

Aus dem  
Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Kurt Pfister

Angefertigt unter der Leitung von  
Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

---

**Entwicklung und Evaluierung von Real-time PCR-  
Verfahren zum Nachweis von *Ehrlichia canis* und  
*Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmataceae)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Sandra Messerer  
aus Dingolfing

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer

Referentin: Priv.-Doz. Dr. M. Rinder

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. W. Breuer

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Überblick über human- und veterinärmedizinisch relevante Erreger der Familie Anaplasmataceae .....</b>	<b>3</b>
<b>2. <i>Ehrlichia canis</i> .....</b>	<b>6</b>
2.1 Taxonomische Einordnung .....	7
2.2 Wirtsspektrum und Vektoren .....	7
2.3 Entwicklungszyklus .....	9
2.4 Geographische Verbreitung.....	11
2.5 Klinische Symptome und Therapiemöglichkeiten .....	12
2.6 Diagnose der kaninen monozytären Ehrlichiose .....	13
2.6.1 Hämatologie .....	13
2.6.2 Direkter Erregernachweis im Ausstrich .....	13
2.6.3 Serologische Nachweisverfahren .....	15
2.6.4 Zellkultur .....	16
2.6.5 Molekularbiologische Nachweisverfahren.....	17
<b>3. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>.....</b>	<b>21</b>
3.1 Taxonomische Einordnung .....	21
3.2 Wirtsspektrum und Vektoren .....	21
3.3 Entwicklungsszyklus.....	22

3.4 Geographische Verbreitung.....	23
3.5 Klinische Symptome und Therapiemöglichkeiten .....	25
3.6 Diagnostik .....	26
3.6.1 Hämatologie .....	26
3.6.2 Direkter Erregernachweis im Ausstrich .....	27
3.6.3 Serologische Nachweisverfahren .....	28
3.6.4 Zellkultur .....	29
3.6.5 Molekularbiologische Nachweisverfahren.....	29
<b>4. PCR als diagnostisches Nachweisverfahren .....</b>	<b>33</b>
4.1 PCR-Prinzip und traditionelle PCR.....	33
4.2 Real-time PCR.....	34
<b>III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>38</b>
<b>A Material und Methoden .....</b>	<b>38</b>
1. Entwicklung einer Real-time PCR zum Nachweis von <i>Ehrlichia canis</i> und <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	38
1.1 Auswahl der Zielgene.....	38
1.1.1 <i>Ehrlichia canis</i> .....	38
1.1.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	39
1.2 Primer- und Sondenkonstruktion .....	40
1.2.1 <i>Ehrlichia canis</i> .....	40
1.2.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	42
1.3 Optimierung der PCR-Bedingungen .....	42
2. Vergleich verschiedener Real-time PCRs .....	43
2.1 <i>Ehrlichia canis</i> .....	43
2.1.1 Analytische Spezifität .....	43
2.1.2 Analytische Sensitivität.....	43

2.1.3 Validierung der Real-time PCR ECP-p30 anhand geblindeter Proben.....	44
2.2 Vergleich der Real-time PCR AP-16S für <i>Anaplasma phagocytophilum</i> mit bereits publizierten PCRs.....	46
2.2.1 Analytische Spezifität .....	47
2.2.2 Analytische Sensitivität.....	47
2.2.3 Validierung der Real-time PCRs für <i>Anaplasma phagocytophilum</i> anhand geblindeter Proben.....	48
3. Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR ECP-p30 und der PCR AP-MSP2 unter Verwendung von Plasmid-DNA .....	48
4. Untersuchung von Patienten auf Infektion mit <i>Ehrlichia canis</i> und <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	50
4.1 Patientengut der <i>Ehrlichia canis</i> -Studie.....	50
4.2 Patientengut der <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -Studie .....	52
4.3 Probengewinnung und –lagerung.....	54
4.4 Lichtmikroskopische Untersuchung auf <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	55
4.5 Molekularbiologische Untersuchungen.....	56
4.5.1 DNA-Extraktion .....	56
4.5.2 Real-time PCR für <i>Ehrlichia canis</i> .....	57
4.5.3 Real-time PCR für <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	59
4.5.4 Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte.....	60
4.6 Serologische Untersuchung- IFAT.....	62
4.6.1 Serologische Untersuchung auf <i>Ehrlichia canis</i> .....	62
4.6.2 Serologische Untersuchung auf <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	63
5. Vergleich der Untersuchungsmethoden .....	64
<b>B Ergebnisse.....</b>	<b>65</b>
1. Real-time PCR zum Nachweis von <i>Ehrlichia canis</i> und <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ..	65
1.1 Primer- und Sondenkonstruktion .....	65
1.1.1 <i>Ehrlichia canis</i> .....	65

1.1.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	68
1.2 Optimierung der PCR-Bedingungen .....	71
1.2.1 Optimierung der PCR-Parameter für <i>Ehrlichia canis</i> .....	71
1.2.2 Optimierung der PCR für <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	73
2. Ergebnisse des Vergleichs verschiedener Real-time PCRs.....	75
2.1 PCRs zur Untersuchung auf <i>Ehrlichia canis</i> .....	75
2.1.1 Analytische Spezifität .....	75
2.1.2 Analytische Sensitivität.....	76
2.1.3 Ergebnisse der Validierung der PCR ECP-p30 anhand geblindeter Proben.....	77
2.2 Ergebnisse des Vergleichs der PCR AP-16S mit bereits publizierten Real-time PCRs zur Untersuchung auf <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	78
2.2.1 Analytische Spezifität .....	79
2.2.2 Analytische Sensitivität.....	79
2.2.3 Ergebnisse der Validierung anhand geblindeter Proben .....	81
3. Nachweisgrenze der PCR ECP-p30 für <i>Ehrlichia canis</i> und der PCR AP-MSP2 für <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	82
4. Ergebnisse der Untersuchung von Patienten auf Infektion mit <i>Ehrlichia canis</i> und <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	83
4.1 Patientengut der <i>Ehrlichia canis</i> -Studie.....	83
4.2 Patientengut der <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -Studie .....	84
4.3 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung auf <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	84
4.4 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung.....	85
4.4.1 Real-time PCR für <i>Ehrlichia canis</i> .....	85
4.4.2 Real-time PCR für <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	86
4.4.3 Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte.....	87
4.5 Ergebnisse der serologischen Untersuchung.....	87
4.5.1 IFAT zum Nachweis von <i>Ehrlichia canis</i> .....	87
4.5.2 IFAT zum Nachweis von <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	88
5. Vergleich der Untersuchungsmethoden .....	89

<b>C Diskussion.....</b>	<b>92</b>
1. <i>Ehrlichia canis</i> .....	92
1.1 Entwicklung und Validierung einer Real-time PCR für <i>Ehrlichia canis</i> .....	92
1.2 Untersuchung von Patienten.....	97
2. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	101
2.1 Entwicklung und Validierung einer Real-time PCR für <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	101
2.2 Untersuchung von Patienten.....	104
<b>IV. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>107</b>
<b>V. SUMMARY.....</b>	<b>110</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>113</b>
<b>VII. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>149</b>
<b>VIII. ANHANG .....</b>	<b>151</b>
1. Patientendaten der <i>Ehrlichia canis</i> -Studie.....	151
2. Patientendaten der <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -Studie.....	156
2.1 Eigens für die Studie eingesandte Proben mit Fragebogen.....	156

2.2 Aus der Routinediagnostik entnommene Proben ohne Fragebogen ..... 158

**IX. DANKSAGUNGEN .....161**

## I. Einleitung und Problemstellung

Durch Zecken übertragene Krankheitserreger gewinnen als sogenannte „Emerging tick-borne infections“ aufgrund des gestiegenen öffentlichen Interesses an Zecken als Vektoren sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin immer mehr an Bedeutung (Christova et al., 2003). Innerhalb der Familie der Anaplasmataceae spielen dabei die Arten *Ehrlichia canis* und *Anaplasma phagocytophilum* für die Kleintierpraxis die größte Rolle. So ist *E. canis* als Erreger der kaninen monozytären Ehrlichiose bedeutend. Obwohl sich das endemische Vorkommen dieser Art aufgrund der Gebundenheit an den Vektor *Rhipicephalus sanguineus* auf warme Klimazonen beschränkt, gewinnt die Erkrankung in Deutschland als Reisekrankheit und durch den immer häufiger werdenden Import von Hunden aus endemischen Gebieten an Relevanz. Aufgrund des regelmäßigen Vorkommens klinisch inapparenter Infektionen mit *E. canis* und der unspezifischen Krankheitssymptome gestaltet sich eine erfolgreiche Diagnosestellung meist sehr schwierig und erfolgt üblicherweise mittels indirektem Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) (Mathew et al., 2000; Suksawat et al., 2000). Dieser Test zeigt jedoch Kreuzreaktionen mit anderen Ehrlichienarten (Rikihisa et al., 1992), und es ist nicht möglich, anhand des Vorhandenseins von Antikörpern auf eine Präsenz des Erregers zu folgern. Besonders im Hinblick auf therapieresistente Infektionen mit *E. canis* ist der direkte Erregernachweis für die Überprüfung des Therapieerfolges unumgänglich (Iqbal und Rikihisa, 1994; Neer et al., 1999). Daher ist der Einsatz sensitiver molekularbiologischer Nachweisverfahren zum direkten Nachweis von *E. canis* anzustreben.

In Deutschland besitzt außerdem *Anaplasma phagocytophilum*, der Erreger der granulozytären Ehrlichiose, aufgrund seines zoonotischen Charakters und der weiten Verbreitung seines Vektors *Ixodes ricinus* („Gemeiner Holzbock“) sowohl human- als auch veterinärmedizinische Relevanz. Da *A. phagocytophilum* häufig selbstlimitierende Infektionen mit spontaner Erregerelimination, aber längerer Antikörperpräsenz hervorruft (Pusterla et al., 1997a; Blanco und Oteo, 2002), ist auch hier der alleinige Nachweis von Antikörpern mittels IFAT für eine Diagnose, die als Grundlage für eine Therapieeinleitung dienen soll, nicht ausreichend aussagekräftig. Konventionelle Polymerasekettenreaktion- (PCR-) basierte Methoden, deren Sensitivität meist durch den Einsatz sogenannter geschachtelter PCRs erhöht wurde, bergen in der Routinediagnostik ein großes Kontaminationsrisiko und sind zudem

zeitaufwendig. Insbesondere für *A. phagocytophilum* besaßen sie teilweise entscheidende Mängel in Sensitivität oder Spezifität (Massung und Slater, 2003). Im Gegensatz dazu bieten moderne, Real-time PCR-basierte Tests die entscheidenden Vorteile schneller Durchführbarkeit, hoher Spezifität und Sensitivität und eines geringen Kontaminationsrisikos.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung und Validierung einer Real-time PCR für *E. canis* und *A. phagocytophilum*, sowie deren Anwendung und der Vergleich mit etablierten Testverfahren anhand einer größeren Anzahl Patienten. Zunächst sollte die Auswahl geeigneter Zielgene, die Konstruktion spezifischer Primer und Sonden, die Optimierung und anschließende Validierung der neu entwickelten Testverfahren erfolgen. Hierbei sollten für *A. phagocytophilum* auch bereits publizierte Tests (Pusterla et al., 1999a; Courtney et al., 2004) einbezogen werden. Anschließend sollte die Real-time PCR für *E. canis* an 244 Blutproben von Hunden aus einem bekannten endemischen Gebiet in Italien angewendet und die Ergebnisse mit denen des IFAT verglichen werden. Bei der Untersuchung auf *A. phagocytophilum* sollten 205 Hundeblutproben aus Deutschland einbezogen und ein Vergleich von Real-time PCR, IFAT und Buffy-coat-Ausstrich durchgeführt werden.

## II. Literaturübersicht

### 1. Überblick über human- und veterinärmedizinisch relevante Erreger der Familie Anaplasmataceae

Erreger der Familie Anaplasmataceae, deren Vertreter durchweg obligat intrazelluläre Bakterien darstellen (Rikihisa, 1991), gewinnen sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin immer mehr an Interesse, da sie ursächlich für Krankheiten mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Abmagerung und veränderten hämatologischen Werten sein können (Rikihisa, 1991; Dumler und Bakken, 1995). Die im Reich der Bakterien (Abteilung Proteobacteria, Klasse Alphaproteobacteria) der Ordnung der Rickettsiales zugeordnete Familie der Anaplasmataceae umfasst die medizinisch relevanten Gattungen *Aegyptianella*, *Neorickettsia*, *Anaplasma* und *Ehrlichia* (Dumler et al., 2001; Garrity, 2001).

Die Gattung *Aegyptianella* beinhaltet Blutpathogene bei Vögeln, Amphibien und Reptilien. Veterinärmedizinische Bedeutung besitzt in den Tropen und Subtropen die Art *A. pullorum*, die sich in den Erythrozyten verschiedener Vogelarten vermehrt. Als Überträger fungieren Lederzecken. Betroffene Tiere entwickeln Fieber, Anämie, Durchfall, allgemeine Schwäche und Abmagerungserscheinungen (Selbitz, 2002).

Bei der Gattung *Neorickettsia* besitzt die Spezies *Neorickettsia sennetsu* humanmedizinische Relevanz und kommt in Japan und Malaysia vor, wo sie eine Mononukleose-ähnliche Erkrankung hervorruft (Misao und Kobayashi, 1954). Die Übertragung auf den Menschen erfolgt vermutlich durch die Aufnahme roher Fische, die mit dem Erreger infizierte Trematoden enthalten. Bei experimentell infizierten Mäusen verursacht *N. sennetsu* eine schwere Erkrankung mit Splenomegalie und Lymphadenopathie, die zum Tod der Tiere führt (Wen et al., 1996), während die Erkrankung beim Menschen einen milderen Verlauf aufweist (Rikihisa, 1991). Veterinärmedizinisch relevante Vertreter der Gattung *Neorickettsia* sind *Neorickettsia helminthoeca* und *N. risticii*. *N. helminthoeca* wurde erstmals 1950 beschrieben (Cordy und Gorham, 1950) und gilt als Erreger der „Salmon Poisoning Disease“, einer Erkrankung, die in den USA gelegentlich bei Hunden, Füchsen und Coyoten nach dem

Verzehr roher Lachsfische auftritt, die mit dem Erreger infizierte Trematoden (*Nanophyetus salmincola*) enthalten. *Nanophyetus salmincola* weist einen komplexen Lebenszyklus auf, der Schnecken (*Oxytrema silicula*) und Salmoniden als Zwischenwirte, sowie Carnivoren als Endwirte beinhaltet. Das Auftreten der Erkrankung ist somit eng an das Vorkommen der Schnecken und Salmoniden gebunden und erstreckt sich vor allem von Nordwestkalifornien bis Südwestwashington, dem Verbreitungsgebiet von *O. silicula* (zusammengefasst durch Rikihisa, 1991). *N. risticii*, der Erreger des Potomac-Pferdefiebers, stellt, nicht zuletzt aufgrund wirtschaftlicher Aspekte, in den USA und Kanada einen wichtigen Krankheitserreger dar (Neer, 1998), wurde aber auch schon in Frankreich und Indien beobachtet (Ristic, 1990). *N. risticii* löst bei infizierten Pferden eine saisonal von Mai bis November auftretende, fieberhaft verlaufende Erkrankung mit Kolitis und schwerem klinischen Verlauf aus (Palmer, 1993; Madigan und Pusterla, 2000), die auch als equine monozytäre Ehrlichiose bezeichnet wird (Madigan und Pusterla, 2000). Als Vektoren fungieren Trematoden. Schnecken der Spezies *Juga* und *Stagnicola* sowie aquatische Insekten (beispielsweise *Trichoptera*, *Odonata*, *Anisoptera* und *Plecoptera*) können mit *N. risticii* infizierte Trematoden enthalten und die Aufnahme des Erregers durch die Pferde erfolgt wahrscheinlich über die Ingestion schneckenhaltigen Grases oder das Trinken trematoden- bzw. insektenhaltigen Wassers (Barlough et al., 1998; Reubel et al., 1998a; Chae et al., 2000; Madigan et al., 2000; Madigan und Pusterla, 2000). In seroepidemiologischen Studien wurden Antikörper gegen *N. risticii* in endemischen Gebieten der Vereinigten Staaten nicht nur bei Pferden, sondern auch in Seren von Hunden, Katzen, Coyoten, Schweinen und Ziegen nachgewiesen (Perry et al., 1989; Magnarelli und Anderson, 1993; Pusterla et al., 2000a).

Medizinisch relevante Erreger der Gattung *Anaplasma* sind *A. phagocytophilum*, *A. platys* und *A. bovis*. Sie werden innerhalb der Gattung *Anaplasma* der „Phagocytophilum-Gruppe“ zugeordnet (Dumler et al. 2001) und durch Schildzecken übertragen. *A. bovis*, der Erreger der bovinen Ehrlichiose, wird durch Zecken der Gattungen *Hyalomma* und *Rhipicephalus* übertragen, parasitiert in Monozyten und Makrophagen von Rindern und kommt im Mittleren Osten und in Afrika vor (Neer, 1998). Eine wichtige Bedeutung in der Veterinärmedizin hat zudem *A. platys*, der Erreger der infektiösen kaninen zyklischen Thrombozytopenie. Die Erkrankung tritt weltweit in warmen Klimazonen auf, wobei in den europäischen Ländern von einer Verbreitung in Griechenland (Kontos und Papadopoulos, 1987), Frankreich, Spanien (Sainz et al., 1999) und Süditalien (Pennisi et al., 1989) ausgegangen wird. Der Erreger weist einen ausgeprägten Tropismus für Thrombozyten auf, so dass es bei betroffenen Tieren zur

Ausbildung einer Thrombozytopenie kommt (Harvey et al., 1978). Der Vektor konnte noch nicht zweifelsfrei identifiziert werden, vermutet wird jedoch, dass *Rhipicephalus sanguineus* eine wichtige Rolle bei der Übertragung spielt (Bradfield et al., 1996; Dumler et al., 2001; Sparagano et al., 2003). Innerhalb der Gattung *Anaplasma* findet derzeit sicherlich *A. phagocytophilum* die größte Aufmerksamkeit. Die von dem Erreger verursachte Erkrankung wird auch der Gruppe der „newly emerging diseases“ zugeordnet. Dieser Erreger der granulozytären Ehrlichiose, die bisher sowohl bei Menschen als auch bei Tieren diagnostiziert werden konnte, wird durch Zecken übertragen, wobei in den Vereinigten Staaten *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus* und in Europa *Ixodes ricinus* („Gemeiner Holzbock“) als Vektoren fungieren (Dumler und Bakken, 1995; Baumgarten et al., 1999). Aufgrund der weiten Verbreitung der Vektoren nahmen nach Beschreibung der ersten humanmedizinischen Krankheitsfälle in den USA, durch den damals noch als HGE-Agens bezeichneten Erreger, die Hinweise auf das Vorkommen in Europa rasch zu (Morais et al., 1991; Brouqui et al., 1995), bevor 1996 der erste molekularbiologische Nachweis in Slowenien gelang (Petrovec et al., 1997). Die früher zunächst als eigene Spezies angesehenen Erreger des Weidefiebers bei Wiederkäuern, also *E. phagocytophila* (Gordon et al., 1932; Hudson, 1950; Foggie, 1951), der Erreger der equinen granulozytären Ehrlichiose *E. equi* (Gribble, 1969; Stannard et al., 1969; Madigan, 1993) und der Erreger der kaninen granulozytären Ehrlichiose (Greig et al., 1996; Pusterla et al., 1997b) werden seit kurzem mit dem HGE-Agens zu einer Art, *A. phagocytophilum*, zusammengefasst (Dumler et al., 2001). Eine detaillierte Darstellung von *A. phagocytophilum* erfolgt in Kapitel 3.

Die Gattung *Ehrlichia* beinhaltet mit den Arten *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris* und *E. ruminantium* ebenfalls medizinisch wichtige Erreger (Buller et al., 1999; Gusa et al., 2001; Inokuma et al., 2001a; 2001b; Stich et al., 2002; Zhang et al., 2003). Diese Arten werden zur „*Ehrlichia-canis*-Gruppe“ zusammengefasst (Anderson et al., 1991; Wen et al., 1995; Dumler et al., 2001). Die Übertragung erfolgt durch Zecken (Wen et al., 1995; Wen et al., 1996). *E. ruminantium* wurde früher als *Cowdria ruminantium* bezeichnet (Dumler et al., 2001), verursacht die „Herzwasser-Krankheit“ bei Wiederkäuern in Afrika und der Karibik (Cowdry, 1926; Uilenberg, 1983; Camus et al., 1993) und wird durch *Amblyomma* Zecken übertragen (Bezuidenhout, 1987). Bei *E. muris*, ursprünglich aus Mäusen und Zecken (*Haemaphysalis flava*) in Japan isoliert (Wen et al., 1995; Kawahara et al., 1999), sind bisher keine Krankheitsfälle bekannt, es konnten jedoch in Seren von Japanern ohne klinische Symptome Antikörper gegen diese Ehrlichienart

nachgewiesen werden (Kawahara et al., 1999). *E. ewingii* wurde zunächst für eine rein tierpathogene Ehrlichienart gehalten, bis Fragmente der 16S rDNA von *E. ewingii* aus Blutproben menschlicher Patienten amplifiziert werden konnten (Buller et al., 1999). Die Übertragung erfolgt über *Amblyomma americanum* (Dumler et al., 2001). Veterinärmedizinische Bedeutung erlangte *E. ewingii* in den USA als Erreger einer milden Form der kaninen granulozytären Ehrlichiose, die sich in Form einer Polyarthritiden zeigen kann (Ewing et al., 1971; Stockham et al., 1985). Der Erreger besiedelt neutrophile und eosinophile Granulozyten, wobei als Vektoren wahrscheinlich *A. americanum* und *Otobius megnini* fungieren (Neer, 1998). Der Erreger der humanen monozytären Ehrlichiose, *E. chaffeensis*, besitzt zoonotischen Charakter. Er konnte in den USA sowohl bei erkrankten Menschen als auch bei Tieren nachgewiesen werden. Die Übertragung erfolgt durch Zecken der Arten *A. americanum* („Lone Star Tick“) und *Dermacentor variabilis* (Anderson et al., 1993; Dumler und Bakken, 1995). Der Nachweis bei Tieren gelang sowohl bei experimentell als auch natürlich infizierten Hunden, die jedoch im Gegensatz zu erkrankten Menschen meist keine klinischen Symptome aufwiesen (Dawson und Ewing, 1992; Breitschwerdt et al., 1998b). Zudem konnte *E. chaffeensis* erfolgreich bei experimentell infizierten Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*) sowie Pferden und Nagern nachgewiesen werden (Dawson et al., 1996b; Telford et al., 1996; Lockhart et al., 1997; Davidson et al., 2001). Innerhalb dieser Gruppe stellt *E. canis* den für die Veterinärmedizin wohl wichtigsten Erreger dar (Pusterla et al., 2000a). Humanmedizinische Beachtung fand *E. canis*, als bei einem Patienten in Venezuela eine asymptomatische Infektion diagnostiziert wurde, die aufgrund molekularbiologischer-16S rDNA Untersuchungen *E. canis* zugeordnet wurde (Perez et al., 1996). Als Erreger der kaninen monozytären Ehrlichiose (CME) ist *E. canis* in warmen Klimazonen weltweit verbreitet und verursacht bei betroffenen Hunden schwere klinische Erkrankungen (Neer, 1998). *E. canis* wird in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

### 2. *Ehrlichia canis*

Bei *E. canis*, dem Erreger der kaninen monozytären Ehrlichiose (CME) handelt es sich um ein kleines, oft pleomorphes, gram-negatives, kokkoides bis ellipsoides, obligat intrazelluläres Bakterium, das intrazytoplasmatisch in Form einer Morula (lat.: Maulbeere) in Monozyten,

Makrophagen und Lymphozyten infizierter Caniden parasitiert (Nyindo et al., 1971; Troy und Forrester, 1990; Rikihisa, 1991; Dumler et al., 2001; Mylonakis et al., 2003). Die Bakterien enthalten im Unterschied zu typischen gramnegativen Bakterien einen geringen Anteil an Peptidoglykan in der Zellwand, bilden jedoch eine kapselähnlichen Struktur aus und sind im Zytoplasma nicht symmetrisch oder gleichmäßig verteilt, sondern formen Aggregationen. In vitro Kultivierung von *E. canis* erfolgt üblicherweise in kaninen monozytären Zelllinien (DH82). Der Energiestoffwechsel der Ehrlichien stellt einen aeroben, assaccharolytischen Prozess dar, wobei Glutamin gegenüber Glutamat als Substrat bevorzugt wird, da die obligat intrazellulären Bakterien von der Zellmembran der Wirtszelle umgeben sind und Glutamin einfacher durch diese Zellmembran penetrieren kann. Glucose oder Glucose-6-Phosphat können nicht verwertet werden, was einen bedeutenden Unterschied zu den nahe verwandten Chlamydien und Wolbachien darstellt (Rikihisa, 1991).

### 2.1 Taxonomische Einordnung

*E. canis* wird innerhalb der Gattung *Ehrlichia* der „Canis-Gruppe“ zugeordnet. Diese Gattung zählt zur Familie der Anaplasmataceae, die wiederum der Ordnung Rickettsiales innerhalb der Klasse der Alphaproteobacteria untergeordnet ist. Diese Klasse wird zur Abteilung der Proteobacteria im Reich der Bakteria gerechnet (Dumler et al., 2001; Garrity, 2001).

### 2.2 Wirtsspektrum und Vektoren

Der Lebenszyklus von *E. canis* umfasst Zecken als Vektoren und Säugetiere als Wirte. Das Wirtsspektrum von *E. canis* umfasst primär alle Mitglieder der Familie Canidae (Neer, 1998). Für eine Infektion empfänglich sind dabei sowohl Wildtiere wie Coyote (*Canis latrans*), Europäischer Rotfuchs (*Vulpes vulpes*), Amerikanischer Rotfuchs (*Vulpes fulva*), Graufuchs (*Urocyon cinereoargenteus*), Dingo (*Canis lupus familiaris dingo*) und Schakal (*Canis mesomelas*) als auch domestizierte Hunde (*Canis familiaris*) (Ewing et al., 1964; Amyx und Huxsoll, 1973; Price und Karstad, 1980; Neer, 1998; Mason et al., 2001). Diese Tiere fungieren vermutlich auch als Reservoir für den Erreger (Mason et al, 2001), wobei es bei infizierten Hunden zu einer Erregerpersistenz über Jahre hinweg kommen kann (Codner und

Farris-Smith, 1986). Besonders empfänglich für eine Infektion mit *E. canis* gelten Deutsche Schäferhunde. Als Ursache hierfür wird vermutet, dass ihre zelluläre Immunantwort schwächer ausgebildet ist als bei anderen Rassen, wogegen keine Unterschiede in der humoralen Immunantwort festzustellen waren (Nyindo et al., 1980). In Studien war diese Rasse zahlenmäßig öfter betroffen als andere Rassen (Harrus et al., 1997; Kuffer-Frank et al., 1999) und tendierte zur Entwicklung eines schweren klinischen Verlaufes (Nyindo et al., 1980; Harrus et al., 1997), während im Vergleich dazu Beagles eher milde klinische Symptomatik zeigten (Nyindo et al., 1980).

Möglicherweise ist das Wirtsspektrum von *E. canis* sogar breiter. So wurde von einem Fall in Venezuela berichtet, in dem bei einem Menschen ohne klinische Symptome der molekularbiologische Nachweis von DNA gelang, deren Sequenz der 16S rDNA identisch mit der von *E. canis* war, so dass diese Infektion *E. canis* zugeordnet wurde (Perez et al., 1996). Bei drei Katzen gelang zudem aus Blutproben die Isolation von DNA, die zu 100% mit der Sequenz eines *E. canis*-Isolates übereinstimmte. Aufgrund fehlenden Nachweises von Antikörpern gegen *E. canis* in den Seren der Tiere und fehlender weitergehender Untersuchungen müssen diese Ergebnisse jedoch vorsichtig beurteilt werden (Breitschwerdt et al., 2002).

Als Vektoren für *E. canis* fungieren Zecken, wobei die Schildzeckenart *Rhipicephalus sanguineus* (braune Hundezecke; Abb. 1) als Hauptvektor anzusehen ist (Groves et al., 1975; Neer, 1998; Murphy et al., 1998a). Nachdem sich die Larven oder Nymphen bei ihrer Blutmahlzeit an mit *E. canis* befallenen Hunden infiziert haben (Lewis et al., 1977), können Nymphen und adulte Zecken den Erreger übertragen (Neer, 1998). Die transstadiale Übertragung von der Zecke auf das Säugetier erfolgt beim Saugakt über den Speichel (Harrus et al., 1997; Zhang et al., 2003). Hunde, die mit *R. sanguineus* befallen sind, sollen ein erhöhtes Risiko für eine Infektion mit *E. canis* haben (Botros et al., 1995; Murphy et al., 1998a; Trapp et al., 2002). In den USA besitzt möglicherweise *Dermacentor variabilis* (amerikanische Hundezecke) eine zusätzliche Bedeutung als Vektor. So gelang die experimentelle Übertragung von *E. canis* mit Nymphen als erregeraufnehmenden und adulten Zecken als erregerübertragendem Agens (Johnson et al., 1998). Die epidemiologische Bedeutung von *D. variabilis* als Vektor für *E. canis* ist jedoch unklar. Zudem ist eine Übertragung des Erregers von Hund zu Hund über Bluttransfusionen möglich, was vor allem in endemischen Regionen beachtet werden muss (Harrus et al., 1998a). Die in Europa am

häufigsten vorkommende Zeckenart, *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock), ist kein Vektor für *E. canis* (Skotarczak, 2003). Zudem misslang die experimentelle Übertragung von *E. canis* mit *Otobius megnini* (Ewing et al., 1990).



Abb 1: Rhipicephalus sanguineus

### 2.3 Entwicklungszyklus

Der Lebenszyklus von *E. canis* involviert eine Zecke als Vektor und ein Säugetier als Wirt, wobei die Infektion der Säugetiere durch den Stich infizierter Nymphen oder adulter Zecken erfolgt, die die Erreger bis zu 155 Tage nach ihrer Infektion übertragen können (Lewis et al., 1977; Neer, 1998). *E. canis* parasitiert in Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten befallener Caniden (Mylonakis et al., 2003). Die Larven und Nymphen der Zecken infizieren sich im Gegenzug bei der Blutmahlzeit an infizierten Hunden (Lewis et al., 1977; Neer, 1998). Die Übertragung scheint ausschließlich transstadial zu erfolgen. Eine transovariable Übertragung von einer Zeckengeneration auf die Nächste wurde bisher nicht nachgewiesen (Groves et al., 1975). Die Zecken sind somit nicht als echtes Reservoir für den Erreger anzusehen (Neer, 1998).

Die Entwicklung von *E. canis* innerhalb des Zytoplasmas der Wirtszellen wurde im Zuge der ersten erfolgreichen in vitro Kultivierung des Erregers bereits 1971 näher erforscht. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde eine leichte Aufhellung des Zytoplasmas der

Wirtszellen beobachtet und es konnten in vielen Monozyten bereits einzelne sogenannte Elementarkörperchen beobachtet werden. Nach einer weiteren Inkubationsphase von zwei bis drei Tagen stieg die Zahl der Elementarkörperchen an. Elementarkörperchen formten nun 0,5 bis 2,5  $\mu\text{m}$  große, unreife zytoplasmatische Einschlüsse (Initialkörperchen), die pleomorph waren und aus dicht gepackten Elementarkörperchen bestanden. Während der nächsten sieben bis zwölf Tage entwickelten sich die Initialkörperchen zu etwa 0,4  $\mu\text{m}$  großen Morulae (reife Einschlusskörperchen). Die Morulae erschienen größer als die unreifen Formen, eher oval und konnten eindeutig voneinander abgegrenzt werden. Als Untereinheiten der Morulae wurden Elementarkörperchen identifiziert. In diesem Entwicklungsstadium waren viele Monozyten auf das drei- bis vierfache ihrer ursprünglichen Größe angewachsen und enthielten bis zu 70 intrazytoplasmatische Morulae. In einigen Monozyten wurden Kolonien freier Elementarkörperchen detektiert. Während der zwölf- bis 18-tägigen Inkubationszeit der Zellkultur wurden die Morulae allmählich von Vakuolen umgeben (Nyindo et al., 1971). Die Teilungsprozesse der Elementarkörperchen wurden als binäre Teilungen identifiziert (von Löwenich und Bogdan, 2001).

In der Zecke erfolgt eine Vermehrung von *E. canis* in Hämozyten, Zellen des Mitteldarmes und Zellen der Speicheldrüsen. Dabei werden sowohl männliche als auch weibliche Zecken infiziert. Alle oben für die Wirtszellen beschriebenen Entwicklungsstadien der Einschlusskörperchen, und zwar Elementarkörperchen, Initialkörperchen und Morulae, konnten in morphologisch ähnlicher Form auch in den Zellen der Zecken identifiziert werden. So wurde in den Zellen des Mitteldarmes eine starke Vermehrung der Ehrlichien beobachtet, wobei gleichermaßen Elementarkörperchen, Initialkörperchen und Morulae auftraten. Im Zytoplasma der Hämozyten schienen Initialkörperchen die dominierende Entwicklungsstufe zu sein. Die in den Speicheldrüsen der Zecken auftretenden großen Morulae erschienen dicht gepackt. In den Ovarien der infizierten Zecken konnten keine Erreger nachgewiesen werden. Dies stützt die Annahme, dass keine transovarielle Übertragung stattfindet (Smith et al., 1976). Die Übertragung des Erregers erfolgt mit dem Speichel beim Saugakt infizierter Zecken an Säugetieren offensichtlich nach Freisetzung der Erreger aus den Zellen der Speicheldrüsen (Smith et al., 1976; Lewis et al., 1977). Die Hämozyten sind wahrscheinlich für die Verbreitung von *E. canis* vom Mitteldarm in die Speicheldrüsen verantwortlich (Smith et al., 1976).

## 2.4 Geographische Verbreitung

Bei *E. canis* handelt es sich um einen Erreger mit weltweiter Verbreitung (Ewing, 1972; Neer, 1998; Suksawat et al., 2001a), wobei ein gehäuftes Auftreten in tropischen und subtropischen Regionen vorherrscht (Rikihisa, 1991; Neer, 1998). Zum ersten Mal wurde die kanine monozytäre Ehrlichiose im Jahr 1935 in Algerien beschrieben (Donatien und Lestoquard, 1935), und 1962 zum ersten Mal in den USA beobachtet (Ewing, 1963). Betroffen waren hierbei vor allem die südlichen Staaten der USA, der Erregernachweis gelang jedoch auch in nordöstlichen Regionen wie New Jersey und Pennsylvania, sowie in Connecticut (Waddle und Littman, 1988; Petersen et al., 1989; Magnarelli et al., 1990). Besondere Beachtung fand der Erreger während des Vietnamkrieges, als viele militärisch eingesetzte Hunde Hämorrhagien aufgrund einer *E. canis*-Infektion entwickelten und der Krankheit zum Opfer fielen (Huxsoll et al., 1970; Walker et al., 1970; Nims et al., 1971). Der Erreger ist mittlerweile in fast allen Verbreitungsgebieten seines wichtigsten Vektors, *R. sanguineus*, präsent (Mason et al., 2001). Hierzu zählen Südostasien, Japan, Korea, Indien, Sri Lanka, Afrika, der Mittlere Osten, Nordamerika, Hawaii, Alaska, Zentralamerika und die Karibik (Ewing 1969; Ewing, 1972; Groves et al., 1975; Keefe et al., 1982). In Europa liegen Berichte über Infektionen mit *E. canis* aus der Türkei (Batmaz et al., 2001), aus Südfrankreich (Brouqui et al., 1989), aus Griechenland (Mylonakis et al., 2003), aus Portugal (Bacellar et al., 1995), aus Spanien (Varela et al., 1997) und aus Italien (Pennisi et al., 1987) vor. Nachdem der erste Fall von CME in Italien 1987 in Sizilien diagnostiziert worden war, folgten klinische und serologische Nachweise von *E. canis* in weiteren italienischen Regionen wie Apulien, Kampanien, Umbrien, Emilia Romana und der Lombardei, wobei hier Seroprävalenzen zwischen 1,5% und 60% ermittelt wurden (Pennisi et al., 1993; Voigt et al., 1993; Baldelli et al., 1994; Vesco et al., 1994; De Caprariis et al., 1995; Baldelli et al., 1996; Piergili Fioretti et al., 1996; Proverbio et al., 1996). Seroepidemiologische Studien in endemischen Gebieten der USA zeigten, dass die Infektionsrate der Tiere bis zu 53% betrug (Rodgers et al., 1989).

In Deutschland ist *E. canis* derzeit nicht endemisch. Die Einschleppung des Erregers in gemäßigte Klimazonen erfolgt durch den Import von Tieren oder durch Auslandsaufenthalte von Hunden in endemischen Gebieten (Gothe, 1998; Pusterla et al., 2000b). Da die Übertragung und endemische Etablierung jedoch an das Vorkommen von *R. sanguineus* gebunden ist, ist in gemäßigten Klimazonen eine endemische Verbreitung nicht zu erwarten.

## 2.5 Klinische Symptome und Therapiemöglichkeiten

Die kanine monozytäre Ehrlichiose verläuft in drei Phasen (Harrus et al., 1997). Nach einer Inkubationszeit von acht bis 20 Tagen kommt es zunächst zu einer akuten Phase der Erkrankung, in der Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit, Dyspnoe, Anorexie, Lymphadenopathie und Gewichtsverlust auftreten. Labordiagnostisch sind Thrombozytopenie, Leukopenie, geringgradige Anämie und Hypergammaglobulinämie zu diagnostizieren (Buhles et al., 1974; Kühn und Gaunt, 1985; Rikihisa, 1991). Nach zwei bis vier Wochen entwickelt sich eine subklinische Phase ohne klinische Symptome und mit einer geringgradig ausgeprägten Thrombozytopenie, die 40 bis 120 Tage, oder sogar Jahre, dauern kann, während der die Tiere persistierend infiziert sind (Codner und Farris-Smith, 1986). Im Anschluss kann sich als dritte Stufe die chronische Phase entwickeln, bei der wiederum klinische Symptome in unterschiedlich schwerer Ausprägung auftreten, die neben den Krankheitserscheinungen der akuten Phase, zusätzlich Hämorrhagien, Epistaxis, Ödemen oder ZNS-Symptomen einschließen. Die Laborbefunde ähneln denen der akuten Phase. Komplikationen während dieses Stadiums der kaninen monozytären Ehrlichiose (CME) treten oft im Zusammenhang mit Sekundärinfektionen auf (Buhles et al., 1974; Kuehn und Gaunt, 1985; Rikihisa, 1991; Neer, 1998).

Einer Empfehlung der „Infectious Disease Study Group of the American College of Veterinary Internal Medicine“ folgend, sollte die Behandlung von CME durch Doxzyklin (10 mg/kg Körpergewicht täglich) für 28 Tage erfolgen (Neer et al., 2002). Eine Therapie der akuten CME mit einer Kombination aus Doxzyklin und Imidocarbdiopropionat ist ebenfalls möglich (Harrus et al., 1997), während Enrofloxazin nicht wirksam ist (Neer et al., 1999). Studien haben jedoch gezeigt, dass eine Erregerelimination trotz antibiotischer Behandlung häufig nicht gelingt (Iqbal und Rikihisa, 1994; Wen et al., 1997). Dieses Risiko erscheint besonders hoch, wenn Tiere nicht in der akuten, sondern erst in der subklinischen oder chronischen Phase der Erkrankung therapiert werden (Dawson und Ewing, 1992; Harrus et al., 1998b; Harrus et al., 2004). Da für *E. canis* derzeit keine Vakzine erhältlich ist (Felek et al., 2003), beschränken sich präventive Maßnahmen auf die Zeckenprophylaxe, wenn sich Tiere in endemischen Gebieten aufhalten (Kuffer-Frank et al., 1999; Pusterla et al., 2000b).

## 2.6 Diagnose der kaninen monozytären Ehrlichiose

### 2.6.1 Hämatologie

Bei einer Infektion mit *E. canis* kommt es zu mehr oder weniger charakteristischen Veränderungen der hämatologischen Befunde (Buhles et al., 1974; Kühn und Gaunt, 1985; Rikihisa, 1991), die eine Verdachtsdiagnose erhärten können. Am häufigsten wird bei betroffenen Tieren eine Thrombozytopenie beobachtet (Troy und Forrester, 1990), die in der subklinischen Phase der Erkrankung weniger ausgeprägt ist als in der akuten und chronischen Phase (Buhles et al., 1974; Waddle und Littman, 1988). Die Ursachen für die auftretende Thrombozytopenie sind bisher noch unklar, als Gründe wurden jedoch immunmedierte Zerstörung der Blutplättchen (Waner et al., 1995), verringerte Produktion (Harrus et al., 1997), erhöhter Verbrauch (Harrus et al., 1997), verkürzte Lebensdauer (Smith et al., 1974) oder Sequestration der Blutplättchen in der Milz (Harrus et al., 1998a) vermutet. Eine Thrombozytopenie tritt jedoch nicht immer auf und eine Infektion mit *E. canis* kann nicht ausgeschlossen werden, wenn die Thrombozytenanzahl im Referenzbereich liegt (Waner et al., 1997). Das Zählen der Blutplättchen erscheint jedoch in endemischen Gebieten als „Screening-Test“ geeignet (Troy und Forrester, 1990), wenn im Anschluss eine Bestätigung der Infektion mit geeigneten diagnostischen Methoden erfolgt (Bulla et al., 2004).

Aufgrund der Infektion mit *E. canis* kommt es, wie generell bei Infektionen, zu Verschiebungen in den Eiweißfraktionen im Serum. Daher kann eine Eiweißelektrophorese des Serums ebenfalls zu einer Verdachtsdiagnose führen. Meist ist hierbei eine polyklonale Hyperglobulinämie zu beobachten (Harrus et al., 1996). Dieses Verfahren wird in Italien sehr häufig als „Screening Test“ angewandt um zu überprüfen, ob Hunde, die beispielsweise neu in ein Tierheim kommen, Infektionen aufweisen (Persönliche Mitteilung Frau Friz, Tierheimleiterin der Lega Pro Animale, Italien). Aufgrund der Unzuverlässigkeit und Unspezifität scheint dieses Verfahren jedoch ungeeignet, um CME zu diagnostizieren.

### 2.6.2 Direkter Erregernachweis im Ausstrich

Eine eindeutige Diagnose der CME kann durch den Nachweis von **Morulae** als Einschlusskörperchen in Giemsa-gefärbten Ausstrichen von Vollblut, Buffy-Coat,

Knochenmarksaspiraten und Milzaspiraten lichtmikroskopisch erfolgen (Beaufils et al., 1995; Mylonakis et al., 2003; Abb. 2). Der lichtmikroskopische Nachweis gelingt, wenn überhaupt, nur in der akuten Phase der Erkrankung (Huxsoll et al., 1972; Harrus et al., 1998a) und besitzt je nach Ausgangsmaterial unterschiedliche Sensitivität. So wurde bei der Untersuchung von Ausstrichen aus peripheren Blut teilweise nur eine Sensitivität von 4 % erreicht (Elias, 1991).

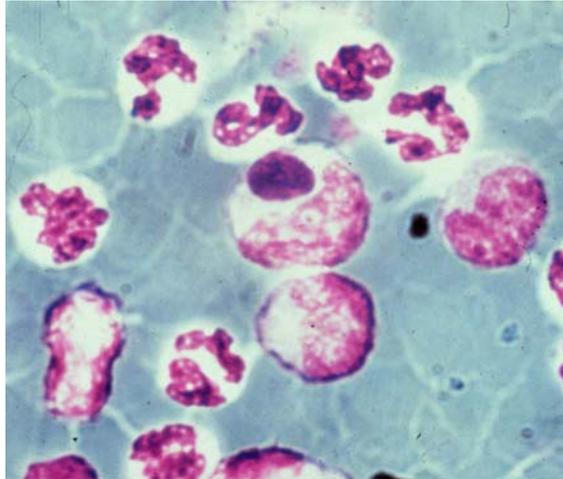


Abb. 2: Morulae von *E. canis* in einem Monozyten

In einer neueren Studie wurde die diagnostische Sensitivität verschiedener Ausgangsmaterialien (Buffy-Coat, Blut, Lymphknoten- und Knochenmarksaspiraten und Material aus Kulturen) zur zytologischen Diagnostik akuter CME verglichen (Mylonakis et al., 2003). Hierbei wurden jeweils 1000 Ölimmersionsfelder untersucht und die höchste Sensitivität bei der Auswertung von Ausstrichen aus Buffy-Coat-Material (66%) und Lymphknotenaspiraten (60,9%) erzielt, während die Sensitivität bei der Untersuchung von Blutausstrichen nur bei 8% lag. Peripheres Blut wurde somit als Ausgangsmaterial für die lichtmikroskopische Untersuchung als ungeeignet beurteilt, um eine Infektion mit *E. canis* zu diagnostizieren. Aber auch mit Material aus Kurzzeit-Kulturen und Knochenmark, wurde lediglich eine unzureichende diagnostische Sensitivität von 14,6% bzw. 34% erreicht. Morulae wurden häufiger in Lymphozyten als in Monozyten gefunden. Der Vorteil zytologischer Nachweismethoden wurde in den geringen Kosten und der einfachen Durchführbarkeit gesehen, während der Grad der Sensitivität einen deutlichen Nachteil darstellte, durch die Auswahl geeigneten Untersuchungsmateriales aber stark beeinflusst werden konnte und

Ausstriche aus peripherem Blut als ungeeignet beurteilt wurden (Mylonakis et al., 2003). In Thailand beispielsweise stellte die Untersuchung von Blutausstrichen auf das Vorhandensein von Morulae trotz der Insensitivität der Methode den „Gold Standard“ in der Diagnostik der Ehrlichieninfektionen dar (Suksawat et al., 2001b).

### 2.6.3 Serologische Nachweisverfahren

Seit 1972 werden serologische Verfahren zur Diagnostik der CME angewandt (Ristic et al., 1972), die üblicherweise auf dem Nachweis von Antikörpern im **indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest** (IFAT) beruhen (Mathew et al., 2000; Suksawat et al., 2000). Dieser Test stellt seither den „serologischen Gold Standard“ zum Nachweis einer *E. canis*-Exposition dar (Waner et al., 2001). Antikörper gegen *E. canis* können bei experimentell infizierten Tieren je nach Höhe der eingesetzten infektiösen Dosis oft schon zwei bis sechs Tage nach der Exposition nachgewiesen werden (Rikihisa et al., 1992; Iqbal et al., 1994). In einigen Fällen dauert es jedoch bis zu 28 Tagen, bis eine Serokonversion feststellbar ist (Neer, 1998). Llera et al. entwickelten 2002 einen IFAT, bei dem ein simultaner Test auf Antikörper gegen *E. canis* und *Leishmania infantum* möglich ist, was in Gebieten, in denen beide Erreger endemisch sind, eine Zeit- und Kostenersparnis mit sich bringen soll. Der Vorteil des IFATs liegt in der hohen Sensitivität, mit der ein vorausgegangener Kontakt mit *E. canis* detektiert werden kann (Wen et al., 1997). Allerdings kann nicht zwischen aktueller Infektion und früherer Infektion oder Erkrankung mit anschließender Erregerelimination differenziert werden (Iqbal et al., 1994). Dies stellt vor allem in endemischen Gebieten ein Problem dar. Ein weiterer Nachteil des IFAT ist die ausgeprägte Kreuzreaktivität mit anderen Ehrlichienarten, also die geringe Spezifität (Perez et al., 1996; Rikihisa et al., 1992). Eine *E. canis* Infektion kann von Infektionen mit *E. chaffeensis* oder *E. ewingii* beispielsweise nur durch simultane Western Immunoblot Analyse (WI) abgegrenzt werden (Rikihisa et al., 1994), was im Verbreitungsgebiet dieser Erreger, also vor allem in den USA, ein Problem darstellt, in Europa jedoch keine Rolle spielen dürfte. Durch den zusätzlichen Aufwand, die zusätzlichen Kosten und die höheren technischen Ansprüche (Iqbal et al., 1994) erscheint der WI nicht als diagnostischer Routinetest geeignet. Die Kreuzreaktivität zu *A. phagocytophilum* ist weniger ausgeprägt und tritt nur im Zusammenhang mit sehr hohen Antikörpertitern auf (Dumler et al., 1995; Nicholson et al., 1997). Nicht geeignet ist der IFAT zur Kontrolle des Therapieerfolges einer CME mit

Antibiotika. Obwohl bei den meisten Tieren nach erfolgreicher Behandlung ein Absinken der Antikörpertiter zu erwarten ist (Iqbal und Rikihisa, 1994), können erhöhte Serumantikörpertiter jedoch auch noch bis zu 15-31 Monate nach erfolgter Therapie auftreten (Perille und Matus, 1991). Ein Jahr nach Therapiebeginn zeigten bis zu 40 % der Hunde persistierende Antikörpertiter (Bartsch und Greene, 1996). Für die Durchführung und Auswertung der IFATs ist ein Fluoreszenzmikroskop und qualifiziertes Personal erforderlich.

Durch die Entwicklung eines dot-**enzyme linked immunosorbant assay** (ELISA) sollte die serologische Diagnostik vereinfacht werden (Waner et al., 2000). Dieser schnell durchzuführende Test ist semi-quantitativ und ermöglicht den Nachweis zirkulierenden Antigens ohne teure Laboreinrichtung (Ohashi et al., 1998a). Die Sensitivität und der Nachteil des Auftretens von Kreuzreaktionen wurden ähnlich wie bei den IFATs beurteilt (Waner et al., 2001). Dieser Test findet in der Diagnostik kaum Anwendung, da Probleme entstehen können, wenn in den frühen Stadien der Infektion eine Variabilität des zirkulierenden Antigens auftritt, wie sie bei experimentell infizierten Beagles beobachtet wurde (Waner et al., 1996).

### 2.6.4 Zellkultur

Die Anzucht und der anschließende Nachweis des Erregers in Zellkulturen (**Cell Culture Isolation**, CCI) wurde von Iqbal und Mitarbeitern (1994) als sensitivster und verlässlichster Test zum Nachweis kaniner Ehrlichiose angesehen. Die Isolierung von *E. canis* aus Monozyten gelang bereits zwei Tage nach experimenteller Infektion von Hunden. Ein entscheidender Nachteil für den Einsatz als Routinetest ist jedoch, dass es 14 bis 34 Tage dauert, bis das Untersuchungsergebnis vorliegt. Außerdem limitieren hohe Ansprüche an das Labor und die hohen Kosten den Einsatz. Zur Überprüfung des therapeutischen Erfolges beim Einsatz von Antibiotika erscheint die CCI aufgrund der hohen Sensitivität jedoch die Methode der Wahl zu sein (Iqbal et al., 1994).

### 2.6.5 Molekularbiologische Nachweisverfahren

Aufgrund der geringen Spezifität von IFAT und ELISA, der geringen Sensitivität von Hämatologie und lichtmikroskopischer Untersuchung von Ausstrichen und der aufgrund Zeit- und Kostenfaktoren eingeschränkten Eignung der CCI für die Routinediagnostik wurden molekularbiologische, auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) basierende Test zum Nachweis von *E. canis* entwickelt. Mit diesen modernen Nachweisverfahren konnte der Erregernachweis bereits vier bis sieben Tage nach erfolgter Infektion erbracht werden (Iqbal et al., 1994; McBride et al., 1996; Wen et al., 1997; Breitschwerdt et al., 1998a; Mathew et al., 2000; Pusterla et al., 2000a; Inokuma et al., 2001b; Stich et al., 2002)

Iqbal und Mitarbeiter entwickelten 1994 die erste speziesspezifische PCR zum Nachweis von *E. canis*, die als Zielgen die 16S rDNA verwendete und mit einem universellem bakteriellen Primer A17 (5'-GTTTGATCATGGCTCAG-3') und dem Primer EC3 (5'-TTAAAAGCCGCTCCAAA-3') ein 600 bp-Produkt ergab. Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (0,7%iges Agarosegel) und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht und lediglich anhand ihrer Größe verifiziert. Hierbei wurde DNA verwendet, die aus DH82-Zellen extrahiert wurde, die mit *E. canis* infiziert waren. Es wurde nicht überprüft, ob auch andere Ehrlichienarten ein PCR-Produkt lieferten. Stattdessen wurde die Spezifität nur anhand extrahierter DNA aus nicht mit *E. canis* infizierten DH82-Zellen überprüft. Unter Verwendung von Verdünnungsreihen der aus infizierten DH82-Zellen extrahierten DNA wurde für die PCR eine Nachweisgrenze von 20 pg DNA ermittelt.

Aufgrund der unzureichenden Sensitivität und nicht ausreichend überprüften Spezifität des obigen PCR-Protokolls entwickelten McBride und Mitarbeiter (1996) ein Nachweisverfahren mit PCR und anschließender Sondenhybridisierung. Die Amplifizierung eines 495 bp-Produktes der 16S rDNA von *E. canis* erfolgte mit den Primern EC1 (5'-TTATAGCCTCTGGCTATAGG-3') und EC2 (5'-CACTTTTAACTTACTAGTCC-3'). Wenn das PCR-Produkt im Anschluss lediglich mittels Agarosegelelektrophorese (1,5%iges Agarosegel) und Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht wurde, wurde eine Sensitivität von 320 pg, entsprechend  $1,5 \times 10^6$  Organismen ermittelt. Durch zusätzlichen Southern Blot und Hybridisierung mit einer internen, 297 bp großen, mit Peroxidase markierten Sonde war es möglich das PCR-Produkt zu verifizieren und die Nachweisgrenze auf 30 fg zu verringern,

was etwa 150 *E. canis* Organismen entspricht. Die Spezifität der PCR wurde mit nahe verwandten Ehrlichienarten überprüft. DNA von *E. chaffeensis*, *A. platys*, und *N. risticii* wurde nicht amplifiziert.

Eine „single-round“ PCR, die als Zielgen ebenfalls die 16S rDNA hat, wurde anhand früher publizierter Sequenzen der 16S rDNA von *E. canis* (Anderson et al., 1991) von Pusterla und Mitarbeitern entwickelt. Die Primer EC1 (5'-CGGACAATTATTTATAGCCTC-3') und EC2 (5'-CCATTACCTCACCAACTAG-3') amplifizierten ein 191 bp großes Fragment. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und anschließend sequenziert. Es konnte eine in vitro mit *E. canis* infizierte Zelle detektiert werden. Weitere Angaben über Sensitivität und Spezifität des Tests lagen nicht vor (Pusterla et al., 2000a).

Die Sensitivität der PCRs sollte durch den Einsatz von geschachtelten PCRs („nested“-PCRs) erhöht werden. Im Rahmen von Studien über *E. chaffeensis* wurden verschiedene Sequenzen publiziert und mehrere genus- und speziesspezifische Primer entwickelt. Verschiedene dieser Primer wurden 1997 von Wen und Mitarbeitern kombiniert, um eine spezifische PCR für *E. canis* zu entwickeln und auf ihre Spezifität und Sensitivität überprüft. Hierbei erfolgte zunächst mit den Genus-spezifischen Primern ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGGC AAGCC-3') und ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGC-3') die Amplifikation eines 478 bp-Fragments der 16S rDNA. Dieses PCR-Produkt wurde dann als Template in die zweite PCR eingesetzt, in der mit den Spezies-spezifischen Primern HE-3 (5'-TATAGGTA CCGTCATTATCTTCCCTAT-3') und ECA (5'-CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAG GAA-3') ein 389 bp-Fragment der 16S rDNA von *E. canis* amplifiziert wurde, das mittels Agarosegelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid und anschließender Hybridisierung verifiziert wurde. Die Sensitivität dieses Protokolls wurde mit 0,2 pg *E. canis*-DNA ermittelt. Die Spezifität wurde anhand nahe verwandter Ehrlichienarten (*E. chaffeensis*, *E. muris*, *N. helminthoeca* und SF Agens) überprüft, wobei in der zweiten Reaktion nur *E. canis* ein PCR-Produkt lieferte (Anderson et al., 1992; Dawson et al., 1996a; Wen et al., 1997).

Breitschwerdt und Mitarbeiter (1998a) entwickelten eine „semi-nested“ PCR, die als Zielgen die 16S rDNA hat. Hierbei wurde die erste Amplifikation mit den Primern GE2f (5'-GTTA GTGGCATAACGGGTGAAT-3') und EC19 (5'-AAGGATCCACTCATCGTTTACAGCG

TGG-3') durchgeführt, wobei ein 780 bp großes Fragment entstand. Bei der zweiten PCR wurde der Primer EC19 durch den Primer GE7r (5'-CCGTATCTCAGTTCCAGTGTG-3') ersetzt und ein 220 bp großes Produkt amplifiziert, das im Anschluss durch Agarosegelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht verifiziert wurde. Der Primer GE2f wurde nach eigenen Recherchen bereits früher von Dawson und Ewing (1992) verwendet und aus der Literatur übernommen. Über Sensitivität und Spezifität dieser PCR liegen keine Angaben vor.

Eine weitere Modifikation in der Entwicklung einer PCR für den Nachweis von *E. canis* stellte die Publikation einer PCR mit biotinylierten Primern dar. Es wurden bereits früher entwickelte Primer (Dawson et al., 1996a; Murphy et al., 1998a) verwendet. In einem zweiten Versuchsansatz wurde einer der beiden Primer mit Biotin markiert, das gereinigte PCR-Produkt auf eine Nylon-Membran geblottet und das Biotin-markierte PCR-Produkt mittels einer immunologischen Reaktion mit anti-Biotin-Antikörpern detektiert. Die Sensitivität beim Einsatz der biotinylierten Primer war um den Faktor 10 bis 100 höher als ohne Labeling, wobei 6,4 ng PCR Produkt nachgewiesen werden konnten. Die Spezifität wurde mit den nahe verwandten Spezies *E. chaffeensis* und *A. platys* überprüft, wobei keiner der beiden Erreger ein PCR-Produkt ergab, womit Spezifität und Sensitivität ähnlich wie beim Ersatz von „nested“-PCRs (Wen et al., 1997) und PCRs mit anschließender Sondenhybridisierung (McBride et al., 1996) beurteilt wurden. Der Vorteil dieser PCR gegenüber PCR/CH oder nested-PCR wurde in der schnelleren und weniger kostenintensiven Durchführung gesehen (Mathew et al., 2000). Der Arbeits- und Kostenaufwand für das Labeling, das Blotting und die Immunreaktion dürfen jedoch nicht übersehen werden.

Die erste PCR für *E. canis*, die als Zielgen nicht die 16S rDNA hat, wurde 2001 von Inokuma und Mitarbeitern veröffentlicht. Hierbei wurden mehrere genus- und speziesspezifische Primersets entwickelt, um möglichst große Fragmente des Gens für die Citrat Synthase (gltA), das erste Enzym des Zitratzyklus, zu amplifizieren. So konnte unter anderem ein 1251 bp großer Abschnitt des gltA-Genes von *E. canis* identifiziert werden. Diese PCR wurde zur Durchführung phylogenetischer Analysen verschiedener Ehrlichienspezies anhand möglichst langer Sequenzabschnitte entwickelt (Inokuma et al., 2001b). Aufgrund der Größe der PCR-Produkte und fehlender Angaben über Spezifität und Sensitivität des Tests ist eine Eignung für die Diagnostik fraglich.

Das Gen für ein 30 kDa großes Membranprotein von *E. canis*, das sogenannte p30-Gen, wurde von Stich und Mitarbeitern für ein „nested“-PCR Protokoll verwendet. Dieser Test wurde eigens für die Detektion von *E. canis* in kaninem Blut und Zecken entwickelt. Basierend auf Vergleichen mit den Sequenzen des p28-Genes von *E. chaffeensis* wurden spezies-spezifische Primersets konstruiert. Die erste Reaktion wurde mit den Primern ECA30-353S (5'-CATGATTGGGATGGAAGTCCAATAC-3') und ECA30-597A (5'-ATGGCTGCCGATGTGTGATG-3') durchgeführt, die zweite mit den Primern ECA30-384S (5'-ATAAACACGCTGACTTTACTGTTCC) und ECA30-583A (5'-GTGATGAGATAGAGCGCAGTACC), welche ein 200 bp großes Fragment amplifiziert, das mit Hilfe von Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen sichtbar gemacht wurde. Die Sensitivität des p30 Assay erwies sich als um den Faktor 100 bis 1000 höher als bei der PCR nach Wen et al. (1997). Die Spezifität wurde gegenüber den nahe verwandten Ehrlichienarten *E. chaffeensis*, *E. muris* und HGE Agent überprüft. Nur mit *E. canis* ergab sich ein nachweisbares PCR-Produkt (Stich et al., 2002).

Traditionelle „single-round“ PCRs können aufgrund der gezeigten geringeren Sensitivität gegenüber modifizierten Verfahren oder „nested“-PCRs keine zufriedenstellenden Ergebnisse in der Diagnostik von *E. canis* liefern (McBride et al., 1996; Wen et al., 1997; Mathew et al., 2000; Stich et al., 2002). „Nested“ Techniken, Biotin-Labeling und anschließender immunologischer Nachweis sowie Sondenhybridisierung im Anschluss an die PCR bringen jedoch einen nicht unerheblich höheren Arbeits- und Kostenaufwand mit sich. Deswegen ist die Entwicklung sensitiver und zugleich schnell durchzuführender Tests anzustreben. Zudem hat sich aufgrund von Sequenzvergleichen gezeigt, dass die 16S rDNA innerhalb des Genus *Ehrlichia* viele konservierte Bereiche aufweist, was die Konstruktion speziesspezifischer Primer erschwert (siehe auch Kap. 4.6.5), weshalb andere Gene, für die Sequenzinformationen verfügbar sind, bei der Entwicklung neuer molekularbiologischer diagnostischer Verfahren berücksichtigt werden sollten.

### 3. *Anaplasma phagocytophilum*

Bei *A. phagocytophilum*, dem Erreger der granulozytären Ehrlichiose, handelt es sich um kleine (0,2-2 µm), gram-negative, kokkoide bis ellipsoide, oft pleomorphe und obligat intrazellulär parasitierende Bakterien, die Leukozyten ihrer Wirtstiere infizieren. Hierbei sind zwei Strukturformen zu beobachten: eine größere, retikuläre Form und eine kleine, dichte Kernform, die kondensiertes Protoplasma enthält (Rikihisa, 1991; Chen et al., 1994; Neer, 1998; Dumler et al., 2001). In infizierten Zellen sind lose gepackte kleine Morulae als Einschlusskörperchen nachweisbar, die üblicherweise einen Durchmesser von 1,5 bis 2,5 µm haben, aber auch eine Größe von bis zu 6 µm erreichen können (Rikihisa, 1991; Popov et al., 1998). Eine erfolgreiche Kultivierung von *A. phagocytophilum* kann in Zellkultur mit von Zecken stammenden IDE8- und ISE6-Zellen oder der humanen Zelllinie HL-60 erfolgen (Goodman et al., 1996; Munderloh et al., 1996; Munderloh et al., 1999). Der Energiestoffwechsel verläuft analog *E. canis* (Rikihisa, 1991).

#### 3.1 Taxonomische Einordnung

Zunächst wurde das Genus Ehrlichia in drei Gruppen eingeteilt, wobei *E. phagocytophila*, *E. equi* und der Erreger der Humanen Granulozytären Ehrlichiose (genannt HGE-Agens) als separate Spezies angesehen wurden und zur *E. phagocytophila*-Gruppe zählten, bis es 2001 zur bereits erwähnten Neuordnung innerhalb der Rickettsiales kam. Seither sind alle drei Erreger aufgrund ihrer phylogenetischen und phänotypischen Eigenschaften innerhalb der Familie der Anaplasmataceae und der Gattung *Anaplasma* unter der Spezies *A. phagocytophilum* zusammengefasst (Dumler et al., 2001).

#### 3.2 Wirtsspektrum und Vektoren

Das Wirtsspektrum von *A. phagocytophilum* umfasst sowohl zahlreiche Haus-, Nutz- und Wildtierarten als auch den Menschen. Betroffene Haus- und Nutztiere sind Pferde, Hunde, Katzen, Schafe, Rinder, Bisons und Lamas. Eine experimentelle Infektion gelang zusätzlich

bei Meerschweinchen, Primaten und Mäusen (Neer, 1998; Bjoersdorff et al., 1999). Als Erregerreservoir für *A. phagocytophilum* gelten Wildtiere. In Europa sind dies vor allem Rotwild (*Cervus elaphus*), Rehe (*Capreolus capreolus*), Gemsen (*Rupicapra rupicapra*), Rotfüchse (*Vulpes vulpes*) und kleine Nagetiere (Alberdi et al., 2000; Liz et al., 2000; 2002; Petrovec et al., 2002), während in den USA die Weißfuß-Hirschmaus (*Peromyscus leucopus*) und Weißwedelhirsche (*Odocoileus virginianus*) als Hauptreservoir gelten (Telford et al., 1996; Kim et al., 2002; Munderloh et al., 2003). Beim Menschen wurde der Erreger erstmals 1994 dokumentiert (Bakken et al., 1994). Mittlerweile werden Ehrlichieninfektionen beim Menschen als „Emerging tick-borne infections“, mit einer zunehmenden Zahl an Fällen in den USA und Europa, betrachtet (Christova et al., 2003). Während es sich beim Menschen meist um eine selbstlimitierende Erkrankung handelt, liegen Berichte über persistierende Infektionen bei Wiederkäuern und Nagetieren vor (Dumler und Bakken, 1996; Stuen et al., 1998; Stafford et al., 1999).

Als Vektoren für *A. phagocytophilum* fungieren Zecken der Familie *Ixodidae*. In den USA erfolgt die Übertragung durch den Stich von Zecken der Arten *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus*, während in Europa *Ixodes ricinus*, der gemeine Holzbock, als Vektor identifiziert wurde (Daniels et al., 1997; Reubel et al., 1998b). Experimentell konnte sowohl die Übertragung des Erregers vom infizierten Säugetier (Schaf) auf Zecken (*Ixodes ricinus*), als auch von infizierten Zecken auf das Wirtstier bewiesen werden (Ogden et al., 2003). *I. ricinus* stellt in Europa die häufigste Zeckenart mit einer Verbreitung von Portugal bis zum kaspischen Meer dar (Eckert et al., 2005) und besitzt ein extrem weites Wirtsspektrum, das neben Haus- und Nutztieren auch viele Wildtiere wie beispielsweise Vögel, Eidechsen, Igel, kleine Säugetiere, Rehe und Füchse umfasst (Gray, 2002). Die Übertragung von *A. phagocytophilum* erfolgt transstadial (Telford et al., 1996). In Zecken der Spezies *Dermacentor reticulatus* konnte der Erreger der granulozytären Ehrlichiose bei einer Untersuchung in Österreich nicht nachgewiesen werden, während der Nachweis in *I. ricinus* erfolgreich war (Sixl et al., 2003).

### 3.3 Entwicklungsszyklus

Bei *A. phagocytophilum* handelt es sich um einen durch Zecken übertragenen Erreger (Dumler et al., 2001) mit zoonotischem Potential (Madigan et al., 1995). Der Lebenszyklus

von *A. phagocytophilum* erfasst Schildzecken als Vektoren und Säugetiere. Wildtiere werden als natürliches Reservoir angesehen (Polin et al., 2004). Der Erreger parasitiert in Leukozyten infizierter Wirtstiere (Neer, 1998), wobei die Übertragung vermutlich durch den Speichel infizierter Zecken beim Saugakt erfolgt (Ogden et al., 2003).

Bei der Adhäsion an die Wirtszelle spielt ein Oberflächenprotein (msp2) eine entscheidende Rolle, wobei als Rezeptor der P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) fungiert (Goodman et al., 1999; Herron et al., 2000; Park et al., 2003). Nach der Aufnahme infektiöser Elementarkörperchen in die Zelle erfolgt die Vermehrung durch Zweiteilung und die Entwicklung von Initialkörperchen. Aus einem Initialkörperchen (1 bis 1,5 µm) entwickelt sich dann innerhalb von einigen Tagen eine Morula (1,5 bis 6 µm). In einer Wirtszelle können mehrere Morulae vorhanden sein (von Loewenich und Bogdan, 2001). Die Vermehrung der Organismen findet hauptsächlich in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten statt, während Monozyten und Lymphozyten sekundäre Wirtszellen für *A. phagocytophilum* darstellen (Streit, 1993).

Die Übertragung des Erregers von den Zecken auf die Säugetiere erfolgt ausschließlich transstadial (Telford et al., 1996), wobei sowohl eine Übertragung der Erreger von Zecken der Art *I. ricinus* auf Schafe als Wirtstiere, als auch umgekehrt experimentell bewiesen ist (Ogden et al., 2003). Die Entwicklung innerhalb der Zecken wurde bislang nicht näher erforscht. Aufgrund der Zugehörigkeit zur Familie Anaplasmataceae ist jedoch anzunehmen, dass die Entwicklung, Vermehrung und Verbreitung in Zecken sowie die Übertragung auf Säugetiere ähnlich wie bei *E. canis* verläuft (Kap. 2.3).

### 3.4 Geographische Verbreitung

Der Erreger der granulozytären Ehrlichiose, *A. phagocytophilum* ist in den USA, Kanada, Europa, Afrika und Asien verbreitet (Neer, 1998; Madigan und Pusterla, 2000). Zum ersten Mal wurde er 1940 als infektiöses Agens des „Zeckenfiebers“, einer Erkrankung bei Wiederkäuern, die bereits 1932 beschrieben wurde (Gordon et al., 1932), identifiziert (Gordon et al., 1940).

In den USA wurde die Erkrankung erstmals 1961 bei Pferden in Nordkalifornien dokumentiert (Gribble, 1969). Sie wurde anschließend mit zunehmender Häufigkeit auch in Washington, Oregon, New Jersey, Colorado, Illinois, Minnesota, Connecticut, Florida und Wisconsin diagnostiziert (Madigan und Pusterla, 2000). Das Infektionsspektrum beschränkte sich hierbei nicht auf Pferde. Der Infektionsnachweis gelang zudem bei Hunden (Magnarelli et al., 2001). Die ersten Fälle in der Humanmedizin in den USA (Minnesota-Wisconsin-Region) wurden 1994 dokumentiert (Bakken et al., 1994). Bei Pferden gibt es bestätigte Fälle außerhalb der USA in Kanada, Brasilien und Europa (Madigan und Pusterla, 2000).

Bei Hunden in Europa wurde granulozytäre Ehrlichiose zunächst in Schweden (Johansson et al., 1995; Egenvall et al., 1997) und anschließend auch in Slowenien (Tozon et al., 2003) nachgewiesen. Bei Haus-, Wild- und Nutztieren konnte *A. phagocytophilum* in Europa zudem in Italien (Manna et al., 2004), Spanien (Oporto et al., 2003), Norwegen (Stuen et al., 2002), Österreich (Polin et al., 2004), der tschechischen Republik (Petrovec et al., 2003) und in der Schweiz (Liz et al., 2002) nachgewiesen werden. Der molekularbiologische Erregernachweis beim Menschen gelang für Europa erstmals 1996 in Slowenien (Petrovec et al., 1997). Weitere Infektionen des Menschen in Europa wurden in der Schweiz (Brouqui et al., 1995), den Niederlanden (Van Dobbenburg et al., 1999), Spanien (Oteo et al., 2000), Schweden, Norwegen (Bjoersdorff et al., 1999), Kroatien (Misic-Majerus et al., 2000), Österreich (Walder et al., 2003) und Polen (Tylewska-Wierzbanowska et al., 2001) beschrieben.

In Deutschland wurde der erste Fall granulozytärer Ehrlichiose 1984 bei einem Pferd dokumentiert (Büscher et al., 1984). Beim Menschen wurde der serologische Nachweis von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* in einer Studie anhand Serumproben von Forstarbeitern erbracht, die hierbei höhere Titer aufwiesen als Personen aus der selben Region, die zu keiner Risikogruppe zählten (Fingerle et al., 1997). In Baden-Württemberg konnten ebenfalls bei 5% bis 16% der Forstarbeiter Antikörper gegen *A. phagocytophilum* nachgewiesen werden (Oehme et al., 2002). Direkte Erregernachweise beim Menschen wurden für Deutschland bislang noch nicht dokumentiert.

Seroepidemiologische Studien in Europa ergaben bei untersuchten Wildtieren Prävalenzen von bis zu 74% (Petrovec et al., 2003). Untersuchungen von Zecken mittels PCR zeigten in Deutschland eine Durchseuchungsrate von 1% bis 2,3% (Baumgarten et al., 1999; Fingerle et al., 1999; Hildebrandt et al., 2003; Hartelt et al., 2004) und in der Schweiz Prävalenzen von 1,3 % in den untersuchten Zecken (Pusterla et al., 1999b), während in Österreich mit 5,1 bis

8,7% deutlich höhere Werte ermittelt wurden (Sixl et al., 2003; Polin et al., 2004). Generell konnten für gesaugte Zecken höhere Prävalenzen ermittelt werden als für nüchterne Zecken (Baumgarten et al., 1999).

### 3.5 Klinische Symptome und Therapiemöglichkeiten

Die **granulozytäre Ehrlichiose** ist eine fieberhaft verlaufende Erkrankung mit meist unspezifischen klinischen Symptomen (Fingerle et al., 1997). Bei der **humanen granulozytären Ehrlichiose** (HGE) handelt es sich meist um eine selbstlimitierende Erkrankung, wobei es den Anschein hat, dass die Krankheit in Europa einen weniger schweren Verlauf nimmt als in den USA. Die Erkrankung verläuft in Europa oft subklinisch und hat eine günstige Prognose, während in den USA schwere Verläufe mit tödlichem Ausgang dokumentiert sind. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis sieben Tagen sind die Hauptsymptome oft grippe-ähnlich und umfassen Fieber, Myalgien und Kopfschmerzen. Desweiteren treten Konjunktivitis, Lymphadenopathie, Manifestationen im Atmungs- oder Gastrointestinaltrakt, sowie gelegentlich Hepatomegalie und Splenomegalie auf (Goodman et al., 1996; zusammengefasst durch Blanco und Oteo, 2002). Die Therapie erkrankter Menschen erfolgt mittels Antibiotika, und zwar haben sich Doxyzyklin (100mg 2mal täglich), Rifampizin und Fluoroquinolone als wirksam erwiesen, wobei Doxyzyklin aufgrund des Reservecharakters der beiden anderen Wirkstoffe das Mittel der Wahl darstellt. Nicht wirksam sind Clindamycin, Trimethoprim-Sulfonamide, Ampicillin, Amoxicillin, Erythromycin, Chloramphenicol und Gentamycin (Klein et al., 1997; Horowitz et al., 2001).

Die **granulozytäre Ehrlichiose bei Rindern und Schafen** wird auch als „Zeckenfieber“ oder „Weidefieber“ bezeichnet und tritt saisonal auf (Gordon et al., 1940; Pusterla et al., 2000b). Klinisch fallen die Tiere durch sehr hohes Fieber, Apathie, Bewegungsunlust, Anorexie, respiratorische Symptome und verringerte Milchleistung auf. Bei Schafen wurden zudem Aborte und andere Fruchtbarkeitsprobleme beobachtet (Pfister et al., 1987; Stuen et al., 2002). Hämatologische Veränderungen beinhalten Leukopenie, Thrombozytopenie und milde Anämie (Liz, 1994; Pusterla et al., 1997a). Die Patienten sprechen sehr gut auf die Behandlung mit Oxytetracyclin (10 mg/kg Körpergewicht intravenös über 3 bis 5 Tage verabreicht) an. Innerhalb von zwölf bis 24 Stunden nach Therapiebeginn kommt es zur

Rückbildung der klinischen Symptome und zur Elimination der Erreger (Vaughan, 1988; Argenté et al., 1992).

Die **equine granulozytäre Ehrlichiose (EGE)** stellt eine saisonale, üblicherweise selbst-limitierende Erkrankung dar (Gribble, 1969; Madigan, 1993). Klinische Symptome treten nach einer Inkubationszeit von zehn bis zwanzig Tagen auf und umfassen Fieber, Lethargie, Anorexie, Gliedmaßenödeme, Ataxie und Bewegungsunwilligkeit. Jüngere Tiere unter drei bis vier Jahren erkranken weniger schwer. Hämatologische Befunde sind Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie (Gribble, 1969; Madigan und Gribble, 1987). Eine erfolgreiche Therapie mit Erregerelimination bei erkrankten Pferden ist mit Oxytetracyclin (7 mg/kg Körpergewicht intravenös über 7 Tage verabreicht) möglich. Vorbeugende Maßnahmen beschränken sich auf die Zeckenprophylaxe (Pusterla et al., 2000b).

Klinische Symptome der **kaninen granulozytären Ehrlichiose (CGE)** treten nach einer Inkubationszeit von vier bis elf Tagen auf. Es handelt sich um unspezifische Symptome wie Fieber, Lethargie, Anorexie, Erbrechen und Durchfall. Labordiagnostisch sind Anämie, mäßige Thrombozytopenie, Lymphopenie und Eosinopenie auffällig (Skotarczak, 2003). Antibiotika der Wahl zur Behandlung erkrankter Hunde sind Tetracycline. Nach Verabreichung von Doxycyclin (10-20 mg/kg Körpergewicht peroral über 10 bis 14 Tage verabreicht) kommt es sehr rasch zu einer Regression der klinischen Symptome (Woody und Hoskins, 1991) und, im Gegensatz zu *E. canis*, zu einer erfolgreichen Erregerelimination. Prophylaktische Maßnahmen beschränken sich auf die Zeckenabwehr, da keine Vakzine erhältlich ist (Pusterla et al., 2000b).

## 3.6 Diagnostik

### 3.6.1 Hämatologie

Bei einer Infektion mit *A. phagocytophilum* kommt es neben den meist unspezifischen klinischen Symptomen zu Veränderungen der hämatologischen Laborbefunde, die eine Verdachtsdiagnose erhärten können. Hierbei treten Hypoproteinämie, Hypoalbuminämie, erhöhte Serumaktivität von Alkalischer Phosphatase und Amylase auf. Zudem können Proteinurie und Bilirubinurie diagnostiziert werden. Am häufigsten werden

Thrombozytopenie, Anämie und Leukopenie mit Neutro- und Lymphopenie beobachtet (Greig et al., 1996; Skotarczak, 2003). Die Ursache für die Anämie wird in einer höheren Zerstörungsrate oder gestörter Erythropoese vermutet (Buhles 1975; Pusterla et al., 1997a), während der Leukopenie möglicherweise eine Suppression der Produktion im Knochenmark (Greig et al., 1977) oder die Zerstörung infizierter Zellen zugrunde liegt (Hudson, 1950). Die Thrombozytopenie wird vermutlich durch erhöhten Verbrauch und Zerstörung der Blutplättchen in der Milz verursacht (Pusterla et al., 1997a).

### 3.6.2 Direkter Erregernachweis im Ausstrich

Während des Auftretens klinischer Symptome können in nach Giemsa oder Wright gefärbten Blutausstrichen charakteristische **zytoplasmatische Einschlusskörperchen** in Granulozyten (Abb. 3) nachgewiesen werden (Madigan und Gribble, 1987; Rikihisa, 1991).

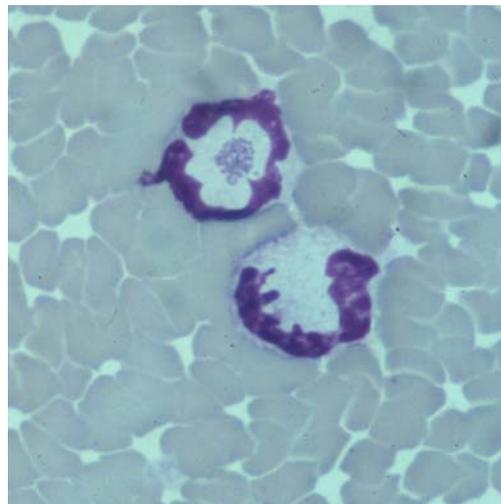


Abb. 3: Morulae von *A. phagocytophilum* in einem Granulozyten

Bei experimentell infizierten Rindern wurden Morulae in den Leukozyten fünf bis acht Tage nach der Infektion für sechs bis 14 Tage nachgewiesen. Während der Phase der Parasitämie variierte der Prozentsatz infizierter Zellen von 1 bis 30%. Die maximale Infektionsrate wurde am zweiten, dritten oder vierten Tag der Parasitämie erreicht und betrug 7,5 bis 30%, wobei der Nachweis der Morulae vor allem in neutrophilen Granulozyten gelang, während Eosinophile und Monozyten zu einem geringeren Anteil betroffen waren. Während der akuten

Phase der Erkrankung bestanden die infizierten Zellen zu 92 bis 99% aus Neutrophilen und zu 1 bis 8% aus Eosinophilen. Ab Tag vier bis sechs betrug der Anteil infizierter Monozyten an der Gesamtzahl infizierter Zellen 0,5 bis 2,5%, wobei die Infektion dieses Zelltyps bis zum Ende der Ehrlichämie persistierte (Pusterla et al., 1997a). In anderen Studien mit Wiederkäuern wurde eine deutlich höhere maximale Infektionsrate der Leukozyten von 6 bis 72% (Tuomi, 1967) bzw. 46 bis 64% (Liz, 1994) erhoben. Der Nachweis von Morulae in den Granulozyten jedoch auch bei nachgewiesener Infektion nicht immer erfolgreich (Aguero-Rosenfeld et al., 1996; Bakken et al., 1996), wobei der Nachweis von *A. phagocytophilum* im Blutausschrieb offenbar häufiger gelingt als der von *E. canis* (Leutenegger et al., 2002). Bei experimentell infizierten Hunden gelang der Nachweis von Einschlusskörperchen in Neutrophilen vier bis 14 Tage post infectionem für vier bis acht Tage (Egenvall et al., 1998).

### 3.6.3 Serologische Nachweisverfahren

Der serologische Nachweis von *A. phagocytophilum* beruht üblicherweise auf dem Nachweis spezifischer Antikörper im IFAT. Zunächst wurde ein Test zur Detektion von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* bei Pferden entwickelt (Nyindo et al., 1978). Aufgrund starker Reaktionen Ehrlichiose-verdächtiger Hunde in dem ursprünglich für Pferde entwickelten IFAT wurde vermutet, dass derselbe oder ein nahe verwandter Erreger für Krankheitsfälle bei Hunden und Pferden in Schweden verantwortlich war (Artursson et al., 1994). Im Gegensatz zum IFAT für *E. canis*, bei dem eine Kreuzreaktivität zu den nahe verwandten Arten *E. chaffeensis*, *E. canis*, *E. ewingii*, *N. risticii* und *N. sennetsu* besteht, stellen Kreuzreaktionen beim IFAT für *A. phagocytophilum* offenbar kein Problem dar (Dumler et al., 1995). Der Nachweis spezifischer Antikörper gelingt sechs bis elf Tage nach der Infektion, wobei die positiven Titer bei unbehandelten Tieren 120 bis 180 Tage persistieren (Liz, 1994; Pusterla et al., 1997a). Da es bei manchen Patienten nach einer Infektion mit *A. phagocytophilum* jedoch offensichtlich zu einer langsamen Immunantwort kommt (Bakken et al., 1996; Zhi et al., 1997), sind während der akuten Phase der Erkrankung falsch negative Ergebnisse im IFAT zu erwarten (Massung et al., 1998). Mittels eines einzelnen IFAT-Ergebnisses kann keine Differenzierung zwischen aktueller Infektion und alleinigem Kontakt bzw. früherer Infektion mit einem Erreger erfolgen (Iqbal et al., 1994). Um eine tatsächlich vorliegende akute Infektion zu diagnostizieren, ist die Untersuchung von Serumpaaren und der Nachweis eines Titeranstieges nötig (Madigan et al., 1990). Die Durchführung eines IFAT stellt hohe

Ansprüche an das Labor und erfordert ein Fluoreszenzmikroskop sowie ausgebildetes Personal (Zhi et al., 1998).

Die Entwicklung eines **ELISA** sollte die Diagnostik von *A. phagocytophilum*-Infektionen objektivieren. Dabei wurde festgestellt, dass rekombinantes p44 Antigen für die Detektion von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* im ELISA eingesetzt werden kann und mit IFAT und Western Immunoblot übereinstimmende Ergebnisse lieferte. Der Test wurde als sensitiv, spezifisch und reproduzierbar beurteilt (Magnarelli et al., 2001). Dennoch finden in der Routinediagnostik weiterhin sehr häufig IFAT und seit kurzem auch PCRs ihren Einsatz.

### 3.6.4 Zellkultur

Eine erfolgreiche Kultivierung von *A. phagocytophilum* kann in Zellkulturen von Zecken (IDE8 und ISE6) oder der humanen Zelllinie HL-60 erfolgen (Goodman et al., 1996; Munderloh et al., 1996; Munderloh et al., 1999), was in der Vergangenheit primär zur Charakterisierung wichtiger Antigene und der Identifizierung der Verwandtschaft des Erregers zu anderen obligat intrazellulären Rickettsien genutzt wurde (Murphy et al., 1998b). Der Erregernachweis mittels Zellkultur (CCI) dauert mit bis zu einem Monat sehr lange (Rikihisa, 1991; Massung et al., 1998), so dass ein Einsatz in der Diagnostik nicht praktikabel ist. Zudem wurde die diagnostische Sensitivität der CCI niedriger beurteilt als die von IFAT und nested-PCR (Zhi et al., 1998).

### 3.6.5 Molekularbiologische Nachweisverfahren

Um eine schnelle, sensitive und effiziente Diagnostik der granulozytären Ehrlichiose zu ermöglichen, wurden zahlreiche konventionelle und zwei Real-time PCRs entwickelt. Massung und Slater testeten im Jahr 2003 die bis dahin entwickelten **konventionellen PCRs**, insgesamt 13 Protokolle, auf ihre Nachweisgrenze mittels Verdünnungsreihen von mit *A. phagocytophilum* infizierten Zellen (Kultivierung in HL-60) und die Spezifität der hierbei als sensitiv gewerteten PCRs anhand von DNA von *E. chaffeensis* (Ec), *Rickettsia rickettsii* (Rr) und *Bartonella henselae* (Bh) (Tab. 1). Die Nachweisgrenze wurde dabei als geschätzte niedrigste detektierbare Zahl von mit *A. phagocytophilum* infizierten Zellen angegeben. Sie

schwankte hierbei von 0,25 bis 25 infizierten HL-60 Zellen. Von einer PCR konnte sie aufgrund hohen auftretenden Hintergrundes nicht ermittelt werden. Die neun sensitivsten PCRs, die eine Nachweisgrenze kleiner oder gleich 2,5 aufwiesen, wurden auf ihre Spezifität getestet, wobei von den Tests mit einer Nachweisgrenze von 0,25 nur die „nested“-PCR nach Massung et al. (1998), Zielgen 16S rDNA, und die PCR nach McQuiston et al. (1999), Zielgen msp2, als spezifisch befunden wurden. Ebenfalls als spezifisch erwiesen sich die Tests von Childs und Paddock (2002) und von Walls et al. (2000), sie besaßen jedoch eine deutlich schlechtere Nachweisgrenze (Massung und Slater, 2003).

Tab. 1: Getestete PCRs mit Angabe des Zielgenes, der verwendeten Primer, der Reaktionsbedingungen, der Nachweisgrenze und der Spezifität (modifiziert nach Massung und Slater, 2003)

Zielgen	Primer	Anneling- temperatur (°C)	Zyklenzahl	Nachweisgrenze	Spezifität			Referenz
					Rr	Bh	Ec	
16S	ge9-ge10	55	40	2,5	-	-	-	Childs und Paddock, 2002
16S	ec12-ec9	48, 52	3, 37	2,5	-	-	-	Childs und Paddock, 2002
nested	ge9-ge10	55	30					
16S	ehr521-ehr747	60	50	0,25	+	+	+	Pancholi et al., 1995
16S	ehr521-ehr790	55	40	0,25	-	-	+	Kolbert, 1996
16S	per1-per2	45	40	2,5	-	-	+	Goodman et al., 1996
16S	ger3-ger4	50	40	nicht ermittelbar	NT	NT	NT	Goodman et al., 1996
16S	ge3a-ge10	55	40	0,25	-	-	-	Massung et al., 1998
nested	ge9-ge2	55	30					
<i>groE</i>	hs1-hs6	48, 52	3, 37	0,25	schwach	-	-	Sumner et al., 1997
nested	hs43-hs45		30	detektierbar			+	
<i>ank</i>	la6-la1	55	40	2,5	-	-	-	Walls et al., 2000
<i>mSP2</i>	mSP2-3f-mSP2-3r	55	40	0,25	-	-	-	McQuiston et al., 1999
100 kDa	s7f-s7r	55	40	25	schwach	NT	NT	Storey et al., 1998
				detektierbar				
130 kDa	s22f-s22-r	55	40	2,5	schwach	NT	NT	Storey et al., 1998
				detektierbar				
Hsp-70	b3f1-b3r	55	40	25		NT	NT	Storey et al., 1998

Ec: *E. chaffeensis*, Rr: *Rickettsia rickettsii*, Bh: *Bartonella henselae*;

NT: nicht getestet, -:negativ, +:positiv; weitere Erläuterungen im Text;

Die erste **Real-time PCR** zum Nachweis von *A. phagocytophilum* wurde von Pusterla und Mitarbeitern (1999a) publiziert. Sie hat als Zielgen die 16S rDNA und wurde mit den Primern Ep.50r (5'-TCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTG-3') und Ep.145f (5'-CCATTTCTAGTGGCTATCCCATACTAC-3') durchgeführt. Bei der Sonde handelte es sich um die TaqMan Sonde Ep.80p (CCTATGCATTACTCACCCGTCTGCCACT), die am 5' Ende mit dem Reporter 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) und am 3' Ende mit dem Quencher 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) versehen wurde. Die Spezifität gegenüber nahe verwandten Erregern wurde mit *A. phagocytophilum*, und zwar mit den Erregern von Rind, Pferd und Mensch, die damals noch als getrennte Spezies angesehen wurden, *E. phagocytophila*, *E. equi* bzw. HGE-Agens, sowie mit *E. canis*, *N. risticii*, *Anaplasma marginale* und *Rickettsia rickettsii* getestet. Nach 45 Reaktionszyklen lieferte lediglich *A. phagocytophilum* aus Rind, Pferd und Mensch ein positives Ergebnis. Die analytische Sensitivität wurde mit 10 Kopien eines Standardplasmids angegeben und entsprach somit der von Pusterla und Mitarbeitern (1997a) publizierten nested PCR (Pusterla et al., 1999a).

Im Folgendem wurde im Jahr 2004 von Courtney und Mitarbeitern ein weiteres **Real-time PCR-Protokoll** zur Detektion von *A. phagocytophilum* publiziert. Sie ist auf das Zielgen für das Oberflächenprotein msp2 (Major Surface Protein) gerichtet und wird mit den Primern ApMSP2f (5'-ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT-3') und ApMSP2r (5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3') und der TaqMan Sonde ApMSP2p-HEX (5'-TGGTGCCAGGTTGAGCTTGAGATTG-3'), die am 5'-Ende mit Hexachloro-6-Carboxy-Fluoreszein (HEX) und am 3'-Ende mit TAMRA versehen ist, durchgeführt. Die Spezifität dieses Tests wurde anhand genomischer DNA von *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *R. rickettsii*, *Rickettsia prowazekii*, *Escherichia coli*, *B. henselae*, *E. canis*, *E. chaffeensis* und *N. sennetsu* überprüft, wobei nur *A. phagocytophilum* positive Ergebnisse lieferte. Als Nachweisgrenze wurde ein Achtel einer mit *A. phagocytophilum* infizierten Zelle (HL-60) angegeben. Die Sensitivität und Spezifität erreichten damit ähnliche Werte wie bei der traditionellen „nested“-PCR nach Massung et al. (1998) (Courtney et al., 2004).

## 4. PCR als diagnostisches Nachweisverfahren

### 4.1 PCR-Prinzip und traditionelle PCR

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, spezifische Sequenzbereiche von DNA-Abschnitten zu vervielfältigen, wenn die flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Bereichs bekannt sind (Stryer, 1999). Im Jahr 1971 wurde von Kleppe und Mitarbeitern erstmals ein Verfahren zur in vitro Amplifikation von DNA beschrieben. Aufgrund des hohen Aufwandes fand die Methode zunächst keine große Verbreitung, bis 1984 aus thermophilen Bakterien (*Thermus aquaticus*) eine DNA-Polymerase isoliert werden konnte, die die hohen Reaktionstemperaturen unbeschadet übersteht (Saiki et al., 1988; Stryer, 1999) und so nicht nach jedem Zyklus neu hinzugegeben werden muss. Die Amplifikation der DNA-Abschnitte während der PCR besteht aus drei Phasen: zunächst erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C (Denaturierungsphase). Nach Abkühlung des Reaktionsansatzes auf die sogenannte Annealing-Temperatur hybridisieren die Primer mit der nach Denaturierung einsträngig vorliegenden, komplementären Matrizen-DNA (Annealingphase). Die DNA-Polymerase verlängert in der anschließenden Elongationsphase (72 °C) die Primer, entsprechend der Sequenz des Komplementärstranges, von ihrem 3'-Ende aus und amplifiziert so den vorliegenden DNA-Abschnitt. Diese drei Phasen können durch Änderung der Reaktionstemperatur mehrmals durchlaufen werden, wobei die neu gebildeten DNA-Stränge in den Folgezyklen ebenfalls als Matrizen dienen, so dass es zu einer exponentiellen Zunahme des Amplifikats kommt (Stryer, 1999). Bei der Durchführung von sogenannten nested-PCRs wird zunächst ein Primäramplifikat vervielfältigt. Anschließend kommt es zu einer zweiten PCR, bei der die Primer innerhalb der Sequenz des Primäramplifikats hybridisieren, das Amplifikat nochmals vervielfältigen und ein zweites, kürzeres Amplifikat entstehen lassen. Bei sogenannten semi-nested-PCRs liegt nur einer der beiden Primer der Sekundärreaktion innerhalb des Primäramplifikats, während der andere Primer aus der Primärreaktion übernommen wird. Abschließend müssen in der sogenannten „traditionellen PCR“ die Produkte mit Hilfe einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht und identifiziert werden.

## 4.2 Real-time PCR

Bei der Real-time PCR wird die Entstehung der PCR-Produkte in „Echtzeit“ verfolgt. Die Identifikation des PCR-Produktes erfolgt nicht, wie oben für traditionelle PCR-Verfahren beschrieben, erst am Ende der Reaktion durch Gelelektrophorese, sondern mittels Fluoreszenz, die nach jedem Reaktionszyklus gemessen wird und die von der Produktmenge abhängig ist (Higuchi et al., 1993; Heid et al., 1996). Deshalb kann auf eine Gelelektrophorese verzichtet werden, wodurch die Kontaminationsgefahr reduziert wird. Die Generierung produktabhängiger Fluoreszenz kann entweder mittels unspezifischer Fluoreszenzfarbstoffe oder mittels fluorophormarkierter Oligonukleotide als Sonden erfolgen. Als Fluoreszenzfarbstoff wird in der Real-time PCR meist der Cyaninfarbstoff SYBR Green I eingesetzt, der weitgehend unspezifisch in der doppelsträngigen DNA bindet und nach Anregung etwa 1000mal stärker fluoresziert als der freie Farbstoff, weshalb besonders die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sichtbar gemacht werden kann (Wittwer et al., 1997; Morrison et al., 1998). Da es sich bei der mit SYBR Green I erzeugten Fluoreszenz jedoch um ein Signal handelt, das nicht nur bei der Entstehung des spezifischen PCR-Produktes, sondern auch bei der Bildung von unspezifischen PCR-Produkten und Primerdimeren entsteht, werden häufig Sonden zur Erzeugung sequenzspezifischer Fluoreszenz eingesetzt. Es handelt sich hierbei um fluorophormarkierte Oligonukleotide, die komplementär zur Zielsequenz sind, und somit hybridisieren (Cardullo et al., 1988; Wu und Brand, 1994; Clegg, 1995). Bei erfolgter Hybridisierung ist ein bei den verschiedenen Sondentypen auf unterschiedliche Weise entstehendes Fluoreszenzsignal nachweisbar, dessen Intensität von der Zahl der gebundenen Sondenmoleküle abhängt. Im Verlauf einer PCR mit entstehendem spezifischen Produkt nimmt also die Fluoreszenz zu, da je nach Sondentyp entweder die Löschung (Quench) einer Reporter-Fluoreszenz abnimmt, oder da der Resonanzenergietransfer von einem Donor- auf einen Akzeptorfluorophor zunimmt (Förster, 1948; Stryer und Haugland, 1967; Clegg, 1992). Beim Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) handelt es sich um einen spektroskopischen Prozess, bei dem Energie durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Molekülen mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren übertragen wird (Stryer und Haugland, 1967; Wilhelm, 2003). Die bekanntesten Sondentypen werden im Folgenden kurz vorgestellt (Abb. 4):

Das SONDENSYSTEM DER **Hybridisierungssonden** (FRET-Sonden; Abb. 4a) besteht aus zwei terminal markierten Sonden, die auf der Zielsequenz in unmittelbarer Nähe zueinander

hybridisieren, so dass der Donorfluor der einen Sonde neben dem Akzeptorfluor der anderen Sonde liegt. Durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge, das nur vom Donorfluor absorbiert wird, kommt es zu einem Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer auf den Akzeptorfluor, der die übertragene Energie als Fluoreszenz abstrahlt (Wittwer et al., 1997).

Die sogenannten **TaqMan-Sonden** (Hydrolysesonden; Abb. 4b) sind am 5'-Ende mit einem Reporterfluorophor und intern mit einem Quencher versehen. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit der komplementären Sequenz des Zielstranges und wird durch die 5'→3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert, die ihre Wirkung jedoch nur am Doppelstrang entfaltet, so dass nichthybridisierte Sondenmoleküle unbeschadet bleiben. Durch die Abspaltung kleiner Fragmente kommt es zu einer räumlichen Trennung von Reporter und Quencher und somit durch die Abnahme der Löschung der Fluoreszenz zu einem messbaren Signal (Holland et al., 1991; Gibson et al., 1996; Heid et al., 1996; [www.probes.com](http://www.probes.com)).

„**Molecular Beacons**“ (Abb. 4c) sind an einem Ende mit einem Reporterfluorophor und am anderen Ende mit einem Quencher markiert. Zusätzlich zur sogenannten „Loop“-Region, die für die Zielsequenz spezifisch ist, besitzen sie zueinander komplementäre Sequenzen an beiden Enden („Steam“). Diese terminalen Bereiche lagern sich in freier Lösung aneinander, so dass die Sonde in der typischen Haarnadel-Struktur („Steam-Loop“-Struktur) vorliegt. Bei der Hybridisierung mit der als Einzelstrang vorliegenden Zielsequenz kommt es zur Öffnung dieser Struktur und somit zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher, wodurch eine messbare Fluoreszenz entsteht (Tyagi und Kramer, 1996; Kostrikis et al., 1998; Tyagi et al., 1998; [www.probes.com](http://www.probes.com)).

Bei den sogenannten „**Sunrise Primern**“ (Abb. 4d) handelt es sich um Primer, die in Lösung eine Haarnadel-Struktur aufweisen, da sie am 5'-Ende selbstkomplementäre Sequenzabschnitte aufweisen. Durch diese Formation werden Reporter und Quencher in räumlicher Nähe zueinander gehalten. Als Primer dient das der Zielsequenz komplementäre 3'-Ende. Die Sonde wird in das PCR-Produkt eingebaut. Im nachfolgenden Amplifikationszyklus dient dieses Produkt als Matrize für die Verlängerung des Gegenprimers. Da sich die Hairpin-Struktur im doppelsträngigen PCR-Produkt öffnet, werden Reporterfluorophor und Quencher räumlich getrennt und es entsteht ein messbares Signal. Fluoreszenz kann bei diesem System jedoch auch durch die Bildung von Primerdimeren und unspezifischen

Produkten entstehen (Nazarenko et al., 1997; Whitcombe et al., 1998; Whitcombe et al., 1999).

Um die Generierung von Fluoreszenz durch Primerdimere zu verhindern, wurden sogenannte „**Scorpion Primer**“ (Abb. 4e) als Variante der Sunrise Primer entwickelt. Hierbei wird die Verlängerung des Gegenstranges in den Primer hinein durch eine interne Hexethylenglykolgruppe verhindert. Der freie Primer liegt in einer Steam-Loop-Struktur vor, wobei die Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher unterdrückt wird. Nach Verlängerung des 3'-Endes kommt es zur Bindung des 5'-terminalen Abschnittes auf dem DNA-Strang außerhalb der Primerregion und somit zur Öffnung der Steam-Loop-Formation. Die Öffnung des Primers nach der Bildung von Primerdimeren und unspezifischen Produkten wird somit verhindert (Wilhelm, 2003).

Eine weitere Variante sind sogenannte **Light-Up-Sonden**. Es handelt sich hierbei um Peptid-Nukleinsäuren mit Thiazolorange als Fluorophor. Die Fluoreszenzintensität wird nicht gequencht, sondern erhöht sich lediglich bei der Hybridisierung mit dem Zielstrang erheblich und wird so detektierbar. Die Sensitivität wird jedoch im Vergleich zu den oben genannten FRET-basierten SONDENSYSTEMEN wegen der erhöhten Hintergrundfluoreszenz als geringer angesehen (Isacson et al., 2000; Svanvic et al., 2000; 2001).

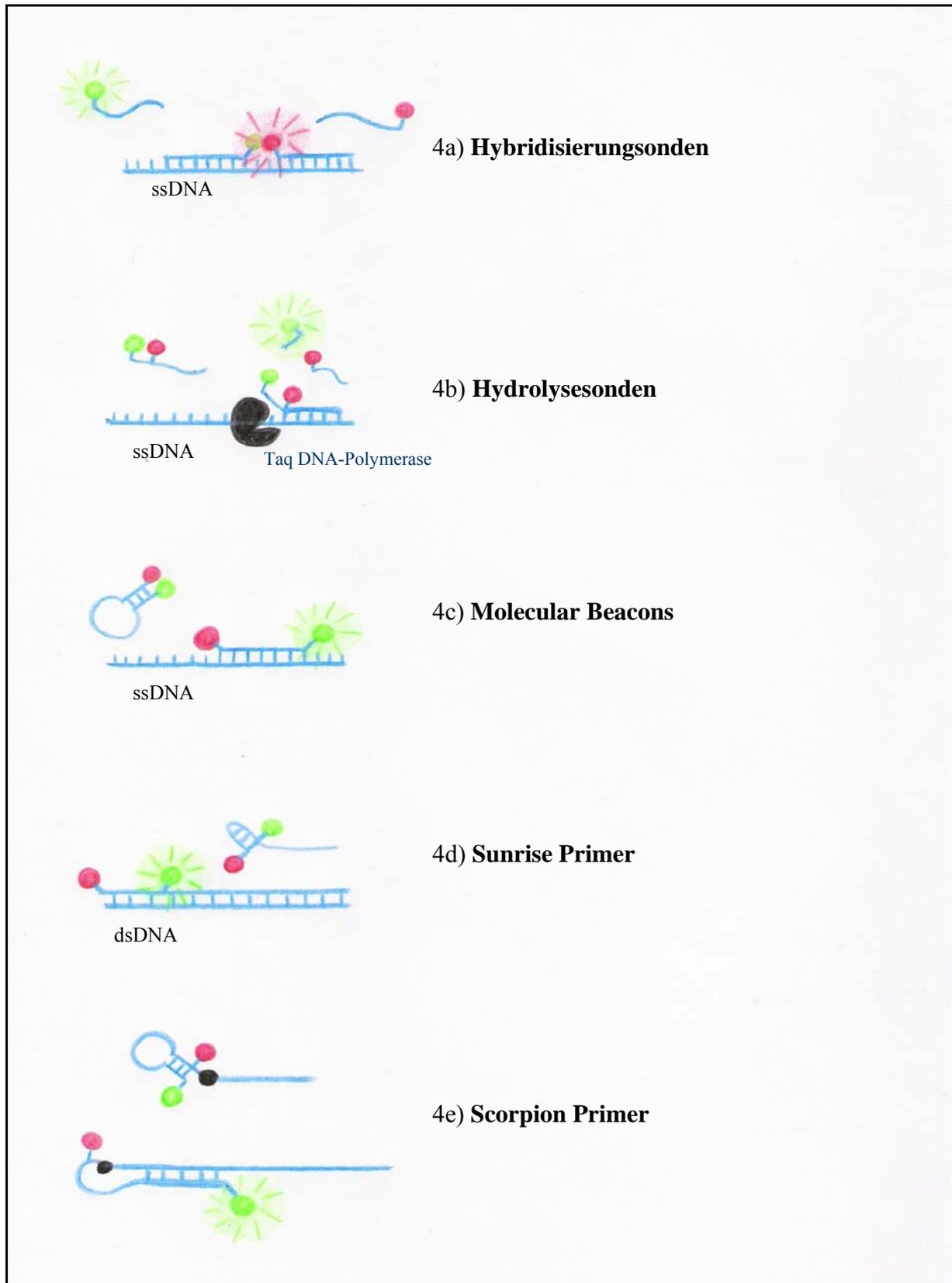


Abb. 4: Prinzipien verschiedener Sondentypen zur Erzeugung sequenzspezifischer Fluoreszenz während der Real-time PCR; ● Donor- bzw Reporterfluorophor, ● Akzeptorfluorophor bzw. Quencher, ● Hexethylglykolgruppe; (modifiziert nach Wilhelm, 2003)

### III. Eigene Untersuchungen

#### A Material und Methoden

#### 1. Entwicklung einer Real-time PCR zum Nachweis von *Ehrlichia canis* und *Anaplasma phagocytophilum*

##### 1.1 Auswahl der Zielgene

###### 1.1.1 *Ehrlichia canis*

Als potentielle Zielregionen für eine Real-time PCR für *Ehrlichia canis* wurden die Gene für die 16S rRNA und für das Membranprotein p30-10 ausgewählt, da hierzu in der NCBI-Genbank-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) Sequenzinformationen für mehrere *E. canis*-Stämme und auch für nahe verwandte *Ehrlichia* spp. verfügbar waren, so dass konservierte und variable Bereiche der Sequenzen identifiziert werden konnten.

Bei der 16S rDNA, die für die kleine Untereinheit der bakteriellen Ribosomen kodiert, wurden zur Ermittlung der intraspezifischen Variation 14 *E. canis*-Isolate einbezogen, und zwar *E. canis* strain Madrid (NCBI-Genbank-Zugangsnummer AY394465), *E. canis* (AF308455), *E. canis* isolate VTE (AF373614, AF373615), *E. canis* strain Kagoshima 1 (AF536827), *E. canis* isolate VDE (AF373613), *E. canis* isolate VHE (AF373612), *E. canis* strain Gzh982 (AF162860), *E. canis* strain Florida (M73226), *E. canis* strain Oklahoma (M73221), *E. canis* strain 95E10-26039 (U96437), *E. canis* strain Gxht67 (AF156786), *E. canis* strain Gdt3 (AF156785) und *E. canis* isolate 611 (U26740). Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „Multiple Sequence Alignment“ unter Verwendung von Clustal W (Feng und Doolittle 1987, Thompson et al. 1994) aus dem Softwarepaket DNAMAN (Lynnon Bio Soft, Quebec, Kanada) miteinander verglichen. Basierend auf diesem Alignment wurde für die 16S rDNA von *E. canis* eine Konsensussequenz erstellt.

Zur Identifizierung artspezifischer Bereiche als mögliche Positionen für Primer und Sonden wurden in einem weiteren Alignment neben repräsentativen Sequenzen von *E. canis* (NCBI-Genbank-Zugangsnummern AY394465, U26740, M73221) die 16S rDNA-Sequenzen von *E. chaffeensis* (U60476, AF147752, U23503), *N. sennetsu* (M73225, M73219), *Anaplasma platys* (M82801, AY077619, AF156784) und *A. phagocytophilum* (AY527214) einbezogen.

Für das Gen p30-10 von *E. canis*, das zu einer polymorphen Genfamilie gehört, die für ein 30 kDa großes immundominantes Membranprotein (Major Outer Membrane Protein) kodiert (Ohashi et al., 1998a; 1998b) und das das einzige p30 Paralog darstellt, das sowohl in Zecken als auch in Blutproben von Hunden konstant und universell exprimiert wurde (Unver et al., 2001), wurde ein „Multiple Sequence Alignment“ angefertigt und Sequenzen der Isolate *E. canis* strain Venezuela (AF528515), *E. canis* strain Hawaii (AF528513) und *E. canis* strain California (AF528512) verglichen. Basierend auf diesem Alignment wurde für das p30-10-Gen von *E. canis* eine Konsensussequenz erstellt.

In einem weiteren Alignment wurde nun die Sequenz des p30-10-Genes von *E. canis* (AF528515, AF528512) mit den Sequenzen nahe verwandter *Ehrlichia* spp. verglichen. Hierzu wurden Sequenzen des p28-Genes verschiedener Stämme von *E. chaffeensis* (AF077735, AF077734, AF077733, AF077732), *E. ewingii* (AF287964, AF287962, AF287961) und *E. canis* (AF082750, AF082749, AF082747) herangezogen. Das p28-Gen der anderen *Ehrlichia* spp. wird als Homolog zum p30-Gen von *E. canis* angesehen (Gusa et al., 2001; Stich et al., 2002).

### 1.1.2 *Anaplasma phagocytophilum*

Bei der Auswahl des Zielgenes für eine Real-time PCR für *A. phagocytophilum* wurde nur die 16S rDNA einbezogen, da für nahe verwandte Ehrlichienarten vergleichbare Sequenzen anderer Gene in der NCBI-Genbank-Datenbank nicht verfügbar waren. Um die Variationsbreite innerhalb der Art *A. phagocytophilum* zu ermitteln, wurde ein „Multiple Alignment“ der 16S rDNA-Sequenzen der Isolate *A. phagocytophilum* (AF486636), *A. phagocytophilum* strain Strong (AY527214), *A. phagocytophilum* strain Susy (AY527213) und *A. phagocytophilum* isolate 832 (AF481855) angefertigt und eine Konsensussequenz ermittelt.

Um artspezifische Bereiche für die Positionierung der Primer und Sonden zu ermitteln, wurde die 16S rDNA verschiedener Stämme von *A. platys* (M82801, AY077619, AF156784), *E. canis* (AY394465, U26740, M73221), *E. chaffeensis* (U60476, AF147752, U23503), *N. sennetsu* (M73225, M73219), *N. risticii* (M21290), einer *Rickettsia* sp. (D84558) und verschiedener *Wolbachia* spp. (AJ632147, AY394613) mit der von *A. phagocytophilum* mittels eines „Multiple Sequence Alignments“ verglichen.

## 1.2 Primer- und Sondenkonstruktion

Die Konstruktion der spezifischen Primer und der Sonden, die die Struktur eines so genannten „Molecular Beacon“ (Tyagi und Kramer, 1996) aufwies, erfolgte mit Hilfe des Computer-Programmes „Beacon Designer 2.1“. Molecular Beacons bestehen aus einer dem Zielstrang komplementären Sequenz („Loop“), die jeweils am 3'- und am 5'-Ende um einen selbstkomplementären Sequenzabschnitt („Steam“) mit einer Basenlänge von fünf bis sieben Nukleotiden erweitert ist, wodurch eine Haarnadelstruktur entsteht. Durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher, die sich am 3'- und am 5'-Ende befinden, wird die messbare Fluoreszenz unterdrückt. Erst durch den Hybridisierungsvorgang an einer spezifischen Zielsequenz wird diese Haarnadelformation aufgelöst und die Fluoreszenz durch die räumliche Trennung der Fluorophore messbar (Tyagi und Kramer, 1996).

### 1.2.1 *Ehrlichia canis*

Für die Amplifikation eines Fragments der 16S rDNA von *E. canis* wurden die Primer EC-1 und EC-2 (Pusterla et al, 2000a) verwendet und mit Hilfe des Programms „Beacon Designer 2.1“ (Premier Biosoft International, Palo Alto, California) eine Molecular Beacon-Sonde, EC-S1, konstruiert (Tab. 2). Die PCR wird im Folgenden als „EC-16S“ bezeichnet. Primer und Sonde wurden anschließend anhand der „Multiple Sequence Alignments“ aus 1.1.1 und mit dem „Blast Search“ Programm der NCBI-Genbank auf ihre Spezifität überprüft. Dabei wurde bei den Primern vor allem darauf geachtet, dass das 3'-Ende nicht auf Säuger-DNA oder auf mit *E. canis* nahe verwandte Erreger passt.

Für das p30-10-Gen von *E. canis* (NCBI-Genbank-Zugangs-Nummer AF528515) wurden anhand der Alignments aus 1.1.1 artspezifische Bereiche identifiziert und, darauf gerichtet, der Forward-Primer ECP-1 und der Reverse-Primer ECP-2 (Tab. 3) manuell konstruiert. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass die Primerregionen keine monotonen und repetitiven Sequenzen oder GC-oder AG-reiche Stellen enthielten. Mittels der Software „Beacon Designer 2.1“ wurde anschließend die auf einen artspezifischen Bereich gerichtete Sonde ECP-S1 (Tab. 3) konstruiert. Diese PCR wird im Folgenden als „ECP-p30“ bezeichnet. Mit dem „Blast Search“ Programm der NCBI-Genbank wurde zusätzlich die Spezifität der Primer sowie der Sonde untersucht. Dabei wurde auch bei diesen Primern vor allem darauf geachtet, dass das 3'-Ende nicht auf mit *E. canis* nahe verwandte Erreger oder auf Säuger-DNA passt.

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma ThermoHybaid, Ulm, synthetisiert. Die Sonden wurden dabei am 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-fluoreszein (6-FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencher 4-Dimethylaminophenylbenzoesäure (Dabcyl) markiert.

Tab. 2: Sequenzen von Primern und Sonde für die PCR EC-16S

	<b>Sequenz</b>
EC-1	5'-CGGACAATTATTTATAGCCTC-3'
EC-2	5'-CCATTACCTCACCAACTAG-3'
EC-S1	5'-6-FAM-CGCGATCCTAGTAGTACGGAATAGCCATTAGAAATCGCG-Dabcyl-3'

Tab. 3: Sequenzen von Primern und Sonde für die PCR ECP-p30

	<b>Sequenz</b>
ECP-1	5'-AGTTACCCTATCACACCAGAAGTC-3'
ECP-2	5'-CGTCAAGAGTTACTGAAGCAGATG-3'
ECP-S1	5'-6-FAM-CGCGATCTACTACAGGAGTTATTACAGGTATCTTCTCGATCGCG-Dabcyl-3'

### 1.2.2 *Anaplasma phagocytophilum*

Anhand der 16S rDNA-Alignments der verschiedenen Ehrlichienarten wurden artspezifische Bereiche für *A. phagocytophilum* ausgewählt und die Primer AP-3 (Forward) und AP-4 (Reverse) manuell konstruiert (Tab. 4). Für die Sequenz der 16S rDNA von *A. phagocytophilum* (NCBI-Genbank-Zugangs-Nummer AY527214) wurde anschließend mit Hilfe des „Beacon Designer 2.1“ die Sonde AP-S2 (Tab. 4) so konstruiert, dass sie auf einen artspezifischen Bereich gerichtet war. Dies wurde anhand der Alignments aus 1.1.1 überprüft. Zusätzlich wurden Primer und Sonden mit dem „Blast Search“ Programm der NCBI-Genbank auf ihre Spezifität untersucht. Die PCR wird im Folgenden als „AP-16S“ bezeichnet.

Die Markierung der Sonden erfolgte, analog *E. canis*, am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM und am 3'-Ende mit Dabcyl. Primer und Sonde wurden von der Firma ThermoHybaid synthetisiert.

Tab. 4: Primer und Sonde für die PCR AP-16S

	Sequenz
AP-3	5'-TATGGGATAGCCACTAGAAATG-3'
AP-4	5'-CTCAGACCAGCTATAGATCATC-3'
AP-S2	5'-6-FAM-CGCGATCTCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTGATCGCG-Dabcyl-3'

### 1.3 Optimierung der PCR-Bedingungen

Die Real-time PCRs EC-16S und ECP-p30 für *E. canis* und AP-16S für *A. phagocytophilum* wurden mit einem iCycler iQ™ (Biorad, München) mit folgendem Laufprotokoll durchgeführt: initiales Aufheizen auf 95 °C für 13 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing für 1 min und Extension bei 72 °C für 30 s. Die Fluoreszenz wurde bei jedem Annealingsschritt gemessen. Nach jedem Lauf wurden die Daten mit der Software Version 3.0A analysiert (iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System, Biorad) und bei der Optimierung anhand des Kurvenanstiegs, des Schwellenwertes, des sigmoiden Verlaufes der Kurven und der Höhe der Fluoreszenz die jeweils besten Bedingungen ausgewählt.

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden zunächst die Parameter Magnesiumchloridkonzentration und Annealingtemperatur variiert. Anschließend wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Dimethylsulfoxid (DMSO), Bovinem Serumalbumin (BSA) und Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) getestet.

## 2. Vergleich verschiedener Real-time PCRs

### 2.1 *Ehrlichia canis*

Es wurde ein Vergleich der analytischen Spezifität und der analytischen Sensitivität der Real-time PCRs EC-16S und ECP-p30 für *E. canis* durchgeführt. Im Anschluss wurde mit der PCR, die hierbei die besseren Ergebnisse lieferte, eine Validierung mit geblindeten Proben durchgeführt.

#### 2.1.1 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität ist ein Maß dafür, inwieweit ein verwendetes Verfahren nur die zu untersuchenden Substanzen erfasst (Becker, 1987). Die analytische Spezifität der beiden Real-time PCRs EC-16S und ECP-p30 für *E. canis* wurde anhand von mit *E. canis* nahe verwandten Bakterien und anderen durch Zecken übertragenen Erregern getestet. In die PCRs wurde neben *E. canis*-DNA auch genomische DNA von *A. platys*, *N. risticii*, *A. phagocytophilum*, *Babesia canis*, *B. gibsoni* und *Hepatozoon canis* eingesetzt.

#### 2.1.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität ist ein Maß für die kleinste nachweisbare Konzentration der zu untersuchenden Substanz (Becker, 1987). Um die analytische Sensitivität der PCRs EC-16S

und ECP-p30 zu testen wurden Verdünnungsreihen ( $10^0$  bis  $10^{-5}$ ) genomischer DNA mit unbekannter Konzentration an *E. canis* angefertigt und in die PCRs eingesetzt.

### 2.1.3 Validierung der Real-time PCR ECP-p30 anhand geblindeter Proben

Zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität und diagnostischen Spezifität des entwickelten Nachweisverfahrens wurde eine geblindete, extern kontrollierte Validierung, modifiziert nach Rinder et al. (1998), nach folgenden Kriterien durchgeführt.

1. Es sollten **insgesamt 50 Proben** analysiert werden.
2. Es wurden **Knochenmarksaspirate und Blutproben** verwendet.
3. Mindestens **10**, maximal **30 Proben** sollten aus **Negativkontrollen** bestehen.

Negativkontrollen stammten von gesunden Hunden, die sich bisher ausschließlich in Deutschland aufgehalten hatten, und bei denen *E. canis* mit der PCR EC-16S nicht nachgewiesen worden war.

4. Mindestens **20**, maximal **40 Proben** sollten aus **Positivkontrollen** bestehen.

Positivkontrollen stammten von Hunden aus Griechenland, die dort bereits mittels PCR auf *E. canis* untersucht und positiv getestet worden waren. Es handelte sich hierbei um Material, das freundlicherweise von Dr. M. E. Mylonakis, Universität Thessaloniki, Griechenland, zur Verfügung gestellt worden war.

5. Alle Proben mussten **geblindet** sein.

Von jeder ausgewählten Probe wurde durch eine unabhängige Person 200 µl in ein Eppendorf-Gefäß verbracht und dieses mit einer Code-Nummer von 1 bis 50 beschriftet. Diese Code-Nummern wurden zusammen mit der ursprünglichen Bezeichnung der Probe in eine Tabelle eingetragen, damit später eine problemlose Identifizierung der Proben gewährleistet war. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Bearbeitung an mich übergeben. Die Tabelle mit der Verschlüsselung der Code-Nummern blieb bei der zweiten Person, die die Proben geblindet hatte. Die DNA-Extraktion und die PCR wurden den Kap. 4.5.1 und 4.5.2 entsprechend durchgeführt. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben 1 bis 50 als positiv oder negativ bewertet. Erst anschließend wurde der Schlüssel geöffnet, die Ergebnisse wurden als Vier-Felder Tafel (Abb. 5) dargestellt und diagnostische Sensitivität, diagnostische Spezifität und diagnostische Effizienz (Becker, 1987; Kraft, 1999) berechnet.

	Test positiv <b>T+</b>	Test negativ <b>T-</b>
Infektion mit <i>E. canis</i> vorhanden ( <b>K+</b> )	richtig positiv <b>RP</b>	falsch negativ <b>FN</b>
Infektion mit <i>E. canis</i> nicht vorhanden ( <b>K-</b> )	falsch positiv <b>FP</b>	richtig negativ <b>RN</b>

Abb. 5: Vier-Felder-Tafel

Die **diagnostische Sensitivität**, also die Wahrscheinlichkeit, mit der bei Vorhandensein einer Infektion (K+) mit einem positivem Testresultat (T+) gerechnet werden kann, wurde als Quotient aus der Zahl der richtig positiven Ergebnisse (RP) und der Gesamtzahl der tatsächlich mit *E. canis* befallenen Ansätze (K+) errechnet. Als Gegenstück wurde die **Unempfindlichkeit**, also die Wahrscheinlichkeit eines negativen Testresultates (T-) trotz vorhandener Infektion (T+), als Quotient aus der Zahl der falsch negativen Ergebnisse (FN) und der Gesamtzahl der tatsächlich mit *E. canis* befallenen Ansätze (K+) errechnet. Empfindlichkeit und Unempfindlichkeit ergänzen einander zu 1,0 bzw. 100 %.

Die **diagnostische Spezifität** ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein negatives Testresultat (T-) zu erwarten ist, wenn keine Infektion vorliegt (K-). Sie wurde als Quotient aus der Zahl der richtig negativen Ergebnisse (RN) und der Gesamtzahl der tatsächlich nicht mit *E. canis* befallenen Ansätze (K-) errechnet. Das Gegenstück zur diagnostischen Spezifität ist die **Unspezifität**, die die Wahrscheinlichkeit eines positiven Testresultates (T+) angibt, obwohl keine Infektion vorliegt (K-). Sie wurde als Quotient aus der Zahl der falsch positiven Ergebnisse (FP) und der Gesamtzahl aller tatsächlich negativen Ansätze (K-) errechnet. Spezifität und Unspezifität ergänzen sich zu 1,0 bzw. 100 %.

Die **diagnostische Effizienz** als die Wahrscheinlichkeit, mit der sowohl bei Vorhandensein als auch bei Fehlen einer Infektion eine richtige Zuordnung durch den Labortest erfolgt, wurde als Quotient aus der Summe aller richtigen Ergebnisse (RP+RN) und der Gesamtzahl aller Ergebnisse (RP+RN+FP+FN) errechnet. Die **diagnostische Ineffizienz** als Gegenstück hierzu, d.h. die Wahrscheinlichkeit, mit der in beiden Fällen eine falsche Zuordnung zu

erwarten ist, wurde als Quotient aus der Summe aller falschen Ergebnisse (FP+FN) und der Gesamtzahl aller Ergebnisse (RP+RN+FP+FN) errechnet.

Der **prädiktive Wert des positiven Testergebnisses** (prädpos) sagt aus, wie groß die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens der zu untersuchenden Infektion ist, wenn der Test positiv ausfällt. Er wurde als Anteil der richtig positiven (RP) unter allen positiven Testergebnissen (T+) errechnet. Der **prädiktive Wert des negativen Testergebnisses** (prädneg) gibt dagegen an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass keine Infektion vorliegt, wenn das Testergebnis negativ ist und errechnet sich als Anteil der richtig negativen (RN) unter allen negativen Testergebnissen (T-).

## **2.2 Vergleich der Real-time PCR AP-16S für *Anaplasma phagocytophilum* mit bereits publizierten PCRs**

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte 16S rDNA Real-time PCR für *A. phagocytophilum* mit den Primern AP-3 und AP-4 und der Sonde AP-S2 (PCR AP-16S) wurde mit bereits publizierten Real-time PCRs verglichen. Dabei wurde sowohl eine von Pusterla et al. (1999a) beschriebene Real-time PCR, die für das Zielgen der 16S rDNA die Primer Ep50r und Ep145f und die Sonde Ep80p verwendet als auch eine von Courtney et al. (2004) publizierte PCR, die auf das Zielgen für das Oberflächenprotein msp2 (Major Surface Protein) gerichtet ist und mit den Primern ApMSP2f und ApMSP2r und der Sonde ApMSP2-HEX durchgeführt und hier als PCR AP-MSP2 bezeichnet wird, einbezogen. Der Vergleich umfasste damit alle zum Untersuchungszeitpunkt publizierten Real-time PCRs für *A. phagocytophilum*. Bei den von Pusterla et al. (1999a) und Courtney et al. (2004) verwendeten Sonden handelt es sich um sogenannte „TaqMan-Sonden“. Diese binden zunächst am komplementären Zielstrang zwischen den Primern. Bei der Synthese des zweiten Stranges während der Kettenverlängerung bei der PCR wird die Sonde durch die 3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten, die dann freigesetzt werden. Durch die hierbei entstehende räumliche Trennung von Reporter und Quencher kommt es zu einer messbaren Fluoreszenz.

Für die drei Real-time PCR-Tests wurden die analytische Spezifität und die analytische Sensitivität (Becker, 1987; Kraft, 1999) ermittelt. Außerdem wurde jeweils eine Validierung anhand geblindeter Proben (analog 2.1.3) durchgeführt.

### 2.2.1 Analytische Spezifität

Um die analytische Spezifität der oben genannten PCRs zu vergleichen wurden neben genomischer DNA von *A. phagocytophilum* Lösungen mit genomischer DNA von *A. platys*, *N. risticii*, *E. canis*, *B. canis*, *B. gibsoni* und *H. canis* eingesetzt, also von Erregern, die mit *A. phagocytophilum* entweder nahe verwandt sind oder auch durch Zecken übertragen werden. Die PCR-AP 16S wurde unter den in Tab. 13 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, bei der PCR nach Pusterla et al (1999a) und der PCR AP-MSP2 (Courtney et al., 2004) wurden die in der Literatur angegebenen Parameter eingehalten.

### 2.2.2 Analytische Sensitivität

Als Ausgangsmaterial für die Ermittlung der analytischen Sensitivität diente eine EDTA-Blutprobe eines natürlich mit *A. phagocytophilum* infizierten Hundes, bei dem im Blutausschlag unter dem Lichtmikroskop Erreger nachgewiesen worden waren. Dabei wurde einerseits eine Verdünnungsreihe ( $10^0$  bis  $10^{-5}$ ) angefertigt, bei der bereits extrahierte genomische DNA mit Wasser verdünnt wurde, andererseits wurde erregerhaltiges Blut mit erregerfreiem Blut verdünnt (Verdünnungsstufen von  $10^0$  bis  $10^{-5}$ ) und anschließend die DNA-Extraktion durchgeführt. Die absolute Konzentration der enthaltenen DNA von *A. phagocytophilum* oder des jeweiligen Zielgenes war dabei unbekannt. Das Material aus den Verdünnungsreihen wurde auf je drei Eppendorfgläser aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert, so dass für jede PCR nach dem Auftauen die gleichen Bedingungen herrschten.

### 2.2.3 Validierung der Real-time PCRs für *Anaplasma phagocytophilum* anhand geblindeter Proben

Die Validierung der oben beschriebenen PCRs erfolgte analog Kapitel 2.1.3. Es wurden jedoch stets Blutproben verwendet. Die positiven Proben stammten von einem Hund, bei dem im Giemsa gefärbten Blutaussstrich in den Granulozyten unter dem Lichtmikroskop die bei einer Infektion mit *A. phagocytophilum* typischen Einschlusskörperchen (Morula) diagnostiziert worden waren und in dessen Serum spezifische Antikörper gegen *A. phagocytophilum* im indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) nachgewiesen worden waren. Es wurden verschiedene Verdünnungsstufen dieses Blutes eingesetzt. Die negativen Blutproben stammten von Hunden, bei denen sowohl im Blutaussstrich als auch mit der PCR nach Courtney et al. (2004) kein Befall mit *A. phagocytophilum* festgestellt werden konnte.

### 3. Bestimmung der Nachweisgrenze der PCR ECP-p30 und der PCR AP-MSP2 unter Verwendung von Plasmid-DNA

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der PCRs wurden in Plasmide einligierte PCR-Produkte verwendet. Die Klonierung der PCR-Produkte der PCR ECP-p30 (Klon ECK) und der PCR AP-MSP2 nach Courtney et al. (2004) (Klon APk) wurde dabei unter Verwendung des Plasmids pGEM®-T Easy Vector (pGEM®-T Easy Vector Kit, Promega, Madison, USA) durch PD Dr. M. Rinder am National Research Center for Protozoon Diseases, Universität Obihiro, Japan, durchgeführt, da zum Zeitpunkt der Untersuchung ein S1-Labor am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der LMU München nicht vorhanden war.

Die Konzentration der Lösungen mit den Plasmiden, deren Identität durch Sequenzierung bestätigt worden war, wurde anschließend in einem Agarosegel ermittelt. Zur Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurde 1 g Agarose (Roth, Karlsruhe) mit 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) in einen Erlenmeierkolben verbracht und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose ganz aufgelöst hatte. Nach

Abkühlung auf ca. 50 °C wurde das noch flüssige Gel 0,5 cm hoch in einen Gelträger (Eppendorf, Hamburg) gegossen und ein 12-well-Kamm (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) eingelegt. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer (PeqLab Biotechnologie) gelegt und mit TAE-Puffer überschichtet. Anschließend wurden Mischungen aus 1,5 µl 6x Blaupuffer (6x Loading Dye Solution; Fermentas Life Sciences, Leonrot) und 6,5 µl DNA-Lösung je well aufgetragen. Dabei wurden die DNA-Lösungen mit den klonierten PCR-Produkten der PCR ECP-p30 und der PCR AP-MSP2 nach Courtney et al. (2004) unverdünnt, 2-, 4-, 6- und 8-fach verdünnt eingesetzt. Als Standards zur Bestimmung der DNA-Menge wurden je zwei Konzentrationen der Gebrauchslösungen der „High DNA Mass Ladder“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) in einem Volumen von 8 µl aufgetragen, so dass 30 ng und 60 ng DNA in den 3000 bp-Markerbanden enthalten waren. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für 1,5 Stunden (Electrophoresis Power Supply-EPS 301, Amersham Biosciences, Freiburg). Anschließend wurde das Gel für 15 Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt. Durch die Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid zwischen die Basen des DNA-Doppelstranges wurden die PCR-Produkte dann unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (BioCapt Photo-Documentation, PeqLab). Dabei wurden die Bandenintensitäten der Proben und der Marker verglichen und die enthaltene DNA-Menge pro µl Plasmidlösung abgelesen. Die Umrechnung der enthaltenen DNA-Menge in die Anzahl der pro ml Lösung enthaltenen Moleküle (Plasmide) erfolgte nach folgenden Formeln ([www.neb.com](http://www.neb.com), technical support):

$$\text{Moleküle pro } \mu\text{g DNA} = \frac{9,1 \times 10^{11} \text{ Moleküle}}{(\text{Länge des Vektors} + \text{Länge des PCR - Produktes}) \text{ in kbp}}$$

$$\text{Anzahl der Moleküle/ml} = \frac{\text{gemessene DNA - Menge in } \mu\text{g pro ml}}{\text{Anzahl der Moleküle pro } \mu\text{g DNA}}$$

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der PCR ECP-p30 und der PCR AP-MSP2 wurden von den DNA-Lösungen mit den Plasmiden ECK bzw. APk nun Verdünnungsreihen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-15}$  angefertigt und jeweils als Dreifachansätze in die PCRs eingesetzt. Die jeweils

niedrigste nachweisbare Verdünnungsstufe wurde bestimmt und so ein Rückschluss auf die niedrigste Zahl der nachweisbaren Plasmide gezogen:

$$\text{Nachweisbare Plasmide pro } 50 \mu\text{l Ansatz} = \frac{\text{eingesetzte Plasmidlösung in } \mu\text{l} \times \text{Verdünnungsstufe} \times \text{Zahl der Plasmide pro } \mu\text{l}}{\text{Verdünnungsstufe} \times \text{Zahl der Plasmide pro } \mu\text{l}}$$

#### 4. Untersuchung von Patienten auf Infektion mit *Ehrlichia canis* und *Anaplasma phagocytophilum*

##### 4.1 Patientengut der *Ehrlichia canis*-Studie

In die Studie wurden insgesamt Proben von 244 Hunden, im Folgenden als EC1 bis EC244 bezeichnet, einbezogen. Bedingung für die Teilnahme war, dass sich die Hunde in einem bekannten endemischen Gebiet aufhielten und innerhalb der letzten drei Monate nicht mit Arzneimitteln behandelt worden waren, die geeignet sind, eine Infektion mit *E. canis* zu bekämpfen. Die Blutproben wurden von Hunden gewonnen, die sich in der Provinz Kampanien in Italien aufhielten. Die Blutentnahme erfolgte durch Tierärzte der Tierschutzvereinigung „Lega pro Animale“, die etwa 40 km nördlich von Neapel in Castel Volturno (Abb. 6) ein Kastrationszentrum mit einer Tierklinik und einem angeschlossenen Tierheim betreibt.

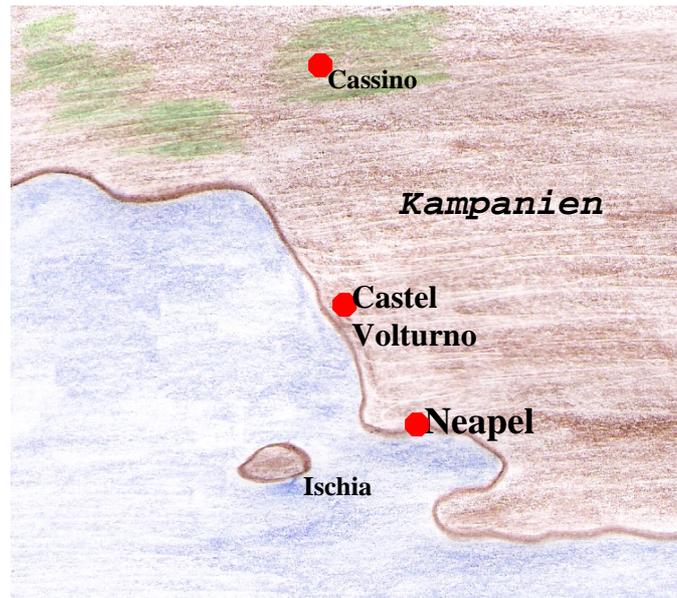


Abb. 6: Geographische Lage des Untersuchungsgebietes

Es wurden sowohl Hunde, die von ihren Besitzern in der Tierklinik vorgestellt (19 Hunde) oder unmittelbar von der Straße aufgelesen wurden (52 Hunde) als auch Tiere, die zu einem früheren Zeitpunkt ins Tierheim aufgenommen worden waren und sich zum Zeitpunkt der Probennahme dort aufhielten (173 Hunde), miteinbezogen. Zu jedem Tier wurde ein Datenblatt (Abb. 7) ausgefüllt, in dem die wichtigsten Patientendaten, klinische Symptome und eventuell bereits durchgeführte Untersuchungen dokumentiert wurden.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse von PCR und IFAT bei den unterschiedlichen Tiergruppen wurde der  $\chi^2$ -Test unter Verwendung eines Signifikanzniveaus  $\alpha$  von 0,05 eingesetzt. Die Werte für  $\chi^2$  und p wurden mit einem Computerprogramm (<http://medweb.uni-muenster.de/institute/imib/lehre/skript/biomasche/bio/chi.html>) errechnet und eine Signifikanz bei  $p < 0,05$  angenommen.

Interne Nr: _____
<b><u>Untersuchung auf Ehrlichia canis</u></b>
<b>1. Allgemeine Angaben zum Patienten</b>
Besitzer: _____
Name des Hundes: _____
Alter: _____
Rasse: _____
Geschlecht: _____
Herkunft: _____
Vorberichtlich Zeckenbefall: <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
<b>2. Symptome, die auf eine Ehrlichiose hindeuten können</b>
Fieber <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Anorexie <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Abmagerung <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Hämorrhagien <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
<b>3. Wurde bereits eine hämatologische Untersuchung durchgeführt?</b>
<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
<b>I. Falls „ja“: Befunde, die auf eine Ehrlichiose hinweisen könnten</b>
Anämie <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Thrombocytopenie <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Leukopenie <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
<b>4. Wurde ein IFAT durchgeführt?</b>
<input type="checkbox"/> Ja, Titer: _____ <input type="checkbox"/> Nein

Abb. 7: Fragebogen zu den Blutproben für die Untersuchung auf *E. canis*

#### 4.2 Patientengut der *Anaplasma phagocytophilum*-Studie

In die Studie für die Untersuchung auf *A. phagocytophilum* wurden nur Hunde einbezogen, die sich zum Untersuchungszeitpunkt in Deutschland aufhielten. Es wurden Proben von 205 Hunden untersucht. Insgesamt 72 Blutproben (Probenbezeichnung F1 bis F72) stammten von Tierärzten aus den Regionen München, Allgäu, Schwäbische Alb und Bodensee, die für diese Studie um die Einsendung von EDTA-Blutproben von Hunden gebeten wurden, die

vorberichtlich Zeckenbefall aufwiesen und innerhalb der letzten drei Monate nicht mit gegen *A. phagocytophilum* wirksamen Medikamenten vorbehandelt worden waren. Zu diesen Hunden wurde von den Tierärzten ein Formblatt, in dem die wichtigsten Patientendaten wie Alter, Rasse und Geschlecht sowie klinische Symptome und eventuelle Voruntersuchungen erfasst wurden, mit eingeschickt (Abb. 8). Außerdem wurden Proben von 133 Hunden (Probenbezeichnung OF1 bis OF133) miteinbezogen, von denen im Rahmen der Routinediagnostik EDTA-Blut in das Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der LMU München eingeschickt worden war. Der Grund der Einsendung hatte keinen Einfluss auf die Auswahl. Es wurde lediglich darauf geachtet, dass die Proben von Hunden stammten, die sich in Deutschland aufhielten. Die statistische Auswertung der Ergebnisse des IFAT bei den beiden Patientengruppen erfolgte wie für *E. canis* beschrieben (Kap. 4.1), mit dem  $\chi^2$ -Test unter Verwendung eines Signifikanzniveaus  $\alpha$  von 0,05.

<b>Interne NR:</b> _____		
<b><u>Untersuchung auf granulozytäre Ehrlichiose</u></b> <b><u>(Anaplasma phagocytophilum)</u></b>		
<b>1. Allgemeine Angaben zum Patienten</b>		
Name des Hundes:	_____	
Alter:	_____	
Rasse:	_____	
Geschlecht:	_____	
Aktuell Zeckenbefall:	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
<b>2. Symptome, die auf eine granulozytäre Ehrlichiose hindeuten könnten</b>		
Fieber	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Anorexie	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Abgeschlagenheit	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Lahmheiten	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Erbrechen	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Durchfall	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
<b>3. Wurde bereits eine hämatologische Untersuchung durchgeführt?</b>		
	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
<b>4. Falls Antwort bei 3. „ja“:</b>		
<b>Befunde, die auf eine Ehrlichiose hinweisen könnten</b>		
Anämie	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Thrombocytopenie	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein
Leukopenie	<input type="checkbox"/> Ja	<input type="checkbox"/> Nein

Abb. 8: Fragebogen zu den Blutproben für die Untersuchung auf *A. phagocytophilum*

### 4.3 Probengewinnung und –lagerung

Die Blutentnahme der Proben für die Untersuchung auf *E. canis* erfolgte durch Tierärzte der Tierschutzvereinigung „Lega Pro Animale“. Es wurden je ein EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) und ein Serum-Röhrchen (Sarstedt) mit venösem Blut befüllt. Die Proben wurden beschriftet und bis zum Transport an das Institut für Vergleichende Tropenmedizin und

Parasitologie der LMU München bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Beim Transport der tiefgefrorenen Blutproben von Italien nach München wurde darauf geachtet, dass die Kühlkette nicht unterbrochen wurde. Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verarbeitung erneut bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Die Blutproben für die Untersuchung auf *A. phagocytophilum* wurden von den Tierärzten in nicht einheitlichen Blutentnahmesystemen (Probenvolumen 2 ml-7,5 ml) auf dem Postweg eingesandt. Es handelte sich jedoch stets um venöses EDTA-Blut. Nach Ankunft im Labor erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation der Probengefäße bei 2000 rpm (Tischzentrifuge Universal 30F, Hettich, Tuttlingen). Im Anschluss wurde das Serum mit einer Pipette abgehoben und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß verbracht. Aus der zellreichen Schicht zwischen Serum und Erythrozyten („Buffy coat“) wurden 200  $\mu\text{l}$  entnommen und in ein weiteres Eppendorfgefäß pipettiert. Die Proben wurden beschriftet und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

#### **4.4 Lichtmikroskopische Untersuchung auf *Anaplasma phagocytophilum***

Von den Blutproben F1 bis F72 der 72 Hunde, die auf Anforderung für die Studie eingesandt wurden, wurde zunächst ein Buffy-coat-Ausstrich angefertigt. Hierfür wurde eine Mikrohämatokritkapillare (Brand, Wertheim) mit EDTA-Blut gefüllt und zentrifugiert. Das Glasröhrchen wurde dann an der Stelle, an der Buffy coat sichtbar war, zerbrochen und ein Tropfen dieser zellreichen Fraktion auf einen Objektträger gegeben. Dann wurde ein flexibler Spatel (Flexi Strip, Roth) im  $45^\circ$ -Winkel angesetzt und zum Buffy coat-Tropfen zurückgezogen, bis die Spatelkante mit Blut benetzt war. Daraufhin wurde der Spatel sofort zügig vorwärts geschoben und das Blut so ausgestrichen. Der Ausstrich wurde luftgetrocknet und dann fünf Minuten mit Methanol (99 %; Roth) fixiert. Dann erfolgte eine erneute Trocknung an der Luft. Im Anschluss wurden die Ausstriche 45 Minuten mit frisch angesetzter Giemsa-Gebrauchslösung [Giemsa-Stammlösung (Merck, Darmstadt) mit Weisse-Puffer (pH 7,2; Merck) 25-fach verdünnt] gefärbt, unter fließendem Wasser abgespült und getrocknet.

Die Beurteilung erfolgte unter Verwendung von Immersionsöl bei 500-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop. Die Randbereiche der Blutausrichthe wurden hierzu für mindestens 10 Minuten mäanderförmig auf das Vorhandensein von Einschlusskörperchen (Morula) in den Granulozyten untersucht und das Ergebnis festgehalten.

## 4.5 Molekularbiologische Untersuchungen

### 4.5.1 DNA-Extraktion

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion unter Verwendung des „QIAamp DNA Blood Mini Kits“ (Qiagen, Hilden) wurden je 200 µl der aufgetauten und sorgfältig gemischten Proben (EDTA-Blut, Buffy coat-Material oder Knochenmarksaspirat) verwendet. Das Extraktionsverfahren basiert auf enzymatischer Lyse zellulärer Bestandteile und anschließender Adsorption der dadurch freigesetzten DNA an eine Silikagelmembran. Die Extraktion erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers, wobei über die Zusammensetzung der enthaltenen Puffer vom Erzeuger keine Angaben gemacht wurden. Pro Durchgang wurden 23 Ansätze mit je 200 µl Untersuchungsmaterial und eine Negativkontrolle, bestehend aus 200 µl PBS (135 mM NaCl, 15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 2,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10,7 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7,2 ) gleichzeitig verarbeitet.

Zu jedem 200 µl Probenaliquot wurden 20 µl Proteinase K gegeben und sorgfältig gemischt, bevor 200 µl des Puffers „AL“ (beides im Kit enthalten) hinzupipettiert wurden. Der Inhalt der Gefäße wurde gut gemischt und dann im Wasserbad bei 56 °C 10 Minuten lang inkubiert. Im Anschluss wurden die Eppendorfgefäße kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge Biofuge pico, Heraeus, Osterode), bevor sie geöffnet und 200 µl Ethanol absolut (Roth) dazugegeben wurden. Der gut durchmischte Inhalt der Gefäße wurde nun mit einer Pipette auf ein „QIAamp spin“-Säulchen überführt und bei 13000 rpm 1 Minute lang zentrifugiert. Hierbei wurde die DNA an die in den Säulchen befindliche Silikagelmembran gebunden. Zum anschließenden Waschen wurde das Säulchen zunächst in ein 2 ml Gefäß verbracht, 500 µl der Gebrauchslösung des Puffers „AW1“ hinzu gegeben und zentrifugiert, das Säulchen auf ein neues Gefäß aufgesteckt und nach Zugabe von 500 µl Puffer „AW2“ erneut zentrifugiert.

Bei der abschließenden Elution wurde das QIAamp Säulchen in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesteckt, 100 µl des Puffers „AE“ auf die Mitte der Membran gegeben, mindestens 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die auf diese Weise erhaltene DNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 4.5.2 Real-time PCR für *Ehrlichia canis*

Die Proben für *E. canis* (Probenbezeichnung EC1 bis EC244) wurden mit der PCR ECP-p30 untersucht. Sie amplifiziert ein 149 bp großes Fragment und ist auf das Zielgen p30-10, das für ein 30-kDa großes immundominantes Membranprotein (Major Outer Membrane Protein) codiert, gerichtet und wird mit den Primern ECP-1 und ECP-2 und der Sonde ECP-S1, die die Struktur eines „Molecular Beacon“ (Tyagi und Kramer, 1996) aufweist, durchgeführt (Kap.1.2.1, Tab. 3). Neben den DNA-Lösungen der Patienten EC1 bis EC244 wurden auch die Negativkontrollen der DNA-Extraktion sowie pro Lauf eine Positivkontrolle für *E. canis*, bestehend aus genomischer DNA und eine Negativkontrolle aus Wasser statt DNA-Lösung mitgeführt. Wie in Tab. 5 detailliert dargestellt ist, wurde zunächst aus 10x Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Hilden), MgCl<sub>2</sub> (25mM; Qiagen, Hilden), H<sub>2</sub>O, dNTP (10mM each; Roth), HotStar Taq (5 u/µl; Qiagen, Hilden), Primern und Sonde unter einer „DNA-Workstation“ (Uni Equip, Martinsried) in einem Reinst-Raum ein Master-Mix hergestellt. Hiervon wurden je 45 µl in jede Vertiefung einer 96-well-PCR-Platte (Biorad) vorgelegt. In einem separaten Raum wurden nun je 5 µl der zu untersuchenden DNA-Lösungen oder Negativkontrollen hinzupipettiert und die Platte mit Klebefolie (iCycler iQ™ Optical Quality Sealing Tape, Biorad) verschlossen.

Die PCR wurde mit einem iCycler iQ™ (Biorad) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: initiales Aufheizen auf 95 °C für 13 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 57 °C für 1 min und Extension bei 72 °C für 30 s. Die Fluoreszenz wurde bei jedem Annealingsschritt gemessen. Nach jedem Lauf wurden die Daten mit der Software Version 3.0A analysiert (iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System, Biorad). Eine Reaktion wurde dann als positiv gewertet, wenn ihre Fluoreszenz einen Schwellenwert (=Basisemission und das 10-fache ihrer Standardabweichung) überschritt und einen sigmoiden Kurvenverlauf zeigte, wie in Abb. 9 beispielhaft dargestellt ist.

Tab. 5: Pipettierschema für die PCR ECP-p30

Komponente	Volumen	Hersteller
10x Puffer mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	5 µl	Qiagen
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	7 µl	Qiagen
H <sub>2</sub> O	28,75 µl	
Primer ECP-1 (50 µM)	1 µl	ThermoHybaid
Primer ECP-2 (50 µM)	1 µl	ThermoHybaid
Sonde ECP-S1(50 µM)	0,5 µl	ThermoHybaid
dNTP (10 mM each)	1,25 µl	Roth
HotStar Taq (5 u/µl)	0,5 µl	Qiagen
DNA-Lösung	5 µl	
<b>Gesamtvolumen:</b>	<b>50 µl</b>	

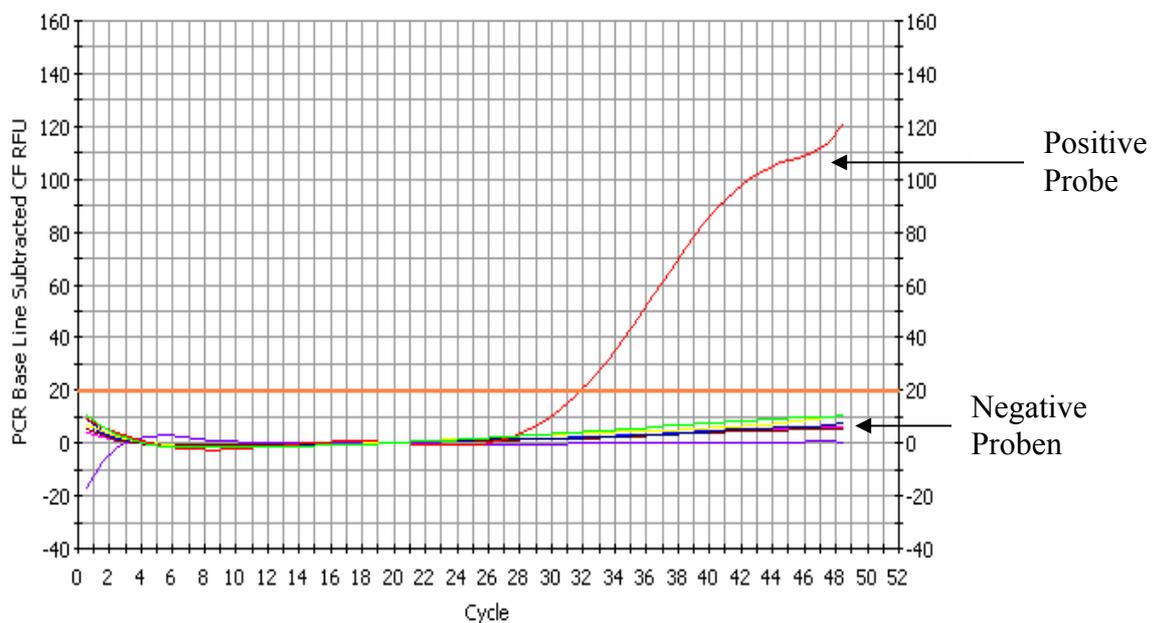
**PCR Amp/Cycle Graph for FAM-490**

Abb. 9: Beispiel für die Beurteilung der PCR-Ergebnisse (Cycle: Reaktionszyklus, PCR Base Line Subtracted CF RFU: Maß für die Höhe der Fluoreszenz, Orange Linie: Schwellenwert)

#### 4.5.3 Real-time PCR für *Anaplasma phagocytophilum*

Die Untersuchung auf *A. phagocytophilum* erfolgte mit der von Courtney et al. (2004) entwickelten PCR AP-MSP2. Sie amplifiziert ein 77 bp großes Fragment des Oberflächenproteins msp2 (Major Surface Protein) und wird mit den Primern ApMSP2f und ApMSP2r und der Sonde ApMSP2-HEX durchgeführt, wobei die Reaktionsbedingungen, die in der Literatur angegeben wurden, beibehalten wurden. Lediglich die Zahl der Reaktionszyklen wurde von 40 auf 50 Zyklen erhöht. Neben den DNA-Lösungen der Patienten F1-F72 und OF1-OF133 wurden auch die Negativkontrollen der DNA-Extraktion sowie pro Lauf eine Positivkontrolle für *A. phagocytophilum*, bestehend aus genomischer DNA, und eine Negativkontrolle aus Wasser statt DNA-Lösung mitgeführt.

Zunächst wurde aus 10x Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Qiagen, Hilden), MgCl<sub>2</sub> (25 mM; Qiagen, Hilden), H<sub>2</sub>O, dNTP (10 mM each; Roth), HotStar Taq (5 u/μl; Qiagen, Hilden), Primern und Sonde unter einer „DNA-Workstation“ (Uni Equip, Martinsried) in einem Reinst-Raum ein Master-Mix hergestellt (Tab. 6). Hiervon wurden je 20 μl in jede Vertiefung einer 96-well-PCR-Platte (Biorad) vorgelegt. In einem separaten Raum wurden nun je 5 μl der zu untersuchenden DNA-Lösungen oder Negativkontrollen hinzupipettiert und die Platte mit Klebefolie (iCycler iQ™ Optical Quality Sealing Tape, Biorad) verschlossen.

Tab. 6: Pipettierschema für die PCR nach Courtney et al. (2004)

Komponente	Volumen	Hersteller
10x Puffer mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	Qiagen
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,5 µl	Qiagen
H <sub>2</sub> O	11,7375 µl	
Primer ApMSP2f (50 µM)	0,225 µl	ThermoHybaid
Primer ApMSP2r (50 µM)	0,225 µl	ThermoHybaid
Sonde ApMSP2 HEX (50 µM)	0,0625 µl	ThermoHybaid
dNTP (10 mM each)	0,5 µl	Roth
HotStar Taq (5 u/µl)	0,25 µl	Qiagen
DNA-Lösung	5 µl	
Gesamtvolumen:	25 µl	

Die PCR wurde mit einem iCycler iQ™ (Biorad) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: initiales Aufheizen auf 95 °C für 13 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Annealing und Extension bei 60 °C für 1 min. Die Fluoreszenz wurde bei jedem Annealingsschritt gemessen. Nach jedem Lauf wurden die Daten mit der Software Version 3.0A analysiert (iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System, Biorad). Eine Reaktion wurde dann als positiv gewertet, wenn ihre Fluoreszenz einen Schwellenwert (=Basisemission und das 10fache ihrer Standardabweichung) überschritt und einen sigmoiden Kurvenverlauf zeigte, wie in Abb. 9 beispielhaft dargestellt ist.

#### 4.5.4 Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte

Zur Bestätigung der Identität der PCR-Produkte durch Sequenzierung wurden für *E. canis* die Amplifikate der Proben EC9, EC111 und EC235, die aus der Gruppe der bei der Real-time PCR positiv reagierenden Proben zufällig ausgesucht worden waren, und das Amplifikat der

Positivkontrolle für *E. canis* einbezogen. Für *A. phagocytophilum* wurde eine Sequenzanalyse des Amplifikates der Probe OF64 durchgeführt.

Für *E. canis* wurden die PCR-Produkte direkt sequenziert. Zur Herstellung eines 2,5 %igen Agarosegels wurden 2,5 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) in einen Erlenmeierkolben verbracht und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose ganz aufgelöst hatte. Im Anschluss daran wurde ein Agarosegel, wie bereits in Kap.III, A, 3 beschrieben, hergestellt und mit TAE-Puffer überschichtet. Es wurden jeweils 1,5 µl 6x Blaupuffer (6x Loading Dye Solution; Fermentas Life Sciences) und 8,5 µl des PCR-Produktes je well aufgetragen. Als Marker zur Laufkontrolle und als Größenstandard wurden 10 µl der Gebrauchslösungen des GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas Life Sciences) und der GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Fermentas Life Sciences) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für 1,5 Stunden (Electrophoresis Power Supply-EPS 301, Amersham Biosciences, Freiburg). Anschließend wurde das Gel, wie bereits in Kap.III, A, 3. beschrieben, für 15 Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt. Die PCR-Produkte wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (BioCapt Photo-Documentation, PeqLab), dann mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die Extraktion der in den Banden enthaltenen DNA erfolgte mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Gelstücke gewogen und mit der dreifachen Menge an Puffer „QG“ (Zusammensetzung unbekannt) versetzt, und bei 50 °C für inkubiert, bis sich das Gel ganz aufgelöst hatte. Dann wurde ein dem Gewicht des Gelstückes entsprechender Volumenteil Isopropanol (Roth) hinzugefügt und sorgfältig gemischt. Der gesamte Inhalt des Eppendorfgefäßes wurde nun auf ein „QIAquick spin-Säulchen“ überführt und eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus). Hierbei wurde die DNA an die Membran im Säulchen gebunden. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen, 750 µl des Puffers „PE“ (Zusammensetzung unbekannt) auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Nachdem auch diese Flüssigkeit verworfen wurde, erfolgte eine erneute Zentrifugation des QIAquick spin-Säulchen für eine Minute. Dann wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt und die DNA mit 50 µl des Puffers „EB“ (10mM Tris-Cl, pH 8,5), auf die Mitte der Membran pipettiert, und bei einer einminütigen Zentrifugation eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 12,5 µl 10 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol (98 %; Roth) für eine Stunde bei -20 °C. Nach anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm (Kühlzentrifuge 5417R,

Eppendorf) wurde der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet durch Zugabe von 200 µl Ethanol (70 %; Roth) und einer erneuten Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge 13, Heraeus) bei Raumtemperatur gewaschen. Der Überstand wurde erneut dekantiert, die Eppendorfgläser kurz zentrifugiert, der Flüssigkeitsrest abpipettiert und die Pellets luftgetrocknet. Die Sequenzierung mit den Primern ECP-1 (Positivkontrolle für *E. canis*, EC9) und ECP-2 (EC111, EC235) wurde von der Firma MWG Biotech, Ebersberg durchgeführt.

Bei *A. phagocytophilum* war wegen der geringen Länge des PCR-Produktes von 77 bp eine direkte Sequenzierung nicht erfolgreich. Daher wurde eine Klonierung unter der Verwendung des Plasmids pGEM®-T Easy Vector (pGEM®-T Easy Vector Kit, Promega, Madison, USA) in *Escherichia coli* DH5α-Zellen (Promega) und anschließend eine Sequenzierung des Plasmids mit den Sequenzierprimern SP6 und T7 (Promega) durch PD Dr. M. Rinder am National Research Center for Protozoon Diseases, Universität Obihiro, Japan durchgeführt, da zum Zeitpunkt der Untersuchung ein S1-Labor am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der LMU München nicht vorhanden war.

## **4.6 Serologische Untersuchung- IFAT**

### 4.6.1 Serologische Untersuchung auf *Ehrlichia canis*

Die serologische Untersuchung der Serumproben EC1 bis EC244 erfolgte mittels indirektem Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) zum Nachweis gruppenspezifischer IgG-Antikörper gegen *E. canis*. Es wurde hierfür der kommerzielle Testkit „MegaScreen FLUOEHRlichia c.“ (Firma MegaCor, Hörbranz, Österreich) verwendet. Die Serumantikörper binden an das auf einem Objektträger fixierte Antigen und werden mit Fluoreszein-Isothiocyanat konjugierten anti-Hund IgG-Antikörpern mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht, wo sie als grüngelb leuchtende intrazelluläre Einschlusskörperchen (Morulae) erscheinen.

Für alle Proben und für je eine Positiv- und eine Negativkontrolle pro Objektträger wurden zwei Verdünnungsstufen (1:50 und 1:100) mit PBS (pH 7,4; Tab. 7) angefertigt. Die mit Antigen beschichteten Objektträger wurden beschriftet und auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurden jeweils 10 µl der hergestellten Verdünnungen auf die Felder des Objektträgers aufgetragen und dieser in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger mit PBS-Puffer aus einer Spritzflasche abgespült und zwei mal 5 Minuten in einer Glasküvette mit frischem PBS-Puffer gewaschen. Nach Abschütteln der Flüssigkeit wurden 10 µl Anti-Hund IgG-FITC (F-7884, Sigma, Deisenhofen), 20-fach verdünnt mit PBS pH 7,4 mit 0,03 % Evans Blue (1 %; Merck, Darmstadt), aufgetragen und erneut in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde der Objektträger in frischem PBS-Puffer pH 7,4 in Glasküvetten gewaschen, die Flüssigkeit abgeschüttelt und mit Eindeckmittel (MegaScreen Fluovet, MegaCor) blasenfrei eingedeckt. Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop, wobei Proben ohne erkennbare spezifische Fluoreszenz als negativ beurteilt wurden, während Proben, die nur eine Fluoreszenz bei der Verdünnung 1:50 zeigten, als grenzwertig und Proben mit einer Fluoreszenz auch bei 1:100 als positiv beurteilt wurden.

Tab. 7: Herstellung des PBS-Puffers

<b>Stammlösung</b>	NaCl (Merck, Darmstadt )	389,25 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O (Merck, Darmstadt)	171,25 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)	19,5 g
	Aqua dest.	Ad 2500ml
<b>Gebrauchslösung</b>	Stammlösung 1:20 mit Aqua dest. verdünnen, pH einstellen	

#### 4.6.2 Serologische Untersuchung auf *Anaplasma phagocytophilum*

Für den Nachweis von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* in den Hundeseren der Proben F1 bis F72 und OF1 bis OF133 wurden mit Antigen beschichtete Objektträger, die von der

Firma Focus Technologies, California, USA, hergestellt wurden, verwendet. Es wurden Verdünnungen der Seren sowie je einer Positiv- und einer Negativkontrolle pro Objektträger von 1:32 und 1:64 untersucht. Auf die beschrifteten, auf Raumtemperatur gebrachten Objektträger wurden je 20 µl der zu untersuchenden Verdünnungen aufgetragen und in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS (pH 7,2) ab gespült, zweimal 5 Minuten lang in Glasküvetten mit frischem PBS-Puffer gewaschen, in Aqua dest. geschwenkt und luftgetrocknet. Nun wurden auf jedes Feld 20 µl Anti-Hund IgG-FITC (F-7884 der Firma Sigma, Deisenhofen; 1:20 mit PBS-Puffer [pH 7,2] verdünnt und mit 0,03 % Evans-Blue der Firma Merck) aufgetragen. Nach erneuter Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank wurden die Objektträger vorsichtig mit PBS (pH 7,2) ab gespült, zweimal 5 Minuten in Glasküvetten mit PBS (pH 7,2) gewaschen und in Aqua dest. geschwenkt. Die luftgetrockneten Objektträger wurden mit Eindeckmittel (MegaScreen Fluovet, MegaCor) versehen und bei 400-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die Einteilung erfolgte in „negativ“ (keine Fluoreszenz), „grenzwertig“ (Fluoreszenz lediglich bei Verdünnung 1:32) und „positiv“ (Fluoreszenz auch bei Verdünnung 1:64).

## 5. Vergleich der Untersuchungsmethoden

Abschließend wurden die Testergebnisse der verschiedenen angewandten Untersuchungsmethoden paarweise (Blutausstrich - Real-time PCR, Blutausstrich - IFAT und PCR – IFAT) miteinander verglichen. Dabei wurde der prozentuale Anteil der übereinstimmenden Ergebnisse berechnet.

## B Ergebnisse

### 1. Real-time PCR zum Nachweis von *Ehrlichia canis* und *Anaplasma phagocytophilum*

#### 1.1 Primer- und Sondenkonstruktion

##### 1.1.1 *Ehrlichia canis*

Für die PCR EC-16S wurde mit Hilfe der Software „Beacon Designer 2.1“ eine Sonde (EC-S1) zu den bereits publizierten Primern EC-1 und EC-2 (Pusterla et al., 2000a) konstruiert (Tab. 8; Abb. 10). Die Auswahl der geeignetsten Sonde erfolgte anhand Sequenzunterschieden in der 16S rDNA gegenüber nahe verwandter Ehrlichienpezies und der Bewertung der Sonden durch das Programm.

Tab. 8: Sequenzen von Primern und Sonde für die PCR EC-16S

	Sequenz
EC-1	5'-CGGACAATTATTTATAGCCTC-3'
EC-2	5'-CCATTACCTCACCAACTAG-3'
EC-S1	5'-6-FAM-CGCGATCCTAGTAGTACGGAATAGCCATTAGAATCGCG-Dabcyl-3'

Eine Überprüfung der Spezifität von Primern und Sonde gegenüber verwandten Ehrlichien erfolgte zunächst anhand eines Alignments mit *E. chaffeensis*, *E. platys*, *A. phagocytophilum*, und *N. sennetsu* (Abb. 10). Zusätzlich wurde die Spezifität mit dem „Blast Search“ Programm der NCBI-Genbank überprüft. Der Primer EC-1 zeigte aber insbesondere am 3'-Ende Sequenzunterschiede zu anderen Ehrlichienarten, so dass eine Amplifikation dieser Erreger nicht zu erwarten war. Der Primer EC-2 hingegen war als unspezifischer Primer konstruiert worden und zeigte mit verschiedenen Bakterien wie Pseudomonaden, Streptomyces oder Leptospiren eine Übereinstimmung von 100%, jedoch nicht mit der DNA von Säugern. Für die Sonde EC-S1 wurde festgestellt, dass sie nur auf verschiedene *E. canis* Stämme passte. Bei *E. chaffeensis*, der am nächsten verwandten Ehrlichienart, bestand in der zentralen Sondenregion, und zwar an der elften Position der bindenden Region, eine Misspaarung.

E. canis (AY394465)	.....CAAACCTGGCG..NAGCCTACCA..TGCANGTCGAACGGACA	38
E. canis (U26740)	.....AAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGACA	29
E. canis (M73221)	CTCAGAACGAACGCTGGCGGCAAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGACA	50
E. chaff. (U60476)	CTCAGAACGAACGCTGGCGGCAAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGACA	50
E. chaff. (U23503)	CTCAGAACGAACGCTGGCGGCAAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGACA	50
E. chaff. (AF147752)	CTCAGAACGAACGCTGGCGGCAAGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGACA	50
A. platys (AF156784)	CTCAGAACGAACGCTGGCGGCAAGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGATT	50
A. platys (M82801)	CTCAGAACGAACGCTGGCGGCAAGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGATT	50
A. phag. (AY527214)	.....AACGAACGCTGGCGGCAAGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGATT	45
E. sennet. (M73225)	CTCAGAACGAACGCTAGCGGTAGGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGAA	50
E. sennet. (M73219)	.....AAT	3
A. platys (AY077619)	.....ACGAACGCTGGCGGCAAGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGATT	44
E. canis (AY394465)	NTTATTTATAGCCTCTNGGCTATAGGAAATTGTTAGTGGCAGACGGGTGA	88
E. canis (U26740)	ATTATTTATAGCCTCT.GGCTATAGGAAATTGTTAGTGGCAGACGGGTGA	78
E. canis (M73221)	ATTATTTATAGCCTCT.GGCTATAGGAAATTGTTAGTGGCAGACGGGTGA	99
E. chaff. (U60476)	ATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAATAATTGTTAGTGGCAGACGGGTGA	100
E. chaff. (U23503)	ATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAATAATTGTTAGTGGCAGACGGGTGA	100
E. chaff. (AF147752)	ATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAATAATTGTTAGTGGCAGACGGGTGA	100
A. platys (AF156784)	.TTGTCTAGCTT...GCTATGATAAA.AATTAGTGGCAGACGGGTGA	94
A. platys (M82801)	.TTGTCTAGCTT...GCTATGATAAA.AATTAGTGGCAGACGGGTGA	94
A. phag. (AY527214)	ATTCTTTATAGCTT...GCTATAAAGAAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGA	91
E. sennet. (M73225)	.....CAAAGCTGC...TTGCCAGCTGGTCCCGTGGCAGACGGGTGC	90
E. sennet. (M73219)	.....CAAAGCTGC...TTGCCAGCTGGTCCCGTGGCAGACGGGTGC	43
A. platys (AY077619)	.TTGTCTAGCTT...GCTATGATAAA.AATTAGTGGCAGACGGGTGA	88
E. canis (AY394465)	GTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCATTAGAAATGGT	138
E. canis (U26740)	GTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCATTAGAAATGGT	128
E. canis (M73221)	GTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTACGGAATAGCCATTAGAAATGGT	149
E. chaff. (U60476)	GTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTATGGAATAGCCATTAGAAATGAT	150
E. chaff. (U23503)	GTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTATGGAATAGCCATTAGAAATGAT	150
E. chaff. (AF147752)	GTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGTATGGAATAGCCATTAGAAATGAT	150
A. platys (AF156784)	GTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGT	144
A. platys (M82801)	GTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGT	144
A. phag. (AY527214)	GTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGT	141
E. sennet. (M73225)	GTAACGCGTGGGAACCTGCCTGGTAGTAGGGAATAACCAGTGGAAACATT	140
E. sennet. (M73219)	GTAACGCGTGGGAACCTGCCTGGTAGTAGGGAATAACCAGTGGAAACATT	93
A. platys (AY077619)	GTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGT	138
E. canis (AY394465)	GGGTAATACTGTATAATCCCCGAGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	188
E. canis (U26740)	GGGTAATACTGTATAATCCCCGAGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	178
E. canis (M73221)	GGGTAATACTGTATAATCCCCGAGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATA	199
E. chaff. (U60476)	GGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	200
E. chaff. (U23503)	GGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	200
E. chaff. (AF147752)	GGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	200
A. platys (AF156784)	GGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	194
A. platys (M82801)	GGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	194
A. phag. (AY527214)	GGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	191
E. sennet. (M73225)	GGGCAACACCCTATACGCCCTGAGGGGGAAA.ATTTATTGCTATCAGATA	189
E. sennet. (M73219)	GGGCAACACCCTATACGCCCTGAGGGGGAAA.ATTTATTGCTATCAGATA	142
A. platys (AY077619)	GGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATG	188
E. canis (AY394465)	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTAT	238
E. canis (U26740)	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTAT	228
E. canis (M73221)	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTAT	249
E. chaff. (U60476)	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCTAT	250
E. chaff. (U23503)	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCTAT	250
E. chaff. (AF147752)	AGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCTAT	250
A. platys (AF156784)	AGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAGGCTTACCAAGGCAT	244
A. platys (M82801)	AGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAGGCTTACCAAGGC.GT	243
A. phag. (AY527214)	AGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAGGCTTACCAAGGCAT	241
E. sennet. (M73225)	GGCCCCGTTAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAGC	239
E. sennet. (M73219)	GGCCCCGTTAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCAGC	192
A. platys (AY077619)	AGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAGGCTTACCAAGGCAGT	238
E. canis (AY394465)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	288
E. canis (U26740)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	278
E. canis (M73221)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	299
E. chaff. (U60476)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	300
E. chaff. (U23503)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	300
E. chaff. (AF147752)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	300
A. platys (AF156784)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	294
A. platys (M82801)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	293
A. phag. (AY527214)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	291
E. sennet. (M73225)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACAC	289
E. sennet. (M73219)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACAC	242
A. platys (AY077619)	GATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGATAC	288

Abb. 10: Lage von Primern und Sonde der PCR EC-16S im Vergleich mit Sequenzen verschiedener *Ehrlichia* spp.; ■ Primer EC-1; ■ Sonde EC-S1; ■ Primer EC-2; Anmerkung: *N. sennetsu* wird in diesem Alignment noch als *E. sennetsu* bezeichnet

Bei der PCR ECP-p30 wurde für die manuell konstruierten Primer (ECP-1 und ECP-2) und die vom Programm „Beacon Designer 2.1“ ermittelte Sonde (ECP-S1; Tab. 9), anhand der Alignments ebenfalls eine Überprüfung der Spezifität durchgeführt. Für *E. ewingii* waren keine Sequenzinformationen für den Sequenzbereich verfügbar, der für die Lage der Primer und Sonde ausgewählt worden war (Abb. 11). Von einer Spezifität von Primern und Sonde kann jedoch bereits ausgegangen werden, wenn keine Amplifikation von *E. chaffeensis* erfolgt.

Tab. 9: Sequenzen von Primern und Sonde für die PCR ECP-p30

	Sequenz
ECP-1	5'-AGTTACCCTATCACACCAGAAGTC-3'
ECP-2	5'-CGTCAAGAGTTACTGAAGCAGATG-3'
ECP-S1	5'-6-FAM-CGCGATCTACTACAGGAGTTATTACAGGTATCTTCTCGATCGCG-Dabcyl-3'

Beide Primer sowie die Sonde wiesen deutliche Sequenzunterschiede zum p28-Gen von *E. chaffeensis*, der *E. canis* am nächsten verwandten Ehrlichienart auf. So bestanden sowohl beim Forward-Primer als auch beim Reverse-Primer Unterschiede in den ersten drei Basen am 3'-Ende, die eine spezifische Amplifikation des p30-10-Gens von *E. canis* erwarten ließen (Abb.6). Die zusätzliche Untersuchung der Spezifität mit dem „Blast Search“ Programm der NCBI-Genbank bestätigte dies. Primer und Sonde passten zu 100% nur zu Sequenzen verschiedener Isolate von *E. canis*.

E. canis p30 (AF528515)	ATAGGTATTAGTTACCTATCACACCAGAAGTCTCTGCATTTATTGGTGG	692
E. canis p30 (AF528512)	ATAGGTATTAGTTACCTATCACACCAGAAGTCTCTGCATTTATTGGTGG	692
E. chaff. (AF077734)	TTAGGTTTAAGCTACTCTATAAGCCCAGAACTTCTGTCTTTGTCGGCGG	925
E. chaff. (AF077735)	TTAGGTTTAAGCTACTCTATAAGCCCAGAACTTCTGTCTTTGTCGGCGG	593
E. chaff. (AF077733)	TTAGGTTTAAGCTACTCTATAAGCCCAGAACTTCTGTGTTTATTGGTGG	931
E. chaff. (AF077732)	TTAGGTTTAAGCTACTCTATAAGCCCAGAACTTCTGTGTTTATTGGTGG	930
E. ewingii (AF287962)	.....	505
E. ewingii (AF287961)	.....	505
E. ewingii (AF287964)	.....	505
E. canis p28 (AF082749)	CTGGGCATTAGTTACTCTATTAATCCGGAAACCTCTGTTTTCATCGGTGG	686
E. canis p28 (AF082747)	CTGGGCATTAGTTACTCTATTAATCCGGAAACCTCTGTTTTCATCGGTGG	686
E. canis p28 (AF082750)	CTGGGCATTAGTTACTCTATTAATCCGGAAACCTCTGTTTTCATCGGTGG	686
E. canis p30 (AF528515)	ATACTACCATGGCGTTATTGGTAATAAATTTGAGAAGATACCTGTAATAA	742
E. canis p30 (AF528512)	ATACTACCATGGCGTTATTGGTAATAAATTTGAGAAGATACCTGTAATAA	742
E. chaff. (AF077734)	ACATTTCCATAAGGTAATGGGAAACGAATTCAGAGATATTCCTGCTATAA	975
E. chaff. (AF077735)	ACATTTCCATAAGGTAATGGGAAACGAATTCAGAGATATTCCTGCTATAA	643
E. chaff. (AF077733)	ACATTTCCATAAGGTAATGGGAAACGAATTTAGAGATATTCCTGCTGTAA	981
E. chaff. (AF077732)	ACATTTCCATAAGGTAATGGGAAACGAATTTAGAGATATTCCTGCTGTAA	980
E. ewingii (AF287962)	.....	505
E. ewingii (AF287961)	.....	505
E. ewingii (AF287964)	.....	505
E. canis p28 (AF082749)	GCATTTCCACAGGATCATAGGTAATGAGTTTAGAGATATTCCTGCAATAG	736
E. canis p28 (AF082747)	GCATTTCCACAGGATCATAGGTAATGAGTTTAGAGATATTCCTGCAATAG	736
E. canis p28 (AF082750)	GCATTTCCACAGGATCATAGGTAATGAGTTTAGAGATATTCCTGCAATAG	736
E. canis p30 (AF528515)	CTCCTGTAGTATTAATATGATGCTCCTCAAACCAATCTGCTTCAGTAACT	792
E. canis p30 (AF528512)	CTCCTGTAGTATTAATATGATGCTCCTCAAACCAATCTGCTTCAGTAACT	792
E. chaff. (AF077734)	TACCTAGTGGATCAAGTCTTACA...GGGAATCACCCCTGCAATAGTAACA	1022
E. chaff. (AF077735)	TACCTAGTGGATCAAGTCTTACA...GGGAATCACCCCTGCAATAGTAACA	690
E. chaff. (AF077733)	TACCTAATGGATCAAGTCTTACA...GGAAACCAACCCCTGCAATAGTAACA	1028
E. chaff. (AF077732)	TACCTAGTGGATCAAGTCTTACA...GGAAACCAACCCCTGCAATAGTAACA	1027
E. ewingii (AF287962)	.....	505
E. ewingii (AF287961)	.....	505
E. ewingii (AF287964)	.....	505
E. canis p28 (AF082749)	TACCTAGTAACTCAACTACAATAAGTGGACCACAATTTGCAACAGTAACA	786
E. canis p28 (AF082747)	TACCTAGTAACTCAACTACAATAAGTGGACCACAATTTGCAACAGTAACA	786
E. canis p28 (AF082750)	TACCTAGTAACTCAACTACAATAAGTGGACCACAATTTGCAACAGTAACA	786
E. canis p30 (AF528515)	CTTGACGTTGGATACTTTGGCGGAGAAATGGGAATGAGGTTACCTTCTA	842
E. canis p30 (AF528512)	CTTGACGTTGGATACTTTGGCGGAGAAATGGGAATGAGGTTACCTTCTA	842
E. chaff. (AF077734)	CTAGATGTATGCCACTTTGGTATAGAAGTTGGAGGAAGATTTGCTTTCTA	1072
E. chaff. (AF077735)	CTAGATGTATGCCACTTTGGTATAGAAGTTGGAGGAAGATTTGCTTTCTA	740
E. chaff. (AF077733)	CTGGACGTATGCCACTTTGGTATAGAGCTTGGAGGAAGGTTTGTCTTCTA	1078
E. chaff. (AF077732)	CTGGACGTATGCCACTTTGGTATAGAGCTTGGAGGAAGGTTTGTCTTCTA	1077
E. ewingii (AF287962)	.....	505
E. ewingii (AF287961)	.....	505
E. ewingii (AF287964)	.....	505
E. canis p28 (AF082749)	CTAAATGTGTGTCACCTTTGGTTTAGAAGTTGGAGGAAGATTTAACTTC..	834
E. canis p28 (AF082747)	CTAAATGTGTGTCACCTTTGGTTTAGAAGTTGGAGGAAGATTTAACTTC..	834
E. canis p28 (AF082750)	CTAAATGTGTGTCACCTTTGGTTTAGAAGTTGGAGGAAGATTTAACTTC..	834

Abb. 11: Lage von Primern und Sonde der PCR ECP-p30 im Vergleich mit Sequenzen verschiedener *Ehrlichia* spp.; ■ Primer ECP-1; ■ Sonde ECP-S1; ■ Primer ECP-2

### 1.1.2 *Anaplasma phagocytophilum*

Bei der PCR AP-16S wurde der Forward-Primer auf einen Genabschnitt gerichtet, der im 3'-Bereich zwar keine Abgrenzung zu *A. platys* erlaubte, aber in der ersten oder zweiten Basenposition Unterschiede zu den einbezogenen Wolbachien- und Ehrlichiensequenzen, einschließlich *N. risticii*, zeigte. Der Reverse-Primer wurde jedoch als für *A. phagocytophilum*

spezifisch konstruiert, da die ersten beiden Basen am 3'-Ende von der entsprechenden Region bei *A. platys* (AY077619, AF156784, M82801), der am nächsten verwandten Anaplasmenart, sowie von der dritten Base von *N. risticii* (M21290) und von mindestens einer der ersten drei Basen bei den berücksichtigten Wolbachien und Ehrlichien verschieden waren. Die Sonde wurde auf einen bei diesen Erregern konservierten Bereich platziert, war also unspezifisch (Tab. 10; Abb. 12).

Tab. 10: Primer und Sonde für die PCR AP-16S

	Sequenz
AP-3	5'-TATGGGATAGCCACTAGAAATG-3'
AP-4	5'-CTCAGACCAGCTATAGATCATC-3'
AP-S2	5'-6-FAM-CGCGATCTCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTGATCGCG-Dabcyl-3'

A. phag. (AY527214)	AATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGT	118
A. platys (AY077619)	AA.AATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGT	115
A. platys (AF156784)	AA.AATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGT	121
A. platys (M82801)	AA.AATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGT	121
Wolbachia (AY394613)	TA.ACTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGTATAGGAATCTACCTAGTAGT	116
Wolbachia (AJ632147)	TA.ACTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGTATAGGAATCTACCTAGTAGT	96
E. risticii (M21290)	GT...CCCGTGGCAGACGGGTGCGTAACCGCTGGGAACCTTGCTGGTAGT	140
E. canis (AY394465)	AATTGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGT	115
E. canis (U26740)	AATTGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGT	105
E. canis (M73221)	AATTGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGT	126
E. chaff. (U60476)	AATTGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGT	127
E. chaff. (U23503)	AATTGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGT	127
E. chaff. (AF147752)	AATTGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCGTAGGAATCTACCTAGTAGT	127
E. sennet. (M73225)	GT...CCCGTGGCAGACGGGTGCGTAACCGCTGGGAACCTTGCTGGTAGT	117
E. sennet. (M73219)	GT...CCCGTGGCAGACGGGTGCGTAACCGCTGGGAACCTTGCTGGTAGT	70
Rickettsia (D84558)	AG...TTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGCTGGGAATCTACCCATCAGT	112
A. phag. (AY527214)	ATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGG	168
A. platys (AY077619)	ATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGG	165
A. platys (AF156784)	ATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGG	171
A. platys (M82801)	ATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGG	171
Wolbachia (AY394613)	ACGGAATAAATTGTTGGAAACGGCAACTAATACCGTATACGCCCTACGGGG	166
Wolbachia (AJ632147)	ACGGAATAAATTGTTGGAAACGGCAACTAATACCGTATACGCCCTACGGGG	146
E. risticii (M21290)	AGGGAATAACCCAGTGGAAACATTGGGCAACACCCTATACGCCCTGAGGGG	190
E. canis (AY394465)	ACGGAATAGCCATTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCGAGGGG	165
E. canis (U26740)	ACGGAATAGCCATTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCGAGGGG	155
E. canis (M73221)	ACGGAATAGCCATTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCGAGGGG	176
E. chaff. (U60476)	ATGGAATAGCCATTAGAAATGATGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGG	177
E. chaff. (U23503)	ATGGAATAGCCATTAGAAATGATGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGG	177
E. chaff. (AF147752)	ATGGAATAGCCATTAGAAATGATGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGG	177
E. sennet. (M73225)	AGGGAATAACCCAGTGGAAACATTGGGCAACACCCTATACGCCCTGAGGGG	167
E. sennet. (M73219)	AGGGAATAACCCAGTGGAAACATTGGGCAACACCCTATACGCCCTGAGGGG	120
Rickettsia (D84558)	ACGGAATAAACTTTTAGAAATAAAGCTAATACCGTATATTCTACGGAA	162
A. phag. (AY527214)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTA	218
A. platys (AY077619)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTA	215
A. platys (AF156784)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTA	221
A. platys (M82801)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTA	221
Wolbachia (AY394613)	GAAAAATTTATTGCTATTAGATGAGCCTATATTAGATTAGCTAGTTGGTG	216
Wolbachia (AJ632147)	GAAAAATTTATTGCTATTAGATGAGCCTATATTAGATTAGCTAGTTGGTG	196
E. risticii (M21290)	GAAA.ATTTATTGCTATCAGATAGGCCCGCGTTAGATTAGCTAGTTGGTG	239
E. canis (AY394465)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTG	215
E. canis (U26740)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTG	205
E. canis (M73221)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATAAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTG	226
E. chaff. (U60476)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTA	227
E. chaff. (U23503)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTA	227
E. chaff. (AF147752)	GAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTACGTTAGATTAGCTAGTTGGTA	227
E. sennet. (M73225)	GAAA.ATTTATTGCTATCAGATAGGCCCGCGTTAGATTAGCTAGTTGGTG	216
E. sennet. (M73219)	GAAA.ATTTATTGCTATCAGATAGGCCCGCGTTAGATTAGCTAGTTGGTG	169
Rickettsia (D84558)	GAAAGATTTATCGCTGATGGATGAGCCCGCTCAGATTAGTCTGTTGGTG	212
A. phag. (AY527214)	GGGTAAGGCCTACCAAGGCAGTATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	268
A. platys (AY077619)	GGGTAAGGCCTACCAAGGCAGTATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	265
A. platys (AF156784)	GGGTAAGGCCTACCAAGGCAGTATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	271
A. platys (M82801)	GGGTAAGGCCTACCAAGGC.GTGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	270
Wolbachia (AY394613)	GAGTAATAGCCTACCAAGGCAATGATCTATAGCTGATCTGAGAGGATGAT	266
Wolbachia (AJ632147)	GGGTAATAGCCTACCAAGGCAATGATCTATAGCTGATCTGAGAGGATGAT	246
E. risticii (M21290)	GGGTAATGGCCTACCAAGGCAGCAGTATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	289
E. canis (AY394465)	AGGTAATGGCCTACCAAGGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGAT	265
E. canis (U26740)	AGGTAATGGCCTACCAAGGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGAT	255
E. canis (M73221)	AGGTAATGGCCTACCAAGGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGAT	276
E. chaff. (U60476)	AGGTAATGGCCTACCAAGGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGAT	277
E. chaff. (U23503)	AGGTAATGGCCTACCAAGGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGAT	277
E. chaff. (AF147752)	AGGTAATGGCCTACCAAGGCTATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGACGAT	277
E. sennet. (M73225)	GGGTAATGGCCTACCAAGGCAGCAGTATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	266
E. sennet. (M73219)	GGGTAATGGCCTACCAAGGCAGCAGTATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	219
Rickettsia (D84558)	AGGTAACGGCTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	262

Abb. 12: Lage von Primern und Sonde der PCR AP-16S im Vergleich mit Sequenzen verschiedener *Ehrlichia* spp.; ■ Primer AP-3; ■ Sonde AP-S2; ■ Primer AP-4; Anmerkung: *N. sennetsu* sowie *N. risticii* werden in diesem Alignment noch als *E. sennetsu* bzw. *E. risticii* bezeichnet

## 1.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

### 1.2.1 Optimierung der PCR-Parameter für *Ehrlichia canis*

Die Optimierung wurde mit einem iCycler iQ™ (Bio-Rad, München) und mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: initiales Aufheizen auf 95 °C für 13 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei der jeweils eingestellten Temperatur in °C für 1 min und Extension bei 72 °C für 30 s. Die Fluoreszenz wurde bei jedem Annealingschritt gemessen. Nach jedem Lauf wurden die Daten mit der Software Version 3.0A analysiert (iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, München). Bei der Optimierung wurde genomische DNA eingesetzt, die bereits mittels konventioneller PCR positiv auf *E. canis* getestet worden war. Pro Lauf wurde eine Negativkontrolle (Wasser statt DNA) mitgeführt.

#### Optimierung der Annealing-Temperatur und der Magnesiumchloridkonzentration

Für die *E. canis* -Real-time PCRs EC-16S (mit den Primern EC-1 und EC-2 und der Sonde EC-S1) und ECP-p30 (mit den Primern ECP-1 und ECP-2 und der Sonde ECP-S1) wurden verschiedene Annealing-Temperaturen in Kombination mit verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen getestet. Für die PCR EC-16S wurden zunächst Annealing-Temperaturen von 50 °C, 55 °C und 60 °C in Kombination mit MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen von 2 mM, 5 mM und 8 mM analysiert (Tab. 11) und im Anschluss daran zur weiteren Eingrenzung der Reaktionsoptima PCR-Läufe bei 48 °C, 51 °C, 54 °C und 57 °C mit jeweils 2 mM, 3,5 mM und 5 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Unter Einbeziehung des Schwellenwertes, der Sigmoidität der Fluoreszenzkurven, der Steilheit der Kurven in der exponentiellen Phase der PCR und der absoluten Höhe der Fluoreszenz ergaben sich für die PCR EC-16S dabei Optima bei einer Annealing-Temperatur von 57 °C und einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 4 mM.

Die PCR ECP-p30 wurde anfangs ebenfalls mit Annealing-Temperaturen von 50 °C, 55 °C und 60 °C in Kombination mit MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen von jeweils 2 mM, 5 mM und 8 mM (Tab. 11) getestet. Anschließend erfolgten Reaktionsläufe bei Temperaturen von 57 °C, 61 °C und 63 °C bei einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 5 mM. Hierbei ergab sich das Optimum bei einer Annealing-Temperatur von 57 °C und einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 5 mM.

Tab. 11: Pipettierschema für die Optimierung anhand der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration

MgCl <sub>2</sub> -Konzentration	2 mM	5mM	8mM
<b>10x Puffer mit 1,5mM MgCl<sub>2</sub></b>	5 µl	5 µl	5 µl
<b>Primer 1 (50 µM)</b>	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Primer 2 (50 µM)</b>	1 µl	1 µl	1 µl
<b>Sonde (50 µM)</b>	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
<b>dNTP (10mM each)</b>	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
<b>HotStar Taq (5u/µl)</b>	0,5µl	0,5µl	0,5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	1 µl	7 µl	13 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	34,75 µl	28,75 µl	22,75 µl
<b>DNA</b>	5 µl	5 µl	5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	50 µl	50 µl	50 µl

#### Optimierung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Bovinem Serumalbumin (BSA)

Zusätzlich wurde der Einfluss von DMSO und BSA geprüft. Dabei wurden Kombinationen aus 0 %, 2 % und 4 % DMSO mit jeweils 0 µl und 10 µl (1g/l) BSA bei 4 mM und 6 mM MgCl<sub>2</sub> für die PCR EC-16S und bei 5 mM und 7 mM MgCl<sub>2</sub> für die PCR ECP-p30 getestet. Sowohl der Zusatz von DMSO als auch der von BSA wirkten sich negativ aus. Es kam zu einem späteren und flacheren Kurvenanstieg, sowie zu einer geringeren Fluoreszenz. Auf eine Zugabe von DMSO oder BSA wurde daher verzichtet.

#### Optimierung dNTP-Konzentration

Sowohl die PCR EC-16S als auch die PCR ECP-p30 wurden nun mit verschiedenen dNTP-Konzentrationen getestet, und zwar wurden 1,25 µl und 2,5 µl dNTP (10 mM each) pro 50 µl Ansatz zugegeben. Die restlichen Bedingungen entsprachen den in Tabelle 12 zusammengefassten Werten. Die niedrigere Zugabe von 1,25 µl dNTP (10 mM each) lieferte in beiden Fällen bessere Ergebnisse.

Tab. 12: Optimalbedingungen der PCRs EC-16S und ECP-p30 für *E. canis*

	<b>PCR-EC-16S</b>	<b>PCR-ECP-p30</b>	<b>Hersteller</b>
	<b>Primer EC-1/ EC-2 und Sonde EC-S1</b>	<b>Primer ECP-2 und Sonde ECP-S1</b>	
<b>Annealing-Temperatur</b>	57°C	57°C	
<b>10x Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub></b>	5 µl	5 µl	Qiagen, Hilden
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	5 µl	7 µl	Qiagen, Hilden
<b>H<sub>2</sub>O</b>	30,75 µl	28,75 µl	
<b>Primer 1 (50 µM)</b>	1 µl	1 µl	ThermoHybaid, Ulm
<b>Primer 2 (50 µM)</b>	1 µl	1 µl	ThermoHybaid, Ulm
<b>Sonde (50 µM)</b>	0,5 µl	0,5 µl	ThermoHybaid, Ulm
<b>dNTP (10mM each)</b>	1,25 µl	1,25 µl	Roth
<b>HotStar Taq (5u/µl)</b>	0,5 µl	0,5 µl	Qiagen, Hilden
<b>DNA</b>	5 µl	5 µl	
<b>Gesamtvolumen</b>	50 µl	50 µl	

### 1.2.2 Optimierung der PCR für *Anaplasma phagocytophilum*

Die Optimierung der PCR wurde mit einem iCycler iQ™ (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen waren: initiales Aufheizen auf 95 °C für 13 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei der jeweils eingestellten Temperatur in °C für 1 min und Extension bei 72 °C für 30 s. Die Fluoreszenz wurde bei jedem Annealingsschritt gemessen. Nach jedem Lauf wurden die Daten mit der Software Version 3.0A analysiert (iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, München). Zur Amplifizierung wurde genomische DNA aus dem Blut eines Hundes eingesetzt, bei dem im Giemsa gefärbten Blutausschrieb die bei einer Infektion mit *A.*

*phagocytophilum* typischen Einschlusskörperchen (Morulae) in den Granulozyten diagnostiziert worden waren. Außerdem waren im Serum des Hundes mittels IFAT spezifische Antikörper gegen *A. phagocytophilum* nachgewiesen worden. Pro Lauf wurde eine Negativkontrolle (Wasser statt DNA) mitgeführt.

#### Optimierung der Annealing-Temperatur und der Magnesiumchloridkonzentration

Die PCR AP-16S mit den Primern AP-3 und AP-4 und der Sonde AP-S2 wurde zunächst bei Annealing-Temperaturen von 50°, 55° und 60°C in Kombination mit Magnesiumchloridkonzentrationen von jeweils 2 mM, 5 mM und 8 mM (Pipettierschema analog Tab. 11) getestet, wobei die schlechtesten Ergebnisse bei 50 °C und 8 mM MgCl<sub>2</sub> erzielt wurden. Deshalb wurden im Anschluss Annealing-Temperaturen von 55°, 57°, 60°C, 62°C und 64 °C mit Magnesiumchloridkonzentrationen von 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM und 5 mM kombiniert. Unter Einbeziehung des Schwellenwertes, der Sigmoidität der Fluoreszenzkurven, der Steilheit der Kurven in der exponentiellen Phase der PCR und der absoluten Höhe der Fluoreszenz ergaben sich für die PCR AP-16S dabei Optima bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C und einer MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 4,5 mM.

#### Optimierung mit DMSO und BSA

Der Einfluss von DMSO und BSA wurde geprüft, indem den Reaktionsansätzen Kombinationen aus 0 %, 2 % und 4 % DMSO mit jeweils 0 µl und 10 µl (1g/l) BSA bei 4,5 mM und 6,5 mM MgCl<sub>2</sub> zugefügt wurden. Sowohl der Zusatz von DMSO als auch der von BSA wirkten sich negativ aus. Es kam zu einem späteren und flacheren Kurvenanstieg, sowie zu einer geringeren Fluoreszenz. Auf eine Zugabe von DMSO oder BSA wurde daher verzichtet.

#### Optimierung der dNTP-Konzentration

Die PCR AP-16S für *A. phagocytophilum* wurde nun mit 2 verschiedenen dNTP-Konzentrationen (1,25 µl und 2,5 µl [10 mM each] pro 50 µl Ansatz) getestet. Die Zugabe von 1,25 µl dNTP (10mM) lieferte bessere Ergebnisse. Die ermittelten Optimalbedingungen der PCR AP-16S sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Optimalbedingungen der PCR AP-16S für *A. phagocytophilum*

	PCR-AP-16S	Hersteller
<b>Annealing-Temperatur</b>	60°C	
<b>10x Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub></b>	5 µl	Qiagen, Hilden
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	6 µl	Qiagen, Hilden
<b>H<sub>2</sub>O</b>	29,75 µl	
<b>Primer AP-3 (50 µM)</b>	1 µl	ThermoHybaid, Ulm
<b>Primer AP-4 (50 µM)</b>	1 µl	ThermoHybaid, Ulm
<b>Sonde AP-S2 (50 µM)</b>	0,5 µl	ThermoHybaid, Ulm
<b>dNTP (10mM each)</b>	1,25 µl	Roth
<b>HotStar Taq (5u/µl)</b>	0,5 µl	Qiagen, Hilden
<b>DNA (Positivkontrolle <i>A.phagocytophilum</i>)</b>	5 µl	
<b>Gesamtvolumen</b>	50 µl	

## 2. Ergebnisse des Vergleichs verschiedener Real-time PCRs

### 2.1 PCRs zur Untersuchung auf *Ehrlichia canis*

#### 2.1.1 Analytische Spezifität

Zur Bestimmung der analytischen Spezifität der PCRs EC-16S und ECP-p30 wurden die Tests nach den in Tab. 12 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Bei beiden PCRs lieferte nur der Ansatz, der genomische DNA von *E. canis* enthielt, ein positives Ergebnis, nicht jedoch DNA von nahe verwandten Erregern (Tab. 14).

Tab. 14: Ergebnisse der PCR EC-16S und ECP-p30 bei Einsatz von DNA unterschiedlicher Erreger

<b>Erreger</b>	<b>PCR EC-16S</b>	<b>PCR ECP-p30</b>
<i>E. canis</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>N. risticii</i>	negativ	negativ
<i>A. phagocytophilum</i>	negativ	negativ
<i>A. platys</i>	negativ	negativ
<i>B. canis</i>	negativ	negativ
<i>B. gibsoni</i>	negativ	negativ
<i>H. canis</i>	negativ	negativ
<b>Negativkontrolle</b>	negativ	negativ

### 2.1.2 Analytische Sensitivität

Um die analytische Sensitivität der beiden Nachweisverfahren für *E. canis* (PCR EC-16S und ECP-p30) zu vergleichen, wurden Verdünnungsstufen *E. canis*-haltiger genomischer DNA unbekannter Konzentration eingesetzt. Bei beiden PCRs wurde ein positives Ergebnis bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$  erzielt. Die Schwellenwerte bei der PCR ECP-p30 lagen meist niedriger als bei der PCR EC-16S (Tab. 15) und die Kurven der PCR ECP-p30 wiesen einen steileren Anstieg und einen sigmoideren Verlauf auf. Zusätzlich zeigte sich eine deutlich höhere absolute Fluoreszenz als bei der PCR EC-16S, weshalb die PCR mit den Primern ECP-1 und ECP-2 und der Sonde ECP-S1, die auf das Membranprotein p30-10 gerichtet ist, für die weiteren Untersuchungen (Validierung und Untersuchung der Patientenproben) ausgewählt wurde.

Tab. 15: Schwellenwerte der PCR EC-16S und ECP-p30 bei Einsatz unterschiedlicher DNA-Verdünnungen von *E. canis*

<b>Verdünnungsstufe der <i>E. canis</i>-DNA</b>	<b>PCR EC-16S</b>	<b>PCR ECP-p30</b>
<b>10<sup>0</sup></b>	<b>36,2</b>	<b>32,2</b>
<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>38,0</b>	<b>36,1</b>
<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>39,2</b>	<b>39,7</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	negativ	negativ
<b>10<sup>-4</sup></b>	negativ	negativ
<b>10<sup>-5</sup></b>	negativ	negativ

### 2.1.3 Ergebnisse der Validierung der PCR ECP-p30 anhand geblindeter Proben

Zur Validierung der PCR ECP-p30 wurden ausgesuchte und geblindete Proben in die PCR eingesetzt, wie in Kap. III, A, 2.1.3 ausführlich dargestellt. Hierbei wurden von den 22 eingesetzten tatsächlich positiven Proben 18 Proben richtig positiv beurteilt, während 4 der eingesetzten positiven Proben ein falsch negatives Ergebnis lieferten. Alle 28 eingesetzten negativen Proben ergaben richtig negative Resultate. Es kam zu keinen falsch positiven Testergebnissen. Die Testresultate der PCR wurden in eine Vier-Felder Tafel eingetragen (Abb.5 und Abb. 13), um die diagnostische Sensitivität, die diagnostische Spezifität und die diagnostische Effizienz des Testes zu berechnen.

	Test positiv: <b>18</b>	Test negativ: <b>32</b>
Infektion mit <i>E. canis</i> vorhanden: <b>22</b>	richtig positiv: <b>18</b>	falsch negativ: <b>4</b>
Infektion mit <i>E. canis</i> nicht vorhanden: <b>28</b>	falsch positiv: <b>0</b>	richtig negativ: <b>28</b>

Abb. 13: Vier-Felder-Tafel mit den Ergebnissen der PCR ECP-p30

Es ergab sich eine **diagnostische Sensitivität** von **82 %** (18/22) für die PCR ECP-p30, das heißt dass eine vorhandene Infektion mit *E. canis* mit einer Wahrscheinlichkeit von 82% zu einem positiven Testergebnis führt. Dementsprechend betrug die **Unempfindlichkeit**, also die Wahrscheinlichkeit, trotz vorhandener Infektion ein negatives Testergebnis zu erhalten, **18 %**.

Für die PCR ECP-p30 wurde eine **diagnostische Spezifität** von **100 %** (28/28) berechnet, es ist also kein positives Testergebnis zu erwarten, wenn keine Infektion mit *E. canis* vorliegt. Die **diagnostische Unspezifität** betrug für diesen Test somit **0 %**.

Aus den Ergebnissen der PCR ergab sich eine **diagnostische Effizienz** von **92 %** (46/50). Sie gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine richtige Zuordnung durch das Laborergebnis erfolgt. Ein falsches Ergebnis (**diagnostische Ineffizienz**) ist somit mit einer Wahrscheinlichkeit von **8 %** zu erwarten.

Der **prädiktive Wert des positiven Testergebnisses (prädpos)**, der den Anteil richtig positiver Testergebnisse unter allen positiven Ergebnissen angibt, lag für die PCR ECP-p30 bei **100 %** (18/18). Der **prädiktive Wert des negativen Testergebnisses (prädneg)**, das heißt die Wahrscheinlichkeit dass keine Infektion mit *E. canis* vorliegt, wenn das Testergebnis negativ ist, betrug **87,5 %** (28/32).

## **2.2 Ergebnisse des Vergleichs der PCR AP-16S mit bereits publizierten Real-time PCRs zur Untersuchung auf *Anaplasma phagocytophilum***

Zur Beurteilung der Qualität der PCR AP-16S wurde das entwickelte Testverfahren mit bereits publizierten PCRs verglichen. Hierfür wurden eine Real-time PCR, die als Zielgen ebenfalls die 16S rDNA aufweist und mit den Primern Ep50r und Ep145f und der Sonde Ep80p durchgeführt wird (Pusterla et al., 1999a), sowie eine Real-time PCR, die auf das Oberflächenprotein msp2 gerichtet ist und die Primer ApMSP2f und ApMSP2r und die Sonde ApMSP2-HEX aufweist (Courtney et al., 2004), im Folgenden als PCR AP-MSP2 bezeichnet, einbezogen.

## 2.2.1 Analytische Spezifität

Zur Beurteilung der analytischen Spezifität der PCR AP-16S, der PCR nach Pusterla et al. (1999a) und der PCR AP-MSP2 wurden verschiedene, mit *A. phagocytophilum* nahe verwandte Erreger und andere beim Hund im Blut vorkommende Pathogene getestet. Dabei ergab sich, dass die PCR AP-MSP2 nur mit *A. phagocytophilum* ein positives Ergebnis lieferte, während die PCR AP-16S und die PCR nach Pusterla et al. (1999a) auch mit *A. platys* und *N. risticii* ein positives Resultat erbrachten (Tab. 16).

Tab. 16: Ergebnisse der PCR AP-16S, der PCR nach Pusterla et al. (1999a) und der PCR AP-MSP-2 (Courtney et al., 2004) bei Einsatz von DNA unterschiedlicher Erreger

<b>Erreger</b>	<b>PCR AP-16S</b>	<b>PCR Pusterla et al. (1999a)</b>	<b>PCR AP-MSP2</b>
<i>A. phagocytophilum</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
<i>A. platys</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ
<i>E. canis</i>	negativ	negativ	negativ
<i>N. risticii</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ
<i>B. canis</i>	negativ	negativ	negativ
<i>B. gibsoni</i>	negativ	negativ	negativ
<i>H. canis</i>	negativ	negativ	negativ

## 2.2.2 Analytische Sensitivität

Zur Überprüfung der analytischen Sensitivität wurden Verdünnungsreihen genomischer DNA mit unbekannter Konzentration an *A. phagocytophilum* eingesetzt. Die PCR AP-16S war hierbei um eine Zehnerpotenz sensitiver als die PCR nach Pusterla et al. (1999a) und ergab ein positives Ergebnis bis zu einer DNA-Verdünnung von  $10^{-4}$ . Mit der PCR AP-MSP2 wurde allerdings auch mit der stärksten verwendeten Verdünnung von  $10^{-5}$  ein positives Ergebnis erzielt. Die Schwellenwerte lagen bei der PCR AP-MSP2 niedriger als bei den anderen getesteten PCR (Tab. 17). Zudem wurde eine höhere absolute Fluoreszenz beobachtet als bei der PCR Ap-16S und bei der PCR nach Pusterla et al. (1999a).

Tab. 17: Schwellenwerte der PCR AP-16S, der PCR nach Pusterla et al. (1999a) und der PCR AP-MSP2 (Courtney et al., 2004) bei Einsatz unterschiedlicher DNA-Verdünnungen von *A. phagocytophilum*

<b>Verdünnungsstufe der extrahierten DNA</b>	<b>PCR AP-16S</b>	<b>PCR Pusterla et al. (1999a)</b>	<b>PCR AP-MSP2</b>
<b>10<sup>0</sup></b>	<b>24,8</b>	<b>30,5</b>	<b>18,6</b>
<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>28,0</b>	<b>34,6</b>	<b>21,6</b>
<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>32,5</b>	<b>39,9</b>	<b>25,8</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>34,6</b>	<b>41,5</b>	<b>29,9</b>
<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>36,1</b>	negativ	<b>22,9</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	negativ	negativ	<b>36,3</b>

Zusätzlich wurden Verdünnungen *A. phagocytophilum*-positiven Blutes mit negativ getestetem Hundeblood hergestellt und erst im Anschluss die DNA-Extraktion durchgeführt. Auch hier wies die PCR nach Pusterla et al. (1999a) die geringste Sensitivität auf und lieferte ein positives Ergebnis bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-3</sup>. Die PCRs AP-16S und AP-MSP2 waren um eine Zehnerstufe sensitiver. Bei der PCR AP-MSP2 lagen die Schwellenwerte erneut in der Regel niedriger als bei den anderen Tests (Tab. 18). Zudem zeigten die Kurven in der exponentiellen Phase der PCR einen steileren Verlauf und insgesamt eine höhere absolute Fluoreszenz.

Tab. 18: Schwellenwerte der PCR AP-16S, der PCR nach Pusterla et al. (1999a) und der PCR AP-MSP2 (Courtney et al., 2004) bei Einsatz von DNA von *A. phagocytophilum* aus unterschiedlichen Blutverdünnungen

<b>Verdünnungsstufe des Blutes</b>	<b>PCR-AP-16S</b>	<b>PCR Pusterla et al. (1999a)</b>	<b>PCR AP-MSP2</b>
<b>10<sup>0</sup></b>	<b>29,6</b>	<b>35</b>	<b>22,1</b>
<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>30,4</b>	<b>37,6</b>	<b>25,8</b>
<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>32,7</b>	<b>44,2</b>	<b>28,1</b>
<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>33,4</b>	<b>42</b>	<b>31,6</b>
<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>35,9</b>	negativ	<b>43</b>
<b>10<sup>-5</sup></b>	negativ	negativ	negativ

## 2.2.3 Ergebnisse der Validierung anhand geblindeter Proben

Zur Validierung und zum Vergleich der PCR AP-16S, der PCR nach Pusterla et al. (1999a) und der PCR AP-MSP2 wurden ausgesuchte und geblindete Proben eingesetzt. Keiner der Tests lieferte hierbei ein falsch positives Ergebnis. Die PCR nach Pusterla et al. (1999a) lieferte für 9 der insgesamt 25 eingesetzten positiven Proben ein positives Testresultat, während in 16 der tatsächlich positiven Proben der Nachweis von *A. phagocytophilum* nicht erbracht wurde. Mit der PCR AP-16S konnten 16 der insgesamt 25 positiven Proben richtig erkannt werden, während die PCR AP-MSP2 für 24 der insgesamt 25 eingesetzten Proben ein positives Testresultat lieferte (Abb.6).

	PCR AP-16S		PCR nach Pusterla et al. (1999a)		PCR AP-MSP2	
	Test positiv:	Test negativ:	Test positiv:	Test negativ:	Test positiv:	Test negativ:
	<b>16</b>	<b>34</b>	<b>9</b>	<b>41</b>	<b>24</b>	<b>26</b>
Infektion mit <i>A. phagocytophilum</i> vorhanden: <b>25</b>	richtig positiv: <b>16</b>	falsch negativ: <b>9</b>	richtig positiv: <b>9</b>	falsch negativ: <b>16</b>	richtig positiv: <b>24</b>	falsch negativ: <b>1</b>
Infektion mit <i>A. phagocytophilum</i> nicht vorhanden: <b>25</b>	falsch positiv: <b>0</b>	richtig negativ: <b>25</b>	falsch positiv: <b>0</b>	richtig negativ: <b>25</b>	falsch positiv: <b>0</b>	richtig negativ: <b>25</b>

Abb. 14: Ergebnisse der Untersuchung geblindeter Proben mittels der verschiedenen PCRs

Anhand dieser Ergebnisse wurden die diagnostische Sensitivität, die diagnostische Spezifität und die diagnostische Effizienz berechnet und vergleichend dargestellt (Tab. 19).

Tab. 19: Vergleich der Ergebnisse der Validierung für die PCRs zur Untersuchung auf *A. phagocytophilum*

	PCR AP-16S	PCR nach Pusterla et al. (1999a)	PCR AP-MSP2
<b>diagnostische Sensitivität</b>	64%	36%	96%
<b>diagnostische Unempfindlichkeit</b>	36%	64%	4%
<b>diagnostische Spezifität</b>	100%	100%	100%
<b>diagnostische Unspezifität</b>	0%	0%	0%
<b>diagnostische Effizienz</b>	82%	68%	98%
<b>diagnostische Ineffizienz</b>	18%	32%	2%
<b>prädiktiver Wert des positiven Testergebnisses</b>	100%	100%	100%
<b>prädiktiver Wert des negativen Testergebnisses</b>	74%	61%	96%

Aufgrund der Ergebnisse der Validierung mittels geblindeter Proben und der Ergebnisse der Spezifitäts- und der Sensitivitätsprüfung wurde für die Untersuchung der Patientenproben die PCR AP-MSP2 ausgewählt.

### 3. Nachweisgrenze der PCR ECP-p30 für *Ehrlichia canis* und der PCR AP-MSP2 für *Anaplasma phagocytophilum*

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wurden in Plasmide einligierte PCR-Produkte der PCR ECP-p30 (ECK) für *E. canis* und der PCR AP-MSP2 (APk) für *A. phagocytophilum*

verwendet. Mittels Agarosegel-Elektrophorese und Vergleich der Bandenintensitäten der Plasmid-DNA-Lösungen mit einem Standard wurde für die Plasmidlösung ECK eine DNA-Konzentration von 10 ng/μl ermittelt. Dies entspricht einer Molekülzahl von  $2,9 \times 10^{12}$  pro ml. Für die Plasmidlösung APk ergab sich eine Konzentration von 120 ng/μl und somit eine Anzahl von  $3,5 \times 10^{13}$  Molekülen/ml.

Bei der Ermittlung der Nachweisgrenze wurden Verdünnungsstufen der Plasmidlösungen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-15}$  eingesetzt und die PCRs für *E. canis* und *A. phagocytophilum* nach den in Tab. 12 bzw Tab. 6 angegebenen Bedingungen unter Einsatz von 5 μl DNA-Lösung durchgeführt. In der PCR ECP-p30 wurde dabei maximal eine Verdünnung von  $10^{-9}$  eingesetzte DNA-Lösung als positiv bewertet, was einer nachweisbaren Plasmidzahl von 14,5 Molekülen (Genkopien) pro 50 μl Ansatz entspricht. Die Nachweisgrenze der PCR AP-MSP2 (Courtney et al., 2004) lag bei einer Verdünnung der Plasmidlösung von  $10^{-10}$ . Dies entspricht einer nachweisbaren Plasmidzahl von 17,5 Molekülen pro 50 μl Ansatz.

#### 4. Ergebnisse der Untersuchung von Patienten auf Infektion mit *Ehrlichia canis* und *Anaplasma phagocytophilum*

##### 4.1 Patientengut der *Ehrlichia canis*-Studie

Bei den 244 Hunden (Proben EC1 bis EC244), die in die Studie zur Untersuchung auf *E. canis* einbezogen wurden, handelte es sich um 93 (38,1%) männliche und 151 (61,9%) weibliche Tiere. Das Alter der Hunde variierte von 3 Monaten bis 12 Jahre, wobei das durchschnittliche Alter bei 2,9 Jahren lag. 19 Hunde wurden von ihren Besitzern in der Tierklinik vorgestellt, während 52 Tiere unmittelbar von der Straße aufgelesen worden waren. Die meisten der einbezogenen Hunde, und zwar 173 Tiere, waren zu einem früheren Zeitpunkt ins Tierheim aufgenommen worden und hielten sich zum Zeitpunkt der Probennahme schon länger dort auf. Bei 68 Tieren (27,9%) der 244 untersuchten Hunde lag vorberichtlich Zeckenbefall vor. Klinische Symptome und Befunde, die auf eine monozytäre

Ehrlichiose hindeuten können, wurden bei 18 (7,4%) der Tiere festgestellt. Es handelte sich hierbei um Abmagerung (13/18), Hämorrhagien (7/18), Fieber (1/18) sowie Anämie (2/18) und Thrombozytopenie (4/18).

#### **4.2 Patientengut der *Anaplasma phagocytophilum*-Studie**

In die Studie zur Untersuchung auf *A. phagocytophilum* wurden Blutproben von insgesamt 205 Hunden einbezogen. Von 72 Hunden (Probenbezeichnung F1 bis F72) war Blut eigens für die Studie von Tierärzten eingesandt worden. Hierbei handelte es sich um 43 (59,7%) männliche und 29 (40,3%) weibliche Tiere, deren Alter durchschnittlich 6,1 Jahre betrug und zwischen 3 Monaten und 15 Jahren variierte. Außerdem wurden Proben von 133 Hunden (Probenbezeichnung OF1 bis OF133), von denen Blut im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie eingesandt worden war, einbezogen. Die Proben wurden aus allen Hundebloodproben, die in das Routinelabor eingesandt worden waren, zufällig ausgewählt. Innerhalb dieser Gruppe war für 21 (15,8%) Tiere das Alter und für 2 (1,5%) Tiere das Geschlecht unbekannt. Bei den restlichen Hunden handelte es sich um 66 männliche (50,4%) und 65 weibliche (49,6%) Hunde, deren Alter 3 Monate bis 14 Jahre und durchschnittlich 4,1 Jahre betrug.

#### **4.3 Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung auf *Anaplasma phagocytophilum***

Die lichtmikroskopische Untersuchung Giemsa-gefärbter Buffy-coat-Ausstriche auf *A. phagocytophilum* zum Nachweis von Einschlusskörperchen (Morula) in den Granulozyten (Abb. 3) wurde bei den auf Anforderung eingesandten Proben (F1 bis 72) unter Verwendung von Immersionsöl bei 500facher Vergrößerung durchgeführt. Auch bei 10-minütiger Untersuchung jedes Blutausstriches wurde *A. phagocytophilum* in keinem Fall nachgewiesen.

#### 4.4 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung

##### 4.4.1 Real-time PCR für *Ehrlichia canis*

Die Untersuchung der Proben EC1-EC244 auf *E. canis* erfolgte mittels der PCR ECP-p30 unter den in Tab. 12 zusammengefassten Bedingungen mit einem iCycler iQ™ (Bio-Rad) unter folgenden Reaktionsbedingungen: initiales Aufheizen auf 95 °C für 13 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 57°C für 1 min und Extension bei 72 °C für 30 s. Die Fluoreszenz wurde bei jedem Annealingsschritt gemessen. Nach jedem Lauf wurden die Daten mit der Software Version 3.0A analysiert (iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, München).

Bei 34 der 244 untersuchten Proben (13,9 %) wurde der Nachweis von *E. canis*-DNA erbracht, und zwar bei 15 männlichen und 19 weiblichen Tieren. Insgesamt wurde somit bei 16,1 % der männlichen und 12,6 % der weiblichen Hunde eine Infektion diagnostiziert. Das Alter der mit *E. canis* befallenen Tiere variierte von 0,5 bis 7 Jahren und betrug durchschnittlich 2,3 Jahre. Von den 34 positiv getesteten Hunden waren zwei Tiere von ihren Besitzern in der Tierklinik vorgestellt worden, zwölf Tiere waren unmittelbar von der Strasse aufgelesen worden und 20 Hunde waren zu einem früheren Zeitpunkt eingefangen worden und hielten sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme schon länger im Tierheim auf. Somit wurde DNA von *E. canis* bei 10,5 % der Tiere in privatem Besitz, bei 23,1 % der direkt von der Strasse aufgelesenen Hunde und bei 11,6 % der Hunde, die sich schon länger im Tierheim aufhielten, nachgewiesen. Die Unterschiede zwischen Straßen- und Tierheimhunden waren signifikant ( $p < 0,05$ ).

Bei 16 (47,1 %) der in der PCR positiv auf *E. canis* getesteten Hunde wurde vorberichtlich Zeckenbefall beschrieben. Vier (11,8 %) der positiven Tiere zeigten klinische Symptome oder auffällige Laborbefunde. Bei zwei (5,9 %) aller positiv getesteten Hunde wurde Abmagerung festgestellt, ein (2,9 %) Hund zeigte ausgeprägte Hämorrhagien und bei einem weiteren Tier (2,9 %) deuteten Abmagerung und Hämorrhagien auf eine Infektion mit *E. canis* hin, während bei den anderen infizierten Tieren (88,2%) keinerlei klinische Symptome beobachtet wurden. Klinische oder labordiagnostische Befunde wurden jedoch auch bei 14 Tieren (6,6 %) ermittelt, bei denen keine Infektion mit *E. canis* nachgewiesen werden konnte. Bei sechs dieser Tiere war Abmagerung festgestellt worden, ein Hund hatte eine Thrombozytopenie und

zwei Tiere zeigten Hämorrhagien als alleiniges Symptom. Bei den restlichen Tieren wurde eine Kombination mehrerer Symptome beobachtet: ein Hund wies eine Anämie mit gleichzeitiger Thrombozytopenie auf, zwei Tiere zeigten Hämorrhagien und waren zudem abgemagert, ein Hund hatte Fieber, eine Thrombozytopenie und war abgemagert und bei einem Hund wurden Abmagerung, Hämorrhagien, Anämie und Thrombozytopenie diagnostiziert.

#### 4.4.2 Real-time PCR für *Anaplasma phagocytophilum*

Die Untersuchung der Patientenproben F1-F72 und OF1-133 auf *A. phagocytophilum* erfolgte mit der PCR AP-MSP2 nach Courtney et al. (2004) mit einem iCycler iQ™ (Bio-Rad, München) unter folgenden Reaktionsbedingungen: initiales Aufheizen auf 95 °C für 13 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Annealing und Extension bei 60 °C für 1 min. Die Fluoreszenz wurde bei jedem Annealingsschritt gemessen. Nach jedem Lauf wurden die Daten mit der Software Version 3.0A analysiert (iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, München).

Bei den 72 Proben, die eigens für diese Studie von Tierärzten eingesandt wurden, wurde bei einem Hund (1,4 %) der Nachweis von *A. phagocytophilum* erbracht. Es handelte sich hierbei um eine 3-jährige, laut Anamnese sterilisierte Golden Retrieverhündin, die durch Abgeschlagenheit und Lahmheiten auffiel und vorberichtlich Zeckenbefall hatte. Bei einer sechs Monate später durchgeführten Nachuntersuchung mittels PCR wurde DNA von *A. phagocytophilum* nicht mehr nachgewiesen. Die Hündin war dabei zwischenzeitlich nicht antibiotisch behandelt worden.

Von den Proben der 133 Hunde, die aus der Routinediagnostik des Instituts stammten, lieferten zwei (1,5 %) ein positives Ergebnis in der PCR. Hierbei handelte es sich um ein 4-jähriges männliches Tier, das keine klinischen Symptome zeigte, und eine 7-jährige Hündin, bei der labordiagnostisch Anämie und Thrombozytopenie festgestellt worden waren.

#### 4.4.3 Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte durch die Firma MWG Biotech bestätigte die Identität der PCR-Produkte. Für *E. canis* wurden die 149 bp großen PCR-Produkte von den Hunden EC9, EC111 und EC235 sowie von der Positivkontrolle direkt sequenziert und ergaben eindeutig lesbare Nukleotidsequenzen von 31 bp, 64 bp, 40 bp bzw. 24 bp, die jeweils zu 100 % mit der Sequenz des p30-10-Genes von *E. canis* (NCBI-Genbank-Zugangs-Nummer AF528515) und damit mit dem PCR-Zielgen übereinstimmten.

Für das PCR-Produkt von *A. phagocytophilum* war eine Klonierung und anschließende Sequenzierung nötig, da eine direkte Sequenzierung des PCR-Produktes aufgrund der geringen Länge von 77 bp nicht erfolgreich war. Dabei wurde eine vollständige Übereinstimmung der Sequenz des PCR-Produktes aus dem Hund OF64 mit der PCR-Zielsequenz, dem msp2-Gen von *A. phagocytophilum*, bestätigt.

### 4.5 Ergebnisse der serologischen Untersuchung

#### 4.5.1 IFAT zum Nachweis von *Ehrlichia canis*

Die Untersuchung der 244 Serumproben (EC1 bis EC244) auf spezifische Antikörper für *E. canis* mittels IFAT ergab bei 102 Proben (41,8 %) ein positives Ergebnis. Bei 20 (8,2 %) der untersuchten 244 Hundeseren lag das Ergebnis des IFAT in einem grenzwertigen Bereich, hier erfolgte daher keine Zuordnung zu einem positiven oder negativen Ergebnis, während 122 Proben (50,0 %) negativ reagierten.

Bei den im IFAT positiv reagierenden Tieren handelte es sich um 46 männliche und 56 weibliche Hunde. Damit wiesen 49,5 % aller untersuchten männlichen und 37,1 % aller untersuchten weiblichen Tiere spezifische Antikörper gegen *E. canis* auf. Das Alter der positiv getesteten Tiere variierte von 0,5 bis 12 Jahre und betrug durchschnittlich 3,5 Jahre. Von den 102 positiv getesteten Hunden waren sechs Tiere von ihren Besitzern in der Tierklinik vorgestellt worden, 21 waren unmittelbar von der Strasse aufgelesen worden und 75 waren zu einem früheren Zeitpunkt eingefangen worden und hielten sich zum Zeitpunkt

der Blutentnahme schon länger im Tierheim auf. Somit wiesen 31,6 % der Tiere in privatem Besitz, 40,4 % der direkt von der Strasse aufgelesenen Hunde und 43,4 % der Hunde, die sich schon länger im Tierheim aufhielten, spezifische Antikörper gegen *E. canis* auf. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

Bei 12 (11,8 %) der 102 Tiere mit spezifischen Antikörpern gegen *E. canis* traten Symptome oder Befunde auf, die auf eine monozytäre Ehrlichiose hinweisen können. Vier Tiere (3,9 % der im IFAT positiven Hunde) waren abgemagert, zwei (2,0 %) zeigten Hämorrhagien, weitere zwei Tiere (2,0 %) fielen durch Abmagerung und Hämorrhagien auf, ein Hund (1,0 %) wies eine Anämie mit einer gleichzeitigen Thrombozytopenie auf, ein Hund (1,0 %) zeigte eine Thrombozytopenie und zwei Tiere (je 1,0 %) zeigten eine Kombination mehrerer typischer Symptome (ein Hund Fieber, Abmagerung und Thrombozytopenie; ein weiterer Abmagerung, Hämorrhagien, Anämie und Thrombozytopenie). Bei 88,2 % der Tiere mit spezifischen Antikörpern gegen *E. canis* konnten keine klinischen Symptome festgestellt werden. Sechs der 142 Tiere ohne Antikörper gegen *E. canis* waren klinisch auffällig. Vier dieser Tiere waren abgemagert, ein Hund zeigte Hämorrhagien und ein Hund fiel durch Abmagerung und gleichzeitiges Auftreten von Hämorrhagien auf.

#### 4.5.2 IFAT zum Nachweis von *Anaplasma phagocytophilum*

Bei den Proben F1 bis F72, die eigens von Tierärzten für diese Studie eingesandt wurden, wurden in 12 (16,7 %) Seren spezifische Antikörper gegen *A. phagocytophilum* nachgewiesen. Insgesamt 13 Proben (18,1 %) lieferten ein grenzwertiges Ergebnis, während 47 Seren (65,3 %) eindeutig negativ beurteilt wurden. Die antikörperpositiven Seren stammten von je 6 männlichen und weiblichen Tieren. Somit reagierten 14,0 % der Seren aller untersuchten männlichen Tiere und 20,7 % der Seren aller untersuchten weiblichen Tiere positiv. Das Alter der seropositiven Tiere variierte von 3 bis 13 Jahren und betrug durchschnittlich 8,0 Jahre.

In 46 (34,6 %) der 133 aus der Routinediagnostik des Instituts entnommenen Proben (Seren OF1 bis OF133) wurde der Nachweis spezifischer Antikörper gegen *A. phagocytophilum* erbracht. Ein grenzwertiges Ergebnis lieferten 18 (13,5 %) der Proben, während 69 (51,9 %) als negativ beurteilt werden konnten. Das Alter der im IFAT positiven Tiere lag zwischen 1

und 14 Jahren und bei durchschnittlich 5,2 Jahren. Bei 5 (10,9 %) dieser Hunde war jedoch das Alter unbekannt. Bei den positiven Hunden handelte es sich um 21 männliche und 24 weibliche Tiere. Bei einem Hund lagen keine Angaben über das Geschlecht vor. Somit waren 31,8 % aller untersuchten männlichen und 36,9 % aller untersuchten weiblichen Tiere seropositiv. Die Unterschiede in den Ergebnissen des IFAT bei Einbeziehung der grenzwertigen Resultate der beiden Patientengruppen waren signifikant ( $p < 0,05$ ).

### 5. Vergleich der Untersuchungsmethoden

Für *E. canis* ergab sich, dass der Anteil der im IFAT positiv getesteten Hunde mit 41,8 % (102/244) wesentlich höher war als der Anteil der in der PCR positiven Tiere mit 13,9 % (34/244). Im IFAT als grenzwertig beurteilt wurden Seren von 20 Hunden. Von diesen reagierten 19 in der PCR negativ und nur bei einem dieser Hunde wurde mittels PCR der Nachweis von *E. canis* erbracht. Bei lediglich 31 der 102 Hunde mit positivem Antikörpernachweis im IFAT wurde *E. canis*-DNA in der PCR nachgewiesen, während bei 31 der 34 in der PCR positiven Tiere auch Antikörper im IFAT diagnostiziert wurden. Eine Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse von IFAT und PCR lag insgesamt bei 61,9% der Proben (151 von 244) vor (Tab. 20). Es muss jedoch angemerkt werden, dass die im IFAT grenzwertigen Ergebnisse als nicht übereinstimmend bewertet wurden, da keine eindeutige Zuordnung zu den positiven oder negativen PCR-Ergebnissen erfolgen konnte.

Tab. 20: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von PCR und IFAT für *E. canis*

		PCR		
		positiv	negativ	
IFAT	positiv	31	71	102
	grenzwertig	1	19	20
	negativ	2	120	122
		34	210	244

Bei *A. phagocytophilum* wurden für die Proben F1 bis F72 drei verschiedene Testverfahren in den Vergleich einbezogen (Tab. 21). Dabei war der Anteil der positiven Tiere bei der Untersuchung der Buffy-coat-Ausstriche mit 0 % am niedrigsten, betrug bei der Untersuchung mittels PCR 1,4 % (1/72) und erreichte beim IFAT 16,7 % (12/72). Die Ergebnisse der Buffy-coat-Ausstriche stimmten zu 98,6 % (71/72) mit den Ergebnissen der PCR überein, während beim Vergleich der Ergebnisse der Buffy-coat-Ausstriche mit den Ergebnissen des IFAT eine prozentuale Übereinstimmung von 65,3 % (47/72) errechnet werden konnte. Die im IFAT grenzwertigen Ergebnisse (13/72) wurden dabei als nicht übereinstimmend bewertet, da keine Zuordnung zu den positiven bzw. negativen Ergebnissen der Ausstriche erfolgen konnte. Identische Ergebnisse bei PCR und IFAT wurden bei 66,7 % (48/72) der untersuchten Hunde erzielt. Auch hier wurden die grenzwertigen Ergebnisse des IFAT als nicht übereinstimmend gewertet, die entsprechenden Proben ergaben aber alle ein negatives PCR-Resultat (Tab.21). Bei dem Hund (F65), der in der PCR positiv auf *A. phagocytophilum* getestet worden war, konnten im Buffy-coat Ausstrich keine für eine Infektion mit *A. phagocytophilum* typischen Einschlusskörperchen nachgewiesen werden, während im Serum des Tieres spezifische Antikörper mit einem Titer von 1:64, dies entspricht der ersten positiven Verdünnungsstufe, nachgewiesen wurden. In einem sechs Monate nach der ersten Untersuchung durchgeführten Test wurde im Serum ein Titer von 1:32, also ein grenzwertiger Befund, ermittelt.

Tab. 21: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von PCR und IFAT der Patienten F1 bis F72 für *A. phagocytophilum*

		PCR		
		positiv	negativ	
IFAT	positiv	1	11	12
	grenzwertig	0	13	13
	negativ	0	47	47
		1	71	72

Die Proben OF1 bis OF133, die aus der Routinediagnostik des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie stammten, wurden nur mittels PCR und IFAT auf *A.*

*phagocytophilum* untersucht, wobei der Anteil positiver Testergebnisse im IFAT mit 34,6 % (46/133) höher war als der Anteil der positiven Testergebnisse in der PCR, der 1,5 % (2/133) betrug. Eine Übereinstimmung der Testergebnisse konnte in 52,6 % (70/133) der untersuchten Proben ermittelt werden (Tab. 22). Grenzwertige Ergebnisse im IFAT wurden als nicht übereinstimmend gewertet. Bei einem Hund (OF14), der in der PCR positiv getestet worden war, lieferte der IFAT ein grenzwertiges Ergebnis. Bei dem anderen in der PCR positiv getesteten Hund (OF64) wurden im Serum spezifische Antikörper gegen *A. phagocytophilum* nachgewiesen.

Tab. 22: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse von PCR und IFAT der Patienten OF1 bis OF133 für *A. phagocytophilum*

		PCR		
		positiv	negativ	
IFAT	positiv	1	45	46
	grenzwertig	1	17	18
	negativ	0	69	69
		2	131	133

## C Diskussion

### 1. *Ehrlichia canis*

#### 1.1 Entwicklung und Validierung einer Real-time PCR für *Ehrlichia canis*

Bei *E. canis*, dem Erreger der kaninen monozytären Ehrlichiose handelt es sich um einen Erreger mit weltweiter Verbreitung in tropischen und subtropischen Gebieten, der durch *R. sanguineus* übertragen wird (Groves et al., 1975; Murphy et al., 1998a). Nach Ausbildung einer akuten Phase der Erkrankung kommt es bei infizierten Hunden sehr häufig zur Ausbildung einer subklinischen und eventuell zu einer anschließenden chronischen Phase, in der sowohl Diagnostik als auch Therapie sehr schwierig sind.

Bisherige diagnostische Möglichkeiten für *E. canis* bergen eine gewisse Problematik. Hämatologische Tests, die vor allem das Auszählen der Thrombozytenzahlen erfassen, sind einfach und kostengünstig durchzuführen und werden in Italien (Persönliche Mitteilung Frau Friz, Leiterin des Tierheims der Lega Pro Animale in Castel Volturno, Italien) und Brasilien (Bulla et al., 2004) häufig als „Screening“-Tests für *E. canis* angewendet. Hämatologische Werte, vor allem Thrombozytenzahlen, im Normbereich schließen aber eine Infektion mit *E. canis* nicht aus (Waner et al., 1997). Das Bestimmen der Thrombozytenzahlen wurde jedoch in endemischen Gebieten als geeigneter „Screening“-Test angesehen und eine Thrombozytopenie kann als Anlass für weiterführende Diagnostik bewertet werden (Troy und Forrester, 1990; Bulla et al., 2004). Der lichtmikroskopische Nachweis typischer Einschlusskörperchen, der Morulae, in den Monozyten ist einfach und kostengünstig, besitzt jedoch eine geringe Sensitivität (Iqbal et al., 1994). Am ehesten gelingt die Diagnose in der akuten Phase der CME, während die Parasitämie in der subklinischen Phase für einen lichtmikroskopischen Nachweis meist zu gering ist (Harrus et al., 1998a). Die Sensitivität ist jedoch stark vom Ausgangsmaterial für die Untersuchungen abhängig. So wurden die besten Ergebnisse mit Ausstrichen erzielt, die aus Buffy-coat-Material und Lymphknotenaspiraten angefertigt wurden. Hierbei wurde für Buffy-coat-Ausstriche eine Sensitivität von bis zu 66 % ermittelt, während in Blutausstrichen nur bei 8 % der infizierten Tiere Morulae nachgewiesen wurden (Mylonakis et al., 2003). Aufgrund der geringen Sensitivität ist dieser Test als alleiniges

diagnostisches Verfahren für *E. canis* nicht ausreichend. Ein verlässlicher, sensitiver Nachweis von *E. canis* ist die Isolierung des Erregers aus Zellkulturen (Cell Culture Isolation, CCI). Dieser Test ist jedoch aufgrund der hohen Kosten und der langwierigen Nachweiszeit von bis zu 34 Tagen für die Routinediagnostik nicht geeignet (Iqbal et al., 1994).

Der IFAT ist sicherlich der für die Diagnose kaniner monozytärer Ehrlichiose am häufigsten angewandte Test. Vorteilhaft ist dabei, dass der serologische Nachweis von Antikörpern gegen *E. canis* mit geeigneter Laboreinrichtung und geschultem Personal schnell und einfach durchzuführen ist und oft schon zwei bis sechs Tage nach der Exposition gelingt (Rikihisa et al., 1992; Iqbal et al., 1994). Nachteilig erwies sich eine Kreuzreaktivität mit *E. ewingii* und *E. chaffeensis* (Rikihisa et al., 1992; Perez et al., 1996). Da diese Ehrlichienpezies bisher nur in den USA nachgewiesen wurden (Neer, 1998; Buller et al., 1999), besitzt die Kreuzreaktivität bei der Diagnostik mittels IFAT in Europa damit vermutlich keine Bedeutung. Wichtiger, und vor allem in endemischen Gebieten problematisch, ist jedoch, dass mit serologischen Verfahren lediglich Antikörper nachgewiesen werden, die keinen direkten Rückschluss darauf erlauben, ob der Erreger noch vorhanden und für Krankheitssymptome verantwortlich ist, oder ob er längst eliminiert wurde und nur die Antikörper persistieren. Es ist bekannt, dass nach erfolgter Therapie und Erregerelimination Antikörper noch für bis zu 12 Monate nachweisbar sind (Bartsch und Greene, 1996; Breitschwerdt et al., 1998b). In anderen Studien wurden erhöhte Antikörpertiter noch 15 bis 31 Monate nach Therapiebeginn ermittelt (Perille und Matus, 1991). Hier ist jedoch fraglich, ob es tatsächlich zu einer Erregerelimination gekommen ist, oder ob es sich um therapieresistente Fälle mit Erregerpersistenz handelt. Infolge dieser Problematik sind der IFAT und andere serologische Testverfahren nicht dazu geeignet, einen Therapieerfolg zu überprüfen (Iqbal und Rikihisa, 1994; Neer et al., 1999).

Auf dem Nachweis der Erreger-DNA basierende PCR-Verfahren stellen daher eine vielversprechende Alternative bei der Diagnostik kaniner Ehrlichiosen dar. Diese Tests sind schnell durchführbar, haben das Potential zur hohen Sensitivität und Spezifität und sind, da sie die Erreger direkt nachweisen, besser geeignet, die Elimination der Erreger nach erfolgter Therapie zu überprüfen. In der Vergangenheit wurden zahlreiche „konventionelle“ Protokolle entwickelt, die mittels einfacher oder „geschachtelter“ („nested“) PCR-Reaktionen einen Nachweis von *E. canis*-DNA erlauben (Iqbal et al., 1994; McBride et al., 1996; Wen et al., 1997; Breitschwerdt et al., 1998a; Mathew et al., 2000; Pusterla et al., 2000a; Inokuma et al.,

2001b; Stich et al., 2002). Sowohl „nested“-PCRs als auch die Kombination von PCR-Verfahren mit Chemilumineszenz Hybridisierung (Mathew et al., 2000) sind jedoch mit einem erhöhten Zeitaufwand verbunden. Zudem sind nach der Durchführung konventioneller PCRs weitere Arbeitsschritte zum Nachweis und zur Verifizierung der PCR-Produkte nötig. Dabei ist die Beurteilung nur durch eine Agarosegelelektrophorese, bei der die Größe des PCR-Produktes abgeschätzt werden kann, zur eindeutigen Identifizierung der Spezifität des Produktes nicht ausreichend. Weitere Arbeitsschritte wie Sequenzierung oder zumindest eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus- (RFLP-) Analyse sind erforderlich. Da für diese Arbeitsschritte ein Öffnen der PCR-Gefäße und Umgang mit den PCR-Produkten unumgänglich ist, ist das Risiko der Kontamination der Umgebung mit der amplifizierten DNA beträchtlich. Kontaminationen stellen sicherlich einen wichtigen Nachteil für die Anwendung konventioneller PCRs in der Routinediagnostik dar und können unter Umständen so weit gehen, dass ein Einsatz bestimmter PCR-Protokolle über Jahre nicht mehr möglich ist.

Die Real-time PCR bietet demgegenüber entscheidende Vorteile. So erfolgt die Durchführung von Real-time PCRs in einem geschlossenen System. Da die Identifizierung der PCR-Produkte bereits während des Reaktionsablaufes mittels generierter Fluoreszenz geschieht (Higuchi et al., 1993; Heid et al., 1996), entfallen die post-PCR-Prozesse und das Öffnen der Reaktionsgefäße. Das Kontaminationsrisiko wird dadurch deutlich reduziert. Im Gegensatz zum Agarosegel, bei dem nur die Größe des entstandenen Produktes betrachtet wird, erfolgt bei der Real-time PCR ein sequenzspezifischer Nachweis des Amplifikats. Es kommt nur bei Hybridisierung einer beispielsweise bei „Molecular Beacons“ 26 bis 30 Basen langen Region der Sonden mit einem komplementären Strang zu einem messbaren Fluoreszenzsignal. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens ist die schnelle Durchführbarkeit. Die gesamte Untersuchung inklusive DNA-Extraktion ist innerhalb von vier bis sechs Stunden abgeschlossen. Zudem ist bei entsprechendem Protokoll auch eine quantitative Bestimmung der Erreger im Probenmaterial möglich. Hohe Gehalte an Erreger-DNA im Ausgangsmaterial führen zu niedrigen Schwellenwertzyklen mit steilen Kurven, während spät ansteigende, flache Kurven auf wenig enthaltene Ziel-DNA schließen lassen. In unserer Studie wurde jedoch auf eine quantitative Erregerbestimmung verzichtet. Da bei der Real-time PCR sehr kleine PCR-Produkte erzeugt werden, die einschließlich des Bereiches der Sondenhybridisierung üblicherweise 100 bis 150 Basenpaare umfassen, wird meist eine hohe Sensitivität erreicht. Aufgrund der genannten Vorteile gegenüber traditionellen Verfahren und dem erfolgreichen Einsatz bei der Diagnostik

anderer Erreger (Würth, 2004; Zahler-Rinder et al., 2004) war die Entwicklung einer Real-time PCR für *E. canis* ein Ziel der vorliegenden Arbeit.

Ein wichtiger Aspekt bei dieser Entwicklung einer Real-time PCR für *E. canis* war die Auswahl geeigneter Zielgene. Innerhalb der Art *E. canis* sollte der zu vervielfältigende Sequenzabschnitt möglichst konserviert sein, um keine Stämme oder Varianten des Erregers bei der PCR auszuschließen. Diese Voraussetzung wurde von den ausgewählten Fragmenten der 16S rDNA und des p30-10-Genes erfüllt, was durch die erstellten „Multiple Sequence Alignments“ bestätigt wurde. Die Sequenz des Zielgenes sollte jedoch speziesspezifische Unterschiede aufweisen, um die Konstruktion ausreichend spezifischer Primer und Sonden für *E. canis* zu ermöglichen. Eine Amplifikation nahe verwandter Ehrlichienpezies wie *E. chaffeensis*, *N. sennetsu* oder *E. ewingii* sollte nicht erfolgen. Da die Konstruktion von Primern und Sonden anhand von „Multiple Sequence Alignments“ erfolgte, war es nötig, dass in der NCBI-Genbank Sequenzen der nahe verwandten Spezies verfügbar waren, die mit der Sequenz von *E. canis* verglichen werden konnten. Diese Voraussetzung war zum Zeitpunkt der Untersuchung für die 16S rDNA und für das Gen p30-10 erfüllt. Hierbei wurde besonders auf Sequenzunterschiede zu *E. chaffeensis* geachtet. Da es sich hierbei um die zu *E. canis* am nächsten verwandte Ehrlichienart handelt, war davon auszugehen, dass eine PCR spezifisch für *E. canis* ist, wenn keine Amplifikation von *E. chaffeensis*-DNA erfolgt (Stich et al., 2002; Persönliche Mitteilung, R.W. Stich). Hierbei zeigte sich, dass die 16S rDNA innerhalb des Genus *Ehrlichia* viele konservierte Bereiche aufwies. Bei der Konstruktion der Primer und Sonden wurde darauf geachtet, dass speziesspezifische Sequenzabschnitte miteinbezogen wurden. Aufgrund der weitreichenden Sequenzunterschiede zu *E. chaffeensis*, die bei Primern und Sonden für das Zielgen p30-10 noch ausgeprägter waren und durch die Ergebnisse des Blast-Search-Programmes der NCBI Genbank bestätigt wurden, musste nicht von einer Amplifikation von *E. chaffeensis* ausgegangen werden. Die Eignung des Gens p30 als Zielgen für eine diagnostische PCR wurde bereits nachgewiesen. So wies eine „konventionelle“ „nested“-PCR, die das p30-Gen zum Ziel hat, eine 100- bis 1000-fach höhere Sensitivität auf als eine „nested“-PCR, die ein Fragment der 16S rDNA amplifiziert (Stich et al., 2002). Nach Abschluss der hier präsentierten Untersuchungen wurde eine Real-time PCR zum Nachweis von *E. canis* publiziert (Branger et al., 2004). Diese hat als Zielgen die 16S rDNA und wurde in die vorliegende Studie aus zeitlichen Gründen nicht miteinbezogen.

Nach Entwicklung und Optimierung der beiden Real-time PCRs EC-16S und ECP-p30 für *E. canis* erfolgte ein direkter Vergleich der beiden Testverfahren. Bei der Überprüfung der analytischen Spezifität der PCRs lieferten beide Tests nur für den Ansatz, in dem *E. canis*-DNA enthalten war, ein positives Ergebnis. Eingesetzte DNA-Lösungen von *A. platys*, *N. risticii*, *A. phagocytophilum*, *Babesia canis*, *B. gibsoni* und *Hepatozoon canis* lieferten ein negatives Ergebnis, was auf eine Spezifität gegenüber den getesteten Erregern schließen lässt. Leider konnte die Spezifität gegenüber *E. chaffeensis* nicht experimentell überprüft werden, da keine DNA des Erregers zur Verfügung stand. Wie bereits erwähnt, sollte eine Amplifikation aufgrund der Sequenzunterschiede im Bereich der Primerregion jedoch nicht möglich sein. Eine Bestätigung der Spezifität der PCR einschließlich Sondenhybridisierung erfolgte durch die Sequenzierung einiger in der PCR positiv getesteter Proben. Hierbei wurde festgestellt, dass eine 100%ige Übereinstimmung der Sequenzen der PCR-Produkte mit der Sequenz des p30-Genes von *E. canis* vorliegt und somit die erwartete speziesspezifische Amplifikation auftrat. Beim Vergleich der analytischen Sensitivität lieferte die PCR ECP-p30 etwas bessere Ergebnisse. Beide PCRs ergaben ein positives Ergebnis bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-2}$ . Da es sich bei den eingesetzten Verdünnungen um *E. canis* DNA unbekannter Konzentration handelte, konnte dabei aber keine absolute Nachweisgrenze ermittelt werden und kein direkter Vergleich mit der Sensitivität publizierter PCRs erfolgen. Die Schwellenwerte der PCRs EC-16S und ECP-p30 lagen bei den drei positiv getesteten Verdünnungsstufen  $10^0$ ,  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  bei 36,2, 38,0, und 39,2 bzw. 32,2, 36,1 und 39,7 und somit bei der PCR ECP-p30 insgesamt etwas niedriger als bei der PCR EC-16S. Außerdem war der Kurvenverlauf bei der PCR ECP-p30 steiler und sigmoider und es zeigte sich eine höhere absolute Fluoreszenz als bei der PCR EC-16S. Anhand dieser Ergebnisse und der weitreichenderen Sequenzunterschiede zu *E. chaffeensis*, wurde entschieden, die weiteren Untersuchungen mit der PCR ECP-p30 durchzuführen.

Bei der Durchführung der Validierung der PCR ECP-p30 wurden 22 positive und 28 negative geblindete Proben eingesetzt. Hierbei wies der Test eine hohe diagnostische Spezifität (100 %) auf. Es kam zu keinen falsch-positiven Ergebnissen, was für den erfolgreichen Einsatz der PCR in der Routinediagnostik sehr wichtig ist. Die diagnostische Sensitivität des Testes lag bei 82 %. Die prädiktiven Werte der positiven und negativen Testergebnisse lagen bei 100 % bzw. 87,5 %. Somit kann bei Vorliegen eines positiven Testergebnisses mit hoher Sicherheit von einer Infektion mit *E. canis* ausgegangen werden und ein Behandlungsversuch eingeleitet werden. Vier der 22 positiven Proben wurden nicht richtig zugeordnet. Da die

Konzentration des Erregers in den Proben unbekannt war, konnte nicht festgestellt werden, ob es sich vielleicht um Material handelte, in denen wenige Erreger enthalten waren. Zudem handelte es sich bei den falsch-negativen Ergebnissen um Proben, von denen nicht genügend Material für die Erstellung von Duplikaten vorhanden war, so dass kein direkter Vergleich von zwei Untersuchungsergebnissen erfolgen konnte. Bei der Beurteilung der Ergebnisse der Validierung müssen zusätzlich die Schwierigkeiten bei der DNA-Extraktion berücksichtigt werden. Bei dem Untersuchungsmaterial handelte es sich um tiefgefrorene Knochenmarksaspirate, die teilweise aufgrund von Klümpchenbildung nicht gut zu verarbeiten waren. Einige dieser Klümpchen mussten von den „QIAamp spin“-Säulchen entfernt werden, da sie entweder die Pipettenspitze verstopften oder nicht durch die Membran der Säulchen diffundierten und einfach auf deren Oberfläche liegen blieben. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass in den Klümpchen Erreger enthalten waren, deren DNA somit für eine weitere Untersuchung nicht zur Verfügung stand und es so zu falsch negativen PCR-Ergebnissen kam. Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze mittels in Plasmide einligierter PCR-Produkte wurde für die PCR ECP-p30 eine Nachweisgrenze von 14,5 Molekülen pro 50 µl Ansatz errechnet. Hierbei entspricht die Anzahl nachweisbarer Moleküle der Anzahl nachweisbarer Genkopien.

## **1.2 Untersuchung von Patienten**

Die Anwendung der entwickelten Real-time PCR für *E. canis* sollte sogleich in der Untersuchung von Patientenproben aus einem bekannten endemischen Gebiet, Castel Volturno in Kampanien, Italien, getestet werden. Die Auswahl der Patienten erfolgte durch dort tätige Tierärzte nach von uns festgelegten Kriterien. Alter und Rasse sollten keinen Einfluss auf die Teilnahme haben, vielmehr sollte eine breit gefächerte, für die Hundepopulation in Italien repräsentative Gruppe untersucht werden. Deshalb wurden Hunde jeden Alters einbezogen. Einziges Ausschlusskriterium war eine Behandlung mit gegen Ehrlichien wirksamen Medikamenten in den letzten drei Monaten. Dieser Spielraum sollte eine Reinfektion ermöglichen, wenn die Tiere zu einem früheren Zeitpunkt behandelt worden waren. Der tatsächliche Infektionsstatus der Tiere konnte anhand der Fragebögen und der Anamnese nicht erhoben werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse von PCR und IFAT ergab sich wie erwartet, dass die Zahl der seropositiven Tiere (102) weit größer war als die Zahl der Hunde, bei denen der direkte Erregernachweis gelang (34). Ein Grund für ein negatives PCR-Ergebnis bei seropositiven Tieren könnte sein, dass mittels IFAT lediglich Antikörper nachgewiesen wurden, während der Erreger schon längst eliminiert worden war. So reagieren Tiere, denen nach einer Infektion eine erfolgreiche Elimination der Erreger gelang, unter Umständen noch längere Zeit seropositiv (Iqbal und Rikihisa, 1994; Breitschwerdt et al., 1998b; Neer et al., 1999). Dies ist besonders in der vorliegenden Studie zu beachten, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die einbezogenen Tiere zu einem früheren Zeitpunkt eine Infektion durchgemacht haben, dann aber behandelt wurden und den Erreger eliminiert haben. Ein weiterer Grund für negative PCR-Ergebnisse bei seropositiven Tieren wäre theoretisch eine Infektion mit nahe verwandten Ehrlichienpezies wie *E. chaffeensis* oder *E. ewingii* (Rikihisa et al., 1992; Perez et al., 1996) die im *E. canis*-IFAT kreuzreagieren, in der PCR aber nicht nachgewiesen werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Verbreitung dieser beiden Erreger auf die USA beschränkt ist (Neer, 1998; Buller et al., 1999). Als Ursache negativer Ergebnisse in der PCR bei seropositiven Tieren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die PCR ECP-p30 für den Nachweis sehr geringer Erregerzahlen nicht sensitiv genug ist. Das Problem sehr niedriger Parasitämie tritt besonders während der chronischen Phase der CME auf und ist in der akuten Phase eher nicht zu erwarten.

Bei zwei der Hunde, die in der PCR ein positives Ergebnis lieferten, konnten im Serum mittels IFAT keine Antikörper nachgewiesen werden. Hierbei könnte es sich um Hunde in einer frühen Phase der Infektionen handeln, bei denen zwar der Nachweis der Erreger mittels PCR bereits gelang, jedoch noch keine für den Nachweis ausreichende IgG-Antikörperproduktion erfolgt ist. Denkbar wäre auch, dass die Immunantwort durch antibiotische Behandlung gehemmt wurde (Dawson et al., 1996a) oder bei immunsupprimierten Tieren verzögert auftritt (Wen et al., 1997). Als unwahrscheinlich wird jedoch die Möglichkeit angesehen, dass eine neue, bisher unbekannte Ehrlichienpezies positive Ergebnisse in der PCR liefert, und gleichzeitig im IFAT negativ reagiert (Wen et al., 1997).

Die Übereinstimmung der PCR- und IFAT-Ergebnisse erreichte in der vorliegenden Untersuchung 61,9 % und war damit fast identisch mit dem Ergebnis einer Studie von Wen und Mitarbeitern (1997), bei der 62 % Übereinstimmung ermittelt worden waren, aber etwas niedriger als bei einer Studie von Kordick et al. (1999), wo bei Einbeziehung aller

untersuchten Ehrlichienarten 73,1 % der Ergebnisse übereinstimmten. In beiden Studien wurden ebenfalls mehr seropositive Tiere ermittelt als PCR-positiv. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass in der vorliegenden Studie die 20 im IFAT grenzwertigen Ergebnisse als nicht übereinstimmend bewertet wurden. Nur eine der im IFAT grenzwertigen Proben reagierte in der PCR positiv. Wären die Tiere für weitere serologische Nachuntersuchungen zur Verfügung gestanden, so dass eine eindeutige Gruppierung in seropositive und –negative Tiere erfolgen hätte können, hätte sich der Anteil der übereinstimmenden Ergebnisse unter Umständen deutlich erhöht.

Wenn die Testergebnisse sowohl von IFAT als auch von PCR positiv sind, kann davon ausgegangen werden, dass das Tier tatsächlich mit *E. canis* infiziert ist. Im Gegenzug ist bei zwei negativen Ergebnissen ein sicherer Ausschluss einer Infektion möglich (Wen et al., 1997). In der vorliegenden Studie konnte nach diesen Kriterien bei 49,2 % (120/244) Tieren eine Infektion mit *E. canis* ausgeschlossen werden, während 12,7 % der Hunde demnach eindeutig eine Infektion (31/244) aufwiesen und als behandlungsbedürftig angesehen werden. Bei einem vorliegenden positiven Ergebnis in der PCR sollte angesichts des ermittelten prädiktiven Wertes des positiven Testergebnisses von 100 % ein Behandlungsversuch in jedem Fall eingeleitet werden. Es wäre jedoch anzuraten, auch klinisch auffällige seropositive Tiere einer Behandlung zu unterziehen, auch wenn kein Erregernachweis mittels PCR erbracht werden konnte.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Blutproben stammten von Hunden eines Tierheims in Castel Volturno, Italien. In diesem Tierheim wird ein enormer medikamenteller und finanzieller Aufwand zur Eindämmung kaniner monozytärer Ehrlichiose betrieben. Es wird sowohl versucht, infizierte Tiere durch den Einsatz von Tetrazyklin oder Doxyzyklin, teilweise in Kombination mit Imidocarbdiopropionat, zu therapieren, als auch Neu- bzw. Reinfektionen durch Zeckenprophylaxe zu verhindern (Persönliche Mitteilung Frau Friz, Tierheimleiterin). Anhand der Untersuchung der Patienten sollten in der vorliegenden Studie keine epidemiologischen Daten erhoben werden. Vielmehr sollte das neu entwickelte Testverfahren an einer größeren Anzahl von Patienten getestet werden um die Ergebnisse mit etablierten diagnostischen Methoden und wie oben beschrieben mit anderen Studien zu vergleichen. Dennoch ist durch die Einteilung der Patienten in drei Gruppen eine Spekulation über den Infektionsstatus und den Erfolg durchgeführter Behandlungen möglich: Der Nachweis von *E. canis* mittels IFAT gelang bei 31,6 % der Tiere aus privatem Besitz, bei

40,4 % der Straßenhunde und bei 43,4 % der untersuchten Tierheimhunde. Der Anteil der Tiere, die mit dem Erreger irgendwann Kontakt hatten, unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Die in der PCR ermittelte Infektionsrate lag bei den unbehandelten Straßenhunden ohne Zeckenprophylaxe mit 23,1 % ungefähr doppelt so hoch wie bei den Privathunden mit 10,5 % oder den Hunden im Tierheim mit 11,6 %. Die Unterschiede zwischen den Straßenhunden und den Hunden aus dem Tierheim waren dabei signifikant. Die Tierheimhunde wurden prophylaktisch gegen Zecken behandelt und die meisten erhielten, wenn auch vor mindestens drei Monaten, Antibiotika. Die PCR-Positivität bei diesen Tieren war zwar niedriger als bei den unbehandelten Hunden, eine Behandlung reduziert diese Rate aber nur um die Hälfte, hatte also anscheinend nur in ca. 50 % der Fälle Erfolg. Dies ist für den betriebenen Aufwand, der zumindest im Tierheim erheblich ist (Persönliche Mitteilung Frau Friz, Tierheimleiterin), sehr wenig. Diese geringe Erfolgsquote bestätigt jedoch Ergebnisse anderer Studien, in denen die Einschätzung vorherrscht, dass eine erfolgreiche Therapie der CME sehr schwierig ist, vor allem wenn die Tiere nicht in der akuten, sondern erst in der subklinischen oder chronischen Phase der Erkrankung behandelt werden. Die Erfolgsrate lag in einer Studie von Harrus et al. (1998b) bei 75 %. Auch mit Doxyzyklin, das, eventuell in Kombination mit Imidocarbdiopropionat, das Mittel der Wahl darstellt (Harrus et al., 1997; Neer et al., 2002), konnte in zwei weiteren Studien nicht in allen Fällen eine Elimination der Erreger erreicht werden (Iqbal und Rikihisa, 1994; Wen et al., 1997). Für die positiven PCR-Befunde der Tiere in der vorliegenden Studie könnte die nicht vollständige Elimination der Erreger nach erfolgter Therapie verantwortlich sein, auch wenn eine zwischenzeitliche Reinfektion nicht auszuschließen ist.

Der Hauptvektor *R. sanguineus* ist in subtropischen und tropischen Regionen weit verbreitet, so dass in diesen Gebieten auch von einer Verbreitung von *E. canis* ausgegangen werden muss, was durch serologische und molekularbiologische Studien in vermutlichen Endemiegebieten, in die Zecken und Hunde einbezogen wurden, bestätigt wurde (Voigt et al., 1993; Baldelli et al., 1996; Murphy et al., 1998a; Breitschwerdt et al., 1998b; Suksawat et al., 2000; Wen et al., 2003). Die Infektion von Hunden in endemischen Gebieten kann bereits im Frühjahr erfolgen, da die Überwinterung von *E. canis* in Zecken gewährleistet ist, weil infizierte Zecken den Erreger bis zu 155 Tage übertragen (Lewis et al., 1977). Die Einschleppung von *E. canis* nach Deutschland ist vor allem durch den Import von Hunden aus Endemiegebieten und durch Hunde, die beispielsweise im Urlaub in solche Gebiete reisen, möglich. Aufgrund der eingeschränkten Überlebensfähigkeit von *R. sanguineus* in

gemäßigten Breiten, die sich auf Gebäude und beispielsweise Hundezuchten beschränkt (Winkler et al., 1988), ist eine endemische Etablierung von *E. canis* in Deutschland zurzeit jedoch nicht zu erwarten. Die braune Hundezecke fungiert außerdem als Vektor für *H. canis* (Baneth et al., 2001) und *B. canis* (Kordick et al., 1999), so dass neben der Ehrlichiose auch die Hepatozoonose und die Babesiose als Reisekrankheiten, die in südeuropäischen und anderen tropischen und subtropischen Ländern durch Zecken auf Hunde übertragen werden, berücksichtigt werden sollten. Da für diese Erkrankungen keine Impfungen in Deutschland verfügbar sind, sollten Tiere, die in warme Klimazonen reisen, in jedem Fall prophylaktisch gegen Zecken behandelt werden. Eine sehr gute Wirkung scheint, nach Erfahrungen von Tierärzten des Tierheims in Castel Volturno, hierbei Permethrin zu haben (Persönliche Mitteilung Frau Friz, Tierheimleiterin).

## 2. *Anaplasma phagocytophilum*

### 2.1 Entwicklung und Validierung einer Real-time PCR für *Anaplasma phagocytophilum*

*A. phagocytophilum*, der Erreger der granulozytären Ehrlichiose bei Hund, Pferd, Rind und beim Menschen, ist in den USA und Europa verbreitet. Aufgrund der zunehmenden Zahl an nachgewiesenen Fällen insbesondere beim Menschen und des zoonotischen Potentials wurde die Erkrankung als sogenannte „Emerging tick-borne infection“ eingestuft (Christova et al., 2003) und ist in den letzten Jahren auch in der Tiermedizin auf zunehmendes Interesse gestoßen. Daher wurden zuverlässige diagnostische Tests zum Nachweis von *A. phagocytophilum* zunehmend nachgefragt.

Die Diagnose einer Infektion mit *A. phagocytophilum* erfolgte bisher meist durch den Nachweis von Antikörpern mittels Immunfluoreszenz. Der IFAT kann bereits sechs bis elf Tage nach der Infektion positiv reagieren (Pusterla et al., 1997a). Dennoch sind insbesondere in der initialen akuten Phase der Infektion falsch negative Ergebnisse nicht selten (Bakken et al., 1996; Zhi et al., 1997; Massung et al., 1998). Eine aktuelle Infektionskrankheit kann

zudem von früheren eventuell klinisch inapparenten Infektionen nur durch die Auswertung von Serumpaaren und dem Nachweis eines Titeranstieges unterschieden werden (Madigan et al., 1990). Die für den *E. canis*- IFAT erwähnten Probleme bei der Spezifität existieren für *A. phagocytophilum* allerdings nicht. So wurden für den Erreger der granulozytären Ehrlichiose bisher keine Kreuzreaktionen mit anderen nahe verwandten Ehrlichienarten nachgewiesen (Dumler et al., 1995).

Insbesondere zur Erkennung akuter Infektionskrankheiten bietet sich daher der direkte Erregernachweis an. Dies kann durch den lichtmikroskopischen Nachweis zytoplasmatischer Einschlusskörperchen in den Granulozyten erfolgen (Madigan und Gribble, 1987). Bei experimentell infizierten Rindern gelang der Nachweis von Morulae bereits fünf bis acht Tage nach der Infektion für sechs bis 14 Tage (Pusterla et al., 1997a). Die Sensitivität der Lichtmikroskopie ist offenbar etwas höher als bei *E. canis* (Leutenegger et al., 2002), gute Erfolgsaussichten sind jedoch auf einen sehr kurzen Zeitraum beschränkt, so dass vor allem bei einem negativen Ergebnis kein zuverlässiger Ausschluss einer Infektion erfolgen kann. Eine Anreicherung der Erreger aus klinischem Material in Zellkulturen und anschließende Detektion ist zwar möglich, aufgrund der hohen Kosten und der langen Dauer aber nicht für die Routinediagnostik geeignet (Massung et al., 1998).

Die PCR als modernes molekularbiologisches Verfahren zur Detektion von *A. phagocytophilum*-DNA bietet sich daher an, und in der Vergangenheit wurden zahlreiche konventionelle einfache und geschachtelte PCR-Protokolle entwickelt. Wie Massung und Slater (2003) jedoch zeigten, ergaben sich bei vielen Tests Probleme in der Sensitivität und Spezifität. So wurden nur zwei von 13 einbezogenen PCRs als ausreichend sensitiv und spezifisch für *A. phagocytophilum* beurteilt (Massung et al., 1998; McQuiston et al., 1999; Massung und Slater, 2003). Real-time PCRs können, wie bereits in Abschnitt 1.1 dargestellt, aufgrund ihrer raschen Durchführbarkeit und der besseren Möglichkeit der Kontaminationsvermeidung gegenüber traditionellen PCRs und „nested“-PCRs einen Fortschritt in der molekularbiologischen Diagnostik mit sich bringen. Zudem ist durch den Einsatz sequenzspezifischer Sonden eine direkte Verifizierung der Spezifität des Produktes möglich, da diese nur bei Vorliegen eines komplementären Sequenzabschnittes binden und es nur dann zur Generierung von Fluoreszenz kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Real-time PCR zum Nachweis von *A. phagocytophilum* entwickelt und in ihrer Leistungsfähigkeit mit der zunächst einzigen von Pusterla und Mitarbeitern (1999a) publizierten und dann auch mit der im weiteren Verlauf der Untersuchungen veröffentlichten Real-time PCR von Courtney et al. (2004) verglichen. Die Auswahl des Zielgenes erfolgte nach ähnlichen Kriterien wie bei *E. canis*. So sollten in der NCBI-Genbank vergleichbare Sequenzen nahe verwandter Bakterienspezies für das Zielgen verfügbar sein, um die Identifizierung speziesspezifischer Sequenzabschnitte zu ermöglichen. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen lagen für *A. platys*, *N. risticii* und *Wolbachia* spp. nur 16S rDNA-Sequenzen vor. *A. platys*, der Erreger der infektiösen kaninen zyklischen Thrombozytopenie, wird vermutlich durch die braune Hundezecke, *R. sanguineus*, auf Hunde übertragen und wurde auch in Südeuropa (Kontos und Papadopoulos, 1987; Pennisi et al., 1989; Sainz et al., 1999) in Hunden nachgewiesen. *N. risticii* besitzt besonders bei Pferden als Erreger des „Potomac Horse Fever“ Bedeutung. In seroepidemiologischen Studien in den USA wurden jedoch auch bei Hunden, Katzen, Coyoten, Schweinen und Ziegen Antikörper gegen *N. risticii* detektiert (Perry et al., 1989; Magnarelli und Anderson, 1993; Pusterla 2000a). Wolbachien werden häufig als Symbionten in Zecken nachgewiesen (Hartelt et al., 2004), kommen aber üblicherweise nicht in Hundeblood vor. Eine Ausnahme stellte ein Hund dar, bei dem im Blut, wahrscheinlich aufgrund einer Infektion mit *Dirofilaria immitis*, eine *Wolbachia* sp. nachgewiesen wurde (Unver et al., 2003). Das Auftreten von Wolbachien in kaninem Blut ist somit eher unwahrscheinlich und die Behandlung aller Ehrlichien erfolgt auf die gleiche Weise (Ohashi et al., 1998a). Basierend auf dem Sequenzalignment wurden für die PCR-Primer Sequenzabschnitte identifiziert, die als spezifisch für *A. phagocytophilum* angesehen wurden, da besonders am 3'-Ende der Primerregionen Unterschiede zu den einbezogenen nahe verwandten Ehrlichienarten *A. platys* und *N. risticii* bestanden. Üblicherweise kann besonders durch die Auswahl spezifischer Regionen am 3'-Ende der Primer eine hohe Spezifität erreicht werden (Sommer und Tautz, 1989). Das entwickelte Testverfahren wurde nun mit zwei bereits publizierten Real-time PCRs verglichen. Bei der Überprüfung der analytischen Spezifität mittels verschiedener Erreger wurde festgestellt, dass nur die PCR AP-MSP2 (Courtney et al., 2004) spezifisch für *A. phagocytophilum* war. Die PCR AP-16S und die PCR nach Pusterla et al. (1999a) lieferten zwar für *E. canis*, *B. canis*, *B. gibsoni* und *H. canis* ein negatives Ergebnis, ergaben aber außer für *A. phagocytophilum* auch für *A. platys* und *N. risticii* ein Produkt. Dies war aufgrund der oben beschriebenen Auswahl der Primer eigentlich nicht zu erwarten, über die Gründe der Unspezifität der PCR kann aber nur spekuliert werden. So wäre es möglich, dass bei den für die Primer ausgewählten

Sequenzabschnitten innerhalb der Arten *A. platys* und *N. risticii* Polymorphismen auftreten, so dass es aufgrund von speziesspezifischen Variationen zu einer Amplifikation der Erreger kam. Zudem ergab sich in der Untersuchung der analytischen Sensitivität der drei Tests mittels eingesetzter DNA- und Blutverdünnungsreihen bei der PCR AP-MSP2 die höchste Sensitivität. Sie war um eine Verdünnungsstufe höher als bei der PCR AP-16S und um zwei Verdünnungsstufen höher als bei der PCR nach Pusterla et al. (1999a). Auch bei der Validierung anhand geblindeter Proben lieferte die PCR AP-MSP2 die besten Ergebnisse. Kein Test lieferte falsch positive Ergebnisse, so dass die diagnostische Spezifität jeweils 100 % betrug. Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass keine Proben mit nahe verwandten Erregern geblindet eingesetzt wurden, da solche Proben mit gesicherter Freiheit von *A. phagocytophilum* nicht verfügbar waren. Bei der Auswertung der diagnostischen Sensitivität hingegen ergaben sich gravierende Unterschiede: Sie betrug für die PCR nach Pusterla et al. (1999a) 36 %, für die PCR AP-16S 64 % und für die PCR AP-MSP2 96 %. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass für die Herstellung der geblindeten Proben nur positives Blut eines einzigen Patienten zur Verfügung stand, das mit erregerfreiem Blut verdünnt wurde. Aufgrund der unbekanntenen Erregerkonzentration des Blutes wäre es möglich, dass viele der geblindeten Proben im Bereich der Nachweisgrenze der PCR AP-16S und der PCR nach Pusterla et al. (1999a) lagen und somit nur mit der PCR AP-MSP2 positiv getestet werden konnten. Es ist fraglich, inwieweit dieses Vorgehen die realen Verhältnisse bei der Untersuchung von Patientenproben widerspiegelt, so dass beide Tests eventuell bessere Ergebnisse erzielt hätten, wenn Blutproben verschiedener positiver Tiere unverdünnt eingesetzt worden wären. Insgesamt ergab sich ohne Zweifel, dass die PCR AP-MSP2 (Courtney et al., 2004) sensitiver und spezifischer ist als die beiden anderen Real-time PCRs, so dass die Untersuchung der Patientenproben mittels dieses Verfahrens erfolgte.

## **2.2 Untersuchung von Patienten**

Für die Untersuchung von Patienten auf *A. phagocytophilum* wurden insgesamt 75 Tierärzte angeschrieben und um die Einsendung von Hundeblood gebeten. Aufgrund der geringen Resonanz, es wurden nur 72 Blutproben auf diese Weise erhalten, war es nötig, zusätzlich Proben aus dem Routinelabor des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie in die Untersuchung mit einzubeziehen. Alle Tiere, von denen Blut eigens für

die Studie eingesandt worden waren, wiesen vorberichtlich Zeckenbefall auf. Von den Proben F1 bis F 72 wurde nur bei einem Hund (1,4 %) der Nachweis von *A. phagocytophilum* mittels PCR erbracht. Es handelte sich hierbei um eine dreijährige Golden Retrieverhündin, die durch Abgeschlagenheit und Lahmheiten auffiel. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass für diese Symptomatik nicht die Infektion mit *A. phagocytophilum*, sondern vielmehr eine ebenfalls diagnostizierte Herzerkrankung und Arthrosen des Tieres verantwortlich waren. Mittels IFAT wurden gleichzeitig im Serum des Tieres Antikörper gegen *A. phagocytophilum* bis zu einer Verdünnung von 1:64, was der ersten positiven Verdünnungsstufe entspricht, nachgewiesen. Im Lichtmikroskop waren allerdings keine Einschlusskörperchen im Buffy-coat-Ausstrich der Hündin nachweisbar. Interessanterweise wurden bei einer etwa sechs Monate später durchgeführten Nachuntersuchung mittels PCR keine Erreger mehr nachgewiesen und der Titer im IFAT war auf 1:32 gesunken, obwohl der Hund laut behandelndem Tierarzt zwischenzeitlich nicht antibiotisch therapiert worden war. Dies unterstützt die Annahme, dass es sich bei *A. phagocytophilum*, im Gegensatz zu *E. canis*, um eine selbstlimitierende Infektion handelt (Hunfeld et al., 2004), obwohl auch Berichte über persistierende Infektionen bei Tieren existieren (Foggie, 1951; Stuen et al., 1998). Der Antikörpertiter der Golden Retrieverhündin war nach sechs Monaten um eine Stufe gesunken, was ebenfalls mit früheren Studien, bei denen Antikörpertiter bei unbehandelten Tieren 120 bis 180 Tage persistierten (Liz, 1994; Pusterla et al., 1997a) vereinbar scheint. Wie zu erwarten war, wurden mittels IFAT bei einem deutlich höheren Anteil, und zwar bei 16,7 % (12/72) der Tiere Antikörper nachgewiesen. 18,1 % (13/72) der Hundeseren lieferten ein grenzwertiges Ergebnis.

Bei den Proben, die aus der Routinediagnostik zufällig ausgewählt worden waren, konnte mittels PCR bei 1,5 % (2/133) der Nachweis von *A. phagocytophilum* erbracht werden. Interessanterweise war die Infektionsrate in der PCR somit bei den zufällig ausgewählten Hunden ebenso hoch wie bei den eigens dafür eingesandten Proben. Bei den PCR-positiven Hunden aus der Routinediagnostik handelte es sich um ein 4-jähriges männliches Tier, mit einem grenzwertigen Ergebnis im IFAT, ohne klinische Symptome, und eine 7-jährige seropositive Hündin, bei der labordiagnostisch Anämie und Thrombozytopenie festgestellt worden waren. Zudem wurden im Buffy-coat-Ausstrich Morulae von *A. phagocytophilum* in den Granulozyten nachgewiesen. Bei dieser Hündin wurde nach erfolgter antibiotischer Therapie eine Kontrolluntersuchung mittels PCR durchgeführt, die ein negatives Ergebnis erbrachte. Dies gibt Grund zu der Annahme, dass sich Infektionen mit *A. phagocytophilum* im Gegensatz zu *E. canis* gut therapieren lassen und es nicht zu einer Erregerpersistenz kommt.

Im IFAT konnten bei 34,6 % der Tiere aus der Routinediagnostik (46/133) Antikörper gegen *A. phagocytophilum* nachgewiesen werden, während 13,5 % (18/133) ein grenzwertiges Ergebnis lieferten. Die bei beiden Hundegruppen höhere Positivitätsrate im IFAT im Vergleich zur PCR lässt, zumal Kreuzreaktivitäten mit anderen Ehrlichienarten nicht bekannt sind (Dumler et al. 1995), sehr niedrige Erregerkonzentrationen oder eine bereits erfolgte Erregerelimination vermuten. Die Antikörpernachweise bei immerhin 16,7 % und 34,6 % der untersuchten Hunde lassen aber durchaus auf eine Bedeutung von *A. phagocytophilum* als Krankheitserreger bei Hunden in Deutschland schließen. Es handelt sich jedoch offenbar häufig um selbstlimitierende Infektionen, die zumindest teilweise klinisch inapparent verlaufen.

Als Vektor für *A. phagocytophilum* fungiert in Europa *Ixodes ricinus* („Gemeiner Holzbock“) (Daniels et al., 1997; Reubel et al., 1998b; Petrovec et al., 1999), eine in Deutschland weit verbreitete und dominierende Zeckenart. Es ist anzunehmen, dass auch *A. phagocytophilum* in *I. ricinus*-Zecken in ganz Deutschland vorkommt. So wurden mittels PCR Befallsraten von 1,0 % in Baden-Württemberg (Hartelt et al., 2004), von 2,3 % in Thüringen (Hildebrandt et al., 2003) und 1,6 % in Bayern (Fingerle et al., 1999) ermittelt. Da insbesondere Hunde, bei denen keine Zeckenprophylaxe durchgeführt wird, häufig von *I. ricinus*-Zecken befallen sind, ist ein regelmäßiger Kontakt mit *A. phagocytophilum* zu erwarten, was in der vorliegenden Studie durch die hohen Seroprävalenzen bestätigt wird. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse des IFAT bei den beiden Hundegruppen. Dies lässt eine Spekulation über ein regionales Vorkommen von *A. phagocytophilum* zu. So stammte ein Großteil der eigens für die Untersuchung eingesandten Blutproben aus dem Allgäu, während die zufällig ausgewählten Proben aus der Routinediagnostik keiner Region zugeordnet werden konnten, sondern vielmehr aus ganz Deutschland stammten. Dies lässt deutschlandweit ein häufigeres Vorkommen von *A. phagocytophilum* vermuten als in der Region, aus der die für diese Studie gezielt eingesandten Proben stammten. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals an einer größeren Zahl von Hunden in Deutschland die Befallsrate mit *A. phagocytophilum* ermittelt und hierbei sowohl der serologische als auch der molekularbiologische Nachweis des Erregers erbracht.

## IV. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Real-time PCR-basierte Nachweisverfahren für *E. canis* und *A. phagocytophilum* entwickelt, validiert und im Anschluss für die Untersuchung von Patientenproben eingesetzt. Für *E. canis* wurden für zwei Tests Primer und Sonden des Typs „Molecular Beacon“ konstruiert, die auf unterschiedliche Zielgene gerichtet waren, die Reaktionsbedingungen optimiert und die Leistungsfähigkeit beider Tests verglichen. Die PCR EC-16S hatte hierbei die 16S rDNA als Zielgen, während die PCR ECP-p30 auf das p30-10-Gen von *E. canis* gerichtet war. Bei der Ermittlung der analytischen Sensitivität und analytischen Spezifität ergab sich, dass beide Tests in ihren Leistungen sehr ähnlich waren. Beide PCRs waren spezifisch und lieferten nur für DNA von *E. canis* ein positives Ergebnis, während die übrigen getesteten Erreger *A. platys*, *N. risticii*, *A. phagocytophilum*, *Babesia canis*, *B. gibsoni* und *H. canis* in der PCR negativ reagierten. Da die PCR ECP-p30 bei der Sensitivitätsprüfung geringfügig besser beurteilt wurde, wurde entschieden, die weiteren Untersuchungen mit diesem PCR-Protokoll durchzuführen. Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität dieses Tests wurde eine extern kontrollierte Validierung mit geblindeten Proben durchgeführt. Hierbei ergab sich eine diagnostische Spezifität von 100 %. Die diagnostische Sensitivität der Real-time PCR betrug 82 %. Der prädiktive Wert des positiven Testergebnisses lag für die PCR ECP-p30 bei 100 %, während der prädiktive Wert des negativen Testergebnisses 87,5 % erreichte. Als Nachweisgrenze wurden 14,5 Moleküle des Zielgens pro 50 µl Ansatz ermittelt.

Im Anschluss wurde die Eignung des Tests an Blutproben von Hunden aus einem für *E. canis* endemischen Gebiet untersucht. Dabei wurden 244 Blutproben einbezogen und die Ergebnisse der PCR mit denen eines IFATs verglichen. Die Blutproben stammten aus Kampanien, Italien und wurden dort durch Tierärzte von Hunden gewonnen, die in einer Tierarztpraxis mit angeschlossenen Tierheim vorgestellt wurden. Die Tiere waren drei Gruppen zuzuordnen: Ein Teil der Hunde, und zwar 19 Tiere, wurde von privaten Besitzern in der Praxis vorgestellt, 52 Tiere waren unmittelbar zuvor von der Strasse aufgelesen worden und die dritte Gruppe, die 173 Hunde umfasste, hielt sich zum Zeitpunkt der Probennahme schon längere Zeit im Tierheim auf. Innerhalb des Tierheims wird ein hoher diagnostischer und medikamenteller Aufwand zur Erkennung und Bekämpfung von *E. canis* mittels

antibiotischer Therapie und Zeckenprophylaxe betrieben. In die Untersuchung einbezogen wurden jedoch nur Hunde, die mindestens drei Monate lang nicht mehr mit einem gegen *E. canis* wirksamen Medikament behandelt worden waren. Bei der serologischen Untersuchung der Hunde mittels IFAT ergab sich ein Anteil seropositiver Tiere von insgesamt 41,8 %, der auch bei Betrachtung der drei verschiedenen Gruppen nur wenig variierte. So betrug der Anteil seropositiver Tiere innerhalb der Gruppe der Hunde aus dem Tierheim 43,4 %, während 40,4 % der Straßenhunde und 31,6 % der Tiere in privatem Besitz seropositiv waren. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Ein direkter Erregernachweis mittels Real-time PCR erfolgte bei 13,9 % der untersuchten Tiere. Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse von PCR und IFAT wurde eine Übereinstimmung bei 61,9 % der untersuchten Proben ermittelt. Bei Betrachtung der einzelnen Hundegruppen lag der Anteil der in der PCR positiven Tiere bei den Straßenhunden mit 23,1 % ungefähr doppelt so hoch wie bei den Tieren in Privatbesitz (10,5 %) oder den Tierheimhunden im Tierheim (11,6 %). Der Unterschied zwischen den Straßenhunden und den Tierheimhunden war somit signifikant. Diese Ergebnisse weisen auf ein häufiges Vorkommen von *E. canis* im Untersuchungsgebiet hin und stützen die Auffassung, dass eine Erregerelimination mittels Antibiotikatherapie nur schwer zu erreichen ist.

Für *A. phagocytophilum* wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls eine Real-time PCR entwickelt und das Testverfahren unter Einbeziehung zweier bereits publizierter Real-time PCR-Protokolle und zwar von Pusterla et al. (1999a) und von Courtney et al. (2004), validiert. Bei der Entwicklung der Real-time PCR für *A. phagocytophilum* wurde als Zielgen die 16S rDNA herangezogen, da nur hierfür vergleichbare Sequenzen nahe verwandter Ehrlichien-spezies verfügbar waren. Alle drei vorliegenden Testverfahren wurden auf ihre analytische Spezifität und ihre analytische Sensitivität überprüft und zusätzlich im Rahmen einer extern kontrollierten Validierung mittels geblindeter Proben verglichen. Hierbei zeigte sich, dass nur die PCR nach Courtney et al (2004), hier als PCR AP-MSP2 bezeichnet, eine sehr gute Spezifität für *A. phagocytophilum* besaß. Die anderen Tests lieferten auch für *N. risticii* und *A. platys* positive Ergebnisse. Die analytische Sensitivität war bei diesem Test ebenfalls um mindestens eine Zehnerpotenz höher als bei den anderen beiden PCRs. Im Rahmen der Validierung wurde für die PCR AP-MSP2 eine diagnostische Spezifität von 96 % ermittelt, während die im Rahmen dieser Studie entwickelte PCR AP-16S eine Spezifität von 64 % und die PCR nach Pusterla et al. (1999a) einen Wert von 36 % erreichten. Der prädiktive Wert des positiven Testergebnisses betrug für die drei PCRs somit 96 %, 74 % bzw. 61 %. Für die

Untersuchung von Patientenproben auf Befall mit *A. phagocytophilum* wurde deshalb die PCR AP-MSP2 ausgewählt. In die Studie wurden Hunde aus Deutschland einbezogen, und zwar sowohl 72 Blutproben, die eigens für diese Studie auf Anforderung von Tierärzten eingesandt worden waren, als auch 133 Proben, die aus verschiedensten Gründen in das Routinelabor des Institutes eingesandt worden waren. Die 72 eigens für die Studie gewonnenen Proben wurden mittels Buffy-coat-Ausstrich, PCR und IFAT auf *A. phagocytophilum* untersucht. Lichtmikroskopisch konnten in keinem Fall Einschlusskörperchen des Erregers in den Granulozyten nachgewiesen werden. Mittels PCR wurde jedoch bei einem Hund (1,4 %) der Nachweis von *A. phagocytophilum* erbracht. Im IFAT konnten bei 16,7 % der 72 untersuchten Hundeseren spezifische Antikörper gegen den Erreger nachgewiesen werden. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse von PCR und Buffy-coat-Ausstrichen lag bei 98,6 % der Proben vor. Beim Vergleich der Ergebnisse der Buffy-coat-Ausstriche mit den Ergebnissen des IFAT wurde eine prozentuale Übereinstimmung von 65,3 % errechnet. Identische Ergebnisse bei PCR und IFAT wurden bei 66,7 % der untersuchten Hunde erzielt. Die 133 Proben, die zufällig aus allen Einsendungen in das Routinelabor des Instituts für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie ausgewählt worden waren, wurden mittels PCR und IFAT untersucht, wobei zwei Tiere (1,5 %) in der PCR und 34,6 % im IFAT ein positives Ergebnis lieferten. Die Identität des PCR-Produktes eines der positiven Tiere wurde durch Klonierung und anschließende Sequenzierung bestätigt. Eine Übereinstimmung der Testergebnisse von IFAT und PCR bestand bei 52,6 % der untersuchten Proben. Diese Ergebnisse stützen die Auffassung, dass Hunde in Deutschland häufig mit *A. phagocytophilum* in Kontakt kommen, dass es sich dabei aber meist um eine selbstlimitierende, klinisch inapparente Infektion handelt.

## V. Summary

### **Development and evaluation of Real-time PCR assays for the detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmataceae)**

In this study two Real-time based PCR assays for the detection of *E. canis* and *A. phagocytophilum* were developed, validated and subsequently used for the analysis of canine blood samples. For *E. canis* two sets of primers and probes of the type “Molecular Beacon” were designed, which were aimed at different genes. After optimizing the PCR assays the efficacy of the two tests was compared. While PCR EC-16S amplified a fragment of the 16S rDNA, the PCR ECP-p30 was targeted at the p30-10-gene. When the analytical sensitivity and analytical specificity were analysed, both tests were found to be very similar. Both PCR assays were very specific. Only DNA of *E. canis* produced positive PCR results, while the other tested pathogens *A. platys*, *N. risticii*, *A. phagocytophilum*, *B. canis*, *B. gibsoni* and *H. canis* tested negativ. Because PCR ECP-p30 seemed to be slightly more sensitive than PCR EC-16S further analysis was made with this protocol. An externally controlled evaluation with blinded samples was performed in order to determine the diagnostic sensitivity and specificity of the test. The diagnostic specificity of the PCR assay was 100 %, while the diagnostic sensitivity was 82 %. The predictive value of positive test results was 100 %, while the predictive value of negative test results achieved 87,5 %. The detection threshold of the PCR ECP-p30 was 14,5 molecules of the target-gene per 50 µl solution.

Subsequently the aptitude of the developed test was examined with canine blood samples. 244 blood samples from dogs were analysed and the results of PCR were compared wit IFA results. The canine blood samples originated from Campania, Italy and were taken from veterinarians working in a clinic with included animal shelter. The dogs were assigned to three different groups: 19 dogs were taken to the veterinarians by their private owners, 52 dogs were caught directly from the street and the third group, including 173 dogs, had already been in the animal shelter for a longer time when the blood samples were taken. The animal shelter spares no expenses for diagnosis and treatment of *E. canis* by antibiotics and for tick prophylaxis. In this study, only dogs were included, which had not been treated for *E. canis* for at least three months. Serologic testing of the dogs by IFA resulted in 41,8 % seropositive

dogs and showed little variance among the three different groups. In the group of the animal shelter dogs antibodies against *E. canis* were detected in 43,4 % of the analysed samples, while 40,4 % of the stray dogs and 31,6 % of the privately owned dogs showed seropositive reaction. The differences were not significant. The pathogen itself was detected by Real-time PCR in 13,9% of the dogs. When results of PCR and IFA were compared, results matched in 61,9 % of the analysed samples. Closer examination of the groups showed, that 23,1% of the stray dogs were positive in PCR which is about twice as high as the percentage of positive privately owned (10,5 %) or animal shelter dogs (11,6 %). The difference among the stray dogs and the animal shelter dogs was significant. These results show, that *E. canis* is probably widely spread in the investigation area and support the conclusion, that an elimination of the pathogen by antibiotic treatment is difficult to achieve.

Additionally a Real-time PCR was developed for *A. phagocytophilum* and validated by comparing two assays published by Pusterla et al. (1999a) and Courtney et al. (2004). When the PCR assay was developed, the 16S rDNA was used as target, because only for this gene comparable sequences of related *Ehrlichia* species were available. All three PCR protocols were tested for their analytic specificity and analytic sensitivity and additionally validated by an externally controlled blinded evaluation. Only the PCR by Courtney et al. (2004), here called PCR AP-MSP2, had a high specificity for *A. phagocytophilum*. The other tests also amplified *N. risticii* and *A. platys*. The analytical sensitivity of PCR AP-MSP2 was also one dilution step higher than of the other tests. During the blinded externally controlled evaluation the diagnostic sensitivity of PCR AP-MSP2 was determined to be 96 %, while the sensitivity of the PCR AP-16S developed in this study achieved 64 % and the sensitivity of the PCR by Pusterla et al. (1999a) was 36 %. The predictive value of the positive test result was 96 %, 74 % and 61 % respectively for the three PCRs. Because of these results, PCR AP-MSP2 was chosen for the analysis of clinical blood samples of dogs living in Germany. The study included 72 blood samples, that were sent to us by veterinarians specifically for this investigation and 133 canine blood samples, that were sent to the routine diagnostic laboratory of the institution for several purposes. The 72 samples specifically for this study were examined for *A. phagocytophilum* by buffy-coat smears, PCR and IFA. Morulae in the granulocytes could not be detected by light microscopy in any case. PCR for *A. phagocytophilum* was positive for one dog (1,4 %) and 16,7 % of the 72 samples were positive in IFA testing. A concordance of the results of PCR and buffy-coat smears was determined in 98,6 %, while buffy-coat and IFAT results showed a concordance in 65,3 % of

the samples and results of PCR and IFAT corresponded in 66,7 % of the cases. The 133 samples, that were randomly selected from all canine blood samples sent to the routine diagnostic laboratory of the institution were analysed by PCR and IFAT. Two dogs were tested PCR positive for *A. phagocytophilum* and 34,6 % had specific antibodies. The identity of the PCR-product from one of the positive dogs was confirmed by cloning and subsequent sequencing. A concordance between the results of IFAT and PCR was determined in 52,5 % of the analysed blood samples. These results support the view, that dogs in Germany are often exposed to *A. phagocytophilum*, but that canine granulocytic ehrlichiosis is often a self-limiting infection without clinical signs.

## VI. Literaturverzeichnis

Aguero-Rosenfeld, M.E., Horowitz, H.W., Wormser, G.P., McKenna, D.F., Nowakowski, J., Munoz, J., Dumler, J.S. (1996): Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State  
Ann Intern Med 125: 904-908

Alberdi, M.P., Walker, A.R., Urquhart, K.A. (2000): Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*  
Epidemiol Infect 124: 315-323

Amyx, H.L., Huxsoll, D.L. (1973): Red and gray foxes-potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis*  
J Wildl Dis 9: 47-50

Anderson, B.E., Dawson, J.E., Jones, D.C., Wilson, K.H. (1991): *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis  
J Clin Microbiol 29: 2838-2842

Anderson, B.E., Greene, C.E., Jones, D.C., Dawson, J.E. (1992): *Ehrlichia ewingii* sp. nov., the etiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis  
Int J Syst Bacteriol 42: 299-302

Anderson, B.E., Sims, K.G., Olson, J.G., Childs, J.E., Piesmann, J.E., Happ, C.M., Maupin, G.O., Johnson, B.J.B. (1993): *Amblyomma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis  
Am J Trop Med Hyg 49: 239-244

Argenté, G., Collin, E., Morvan, H. (1992): Ehrlichiose bovine (fièvre des pâtures): Une observation en France  
Point Vet 24: 89-90

Artursson, K., Malmquist, M., Olsson E., Bjoersdorff, A., Eklund, M., Gunnarson, A. (1994): Diagnostik av borrelios och granulozytär ehrlichios hos häst, hund och katt i Sverige  
Svensk Veterinärtidn 41: 331-336

Bacellar, F., Dawson, J.E., Silveira, C.A., Filipe, A.R. (1995): Antibodies against Rickettsiaceae in dogs of Setubal, Portugal  
Cent Eur J Public Health 3: 100-102

Bakken, J.S., Dumler, J.S., Chen, S.M., Eckman, M.R., Van Etta, L.L., Walker, D.H. (1994). Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States. A new species emerging?  
J Am Med Assoc 272: 212-218

Bakken, J.S., Krueth, J., Wilson-Nordskog, C., Tilden, R.L., Asanovich, K., Dumler, J.S. (1996): Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis  
J Am Med Assoc 275: 199-205

Baldelli, R., Di Francesco, A., Caria M. et al. (1994): Ehrlichiosi canina: segnalazione di alcuni casi in Sardegna  
Il Progresso Vet 49: 585-586

Baldelli, R., Di Francesco, A., Poglayen, G., Castiglione, N. (1996): Ehrlichiosi canina: indagine sierologia in canili italiani  
Obiettivi Doc Vet 7/8: 69-72

Baneth, G., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I., Shkap, V. (2001): Transmission of *Hepatozoon canis* by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks  
J Parasitol 87: 606-611

Barlough, J.E., Reubel, G.H., Madigan, J.E., Vredevroe, L.K., Miller, P.E., Rikihisa, Y. (1998): Detection of *Ehrlichia risticii*, the agent of Potomac horse fever, in freshwater stream snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) from northern California  
Appl Environ Microbiol 64: 2888-2893

- Bartsch, R.C., Greene, R.T. (1996): Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and or doxycycline  
J Vet Intern Med: 10: 271-274
- Batmaz, H., Nevo, E., Waner, T., Senturk, S., Yilmaz, Z., Harrus, S. (2001): Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Turkey  
Vet Rec 148: 665-666
- 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
- Beaufils, J.P., Martin-Granel, J., Jumelle, P. (1995): Intérêt des corps d'inclusion dans le diagnostic cytologique de l'ehrlichiose canine  
Bull Acad Vét Fr 68: 57-62
- Becker, D. (1987): Vademecum Labordiagnostik  
Verlag Volk und Gesundheit, Berlin: 334 S.
- Bezuidenhout, J.D. (1987): Natural transmission of Heartwater  
Onderstepoort J Vet Res 54: 349-351
- Bjoersdorff, A.L., Svendenius, J.H., Owens, J.H., Massung, R.F. (1999): Feline granulocytic ehrlichiosis-a report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent  
J Small Anim Pract 40: 20-24
- Blanco, J.R., Oteo, J.A. (2002): Human granulocytic ehrlichiosis in Europe  
Clin Microbiol Infect 8: 763-772
- Botros, B.A.M., Elmolla, M.S., Salib, A.W. et al. (1995): Canine ehrlichiosis in Egypt: sero-epidemiological survey  
Onderstepoort J Vet Res 62: 41-43

- Bradfield, J.F., Vore, S.J., Pryor, W.H. (1996): *Ehrlichia platys* infection in dogs  
Lab Anim Sci 46: 565-568
- Branger, S., Rolain, J.M., Raoult, D. (2004): Evaluation of antibiotic susceptibilities of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* by Real-time PCR  
Antimicrob Agent Chem 48: 4822-4828
- Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Hancock, S.I. (1998a): Doxycycline glycylate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains  
Antimicrob Agent Chem 42: 362-368
- Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Hancock, S.I. (1998b): Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*  
J Clin Microbiol 36: 2645-2651
- Breitschwerdt, E.B., Abrams-Ogg, A.C.G., Lappin, M.R., Bienzle, D., Hancock, S.I., Cowan, S.M., Clouten, J.K., Hegarty, B.C., Hawkins, E.C. (2002): Molecular evidence supporting *Ehrlichia canis*-like infection in cats  
J Vet Intern Med 16: 642-649
- Brouqui, P., Raoult, D., Vidor, E. (1989): Lack of co-transmission of *Rickettsia conorii* and *Ehrlichia canis* in human beings in the south of France  
Eur J Epidemiol 5: 110-112
- Brouqui, P., Dumler J.S., Lienhard R., Brossard M, Raoult D. (1995): Human granulocytic ehrlichiosis in Europe  
Lancet 346:782–783
- Büscher, G., Gandras, R., Apel, G., Friedhoff, K.T. (1984): Der erste Fall von Ehrlichiose beim Pferd in Deutschland (Kurzmitteilung)  
Dtsch Tierärztl Wochenschr 91: 408-409

Buhles, W.C., Ruxsoll, D.L., Ristic, M. (1974): Tropical canine pancytopenia: clinical, hematologic, and serologic response of dogs to *Ehrlichia canis* infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation

J Infect Dis 130: 358-367

Buhles, W.C., Huxsoll, D.L., Hildebrandt, P.K. (1975): Tropical canine pancytopenia: role of aplastic anemia in the pathogenesis of severe disease

J Comp Pathol 85: 511-521

Bulla, C., Kiomi Takahira, R., Pessoa Araujo, J., Trinca, L.A., Souza Lopez, R., Wiedmeyer, C.E. (2004): The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area

Vet Res 35: 141-146

Buller, R.S., Arens M., Hmiel S.P., Paddock C.D., Sumner J.W., Rikihisa Y., Unver A., Gaudreault-Keener M., Manian F.A., Liddell A.M., Schmulewitz N., Storch G.A. (1999): *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis

N Engl J Med 341:148–155

Camus, E., Martinez, D., Beauperthuy, L., et al. (1993): Heartwater in Guadeloupe and in the Caribbean

Rev Elev Med Vet Pays Trop 46: 109-114

Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamicnik, P.C., Wolf, D.E. (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer

Proc Natl Acad Sci USA 85: 8790-8794

Chae, J.-S., Pusterla, N., Johnson, E. (2000): Infection of aquatic insects with trematode metacercariae carrying *Ehrlichia risticii*, the cause of Potomac Horse fever

J Med Entomol 37: 619-625

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

Childs, J.E., Paddock, C.D. (2002): *Ehrlichia* species (the ehrlichioses)

In: Long, S.S., Pickering, L.K., Prober, C.G. (ed.): Principles and practice of pediatric infectious diseases; 2. Auflage; Churchill Livingstone, Philadelphia, USA: 913-916

Christova, I., van de Pol, J., Yazar, S., Velo, E., Schouls, L. (2003): Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group rickettsiae in ticks from Southeastern Europe

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22: 535-542

Clegg, R.M. (1992): Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids

Methods Enzymol 211: 353-388

Clegg, R.M. (1995): Fluorescence resonance energy transfer

Curr Opin Biotechnol 6: 103-110

Codner, E.C., Farris-Smith, L.L. (1986): Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs

J Am Vet Med Assoc 189: 47-50

Cordy, D.R., Gorham, J.R. (1950): The pathology and etiology of salmon disease in the dog and fox

Am J Pathol 26: 617-637

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

Cowdry, E.V. (1926): Studies on the aetiology of Heartwater: III. The multiplication of *Rickettsia ruminantium* within the endothelial cells of infected animals and their discharge into the circulation

J Exp Med 44: 803-814

Daniels, T.J., Falco, R.C., Schwartz, I., Varde, S., Robbins, R.G. (1997): Deer ticks (*Ixodes scapularis*) and the agents of Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in a New York City park

Emerg Infect Dis 3: 353-355

Davidson, R.W., Lockhart, J.M., Stallknecht, D.E., Howerth, E.W., Dawson, J.E., Rechav, Y. (2001): Persistent *Ehrlichia chaffeensis* infection in white-tailed deer

J Wildl Dis 37: 538-546

Dawson, J.E., Ewing, S.A. (1992): Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis

Am J Vet Res 53: 1322-1327

Dawson, J.E., Biggie, K.L., Warner, C.K., Cookson, K., Jenkins, S., Levine, J.F., Olson, J.G. (1996a): Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia

Am J Vet Res 57: 1175-1179

Dawson, J.E., Warner, C.K., Baker, V., Ewing, S.A., Stallknecht, D.E., Davidson, W.R., Kocan, A.A., Lockhart, J.M., Olson, J.G. (1996b): *Ehrlichia*-like 16S rDNA sequence from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)

J Parasitol 82: 52-58

De Caprariis, D., Gravino, E., Cerundolo, R. (1995): Le infezioni del genere *Ehrlichia* nel cane

Veterinaria 4: 19-34

Donatien, A., Lestoquard, F. (1935): Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien

Bull Soc Pathol Exot 28: 418-419

Dumler, J. S., Bakken J.S. (1995): Ehrlichial diseases of humans: Emerging tick-borne infections

Clin Infect Dis 20:1102–1110

Dumler, J.S., Asanovich, K.M., Bakken, J.S., Richter, P., Kimsey, R., Madigan, J.E. (1995): Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic *Ehrlichia*

J Clin Microbiol 33: 1098-1103

Dumler, J.S., Bakken, J.S. (1996): Human granulocytic ehrlichiosis in Wisconsin and Minnesota: a frequent infection with the potential for persistence

J Infect Dis 173: 1027-1030

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R. (2001): Reorganization of the 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 and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*

Int J Syst Evol Microbiol 51: 2145-2165

Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P. (2005): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin

Enke Verlag in MVS Medizinverlag Stuttgart GmbH & Co: 589 S.

Egenvall, A.E., Hedhammar, A.A., Bjoersdorff, A.I. (1997): Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden

Vet Rec 140: 222-226

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

Vet Rec 143: 412-417

Elias, E. (1991): Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of *E. canis*

J Small Anim Pract 33: 540-543

Ewing, S.A. (1963): Observations on leukocytic inclusion bodies from dogs infected with *Babesia canis*

J Am Vet Med Assoc 143: 503-506

Ewing, S.A. (1969): Canine ehrlichiosis

Adv Vet Sci Comp Med 13: 331-354

Ewing, S.A. (1972): Geographic distribution and tick transmission of *Ehrlichia canis*

J Med Entomol 9: 597-598

Ewing, S.A., Buckner, R., Stringer, B. (1964): The coyote, a potential host for *Babesia canis* and *Ehrlichia* sp.

J Parasitol 50: 704

Ewing, S.A., Roberson, W.R., Buckner, R.G., Hayat, C.S. (1971): A new strain of *Ehrlichia canis*

J AmVet Med Assoc 159:1771-1774

Ewing, S.A., Harkess, J.R., Kocan, K.M., Barker, R.W., Fox, J.C., Tyler, R.D., Cowell. R.L., Morton, R.B. (1990): Failure to transmit *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: *Ehrlichiae*) with *Otobius megnini* (Acari: *Argasidae*)

J Med Entomol 27: 803-806

Felek, S., Greene, R., Rikihisa, Y. (2003): Transcriptional analysis of *p30* Major Outer Membrane Protein genes of *Ehrlichia canis* in naturally infected ticks and sequence analysis of *p30-10* of *E. canis* from diverse geographic regions

J Clin Microbiol 41: 886-888

Feng, D.F., Doolittle, R.F. (1987): Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees

J Mol Evol 25: 351-360

Fingerle, V., Goodman, J.L., Johnson, R.C., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., Wilske, B. (1997): Human granulocytic ehrlichiosis in Southern Germany: Increased seroprevalence in high-risk groups

J Clin Microbiol 35: 3244-3247

Fingerle, V., Munderloh, U.G., Liegl, G., Wilske, B. (1999): Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany

Med Microbiol Immunol 188: 145-149

Foggie, A. (1951): Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep

J Pathol Bacteriol 63: 1-15

Förster, T. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz

Ann Phys 6: 55-75

Garrity, G.M. (2001): Bergey's manual of systematic bacteriology, 2<sup>nd</sup> edition

Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg: 721 S.

Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. (1996): A novel method for real time quantitative RT PCR

Genome Res 6: 995-1001

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): Leucocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand

J Clin Invest 103: 407-412

Gordon, W.S., Brownlee, A., Wilson, D.R., MacLeod, J. (1932): "Tick-borne fever ". (A hitherto undescribed disease of sheep)

J Comp Pathol Ther 65: 301-307

Gordon, W.S., Brownlee, A., Wilson, D.R. (1940): studies in louping ill, tick-borne fever and scrapie

In: Program and abstracts of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Microbiology, New York

Gothe, R. (1998): *Ehrlichia-canis*-Infektionen der Hunde in Deutschland

Tierärztl Prax 26 (K): 396-401

Gray, J.S. (2002): Biology of *Ixodes* species ticks in relation to tick-borne zoonoses

Wien Klin Wochenschr 114: 473-478

Greig, A., MacLeod, N.S., Allison, C.J. (1977): Tick borne fever in association with mucosal disease and cobalt deficiency in calves

Vet Rec 100: 562-564

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

Groves, M.G., Dennis, G.L., Amyx, H.L., Huxsoll, D. L. (1975): Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*)

Am J Vet Res 36: 937-940

Gusa, A.A., Buller, R.S., Storch, G.A., Huycke, M.M., Machado, L.J., Slater, L.N., Stockham, S.L., Massung, R.F. (2001): Identification of a *p28* Gene in *Ehrlichia ewingii*: Evaluation of gene for use as a target for a species-specific PCR diagnostic assay

J Clin Microbiol 39: 3871-3876

Harrus, S., Waner, T., Avidar, Y., Bogin, E., Peh, H., Bark, H. (1996): Serum protein alterations in canine ehrlichiosis

Vet Parasitol 66: 241-249

- Harrus, S., Waner, T., Bark, H. (1997): Canine monocytic ehrlichiosis: an update  
Compend Cont Educ Pract Vet 19: 431-447
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.M., Bark, H. (1998a):  
Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*  
J Clin Microbiol 36: 73-76
- Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Bark, H. (1998b): Therapeutic effect of doxycycline in  
experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: Evaluation of a 6-week course  
J Clin Microbiol 36: 2140-2142
- Harrus, S., Kenny, M., Miara, L., Aizenberg, I., Waner, T., Shaw, S. (2004): Comparison of  
simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of  
experimental *Ehrlichia canis* infection  
Antimicrob Agent Chem 48: 4488-4490
- Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S.O., Hassler, D., Kimmig, P. (2004):  
Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.),  
*Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany  
Int J Med Microbiol 293: 86-92
- Harvey, J.W., Simpson, C.F., Gaskin, J.M. (1978): Cyclic thrombocytopenia induced by a  
*Rickettsia*-like agent in dog  
J Infect Dis 137: 182-188
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996): Real time quantitative PCR  
Genome Res 6: 986-994
- Herron, M.J., Nelson, C.M., Larson, J., Snapp, K.R., Kansas, G.S., Goodman, L.J. (2000):  
Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-  
selectin ligand, PSGL-1  
Science 288: 1653-1656

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions

Biotechnology (NY) 11: 1026-1030

Hildebrandt, A., Schmidt, K.-H., Wilske, B., Dorn, W., Straube, E., Fingerle, V. (2003): Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22: 364-367

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase

Proc Natl Acad Sci USA 88: 7276-7280

Horowitz, H.W., Hsieh, T.C., Aguero-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

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

Br Vet J 106: 3-17

Hunfeld, K.-P., Bittner, T., Rödel, R., Brade, V., Cinatl, J. (2004): New real-time PCR-based method for in vitro susceptibility testing of *Anaplasma phagocytophilum* against antimicrobial agents

Int J Antimicrob Agent 23: 563-571

Huxsoll, D.L., Hildebrandt, P.K., Nims, R.M., Walker, J.S. (1970): Tropical canine pancytopenia

J Am Vet Med Assoc 157: 1627-1632

Huxsoll, D.L., Amyx, H.L., Helmet, I.E., Hildebrandt, P.K., Nims, R.M., Gochenour Jr., W.S. (1972): Laboratory studies of tropical canine pancytopenia

Exp Parasitol 31: 53-59

Inokuma, H., Ohno, K., Onishi, T., Raoult, D., Brouqui, P. (2001a): Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa prefectures, Japan

J Vet Med Sci 63: 815-817

Inokuma, H., Brouqui, P., Drancourt, M., Raoult, D. (2001b): Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*

J Clin Microbiol 39: 3031-3039

Iqbal, Z., Rikihisa, Y. (1994): Reisolation of *Ehrlichia canis* from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment

J Clin Microbiol 32: 1644-1649

Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W., Rikihisa, Y. (1994): Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis

J Clin Microbiol 32: 1658-1662

Isacson, J., Cao, H., Ohlsson, L., Nordgren, S., Svanvic, N., et al. (2000): Rapid and specific detection of PCR products using Light-up probes

Mol Cell Probes 14: 321-328

Johansson, K.-E., Pettersson, B., Uhlen, M., Gunnarsson, A., Malmqvist, M., Olsson, E. (1995): Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S rRNA gene

Res Vet Sci 58: 109-112

Johnson, E.M., Ewing, S.A., Barker, R.W., Fox, J.C., Crow, D.W., Kocan, K.M. (1998): Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichiae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae)

Vet Parasitol 74: 277-288

Kawahara, M., Ito, T., Suto, C., Shibata, S., Rikihisa, Y., Hata, K., Hirai, K. (1999): Comparison of *Ehrlichia muris* strains isolated from wild mice and ticks and serologic survey of humans and animals with *E. muris* as antigen

J Clin Microbiol 37: 1123-1129

Keefe, T.J., Holland, C.J., Salyer, P.E., Ristic, M. (1982): Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States  
J Am Vet Med Assoc 181: 236-238

Kim, H.-Y., Mott, J., Zhi, N., Tajima, T., Rikihisa, Y. (2002): Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in horses experimentally infected with *Anaplasma phagocytophila*  
Clin Diagn Lab Immun 9: 1079-1084

Klein, M.B., Nelson, C.M., Goodman, J.L. (1997): Antibiotic susceptibility of the newly cultivated agent of human granulocytic ehrlichiosis: promising activity of quinolones and rifamycins  
Antimicrob Agents Chemother 41: 76-79

Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G. (1971): Studies on polynucleotides. XCVI. Repair of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases  
J Mol Biol 56: 341-361

Kolbert, C. (1996): Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR  
In Persing, D. (ed.): PCR protocols for emerging infectious diseases; ASM Press, Washington, D.C., USA: 106-111

Kontos, V.J., Papadopoulos, O. (1987): Ehrlichiosis in Greece  
International meeting „Rickettsiology: the present and the future“, Palermo, Juni 21-28, 1987:  
187-188

Kordick, S.K., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Southwick, K.L., Colitz, C.M., Hancock, S.I., Bradley, J.M., Rumbough, R., McPherson, J.T., MacCormack, J.N. (1999): Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina  
J Clin Microbiol 37: 2631-2638

Kostrikis, L.G., Tyagi, S., Mhlanga, M.M., Ho, D.D., Kramer, F.R. (1998): Spectral genotyping of human alleles  
Science 279: 1228-1229

- Kraft, W. (1999): Bewertung von Laborbefunden in der tierärztlichen Praxis  
In: Kraft, W., Dürr, U.M. (ed.); Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin  
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York: 34-36
- Kühn, N.F., Gaunt, S.D. (1985): Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis  
J Am Vet Med Assoc 186: 355-358
- Kuffer-Frank, M., Link, M., Schipp, D., Kraft, W. (1999): *Ehrlichia canis*: Epidemiologie, klinische Symptome und labordiagnostische Befunde der Jahre 1996 und 1997 (60 Fälle)  
Tierärztl Prax 27 (K): 53-58
- Leutenegger, C.M., Pusterla, N., Wicki, R., Lutz, H. (2002): Neue molekularbiologische Nachweismethoden am Beispiel zeckengebundener Infektionserreger  
Schweiz Arch Tierheilkd 144: 395-404
- Lewis, G.E., Ristic, M., Smith, R.D., Lincoln, T., Stephenson, E.H. (1977): The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*  
Am J Vet Res 38: 1953-1955
- Liz, J.S. (1994): *Ehrlichia phagocytophila*: Aspects épidémiologiques, hématologiques et sérologiques de l'infection chez les bovins en Suisse  
Dissertation, Universität Neuenburg
- Liz, J.S., Anderes, L., Sumner, J.W., Massung, R.F., Gern, L., Rutti, B., Brossard M. (2000): PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in Western Switzerland  
J Clin Microbiol 38: 1002-1007
- Liz, J.S., Sumner, J.W., Pfister, K., Brossard, M. (2002): PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*)  
J Clin Microbiol 40: 892-897

Llera, J.L.G., Garcia, M.L.L., Reinoso, E.M., Gonzalez, R.D.V. (2002): Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis

Vet Parasitol 109: 185-190

Lockhart, J.M., Davidson, W.R., Stallknecht, D.E., Dawson, J.E., Howerth, E.W. (1997): Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts

J Clin Microbiol 35: 1681-1686

Madigan, J.E. (1993): Equine ehrlichiosis

Vet Clin North Am Equine Pract 9: 423-428

Madigan, J.E., Gribble, D. (1987): Equine ehrlichiosis in Northern California: 49 cases (1968-1981)

J Am Vet Med Assoc 190: 445-448

Madigan, J.E., Hietala, S., Chalmers, S., DeRock, E. (1990): Seroepidemiologic survey of antibodies to *Ehrlichia equi* in horses of northern California

J Am Vet Med Assoc 196: 1962-1964

Madigan, J.E., Rikihisa, Y., Palmer, J.E., DeRock, E., Mott, J. (1995): Evidence for a high rate of false-positive results with the indirect fluorescent antibody test for *Ehrlichia risticii* antibody in horses

J Am Vet Med Assoc 207: 1448-1453

Madigan, J.E., Pusterla, N., Johnson, E., Chae, J.S., Pusterla, J B., Derock, E., Lawler, S.P. (2000): Transmission of *Ehrlichia risticii*, the agent of potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors: preliminary report

Equine Vet J 32: 275-279

Madigan, J.E., Pusterla, N. (2000): Ehrlichial diseases

Emerg Infect Dis 16: 487-499

Magnarelli, L.A., Litwin, H.J., Holland, C.J., Anderson, J.F., Ristic, M. (1990): Canine ehrlichiosis in Connecticut

J Clin Microbiol 28: 366-367

Magnarelli, L.A., Anderson, J.F. (1993): Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in northeastern United States

J Clin Microbiol 31: 2857-2860

Magnarelli, L.A., Ijido, J.W., Van Andel, A.E., Wu, C., Fikrig, E. (2001): Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses

Am J Vet Res 62: 29-32

Manna, L., Alberti, A., Pavone, L.M., Scibelli, A., Staiano, N., Gravino, A.E. (2004): First molecular characterization of a granulocytic *Ehrlichia* strain isolated from a dog in South Italy

Vet J 167: 224-227

Mason, R.J., Lee, J.M., Curran, J.M., Moss, A., van der Heide, B., Daniels, P.W. (2001): Serologic survey for *Ehrlichia canis* in urban dogs from the major population centres of northern Australia

Aust Vet J 79: 559-562

Massung, R.F., Slater, K., Owens, J.H., Nicholson, W.I., Mather, T.N., Solberg, V.B., Olson, J.G. (1998): Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae

J Clin Microbiol 36: 1090-1095

Massung, R.F., Mael, M.J., Owens, J.H., Allan, N., Courtney, J.W., Stafford, K.C., Mather, T.N. (2002): Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut

Emerg Infect Dis 8: 467-472

Massung, R.F., Slater, K.G. (2003): Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*

J Clin Microbiol 41: 717-722

Mathew, J.S., Ewing, S.A., Malayer, J.R., Fox, J.C., Kocan, K.M. (2000): Efficacy of a modified polymerase chain reaction assay for detection of *Ehrlichia canis* infection  
J Vet Diagn Invest 12: 456-459

McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Chinsangaram, J., Akita, G.Y., Osburn, B.I. (1996): PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs  
J Vet Diagn Invest 8: 441-447

McQuiston, J. H., Paddock, C.D., Holman, R.C., Childs, J.E. (1999): The human ehrlichioses in the United States  
Emerg Infect Dis 5: 635–642

Misao, T., Kobayashi, Y. (1954): Studies on infectious mononucleosis: isolation of etiologic agent from blood, bone marrow, and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice  
Tokyo Iji Shinshi 71: 683-686

Misic-Majerus, L.J., Bujic, N., Madjaric, V., Janes-Poje, V. (2000): First description of the human granulocytic ehrlichiosis in Croatia  
Clin Microbiol Infect 6 (suppl 1): 194-195

Morais, J.D., Dawson, J.E., Greene, C., Filipe, A.R., Galhardas, L.C., Bacellar, F. (1991): First European case of ehrlichiosis  
Lancet 338: 633-634

Morrison, T.B., Weis, J.J., Wittwer, C.T. (1998): Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification  
Biotechniques 24: 954-8, 960, 962

Munderloh, U.G., Madigan, J.E., Dumler, J.S., Goodman, J.L., Hayes, S.F., Barlough, J.E., Nelson, C.M., Kurtti, T.J (1996): Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture  
J Clin Microbiol 34: 664-670

Munderloh, U.G., Jauron, S.D., Fingerle, V. et al. (1999): Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture  
J Clin Microbiol 37: 2518-2524

Munderloh, U.G., Tate, C.M., Lynch, M.J., Howerth, E.W., Kurtti, T.J., Davidson, W.R. (2003): Isolation of an *Anaplasma* sp organism from white-tailed deer by tick cell culture  
J Clin Microbiol 41: 4328-4335

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

Murphy, G.L., Ewing, S.A., Whitworth, L.C., Fox, J.C., Kocan, A.A. (1998a): A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma  
Vet Parasitol 79: 325-339

Murphy, C.I., Storey, J.R., Recchia, J., Doros-Richert, L.A., Gingrich-Baker, C., Munroe, K., Bakken, J.S., Coughlin, R.T., Beltz, G.A. (1998b): Major antigenic proteins of the agent of human granulocytiv ehrlichiosis are encoded by members of a multigene family  
Infect Immun 66: 3711-3718

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

Nazarenko, I.A., Bhatnagar, S.K., Hohmann, R.J. (1997): A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer  
Nucleic Acids Res 25: 2516-2521

Neer, T.M. (1998): Ehrlichiosis. Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis

In: Greene, C.E. (ed); Infectious diseases of the dog and cat

Saunders, Philadelphia, USA: 139-154

Neer, T., Eddlestone, S.M., Gaunt, S.D., Corstvet, R.E. (1999): Efficacy of Enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection

J Vet Intern Med 13: 501-504

Neer, T.M., Breitschwerdt, E.B., Greene, R.T., Lappin, M.P. (2002): Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM

J Vet Intern Med 16: 309-315

Nicholson, W.L., Comer, J.A., Sumner, J.W., Gingrich Baker, C., Coughlin, R.T., Magnarelli, L.A., Olson, J.G., Childs, J.E. (1997): An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis

J Clin Microbiol 35: 1510-1516

Nims, R.M., Ferguson, J.A., Walker, J.L., Hildebrandt, P.K., Huxsoll, D.L., Reardon, M.J., Varley, J.E., Kolaja, G.J., Watson, W.T., Shroyer, E.L., Elwell, P.A., Vacura, G.W. (1971): Epizootiology of tropical canine pancytopenia in southeast Asia

J Am Vet Med Assoc 158: 53-63

Nyindo, M.B.A., Ristic, M., Huxsoll, D.L., Smith, A.R. (1971): Tropical canine pancytopenia: in vitro cultivation of the causative agent- *Ehrlichia canis*

Am J Vet Res 32: 1651-1658

Nyindo, M.B.A., Ristic, M., Lewis, G.E. Jr., Huxsoll, D.L., Stephenson, E.H. (1978): Immune response of ponies to experimental infection with *Ehrlichia equi*

Am J Vet Res 39: 15-18

Nyindo, M.B.A., Huxsoll, D.L., Ristic, M., Kakoma, I., Brown, J.L., Carson, C.A., Stephenson, E.H. (1980): Cell-mediated and humoral responses of German shepherd dogs and beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*

Am J Vet Res 41: 250-254

Oehme, R., Hartelt, K., Backe, H., Brockmann, S., Kimmig, P. (2002): Foci of tick-borne diseases in southwest Germany

Int J Med Microbiol 291 Suppl 33: 22-29

Ogden, N.H., Casey, A.N.J., Woldehiwet, Z., French, N.P. (2003): Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phase of infection

Infect Immun 71: 2071-2078

Ohashi, N., Unver, A., Zhi, N., Rikihisa, Y. (1998a): Cloning and characterization of multigenes encoding immunodominant 30-Kilodalton major outer membrane proteins of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant protein for serodiagnosis

J Clin Microbiol 36: 2671-2680

Ohashi, N., Zhi, N., Zhang, N., Rikihisa, Y. (1998b): Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family

Infect Immun 66: 132-139

Oporto, B., Gil, H., Barral, M., Hurtado, A., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L. (2003): A survey on *Anaplasma phagocytophila* in wild small mammals and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Northern Spain

Ann NY Acad Sci 990: 98-102

Oteo, J.A., Blanco, J.R., de Artola, V., Ibarra, V. (2000): First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain)

Emerg Infect Dis 6: 430-431

Palmer, J.E. (1993): Potomac horse fever

Vet Clin N Am Equine Pract 9: 399-410

Pancholi, P., Kolbert, C.P., Mitchell, P.D., Reed, K.D., Dumler, J. S., Bakken, J.S., Telford, S.R., Persing, D.H. (1995): *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis

J Infect Dis 172:1007–1012

Park, J., Choi, K.S., Dumler, J.S. (2003): Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes

Infect Immun 71: 4018-4025

Pennisi, M.G., Catarsini, O., Domina, F. (1987): Ehrlichiosi del cane: descrizione di alcuni casi osservati in Sicilia

Atti Soc Ital SciVet 41: 509-514

Pennisi, M.G., French, T.W., Catarsini, O. (1989): Trombocitopenia ciclica infettiva del cane (*E. platys*) in Italia

Atti Soc Ital Sci Vet: 42: 1341

Pennisi, M.G., De Majo, M., Masucci, M. et al. (1993): Valutazione clinico-epidemiologica di 118 casi di ehrlichiosi canina e 42 casi di trombocitopenia ciclica infettiva

Atti Soc Ital Sci Vet 47: 1505-1509

Perez, M., Rikihisa, Y., Wen, B. (1996): *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: Antigenic and genetic characterization

J Clin Microbiol 34: 2133-2139

Perille, A.L., Matus, R.E. (1991): Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers

J Vet Intern Med 5: 195-198

Perry, B.D., Schmidtman, E.T., Rice, R.M., et al. (1989): Epidemiology of Potomac horse fever: An investigation into the possible role of non-equine mammals

Vet Rec 125: 83-86

Petersen, L.R., Sawyer, L.A., Fishbein, D.B., Kelley, P.W., Thomas, R.J., Magnarelli, L.A., Redus, M., Dawson, J.E. (1989): An outbreak of ehrlichiosis in members of an army reserve unit exposed to ticks

J Infect Dis 159: 562-568

Petrovec, M., Furlan, S.L., Zupanc, T.A., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V., Dumler, J.S. (1997): Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species

J Clin Microbiol 35: 1556-1559

Petrovec, M., Bidovec, A., Sumner, J.W., Nicholson, W.L., Childs, J.E., Avsic-Zupanc, T. (2002): Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: Evidence of two genotypic lineages

Wien Klin Wochenschr 114: 641-647

Petrovec, M., Sixl, W., Schweiger, R., Mikulasek, S., Elke, L., Wüst, G., Marth, E., Strasek, K., Stünzner, D., Avsic-Zupanc, T. (2003): Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic

Ann NY Acad Sci 990: 103-106

Pfister, K., Roesti, A., Boss, P.H., Balsiger, B. (1987): *Ehrlichia phagocytophila* als Erreger des „Weidefiebers“ in dem Berner Oberland

Schweiz Arch Tierheilkd 129: 343-347

Piergili Fioretti, D., Moretti, A., Balzelli, R., Pasquali, P. (1996): Canine ehrlichiosis: epidemiology and serological correlation with *Leishmania* sp. in stray dogs caught in the province of Perugia (Umbria, Central Italy)

Acta Med Vet 42: 71-78

Polin, H., Hufnagl, P., Haunschmid, R., Gruber, F., Ladurner, G. (2004): Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria

J Clin Microbiol 42: 2285-2286

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

Price, J.E., Karstad, L.H. (1980): Free-living jackals (*Canis mesomelas*)- potential reservoir hosts for *Ehrlichia canis* in Kenya  
J Wildl Dis 16: 469-473

Proverbio, D., Avezza, F., Belloli, A. (1996): Ehrlichiosi canina: indagine-epidemiologica nella provincia di Milano  
Arch Vet Ital 47: 169-176

Pusterla, N., Huder, J., Wolfensberger, C., Braun, U., Lutz, H. (1997a): Laboratory findings in cows after experimental infection with *Ehrlichia phagocytophila*  
Clin Diag Lab Immun 4: 643-647

Pusterla, N., Huder, J., Wolfensberger, C., Litschi, B., Parvis, A., Lutz, H. (1997b): granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland  
J Clin Microbiol 35: 2307-2309

Pusterla, N., Huder, J.B., Leutenegger, C.M., Braun, U., Madigan, J.E., Lutz, H. (1999a): Quantitative Real-Time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* Genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks  
J Clin Microbiol 37: 1329-1331

Pusterla, N., Leutenegger, C.M., Huder, J.B., Weber, R., Braun, U., Lutz, H. (1999b): Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland  
J Clin Microbiol 37: 1332-1334

Pusterla, N., Chang, C.-C., Chomel, B.B., Chae, J.-S., Foley, J.E., DeRock, E., Kramer, V.L., Lutz, H., Madigan, J.E. (2000a): Serologic and molecular evidence of *Ehrlichia* spp. in coyotes in California  
J Wildl Dis 36:494-499

Pusterla, N., Braun, U., Leutenegger, C.M., Reusch, C., Lutz, H. (2000b): Ehrlichiose in der Schweiz-Bedeutung für die Veterinärmedizin

Schweiz Arch Tierheilkd 142: 367-373

Reubel, G.H., Barlough, J.E., Madigan, J.E. (1998a): Production and characterization of *Ehrlichia risticii*, the agent of potomac horse fever, from snails (Pleuroceridae: *Juga* spp.) in aquarium culture and genetic comparison to equine strains

J Clin Microbiol 36: 1501-1511

Reubel, G.H., Kimsey, R.B., Barlough, J.E., Madigan, J.E. (1998b): Experimental transmission of *Ehrlichia equi* to horses through naturally infected ticks (*Ixodes pacificus*) from Northern California

J Clin Microbiol 36: 2131-2134

Rikihisa, Y. (1991): The tribe Ehrlichiae and ehrlichial diseases

Clin Microbiol Rev 4: 286-308

Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Fox, J.C., Siregar, A.G., Pasaribu, F.H., Malole, M.B. (1992): Analysis of *Ehrlichia canis* and a canine granulocyte *Ehrlichia* infection

J Clin Microbiol 30: 143-148

Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Fox, J.C. (1994): Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, and *E. ewingii* infections in dogs and humans

J Clin Microbiol 32: 2107-2112

Rinder, H., Janitschke, K., Aspöck, H., Da Silva, A. J., Deplazes, P., Fedorko, D. P., Franzen, C., Futh, U., Hunger, F., Lehmacher, A., Meyer, C. G., Molina, J. M., Sandfort, J., Weber, R., Löscher, T. (1998): Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of Microsporidia in stool specimens. The diagnostic Multicenter Study Group on Microsporidia.

J Clin Microbiol 36:1814-1818

Ristic, M. (1990): Current strategies in research on ehrlichiosis

In: Williams, J.C., Kakoma, I. (ed.); Ehrlichiosis: a vector borne disease of animals and humans

Kluwer Academic Publishers, Boston: 136-153

Ristic, M., Huxsoll, D.L., Weisinger, R.M., Hildebrandt, P.K., Nyindo, M.B.A. (1972): Serological diagnosis of tropical pancytopenia by indirect immunofluorescence

Infect Immun 6: 226-231

Rodgers, S.J., Morton, R.J., Baldwin, C.A. (1989): A serological survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Rickettsia rickettsii*, and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Oklahoma

J Vet Diagn Invest 1: 154-159

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., et al. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

Science 239: 487-491

Sainz, A., Amusatogui, I., Tesoro, M.A. (1999): *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain

J Vet Diagn Invest 11: 382-384

Selbitz, H.-J. (2002): Bakterielle Krankheiten der Tiere

In: Rolle, M., Mayr, A. (ed); Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre

Enke Verlag, Stuttgart: 417-588

Sixl, W., Petrovec, M., Marth, E., Wüst, G., Stünzner, D., Schweiger, R., Avsic-Zupanc, T. (2003): Investigation of *Anaplasma phagocytophila* infections in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in Austria

Ann NY Acad Sci 990: 94-97

Skotarczak, B. (2003): Canine ehrlichiosis

Ann Agric Environ Med 10: 137-141

Smith, R.D., Hooks, J.E., Huxsoll, D.L., Ristic, M. (1974): Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia): survival of phosphorus-32-labeled blood platelets in normal and infected dogs

Am J Vet Res 35: 269-273

Smith, R.D., Sells, D.M., Stephenson, E.H., Ristic, M.R., Huxsoll, D.L. (1976): Development of *Ehrlichia canis*, causative agent of canine ehrlichiosis, in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and its differentiation from a symbiotic rickettsia

Am J Vet Res 37: 119-126

Sommer, R., Tautz, D. (1989): Minimal homology requirements for PCR primers

Nucleic Acids Res 17: 6749

Sparagano, O.A.E., de Vos, A.P., Paoletti, B., Camma, C., de Santis, P., Otranto, D., Giangaspero, A. (2003): Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridisation

J Vet Diagn Invest 15: 527-534

Stafford, K.C. III, Massung, R.F., Magnarelli, L.A., Ijido, J.W., Anderson, J.E. (1999): Infection with agents of human granulocytic ehrlichiosis, lyme disease, and babesiosis in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in Connecticut

J Clin Microbiol 37: 2887-2892

Stannard, A.A., Gribble, D.H., Smith, R.S. (1969): Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever

Vet Rec 84: 149-150

Stich, R.W., Rikihisa, Y., Ewing, S.A., Needham, G.R., Grover, D.L., Jittapalapong, S. (2002): Detection of *Ehrlichia canis* in canine carrier blood and in individual experimentally infected ticks with a *p30*-based PCR assay

J Clin Microbiol 40: 540-546

Stockham, S.L., Schmidt, D.A., Tyler, J.W. (1985): Canine granulocytic ehrlichiosis in dogs from central Missouri: a possible cause of polyarthritis  
Vet Med Rev 6: 3-5

Storey, J. R., Doros-Richert, L.A., Gingrich-Baker, C., Munroe, K., Mather, T.N., Coughlin, R.T., Beltz, G.A., Murphy, C.I. (1998): Molecular cloning and sequencing of three granulocytic *Ehrlichia* genes encoding high molecular-weight immunoreactive proteins  
Infect Immun 66: 1356–1363

Streit, M. (1993): Zur Klinik, Hämatologie und Epidemiologie der Ehrlichiose (Weidefieber) beim Rind  
Dissertation, Bern

Stryer, L. (1999): Biochemie  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin: 1125 S.

Stryer, L., Haugland, R.P. (1967): Energy transfer: a spectroscopic ruler  
Proc Natl Acad Sci USA 58: 719-726

Stuen, S., Engvall, E.O., Artursson, K. (1998): Persistence of *Ehrlichia phagocytophila* infection in lambs in relation to clinical parameters and antibody responses  
Vet Rec 143: 553-555

Stuen, S., Van de Pol, I., Bergström, K., Schouls, L.M. (2002): Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway  
J Clin Microbiol 40: 3192-3197

Suksawat, J., Hegarty, B.C., Breitschwerdt, E.B. (2000): Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia  
J Vet Intern Med 14: 50-55

Suksawat, J., Pitulle, C., Arraga-Alvarado, C., Madrigal, K., Hancock, S.I., Breitschwerdt, E.B. (2001a): Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure  
J Clin Microbiol 39: 90-93

Suksawat, J., Xuejie, Y., Hancock, S.I., Hegarty, B.C., Nilkumhang, P., Breitschwerdt, E.B. (2001b): Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand  
J Vet Intern Med 15: 453-462

Sumner, J.W., Nicholson, W.I., Massung, R.F. (1997): PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species  
J Clin Microbiol 35: 2087-2092

Svanvic, N., Sehlstedt, U., Sjöback, R., Kubista, M. (2000): Detection of PCR products in real time using Light-up probes  
Anal Biochem 287: 179-182

Svanvic, N., Westman, G., Wang, D., Kubista, M. (2001): Light-up probes: Thiazole orangeconjugated peptide nucleic acid for the detection of target nucleic acid in homogeneous solution  
Anal Biochem 281: 26-35

Telford, S.R., III, Dawson, J.E., Katavolos, P., Warner, C.K., Kolbert, C.P., Persing, D.H. (1996): Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle  
Proc Natl Acad Sci USA 93: 6209-6214

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice  
Nucleic Acids Res 22: 4673-4680

Tozon, N., Petrovec, M., Avsic-Zupanc, T. (2003): Clinical and laboratory features of the first detected case of *A. phagocytophila* infections in dogs from Slovenia

Ann NY Acad Sci 990: 424-428

Trapp, S.M., Dagnone, A.S., Vidotto, O., Freire, R.L., de Morais, H.S.A. (2002): Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population in South Brazil

J Vet Intern Med 16: 365

Troy, G.C., Forrester, S.D. (1990): Canine ehrlichiosis

In: Greene, C.E. (ed); Infectious diseases of the dog and cat

WB Saunders, Philadelphia, USA: 48-59

Tuomi, J. (1967): Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity

Acta Pathol Microbiol Scand 70: 429-445

Tyagi, S., Kramer, F.R. (1996): Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization.

Nat Biotechnol 14: 303-308

Tyagi, S., Bratu, D.P., Kramer, F.R. (1998): Multicolor molecular beacons for allele discrimination

Nat Biotechnol 16: 49-53

Tylewska-Wiezbanowska, S., Chmielewski, T., Kondrusik, M., Hermanowska-Szpakowicz, T., Sawicki, W., Sulek, K. (2001): First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 29: 196-198

Uilenberg, G. (1983): Heartwater (*Cowdria ruminantium* Infection): Current status

Adv Vet Sci Comp Med 27: 428-455

Unver, A., Ohashi, N., Tajima, T., Stich, R.W., Grover, D., Rikihisa, Y. (2001): Transcriptional analysis of *p30* major outer membrane multigene family of *Ehrlichia canis* in dogs, ticks, and cell culture at different temperatures  
Infect Immun 69: 6172-6178

Unver, A., Rikihisa, Y., Kawahara, M., Yamamoto, S. (2003): Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Wolbachia* species from canine blood in Japan  
Ann NY Acad Sci 990: 692-698

Van Dobbenburgh, A., Van Dam, A.P., Fikrig, E. (1999): Human granulocytic ehrlichiosis in western Europe  
N Engl J Med 340: 1214-1216

Varela, F., Font, X., Valladares, J.E., Alberola, J. (1997): Thrombocytopenia and light-chain proteinuria in a dog naturally infected with *Ehrlichia canis*  
J Vet Intern Med 11: 309-311

Vaughan, M. (1988): Control of tick-borne diseases in cattle  
In Practice: 79-84

Vesco, G., Tamburello, A., Glorioso, N.S. et al. (1994): Ehrlichiosi canina: indagine epidemiologica preliminare  
Atti Soc Ital Sci Vet 48: 1095-1097

Voigt, V., Cavalli, A., Malena, G. et al. (1993): Anticorpi per *Ehrlichia canis* in sieri di cani della Puglia  
Atti Soc Ital Sci Vet 47: 967-969

von Löwenich, F., Bogdan, C. (2001): Die „unbekannte“ Zeckenerkrankung Ehrlichiose  
Der Hausarzt 10: 39-41

Waddle, J.R., Littman, M.P (1988): A retrospective study of 27 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis

J Am Anim Hosp Assoc 24: 615-620

Walder, G., Tiwald, G., Dierich, M.P., Wurzner, R. (2003): Serological evidence for human granulocytic ehrlichiosis in Western Austria

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22: 543-547

Walker, J.S., Rundquist, J.D., Taylor, R., Wilson, B.L., Andrews, M.R., Barck, J., Hogge, A.J. Jr., Huxsoll, D.L., Hildebrandt, P.K., Nims, R.M. (1970): Clinical and clinicopathological findings in tropical canine pancytopenia

J Am Vet Med Assoc 157: 43-55

Walls, J. J., Caturegli, P., Bakken, J.S., Asanovich, K.M., Dumler, J.S. (2000): Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using *epank1* genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group Ehrlichiae

J Clin Microbiol 38: 354–356

Waner, T., Harrus, S., Weiss, D.J., Barh, H., Keysary, A. (1995): Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis

Vet Immunol Immunopathol 48: 177-182

Waner, T., Rosner, M., Harrus, S., Naveh, A., Zass, R., Keysary, A. (1996): Detection of *Ehrlichia* antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection

Vet Parasitol 63: 331-335

Waner, T., Harrus, S., Bark, H., Bogin, E., Avidar, Y., Keysary, A. (1997): Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs

Vet Parasitol 69: 331-335

Waner, T., Strenger, C., Keysary, A. (2000): Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of *Ehrlichia canis* antibodies in dogs

J Vet Diagn Invest 12: 240-244

Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, A.W.C.A. (2001): Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*

Vet Parasitol 95: 1-15

Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J., Fuerst, P.A., Kawahara, M., Suto, C. (1995): *Ehrlichia muris* sp. nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics

Int J Syst Bacteriol 45: 250-254

Wen, B., Rikihisa, Y., Yamamoto, S., Kawabata, N., Fürst, P.A. (1996): Characterization of the SF agent, an *Ehrlichia* sp. isolated from the fluke *Stellantchasmus falcatus*, by 16S rRNA base. Sequence, serological, and morphological analyses

Int J Syst Bact 46: 149-154

Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J.M., Greene, R., Kim, H.-Y., Zhi, N., Couto, G.C., Unver, A., Bartsch, R. (1997): Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline

J Clin Microbiol 35: 1852-1855

Wen, B., Cao, W., Pan, H. (2003): Ehrlichiae and ehrlichial diseases in China

Ann NY Acad Sci 990: 45-53

Whitcombe, D., Brownie, J., Gillard, H.L., McKechnie, D., Thesker, J., et al. (1998): A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping

Clin Chem 44: 918-923

Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S. (1999): Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence

Nat Biotechnol 17: 804-807

Wilhelm, J. (2003): Entwicklung real-time-PCR-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik

Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

Winkler, G.C., Arnold, P., Deplazes, P., Glardon, O., Lutz, H. (1988): Klinische und serologische Diagnose von Ehrlichiose bei Hunden in der Schweiz

Schweiz Arch Tierheilk 130: 357-367

Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P. (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification

Biotechniques 22: 130-131, 134-138

Woody, B.J., Hoskins, J.D. (1991): Ehrlichial diseases of dogs

North Am Small Anim Pract 21: 75-98

Wu, P., Brand, L. (1994): Resonance energy transfer: Methods and applications

Anal Biochem 218: 1-13

Würth, S. (2004): Untersuchungen zur Piroplasmose bei Hauskatzen in Südafrika

Dissertation, LMU München

Zahler-Rinder, M., Beck, W., Krux, F., Geiger, S. (2004): Biodiversity in canine babesiae: molecular and epidemiological investigations

Int J Med Microbiol 293: 117

Zhang, X.-F., Zhang, J.-Z., Long, S.W., Ruble, R.P., Yu, X.-J. (2003): Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles

J Med Microbiol 52: 1021-1026

Zhi, N., Rikihisa, Y., Kim, H.Y., Wormser, G.P., Horowitz, H.W. (1997): Comparison of major antigenic proteins of six strains of the human granulocytic ehrlichiosis agent by western immunoblot analysis

J Clin Microbiol 35: 2606-2611

Zhi, N., Ohashi, N., Rikihisa, Y., Horowitz, H.W., Wormser, G.P., Hechemy, K. (1998):  
Cloning and expression of the 44-kilodalton major outer membrane protein gene of the human  
granulocytic ehrlichiosis agent and application of the recombinant protein to serodiagnosis  
J Clin Microbiol 36: 1666-1673

**VII. ABKÜRZUNGEN**

A	Adenin
bp	Nukleinsäurebasenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Dabcyl	Dimethylaminophenylbenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	Carboxyfluoreszein
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanin
HEX	Hexachlorfluoreszein
IFAT	indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kbp	Kilobasenpaare
mA	Milliampere
M	molar
min	Minuten
mM	millimolar
msp	Oberflächenprotein (Major Surface Protein)
ng	Nanogramm
µl	Mikroliter
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen/min
RNA	Ribonukleinsäure

s	Sekunden
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	Thermus aquaticus
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt

## VIII. Anhang

1. Patientendaten der *Ehrlichia canis*-Studie

Probe EC	Geschlecht	Alter (Jahre)	PCR	IFAT	Zeckenbefall	Klin. Symptome	Herkunft
1	w	1	negativ	positiv	nein		Privat
2	m	10	negativ	positiv	ja	Anäm, Thro	Privat
3	w	3	positiv	positiv	nein		Privat
4	w	2	negativ	negativ	nein		Strasse
5	w	3	negativ	positiv	nein		Tierheim
6	w	6	negativ	positiv	nein		Tierheim
7	m	2,5	positiv	positiv	ja		Tierheim
8	w	2,5	positiv	positiv	nein		Tierheim
9	w	1	positiv	positiv	ja		Strasse
10	w	1,5	negativ	negativ	ja		Strasse
11	m	4	negativ	negativ	ja		Strasse
12	m	6	negativ	negativ	ja		Strasse
13	m	5	positiv	positiv	ja		Strasse
14	m	2	negativ	positiv	ja		Strasse
15	w	3	negativ	positiv	ja		Strasse
16	m	3	negativ	positiv	ja		Tierheim
17	w	9	negativ	positiv	ja		Tierheim
18	m	6	negativ	positiv	ja		Strasse
19	w	12	negativ	positiv	ja		Tierheim
20	m	2	positiv	positiv	ja		Strasse
21	w	7	negativ	negativ	nein		Privat
22	m	1	positiv	positiv	ja		Strasse
23	w	3	negativ	negativ	ja		Tierheim
24	w	4	negativ	positiv	ja		Tierheim
25	w	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
26	m	6	negativ	positiv	nein		Tierheim
27	w	5	negativ	positiv	nein		Tierheim
28	w	12	negativ	negativ	nein		Tierheim
29	m	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
30	w	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
31	w	2	negativ	negativ	ja		Privat
32	m	2	positiv	positiv	ja		Tierheim
33	w	3	negativ	negativ	ja		Tierheim
34	w	2	negativ	negativ	nein		Privat
35	m	2	negativ	negativ	nein		Strasse
36	w	1	negativ	grenzwertig	ja		Privat
37	w	4	negativ	negativ	ja		Tierheim
38	m	1,5	positiv	positiv	ja		Tierheim
39	w	1	negativ	negativ	ja		Tierheim
40	w	1	negativ	negativ	ja		Tierheim

Probe EC	Geschlecht	Alter (Jahre)	PCR	IFAT	Zeckenbefall	Klin. Symptome	Herkunft
41	w	1	negativ	positiv	nein		Tierheim
42	w	1	negativ	positiv	ja		Tierheim
43	w	1	negativ	negativ	ja		Tierheim
44	w	2	positiv	positiv	ja		Tierheim
45	w	0,25	negativ	negativ	nein		Tierheim
46	w	1	negativ	grenzwertig	nein		Tierheim
47	w	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
48	w	1,5	negativ	positiv	nein		Tierheim
49	m	1	negativ	negativ	nein		Strasse
50	m	1	negativ	grenzwertig	nein	Abm	Tierheim
51	m	9	negativ	grenzwertig	nein		Tierheim
52	w	3	negativ	positiv	nein		Tierheim
53	m	10	negativ	positiv	nein		Tierheim
54	m	6	positiv	positiv	nein		Tierheim
55	w	1	negativ	grenzwertig	nein		Tierheim
56	w	2,5	negativ	grenzwertig	nein		Tierheim
57	m	3	negativ	positiv	nein	Hämor	Tierheim
58	w	10	negativ	positiv	nein	Thro	Tierheim
59	m	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
60	w	3,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
61	m	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
62	w	0,5	positiv	positiv	nein		Tierheim
63	w	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
64	m	9	negativ	positiv	nein		Tierheim
65	w	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
66	m	3,5	negativ	grenzwertig	nein		Tierheim
67	m	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
68	w	0,25	negativ	negativ	nein		Tierheim
69	w	0,25	negativ	negativ	nein		Tierheim
70	w	0,75	negativ	negativ	nein		Privat
71	w	4	negativ	positiv	nein		Tierheim
72	w	2,5	negativ	grenzwertig	nein		Tierheim
73	m	7	negativ	negativ	nein		Tierheim
74	w	2	negativ	grenzwertig	nein		Tierheim
75	w	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
76	m	11	negativ	positiv	nein		Tierheim
77	w	4	negativ	grenzwertig	nein		Tierheim
78	w	4	positiv	positiv	nein		Tierheim
79	w	6	negativ	negativ	nein		Privat
80	w	3	negativ	negativ	nein		Tierheim
81	w	10	negativ	positiv	nein		Tierheim
82	m	7	negativ	positiv	nein		Tierheim
83	m	7	negativ	positiv	nein		Tierheim
84	m	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
85	w	6	negativ	positiv	nein		Tierheim
86	m	5	negativ	negativ	nein		Tierheim
87	w	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
88	w	5	negativ	positiv	nein		Tierheim
89	m	1,5	positiv	positiv	ja		Strasse
90	w	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
91	w	4	negativ	positiv	ja		Tierheim
92	w	6	negativ	positiv	nein		Tierheim
93	w	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
94	m	3	negativ	negativ	nein		Privat

Probe EC	Geschlecht	Alter (Jahre)	PCR	IFAT	Zeckenbefall	Klin. Symptome	Herkunft
95	m	1	negativ	negativ	nein		Privat
96	m	5	negativ	positiv	nein		Tierheim
97	w	1	positiv	positiv	nein		Tierheim
98	m	7	positiv	grenzwertig	ja		Tierheim
99	w	0,5	negativ	negativ	ja		Tierheim
100	w	1	negativ	grenzwertig	ja		Strasse
101	w	3	negativ	positiv	ja		Privat
102	w	0,5	positiv	positiv	nein		Strasse
103	w	0,5	positiv	positiv	ja		Strasse
104	w	0,5	negativ	negativ	ja		Strasse
105	w	1	negativ	negativ	ja		Strasse
106	w	3	negativ	negativ	nein		Strasse
107	m	4	negativ	positiv	ja		Strasse
108	m	1	negativ	negativ	ja		Strasse
109	w	1	negativ	negativ	ja	Hämor	Tierheim
110	w	0,75	positiv	positiv	ja	Abm	Strasse
111	w	1	positiv	positiv	ja		Strasse
112	w	3	negativ	grenzwertig	ja	Abm, Hämor	Strasse
113	m	3	negativ	negativ	nein		Tierheim
114	w	1	negativ	grenzwertig	ja		Strasse
115	w	1	negativ	negativ	ja		Strasse
116	w	1	positiv	positiv	ja	Abm, Hämor	Strasse
117	w	1	negativ	negativ	nein		Strasse
118	w	10	negativ	grenzwertig	ja		Privat
119	m	8	negativ	negativ	ja		Privat
120	m	3	negativ	negativ	ja		Privat
121	m	0,75	negativ	negativ	nein		Tierheim
122	m	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
123	m	2	positiv	positiv	nein		Tierheim
124	m	0,25	negativ	negativ	nein		Tierheim
125	m	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
126	m	3	negativ	negativ	nein		Tierheim
127	m	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
128	m	4	negativ	positiv	nein		Tierheim
129	m	0,75	negativ	negativ	nein		Tierheim
130	m	3	negativ	positiv	nein		Tierheim
131	m	6	negativ	negativ	nein		Tierheim
132	m	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
133	m	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
134	w	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
135	w	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
136	m	3	negativ	negativ	nein		Tierheim
137	m	4	positiv	positiv	nein		Tierheim
138	m	4	positiv	positiv	nein		Tierheim
139	m	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
140	w	6	negativ	positiv	nein		Tierheim
141	w	9	negativ	positiv	nein		Tierheim
142	w	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
143	w	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
144	w	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
145	m	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
146	w	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
147	w	2	negativ	negativ	ja		Tierheim
148	w	2	negativ	negativ	ja		Tierheim

Probe EC	Geschlecht	Alter (Jahre)	PCR	IFAT	Zeckenbefall	Klin. Symptome	Herkunft
149	w	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
150	w	0,5	negativ	negativ	nein		Privat
151	w	0,25	negativ	negativ	ja		Tierheim
152	w	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
153	w	0,25	negativ	negativ	ja		Tierheim
154	w	2	negativ	negativ	ja		Tierheim
155	w	1,5	positiv	positiv	ja		Privat
156	w	2	negativ	negativ	ja		Strasse
157	w	3	negativ	negativ	ja		Strasse
158	w	0,75	negativ	negativ	nein		Strasse
159	w	2	negativ	negativ	nein		Strasse
160	w	0,5	negativ	negativ	nein		Privat
161	w	1	positiv	positiv	nein	Hämor	Strasse
162	w	2	negativ	negativ	nein		Strasse
163	w	2	negativ	grenzwertig	nein		Strasse
164	w	1	negativ	positiv	nein		Strasse
165	w	2	negativ	positiv	nein	Fieb, Abm, Thro	Tierheim
166	w	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
167	w	2	negativ	negativ	nein		Strasse
168	m	3	negativ	grenzwertig	ja		Strasse
169	w	3	negativ	positiv	nein	Abm, Hämor	Privat
170	m	0,75	negativ	negativ	nein		Tierheim
171	w	1,5	negativ	negativ	ja		Strasse
172	w	2	negativ	negativ	nein	Abm	Strasse
173	m	3	positiv	positiv	ja	Abm	Strasse
174	w	2	negativ	negativ	ja		Strasse
175	w	2	negativ	negativ	nein		Strasse
176	w	8	negativ	negativ	ja		Strasse
177	m	1	negativ	positiv	nein		Strasse
178	w	2	positiv	positiv	nein		Tierheim
179	m	3	positiv	positiv	nein		Tierheim
180	m	1,5	negativ	negativ	nein		Strasse
181	w	0,5	negativ	negativ	ja		Strasse
182	w	12	negativ	grenzwertig	nein	Abm	Strasse
183	m	2	negativ	positiv	ja	Abm	Strasse
184	m	2	negativ	positiv	ja		Strasse
185	w	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
186	m	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
187	m	2	negativ	positiv	nein	Abm, Hämor, Anäm, Thro	Strasse
188	w	6	negativ	grenzwertig	ja		Tierheim
189	w	0,5	negativ	negativ	ja		Tierheim
190	m	3	negativ	positiv	nein		Tierheim
191	w	8	negativ	negativ	nein		Tierheim
192	w	3	negativ	negativ	nein		Tierheim
193	m	3	negativ	positiv	nein		Tierheim
194	w	4	negativ	positiv	nein		Tierheim
195	w	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
196	w	5	negativ	positiv	nein		Tierheim
197	w	5	negativ	positiv	nein		Tierheim
198	m	5	negativ	grenzwertig	nein		Tierheim
199	m	0,75	negativ	negativ	nein		Tierheim
200	w	1	positiv	positiv	nein		Tierheim
201	m	3	negativ	positiv	nein		Tierheim
202	w	1	negativ	positiv	nein		Tierheim

Probe EC	Geschlecht	Alter (Jahre)	PCR	IFAT	Zeckenbefall	Klin. Symptome	Herkunft
203	w	4	positiv	negativ	nein		Tierheim
204	w	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
205	w	1	negativ	positiv	nein		Tierheim
206	w	0,75	positiv	negativ	nein		Tierheim
207	w	3	negativ	negativ	nein		Tierheim
208	m	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
209	m	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
210	w	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
211	m	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
212	m	6	negativ	positiv	nein		Tierheim
213	m	8	negativ	negativ	nein		Tierheim
214	m	6	negativ	negativ	nein		Tierheim
215	m	4	negativ	positiv	nein		Tierheim
216	m	1	negativ	positiv	nein		Tierheim
217	m	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
218	m	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
219	w	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
220	w	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
221	w	1	negativ	positiv	nein	Abm	Tierheim
222	w	1	positiv	positiv	nein		Tierheim
223	w	4	negativ	positiv	nein		Tierheim
224	w	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
225	m	9	negativ	positiv	nein		Tierheim
226	m	8	negativ	positiv	nein		Tierheim
227	m	4	negativ	negativ	nein		Tierheim
228	w	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
229	m	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
230	w	3	negativ	negativ	nein		Tierheim
231	w	6	negativ	negativ	nein		Tierheim
232	w	1	negativ	negativ	nein		Tierheim
233	w	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
234	m	2	negativ	positiv	nein		Tierheim
235	m	3	positiv	positiv	nein		Tierheim
236	m	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
237	m	0,5	negativ	negativ	nein		Tierheim
238	w	0,75	negativ	negativ	nein		Tierheim
239	w	3	negativ	positiv	nein		Tierheim
240	w	3	negativ	negativ	ja		Tierheim
241	w	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
242	w	2	negativ	negativ	nein		Tierheim
243	w	2	negativ	negativ	nein	Abm	Tierheim
244	w	2	negativ	negativ	nein		Tierheim

m = männlich; w = weiblich;

Abm=Abmagerung; Anäm=Anämie; Fieb=Fieber; Hämor=Hämorrhagien; Thro=Thrombozytopenie

## 2. Patientendaten der *Anaplasma phagocytophilum*-Studie

### 2.1 Eigens für die Studie eingesandte Proben mit Fragebogen

Probe F	Geschlecht	Alter (Jahre)	Buffy-coat-Ausstrich	PCR	IFAT	Zeckenbefall
1	m	2	negativ	negativ	negativ	ja
2	w	1	negativ	negativ	negativ	ja
3	w	4	negativ	negativ	grenzwertig	ja
4	w	9	negativ	negativ	negativ	ja
5	w	11	negativ	negativ	negativ	ja
6	m	7	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
7	m	4	negativ	negativ	negativ	ja
8	w	5	negativ	negativ	grenzwertig	ja
9	m	10	negativ	negativ	negativ	ja
10	m	4	negativ	negativ	grenzwertig	ja
11	m	4	negativ	negativ	negativ	ja
12	m	6	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
13	m	0,25	negativ	negativ	negativ	ja
14	m	5	negativ	negativ	negativ	ja
15	m	3	negativ	negativ	negativ	ja
16	w	9	negativ	negativ	negativ	ja
17	m	7	negativ	negativ	grenzwertig	ja
18	w	10	negativ	negativ	negativ	ja
19	m	4	negativ	negativ	negativ	ja
20	m	9	negativ	negativ	grenzwertig	ja
21	w	6	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
22	m	6	negativ	negativ	negativ	ja
23	w	4	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
24	m	2	negativ	negativ	negativ	ja
25	m	10	negativ	negativ	negativ	ja
26	m	3	negativ	negativ	negativ	ja
27	m	4	negativ	negativ	grenzwertig	ja
28	m	13	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
29	w	9	negativ	negativ	negativ	ja
30	m	9	negativ	negativ	grenzwertig	ja
31	w	7	negativ	negativ	grenzwertig	ja
32	m	2	negativ	negativ	negativ	ja
33	w	4	negativ	negativ	negativ	ja
34	w	5	negativ	negativ	negativ	ja
35	w	1	negativ	negativ	negativ	ja
36	w	1	negativ	negativ	negativ	ja
37	w	1	negativ	negativ	negativ	ja
38	m	5	negativ	negativ	negativ	ja
39	w	12	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja

Probe F	Geschlecht	Alter (Jahre)	Buffy-coat-Ausstrich	PCR	IFAT	Zeckenbefall
40	m	5	negativ	negativ	negativ	ja
41	w	9	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
42	m	6	negativ	negativ	negativ	ja
43	m	10	negativ	negativ	negativ	ja
44	m	1	negativ	negativ	grenzwertig	ja
45	w	5	negativ	negativ	grenzwertig	ja
46	m	7	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
47	m	8	negativ	negativ	negativ	ja
48	w	12	negativ	negativ	negativ	ja
49	w	3	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	ja
50	w	7	negativ	negativ	negativ	ja
51	w	2	negativ	negativ	negativ	ja
52	m	0,5	negativ	negativ	negativ	ja
53	m	10	negativ	negativ	negativ	ja
54	m	8	negativ	negativ	negativ	ja
55	m	4	negativ	negativ	negativ	ja
56	m	10	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
57	m	10	negativ	negativ	negativ	ja
58	m	6	negativ	negativ	negativ	ja
59	m	10	negativ	negativ	negativ	ja
60	w	9	negativ	negativ	negativ	ja
61	m	3	negativ	negativ	grenzwertig	ja
62	m	1	negativ	negativ	negativ	ja
63	w	3	negativ	negativ	grenzwertig	ja
64	m	10	negativ	negativ	negativ	ja
65	m	7	negativ	negativ	negativ	ja
66	m	10	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
67	w	9	negativ	negativ	<b>positiv</b>	ja
68	w	3	negativ	negativ	negativ	ja
69	w	2	negativ	negativ	negativ	ja
70	w	15	negativ	negativ	grenzwertig	ja
71	m	13	negativ	negativ	negativ	ja
72	m	1	negativ	negativ	negativ	ja

m = männlich; w = weiblich;

## 2.2 Aus der Routinediagnostik entnommene Proben ohne Fragebogen

Probe OF	Geschlecht	Alter (Jahre)	PCR	IFAT
1	w	0,5	negativ	negativ
2	w	unbekannt	negativ	negativ
3	m	1	negativ	negativ
4	unbekannt	unbekannt	negativ	<b>positiv</b>
5	w	10	negativ	negativ
6	m	14	negativ	<b>positiv</b>
7	w	0,5	negativ	negativ
8	m	2	negativ	negativ
9	m	1	negativ	<b>positiv</b>
10	w	2	negativ	grenzwertig
11	m	1	negativ	<b>positiv</b>
12	m	unbekannt	negativ	negativ
13	w	unbekannt	negativ	grenzwertig
14	m	4	<b>positiv</b>	grenzwertig
15	m	7	negativ	negativ
16	m	2	negativ	negativ
17	w	8	negativ	negativ
18	w	0,5	negativ	negativ
19	w	2	negativ	grenzwertig
20	m	1	negativ	negativ
21	w	7	negativ	negativ
22	m	10	negativ	<b>positiv</b>
23	w	3	negativ	<b>positiv</b>
24	w	unbekannt	negativ	<b>positiv</b>
25	w	2	negativ	negativ
26	w	1	negativ	negativ
27	m	3	negativ	negativ
28	m	1	negativ	negativ
29	m	1	negativ	negativ
30	w	4	negativ	<b>positiv</b>
31	w	0,5	negativ	negativ
32	w	unbekannt	negativ	negativ
33	m	8	negativ	<b>positiv</b>
34	m	6	negativ	<b>positiv</b>
35	w	6	negativ	<b>positiv</b>
36	m	10	negativ	negativ
37	m	4	negativ	negativ
38	m	1	negativ	negativ
39	m	2	negativ	grenzwertig
40	w	3	negativ	<b>positiv</b>
41	m	11	negativ	grenzwertig
42	m	unbekannt	negativ	negativ
43	w	unbekannt	negativ	negativ
44	w	0,5	negativ	negativ
45	w	10	negativ	negativ
46	m	unbekannt	negativ	negativ

Probe OF	Geschlecht	Alter (Jahre)	PCR	IFAT
47	w	1	negativ	negativ
48	w	2	negativ	grenzwertig
49	m	4	negativ	negativ
50	m	1	negativ	<b>positiv</b>
51	m	0,5	negativ	negativ
52	w	2	negativ	<b>positiv</b>
53	m	0,75	negativ	negativ
54	m	0,75	negativ	negativ
55	w	unbekannt	negativ	negativ
56	m	9	negativ	grenzwertig
57	w	3	negativ	<b>positiv</b>
58	w	unbekannt	negativ	<b>positiv</b>
59	m	10	negativ	<b>positiv</b>
60	w	2	negativ	negativ
61	m	2	negativ	negativ
62	w	5	negativ	<b>positiv</b>
63	m	unbekannt	negativ	negativ
64	w	7	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>
65	m	3	negativ	negativ
66	m	7	negativ	negativ
67	w	5	negativ	negativ
68	m	unbekannt	negativ	negativ
69	w	0,75	negativ	negativ
70	m	3	negativ	<b>positiv</b>
71	m	0,25	negativ	negativ
72	w	3	negativ	negativ
73	w	0,5	negativ	negativ
74	m	9	negativ	negativ
75	w	3	negativ	negativ
76	m	unbekannt	negativ	<b>positiv</b>
77	m	unbekannt	negativ	negativ
78	m	2	negativ	grenzwertig
79	m	7	negativ	<b>positiv</b>
80	m	1	negativ	grenzwertig
81	m	13	negativ	negativ
82	m	3	negativ	<b>positiv</b>
83	w	0,5	negativ	negativ
84	m	1,5	negativ	<b>positiv</b>
85	w	unbekannt	negativ	negativ
86	m	5	negativ	<b>positiv</b>
87	m	12	negativ	<b>positiv</b>
88	w	4	negativ	<b>positiv</b>
89	m	0,75	negativ	negativ
90	w	12	negativ	grenzwertig
91	m	2	negativ	<b>positiv</b>
92	w	1	negativ	<b>positiv</b>
93	w	0,75	negativ	negativ
94	m	6	negativ	negativ
95	m	2	negativ	<b>positiv</b>
96	w	2	negativ	grenzwertig
97	m	7	negativ	<b>positiv</b>

Probe OF	Geschlecht	Alter (Jahre)	PCR	IFAT
98	w	8	negativ	<b>positiv</b>
99	w	13	negativ	<b>positiv</b>
100	m	unbekannt	negativ	grenzwertig
101	m	2	negativ	negativ
102	w	7	negativ	<b>positiv</b>
103	w	2	negativ	grenzwertig
104	m	3	negativ	negativ
105	w	6	negativ	<b>positiv</b>
106	w	1,5	negativ	<b>positiv</b>
107	w	7	negativ	negativ
108	w	3	negativ	<b>positiv</b>
109	w	9	negativ	<b>positiv</b>
110	m	2	negativ	negativ
111	w	unbekannt	negativ	negativ
112	w	0,75	negativ	negativ
113	w	5	negativ	<b>positiv</b>
114	m	1,5	negativ	negativ
115	m	8	negativ	grenzwertig
116	w	3	negativ	<b>positiv</b>
117	w	unbekannt	negativ	<b>positiv</b>
118	w	5	negativ	<b>positiv</b>
119	m	4	negativ	negativ
120	w	3	negativ	grenzwertig
121	w	3	negativ	<b>positiv</b>
122	unbekannt	unbekannt	negativ	negativ
123	m	0,5	negativ	negativ
124	m	6	negativ	<b>positiv</b>
125	m	7	negativ	negativ
126	m	0,5	negativ	grenzwertig
127	w	3	negativ	negativ
128	w	unbekannt	negativ	grenzwertig
129	w	1,5	negativ	negativ
130	m	2,5	negativ	<b>positiv</b>
131	m	10	negativ	<b>positiv</b>
132	w	8	negativ	negativ
133	w	5	negativ	negativ

m=männlich; w=weiblich;

## **IX. DANKSAGUNGEN**

Für die Überlassung des Themas, die allzeit gewährte freundliche Unterstützung und hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit sowie für die geduldige und konstruktive Korrektur und ständige Diskussionsbereitschaft möchte ich mich ganz besonders bei PD Dr. Monika Rinder bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Kurt Pfister bedanke ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seine stets freundliche und motivierende Unterstützung.

Frau Dr. Y. Gall, Herrn Dr. J. Hirzmann sowie den Mitarbeiterinnen des Routinelabors des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie danke ich ganz herzlich für die stets freundliche und hilfreiche Betreuung der Laborarbeit.

Besonderer Dank gilt Frau D. Friz sowie allen Mitarbeitern der Lega Pro Animale in Castel Volturno, Italien für das aufwändige Sammeln der zahlreichen Blutproben sowie den Transport des Probenmaterials nach München.

Bei Herrn Dr. J. Pohl und allen Tierärzten möchte ich mich für ihre Bemühungen und das Einsenden von Blutproben bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Dr. M.E. Mylonakis, Universität Thessaloniki, Griechenland für die freundliche Bereitstellung von Probenmaterial.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie für ihre stets freundschaftliche und unterstützende Art sowie für die herzliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie sowie meinen Freunden, die immer für mich da waren und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

