,871
1:2	0,53	2,336	2,336	2,403	2,512	2,443	2,444	2,283	2,623	2,609	2,523	2,447
1:4	0,35	1,763	1,758	1,815	1,927	1,887	1,825	1,902	2,08	2,062	1,825	1,778
1:16	0,328	1,336	1,434	1,406	1,549	1,477	1,27	1,458	1,626	1,631	1,452	1,338
	+ Pool	oB 19	oB 28	oB 45	oB 84	oB 116	oB 125	oB 153	oB 161	oB 182	oB 207	oB 226
1	2,826	0,609	0,613	0,712	0,566	0,553	0,666	0,659	0,589	1,13	0,91	0,762
1:2	2,301	0,404	0,423	0,406	0,39	0,44	0,435	0,508	0,419	0,662	0,578	0,496
1:4	1,74	0,309	0,332	0,366	0,326	0,348	0,37	0,325	0,373	0,493	0,507	0,358
1:16	1,332	0,267	0,27	0,341	0,242	0,298	0,346	0,338	0,353	0,407	0,402	0,354

Tabelle 16: Fortsetzung von Seite 86

Testansatz 5

	- Pool	FU1-1	FU1-2	FU1-3	FU1-4	FU1-5	FU1-6	FU1-7	FU1-8	FU1-9	FU1-10	FU1-11
1	0,581	2,795	2,758	2,872	2,917	2,7	2,895	2,887	2,875	2,984	2,826	2,833
1:2	0,467	2,329	2,384	2,435	2,528	2,343	2,491	2,243	2,542	2,601	2,59	2,484
1:4	0,359	1,71	1,716	1,942	1,941	1,877	1,971	1,979	2,042	2,121	1,798	1,705
1:16	0,303	1,347	1,437	1,401	1,421	1,398	1,257	1,412	1,676	1,615	1,486	1,339
	+ Pool	oB 19	oB 28	oB 45	oB 84	oB 116	oB 125	oB 153	oB 161	oB 182	oB 207	oB 226
1	2,808	0,583	0,484	0,583	0,577	0,491	0,432	0,535	0,406	1,107	0,567	0,49
1:2	2,396	0,382	0,407	0,446	0,395	0,415	0,396	0,49	0,363	0,6	0,476	0,45
1:4	1,564	0,336	0,345	0,344	0,308	0,306	0,348	0,34	0,323	0,399	0,415	0,397
1:16	1,255	0,289	0,246	0,312	0,285	0,293	0,31	0,324	0,291	0,282	0,398	0,358

Tabelle 17: Liniendiagramm der Schachbrett-Titration (Serumverdünnung 1:3000, Konjugatverdünnung 1: 8000)



Chemikalien und Reagenzien

ELISA – Gebrauchslösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 0,15 M, pH 7,4

NaCl	85,0 g
NA ₂ HPO ₄	14,8 g
KH ₂ PO ₄	3,54 g
A. bidest	ad 1 Liter

PBS-Tween, 0,05 %

0,5 ml Tween 20[®] ad 1 Liter PBS

Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer)

NaHCO ₃	8,4 g
A. bidest	ad 1 Liter

Der pH-Wert wird mit Na₂CO₃ auf 9,6 eingestellt.

Blockierungspuffer

Gelatine	5 g
PBS	ad 1 Liter

Pufferlösungen und Reagenzien für Gel-Elektrophorese und Immuno-Blot

Sammelgelpuffer (1.5 M Tris-HCL, pH 8,8)

Tris	6 g
Aqua bidest	60 ml

Der pH-Wert wird mit HCL auf pH 8.8 eingestellt und die Lösung auf 100 ml mit A. bidest aufgefüllt.

Trenngelpuffer (0,5 M Tris-HCL, pH 6.6)

Tris	54,45 g
Aqua dest.	150 ml

Der pH-Wert wird mit HCL auf 6,6 eingestellt und mit A. dest auf 300 ml aufgefüllt.

Trenn- und Sammelgel (für 2 Minigele)

	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
Totalvolumen in ml	40,00	20
Aqua bidest in ml	13,40	12,2
1,5 M Trichlorethylene HCL pH 8,8 in ml	10,00	
0,5 M Trichlorethylene HCL pH 6,6 in ml		5,0
10 % SDS-Lösung in µl	400,00	200,00
Acrylamidlösung in ml	16	2,6
10 % APS in µl	300	150,0
TEMED in µl	30	30

Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)

APS	10 %
-----	------

Die Lösung wird mit A.bidest vor dem Gebrauch frisch angesetzt.

SDS-Probenpuffer (8,0 ml)

Aqua dest	3,0 ml
0,5 M Tris-HCL, pH 6.8	1,0 ml
Glycerol	1,6 ml
10 % SDS	1,6 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
0,5 % Bromphenolblau	0,4 ml

Elektroden-Puffer

Tris	0,0025 M (pH 8,3)
Glycin	0,192 M
SDS	1 %

Ponceau-S-Färbelösung (1%)

Ponseau S	1 g
Essigsäure	2,0 ml
A.dest	198,0 ml

Prototheken-Isolations-Medium nach Pore (1973)

Kaliumhydrogenphthalat	10 g
Natriumhydroxid	0,9 g
Magnesiumsulfat	0,2 g
Kaliumhydrogenphosphat	0,3 g
Ammoniumchlorid	0,3 g
Glukose	10,0 g
Thiaminhydrochlorid	0,001 g
Fluorocytosin	0,25 g
Agar	20,0 g
A.dest	ad 1000ml

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Aufgeführte Quellen und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Berlin, den 24.04.2014

Vanessa Palm