

Aus der Klinik für kleine Haustiere  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Studien zu *Anaplasma phagocytophilum* beim Hund:  
Klinik der granulozytären Anaplasmosose und Bedeutung  
für die Transfusionsmedizin**

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

vorgelegt von  
**Aleksandra Chirek**  
Tierärztin aus Dirschau

Berlin 2018  
Journal-Nr.: 4052







**Aus der Klinik für kleine Haustiere  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Studien zu *Anaplasma phagocytophilum* beim Hund: Klinik der granulozytären  
Anaplasrose und Bedeutung für die Transfusionsmedizin**

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

**vorgelegt von  
Aleksandra Chirek  
Tierärztin  
aus Dirschau**

**Berlin 2018**

**Journal-Nr.: 4052**

**Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

**Erster Gutachter:** Univ.-Prof. Barbara Kohn

**Zweiter Gutachter:** PD Dr. Jürgen Krücken

**Dritter Gutachter:** PD Dr. Sebastian Arlt

**Deskriptoren (nach CAB- Thesaurus):**

dogs, Ixodes, anaplasmoses, Anaplasma phagocytophilum, real time PCR, polymerase chain reaction, clinical examination, transfusion

**Tag der Promotion:** 04.06.2018

Meinen Eltern



## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungsverzeichnis .....	7
I. Einleitung.....	9
II. Literaturübersicht.....	10
1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> : Erreger der granulozytären Anaplasrose .....	10
1.1 Pathogenese .....	11
1.2 Übertragung .....	12
2. Die granulozytäre Anaplasrose.....	13
2.1 Die humane granulozytäre Anaplasrose .....	13
2.2 Die canine granulozytäre Anaplasrose .....	14
2.2.1 Klinik .....	14
2.2.2 Laborwertveränderungen .....	18
2.2.3 Pathologische Befunde.....	21
2.2.4 Diagnose .....	21
2.2.4.1 Direkte Nachweismethoden .....	21
2.2.4.2 Indirekte Nachweismethoden.....	22
2.2.5 Therapie .....	26
2.2.6 Verlauf .....	27
2.2.7 Bedeutung für die Transfusionsmedizin .....	27
III. Studie 1: Granulocytic Anaplasmosis in 63 Dogs: Clinical Signs, Laboratory Results, Therapy and Course of Disease.....	34

IV Studie 2: Vorkommen von <i>Anaplasma phagocytophilum</i> bei Blutspenderhunden in Berlin/Brandenburg (2006–2012): retrospektive Auswertung klinischer Daten und Bedeutung für die Transfusionsmedizin.....	44
V. Diskussion .....	52
5. Ergebnisse .....	52
5.1 Studie 1 .....	52
5.1.2 Schlussfolgerung.....	56
5.2 Studie 2 .....	57
5.2.1 Schlussfolgerung.....	59
5.3 Limitationen.....	59
5.4 Ausblick.....	59
VI. Zusammenfassung.....	61
VII. Summary.....	62
VIII. Literaturverzeichnis .....	64
IX. Publikationsverzeichnis .....	78
9.1 Zeitschriftenartikel / wissenschaftliche Beiträge.....	78
9.2 Vorträge .....	78
9.3 Poster .....	80
X. Danksagung .....	82
XI. Selbstständigkeitserklärung .....	83

**Abkürzungsverzeichnis**

<i>A. phagocytophilum</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
<i>A. platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>
ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>B. canis</i>	<i>Babesia canis</i>
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CGA	canine granulozytäre Anaplasrose
CKD	chronische Nierenerkrankung
CRP	C- reaktives Protein
DIC	dissiminierte intravasale Koagulopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. equi</i>	<i>Ehrlichia equi</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et.al	et alii bzw. aliae
FU	Freie Universität
HGA	humane granulozytäre Anaplasrose
HGE	humane granulozytäre Ehrlichiose
HL-60	human promyelocytic leukemia Zelllinie
HMEC-1	human microvascular endothelial Zelllinie
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>I. pacificus</i>	<i>Ixodes pacificus</i>
<i>I. persulcatus</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>
<i>I. scapularis</i>	<i>Ixodes scapularis</i>
IFAT	indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest
IHA	immunhämolytische Anämie

ITP	immunbedingte Thrombozytopenie
k.A.	keine Angabe
LR- PLT	leukozytenreduzierte Thrombozyten
LR- EK	leukozytenreduziertes Erythrozytenkonzentrat
m	männlich
MVEC	microvascular endothelial cells
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PT	Prothrombinzeit
16S rRNA	16 Svedberg ribosomale Ribonukleinsäure
s. l.	sensu lato
sog.	sogenannte
spp.	species pluralis
Tab.	Tabelle
Tc	Thrombozyten
THP-1	de novo AML (akute myeloische Leukämie) Zelllinie
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	vor allem
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel

## I. Einleitung

Die canine granulozytäre Anaplasiose (CGA) ist eine vektor-übertragene Erkrankung, die zunehmend an Bedeutung gewinnt. Hervorgerufen wird die Erkrankung durch den Erreger *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*), einem gram negativen Bakterium, welches von Zecken der Gattung *Ixodes* übertragen wird. Es befällt v.a. neutrophile Granulozyten und bildet in diesen Einschlusskörperchen, sog. Morulae. Es wurde bei verschiedenen Tierarten und beim Menschen nachgewiesen und kann zu schweren Symptomen führen (Dumler et al., 2001). Eine perinatale Übertragung beim Menschen (Horowitz et al., 1998) und eine transplazentare Übertragung bei Rindern (Pusterla et al., 1997; Henniger et al., 2013) sind ebenso möglich. Des Weiteren kann der Erreger über Blut übertragen werden und stellt somit ein Risiko bei Bluttransfusionen dar. Beim Menschen wurde schon häufiger von transfusionsübertragenen Fällen berichtet, beim Hund ist, neben experimentellen Infektionen, ein Fallbericht bekannt (Kohn, 2010; Fine et al., 2015).

Bisher wurden nur Studien und Fallberichte zur caninen granulozytäre Anaplasiose mit geringeren Fallzahlen veröffentlicht (Greig et al., 1996; Poitout et al., 2005; Jensen et al., 2007; Schaarschmidt-Kiener und Müller, 2007; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009; Eberts et al., 2011; Ravnik et al., 2011). Koinfektionen mit weiteren Erregern wurden nicht immer ausgeschlossen.

Ziel dieser Studien war es zum einen, das Krankheitsbild der caninen granulozytären Anaplasiose anhand einer großen Fallzahl zu beschreiben. Dazu wurden die Krankenakten von natürlich mit *A. phagocytophilum* infizierten Hunden im Hinblick auf Anamnese, Klinik, Laborwertveränderungen sowie Therapie und Verlauf der Erkrankung retrospektiv ausgewertet, wobei Koinfektionen bestmöglich ausgeschlossen wurden. Zum anderen sollte das Risiko einer Ansteckung über Bluttransfusionen untersucht werden. Dazu wurden die Ergebnisse aller PCR-Untersuchungen auf *A. phagocytophilum* von Hunden, die zwischen 2006 und 2012 zum Blutspenden in der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin vorgestellt wurden, sowie ihre klinischen und labordiagnostischen Daten retrospektiv ausgewertet.

## II. Literaturübersicht

### 1. *Anaplasma phagocytophilum*: Erreger der granulozytären Anaplasmosis

*A. phagocytophilum* ist ein obligat intrazelluläres Bakterium der Familie *Anaplasmataceae* (Gattung: *Anaplasma*, Ordnung: *Rickettsiales*). Es ist pleomorph, gram-negativ, obligat aerob und unbeweglich (Dumler et al., 2001).

Der Erreger wurde zuerst 1932 in Leukozyten von Schafen aus Schottland entdeckt und bekam den Namen *Ehrlichia phagocytophila* (Gordon et al., 1932). Später wurde der Erreger als Auslöser des „tick-borne fevers“ bei anderen Hauswiederkäuern beschrieben und als ursächliches Agens des Weidefiebers bei Rindern identifiziert (Hudson, 1950; Woldehiwet, 1983). 1969 wurde der Erreger erstmals bei Pferden in Californien als Verursacher der equinen granulozytären Ehrlichiose nachgewiesen. Er bekam den Namen *Ehrlichia equi* (Gribble, 1969). Die canine granulozytäre Anaplasmosis, verursacht durch einen *E. equi* ähnlichen Erreger (heute: *A. phagocytophilum*), wurde erstmalig 1982 in den USA beschrieben (Madewell und Gribble, 1982). Es folgten zahlreiche Berichte aus Europa und den USA.

Die humane granulozytäre Anaplasmosis (HGA), früher als humane granulozytäre Ehrlichiose bezeichnet, wurde 1994 in den USA entdeckt (Chen et al., 1994). Bis zu diesem Zeitpunkt ging man davon aus, dass sich die Erkrankung auf frei lebende Haustiere beschränkt (Woldehiwet, 2010).

Mehrere Tatsachen weckten das Interesse, diese Erreger weitergehend zu untersuchen. Zum einen das Vermögen, sich in neutrophilen Granulozyten vermehren zu können, zum anderen schien der Erreger der HGA mit dem Erreger des Weidefiebers und der equinen granulozytären Ehrlichiose verwandt zu sein (Chen et al., 1994; Greig et al., 1996; Dumler et al., 2001).

Dies führte schlussendlich dazu, dass, basierend auf molekularbiologischen Untersuchungen, die Spezies *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* und das HGE-Agens (humane granulozytäre Ehrlichiose) aufgrund von Ergebnissen der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens unter dem Namen *A. phagocytophilum* zusammengefasst wurden (Dumler et al., 2001).

Beim Hund wurden fünf verschiedene genetische Varianten identifiziert, die sich in ein bis zwei Nukleotiden in den 16S rRNA-Gensequenzen unterscheiden (Poitout et al., 2005). Es ist noch ungeklärt, inwiefern die genetischen Varianten die Pathogenität unterschiedlicher *A. phagocytophilum*-Stämme beeinflussen (Silaghi et al., 2011a). Bei Rehwild in Europa wurden

verschiedene pathogene und apathogene Varianten nachgewiesen (Silaghi et al., 2011b; Overzier et al., 2013). Neben wilden Wiederkäuern, kleinen Nagetieren und Insektenfressern wurde *A. phagocytophilum*-DNA bei vielen anderen Wirbeltieren isoliert. Ob diese Tiere zum endemischen Zyklus beitragen, ist derzeit noch unklar (Stuen et al., 2013).

### 1.1 Pathogenese

Der Lebenszyklus von Anaplasmen bezieht Wirbeltiere und Zecken mit ein und der Erreger kann sich in beiden vermehren. Saugt die Zecke am Wirt, so treten *Anaplasma* spp. in das Epithel des Mitteldarms der Zecke über, wo die erste Replikation stattfindet. Anschließend migrieren die Erreger in das Epithel der Speicheldrüse der Zecke, dem Ort der zweiten Replikation, von dem sie in den Speichel der Zecke gelangen, wenn diese am nächsten Wirt saugt (Ueti et al., 2009).

*A. phagocytophilum* befällt bei Säugetieren vorwiegend neutrophile, seltener eosinophile Granulozyten und wurde auch in Monozyten nachgewiesen (Woldehiwet, 2010).

Der Erreger haftet sich an sialierten Liganden, wie P-Selektin Glycoprotein Ligand-1 und Tetrasaccharid Sialyl Lewis X auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten an und dringt durch rezeptormediierte Endozytose in die Zelle ein (Goodman et al., 1999; Herron et al., 2000; Rikihisa, 2006; Greig und Armstrong, 2012). In der Zelle vermehrt er sich in membrangebundenen Vesikeln und bildet dabei sog. Morulae (Popov et al., 1998; Ismail et al., 2010). Rupturiert die Membran der Wirtszelle, so wird der Erreger frei und kann weitere Zellen und Organe infizieren (Bjöersdorff, 2005; Greig und Armstrong, 2012). *A. phagocytophilum* schafft es über verschiedene Mechanismen, seine eigene Abwehr durch neutrophile Granulozyten zu stören und somit sein Überleben und seine Replikation zu sichern. Zum Beispiel sind die Bakterien in der Lage, die Produktion von Superoxiden in den Granulozyten zu hemmen, welche einen wesentlichen Teil zur Abwehr beitragen. Dafür blockieren sie eine bestimmte Anordnung des Enzyms NADPH-Oxidase auf der Zellmembran und entschärfen somit das Superoxidanion (Rikihisa, 2006; Greig und Armstrong, 2012). Andere Mechanismen sind unter anderem eine Beeinträchtigung der Motilität und der Phagozytoseaktivität der Granulozyten sowie eine Verminderung ihrer Fähigkeit zur Adhärenz an Endothelien und zur Transmigration (Dumler et al., 2005). Ebenfalls sind sie in der Lage, durch Aktivierung der Anti-Apoptose-Kaskade, die Apoptose zu verzögern (Sarkar et al., 2012). Dadurch können sich die Erreger über einen längeren Zeitraum vermehren. Außerdem ist *A. phagocytophilum* in der Lage, humane CD34+Knochenmarkszellen, Endothelzellen und Zellen der Megakaryozytenreihe zu infizieren (Granick et al., 2008).

Diese Zellen können also als mögliches Reservoir für eine Übertragung auf neutrophile Granulozyten des peripheren Blutes dienen.

## 1.2 Übertragung

*A. phagocytophilum* ist weltweit verbreitet und wird von Zecken der Familie *Ixodidae* übertragen: *I. ricinus* in Europa (Blanco und Oteo, 2002), *I. scapularis* und *I. pacificus* in den USA (Bakken und Dumler, 2000) sowie *I. persulcatus* und *Dermacentor silvarum* in Asien und Russland (Richter et al., 1996; Cao et al., 2000).

Es sind zahlreiche Studien über die Prävalenz des Erregers in Zecken veröffentlicht (Baumgarten et al., 1999; von Loewenich et al., 2003; Silaghi et al., 2008). In Europa beträgt die Prävalenz je nach Region zwischen 1 % - ca. 20% (Stuen et al., 2013), in Deutschland (Tab. 1) bis zu 17,4 %. In den USA beträgt die Prävalenz je nach Region und Vektor bis zu 50 %, in Asien bis zu 21,6 % und in Russland 2,5 %-16,7 %.

Tabelle 1: Prävalenz von *A. phagocytophilum* in adulten Zecken und Nymphen der Gattung *I. ricinus* in unterschiedlichen Regionen Deutschlands (\* keine Angabe, \*\*nur Nymphen, \*\*\* nur Adulte)

<b>Autor</b>	<b>Region</b>	<b>Prävalenz in % (Methode: PCR)</b>
Fingerle et al. (1999)	Süddeutschland	1,6
Oehme et al. (2002)	Bodensee Rems Murr Ortenau	2,6* 3,1* 2,7*
Hildebrandt et al. (2002)	Thüringen	2,3
Hartelt et al. (2004)	Süddeutschland	1,0
Pichon et al. (2006)	Umland Berlin	3,9**
Silaghi et al. (2008)	Bayern	2,9

Hildebrandt et al. (2010)	Thüringen	5,4
Schicht et al. (2011)	Hannover	3,2
Schorn et al. (2011)	Bayern	9,0
Richter und Matuschka (2012)	Nord,- Mittel- und Süddeutschland	4,1***
Silaghi et al. (2012)	Leipzig	8,7
	Bayern	9,4
	Saarland	17,4
Overzier et al. (2013)	Süddeutschland	5,3

Damit es zu einer Übertragung des Erregers kommen kann, muss die Zecke 24 - 48 Stunden am Wirt saugen (Hodzic et al., 1998; Katavolos et al., 1998; des Vignes et al., 2001). Andere Übertragungswege, perinatal bei Menschen und transplazentar bei Kühen, sind beschrieben (Pusterla et al., 1997; Horowitz et al., 1998; Henniger et al., 2013). Eine Übertragung über infiziertes Blut ist möglich und wurde experimentell bei Kühen und Hunden beschrieben (Pusterla und Braun; 1997; Egenvall et al., 1998; Wardrop et al., 2016). Es ist ein Fall einer transfusionsübertragenen Anaplasrose beim Hund bekannt (Kohn, 2010). Dieser wird näher im Kapitel 2.2.7 erörtert.

## 2. Die granulozytäre Anaplasrose

Die granulozytäre Anaplasrose, hervorgerufen durch den Erreger *A. phagocytophilum*, ist eine weltweit verbreitete vektor-übertragene Erkrankung, die sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin weltweit zu den „emerging diseases“ zählt (Parola, 2004).

### 2.1 Die humane granulozytäre Anaplasrose

Die humane granulozytäre Anaplasrose ist eine fieberhafte Erkrankung die mild und selbstlimitierend bis schwer verlaufen kann (Dahlgren et al., 2011; Bakken und Dumler, 2015). Die Hauptsymptome beim Menschen sind Fieber, das bei 100% der Patienten vorkommt, Unwohlsein (im Median 97%), Kopf- und Gliederschmerzen (im Median 82 %),

Myalgien (im Median 76 %), seltener kommen Anorexie, Nausea oder Gelenkschmerzen (im Median 39 % - 56 %) vor (Bakken und Dumler, 2015). Typische Laborwertveränderungen sind Thrombozytopenie (im Median 75 %), Leukopenie (im Median 55 %) mit Linksverschiebung und eine milde Erhöhung der Leber-Transaminasen (im Median 83 %) (Bakken et al., 2001; Bakken und Dumler, 2006; Wormser, 2016).

## **2.2 Die canine granulozytäre Anaplasiose**

### **2.2.1 Klinik**

Die canine granulozytäre Anaplasiose (CGA) ist eine vektor-übertragene Infektionserkrankung, die unterschiedliche Verläufe annehmen kann. Zum einen kann sie akut verlaufen, zum anderen sind asymptomatische Infektionen (Foley et al., 2001; Beall et al., 2008; Nair et al., 2016) möglich. Persistierende Infektionen mit *A. phagocytophilum* (siehe Kapitel 2.2.6) wurden bei Hunden, Schafen und Pferden experimentell beschrieben (Egenvall et al., 2000; Stuen und Bergstrom, 2001; Franzen et al., 2009; Moroff et al., 2014). Kommt es zu einer Erkrankung, so kommen insbesondere unspezifische Symptome wie Apathie und Fieber vor (Greig et al., 1996; Poitout et al., 2005; Jensen et al., 2007; Schaarschmidt-Kiener und Müller, 2007; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009; Ravnik et al., 2011). Lahmheiten können ebenfalls auftreten (Poitout et al., 2005; Schaarschmidt-Kiener und Müller, 2007; Beall et al., 2008; Granick et al., 2009; Eberts et al., 2011; Ravnik et al., 2011). Respiratorische Symptome wie Husten, eine leicht angestrenzte Atmung und eine erhöhte Atemfrequenz (Poitout et al., 2005; Granick et al., 2009; Mazepa et al., 2010), neurologische Symptome wie epileptiforme Anfälle (Ravnik et al., 2011), Ataxie, Zittern, Anfallsleiden (Schaarschmidt-Kiener et al., 2007) und Symptome wie Vomitus, Diarrhoe, Polydipsie und Polyurie wurden bisher nur vereinzelt beschrieben (Poitout et al., 2005; Cockwill et al., 2009; Granick et al., 2009; Ravnik et al., 2011; Dondi et al., 2014). Eine milde Lymphadenopathie sowie eine Splenomegalie können ebenfalls bei der klinischen Untersuchung auffallen (Greig et al., 1996; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009) (Tab. 2).

In einem Fallbericht wurde ein 20 Wochen alter Welpe mit einem Abdominalerguss beschrieben, bei dem Morulae in Leukozyten des Ergusses nachgewiesen wurden (Kane et al., 2011). Allerdings wurden keine Morulae im peripheren Blut gefunden.

Ein weiterer Fallbericht berichtete über einen Hund mit unspezifischen Symptomen wie Lethargie, Inappetenz, Fieber und gefüllten Gelenken, der eine ITP und IHA entwickelte.

Dieser Hund sprach nicht auf eine Therapie an und wurde euthanasiert (Bexfield et al., 2005). Bei einem weiteren Hund mit Verdacht auf Pankreatitis konnte *A. phagocytophilum*-DNA nachgewiesen werden. Allerdings bleibt unklar, ob ein Zusammenhang zwischen der Anaplasiose und der Pankreatitis besteht (Arsenault und Messick, 2005).

Bei 4 von 12 Hunden mit unklaren Hautläsionen, die nach der Gabe von Doxycyclin abheilten, konnte *A. phagocytophilum*-DNA in den Läsionen nachgewiesen werden. Diese Hunde waren seropositiv für den Erreger, zeigten aber, bis auf zwei Hunde mit Thrombozytopenie und Anämie, keine weiteren klinischen Befunde einer CGA (Berzina et al., 2014).

Tabelle 2: Zusammenfassung häufiger klinischer Befunde einer CGA in verschiedenen Studien in %  
(k.A.= keine Angabe, \*PCR und Serologie positiv, \*\* PCR positiv, Serologie negativ)

	<b>Lethargie/ Apathie</b>	<b>Fieber</b>	<b>Anorexie/ Inappetenz</b>	<b>Lahmheit</b>	<b>Spleno- megalie</b>	<b>Respiratorische Befunde</b>	<b>Lymphadeno- pathie</b>	<b>Neurologische Befunde</b>	<b>Gastrointestinale Befunde</b>
Greig et al. 1996 (17 Hunde)	88	88	k.A.	6	13	k.A.	13	13	k.A.
Poitout et al. 2005 (8 Hunde)	87	100	87	62	k.A.	50	0	0	k.A.
Jensen et al. 2007 (49 Hunde)	67	47	33	16	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Schaarschmidt- Kiener et al. 2007 (39 Hunde*, 12 Hunde**)	71* 70**	67* 60**	54* 40**	75* 30**	50* 20**	k.A.	71* 20**	67* 90**	29* 40**

Literaturübersicht

---

Kohn et al. 2008 (18 Hunde)	94	61	83	11	94	6	k.A.	k.A.	17
Granick et. al 2009 (34 Hunde)	74	84	62	32	12	6	32	k.A.	33
Ravnik et al. 2011 (20 Hunde)	93	93	93	33	k.A.	7	k.A.	0	20
Eberts et al. 2011 (18 Hunde)	72	89	k.A.	56	k.A.	k.A.	6	11	6

### 2.2.2 Laborwertveränderungen

Typische Laborwertveränderungen (Tab. 3) sind eine Thrombozytopenie, welche bei etwa 90 % der Hunde vorkommt (Greig et al., 1996; Poitout et al., 2005; Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009; Ravnik et al., 2009; Mazepa et al., 2010; Eberts et al., 2011; Dondi et al., 2014) und Anämie (Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2008; Eberts et al., 2011). Eine Leukopenie oder eine Leukozytose können auftreten (Greig et al., 1996; Poitout et al., 2005; Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2008; Eberts et al., 2011), wobei eine Leukozytenzahl im unteren Referenzbereich häufiger vorkommt als eine Leukozytose. Eine Monozytose wurde in 2 Studien beschrieben (Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2008), eine Lymphopenie kann ebenfalls vorkommen (Poitout et al., 2005; Kohn et al., 2008; Eberts et al., 2011). Bei den klinisch-chemischen Parametern liegt häufig eine Erhöhung der Aktivität des Leberenzym alkalische Phosphatase vor (Greig et al., 1996; Poitout et al., 2005; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009). Eine milde Hypoalbuminämie kann vorkommen (Greig et al., 1996; Jensen et al., 2007; Schaarschmidt-Kiener und Müller 2007; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009).

In zwei Fallbeispielen wurde von einer Erhöhung der Pankreasenzyme Lipase und Amylase berichtet (Arsenault und Messick, 2005; Cockwill et al., 2009). Gerinnungsparameter wurden in wenigen Studien und Fallberichten untersucht, dabei fiel lediglich eine milde Verlängerung der aPTT bei 6/10 und bei jeweils 1/3 Hunden auf (Kohn et al., 2008; Cockwill et al., 2009; Granick et al., 2009). 3/10 Hunden hatten eine verlängerte PT (Kohn et al., 2008). Eine Azotämie wurde bisher nur vereinzelt beschrieben (Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2008).

Das Vorhandensein thrombozytengebundener Antikörper wurde in einer Studie bei 6 von 10 Hunden mit Thrombozytopenie nachgewiesen (Kohn et al., 2008). Ein direkter Coombs-Test zum Nachweis erythrozytengebundener Antikörper bei anämischen Hunden mit CGA wurde bei 9 Hunden in einer Studie untersucht und war bei allen Hunden negativ (Kohn et al., 2008). In einem Fallbericht wurden bei einem Hund mit Anämie, Thrombozytopenie und positivem PCR-Ergebnis für *A. phagocytophilum*-DNA thrombozytengebundene Antikörper und eine positive Erythrozytenagglutination nachgewiesen (Bexfield et al., 2005). In einer weiteren Studie war der direkte Coombs-Test bei 2 von 4 Hunden mit Anämie und Morulae im Blut positiv (Goldmann et al., 1998). In einer anderen Studie konnte bei 3 von 26 seropositiven Hunden eine IHA diagnostiziert werden. Allerdings erfolgte bei diesen Hunden kein direkter Erregernachweis (Mazepa et al., 2010).

In einigen Studien wurden Urinproben untersucht. Der auffälligste Befund war der Nachweis einer Proteinurie bei 3/8 Hunden, bei 2/13 Hunden, bei 1/8 Hunden und bei 4/15 Hunden

(Greig et al., 1996; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009; Mazepa et al., 2010). In einer Studie wurden bei 8 Hunden weitere Parameter im Harn untersucht (Kohn et al., 2008). Dazu gehörten die Bestimmung des spezifischen Gewichts (1008-1049, Median 1023), eine Untersuchung mittels Harnteststreifen und ein Harnsediment. Die Befunde waren unspezifisch (vereinzelt Kristalle, Epithelien und Zylinder).

Die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) als Entzündungsmarker einer akuten Anaplasrose wurde beim Menschen beschrieben (Bakken, 1998). Bei drei Hunden wurde CRP gemessen, welches in allen drei Fällen stark erhöht war (Pantchev, 2010).

Eine Studie beschäftigte sich mit Serum-Eiweiß-Profilen, zirkulierenden Immunkomplexen und dem Vorhandensein einer Proteinurie bei Hunden mit CGA (Ravnik et al., 2014). Bei den untersuchten Hunden bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen Thrombozytopenie und Hypoalbuminämie, Hypo- $\alpha$ 1-globulinämie und Hypergammaglobulinämie. Auch die Menge zirkulierender Immunkomplexe unterschied sich nicht statistisch signifikant zur Kontrollgruppe. Eine Proteinurie konnte nur bei IFAT-positiven Hunden nachgewiesen werden, kein Hund mit einer positiven *A. phagocytophilum*-PCR hatte eine Proteinurie.

Tabelle 3: Häufige hämatologische Laborwertveränderungen bei Hunden mit CGA in verschiedenen Studien in %

(k.A.= keine Angabe; \*PCR und Serologie positiv, \*\* PCR positiv, Serologie negativ)

	<b>Thrombozytopenie</b>	<b>Anämie</b>	<b>Leukozytose</b>	<b>Leukopenie</b>	<b>Lymphopenie</b>	<b>Monozytose</b>
Greig et al. 1996 (15 Hunde)	86	20	7	20	k.A.	k.A.
Poitout et al. 2005 (8 Hunde)	87	37	0	62	100	0
Jensen et al. 2007 (49 Hunde)	100	67	33	17	17	17

Schaarschmidt-Kiener et al. 2007 (39 Hunde*,12 Hunde**)	87* 75**	62* 50**	k.A.	64* 67**	k.A.	k.A.
Kohn et al. 2008 (18 Hunde)	89	56	22	28	50	39
Granick et al. 2009 (34 Hunde)	95	47	19	9	65	k.A.
Ravnik et al. 2009 (481 Hunde IFAT +, 20 Hunde PCR+)	71	16,8	20,8	9,5	k.A.	k.A.
Eberts et al. 2011 (18 Hunde)	94	67	0	55	39	6
Kirtz et al. 2015 (57 Hunde)	98,2	15,8	12,3	35,1	66,7	5,7

### **2.2.3 Pathologische Befunde**

Pathologische Befunde wurden bei einigen Hunden erhoben. In einer Studie mit 7 experimentell infizierten Hunden wurde makroskopisch eine gering- bis mittelgradige Splenomegalie festgestellt (Egenvall et al., 1998). Mikroskopisch wurde eine reaktive Hyperplasie der roten Milzpulpa diagnostiziert, die Leber wies vereinzelt hepatozelluläre Apoptose auf und in vielen Geweben wurden wenige lymphohistiozytäre perivaskuläre Infiltrate gefunden. In einer weiteren experimentellen Studie zählten milde entzündliche Veränderungen des Lungengewebes sowie periportal in der Leber und eine milde lymphoide Hyperplasie der Milz zu den Veränderungen (Nair et al., 2016).

### **2.2.4 Diagnose**

Zum Nachweis des Erregers können direkte und indirekte Nachweisverfahren herangezogen werden.

#### **2.2.4.1 Direkte Nachweismethoden**

Der direkte Erregernachweis mittels real-time PCR ist die sicherste Methode (Courtney et al., 2004; Bakken und Dumler, 2006). Als Untersuchungsmaterial eignet sich EDTA-Blut, welches vor Therapiebeginn gewonnen werden sollte (Greig und Armstrong, 2006). Der DNA-Nachweis aus dem Buffy-Coat, aus Milzgewebe oder aus Knochenmark ist ebenfalls möglich (Egenvall et al., 2000). Ein Nachweis des Erregers mittels PCR aus EDTA-Blut ist bereits 2 Tage post infectionem möglich (Scorpio et al., 2011). In einer anderen Studie konnte der Erreger erstmalig drei Tage nach parenteraler Inokulation nachgewiesen werden. Der Erregernachweis gelang in dieser Studie bei zwei Hunden bis Tag 105 nach Inokulation (Moroff et al., 2014).

Eine weitere direkte Nachweismethode ist der lichtmikroskopische Nachweis von Morulae im Blutausschlag. Diese Nachweismethode ist weniger sensitiv als die PCR. Morulae sind nur im akuten Stadium einer Infektion sichtbar und nicht jede Infektion muss mit nachweisbaren Morulae einhergehen. In einer experimentellen Studie konnten bei allen untersuchten Hunden (n=7) Morulae 4 bis 14 Tage nach Inokulation für insgesamt 4 bis 8 Tage nachgewiesen werden. Einer dieser Hunde hatte eine positive PCR für den Erreger 8 Tage bevor Morulae nachweisbar waren (Egenvall et al., 1998). In einer anderen Studie waren Morulae an Tag 10 bis 11 post infectionem nachweisbar (Scorpio et al., 2011). In einer Studie mit natürlich

infizierten Hunden hatten 17 von 18 Hunden nachweisbare Morulae (Eberts et al., 2011). In einer weiteren Studie wurden Morulae nur bei 2 von 7 PCR positiven Hunden nachgewiesen (Jensen et al., 2007).

Elektronenmikroskopische und immunhistochemische Nachweise des Erregers wurden ebenfalls beschrieben (Rikihisa, 1991; Lepidi et al., 2000).

Die Anzucht von *A. phagocytophilum* in HL-60-Zelllinien (human promyelocytic leukemia cell lines) ist möglich, aber sehr aufwendig. Sie benötigt meist mehrere Wochen (Goodman et al., 1996; Greig und Armstrong, 2006). Es wurde auch von anderen möglichen Zelllinien zur Anzucht berichtet. Dazu gehören Zellen der humanen Monozyten THP-1 (ATCC TIB-202) und Endothelien der Reihe HMEC-1 und MVEC, bovine Cornea-Zelllinien BCE C/D1-b (ATCC CRL-2048) und das Rhesusaffen-Retinachoroid-Endothel RF/6A (ATCC CRL-1780) (Munderloh et al., 2004; Garcia-Garcia et al., 2009).

#### **2.2.4.2 Indirekte Nachweismethoden**

Eine häufig angewendete indirekte Nachweismethode ist der Nachweis von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* mittels Immunfluoreszenztest (IFAT) oder ELISA. Allerdings ist die Seroprävalenz in vielen Regionen hoch und die Serologie beweist zunächst nur eine Exposition des Hundes und nicht, dass dieser akut an Anaplasmosen erkrankt ist (Tab. 4). Im frühen Stadium einer Infektion sind noch keine Antikörper nachweisbar (Greig et al., 1996; Poitout et al., 2005; Eberts et al., 2011). Diese konnten in experimentellen Studien erstmals 10 - 22 Tage post infectionem mittels IFAT nachgewiesen werden (Egenvall et al., 1998; Scorpio et al., 2011; Moroff et al., 2014). Ein 4-facher Titeranstieg innerhalb von 2 - 4 Wochen kann zur Diagnosestellung herangezogen werden (Greig und Armstrong 2012; Sainz et al., 2015). Dies wurde auch experimentell in einer Studie gezeigt, bei der ein Titeranstieg 2 - 3 Wochen post infectionem und ein Abfall des Antikörpertiters 4 - 8 Monate später gezeigt werden konnte (Scorpio et al., 2011). Die Bestimmung eines einzelnen Antikörpertiters reicht, ungeachtet seiner Höhe, wegen der hohen Seroprävalenz der häufig klinisch inapparent verlaufenden Infektionen nicht zur Diagnosestellung (Kohn et al., 2011). Ein weiteres Problem bei der Diagnosestellung mittels IFAT stellen mögliche Kreuzreaktionen mit anderen eng verwandten Rickettsien, wie *A. platys*, dar (Inokuma et al., 2001). Dies spielt besonders bei aus dem Ausland importierten Hunden eine Rolle.

Tabelle 4: *A. phagocytophilum*-DNA- und Seroprävalenzen beim Hund (\*zufällig ausgewählte/gesunde Hunde, \*\*kranke und gesunde Hunde, \*\*\*kranke Hunde, \*\*\*\*keine Angabe, \*\*\*\*\*Dirofilarien positive Hunde)

<b>Autor</b>	<b>Land</b>	<b>Anzahl der untersuchten Hunde</b>	<b>Methode</b>	<b>Prävalenz in %</b>
Barutzki et al. (2006)	Deutschland	1124***	IFAT	50,1
Jensen et al. (2007)	Deutschland	111**	IFAT PCR	43,2 6,3
Schaarschmidt-Kiener et al. (2007)	Deutschland	245*	IFAT	19,2
Krupka et al. (2008)	Deutschland	5881*****	Snap 4Dx ELISA	21,5
Kohn et al. (2011)	Deutschland	522**	IFAT PCR	43 5,7
Barth et al. (2012)	Deutschland	448*	Snap 4Dx ELISA	19,4
Preiß-Jägeler et al. (2016)	Deutschland	171* (Berner Sennenhunde) 57*	IFAT	50,3 24,6
Shaw et al. (2005)	England	120**	PCR	0,8
Crawford et al. (2013)	England	262*	PCR	0
Kirtz et al. (2007)	Österreich	1470*****	IFAT	56,5
Pusterla et al. (1998)	Schweiz	996**	IFAT	7,5
Alberti et al. (2005)	Italien	50**	PCR	7,5

Ebani et al. (2008)	Italien	1232****	IFAT	8,76
Torina et al. (2008)	Italien	46****	PCR	2,8 – 21,7 (einzelne mehrfach beprobt)
Pennisi et al. (2012)	Italien	249*	IFAT	38
Ebani et al. (2013)	Italien	215*	IFAT	14,8
Ebani et al. (2014)	Italien	1965*	IFAT	4,68
Vascellari et al. (2016)	Italien	258*	PCR	0
Solano-Galego et al. (2006)	Spanien	466**	IFAT	11,5
Amusategui et al. (2008)	Spanien	649**	IFAT	15,6
Couto et al. (2010)	Spanien	131**	Snap 4Dx ELISA	19
Miro et al. (2013)	Spanien	1100**	Snap 4Dx ELISA	3,1
Santos et al. (2009)	Portugal	55***	IFAT	55
Pantchev et al. (2009)	Frankreich	919****	Snap 4Dx ELISA	2,7
Egenvall et al. (2000)	Schweden	611*	IFAT	17,7
Jäderlund et al. (2007)	Schweden	248***	IFAT	20,7
Perez et al. (2014)	Finnland	340*	Snap 4Dx ELISA	5,3

Zygner et al. (2009)	Polen	408****	PCR	0,5
Rymaszewska et al. (2011)	Polen	242**	PCR	5,4
Krämer et al. (2014)	Polen	3094*	Snap 4Dx ELISA	12,31
Dzięgiel et al. (2016)	Polen	400*	Snap 4Dx ELISA PCR	8,0 2,75
Kybicova et al. (2009)	Tschechien	296**	IFAT PCR	26 3,4
Mircean et al. (2012)	Rumänien	1146*	Snap 4Dx ELISA	5,5
Andersson et al. (2017)	Rumänien	96***	PCR	0
Farkas et al. (2014)	Ungarn	1305*	Snap 4Dx ELISA	7,9
Pantchev et al. (2015)	Bulgarien	167**	Snap 4Dx ELISA	46,1
Levi et al. (2006)	Israel	195*	IFAT	9
Azzag et al. (2015)	Algerien	213**	IFAT	47,7
Hamel et al. (2009)	Albanien	30*	IFAT	40
Drazenovich et al. (2006)	USA	97****	PCR	7
Henn et al. (2007)	USA	184*	PCR	7,6
Beall et al. (2008)	USA	222* 51***	PCR	3 37
Bowman et al. (2009)	USA	479640****	Snap 4Dx ELISA	4,8

Carrade et al. (2011)	USA	2431*	ELISA	2,4
Balakrishnan et al. (2014)	USA	118*	PCR	0
Quorllo et al. (2014)	Nordamerika	6582****	Snap 4Dx ELISA	3,4
McCown et al. (2014)	Kolumbien	498****	Snap 4Dx ELISA	33
Movilla et al. (2016)	Mexico	1706**	Snap 4Dx ELISA	16,4
Montenegro et al. (2017)	Costa Rica	314*	Snap 4Dx ELISA	6,1
Suh et al. (2017)	Korea	532**** 440****	Snap 4Dx ELISA PCR	15,6 2,3
Cui et al. (2017)	China	243*	PCR	1,6

### 2.2.5 Therapie

Die Therapie der CGA erfolgt in der Regel mit Doxycyclin 5 mg/kg 2 x täglich oder 10 mg/kg 1 x täglich über 2 - 3 Wochen (Kirtz et al., 2007; Ebani et al., 2013; Sainz et al., 2015). Bei schweren Verläufen ist zusätzlich eine symptomatische Therapie notwendig. Chloramphenicol wird als Alternative bei Welpen empfohlen (Greig und Armstrong, 2012). In der Humanmedizin wurde nach alternativen Therapien für Patienten mit Unverträglichkeiten gegen Tetrazykline gesucht, und es konnte in vitro nachgewiesen werden, dass Rifampicin und Levofloxacin ebenfalls wirksam gegen den Erreger sind (Horowitz et al., 2001; Maurin et al., 2003). Die meisten Hunde zeigen eine Besserung der Symptome nach Beginn der Antibiotikatherapie innerhalb von 24 - 48 Stunden und die Prognose ist gut (Kohn et al., 2008; Eberts et al., 2011). Alle Hunde vorangegangener Studien, in denen ein Verlauf der Erkrankung dokumentiert war, erholten sich (Greig et al., 1996; Poitout et al., 2005; Jensen et al., 2007; Kohn et al. 2008; Granick et al., 2009; Eberts et al., 2011). Der Einsatz von Glukokortikoiden ist bei immun-medierten Komplikationen wie ITP, IHA und Polyarthritits gerechtfertigt, muss aber mit besonderer Vorsicht geschehen (Sainz et al., 2015).

### 2.2.6 Verlauf

Chronische Verläufe der Erkrankung sind bisher klinisch nicht beschrieben. In einer Studie wurde nach Therapie mit Doxycyclin bei 14/18 Hunden erneut mittels PCR auf *A. phagocytophilum*-DNA getestet. Die PCR war bei allen Hunden negativ (Kohn et al., 2008). Persistierende Infektionen mit *A. phagocytophilum* wurden experimentell bei Hunden und bei Schafen und Pferden beschrieben. In einer Studie konnte Erreger-DNA nach Immunsuppression, bei zwei Hunden mit zuvor negativem PCR Ergebnis, bis zu 6 Monate nach Inokulation nachgewiesen werden (Egenvall et al., 2000). In einer weiteren Studie konnte Erreger-DNA bei zwei Hunden noch 105 Tage nach Inokulation nachgewiesen werden (Moroff et al., 2014). Keiner dieser Hunde hatte Symptome einer CGA, bei allen war der Erregernachweis nach Therapie mit Doxycyclin negativ. In einer Studie, in der zwei Hunde mit einem humanen Isolat intravenös inokuliert wurden, konnte nach einer Therapie mit Doxycyclin und darauf folgender Immunsuppression erneut Erreger-DNA nachgewiesen werden. Diese Hunde waren zu keinem Zeitpunkt der Studie krank oder zeigten Abnormalitäten der Laborwerte (Alleman et al., 2006). Bei vier *A. phagocytophilum* seropositiven Hunden mit unklaren Hautläsionen, die sich unter einer Therapie mit Doxycyclin besserten, konnte *A. phagocytophilum*-DNA in den Läsionen nachgewiesen werden. All diese Hunde hatten jedoch keine typischen Symptome einer CGA (Berzina et al., 2014).

### 2.2.7 Bedeutung für die Transfusionsmedizin

In der Humanmedizin sind, im Gegensatz zur Veterinärmedizin, mehrere Fälle einer Übertragung von *A. phagocytophilum* über Blutprodukte beschrieben (Eastlund et al., 1999; Kemperman, 2008; Annen et al., 2012; Jereb et al., 2012; Alhumaidan et al., 2013; Townsend et al., 2014; Fine et al., 2015; Shields et al., 2015). Die meisten Fallberichte stammen aus den USA, ein Fallbericht aus Europa (Slowenien). Patienten unterschiedlichen Alters mit verschiedenen Grunderkrankungen erhielten Blutprodukte während ihres Krankenhausaufenthaltes und entwickelten anschließend Symptome einer granulozytären Anaplasiose. Da eine Zeckenexposition unwahrscheinlich war, wurde eine transfusionsbedingte Übertragung vermutet und zum größten Teil durch einen Erregernachweis im Blut des Spenders bestätigt. Die Fälle sind in Tab. 5 zusammengefasst. Beim Hund ist ein Fallbericht einer transfusionsübertragenen Anaplasiose bekannt (Kohn, 2010). Es handelte sich dabei um einen Hund mit Hämangiosarkom nach Splenektomie, welcher zum Zeitpunkt der Transfusion unter Chemotherapie stand. Beide, Spender und

Empfänger, waren PCR positiv für *A. phagocytophilum*. Der Spender, ein dreijähriger Huskyrüde, war klinisch gesund und die Laborwerte waren vor der Blutspende im Referenzbereich.

Tabelle 5: Zusammenfassung von Fällen einer granulozytären Anaplasiose nach Bluttransfusionen beim Menschen

m=männlich; w=weiblich; CKD=chronische Nierenerkrankung; Tc=Thrombozyten; DIC=dissimilierte intravasale Koagulopathie; ↑=erhöht; EK=Erythrozytenkonzentrat; LR-EK=leukozytenreduziertes Erythrozytenkonzentrat; LR- PLT=leukozytenreduzierte Thrombozyten; PCR=Polymerasekettenreaktion; IFAT=Immunfluoreszenztest; +=positiv; \* =vermutet)

	<b>Eastlund et al. 1999</b>	<b>Kempermann et al. 2007</b>	<b>Annen et al. 2012</b>	<b>Annen et al. 2012</b>	<b>Jereb et al. 2012</b>	<b>Alhumidan et.al 2013</b>	<b>Townsend et al. 2014</b>	<b>Shields et al. 2015</b>	<b>Fine et al. 2015</b>
Land	USA	USA	USA	USA	Slowenien	USA	USA	USA	USA
Alter in Jahren	75	68	81	51	36	64	41	34	78
Geschlecht	m	m	w	w	w	m	m	w	w
Vorerkrankung	rheumatoide Arthritis	Spondylitis Steroidtherapie CKD	rheumatoide Arthritis Steroidtherapie	multiples Myelom CKD Sinusitis	Kaiserschnitt	Gastritis Eisenmangelanämie	Schussverletzung	β- Thalassämie	Bypass-Operation
Erhaltene Blutkomponente	EK	RBC	LR-EK	LR-EK *	LR-EK	LR-EK	LR-PLT *	LR-EK	LR-PLT

Literaturübersicht

Symptome	Fieber Nausea	Fieber	Fieber Myalgie	Fieber Schüttelfrost Müdigkeit	Fieber resp. Symptome	Fieber Schüttelfrost Kopfschmerzen Husten Dyspnoe	Fieber	Fieber Nausea	Fieber Schüttelfrost Husten Dyspnoe
Labor	Anämie	Tc penie	Panzytopenie DIC	Panzytopenie Leberenzyme ↑	Tc penie Leberenzyme ↑	Anämie Leukopenie	Tc penie	Panzytopenie Leberenzyme ↑	Panzytopenie Leberenzyme ↑ Kreatinin↑
Erregernachweis- Methode des Spenders	IFAT +	PCR+ IFAT +	PCR+ IFAT+	nicht identifiziert	PCR+ IFAT+	PCR+ EIA+	PCR+ EIA+	PCR+	PCR+ EIA+
Erregernachweis- Methode des Empfänger	PCR+ IFAT+	PCR+ IFAT+	PCR+	PCR+	PCR+ IFAT+	PCR+	PCR+	PCR+ IFAT+	PCR+ IFAT+

Serologische Studien beim Menschen zeigen eine Prävalenz des Erregers bei Blutspendern zwischen 0,5 % und 21,4 %. Bei Menschen mit nachgewiesener Zeckenexposition beträgt die Seroprävalenz 4,5 %-7,5 %, Risikogruppen weisen eine Seroprävalenz von ca. 14 % auf (Tab. 6).

Tabelle 6: Seroprävalenz von *A. phagocytophilum* beim Menschen

<b>Autor</b>	<b>Land</b>	<b>Population</b>	<b>Methode</b>	<b>Seroprävalenz (%)</b>
Aguero-Rosenfeld et al. (2002)	USA	Blutspender	IFAT	11,3
Leiby et al. (2002)	USA (Wisconsin) USA (Connecticut)	Blutspender	IFAT	0,5 3,5
Grzeszczuk et al. (2004)	Polen	Blutspender	IFAT	2
Santos et al. (2006)	Portugal	Blutspender	IFAT Western Blot	3
Walder et al. (2003)	Österreich	Blutspender	IFAT	9
Chochlakakis et al. (2008)	Griechenland	Blutspender	IFAT	21,4
Woessner et al. (2001)	Deutschland	Soldaten	IFAT	14,9

Fingerle et al. (1997)	Deutschland	Waldarbeiter	IFAT	14
Kowalski et al. (2006)	Deutschland	Patienten mit nachgewiesenem Zeckenbiss	IFAT	4,5
von Wissmann et al. (2015)	Deutschland	Patienten mit nachgewiesenem Zeckenbiss	IFAT	7,5

Die Seroprävalenzen des Erregers bei Hunden, wie in Tab. 4 zusammengefasst, sind je nach Land und Region sehr unterschiedlich und betragen bis zu 56,5 % (Österreich) (Kirtz et al., 2007).

Bei gesunden Hunden in Berlin/Brandenburg, die keine Symptome einer CGA zeigten, konnte bei 3,78 % Erreger DNA mittels PCR nachgewiesen werden (Kohn et al., 2011).

In Deutschland sind bisher keine Studien zur Prävalenz von *A. phagocytophilum* bei gesunden Blutspenderhunden veröffentlicht.

In einer Studie aus England und in einer weiteren Studie aus dem Osten der USA, bei denen nach Erreger-DNA bei gesunden Blutspenderhunden gesucht wurde, konnte diese bei keinem untersuchten Hund nachgewiesen werden (Crawford et al., 2013; Balakrishnan et al., 2014). Auch der Nachweis von Antikörpern mittels ELISA (Snap 4DX®, IDEXX) war in der Blutspenderpopulation negativ (Balakrishnan et al., 2014). In Italien wurde bei gesunden Blutspenderhunden eine Seroprävalenz von 4,7 % für *A. phagocytophilum* festgestellt. Alle diese Hunde hatten ein negatives PCR-Ergebnis und keine nachweisbaren Morulae im Blutausschrieb (Vascellari et al., 2016).

Folgt man den Richtlinien des ACVIM Consensus Statements von 2016 zum Screening von Blutspendern auf Infektionserreger (Wardrop et al., 2016), so wird eine jährliche Testung auf *A. phagocytophilum* in endemischen Gebieten empfohlen. Im optimalen Fall werden nur Hunde zur Blutspende ausgewählt, die sowohl seronegativ als auch PCR-negativ für den Erreger sind. Als Mindestanforderung gilt ein negativer direkter Erregernachweis jährlich. Die in Deutschland unter der Leitung des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit erarbeiteten Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und

Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich von 2011 ([www.bmel.de/DE/Tier/Tiergesundheit/Tierarzneimittel/\\_texte/LeitlinienBlut.html](http://www.bmel.de/DE/Tier/Tiergesundheit/Tierarzneimittel/_texte/LeitlinienBlut.html))

empfehlen neben der klinischen Untersuchung und einer Reihe von Standarduntersuchungen die Untersuchung aller Blutspender in endemischen Gebieten auf *A. phagocytophilum* mittels PCR unmittelbar mit der Erstspende und anschließend jährlich.

Da Infektionen mit *A. phagocytophilum* klinisch inapparent verlaufen können, der Erreger in Berlin/Brandenburg endemisch und die Seroprävalenz hoch ist, werden alle Blutspender der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin vor jeder Blutspende auf *A. phagocytophilum*-DNA mittels PCR untersucht.

**III. Studie 1: Granulocytic Anaplasmosis in 63 Dogs: Clinical Signs, Laboratory Results, Therapy and Course of Disease**

Journal of Small Animal Practice

DOI 10.1111/jsap.12787

Erhalten am: 22.01.2017

Angenommen am: 28.09.2017

Veröffentlicht am: 24.11.2017

You have to purchase this part online.

<https://doi.org/10.1111/jsap.12787>

**IV Studie 2: Vorkommen von *Anaplasma phagocytophilum* bei Blutspenderhunden in Berlin/Brandenburg (2006–2012): retrospektive Auswertung klinischer Daten und Bedeutung für die Transfusionsmedizin**

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift

DOI 10.2376/0005-9366-17005

Eingegangen am: 09.01.2017

Angenommen am: 19.04.2017

Veröffentlicht am: 23.10.2017

<http://vetline.de/facharchiv/158/3222>

You have to purchase this part online.

<https://vetline.de/vorkommen-von-anaplasma-phagocytophilum-bei-blutspenderhunden-in-berlin-brandenburg-20062012-retrospektive-auswertung-klinischer-daten-und-bedeutung-fuer-die-transfusionsmedizin/150/3130/105042/>

## V. Diskussion

Diese Arbeit umfasst zwei Studien, die sich mit der Klinik der caninen granulozytären Anaplasrose bzw. der Bedeutung des Erregers *Anaplasma phagocytophilum* für die Transfusionsmedizin beschäftigen. In der ersten Studie „Granulocytic Anaplasmosis in 63 Dogs: Clinical Signs, Laboratory Results, Therapy and Course of Disease“ wurden retrospektiv Krankenakten von Hunden, die an caniner granulozytärer Anaplasrose erkrankt waren und die Symptome, die Laborwertveränderungen sowie die Therapie und der Verlauf der Erkrankung beschrieben. In der zweiten Studie „Vorkommen von *Anaplasma phagocytophilum* bei Blutspenderhunden in Berlin/Brandenburg (2006–2012): retrospektive Auswertung klinischer Daten und Bedeutung für die Transfusionsmedizin“ wurden 917 EDTA-Blutproben von 517 verschiedenen Blutspenderhunden mittels PCR auf das Vorhandensein von *A. phagocytophilum*-DNA mittels PCR getestet und die Ergebnisse der klinischen Untersuchung und der Laboruntersuchungen, die vor jeder Blutspende stattfinden, ausgewertet.

### 5. Ergebnisse

#### 5.1 Studie 1

In die Studie wurden, im Gegensatz zu vorangegangenen Studien, nur Hunde eingeschlossen, bei denen der direkte Erregernachweis mittels PCR positiv war und bei denen mögliche Koinfektionen mit anderen in Frage kommenden Erregern weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

Der Erregernachweis mittels PCR zählt zu den sichersten Nachweismethoden. Die Bestimmung eines einzelnen Antikörpertiters reicht, besonders in Gebieten mit hoher Seroprävalenz, nicht zur Diagnosestellung aus (Jäderlund et al., 2007; Jensen et al., 2007; Kohn et al., 2008). Außerdem können zu Beginn einer Infektion noch keine Antikörper nachweisbar sein (Egenvall et al., 1998; Scorpio et al., 2011), und die Höhe des Antikörpertiters korreliert nicht mit dem Auftreten klinischer Symptome (Ravnik et al., 2011). Ein 4-facher Titeranstieg im Abstand von 2 - 4 Wochen kann ebenfalls zur Diagnostik einer Infektion herangezogen werden (Sainz et al., 2015).

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Nachweis einer Exposition oder Infektion mit vektorübertragenen Erregern durch die Kombination aus molekularen und serologischen

Nachweisverfahren erhöht werden kann. Es wurden Serum- und EDTA-Blutproben von gesunden Hunden (n=30) und Hunden, bei denen der Verdacht auf eine vektorübertragenen Erkrankung bestand (n=69), parallel mit serologischen und molekularen Methoden auf das Vorhandensein zehn verschiedener vektorübertragener Erreger getestet. Die molekulare Prävalenz betrug je nach Erreger 23,3 % - 39,1 %, die serologische Prävalenz 43,3 % - 59,4 %. Die parallele Anwendung beider Verfahren führte in 4 % - 58 % dazu, dass Pathogene erkannt wurden, die bei der Verwendung nur eines Verfahrens nicht nachgewiesen werden konnten (Maggi et al., 2014).

Koinfektionen, z.B. mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato, können klinische Symptome verschlimmern und die Diagnosestellung erschweren (Beall et al, 2008; De Tommassi et al., 2013). In einer Studie hatten 3 % der Hunde, die seropositiv für *B. burgdorferi* s. l. waren, auch Antikörper gegen *A. phagocytophium* (Krupka et al., 2007). Liegt eine Koinfektion mit *B. burgdorferi* s. l. und *A. phagocytophilum* vor, so ist das Risiko höher, Symptome wie Fieber, Lethargie und Gelenkschmerzen zu entwickeln (Beall et al., 2008). Experimentelle Studien an Mäusen haben bereits gezeigt, dass die Ausprägung klinischer Symptome bei mit Borrelien und Anaplasmen koinfizierten Tieren schwerer war, als bei Infektionen mit nur einem der beiden Erreger (Zeidner et al., 2000; Thomas et al., 2001). Bei koinfizierten Mäusen konnten verminderte Interleukin-12, Gamma-Interferon und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Werte und erhöhte Interleukin-6-Werte im Serum nachgewiesen werden. Außerdem ist bei einer Doppelinfektion die Expression der Gamma-Interferon-Rezeptoren auf den Makrophagen reduziert, was zu einer Abnahme der Phagozytoseaktivität führt. Diese Tatsachen wirken sich auf das Immunsystem des Wirtes aus und führen zu einer höheren Bakterienlast (Thomas et al., 2001). Auch beim Menschen wurde eine schlimmere Ausprägung der Erkrankung beobachtet, wenn sie mit *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. parallel infiziert waren (Nadelman et al. 1997, Krause et al. 2002). Daher sollten mindestens Koinfektion mit Erregern, die den gleichen Vektor aufweisen, ausgeschlossen werden.

Die meisten Hunde dieser Studie erkrankten in den Monaten Mai bis August. Eine Saisonalität, in Abhängigkeit von der Aktivität der Vektoren, konnte bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden (Greig et al., 1996; Poitout et al., 2005; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009).

Eine Alters- oder Geschlechtsdisposition konnte in dieser Studie nicht ermittelt werden. Hunde der Rasse Golden Retriever waren häufiger an einer CGA erkrankt als andere Rassen. Auffallend war, dass sogar einmalig zwei Hunde dieser Rasse aus einem Haushalt im Abstand

von neun Monaten an einer CGA erkrankten. Bereits in einer Studie aus Minnesota waren der Golden Retriever und der Labrador Retriever die am häufigsten betroffene Hunderasse (Beall et al., 2008). Eine serologische Studie aus Österreich zeigte eine Prädisposition für Berner Sennenhunde (Kirtz et al., 2007). Berner Sennenhunde haben auch, verglichen mit anderen Rassen, eine höhere Serorävalenz für *B. burgdorferi* s. l. (Gerber et al., 2007). Die Rasseverteilung könnte ebenfalls auf die unterschiedlich starke Popularität sowie das unterschiedliche Spaziergeverhalten verschiedener Hunderassen zurückzuführen sein.

Zu den Hauptsymptomen der an CGA erkrankten Hunde dieser Studie zählten Apathie und reduziertes Allgemeinbefinden (83 %), Fieber (67 %) und Inappetenz (63 %), was mit Ergebnissen früherer Studien vergleichbar ist (Greig et al., 1996; Poitout et al., 2005; Jensen et al., 2007; Schaarschmidt-Kiener und Müller, 2007; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009; Ravnik et al., 2011). Zu den selteneren Symptomen an CGA erkrankter Hunde dieser Studie zählten Lahmheiten und unspezifische gastrointestinale Symptome sowie Polydipsie und Polyurie. Lahmheiten wurden in vorangegangenen Studien zum Teil häufiger beschrieben. Dies könnte zum einen am mangelnden Ausschluss möglicher Koinfektionen oder an der genetischen Variabilität des Erregers in verschiedenen Regionen liegen. Obwohl sich die unterschiedlichen genetischen Varianten nur in 1 - 3 Nukleotidsequenzen auf dem 16S rRNA Gen unterscheiden, ist bekannt, dass biologische und ökologische Unterschiede einschließlich unterschiedlicher Wirtspathogenität, Vektoren und geographischer Verteilung vorliegen (Massung et al., 2002). Bei Schafen konnten verschiedene genetische Varianten unterschiedlicher Pathogenität nachgewiesen werden (Stuen et al., 2003). Beim Hund konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob die verschiedenen genetischen Varianten des Erregers zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen führen (Silaghi et al., 2011).

Typische Laborwertveränderungen dieser Studie waren Thrombozytopenie (86 %), oft begleitet von einer Anämie (70 %) sowie eine Erhöhung der Aktivität bestimmter Lebertransaminasen und einer Hyperbilirubinämie (77 %), ebenso wie eine Hypoalbuminämie (62 %). Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen vorangegangener Studien überein (Poitout et al., 2005; Schaarschmidt-Kiener und Müller, 2007; Beall et al., 2008; Kohn et al., 2008; Granick et al., 2009; Eberts et al., 2011; Ravnik et al., 2011).

Eine Besonderheit dieser Studie stellte die Bestimmung thrombozytengebundener Antikörper bei Hunden mit Thrombozytopenie dar, die bei 16 von 36 Hunden (44 %) nachgewiesen werden konnten. Der Nachweis solcher Antikörper wurde bisher nur in einer Studie an weniger Hunden beschrieben und in einem Fallbericht beschrieben (Bexfield et al., 2005; Kohn et al., 2008). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Entstehung einer

Thrombozytopenie bei Hunden mit CGA sekundär immunbedingt sein kann. Es ist bekannt, dass andere vektorübertragene Erreger wie Ehrlichien, Babesien und Bartonellen sekundär immunvermittelte Erkrankungen auslösen können (Farwell et al., 1982; Grindem et al., 1999; Goodman et al., 2005). In einer Studie mit 42 Hunden aus Südkalifornien mit Symptomen einer immun-medierten Erkrankung wie Fieber unklarer Genese, Anämie, Thrombozytopenie, Polyarthritiden, Epistaxis, Proteinurie, Myalgie sowie okulären und neurologischen Symptomen wurden bei 33 % vektorübertragene Erreger nachgewiesen. Dazu gehörten: *Ehrlichia* spp, *A. phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia rickettsii*, *Babesia* spp, *Bartonella* spp, *Mycoplasma* spp (Kidd et al., 2017).

Weitere Gründe für die Entstehung einer Thrombozytopenie sind zum einen ein erhöhter Verbrauch aufgrund einer DIC, die Sequestrierung in der vergrößerten Milz, und die Produktion inhibitorischer Faktoren (Waner et al., 1995; Wong und Thomas, 1998). Es wurde gezeigt, dass *A. phagocytophilum* keine direkte Wirkung auf Megakaryozyten hat und somit eine Störung der Thrombozytenproduktion eine unwahrscheinliche Ursache für die Thrombozytopenie ist (Granick et al., 2008). Außerdem konnten bei 4 von 17 Hunden mit Anämie antierythrozytäre Antikörper mittels direktem Coombs-Test nachgewiesen werden. Antierthrozytäre Antikörper konnten in einer experimentellen Studie bei drei Hunden mit Anämie nachgewiesen werden (Goldman et al., 1998) und in einer klinischen Studie bei weiteren drei Hunden (Kohn et al., 2008). Die Bedeutung einer immunvermittelten Erythrozytenzerstörung im Rahmen einer CGA ist noch unklar.

Eine weitere Besonderheit dieser Studie war der direkte Nachweis von *A. phagocytophilum*-DNA aus Synovia bei 2 von 3 Hunden mit Gelenkschmerzen und Polyarthritiden. Dieses wurde, unseres Wissens nach, bisher noch nicht beschrieben. Borrelien lassen sich auch mittels PCR aus Synovia nachweisen, allerdings kommt es wegen der niedrigen Bakterienlast oft zu falsch negativen Ergebnissen und die Methode wird daher nicht für das Untersuchungsmaterial Synovia empfohlen (Krupka und Straubinger, 2010). Eine Vielzahl von anderen vektorübertragenen und nicht-vektorübertragenen Erregern kann sekundär immunmedierte Polyarthritiden auslösen. Zu den häufigsten in den USA gehören: *B. burgdorferi* s. l., *E. canis*, *Bartonella* spp, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia rickettsii* sowie auch *A. phagocytophilum*. Diese Erreger sind meistens zytologisch in der Synovia nicht sichtbar (Goldstein und Lappin, 2013). In endemischen Gebieten können auch Leishmanien der Auslöser einer Polyarthritiden sein. Diese Erreger können aber im Vergleich zu den oben genannten Pathogenen mikroskopisch in der Synovia nachgewiesen werden (Sbrana et al., 2014).

In einer Studie bei Hunden mit septischer Arthritis konnte gezeigt werden, dass sich die PCR gut zum Nachweis bakterieller Erreger eignet. Die Spezifität und Sensitivität der Methode unterscheidet sich nicht signifikant gegenüber der kulturellen Anzucht (Scharf et al., 2015). Die Ergebnisse einer weiteren Studie zeigten, dass die Anzucht von Bakterien aus Synovia einen geringen Wert hat und eine effektivere Methode zum Einsatz kommen muss (Scharf et al., 2015a). Um die Effektivität des Nachweises von *A. phagocytophilum* aus Synovia bei Hunden mit CGA zu beurteilen, sind weitere Studien nötig.

Patienten mit CGA können wie zuvor erwähnt sekundär immunvermittelte Krankheiten wie IHA, ITP und Polyarthritiden entwickeln. In diesen Fällen ist eine zusätzliche Therapie mit Glukokortikoiden gerechtfertigt. Auch bei Hunden, die an sekundärer IHA als Folge einer Babesieninfektion leiden, wird Prednisolon als zusätzliche Therapie eingesetzt, der Einsatz immunsuppressiver Medikamente ist aber umstritten (Solano-Gallego et al., 2016). Die Gabe von Prednisolon bei Hunden mit CGA wurde bereits vereinzelt beschrieben. In einer Studie aus Minnesota besserten sich die Lahmheiten bei einigen Hunden mit CGA erst, als der Therapie mit Doxycyclin nicht-steroidale Antiphlogistika oder Prednisolon hinzugefügt wurden. Es ist jedoch unklar, ob diese Hunde nur mit *A. phagocytophilum* oder nicht noch zusätzlich mit *Borrelia burgdorferi sensu lato* infiziert waren (Beall et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde bei zwei Hunden mit Verdacht auf ITP sowie bei einem Hund mit Polyarthritiden Prednisolon eingesetzt, welches nach einsetzender Besserung ausgeschlichen wurde (Kohn et al., 2008). In unserer Studie wurden bei 16 Hunden zusätzlich Glukokortikoide eingesetzt, da zu Beginn der Therapie unklar war, ob ihre Symptome primär oder sekundär immunbedingt waren.

### **5.1.2 Schlussfolgerung**

Bei Hunden, die mit unspezifischen Symptomen wie Apathie, Inappetenz, Fieber und Gelenkschmerzen sowie Laborwertveränderungen wie Thrombozytopenie vorstellig werden und bei denen eine Zeckenexposition nicht ausgeschlossen werden kann, sollte die CGA als Differentialdiagnose in Betracht gezogen werden. Die Diagnose sollte direkt mittels PCR aus EDTA-Blut erfolgen, da ein Nachweis von Morulae weniger sensitiv ist. Der Nachweis eines einzelnen Antikörpertiters ist zur Diagnosesicherung unzureichend. Bei Hunden mit Polyarthritiden kann die Untersuchung der Synovia auf *A. phagocytophilum*-DNA hilfreich sein. Die Prognose der CGA ist nach der Behandlung mit Doxycyclin für 2 - 3 Wochen gut. In Fällen mit immunvermittelten Komplikationen kann die Verabreichung von Prednisolon gerechtfertigt sein.

## 5.2 Studie 2

In dieser Studie wurden 517 verschiedene Blutspenderhunde untersucht. Die Prävalenz des Erregers bezogen auf die Anzahl der untersuchten Hunde betrug 4,06 %, bezogen auf die Anzahl untersuchter Blutproben 2,3 %. Bisher wurden nur wenige Studien zur Prävalenz von *A. phagocytophilum* bei Blutspenderhunden veröffentlicht. In den USA wurde mittels ELISA und PCR und in England mittels PCR kein Vorkommen des Erregers nachgewiesen (Crawford et al., 2013; Balakrishnan et al., 2014). In einer früheren Untersuchung bei gesunden Hunden im Raum Berlin/Brandenburg betrug die Seroprävalenz 39,8 %, ein Vorkommen von Erreger-DNA in dieser Region wurde mittels PCR bei 3,78 % von 264 gesunden Hunden nachgewiesen (Kohn et al., 2011).

Die in unserer Studie zur Blutspende vorstellig gewordenen Hunde hatten alle keine Anzeichen einer akuten Erkrankung. Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung sowie der Laboruntersuchungen, die vor jeder Blutspende erfolgten, waren mild ausgeprägt und unterschieden sich nicht statistisch signifikant zwischen den positiv und den negativ getesteten Hunden. Dies bedeutet, dass 4,06 % aller untersuchten Blutspenderhunde mit dem Erreger der CGA, *A. phagocytophilum* infiziert waren, ohne offensichtliche Symptome zu entwickeln. Das unterstreicht die Ergebnisse früherer Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Infektionen mit *A. phagocytophilum* klinisch inapparent verlaufen können (Foley et al., 2001; Jensen et al., 2007; Beall et al., 2008; Kohn et al., 2011; Moroff et al., 2014). Nicht alle Hunde dieser Studie wurden nach Erhalt des positiven PCR-Ergebnisses mit Doxycyclin behandelt. Drei dieser Hunde wurden erneut zur Blutspende vorstellig. Bei keinem dieser Hunde konnte erneut Erreger-DNA nachgewiesen werden. Der Erreger scheint also trotz ausbleibender Therapie aus dem Blut eliminiert worden zu sein. Experimentelle Studien haben gezeigt werden, dass *A. phagocytophilum* zu persistierenden Infektionen führen kann. In diesen Studien hatten die Hunde erneut positive PCR-Ergebnisse nach Glukokortikoidgabe (Egenvall et al., 2000; Alleman et al., 2006). Die Tatsachen, dass es sich bei *A. phagocytophilum* um ein intrazelluläres Bakterium handelt, welches in neutrophilen Granulozyten im Blut zirkuliert und dass eine Infektion mit dem Erreger unbemerkt verlaufen kann, erhöhen das Risiko einer Übertragung über Bluttransfusionen. Außerdem ist der Erreger in der Lage, in gekühltem Blut einige Zeit zu überleben (Proctor und Leiby, 2015). In einer Studie aus der Humanmedizin wurde untersucht, ob der Einsatz von Leukozytenfiltern eine Übertragung von *A. phagocytophilum* reduzieren kann. Dabei wurden Leukozyten mit dem Erreger infiziert und der Einfluss des Filters durch einen Erregernachweis mittels PCR und kultureller Anzucht aus den infizierten Bluteinheiten untersucht. Die Studie kam zu dem

Ergebnis, dass der Einsatz von Leukozytenfiltern bei Transfusionen das Risiko nur reduzieren, aber nicht eliminieren kann (Proctor und Leiby, 2015). Solche Filter werden in den in der Veterinärmedizin gängigen Blutentnahmesystemen bisher üblicherweise nicht eingesetzt. Weitere Verfahren zur Reduzierung der Erregerübertragung aus Vollblutkonserven und Erythrozytenkonzentraten wie z.B. der Einsatz von UV-Licht oder Riboflavin werden zur Zeit noch erforscht (Salunkhe et al., 2015; Yonemura et al., 2017). Andere bekannte intrazelluläre vektorübertragene Erreger waren bis vor kurzem in unserer Region nicht endemisch. 2015 wurden jedoch 4 Fälle autochthoner Babesiose beim Hund diagnostiziert (Weingart et al., 2017). Der Erreger *Babesia canis* wird von Zecken der Gattung *Dermacentor reticulatus* übertragen, deren Dichte in Berlin/Brandenburg zugenommen hat. Die Erkrankung verläuft in der Regel akut, mit milden bis schweren Allgemeinsymptomen bis hin zum Multiorganversagen (Solano-Gallego et al., 2016). Subklinische Infektionen sind ebenfalls möglich (Birkenheuer et al., 2003). Eine Übertragung über Bluttransfusionen beim Hund ist beschrieben (Freeman et al., 1994) und ein Screening der Blutspender wird in endemischen Gebieten empfohlen (Reine, 2004).

In der Humanmedizin sind mehrere transfusionsbedingte Infektionen mit *A. phagocytophilum* bekannt (Eastlund et al., 1999; Kemperman, 2008; Bachowski, 2009; Annen et al., 2012; Jereb et al., 2012; Alhumaidan et al., 2013; Townsend et al., 2014; Fine et al., 2015; Shields et al., 2015). Beim Hund ist die Übertragung experimentell bewiesen (Egenvall et al., 1998; Wardrop et al., 2016) und es ist ein Fall beim Hund aus der Klinik beschrieben (Kohn, 2010). Richtet man sich nach den Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich von 2011, so wird unter anderem die Untersuchung auf *A. phagocytophilum* mittels PCR in endemischen Gebieten jährlich empfohlen (Feige et al., 2011). Auch die Richtlinien des ACVIM Consensus Statements von 2016 zum Screening von Blutspendern auf Infektionserreger sprechen diese Empfehlung aus. Eine weitere Empfehlung der Richtlinie ist die Auswahl seronegativer Hunde als Blutspender. Dies ist aber besonders in Regionen mit hoher Seroprävalenz und wegen des hohen finanziellen Aufwandes nur schwer möglich. In unserer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass ein nahezu normales Blutbild eine Bakteriämie nicht ausschließt, was eine Untersuchung aller Blutspender auf *A. phagocytophilum*-DNA erfordert. Im optimalen Fall wird das Blut eines jeden Blutspenderhundes vor jeder Blutspende mittels PCR auf das Vorhandensein von *A. phagocytophilum*-DNA getestet. Das gewonnene Erythrozytenkonzentrat sollte erst nach Erhalt des negativen Ergebnisses weiterverabreicht werden. Da die Untersuchung auf Erreger-DNA aber einige Zeit in Anspruch nimmt und kein

Schnelltest zur Verfügung steht, ist das in Notfallsituationen nicht immer möglich. In dieser Studie wurden drei Hunde beschrieben, die in Notfallsituationen positiv getestetes Blut erhielten. Soweit nachverfolgbar, entwickelte keiner dieser Hunde Symptome einer CGA, allerdings wurden alle drei bereits wegen ihrer Grunderkrankung mit Doxycyclin behandelt. Da die Empfänger der infizierten Erythrozytenkonzentrate nicht mittels PCR auf das Vorhandensein von *A. phagocytophilum*-DNA nach der Transfusion getestet wurden, bleibt die Frage einer möglichen Erregerübertragung unbeantwortet.

### **5.2.1 Schlussfolgerung**

In dieser Studie konnten keine Faktoren ermittelt werden, die bei gesunden Hunden hinweisend für eine Infektion mit *A. phagocytophilum* gewesen sein könnten. Daher wird empfohlen, alle Blutspender vor jeder Blutspende auf Erreger-DNA mittels PCR zu untersuchen. Das erlaubt, auch seropositive Hunde zur Blutspende zuzulassen.

### **5.3 Limitationen**

Zu den Limitationen beider Studien zählt ihr retrospektiver Charakter. Bei der Auswahl der Patienten der ersten Studie hätten gegebenenfalls Hunde mit selteneren, unbekanntem Symptomen übersehen werden können. Die Untersuchung der Hunde auf Koinfektionen erfolgte individuell je nach Vorbericht und Auslandsanamnese, es gab kein standardisiertes „Panel“. Außerdem wurden die Hunde nach der Therapie nicht erneut auf *A. phagocytophilum*-DNA untersucht, was keine Aussage zur Persistenz des Erregers zulässt.

### **5.4 Ausblick**

Betrachtet man die Ergebnisse beider Studien, so unterstreichen diese die zunehmende Bedeutung vektorübertragener Erreger. Es sind weitere Studien notwendig, um die Bedeutung von *A. phagocytophilum* als Trigger bei immunvermittelten Erkrankungen wie ITP, IHA und Polyarthritiden in endemischen Gebieten zu untersuchen. Des Weiteren muss untersucht werden, inwieweit sich Synovia als Untersuchungsmaterial für die PCR-Untersuchung eignet.

Es konnte keine Aussage über die Persistenz des Erregers getroffen werden, da die Hunde nach Therapie nicht mittels PCR nachuntersucht wurden.

Im Hinblick auf die Untersuchungen der Blutspenderhunde muss überlegt werden, ob diese nicht zusätzlich zur Untersuchung auf *A. phagocytophilum* auf *B. canis* getestet werden

sollten, da diese Infektionen in unserer Region durch die zunehmende Ausbreitung des Vektors zunehmen werden und der Erreger auch über Bluttransfusionen übertragbar ist.

## VI. Zusammenfassung

*A. phagocytophilum* ist ein gram negatives, obligat intrazelluläres Bakterium, welches hauptsächlich von Zecken der Gattung *Ixodes* übertragen wird. Es befällt vor allem neutrophile Granulozyten und ist unter anderem Auslöser der caninen granulozytären Anaplasmose.

Ziele der vorliegenden retrospektiven Studien waren 1) die Beschreibung der klinischen Symptome, der Laborwertveränderungen, der Therapie und der Verlaufes der CGA und 2) die Ermittlung des Vorkommens von *A. phagocytophilum* bei gesunden Blutspenderhunden und die Bedeutung des Erregers für die Transfusionsmedizin.

1) Im Untersuchungszeitraum 2006 bis 2012 wurden 974 Hunde mit in der Literatur beschriebenen Symptomen einer CGA in der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin vorstellig, von denen 72 Hunde ein positives PCR-Ergebnis für *A. phagocytophilum*-DNA hatten. 63 Hunde erfüllten die Einschlusskriterien und gingen in die Studie ein. Die Hauptsymptome der an CGA akut erkrankten Hunde waren Apathie und reduziertes Allgemeinbefinden (83 %), Fieber (67 %) und Inappetenz (63 %). Die häufigste Laborwertveränderung war Thrombozytopenie (86 %) gefolgt von erhöhten Leberenzymaktivitäten und Hyperbilirubinämie (77 %), Anämie (70 %), Hypoalbuminämie (62 %) und Leukozytose (27 %). 44 % von 36 getesteten Hunden mit Thrombozytopenie waren positiv für thrombozytengebundene Antikörper. 59 von 61 Hunden erholten sich, zwei Hunde verstarben (ein Hund an epileptischen Anfällen, ein weiterer an den Folgen einer immunhämolytischen Anämie), zwei Hunde konnten nicht nachuntersucht werden.

Bei Hunden, bei denen eine Zeckenexposition nicht ausgeschlossen werden kann, und die mit unspezifischen Symptomen wie Lethargie und Fieber und/oder Anzeichen einer immunmedierten Erkrankung vorstellig werden, sollte in endemischen Gebieten die CGA als Ursache in Betracht gezogen werden.

2) Insgesamt 917 EDTA-Blutproben von 517 Blutspenderhunden wurden im Untersuchungszeitraum 2006 bis 2012 mittels real-time PCR auf das Vorkommen von *A. phagocytophilum*-DNA getestet. 158 der Hunde spendeten mehrmals Blut und wurden somit mehrmals getestet (2 - 11 mal, Median 3). Bei 21 der 917 (2,3 %) Blutproben von 21 Blutspenderhunden war die PCR positiv, bezogen auf die Anzahl der Blutspenderhunde betrug die Prävalenz 4,06 %. Die positiven Ergebnisse fielen hauptsächlich in die Monate Juni (n=8), Mai (n=5) und Juli (n=3), kamen aber auch in fünf weiteren Monaten vor. Keiner

der getesteten Hunde war mehrfach positiv. Eine leicht erhöhte Rektaltemperatur ( $\geq 39,0$  °C) lag bei drei Hunden vor. Bei elf Hunden fielen geringgradige Laborwertveränderungen auf: Thrombozytopenie (n=3), Leukozytose (n=2), Leukopenie (n=2), Anämie (n=1), Hyperproteinämie (6 von 18 getesteten Hunden). Im Hinblick auf die Laborwertveränderungen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den PCR positiven und PCR negativen Blutproben.

Da 2,3 % der Blutproben gesunder Blutspenderhunde PCR-positiv für *A. phagocytophilum* waren, sollten alle Blutspender in endemischen Gebieten vor jeder Blutspende das ganze Jahr über auf das Vorkommen von *A. phagocytophilum*-DNA im Blut getestet werden.

## VII. Summary

### **Studies on *Anaplasma phagocytophilum* in dogs: clinical presentation of granulocytic anaplasmosis and significance for transfusion medicine**

*A. phagocytophilum* is an obligatory intracellular bacterium transmitted by various genera of *Ixodes* ticks. It infects neutrophils and is the causative agent of canine granulocytic anaplasmosis. The goals of the current retrospective studies were 1) to perform analysis of medical records of dogs naturally infected with *A. phagocytophilum*, focusing on clinical signs, laboratory results, therapy and course of disease and 2) to evaluate the occurrence *A. phagocytophilum* in healthy blood donor dogs and to estimate the significance for transfusion medicine.

1) Between 2006–2012 974 dogs with clinical signs suggestive for CGA were presented in the Clinic for Small Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin. A total of 72 dogs were PCR-positive, 63 of them fulfilled the inclusion criteria. The most common clinical signs were lethargy and reduced activity (83 %), fever (67 %), and inappetence (63 %). Thrombocytopenia was the most common laboratory abnormality (86 %), followed by increased liver enzymes activities and hyperbilirubinaemia (77 %), anaemia (70 %), hypoalbuminaemia (62 %) and leukocytosis (27 %). 44 % of 36 thrombocytopenic dogs tested for platelet-bound antibodies were positive. 59 of 61 dogs recovered, two dogs died (epileptic seizures, immune-mediated haemolytic anaemia) and two were lost for follow-up. In dogs presented with acute nonspecific clinical signs and/or immune – mediated disease, where tick exposure cannot be excluded, canine granulocytic anaplasmosis should be considered as a potential cause in areas where it is endemic.

2) Between 2006 - 2012 altogether 917 EDTA blood samples from 517 dogs were submitted for *A. phagocytophilum* real-time PCR testing. 158 dogs were tested several times (2 – 11 times, median 3). The PCR test was positive for 21 of the 917 blood samples (2.3 %). Referred to the number of blood donor dogs, the prevalence was 4.06 %. Positive results were most often detected in June (n=8), May (n=5), and July (n=3), but also in five other months. None of the dogs tested PCR positive more than once. In three of 21 dogs a mild increase in rectal temperature ( $\geq 39.0$  °C) was documented. Mild laboratory abnormalities were noted in eleven dogs: thrombocytopenia (n=3), leukocytosis (n=2), leukopenia (n=2), anemia (n=1) and hyperproteinemia (6 of 18 tested dogs). There was no significant difference between the PCR negative and positive blood samples with regard to laboratory abnormalities.

As altogether 2.3 % of blood samples from healthy canine blood donors were PCR positive for *A. phagocytophilum*, blood donors in endemic areas should be screened for *A. phagocytophilum*-DNA by PCR in blood samples all year round.

**VIII. Literaturverzeichnis**

**Alhumaidan H., Westley B., Esteva C., Berardi V., Young C., Sweeney J. (2013):** Transfusion-transmitted anaplasmosis from leukoreduced red blood cells.

Transfusion 53(1): 181-186

**Alleman A.R., Chandrashaker R., Beall M. (2006):** Experimental inoculation of dogs with a human isolate (Ny18) of *Anaplasma phagocytophilum* and demonstration of persistent infection following doxycycline therapy (abstract).

J Vet Intern Med 20:763

**Annen K., Friedman K., Eshoa C., Horowitz M., Gottschall J., Straus T (2012):** Two cases of transfusion-transmitted *Anaplasma phagocytophilum*.

Am J Clin Pathol 137(4): 562-565

**Arsenault W.G., Messick J.B. (2005):** Acute granulocytic ehrlichiosis in a rottweiler.

J Am Anim Hosp Assoc 41(5): 323-326

**Bachowski G., Kemperman M.M., Skeate R.C. (2009):** Transfusion- related *Babesia*: outbreak and investigations in the St. Paul, Minnesota Red Cross Region 2008 [abstract].

Transfusion 49: Suppl: 35A

**Bakken J.S. (1998):** The discovery of human granulocytotropic ehrlichiosis.

J Lab Clin Med 132: 175-180

**Bakken J.S., Aguerro-Rosenfeld M.E., Tilden R.L., Wormser G.P., Horowitz H.W., Raffalli J.T., Baluch M., Riddell D., Walls J.J., Dumler J.S. (2001):** Serial measurements of hematologic counts during the active phase of human granulocytic ehrlichiosis.

Clin Infect Dis 32: 862-870

**Bakken J.S., Dumler J.S. (2006):** Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis.

Ann N Y Acad Sci 1078: 236-247

**Bakken J.S., Dumler J.S. (2000):** Human granulocytic ehrlichiosis.

Clin Infect Dis 31: 554-560

**Balakrishnan N., Musulin S., Varanat M., Bradley J.M., Breitschwerdt E.B. (2014):** Serological and molecular prevalence of selected canine vector borne pathogens in blood donor candidates, clinically healthy volunteers, and stray dogs in North Carolina.

Parasit Vectors 24;7: 116

**Barutzki D. (2006):** Seroprävalenz der *Anaplasma-phagocytophilum*-Infektion bei Hunden in Deutschland.

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 119;7-8: 342-347

**Baumgarten B.U., Röllinghoff M., Bogdan C. (1999):** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic *ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany.

J Clin Microbiol 37: 3448-3451

**Beall M.J., Chandrashekar R., Eberts M.D., Cyr K.E., Diniz P.P., Mainville C., Hegarty B.C., Crawford J.M., Breitschwerdt E.B. (2008):** Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota.

Vector Borne Zoonotic Dis 8: 455-464

**Berzina I., Krudewig C., Silaghi C., Matise I., Ranka R., Muller N., Welle M. (2014):** *Anaplasma phagocytophilum* DNA amplified from lesional skin of seropositive dogs.

Ticks Tick Borne Dis 5(3): 329-35

**Bexfield N.H., Villiers E.J., Herrtage M.E. (2005):** Immune-mediated haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with *Anaplasma phagocytophilum* in a dog.

J Small Anim Pract 46: 543-548

**Birkenheuer A.J., Greene C., Silver S. (2003):** *Babesia gibsoni* infections in non-American Pit Bull Terriers.

Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine, Charlotte, USA, 2003, p. 927

**Bjöersdorff A. (2005):** *Ehrlichiosis and Anaplasmosis, Part 2: Anaplasma phagocytophilum comb. nov. Infection.*

Shaw S, Day M. (Hrsg.), Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat. Manson Publishing, London, p. 120-133

**Blanco J.R., Oteo J.A. (2002):** Human granulocytic ehrlichiosis in Europe.

Clin Microbiol Infect 8: 763-772

**Cao W.C., Zhao Q.M., Zhang P.H., Dumler J.S., Zhang X.T., Fang L.Q., Yang H. (2000):** Granulocytic *Ehrlichiae* in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic.

J Clin Microbiol 38: 4208-4210

**Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. (1994):** Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease.

J Clin Microbiol 32: 589-595

- Chirek A., Silaghi C., Pfister K., Kohn B. (2013):** Granulozytäre Anaplasmosose bei 63 Hunden (2006–2012): Klinische und labordiagnostische Befunde und Verlauf.  
Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere; 41(2), S. P05München, 2013, A21
- Cockwill K.R., Taylor S.M., Snead E.C., Dickinson R., Cosford K., Malek S., Lindsay L.R., Diniz P.P. (2009):** Granulocytic anaplasmosis in three dogs from Saskatoon, Saskatchewan.  
Can Vet J 50: 835-840
- Courtney J.W., Kostelnik L.M., Zeidner N.S., Massung R.F. (2004):** Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*.  
J Clin Microbiol 42: 3164-3168
- Crawford K., Walton J., Lewis D., Tasker S., Warman S.M. (2013):** Infectious agent screening in canine blood donors in the United Kingdom.  
J Small Anim Pract 54(8): 414-417
- des Vignes F., Piesman J., Heffernan R., Schulze T.L., Stafford K.C., 3rd, Fish D. (2001):** Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs.  
J Infect Dis 183: 773-778
- Dondi F., Russo S., Agnoli C., Mengoli N., Balboni A., Alberti A., Battilani M. (2014):** Clinicopathological and molecular findings in a case of canine *Anaplasma phagocytophilum* infection in Northern Italy.  
Scientific World Journal 2014: 810587
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. (2001):** Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*.  
Int J Syst Evol Microbiol 51: 2145-2165
- Dumler J.S., Choi K.S., Garcia-Garcia J.C., Barat N.S., Scorpio D.G., Garyu J.W., Grab D.J., Bakken J.S (2005):** Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*.  
Emerg Infect Dis 11: 1828-1834
- Eastlund T., Persing D., Mathiesen D. (1999):** Human granulocytic ehrlichiosis after red cell transfusion (abstract).

Transfusion 39(Suppl):117

**Ebani V.V., Bertelloni F., Turchi B., Cerri D. (2013):** Serological and molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Italian hunting dogs.

Ann Agric Environ Med 20: 289-292

**Eberts M.D., Vissotto de Paiva Diniz P.P., Beall M.J., Stillman B.A., Chandrashekar R., Breitschwerdt E.B. (2011):** Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs.

J Am Anim Hosp Assoc 47(6): 86-94

**Egenvall A., Bjöersdorff A., Lilliehöök I., Olsson Egenvall E., Karlstam E., Artursson K., Hedhammar A., Gunnarsson A. (1998):** Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate.

Vet Rec 143: 412-417

**Egenvall A., Lilliehöök I., Bjöersdorff A., Egenvall E.O., Karlstam E., Artursson K., Heldtander M., Gunnarsson A. (2000):** Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs.

Vet Rec 146: 186-190

**Farwell G.E., Le Grand E.K., Cobb C.C. (1982):** Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs.

J Am Vet Med Assoc 180: 507–511

**Feige K., Grabner A., Gyra H., Kohn B., Moritz A., Schlumbohm W., Schwarz C., Werner E. (2011):** Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.

**Fine A.B., Sweeney J.D., Nixon C.P., Knoll B.M. (2015):** Transfusion-transmitted anaplasmosis from a leukoreduced platelet pool.

Transfusion 56(3): 699-704

**Foley J.E., Foley P., Madigan J.E. (2001):** Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California.

Am J Vet Res 62: 1599-1605

**Franzen P., Aspan A., Egenvall A., Gunnarsson A., Karlstam E. & Pringle J. (2009):** Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection.

J Vet Intern Med 23, 636-642

- Freeman M.J., Kirby B.M., Panciera D.L., Henik R.A., Rosin E., Sullivan L.J. (1994):** Hypotensive shock syndrome associated with acute *Babesia canis* infection in a dog.  
J Am Vet Med Assoc. 204(1): 94-96
- Garcia-Garcia J.C., Barat N.C., Trembley S.J., Dumler J.S. (2009):** Epigenetic silencing of host cell defense genes enhances intracellular survival of the rickettsial pathogen *Anaplasma phagocytophilum*.  
PLoS Pathog 5: e1000488
- Gerber B., Eichenberger S., Wittenbrink M.M., Reusch C.E. (2007):** Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition.  
BMC Vet Res.12; 3: 1
- Goldman E.E., Breitschwerdt E.B., Grindem C.B., Hegarty B.C., Walls J.J., Dumler J.S. (1998):** Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia.  
J Vet Intern Med 12: 61-70
- Goldstein R. & Lappin M. (2013):** Infectious Causes of Polyarthritits in Dogs.  
In: Kirk's Current Veterinary Therapy XV. Bonagura J.D. und Twed D.C., (Hrsg.).  
Elsevier Saunders, St. Louis, Kap. 261
- Goodman J.L., Nelson C., Vitale B., Madigan J.E., Dumler J.S., Kurtti T.J., Munderloh U.G. (1996):** Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis.  
N Engl J Med 334: 209-215
- Goodman J.L., Nelson C.M., Klein M.B., Hayes S.F., Weston B.W. (1999):** Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand.  
J Clin Invest 103: 407-412
- Goodman R.A. & Breitschwerdt E.B. (2005):** Clinicopathologic findings in dogs seroreactive to *Bartonella henselae* antigens.  
Am J Vet Res 66: 2060–2064
- Gordon W.S., Brownlee A., Wilson D.R. (1932):** Tick-borne fever (a hitherto undescribed disease in sheep).  
J Comp Pathol Therap 65: 301-307
- Granick J.L., Armstrong P.J., Bender J.B. (2009):** *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007).  
J Am Vet Med Assoc 234: 1559-1565
- Granick J.L., Reneer D.V., Carlyon J.A., Borjesson D.L. (2008):** *Anaplasma phagocytophilum* infects cells of the megakaryocytic lineage through sialylated ligands but fails to alter platelet production.

J Med Microbiol 57: 416-423

**Greig B., Armstrong P.J. (2006):** *Canine Granulocytotropic Anaplasmosis (A. phagocytophilum Infection).*

Greene CE (Hrsg.), Infectious Diseases of the Dog and Cat. Elsevier Saunders, St. Louis, p. 219-224.

**Greig B., Armstrong P.J. (2012):** *Canine Granulocytotropic Anaplasmosis (A. phagocytophilum Infection).*

Greene CE (Hrsg.), Infectious Diseases of the Dog and Cat. Elsevier Saunders, St. Louis, p. 219-224

**Greig B., Asanovich K.M., Armstrong P.J., Dumler J.S. (1996):** Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs.

J Clin Microbiol 34: 44-48

**Gribble D.H. (1969):** Equine ehrlichiosis.

J Am Vet Med Assoc 155: 462-469

**Grindem C.B., Breitschwerdt E.B., Perkins P.C. (1999):** Platelet-associated immunoglobulin (antiplatelet antibody) in canine Rocky Mountain spotted fever and ehrlichiosis.

J Am Anim Hosp Assoc 35: 56–61

**Henniger T., Henniger P., Grossmann T., Distl O., Ganter M., von Loewenich F.D. (2013):** Congenital infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a calf in northern Germany. Acta Vet Scand 55: 38

**Herron M.J., Nelson C.M., Larson J., Snapp K.R., Kansas G.S., Goodman J.L. (2000):** Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1.

Science 288: 1653-1656

**Hodzic E., Fish D., Maretzki C.M., De Silva A.M., Feng S., Barthold S.W. (1998):** Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks.

J Clin Microbiol 36: 3574-3578

**Horowitz H.W., Hsieh T.C., Agüero-Rosenfeld M.E., Kalantarpour F., Chowdhury I., Wormser G.P., Wu J.M. (2001):** Antimicrobial susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*.

Antimicrob Agents Chemother 45: 786-788

**Horowitz H.W., Kilchevsky E., Haber S., Aguerro-Rosenfeld M., Kranwinkel R., James E.K., Wong S.J., Chu F., Liveris D., Schwartz I. (1998):** Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis.

N Engl J Med 339: 375-378

**Hudson J.R. (1950):** The recognition of tick-borne fever as a disease of cattle.

Br Vet J 106: 3-17

**Inokuma H., Nane G., Uechi T., Yonahara Y., Brouqui P., Okuda M., Onishi T. (2001):** Survey of tick infestation and tick-borne ehrlichial infection of dogs in Ishigaki Island, Japan.

J Vet Med Sci 63: 1225-1227

**Ismail N., Bloch K.C., McBride J.W. (2010):** Human ehrlichiosis and anaplasmosis.

Clin Lab Med 30(1): 261-292

**Jensen J., Simon D., Murua Escobar H., Soller J.T., Bullerdiek J., Beelitz P., Pfister K., Nolte I. (2007):** *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany.

Zoonoses Public Health 54: 94-101

**Jereb M., Pecaver B., Tomazic J., Muzlovic I., Avsic-Zupanc T., Premru-Srsen T., Levicnik-Stežinar S., Karner P., Strle F. (2012):** Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion.

Emerg Infect Dis 18(8): 1354-1357

**Kane A., Block G., Heeb L.A. (2011):** An unusual presentation of granulocytic anaplasmosis in a young dog.

J Am Anim Hosp Assoc 47(4): 276-279

**Katavolos P., Armstrong P.M., Dawson J.E., Telford S.R., 3rd (1998):** Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis.

J Infect Dis 177: 1422-1425

**Kemperman M., Jensen K. (2008):** *Anaplasma phagocytophilum* transmitted through blood-transfusion- Minnesota, 2007.

MMWR Morb Mortal Wkly Rep 57: 1145-1148

**Kidd L., Quorllo B., Lappin M., Richter K., Hart J.R., Hill S., Osmond C., Breitschwerdt E.B. (2017):** Prevalence of Vector-Borne Pathogens in Southern California Dogs With Clinical and Laboratory Abnormalities Consistent With Immune-Mediated Disease.

J Vet Intern Med. 31(4): 1081-1090

**Kirtz B., Czettel B., Thum D., Leidinger E. (2007):** *Anaplasma phagocytophilum* in einer österreichischen Hundepopulation: Eine Prävalenz-Studie (2001-2006).

Kleintierpraxis 52: 562-568

**Kohn B. (2010):** *Anaplasma phagocytophilum* in the dog – update on epidemiology and clinical disease. New York, 2010.

Proceedings of the Canine vector-borne disease meeting, New York 2016, 36–43

**Kohn B., Galke D., Beelitz P., Pfister K. (2008):** Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs.

J Vet Intern Med 22: 1289-1295

**Kohn B., Silaghi C., Galke D., Arndt G., Pfister K. (2011):** Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany.

Res Vet Sci 91(1): 71-76

**Krause P.J., McKay K., Thompson C.A., Sikand V.K. (2002):** Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease.

Clin Infect Dis 34: 1184–1191

**Krupka I., Pantchev N., Weise M., Straubinger R.K. (2007):**

Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland.

Praktischer Tierarzt 10(88): 776-787

**Krupka I. & Straubinger R.K. (2010):** Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Vet Clin North Am Small Anim Pract. 40(6): 1103-1119

**Leiby D.A., Gill J.E. (2004):** Transfusion-transmitted tick-borne infections: a cornucopia of threats.

Transfus Med Rev 18: 293-306

**Lepidi H., Bunnell J.E., Martin M.E., Madigan J.E., Stuen S., Dumler J.S. (2000):** Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections.

Am J Trop Med Hyg 62: 29-37

**Madewell B.R., Gribble D.H. (1982):** Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*.

J Am Vet Med Assoc 180: 512-514

**Maggi R.G., Birkenheuer A.J., Hegarty B.C., Bradley J.M., Levy M.G., Breitschwerdt E.B. (2014):** Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs.

Parasit Vectors. 26; 7: 127

**Massung, R.F., M.J. Mauel, J.H. Owens (2002):** Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut.

Emerg. Infect. Dis.8:467-472

**Maurin M., Bakken J.S., Dumler J.S. (2003):** Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strains from various geographic areas in the United States. Antimicrob Agents Chemother 47: 413-415

**Mazepa A.W., Kidd L.B., Young K.M., Trepanier L.A. (2010):** Clinical presentation of 26 *Anaplasma phagocytophilum*-seropositive dogs residing in an endemic area.

J Am Anim Hosp Assoc 46: 405-412

**Moroff S., Sokolchik I., Woodring T., Woodruff C., Atkinson B., Lappin M.R. (2014):** Detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* in dogs using an automated fluorescence based system.

Vet J 202(2): 348-52

**Munderloh U.G., Lynch M.J., Herron M.J., Palmer A.T., Kurtti T.J., Nelson R.D., Goodman J.L. (2004):** Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*.

Vet Microbiol 101: 53-64

**Nadelman R.B., Horowitz H.W., Hsieh T.C., Wu J.M. (1997):** Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis.

N Engl J Med 337: 27-30

**Nair A.D., Cheng C., Ganta C.K., Sanderson M.W., Alleman A.R., Munderloh U.G., Ganta R.R. (2016):** Comparative Experimental Infection Study in Dogs with *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *Anaplasma platys* and *A. phagocytophilum*.

PLoS One 11(2): e0148239

**Overzier E., Pfister K., Thiel C., Herb I., Mahling M., Silaghi C. (2013):** *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks: comparison of prevalences and partial 16S rRNA gene variants in urban, pasture, and natural habitats.

Appl Environ Microbiol 79(5): 1730-1734

**Pantchev N. (2010):** C-reactive protein as a marker in canine granulocytic anaplasmosis.

Vet Rec 166: 632

- Parola P. (2004):** Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe.  
Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27: 297-304
- Poitout F.M., Shinozaki J.K., Stockwell P.J., Holland C.J., Shukla S.K. (2005):** Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State.  
J Clin Microbiol 43: 796-801
- Popov V.L., Han V.C., Chen S.M., Dumler J.S., Feng H.M., Andreadis T.G., Tesh R.B., Walker D.H. (1998):** Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*.  
J Med Microbiol 47: 235-251
- Proctor M.C., Leiby D.A. (2015):** Do leukoreduction filters passively reduce the transmission risk of human granulocytic anaplasmosis?  
Transfusion 55(6): 1242-1248
- Pusterla N., Braun U. (1997):** Clinical findings in cows after experimental infection with *Ehrlichia phagocytophila*.  
Zentralbl Veterinarmed A 44: 385-390
- Pusterla N., Braun U., Wolfensberger C., Lutz H. (1997):** Intrauterine infection with *Ehrlichia phagocytophila* in a cow.  
Vet Rec 141: 101-102
- Ravnik U., Bajuk B.P., Lusa L., Tozon N. (2014):** Serum protein profiles, circulating immune complexes and proteinuria in dogs naturally infected with *Anaplasma phagocytophilum*.  
Vet Microbiol 173: 160-165
- Ravnik U., Tozon N., Smrdel K.S., Zupanc T.A. (2011):** Anaplasmosis in dogs: the relation of haematological, biochemical and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection.  
Vet Microbiol 149(1-2): 172-176
- Ravnik U., Tozon N., Strasek K., Avsic Zupanc T. (2009):** Clinical and haematological features in *Anaplasma phagocytophilum* seropositive dogs.  
Clin Microbiol Infect. 15 Suppl 2: 39-40
- Reine N.J. (2004):** Infection and blood transfusion: a guide to donor screening.  
Clin Tech Small Anim Pract. 19(2): 68-74
- Richter P.J., Jr., Kimsey R.B., Madigan J.E., Barlough J.E., Dumler J.S., Brooks D.L. (1996):** *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae).  
J Med Entomol 33: 1-5

**Rikihisa Y. (2006):** *Ehrlichia* subversion of host innate responses.

Curr Opin Microbiol 9: 95-101

**Rikihisa Y. (1991):** The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases.

Clin Microbiol Rev 4: 286-308

**Sainz Á., Roura X., Miró G., Estrada-Peña A., Kohn B., Harrus S., Solano-Gallego L. (2015):** Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe.

Parasit Vectors 4; 8: 75

**Sarkar A., Hellberg L., Bhattacharyya A., Behnen M., Wang K., Lord J.M., Moller S., Kohler M., Solbach W., Laskay T. (2012):** Infection with *Anaplasma phagocytophilum* activates the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and NF-kappaB survival pathways in neutrophil granulocytes.

Infect Immun 80: 1615-1623

**Salunkhe V., van der Meer P.F., de Korte D., Seghatchian J., Gutiérrez L. (2015):** Development of blood transfusion product pathogen reduction treatments: a review of methods, current applications and demands.

Transfus Apher Sci. 52(1): 19-34

**Sbrana S., Marchetti V., Mancianti F., Guidi G., Bennett D. (2014):** Retrospective study of 14 cases of canine arthritis secondary to *Leishmania* infection.

J Small Anim Pract. 55(6): 309-313

**Schaarschmidt-Kiener D., Müller W. (2007):** Labordiagnostische und klinische Aspekte der caninen Anaplasrose und Ehrlichiose.

Tierärztl Prax 35: 129-136

**Scharf V.F., Lewis D.D., Wellehan J.F., Wamsley H.L., Richardson R. (2015):** Comparison of synovial fluid culture and 16S rRNA PCR in dogs with suspected septic arthritis.

Aust Vet J. 93(6): 204-207

**Scharf V.F., Lewis S.T., Wellehan J.F., Wamsley H.L., Richardson R., Sundstrom D.A., Lewis D.D. (2015a):** Retrospective evaluation of the efficacy of isolating bacteria from synovial fluid in dogs with suspected septic arthritis.

Aust Vet J. (6): 200-203

**Scorpio D.G., Dumler J.S., Barat N.C., Cook J.A., Barat C.E., Stillman B.A., De Bisceglie K.C., Beall M.J., Chandrashekar R. (2011):** Comparative strain analysis of *Anaplasma phagocytophilum* infection and clinical outcomes in a canine model of granulocytic anaplasmosis.

Vector Borne Zoonotic Dis 11(3): 223-229.

**Shields K., Cumming M., Rios J., Wong M.T., Zwicker J.I., Stramer S.L., Alonso C.D. (2015):** Transfusion-associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient with thalassemia trait: a case report.

Transfusion 55(4): 719-725

**Silaghi C., Gilles J., Hohle M., Fingerle V., Just F.T., Pfister K. (2008):** *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany.

Emerg Infect Dis 14: 972-974

**Silaghi C., Kohn B., Chirek A., Thiel C., Nolte I., Liebisch G., Pfister K. (2011a):** Relationship of molecular and clinical findings on *Anaplasma phagocytophilum* involved in natural infections of dogs.

J Clin Microbiol 49(12): 4413-4414

**Silaghi C., Liebisch G., Pfister K. (2011b):** Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases.

Parasit Vectors 4: 161

**Stuen S. und Bergstrom K. (2001):** Persistence of Ehrlichia phagocytophila infection in two age groups of lambs.

Acta Veterinaria Scandinavica 42: 453-458

**Stuen S., Granquist E.G., Silaghi C. (2013):** *Anaplasma phagocytophilum*- a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies.

Front Cell Infect Microbiol 22:3:31

**Solano-Gallego L., Sainz Á., Roura X., Estrada-Peña A., Miró G. (2016):** A review of canine babesiosis: the European perspective.

Parasit Vectors. 11: 9(1): 336

**Thomas V., Anguita J., Barthold S.W., Fikrig E. (2001):** Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis alters murine immune responses, pathogen burden, and severity of Lyme arthritis.

Infect Immun 69: 3359–3371

- Townsend R.L., Moritz E.D., Fialkow L.B., Berardi V., Stramer S.L. (2014):** Probable transfusion-transmission of *Anaplasma phagocytophilum* by leukoreduced platelets. *Transfusion* 54(11): 2828-2832
- Ueti M.W., Knowles D.P., Davitt C.M., Scoles G.A., Baszler T.V., Palmer G.H. (2009):** Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strain-specific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun* 77: 70-75
- Vascellari M., Ravagnan S., Carminato A., Cazzin S., Carli E., Da Rold G., Lucchese L., Natale A., Otranto D., Capelli G. (2016):** Exposure to vector-borne pathogens in candidate blood donor and free-roaming dogs of northeast Italy. *Parasit Vectors* 29: 9(1): 369
- von Loewenich F.D., Baumgarten B.U., Schroppel K., Geissdorfer W., Rollinghoff M., Bogdan C. (2003):** High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J Clin Microbiol* 41: 5033-5040
- Waner T., Harrus S., Weiss D.J., Bark H., Keysary A. (1995):** Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Vet Immunol Immunopathol* 48: 177-182
- Wardrop K.J., Birkenheuer A., Blais M.C., Callan M.B., Kohn B., Lappin M.R., Sykes J. (2016):** Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. *J Vet Intern Med* 30(1): 15-35
- Weingart C., Krücken J., Rueter M.-T. von Samson-Himmelstjerna, G. Kohn, B. (2017):** Canine Babesiose – vier autochthone Fälle in Nordostdeutschland (2017). *Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere*; 45(2) S. A16–A17
- Woldehiwet Z. (2010):** The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 167(2-4): 108-122
- Woldehiwet Z. (1983):** Tick-borne fever: a review. *Vet Res Commun* 6: 163-175
- Wong S.J., Thomas J.A. (1998):** Cytoplasmic, nuclear, and platelet autoantibodies in human granulocytic ehrlichiosis patients. *J Clin Microbiol* 36: 1959-1963
- Wormser G.P. (2016):** Accuracy of Diagnosis of Human Granulocytic Anaplasmosis in China. *Emerg Infect Dis* 22: 1728-1731

**Yonemura S., Doane S., Keil S., Goodrich R., Pidcocke H., Cardoso M. (2017):** Improving the safety of whole blood-derived transfusion products with a riboflavin-based pathogen reduction technology.

Blood Transfus 15: 357-364

**Zeidner N.S., Dolan M.C., Massung R., Piesman J. (2000):** Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis suppresses IL-2 and IFN gamma production and promotes an IL-4 response in C3H/HeJ mice.

Parasite Immunol 22: 581–588

## IX. Publikationsverzeichnis

### 9.1 Zeitschriftenartikel / wissenschaftliche Beiträge

Silaghi, C.; Kohn, B.; Chirek, A.; Thiel, C.; Nolte, I.; Liebisch, G.; Pfister, K. (2011):  
Relationship of molecular and clinical findings on *Anaplasma phagocytophilum* involved in  
natural infections of dogs.

Journal of clinical microbiology; 49(12), S. 4413–4414

Chirek, A.; Kohn, B. (2014):

Canine granulozytäre Anaplasrose - eine vektorübertragene Erkrankung.

hundkatzeperd : Im Dialog mit dem Tierarzt; (3), S. 8–10

Wächter, M.; Pfeffer, M.; Schulz, N.; Balling, A.; Chirek, A.; Bach, J.-P.; Moritz, A.; Kohn,  
B.; Pachnicke, S.; Silaghi, C. (2015):

Seroprevalence of spotted fever group *Rickettsiae* in dogs in Germany.

Vector borne and zoonotic diseases; 15(3), S. 191–194

Kohn, B.; Bal, G.; Chirek, A.; Rehbein, S.; Salama, A. (2016):

Treatment of 5 dogs with immune-mediated thrombocytopenia using Romiplostim.

BMC veterinary research; 12(1), S. 96

### 9.2 Vorträge

Chirek, A.; Silaghi, C.; Pfister, K.; Kohn, B. (2013):

Prävalenz von *Anaplasma phagocytophilum* bei gesunden Blutspenderhunden im Raum  
Berlin/Brandenburg: 2006-2012

59. Jahreskongress der DGK-DVG

Berlin – 08.11.-10.11.2013.

Kleintier-Praxis; 58(11), S. 597–599

Chirek, A.; Silaghi, C.; Pfister, K.; Kohn, B. (2014):

Clinical features of 63 dogs naturally infected with *Anaplasma phagocytophilum*.

9th CVBD World Forum Symposium

Lissabon – 22.03.-25.03.2014.

Kohn, B.; Chirek, A.; Silaghi, C.; Pfister, K. (2014):

Canine granulocytic anaplasmosis: a clinical study.

13th International Congress of Parasitology

Mexico City – 10.08.-15.08.2014.

Kohn, B.; Chirek, A. (2014):

Canine Anaplasmosis: eine vektorübertragene Erkrankung.

Symposium der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin (Fachgruppe der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, DVG)

Bad Kissingen – 25.04.-27.04.2014.

Symposium der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin (1. Aufl.)

Gießen: Verlag der DVG Service GmbH, S. 14–18

Kohn, B.; Rühle, B.; Chirek, A. (2015):

Ihr Hund/Ihre Katze wird älter?

80. Internationale Grüne Woche

Berlin – 16.01.-25.01.2015.

Rehbein, S.; Bal, G.; Chirek, A.; Salama, A.; Kohn, B. (2016):

Romiplostim-Behandlung bei 7 Hunden mit immunbedingter Thrombozytopenie.

62. Jahreskongress der DVG-Fachgruppe Deutsche Gesellschaft für Kleintiermedizin (DGK-DVG)

Berlin – 27.10.-30.10.2016.

62. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kleintiermedizin (1. Aufl.)

Gießen: Verlag der DVG Service GmbH, S. 135–136

Rehbein, S.; Bal, G.; Chirek, A.; Salama, A.; Kohn, B. (2016):

Romiplostim treatment in 7 dogs with immune-mediated thrombocytopenia.

26. ECVIM-CA Congress

Göteborg, Schweden – 08.09.-10.09.2016.

Journal of veterinary internal medicine; 31(1), S. 230

### 9.3 Poster

Chirek, A.; Silaghi, C.; Pfister, K.; Kohn, B. (2013):

Granulozytäre Anaplasrose bei 63 Hunden (2006–2012): Klinische und labordiagnostische Befunde und Verlauf.

21. Jahrestagung der FG Innere Medizin und Labordiagnostik der DVG (InnLab)  
München – 01.02.-02.02.2013.

Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere; 41(2), S. P05

Chirek, A.; Silaghi, C.; Pfister, K.; Kohn, B. (2013):

Clinical features of 63 dogs naturally infected with *Anaplasma phagocytophilum* (2006 - 2012).

23rd ECVIM-CA Congress

Liverpool – 12.09.-14.09.2013.

Chirek, A.; Silaghi, C.; Pfister, K.; Kohn, B. (2014):

Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in healthy canine blood donors.

24rd ECVIM-CA Congress, Mainz – 04.09.-06.09.2014.

Kohn, B.; Rühle, B.; Chirek, A. (2015):

Ihr Hund/Ihre Katze wird älter?

80. Internationale Grüne Woche

Berlin – 16.01.-25.01.2015.

Chirek, A.; Silaghi, C.; Pfister, K.; Kohn, B. (2016):

Vorkommen von *Anaplasma phagocytophilum* bei Blutspenderhunden im Raum Berlin/Brandenburg (2006–2012).

24. Jahrestagung der Fachgruppe "Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik der DVG (InnLab)"

Berlin – 29.01.-30.01.2016.

Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere; 44(2), S. A 23–A 24

Chirek, A.; Silaghi, C.; Pfister, K.; Kohn, B. (2016):

*Anaplasma phagocytophilum*: Vorkommen bei gesunden Blutspenderhunden im Raum Berlin/ Brandenburg (2006-2012).

Tagung der DVG-Fachgruppe „Parasitologie und parasitäre Krankheiten“

Berlin – 02.05.-04.05.2016.

Aktuelle veterinärparasitologische Forschungsergebnisse: Von der Grundlage bis zur Praxis (1. Aufl.) Gießen: Verlag der DVG Services GmbH, S. 117–118

## **X. Danksagung**

Nun ist sie fertig, meine Doktorarbeit. Ich bedanke mich bei Frau Prof. Kohn für die Vergabe des Themas und für Ihre Unterstützung. Auch wenn wir nicht immer einer Meinung waren, haben Sie stets die Nerven behalten, vielen Dank! Vielen Dank auch für die Verbesserungsvorschläge, die die Arbeit zu dem gemacht haben, was sie jetzt ist. Auch an die Coautoren der Publikationen, Cornelia Silaghi und Kurt Pfister ein großes Danke. Ihre Tipps waren immer sehr produktiv und trugen maßgebend zur Veröffentlichung der Publikationen bei. Meinen Eltern kann ich gar nicht genug dafür danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben zu studieren und Richard und Erika Pessenlehner danke ich für die emotionale und finanzielle Unterstützung während meines Studiums. Dr. Marta Lista danke ich dafür, dass sie mir schon in jungen Jahren das Handwerk beigebracht hat und mich immer ermutigt hat, dranzubleiben, mir meinen Traum zu erfüllen. Und was hätte ich nur ohne meine Freunde getan? Nina Thobor, danke für das Immergernhaben, Judith und Pravin Kansal, für das Immeranmichglauben, Geraldine & Li qun Bihr-Meng für das abendliche Immerablenken, Jördis Pusch für das Immermutmachen, Alan God für das Immereinendrinkparathaben, Natalia Tabit, Stephanie Dorst und Arlett Wenzel für das Immeretwasanderssein. Meinen Kollegen möchte ich auch, besonders für das Immerverstandenwerden danken. Dörte Thielemann, Anna Dettling, Nina Merten, Annica Nerlich, geteiltes Leid, war halbes Leid. Sophie Endorff, danke für das Immeranstelefonehen, wenn doch noch mal die ein- oder andere Information gefehlt hat. Frau Gaede, danke für die immer unkomplizierte Bearbeitung der Promotionsverlängerungen. Loulou, Tequila und Balou, die leider nicht mehr dabei sein können, danke ich für ihre bedingungslose Liebe. Ich vermisse euch sehr!

## **XI. Selbstständigkeitserklärung**

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

Berlin, 04.06.2018, Aleksandra Chirek









