

**Aufreinigung von *Anaplasma phagocytophilum*
aus Zellkultur unter Verwendung von
„rock tumbler grit“**

von Thu Phong Justus Nguyen Trong

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

Aufreinigung von *Anaplasma phagocytophilum* aus Zellkultur
unter Verwendung von „rock tumbler grit“

von Thu Phong Justus Nguyen Trong
aus Meiningen

München 2019

Aus dem Veterinärmedizinischen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Nicolai T. Siegel

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

Für meine Eltern

„Nichts auf dieser Welt, das es sich zu haben lohnt, fällt einem in den Schoß.“

-

Dr. Robert Kelso (Scrubs)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Ätiologie.....	3
1.1.	Taxonomie.....	3
1.2.	Morphologie, Entwicklungsformen und allgemeine Eigenschaften	4
1.3.	Zellinvasion und Kolonisation	7
2.	Epidemiologie	9
2.1.	Lebenszyklus und vektorielle Übertragung.....	9
2.2.	Wirte und Reservoir	11
2.3.	Verbreitung der Infektion.....	14
3.	Klinische Ausprägung der granulozytären Anaplasrose	16
3.1.	Humane granulozytäre Anaplasrose (HGA)	16
3.2.	Granulozytäre Anaplasrose der Haussäugetiere	18
3.2.1.	Canine granulozytäre Anaplasrose (CGA).....	18
3.2.2.	Feline granulozytäre Anaplasrose (FGA).....	18
3.2.3.	Equine granulozytäre Anaplasrose (EGA)	19
3.2.4.	Granulozytäre Anaplasrose bei domestizierten Wiederkäuern	19
4.	Diagnostik und Therapie	20
5.	Kultivierung von <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	24
5.1.	<i>In-vivo</i> -Kultivierung im Mausmodell.....	24
5.2.	<i>In-vitro</i> -Kultivierung in Zellkulturen	26
5.2.1.	Anzucht in Zeckenzelllinien.....	26
5.2.2.	Anzucht in eukaryotischen Zelllinien	28
5.2.3.	Aufreinigung von <i>Anaplasma phagocytophilum</i> aus Zellkultur	30
III.	PUBLIKATION	33
IV.	DISKUSSION	39
1.	Herausforderungen bei der Anzucht von <i>Anaplasma phagocytophilum</i> in Zellkultur.....	40

2.	Strukturelle Besonderheiten und Aufreinigung von <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	43
V.	ZUSAMMENFASSUNG	49
VI.	SUMMARY	51
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	53
VIII.	ANHANG	76
IX.	DANKSAGUNG	822

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AML	Akute Myeloische Leukämie	IgG	Immunglobulin G
ATCC	American Type Culture Collection	IL	Interleukin
BCE	bovine corneal endothelial cells	LPS	Lipopolysaccharide
BHQ-1	Black Hole Quencher 1	msp	major surface protein
CD	cluster of differentiation	MVEC	microvascular endothelial cells
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	NADPH	Nicotinamidadenin- dinukleotidphosphat
CGA	canine granulocytic anaplasmosis	O ₂ ⁻	Superoxidanion
Ct	cycle threshold	P	Passage
DC	dense-cored cells	PAMP	pathogen associated molecular pattern
DIC	Differentialinterferenz- kontrast	PCR	polymerase chain reaction
DMSO	Dimethylsulfoxid	PMN	polymorphnuclear cells
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	PRP	peptidoglycan- recognition-proteins
DNA	desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure	PRR	pattern-recognition- receptors
EGA	equine granulocytic anaplasmosis	PSGL-1	P-Selektin- Glykoproteinligand-1
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	RC	reticulate cells
FACS	fluorescence-activated cell sorting	RF	rhesus monkey fibroblasts
FGA	feline granulocytic anaplasmosis	RNA	ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
FKS	Fetales Kälberserum	ROCK-1	Rho-associated protein kinase-1
HGA	human granulocytic anaplasmosis	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
HIV	human immunodeficiency virus	SCID	severe combined immunodeficiency
HL-60	human promyelocytic leukemia cell line-60	sLe ^x	sialyl lewis ^x
HMEC-1	human microvascular endothelial cells-1	TBF	tick-borne fever
IFAT	immunofluorescence antibody test	TEM	Transelektronen- mikroskopie
IFN	Interferon	TLR1	toll-like receptor 1

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

- Abbildung 1: *Anaplasma phagocytophilum* DCs und RCs
- Abbildung 2: Geographische Verbreitung von *Ixodes* spp. Zecken als primäre Vektoren von *Anaplasma phagocytophilum*
- Abbildung 3: Lebenszyklus von *Anaplasma phagocytophilum*
- Abbildung 4: Anzahl gemeldeter Fälle von HGA in den USA von 2000 - 2016
- Abbildung 5: Intrazelluläre Darstellung von *Anaplasma phagocytophilum*
- Abbildung 6: *Anaplasma phagocytophilum* in Zeckenzellen
- Abbildung 7: Darstellung einer HL-60-Zellkultur nach Infektion mit *Anaplasma phagocytophilum*
- Abbildung 8: Schematische Darstellung des „syringe lysis“ - Protokolls
- Abbildung 9: Schematische Darstellung des „rock tumbler grit“ - Protokolls
- Abbildung 10: Dichtezentrifugation zur weiteren Aufreinigung von *Anaplasma phagocytophilum*
- Abbildung 11: Expression des PSGL-1-Rezeptors auf der Zelloberfläche
- Tabelle 1: Systematik der Familie Anaplasmataceae

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis Anhang

- Abbildung A1: Erstellung eines externen Standards zur Quantifizierung mittels real-time PCR
- Abbildung A2: Proteinmoleküle zur Erkennung von PAMPs
- Tabelle A1: Relative Quantifizierung und Vergleich der Aufreinigungsprotokolle mittels qPCR
- Tabelle A2: Relative Quantifizierung und Vergleich der Methoden zur Entfernung von Zelldebris
- Tabelle A3: Vorkommen und Wirkung von Proteinmolekülen zur Erkennung von PAMPs
- Tabelle A4: Dokumentation der Infektionsrate von *Anaplasma phagocytophilum* in neuinfizierten HL-60-Zellkulturen
- Tabelle A5: Infektionsprotokoll zur Anzucht von *Anaplasma phagocytophilum*

I. EINLEITUNG

Anaplasma phagocytophilum ist ein weltweit verbreitetes, obligat intrazelluläres Bakterium und gilt als Auslöser der granulozytären Anaplasiose. Der Erreger wird durch Zecken übertragen und kann eine Vielzahl verschiedener Säugetiere infizieren. Klinische Fälle wurden dabei für Hunde, Katzen, Pferde, domestizierte Wiederkäuer und Menschen beschrieben (WOLDEHIWET, 2010). Die humane granulozytäre Anaplasiose (HGA) ist die dritthäufigste durch zeckenübertragene Erkrankung in den USA und in Europa und gilt ebenso in Asien als eine sich ausbreitende Infektionskrankheit (SEVERO et al., 2012). Die klinische Ausprägung einer Infektion mit *A. phagocytophilum* äußert sich dabei meist in unspezifischen Symptomen wie mildem Fieber, Apathie, Leistungsabfall, Gelenks- und Gliederschmerzen, kann jedoch auch mit Komplikationen und einem tödlichen Krankheitsverlauf verbunden sein. Der Erreger ist daher von wachsendem human- und veterinärmedizinischem Interesse, wird in vielen Kliniken aber oft noch durch Zufall diagnostiziert (STUEN et al., 2013a; BAKKEN & DUMLER, 2015).

Die Anzucht von *A. phagocytophilum* in Kultur ist aufgrund der Erregervariabilität und den besonderen morphologischen Eigenschaften mit verschiedenen Herausforderungen verbunden. Im Wirt infizieren die Bakterien vor allem neutrophile Granulozyten. Dabei existieren verschiedene genetische Varianten von *A. phagocytophilum*, welche sich in Pathogenität, Wirtsspezifität und Verbreitung unterscheiden (CHOI & DUMLER, 2003; RIKIHISA, 2011). Für die Diagnostik von HGA und für die *in-vitro*-Kultivierung humanpathogener Stämme werden in der Regel humane promyeloische Leukämiezellen (HL-60) verwendet (CARLYON, 2005; BAKKEN & DUMLER, 2006). Die Vermehrung der Erreger findet innerhalb der Wirtszellen in Membran-gebundenen Vakuolen statt, welche als „Morulae“ bezeichnet werden (CHEN et al., 1994).

Um *A. phagocytophilum* für weiterführende Untersuchungen im Labor verwenden zu können, werden die intrazellulären Bakterien mittels verschiedener mechanischer Methoden aus den Zellkulturen freigesetzt (BORJESSON, 2008). Die Herausforderung besteht dabei die Wirtszellen aufzubrechen und das zerstörte Zellmaterial zu entfernen ohne dabei die Bakterien zu schädigen oder mit zu beseitigen. Im Unterschied zu anderen intrazellulären, Gram-negativen Erregern

besitzt *A. phagocytophilum* nur eine dünne Zellhülle ohne Peptidoglykanschicht und Lipopolysaccharide. Die Bakterien sind daher sehr sensitiv gegenüber mechanischen Stress und osmotischen Belastungen und es müssen spezielle, schonende Techniken verwendet werden um die Erreger aus den Wirtszellen freizusetzen und zu isolieren (LIN & RIKIHISA, 2003; CARLYON, 2005; FELSHEIM et al., 2006).

Ziel dieser Arbeit war es daher ein optimiertes Protokoll für die Aufreinigung von *A. phagocytophilum* aus HL-60-Zellen unter Verwendung einer neuen Methode mithilfe von „rock tumbler grit“ zu testen. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die während der intrazellulären Entwicklung vorliegenden Erscheinungsformen – die „dense-cored cells“ und die „reticulate cells“ – von *A. phagocytophilum* nach Lyse der Wirtszellen intakt erhalten blieben. Der quantitative Vergleich mit der herkömmlichen Methode via „syringe lysis“ ergab, dass mehr Bakterien bzw. bakterielle DNA aus den Wirtszellen durch die Verwendung von „rock tumbler grit“ freigesetzt werden konnte. Infektionsversuche in naiven Zellkulturen bestätigten die *in-vitro*-Infektiösität der isolierten Bakterien. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das „rock tumbler grit“-Protokoll für eine effektive und zuverlässige Aufreinigung von *A. phagocytophilum* aus HL-60-Zellen verwendet werden kann.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Ätiologie

1.1. Taxonomie

Anaplasma phagocytophilum zählt zu der Familie Anaplasmataceae, in der Ordnung Rickettsiales und der Klasse der Alphaproteobacteria (Tabelle 1). Die aktuelle Bezeichnung umfasst dabei die vormalig einzeln geführten Erreger *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagozytophila* und das Agens der humanen granulozytären Ehrlichiose (HGE) als genetisch unterschiedliche Varianten der Spezies *A. phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001).

Seitdem das Krankheitsbild der granulozytären Anaplasmosen 1932 erstmals bei Schafen als „*Tick-borne fever*“ beschrieben wurde (GORDON et al., 1932), kam es mehrfach zu einer Revision der Erreger-Taxonomie (WOLDEHIWET, 2010). Die Umstrukturierung in der Systematik beruhte dabei auf der Morphologie, der Epidemiologie und auf dem klinischen Erscheinungsbild (FOGGIE, 1951, 1962; PHILIP, 1974; OGDEN et al., 1998). Die aktuelle Klassifizierung von *A. phagocytophilum* erfolgt seit dem Jahr 2001 anhand phylogenetischer Untersuchungen basierend auf den Gensequenzen der 16S RNA und des groESL-Operon (DUMLER et al., 2001). Aufgrund der genetischen Variabilität zwischen verschiedenen Stämmen von *A. phagocytophilum* sind Analysen des Gesamtgenoms von unterschiedlichen Isolaten Bestandteil weiterer phylogenetischer Untersuchungen (DUNNING HOTOPP et al., 2006; BARBET et al., 2013). Dabei erfolgt auch ein erweiterter Vergleich mit neuen Gensequenzen von Mitgliedern aus der Familie der Anaplasmataceae, um die taxonomische Einordnung zu verfeinern und anzupassen. (DUNNING HOTOPP et al., 2006; DUGAT et al., 2014).

Tabelle 1: Systematik der Familie Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001)

Anaplasmataceae			
<i>Anaplasma</i> (A.)	<i>Ehrlichia</i> (E.)	<i>Wolbachia</i> (W.)	<i>Neorickettsia</i> (N.)
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>E. canis</i>	<i>W. pipientis</i>	<i>N. risticii</i>
<i>A. platys</i>	<i>E. ewingii</i>		<i>N. sennetsu</i>
<i>A. bovis</i>	<i>E. chaffeensis</i>		<i>N. helminthoeca</i>
<i>A. marginale</i>	<i>E. muris</i>		
<i>A. centrale</i>	<i>E. ruminantium</i>		
<i>A. ovis</i>			

1.2. Morphologie, Entwicklungsformen und allgemeine Eigenschaften

Die Mitglieder der Gattung *Anaplasma* sind obligat intrazelluläre, Gram-negative Bakterien und parasitieren in zytoplasmatischen Vakuolen im haematopoetischen Gewebe sowie in reifen und unreifen Zellen der der myeloiden Reihe (RAR & GOLOVLJOVA, 2011). Zu dieser Gruppe gehört auch die Spezies *A. phagocytophilum*, welche durch einen starken Zelltropismus zu neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist. Die Erreger sind unbeweglich und besitzen ein pleomorphes Erscheinungsbild. Innerhalb der Wirtszellen ist die Darstellung der Bakterien aufgrund des geringen Kontrasts zum Zytoplasma mittels Gram-Färbung nur schwer möglich. Zur Färbung der intrazellulär angesammelten Bakterien wird daher meist die Wright- oder Giemsa-Romanowsky-Färbung verwendet (CARLYON, 2005; DUMLER et al., 2007). Die Membran-gebundenen Vakuolen im Zytoplasma mit *A. phagocytophilum* färben sich dabei dunkelblau bis lila und erhalten ein maulbeeren-ähnliches Aussehen (Kapitel 5.2.2., Abb. 7). Dieses charakteristische Erscheinungsbild der angesammelten Bakterien führte zu der Bezeichnung „Morulae“ (vom lateinischen Wort „*morum*“ für Maulbeere) (CHEN et al., 1994; RIKIHISA, 2011). Diese basophile Struktur besitzt in der Regel einen Durchmesser von 1,5 – 2,5 µm und kann aber auch eine Größe von bis zu 6 µm erreichen (POPOV et al., 1998). Infizierte Zellen in Kultur enthalten in der Regel zwischen einer und fünf „Morulae“ mit einer durchschnittlichen Anzahl von 19-20 Organismen pro Vakuole (YOSHIIIE et al., 2000). Mittels Diff-Quick-Färbung können diese Erregeransammlungen auch im Blutausstrich sichtbar sein, lassen sich lichtmikroskopisch jedoch nicht von „Morulae“ von *Ehrlichia ewingii* unterscheiden (ISMAIL et al., 2010). Eine weitere Differenzierung sollte daher epidemiologisch und zur Bestätigung mittels PCR erfolgen.

Während der intrazellulären Entwicklung lassen sich elektronenmikroskopisch zwei morphologische Erscheinungsformen von *A. phagocytophilum* unterscheiden (Abb. 1). Die kleinere, kokkoide Form besitzt eine Größe von 0,2 - 2,0 μm und ein dichtes Nukleoid („electron dense-cored cell“, DC). Die größere, pleomorphe Form umfasst eine Größe von 0,7 - 2,0 μm und besitzt ein Nukleoid mit retikulärer Struktur („reticulate cell“, RC). Die genaue pathobiologische Funktion der DCs und RCs während der Infektion im Wirt ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In Zellkulturen wurde jedoch experimentell gezeigt, dass die DCs die vermeintliche infektiöse Form ist und in naive Wirtszellen eindringen kann. Vor Untergang der Wirtszelle und Freisetzung der Anaplasmen erfolgt die Kondensation der RCs in die DCs und damit die erneute Umstrukturierung in die infektiöse Form. Die Entwicklung von *A. phagocytophilum* läuft innerhalb der Vakuolen synchron. Die Geschwindigkeit zur Umstrukturierung der DCs und RCs kann sich zwischen den „Morulae“ jedoch unterscheiden. Eine Fusion der zytoplasmatischen Inklusionen wie bei anderen obligat intrazellulären Erregern, wie z.B. *Ehrlichia chaffeensis* oder *Chlamydia pneumoniae* wurde bei *A. phagocytophilum* nicht beobachtet.

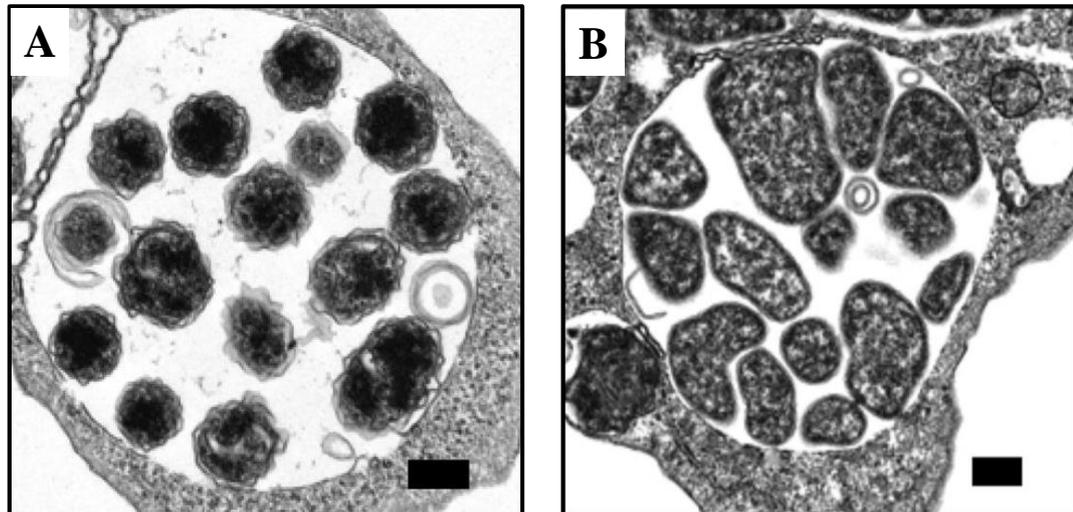


Abbildung 1: *Anaplasma phagocytophilum* DCs und RCs

Modifiziert nach Troese und Carlyon (TROESE & CARLYON, 2009)

[A] Intrazytoplasmatische Vakuole mit “dense cored cells” und [B] “reticulate cells” in einer HL-60-Zelle. Skalierungsbalken 0,5 μm .

Sowohl die DCs als auch die RCs von *A. phagocytophilum* werden jeweils von zwei dünnen Membranen umgeben, was in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar wird (POPOV et al., 1998). Durch die Struktur der inneren glatten Membran und der äußeren geriffelten Membran entsteht ein periplasmatischer Spalt mit variierender Größe (RIKIHISA, 2011). Im Gegensatz zu anderen Gram-negativen Bakterien besitzt *A. phagocytophilum* keine Peptidoglykanschicht oder Lipopolysaccharide (LPS) (RIKIHISA, 1991; RIKIHISA et al., 1997). Dies ermöglicht eine Form angepasste Entwicklung in den räumlich begrenzten Vakuolen und bietet zudem Schutz vor spezifischen Erkennungsmechanismen des Immunsystems des Wirtes (OTTEN et al., 2018). Die Peptidoglykanschicht und die LPS als Bestandteil der bakteriellen Zellwand enthalten charakteristische molekulare Strukturen, welche von den Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt werden und als Folge eine Entzündungsreaktion zur Erregerelimination auslösen (Anhang, Abb. A1). Diese pathogen-assoziierten molekularen Muster (engl. *pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) sind in vielen Mikroorganismen konserviert und kommen nicht in der Zellhülle eukaryotischer Zellen vor (SUKHITHASRI et al., 2013; NEYEN & LEMAITRE, 2016). Zur Identifizierung dieser Struktur motive exprimieren neutrophile Granulozyten auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren (engl. *pattern-recognition-receptors*, PRR), zu denen auch die Toll-like-Rezeptoren gezählt werden (TAKEDA et al., 2003; RIKIHISA, 2006). Zusätzlich können die PAMPs über unterschiedliche Proteine (engl. *peptidoglycan-recognition-proteins*, PRP) des Immunsystems detektiert werden (Anhang Tabelle A3) (OTTEN et al., 2018). Nach Bindung der PRR und PRP kommt es zu einer Immunantwort, welche die Aktivierung reaktiver Sauerstoffverbindungen, die Fusion von Lysozymen, die Freisetzung von Chemo- und Zytokinen, sowie verschiedener Signaltransduktions-Kaskaden zur Aktivierung der Autophagie und der Zellapoptose, beinhaltet (RIKIHISA, 2006; EKMAN & CARDELL, 2010). *A. phagocytophilum* kann diesen Mechanismen zur mikrobiellen Abwehr aufgrund der fehlenden Synthese einer Peptidoglykanschicht und LPS entkommen (RIKIHISA, 2010). Proteom-Analysen infizierter HL-60-Zellen zeigten sogar ein durch *A. phagocytophilum* verursachte Herunterregulierung von spezifischen Toll-like-Rezeptoren (TLR1) (LIN & RIKIHISA, 2003). Diese strukturelle Besonderheit der bakteriellen Zellhülle geht jedoch ebenfalls mit einer hohen Empfindlichkeit gegenüber mechanischen Belastungen und osmotischen Veränderungen einher. Als

Kompensationsmechanismus entwickelte *A. phagocytophilum* die Fähigkeit Cholesterin in die Zellhülle einzubauen um die strukturelle Integrität aufrecht zu erhalten (LIN & RIKIHISA, 2003). Trotzdem müssen spezielle, schonende Techniken, für die Isolierung der Erreger aus der Zellkultur für verschiedene Untersuchungen angewendet werden (Kapitel 5.2.3.).

1.3. Zellinvasion und Kolonisation

A. phagocytophilum besitzt einen ausgeprägten Zelltropismus zu phagozytierenden Zellen, speziell zu neutrophilen Granulozyten (CHOI et al., 2005). Die Erreger sind jedoch ebenfalls in der Lage eosinophile Granulozyten, Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, sowie Endothelzellen zu infizieren (KLEIN et al., 1997; BAYARD-MC NEELEY et al., 2004; WOLDEHIWET, 2010). *In-vitro*-Studien haben gezeigt, dass *A. phagocytophilum* in humane Mikroendothelzellen (HMEC-1) eindringen und sich dort vermehren kann (MUNDERLOH et al., 2004). Zudem wurde beobachtet, dass es bei der Co-Inkubation mit polymorphkernigen Leukozyten (engl. polymorphnuclear cells, PMN) zu einer direkten Übertragung der Erreger auf neutrophile Granulozyten kommt (HERRON et al., 2005). Daher wird vermutet, dass Endothelzellen als Reservoir für die Vermehrung und für die Verbreitung von *A. phagocytophilum* dienen können. Die Aufnahme der Erreger in die Wirtszelle erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endozytose (GOODMAN et al., 1999; HERRON et al., 2000). In humanen neutrophilen Granulozyten und promyeloischen Leukämiezellen (HL-60) erfolgt die Bindung über das Tetrasaccherid sialyl lewis^x (sLe^x) des P-Selektin-Glykoproteinliganden-1 (PSGL-1). Dabei kommt es gleichzeitig zur Phosphorylierung der Effektor kinase Rho-Kinase 1 (ROCK-1), ein Schlüssel-molekül bei der Organisation der Aktinfilamente (THOMAS & FIKRIG, 2007). Am Ende dieser Signalkaskade beginnt die Umstrukturierung des Zytoskeletts, welche das Eindringen und die Etablierung des Erregers in der Wirtszelle erleichtert (RIKIHISA, 2011). Bei der spezifischen Bindung an Oberflächenrezeptoren wurden jedoch große wirtsabhängige Unterschiede beobachtet. So wurde in einem Mausmodell eine PSGL-1 unabhängige Infektion beschrieben (CARLYON et al., 2003). Dies ist eine Erklärung warum die verschiedenen genetischen Varianten eine unterschiedliche Wirtsspezifität aufweisen können. Stämme von *A. phagocytophilum*, welche nicht humanpathogen sind können daher nicht oder nur sehr schwer in den routinemäßig verwendeten HL-60-Zellen kultiviert werden (CARLYON et al., 2003; MASSUNG et al., 2007).

Die Replikation der Erreger innerhalb der Wirtszellen erfolgt in den Membran-gebundenen, zytoplasmatischen Vakuolen (SEVERO et al., 2012). Durch aktive Modulation wirtseigener, membranassoziierter Proteine werden Nährstoffe für die Entwicklung und Vermehrung zur Verfügung gestellt. So wurde gezeigt, dass die Proteine APH_1387 und APH_0032 sich während der Zellkolonisation an die Vakuole anlagern, dabei jedoch nicht über das Typ-IV-Sekretionssystem der Bakterien selbst sekretiert werden (HUANG et al., 2010a; HUANG et al., 2010b). Die Teilung und Vermehrung der Erreger führt zu einer Ausdehnung der Vakuolen im Zytoplasma, wobei eine Fusion mit Lysosomen und damit die Reifung zum Phagolysosom durch Beeinflussung der bakteriellen Proteinsynthese verhindert wird (WEBSTER et al., 1998; GOKCE et al., 1999; MOTT et al., 1999). Gleichzeitig kommt es zur Stimulation der IL-8 Produktion zur Rekrutierung von Granulozyten, welche nach Zellyse und Freisetzung der Erreger als naive Wirtszellen dienen und ein neues Ziel für die bakterielle Infektion darstellen (AKKOYUNLU et al., 2001; RIKIHISA, 2010).

Neutrophile Granulozyten stellen primäre Effektorzellen des Immunsystems zur mikrobiellen Abwehr dar (COHEN, 1994; TAKEDA et al., 2003). Für das intrazelluläre Überleben hat *A. phagocytophilum* verschiedene Strategien zur Etablierung der Infektion entwickelt. Da neutrophile Granulozyten eine kurze Lebenszeit besitzen (Halbwertszeit 6 - 7 h im Blut, Überlebensdauer 24 - 48 h im Gewebe) verzögert *A. phagocytophilum* über verschiedene Mechanismen die Apoptose (YOSHIIIE et al., 2000; CARLYON & FIKRIG, 2003; SCAIFE et al., 2003). Damit ist ein längerer Zeitraum für die Vermehrung der Erreger gewährleistet. Weiterhin wird die Bildung von toxischen Sauerstoffverbindungen, welche einen wichtigen Abwehrmechanismus bilden, eingeschränkt (WIENJES & SEGAL, 1995; WANG et al., 2002). Dabei wird über das bakterielle Protein Anka im Zellkern die Transkription von Komponenten der NADPH-Oxidase (gp91phox, rac2) inhibiert (CARLYON et al., 2002; GARCIA-GARCIA et al., 2009). Dies führt zu einer reduzierten Bildung von Superoxid-Anionen (O_2^-) in den Neutrophilen (WANG et al., 2002). Bei einer Infektion mit *A. phagocytophilum* wurde zudem gezeigt, dass es zu einer Verringerung der Phagozytoseaktivität und der Motilität der Granulozyten kommt (GARYU et al., 2005). Durch den Verlust spezifischer Selektine, wie des L-Selektinliganden (CD62L) auf der Zelloberfläche der Neutrophilen wird das Anhaften am Endothel und die Integrin-vermittelte

Transmigration erschwert (CHOI et al., 2003). Die Verringerung der Diapedese und der Neutrophilenmigration im entzündlichen Gewebe führt wiederum zu einer Inhibition der Zellaktivität im Rahmen der Entzündungskaskade, was die Etablierung von *A. phagocytophilum* innerhalb des Wirtes erleichtert (SCHAFF et al., 2010; SEVERO et al., 2012).

2. Epidemiologie

2.1. Lebenszyklus und vektorielle Übertragung

Der Lebenszyklus von *A. phagocytophilum* umfasst die Entwicklung und Vermehrung des Erregers in Zecken, welche als Vektoren fungieren, sowie die Reproduktion in empfänglichen Wirtstieren, welche wiederum als Reservoir für eine erneute Infektion dienen (RIKIHISA, 2011).

Die Übertragung von *A. phagocytophilum* erfolgt durch Schildzecken des *Ixodes persulcatus*-Komplexes (STUEN et al., 2013a). In Europa gilt *I. ricinus* als Hauptvektor, in den USA *I. pacificus* und *I. scapularis* und in Asien *I. persulcatus* (Abb. 2) (WOLDEHIWET, 2010). Auch in Spezies andere Zeckengattungen wurde DNA von *A. phagocytophilum* nachgewiesen, die Vektorkompetenz konnte jedoch bisher nur für Spezies der Gattung *Ixodes* in verschiedenen Studien bewiesen werden (TELFORD et al., 1996; DES VIGNES et al., 1999; ZEIDNER et al., 2000; TEGLAS & FOLEY, 2006). Die Aufnahme der Bakterien von infizierten Wirten erfolgt während einer Blutmahlzeit mit anschließender Invasion von Zellen des Mitteldarmepithels (TELFORD et al., 1996). Experimentell wurde gezeigt, dass eine Übertragung auf naive Larven innerhalb von 24 h nach Anheftung an infizierten Mäusen stattfinden kann (DES VIGNES et al., 2001). Nach initialer Vermehrung in den Darmepithelzellen gelangt der Erreger zu den sekretorischen Endstücken (Acinus) der Speicheldrüsen, über die es zu einer erneuten bakteriellen Übertragung von der Zecke auf einen Wirt während der Blutaufnahme kommen kann (TELFORD et al., 1996; FELEK et al., 2004).

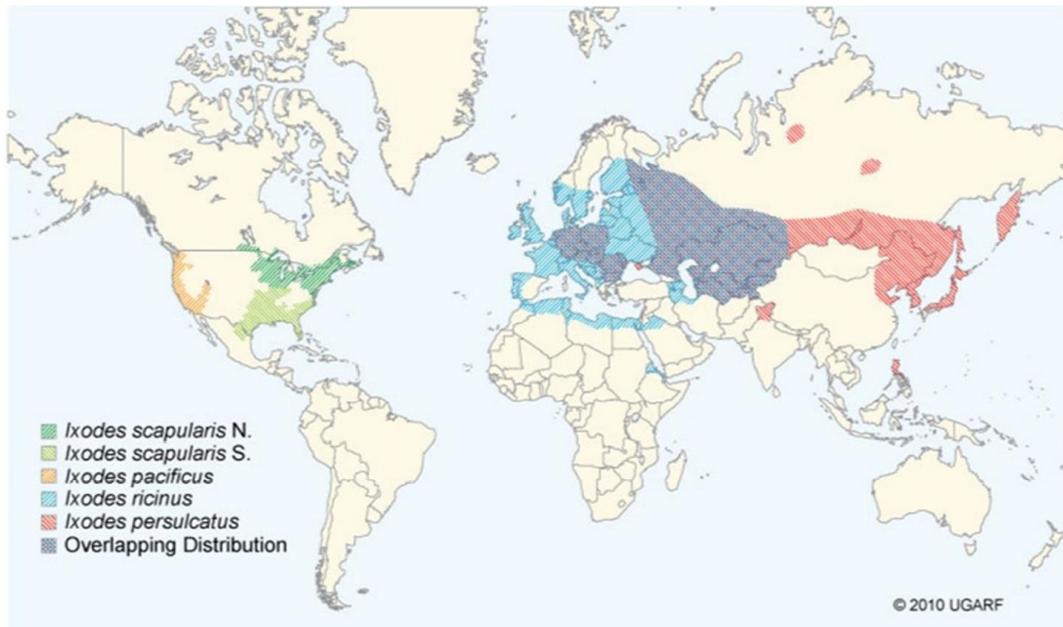


Abbildung 2: Geographische Verbreitung von *Ixodes* spp. Zecken als primäre Vektoren von *Anaplasma phagocytophilum*

Modifiziert nach Greene (GREENE, 2012)

Infizierte Zecken sind in der Lage 24 - 48 h nach Anheftung die Erreger auf den Wirt zu übertragen (HODZIC et al., 1998a; KATAVOLOS et al., 1998; DES VIGNES et al., 2001). In den Zecken bleibt *A. phagocytophilum* während der Blutaufnahme enthalten und überdauert die transtadiellen Entwicklung (TELFORD et al., 1996; OGDEN et al., 1998). Eine transovarielle Übertragung konnte mit Ausnahme von *Dermacentor albipictus* (BALDRIDGE et al., 2009) noch nicht nachgewiesen werden (DUNNING HOTOPP et al., 2006). Zwei experimentelle Studien berichteten eine Übertragung von *A. phagocytophilum* zwischen Zecken bei gleichzeitiger Blutmahlzeit auf einem naiven Wirt („Co-feeding“), dieser Übertragungsweg gilt jedoch als sehr selten (LEVIN & FISH, 2000; OGDEN et al., 2003). *Ixodes* spp. können sich nach Schlupf aus den Eiern in jeder Phase der Entwicklung infizieren, während die Übertragung des Erregers auf neue Wirte durch Nymphen und Adulte erfolgt (DUGAT et al., 2015). Die höchsten Infektionsraten wurden dabei in adulten Zecken nachgewiesen. Dies begründet sich damit, dass durch mehrere Blutmahlzeiten eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht die Erreger aufzunehmen (STUEN et al., 2013a). Da es nicht zu einer generationsübergreifenden Weitergabe der Bakterien kommt, kann sich keine persistierende Infektion in der Vektorpopulation etablieren und weitere Reservoirs

für *A. phagocytophilum* sind notwendig um den endemischen Zyklus aufrecht zu erhalten (Abb. 3) (DUGAT et al., 2015).

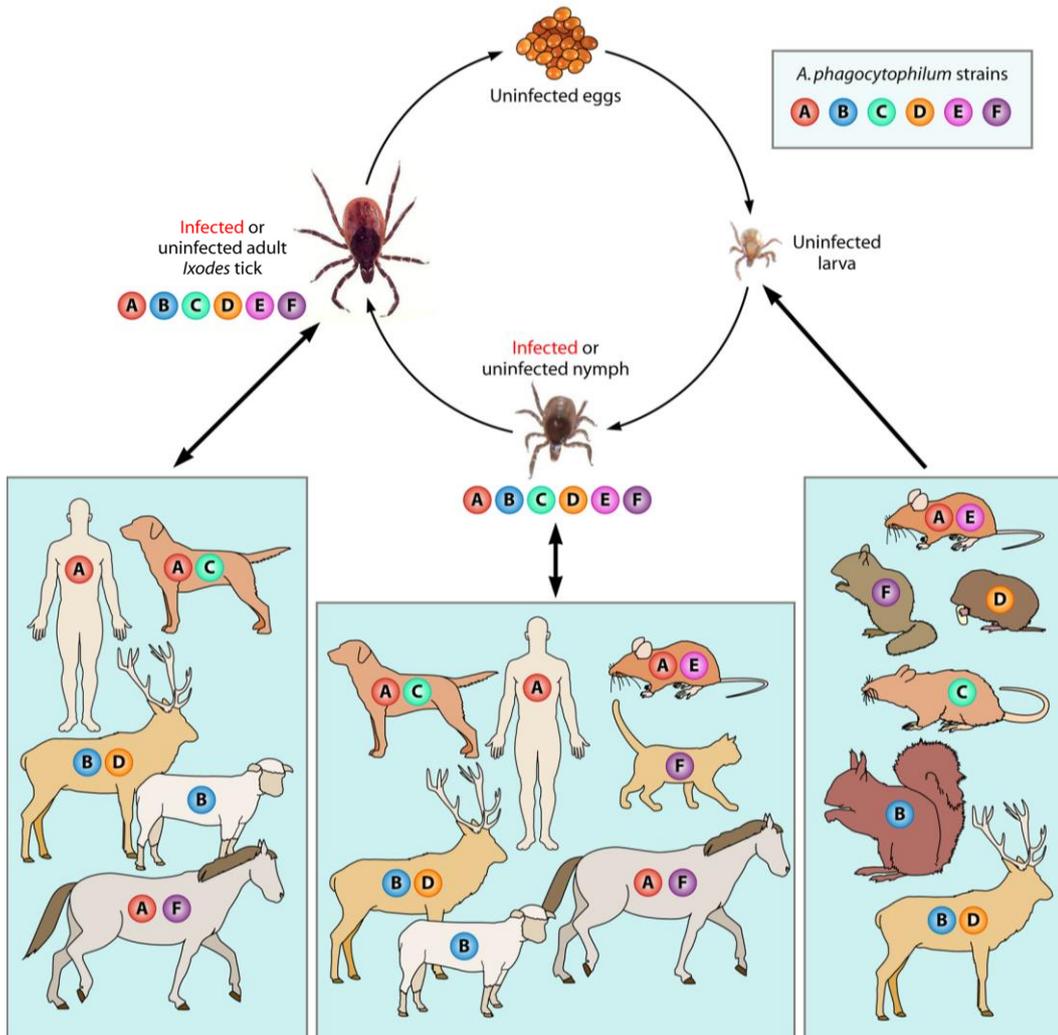


Abbildung 3: Lebenszyklus von *Anaplasma phagocytophilum*

Modifiziert nach Rikihisa (RIKIHISA, 2011)

Die Übertragung von *Anaplasma phagocytophilum* erfolgt in der Zeckenpopulation transstadial, jedoch nicht transovarial. Der Lebenszyklus wird durch die gegenseitige Übertragung zwischen Vektoren und Reservoiretieren aufrechterhalten. Der Mensch ist dabei ein Fehlwirt und kein Bestandteil der natürlichen Verbreitung. In Experimenten mit verschiedenen Stämmen von *Anaplasma phagocytophilum* zeigten sich zusätzlich Unterschiede in der Wirtsspezifität der Erreger und deren Epidemiologie.

2.2. Wirte und Reservoire

A. phagocytophilum kann eine Vielzahl verschiedener Wirbeltiere infizieren (WOLDEHIWET, 2010). Dies steht im direkten Zusammenhang mit der Verbreitung der Vektoren und deren breitem Wirtsspektrum (STANEK, 2009). Die

Reservoirtiere werden durch die Zecken als Blutwirte ausgewählt und somit anschließend für die Replikation und Verbreitung des Erregers genutzt (KAHL et al., 2002; STANEK, 2009). Ein klinisches Krankheitsbild wurde dabei bisher bei Hunden (*Canis lupus familiaris*) (MADEWELL & GRIBBLE, 1982), Katzen (*Felis catus*) (BEAUFILS, 1997), Pferden (*Equus caballus*) (GRIBBLE, 1969; MADIGAN & GRIBBLE, 1987), Lamas (*Lama glama*) (BARLOUGH et al., 1997), Ziegen (*Capra aegagrus hircus*) und Schafen (*Ovis gmelini aries*) (GORDON et al., 1940) und in Rindern (*Bos taurus*) in Europa beschrieben (HUDSON, 1950; ENGVALL et al., 1996). Auch humane Infektionen mit *A. phagocytophilum* wurden bereits diagnostiziert (CHEN et al., 1994), der Mensch gilt allerdings als Fehl- bzw. Endwirt, da es über ihn nicht zu einer Verbreitung der Infektion kommt (AGUERO-ROSENFELD et al., 1996; RIKIHISA, 2011).

Eine große Bedeutung als natürliches Reservoir für *A. phagocytophilum* spielen wildlebende Wiederkäuer. In Asien, Europa und in den USA wurden in vielen verschiedenen Spezies spezifische Antikörper gegen *A. phagocytophilum* nachgewiesen (STUEN et al., 2013a). In den USA gelten dabei Weißwedelhirsche (*Odocoileus virginianus*) (MASSUNG et al., 2005) und in Europa das Rotwild (*Cervus elaphus*) (STUEN et al., 2013b) sowie Rehe (*Capreolus capreolus*) (SILAGHI et al., 2011b) als Hauptquellen zur Übertragung und Verbreitung des Erregers in der Zeckenpopulation (STUEN et al., 2013a). In einer Studie wurde experimentell bewiesen, dass im Rotwild eine Infektion mit *A. phagocytophilum* über mehrere Monate persistieren und es in diesem Zeitraum zu einer erneuten Infektion naiver Zecken kommen kann (STUEN et al., 2001). In endemischen Gebieten stellen Nagetiere, wie Ratten, Waldmäuse, Spitzmäuse, Wühlmäuse, Eichhörnchen und Streifenhörnchen, eine zweite große Gruppe dar in denen *A. phagocytophilum* nachgewiesen wurde (STUEN et al., 2013a). Im Osten und mittleren Westen der USA zählen die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*), die Dunkelfußholzratte (*Neotoma fuscipes*) (NICHOLSON et al., 1998) und das Grauhörnchen (*Sciurus griseus*) (NIETO & FOLEY, 2008) als wichtige Reservoirtiere für *A. phagocytophilum*. So wurde in der Weißfußmaus u.a. die human-pathogene Variante Ap-ha identifiziert (MASSUNG et al., 2003a). In Europa konnte bereits in über neun verschiedenen Nagetier-Spezies die DNA von *A. phagocytophilum* nachgewiesen werden. Die Seroprävalenzen waren jedoch geringer als die in wildlebenden Wiederkäuern (STUEN et al., 2013a). Als wahrscheinliche natürliche

Reservoirre gelten die Rötelmaus (*Myodes glareolus*), die Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) (LIZ et al., 2000; STUEN et al., 2013a). In vereinzelt Studien wird zudem die epidemiologische Bedeutung von Füchsen (*Vulpes vulpes* und *Urocyon cinereoargenteus*) (HULÍNSKÁ et al., 2004; GABRIEL et al., 2009), Bären (*Ursus arctos* und *Ursus americanus*) (DRAZENOVICH et al., 2006; VÍCHOVÁ et al., 2010), Wildschweinen (*Sus scrofa*) (HULÍNSKÁ et al., 2004), verschiedenen Insektivoren (SKUBALLA et al., 2010; BOWN et al., 2011) sowie Reptilien (NIETO et al., 2009) und Vögeln (DE LA FUENTE et al., 2005) diskutiert. Die nachgewiesenen Prävalenzen von *A. phagocytophilum* lagen bei diesen Tierspezies teilweise auf einem vergleichbaren Niveau mit denen der Wildwiederkäuer und Nagetiere. Die Daten reichten jedoch nicht aus, um genaue Rückschlüsse zu ziehen und sie als Reservoirre identifizieren und definieren zu können (STUEN et al., 2013a).

Innerhalb der Spezies *A. phagocytophilum* existieren verschiedene genetische Varianten, welche sich in Verbreitung, Vektorspezifität, Wirtstropismus und Pathogenität unterscheiden können (DUGAT et al., 2015). Diese Stämme zirkulieren in komplexen epidemiologischen Zyklen, welche vernetzt oder unabhängig voneinander auftreten (RIKIHISA, 2011). Das Vorkommen unterschiedlicher Ökotypen erklärt, warum klinisch bestätigte Fälle von Infektionen mit *A. phagocytophilum* in Rindern bisher nur in Europa, jedoch noch nicht in den Vereinigten Staaten diagnostiziert wurde (DUGAT et al., 2015). Zudem wurde eine geographische Diskrepanz zwischen dem Auftreten von Infektionen bei Menschen, Hunden und Pferden und der Verbreitung der Reservoirtiere beobachtet. Dies ist ebenfalls auf die Zirkulation unterschiedlicher Varianten von *A. phagocytophilum* in endemischen Gebieten zurückzuführen (FOLEY et al., 2008). In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass Hunde, Pferde und Menschen vom gleichen Stamm infiziert werden konnten (DUGAT et al., 2015), auf der anderen Seite ein equines Isolat jedoch nicht pathogen für Rinder war (STANNARD et al., 1969). Über den Vergleich der 16S RNA wurden in den USA die Stämme Ap-V1 und Ap-ha zwischen weiteren Varianten identifiziert (CHEN et al., 1994). Beide Ökotypen treten im gleichen geographischen Areal auf und können von den gleichen Vektoren übertragen werden (COURTNEY et al., 2003). Die Untersuchungen zeigten jedoch, dass Ap-ha pathogen für Menschen ist, während Ap-V1 nicht mit humanen Infektionen in Verbindung gebracht werden

konnte (DUGAT et al., 2015). Zudem wurde für Ap-V1 der Weißedelhirsch und für Ap-ha die Weißfußmaus als natürliches Reservoir bestimmt (MASSUNG et al., 2005; REICHARD et al., 2009). In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, dass Ap-V1 Ziegen und Rehe, aber keine Mäuse infizieren kann (MASSUNG et al., 2003b; MASSUNG et al., 2005; MASSUNG et al., 2006a). Diese Unterschiede im Wirtsspektrum zeigte sich ebenfalls auf zellulärer Ebene. So konnten beide Stämme in Zeckenzellkulturen (ISE6, IDE8) isoliert werden (MUNDERLOH et al., 1999; MASSUNG et al., 2007). Die Kultivierung in HL-60-Zellen war jedoch nur für den Ap-ha erfolgreich (GOODMAN et al., 1996; MASSUNG et al., 2007) - weitere Möglichkeiten der Kultivierung sind im Kapitel 5.2. beschrieben. Um die epidemiologischen Zusammenhänge der genetischen Varianten von *A. phagocytophilum* weiter aufzuklären, werden verschiedene Methoden für die molekulargenetische Analyse verwendet. Neben den herkömmlichen Methoden wie Pulsfeldgelelektrophorese, „Single/Multi Locus Sequenz Typing“ und „Variable Number Tandem Repeat“ werden nun auch Vollgenomanalysen verwendet (DUMLER et al., 2003; BOWN et al., 2007; DARK et al., 2012). Dabei besteht die Schwierigkeit *A. phagocytophilum* in Vorfeld zu kultivieren und aufzureinigen, um eine Verunreinigung mit Wirtszell-DNA zu vermeiden. Um die Sequenzierung zu vereinfachen wird an weiteren Strategien gearbeitet, um Vollgenomanalysen von *A. phagocytophilum* auch aus Feldproben durchführen zu können (DUGAT et al., 2014).

2.3. Verbreitung der Infektion

Die Verbreitung von *A. phagocytophilum* folgt der geographischen Verteilung der infizierten Wirte und der *Ixodes* spp. als primäre Vektoren. Die Ausbreitung endemischer Gebiete in der nördlichen Hemisphäre oder in neue geographische Regionen ist verbunden mit einer Vergrößerung des Lebensraums, bedingt durch klimatische, ökologische und landschaftliche Veränderungen. Dies ist assoziiert mit einem Anstieg der Gesamtpopulation von natürlichen Reservoiren bzw. empfänglichen Wirten und kompetenten Vektoren (STUEN et al., 2013a). In einer deutschen Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass es durch den Anstieg der durchschnittlichen Temperatur im Winter, hervorgerufen durch die globale Erwärmung, zu einer Vermehrung der Nagetierpopulation und damit zu einer Intensivierung des Infektionszyklus zwischen Wirt und *A. phagocytophilum* kommt (HARTELT et al., 2008). Des Weiteren wird von Rehen und Rotwild eine große

Anzahl an Zecken über längere Distanzen transportiert (VOR et al., 2010) und somit zu einer Verbreitung des Pathogens beigetragen. Die Vermehrung und Verbreitung von *Ixodes scapularis* in den USA führte zu einem Anstieg an Lyme-Borreliose Fällen und wird in gleichem Maße mit der Ausbreitung von *A. phagocytophilum* in Verbindung gebracht (SONENSHINE & ROE, 1993). Dabei wiesen die Antikörper-Seroprävalenzen gegen *A. phagocytophilum* in Wirtstieren starke Schwankung auf, welche auf eine unterschiedliche Zeckenexposition zurückzuführen sind (STUEN et al., 2013a). In Europa wurde eine erweiterende geographische Reichweite der Spezies *Ixodes ricinus*, sowie die Besiedlung von höher gelegenen Regionen beschrieben (MATERNA et al., 2005). Auch der internationale Handel von Haustieren wie Hunden und Katzen, sowie der globale Transport von Schafen und Rindern werden als Gründe für die Entstehung neuer endemischer Gebiete diskutiert (STUEN et al., 2013a). Ebenso stehen Zugvögel in Verdacht infizierte Zecken über weite Strecken zu transportieren und in Lebensräume zu verteilen. Die direkte Beteiligung von Vögeln am Infektionszyklus als Anaplasmen-Reservoir für die Infektion von Zecken wird von vielen Wissenschaftlern kritisch diskutiert (ALEKSEEV et al., 2001; OGDEN et al., 2008; HILDEBRANDT et al., 2010). Die größte Bedeutung bei der Verbreitung von Infektion mit *A. phagocytophilum* bei Menschen und bei Tieren spielen die Zecken des *Ixodes-persulcatus*-Komplexes, nach Aufnahme des Erregers von natürlichen Reservoiren (WOLDEHIWET, 2010). Darüber hinaus wurde 2008 in China eine nosokomiale Übertragung von *A. phagocytophilum* berichtet, nachdem mehrere Personen direkten Kontakt mit Blut und respiratorischen Sekreten eines an HGA erkrankten Patienten hatten (ZHANG et al., 2008). In den USA entwickelten drei Personen eine granulozytäre Anaplasiose nach Kontakt mit infiziertem Rotwildblut während einer Schlachtung. Bei keinem der drei Patienten wurde von einer vorangegangenen Zeckenexposition in der Anamnese berichtet (BAKKEN et al., 1996b). Weiterhin kann es über Bluttransfusionen zu einer Verbreitung der Infektion kommen (HOROWITZ et al., 1998; SAINZ et al., 2015). Aufgrund des reduzierten Gesundheitszustandes bei einer Indikation für eine Transfusion können die Infektionen mit *A. phagocytophilum* auch tödlich verlaufen (GOEL et al., 2018). In experimentellen Studien wurde weiterhin gezeigt, dass eine transplazentale Infektion bei Kühen möglich ist und mit Totgeburten, Aborten in der späten Phase der Trächtigkeit und klinisch apparenten Infektionen bei neugeborenen Kälbern einhergeht (CRANWELL & GIBBONS, 1986; PUSTERLA et al., 1997).

3. Klinische Ausprägung der granulozytären Anaplasiose

Die granulozytäre Anaplasiose ist eine nicht kontagiöse, vektorübertragene Krankheit, welche eine Vielzahl verschiedener Wirte infizieren kann (DUGAT et al., 2015). Sie wird durch eine Infektion mit *A. phagocytophilum* ausgelöst und verläuft meist latent und ohne Ausprägung klinischer Symptome. Abhängig von der Wirtspezies, dem Gesundheits- und Immunstatus, sowie dem Erregerstramm kann es zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen kommen (DUMLER et al., 2007; GREENE, 2012). Eine Persistenz von *A. phagocytophilum* wurde zudem in Rotwild, Hunden, Pferden und Wiederkäuer beschrieben (FOGGIE, 1951; EGENVALL et al., 2000; FRANZÉN et al., 2009; STUEN et al., 2013a). Die Bakteriämie ist bei Hunden, Pferden und Menschen in der Regel nur von kurzer Dauer (< 28 Tage), wodurch bei diesen Wirten nur eine geringe Wahrscheinlichkeit der Weitergabe des Erregers an kompetente Vektoren besteht (BAKKEN & DUMLER, 2008; GREENE, 2012).

3.1. Humane granulozytäre Anaplasiose (HGA)

Eine Infektion mit *A. phagocytophilum* verläuft beim Menschen meist subklinisch. Symptome bei der humanen granulozytären Anaplasiose treten in der Regel 7 - 14 Tage nach Zeckenstich auf (MCFEE, 2018). Das klinische Bild präsentiert sich als eine fieberhafte Allgemeinerkrankung mit einem üblicherweise selbstlimitierenden Verlauf. Grippeähnliche Symptome wie eine erhöhte Körpertemperatur, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Muskel- und Gliederschmerzen, Übelkeit und ein allgemeines Unwohlsein stehen dabei im Vordergrund (BAKKEN et al., 1994; DUMLER et al., 2007). Zu den am häufigsten auftretenden laborparametrischen Veränderungen zählen Thrombozytopenie, Leukopenie, Anämie, und ein Anstieg der Aspartat- und Aminotransferaseaktivität (BAKKEN & DUMLER, 2008). Bei Patienten mit Immunsuppression – als besondere Risikofaktoren gelten HIV-Infektionen, Krebsbehandlungen, Blut- und Organtransfusionen – kann es zu einem schwerwiegenden bis lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf mit Organversagen kommen (BAKKEN & DUMLER, 2015). In den USA wurde dabei ein stetiger Anstieg der gemeldeten Krankheitsfälle beobachtet mit bis zu 4151 Erkrankten im Jahre 2016 (Abb. 4) (BAKKEN & DUMLER, 2006; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018a).

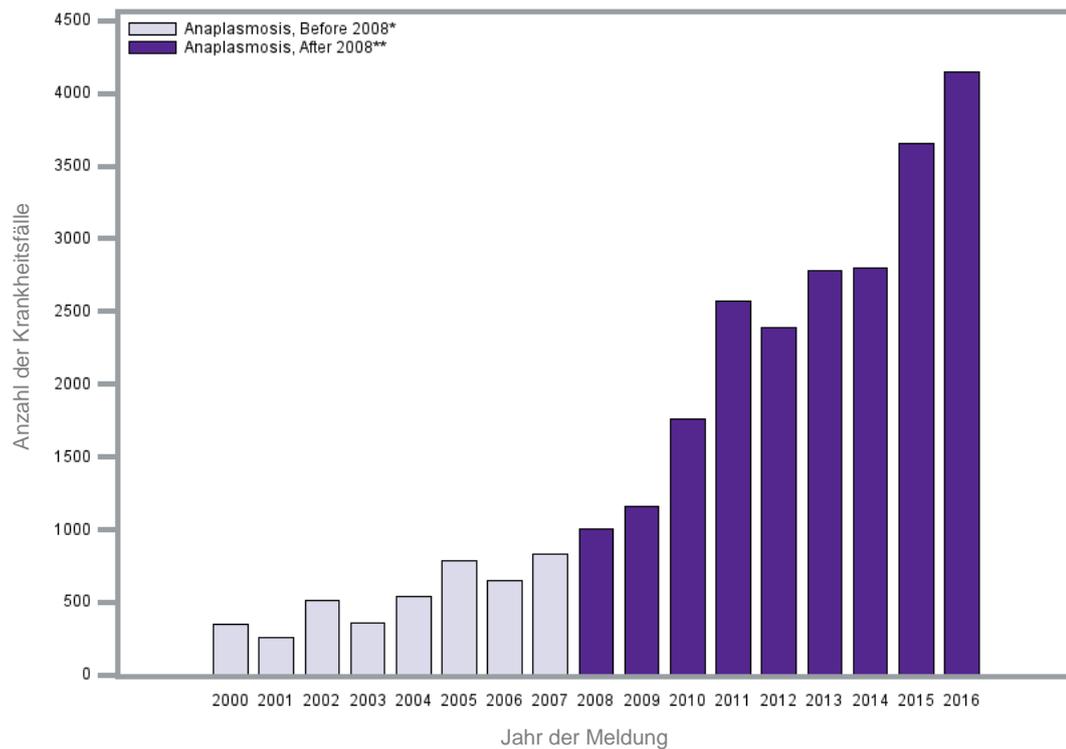


Abbildung 4: Anzahl gemeldeter Fälle von HGA in den USA von 2000 - 2016 :

Modifiziert nach Centers for Disease Control and Prevention - CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018a)

Im Jahre 2000 wurde *Anaplasma phagocytophilum* in den USA meldepflichtig und ein stetiger Anstieg der Fallzahlen ließ sich seitdem beobachten. Die Anzahl an Krankheitsfällen stieg zwischen 2015 und 2016 um 14 %.

* Bis 2008 wurde die Anaplasrose als humane granulozytäre Ehrlichiose gelistet.

** Ab 2008 erfolgte die Kategorisierung als humane granulozytäre Anaplasrose

Dabei stieg die Inzidenzrate innerhalb von 10 Jahren (von 2000 bis 2010) von 1,4 auf 6,1 Krankheitsfälle pro eine Million Personen. Eine Hospitalisationsrate von 36 % wurde berichtet und bei 3 % aller klinisch erkrankten Personen kam es zu lebensbedrohlichen Komplikationen. Die Sterblichkeitsrate betrug dabei unter 1 % (DUMLER, 2012). Eine persistierende Infektion mit einem chronischen Krankheitsverlauf ist beim Menschen nicht beschrieben (BAKKEN & DUMLER, 2015). In Europa sind bislang nur wenige Fälle dokumentiert – der letzte beschriebene Fall war im Jahr 2013, ein Patient nach einem Wanderurlaub in Schottland (HAGEDORN et al., 2014; RKI, 2014). Die geringe Inzidenzrate der HGA in Europa kann auf die unterschiedliche Pathogenität und Verbreitung der Erregerstämme zurückgeführt werden, gleichzeitig aber auch durch eine fehlende oder nicht standardisierte Diagnostik verschuldet sein.

3.2. Granulozytäre Anaplasrose der Haussäugetiere

3.2.1. Canine granulozytäre Anaplasrose (CGA)

Die meisten Hunde, welche sich mit *A. phagocytophilum* infizieren, zeigen nur selten eine klinische Ausprägung. Bei immunkompetenten Tieren kommt es in der Regel zu einem selbstlimitierten Krankheitsverlauf (CARRADE et al., 2009). Die Mehrzahl der Hunde mit CGA zeigt ein unspezifisches klinisches Bild mit Fieber, Anorexie, Lethargie und Lahmheit (GREIG et al., 1996; EGENVALL et al., 1997; KOHN et al., 2008). Seltener ist das Krankheitsbild zusätzlich durch Erbrechen, Durchfall, Hämorrhagien, Polydipsie/Polyurie, Lymphadenomegalie, Splenomegalie oder respiratorischen Symptomen charakterisiert (GREIG & ARMSTRONG, 2006; KOHN et al., 2008). In vereinzelt Fällen wurden neurologische Störungen und propriozeptive Defizite beschrieben, diese konnten nach experimentellen Infektionen allerdings nicht nachgewiesen werden (JÄDERLUND et al., 2007; JÄDERLUND et al., 2009). Im Hinblick auf labordiagnostische Parameter kann es zu einer Thrombozytopenie, Lymphopenie, Eosinopenie, einer milden bis mittelgradigen normochromen Anämie, Hypoalbuminämie und einer Erhöhung der alkalischen Phosphatase kommen (EGENVALL et al., 1997; FRANZÉN et al., 2005; POITOUT et al., 2005). Krankheitsfälle mit tödlichem Ausgang wurden nur sehr selten beschrieben und waren dabei mit weiteren klinischen Vorerkrankungen assoziiert (HEINE et al., 2007; STUEN et al., 2013a). In experimentell infizierten Hunden konnte ebenfalls keine chronische Ausprägung der Klinik beobachtet werden (EGENVALL et al., 2000; CARRADE et al., 2009).

3.2.2. Feline granulozytäre Anaplasrose (FGA)

Eine Disposition für *A. phagocytophilum* wurde bei Katzen erstmals in einem Infektionsversuch nachgewiesen (LEWIS et al., 1975). In der Praxis wurden bisher nur wenige Fälle von FGA beschrieben. Die klinischen Anzeichen umfassten dabei Anorexie, Lethargie, Hyperästhesie, Konjunktivitis, Lahmheit, Myalgien und eine Beeinträchtigung der Bewegungskoordination (EGENVALL et al., 1997; BJOERSDORFF et al., 1999; COHN, 2003; HEIKKILA et al., 2010). Im Blutbild konnte dabei eine Thrombozytopenie und Leukopenie bestimmt werden (ADASZEK et al., 2013). Die FGA zeigt in der Regel ebenfalls einen milden Verlauf ohne Todesfolge (LITTLE, 2010).

3.2.3. Equine granulozytäre Anaplasiose (EGA)

Die EGA kann subklinisch oder klinisch apparent mit einer Inkubationszeit von 1 - 3 Wochen verlaufen (DZIEGIEL et al., 2013). Der Krankheitsverlauf und die Ausprägung der klinischen Anzeichen sind dabei abhängig vom Alter und Immunstatus des Pferdes sowie von der Dauer der Erkrankung (MADIGAN & GRIBBLE, 1987). Bei jüngeren Pferden stehen unspezifische Symptome wie Inappetenz und Bewegungsunlust im Vordergrund. Adulte Pferde mit einem Alter von 3 - 4 Jahren zeigen vorrangig Fieber, Apathie, Anorexie, reduzierte Bewegung verbunden mit einem steifen Gang, Lahmheit und schmerzhafte Ödeme an den Gliedmaßen (MADIGAN & PUSTERLA, 2000; SILAGHI et al., 2011a). Obwohl das kardiale System bei einer Anaplasmeninfektion nur geringfügig betroffen ist konnten ventrikuläre Extrasystolen und ventrikuläre Tachykardien bei der EGA beobachtet werden (SILAGHI et al., 2011a; ADASZEK et al., 2013). Krankheitsfälle mit tödlichen Verlauf können durch die Beteiligung sekundäre Infektionen oder durch Verletzungen bedingt durch Beeinträchtigung der Koordination auftreten (PUSTERLA & MADIGAN, 2013). Charakteristische hämatologische Veränderungen wie Thrombozytopenie, Leukopenie und Anämie können während der akuten Phase der Infektion auftreten (DZIEGIEL et al., 2013). In trächtigen Stuten wurden keine Aborte beobachtet (STUEN et al., 2005).

3.2.4. Granulozytäre Anaplasiose bei domestizierten Wiederkäuern

Die Infektion von domestizierten Wiederkäuern in Europa mit *A. phagocytophilum* tritt meist saisonal auf und ist als Zeckenbissfieber (engl. *tick-borne fever*, TBF), oder unter dem Namen Weidefieber bekannt (GORDON et al., 1940; WOLDEHIWET, 1983). Nach einer Inkubationszeit von ca. 3 - 7 Tagen treten hohes Fieber, Apathie, eine reduzierte Futteraufnahme und eine verminderte Gewichtszunahme auf (TUOMI, 1967; STUEN et al., 2003). Bei laktierenden Kühen kommt es zu einem raschen Abfall in der Milchleistung (HUDSON, 1950). Die Ausprägung der klinischen Anzeichen ist abhängig vom Alter und Immunstatus der Tiere. Die meisten Infektionen verlaufen subklinisch oder mit schwach ausgeprägten klinischen Veränderungen (FOGGIE, 1951; STUEN et al., 1998). Schwere Krankheitsverläufe treten besonders dann auf, wenn immunologisch naive Tiere in endemische Gebiete (Weiden mit einem hohen Zeckenaufkommen) verbracht werden (STUEN et al., 2013a). Es wurden Aborte bei Kühen im 8. oder 9. Monat sowie bei Mutterschafen beobachtet (STUEN, 2006; STUEN et al.,

2013a). Bei Böcken wurde eine reduzierte Fruchtbarkeit berichtet (BRODIE et al., 1986). Respiratorische Symptome wie Husten, Nasenausfluss, Tachypnoe und Dyspnoe können durch sekundäre Infektionen in Folge einer Immunsuppression hervorgerufen werden (STUEN et al., 2003; WOLDEHIWET, 2006). Eine Erregerpersistenz von bis zu 2 Jahren wurde beschrieben (ROLLE & MAYR, 2011).

4. Diagnostik und Therapie

Für die Diagnosestellung der granulozytären Anaplasmose müssen die Informationen der Anamnese, die Erkenntnisse aus der klinischen Untersuchung und aus den Laborergebnissen analysiert und in Zusammenhang mit den Testergebnissen zum Nachweis des Erregers interpretiert werden (AGUERO-ROSENFELD, 2002). Unter Berücksichtigung dieser Faktoren sind die diagnostischen Kriterien für die Bestätigung einer Infektion mit *A. phagocytophilum*: (1) der Nachweis von „Morulae“ in neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten in Kombination mit einem positiven Antikörper-Nachweis, (2) ein 4-facher Anstieg der spezifischen IgG-Antikörper innerhalb von 4 Wochen, (3) ein positives PCR-Testergebnis oder (4) die Isolation des Erregers in Zellkultur (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018b). Der Nachweis von „Morulae“ in den Granulozyten kann nur in der akuten Phase der Infektion erfolgen. Dazu werden Blutaussstriche nach Romanowsky- oder Giemsa-Färbung lichtmikroskopisch untersucht (WOLDEHIWET, 1987; BAKKEN et al., 1994; AGUERO-ROSENFELD et al., 1996). Die basophilen, intrazellulär angesammelten Bakterien färben sich dunkelblau bis lila und erhalten so ihr charakteristisches Maulbeeren-ähnliches Aussehen (Abb. 5) (FOGGIE, 1951; CHEN et al., 1994). Die Färbung und Untersuchung von Blutaussstrichen sind eine sehr schnelle und die kostengünstigste Methode für einen direkten Nachweis der Erreger. Ein negatives Ergebnis schließt jedoch eine Infektion nicht aus (BAKKEN & DUMLER, 2006; CARRADE et al., 2009).

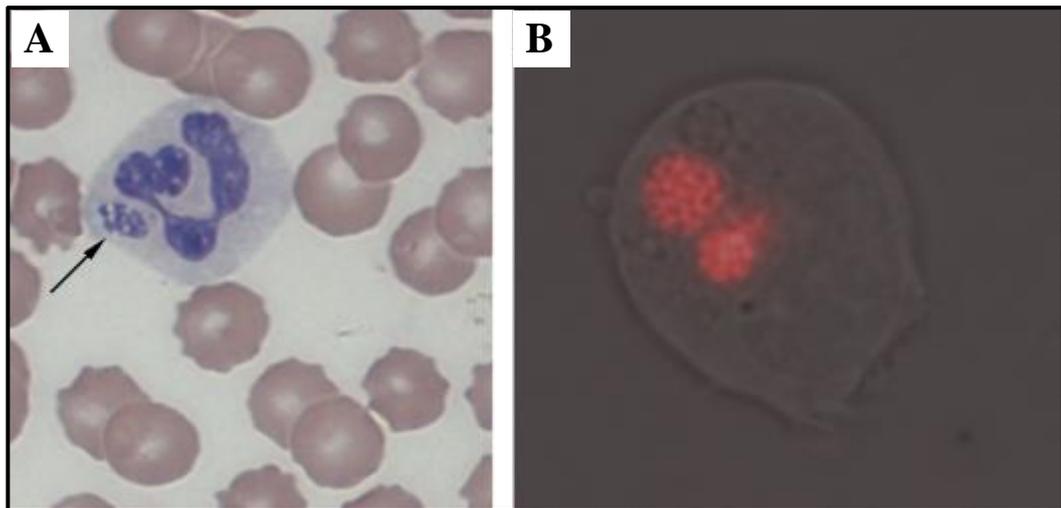


Abbildung 5: Intrazelluläre Darstellung von *Anaplasma phagocytophilum*

Modifiziert nach Carrade (CARRADE et al., 2009)

[A] Caniner neutrophiler Granulozyt mit „Morulae“, Blutausstrich nach Giemsa-Wright-Färbung. [B] Darstellung von mCherry-transformierten *Anaplasma phagocytophilum* mittels Immunfluoreszenz.

Bei Untersuchung von humanen oder caninen Blutproben aus endemischen Gebieten der Lone-Star-Zecke (*Amblyomma americanum*) muss zudem beachtet werden, dass die typischen „Morulae“ von *A. phagocytophilum* lichtmikroskopisch nicht von den zytoplasmatischen Einschlusskörperchen von *Ehrlichia ewingii* unterschieden werden können. Eine Differenzierung mittels PCR muss daher zur Sicherung der Diagnose durchgeführt werden (CARRADE et al., 2009; GREENE, 2012). Über den Nachweis von spezifischen Antikörpern kann indirekt ein Erregerkontakt bestätigt und die Diagnosestellung unterstützt werden (AGUERO-ROSENFELD, 2002). Zu einer ersten Serokonversion kommt es üblicherweise 6 - 8 Tage nach Erregerexposition (EGENVALL et al., 1998; PUSTERLA et al., 1999). Mittels eines Immunfluoreszenztest (immunofluorescence assay, IFAT) können die Antikörper quantitativ bestimmt werden (MAGNARELLI et al., 2001). Ein positiver Antikörperspiegel bestätigt einen Erregerkontakt, bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass der Patient unter einer klinischen Anaplasmosis leidet, da Antikörper von einer vorherigen Infektion mit *A. phagocytophilum* über einen längeren Zeitraum persistieren können (EGENVALL et al., 1997; EGENVALL et al., 2000). Zur Bestätigung einer aktiven Infektion muss daher eine zweite Messung des Antikörperspiegels erfolgen. Ein Anstieg des Titers um das Vierfache innerhalb von 4 Wochen wäre für ein akutes Infektionsgeschehen charakteristisch (BAKKEN

et al., 2002). Bei der quantitativen Antikörperbestimmung mittels IFAT können Kreuzreaktionen zwischen *A. phagocytophilum* und *E. chaffeensis* auftreten (AGUERO-ROSENFELD, 2002). Diese können über einen Immunoblot differenziert werden. Eine weitere Möglichkeit für ein Erreger-Screening bietet ein ELISA-Schnelltest (SNAP 4Dx Plus, IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, USA). Dieser beruht auf dem qualitativen Nachweis der spezifischen Antikörper gegen das Hauptoberflächenprotein msp2/p44. Dieser Schnelltest wird in der Praxis häufig eingesetzt und weist bei einem positiven Ergebnis auf einen Erregerkontakt hin (EGENVALL et al., 1997; BOWMAN et al., 2009; GRANQUIST et al., 2010). Dabei kann jedoch nicht zwischen verschiedenen Spezies (z.B. *A. phagocytophilum* und *A. platys*) und zwischen einem akuten oder zurückliegendem Infektionsgeschehen unterschieden werden (BOWMAN et al., 2009).

Zum Nachweis von bakterieller DNA von *A. phagocytophilum* wurden verschiedene PCR-Techniken (konventionelle PCR, Nested- und real-time-PCR) etabliert. Die Primersequenzen wurden dabei meist auf Basis von Genen der 16S RNA, des groESL-Operons und der Hauptoberflächenproteine (msp2, msp4) generiert (CHEN et al., 1994; COURTNEY et al., 2004; ALBERTI et al., 2005). In der akuten Phase der Infektion ist die PCR aus Blut, Knochenmark oder Milz ein sehr zuverlässiges Diagnostikum (WOLDEHIWET, 2006; ADASZEK et al., 2013; BARTH et al., 2014) und in experimentellen Infektionsversuchen war die bereits PCR 6 - 8 Tage vor dem Erscheinen von „Morulae“ im Blut positiv (EGENVALL et al., 1998). Die Sensitivität und die untere Nachweisgrenze (Anzahl an Organismen welche pro Reaktion oder Mikroliter einer Probe detektiert werden können) von veröffentlichten PCR-Techniken unterscheiden sich zwischen den unterschiedlichen Protokollen und zwischen verschiedenen Laboren. Ein negatives PCR-Ergebnis kann daher eine Infektion nicht mit letzter Sicherheit ausschließen (MASSUNG & SLATER, 2003).

Die Isolierung von *A. phagocytophilum* aus Blut kann in Zeckenzelllinien (z.B. IDE8 oder ISE6) oder in einer humanen promyeloischen Leukämiezelllinie (HL-60) erfolgen (GOODMAN et al., 1996; MUNDERLOH et al., 1999). Die Zeckenzelllinien sind geeignet um verschiedene Stämme von *A. phagocytophilum* zu kultivieren und bieten den Vorteil auch Isolate mit einer variablen Wirtsspezifität zu detektieren. Die Anzucht der Erreger in den Zeckenzellen ist jedoch sehr arbeits- und zeitintensiv und kann bis zu mehreren Monaten in Anspruch nehmen und wird

daher meist zur Vermehrung von verschiedenen Stämmen von *A. phagocytophilum* für Infektionsversuche oder zur Charakterisierung des Pathogens verwendet (MUNDERLOH et al., 1996; DYACHENKO et al., 2013). HL-60-Zellen dagegen besitzen eine hohe Wachstumsrate und bieten vor allem humanpathogenen Stämmen von *A. phagocytophilum* als Wirtszellen optimale Bedingungen zur Vermehrung (CARLYON, 2005). Sie wurde als sensitivste Methode zur Sicherung der Diagnose von HGA beschrieben (AGUERO-ROSENFELD, 2002). Die Kultivierung von *A. phagocytophilum* erfolgt in speziell ausgerüsteten Laboren und benötigt erfahrenes Laborpersonal. Aufgrund der langsamen Vermehrung von *A. phagocytophilum* in Zeckenzelllinien und der Limitierung in HL-60 auf humanpathogenen Stämme bzw. Stämme mit zoonotischem Potenzial ist die Erregerisolierung in Zellkultur keine Routinediagnostik in der Veterinärmedizin (CARRADE et al., 2009; WOLDEHIWET, 2010).

Mittel der Wahl zur Behandlung einer granulozytären Anaplasrose sind Doxycyclin sowie Oxytetracyclin speziell beim Pferd (MADIGAN & GRIBBLE, 1987; BAKKEN et al., 1996a). In der Regel kommt es bereits zu einer vollständigen Erholung innerhalb von 7 - 10 Tagen nach Beginn der Therapie (BAKKEN & DUMLER, 2006). Klinische Rezidive nach Behandlungsende und Absetzen der Medikamente sind nicht beschrieben (CARRADE et al., 2009; BAKKEN & DUMLER, 2015). Bei Patienten mit einem Risiko für eine Medikamentenunverträglichkeit kann Rifampin zur Behandlung in Betracht gezogen werden (KLEIN et al., 1997). *In-vitro*-Daten neuer Studien beschreiben nur geringe Empfindlichkeit von *A. phagocytophilum* gegenüber Chloramphenicol. Dies sollte daher nur in Ausnahmefällen verabreicht werden, entgegen früheren Behandlungsempfehlungen zur Vermeidung einer Gelbfärbung der Zähne bei Welpen (Doxycyclin besitzt im Vergleich zu anderen wasserlöslichen Tetrazyklinen ein deutlich verringertes Risiko) (GREENE, 2012). Bei grenzwertigen Nachweisergebnissen in Verbindung mit einer hinweisenden Anamnese und klinischen Anzeichen kann die granulozytäre Anaplasrose auch als Verdachtsdiagnose behandelt werden. Gegen *A. phagocytophilum* sind keine Impfstoffe verfügbar (BAKKEN & DUMLER, 2015).

5. Kultivierung von *Anaplasma phagocytophilum*

Zur Charakterisierung von *A. phagocytophilum* und zur Untersuchung des Krankheitsverlaufes wurde der Erreger erstmals nach Isolierung im Jahr 1996 in Zellkultur und wenig später in einem murinen Tiermodell kultiviert (GOODMAN et al., 1996; HODZIC et al., 1998b). Die Schwierigkeit bei der Anzucht dieses obligat intrazellulären Bakteriums ergibt sich zum einen durch seine Sensitivität gegenüber mechanischem Stress und osmotischen Veränderungen sowie durch die hohe Variabilität der Erregerstämme mit unterschiedlicher Wirtsspezifität. Weiterhin wurde beobachtet, dass es bei längerer Passage des Erregers in Zellkultur und in immunkompetenten Mäusen zu einem sukzessiven Verlust der Infektiosität und Pathogenität kommt wodurch eine *in vivo*-Kultivierung von *A. phagocytophilum* in SCID-Mäusen zur Aufrechterhaltung der Infektiosität notwendig ist (CARLYON, 2005). Für die Aufreinigung des Erregers aus Kultur für weiterführende Untersuchungen im Labor wurden verschiedene Techniken entwickelt, welche jedoch aufwendig oder mit einem hohen apparativen Aufwand verbunden sind (CARLYON, 2005; FELSHEIM et al., 2006).

5.1. *In-vivo*-Kultivierung im Mausmodell

Verschiedene Stämme von Labormäusen haben sich als Modelle etabliert, um die Pathogenese und die Infektionskinetik zu untersuchen (Tabelle 2). *In vivo* können so auf hämatologische Abweichungen und *post mortem* auf histopathologische Veränderungen in Verbindung mit HGA rückgeschlossen werden (CARLYON, 2005). Die Versuchstiere werden durch Zeckenstich oder durch eine peritoneale Erregerinokulation mittels Spritzen mit *A. phagocytophilum* infiziert. Der Infektionsverlauf kann dann über die üblichen Detektionstechniken (Blutausstrich, PCR, Serologie oder erneute Kultivierung) verfolgt und dokumentiert werden (HODZIC et al., 1998b). Bei immunkompetenten Mäusen kommt es in der Regel innerhalb von 3 bis 4 Wochen zu einer vollständigen Erregerelimination. In CD-1 Mäusen mit Exstirpation der Milz konnte eine aktive Infektion bis Tag 60 nach Inokulation nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich dabei ab Tag 30 eine signifikante Abnahme der Gesamterregermenge im peripheren Blut (TELFORD et al., 1996). Daher empfiehlt es sich bei Kultivierung von *A. phagocytophilum* in immunkompetenten Mäusen ein Aliquot mit Blut vor der 4. Woche auf eine naive Maus zu übertragen, um die Infektion aufrecht zu erhalten (CARLYON, 2005).

Tabelle 3: Verwendete Labormausstämme zur Untersuchung von HGA

Modifiziert nach Borjesson und Barthold (BORJESSON & BARTHOLD, 2002)

Mäusestamm	Infektionseigenschaften	Infektionsintervall	Beschreibung
C3H/HeJ	Elimination der Infektion	10 Tage*; 24 Tage†	Unvollständige Aktivierung von Makrophagen
DBA/2	Verlängerung der Infektionsdauer	> 6 Wochen	Experimente meist mit Inzuchtstämmen
CD-1	Elimination der Infektion	10 Tage*	Nicht zuchtverwandte Individuen
CD-1 (nach Splenektomie)	Anstieg und Verlängerung Infektion	> 60 Tage	
C3H/HeN	Elimination der Infektion	10 Tage*; 55 Tage	Experimente meist mit Inzuchtstämmen
C3H/HeN (nach Splenektomie)	Anstieg und Verlängerung Infektion	> 15 Tage‡	
C3H/Smn.ClrHsd/scid	Persistenz der Infektion	Persistent	Starke Immundefizienz
<i>Peromyscus leucopus</i>	Elimination der Infektion	10 Tage*; 14 Tage†	Natürlicher Wirt
BALB/c	Elimination der Infektion	21 Tage*	Experimente meist mit Inzuchtstämmen
BALB/c-Cmkr2	Abnahme der Bakteriämie	7 Tage*	Interleukin-8-Rezeptor (CXCR2) K/O
C57BL/6	Elimination der Infektion	20 Tage†	Experimente meist mit Inzuchtstämmen
B6.129P2-Tcrb	Anstieg und Verlängerung Infektion	> 30 Tage‡	T-Zell-Rezeptor beta/delta K/O, T-Zell-Defizienz
B6.129S2-Igh-6	Anstieg und Verlängerung Infektion	> 30 Tage‡	Immunglobulin (Schwere Ketten) K/O; B-Zell-Defizienz
B6.129S7-rag1	Persistenz der Infektion	Persistent	Rekombination Aktivierender Gene-1 K/O
B6.129Sv-CD11b	Moderater Anstieg Infektion	8 Tage‡	β2-Integrin, CD11b/CD18 (Mac1) K/O
B6.129S7-Ifng	Markanter Anstieg der Infektion	15 Tage†	IFN-Gamma K/O
B6.129P2-Nos2	Abnahme der Infektion	12 Tage†	Induzierte Nitritoxid-Synthase K/O
B6.129S6-Cyb	Keine Unterschiede beobachtbar	12 Tage†	gp91 phox - Gen K/O
B6.129S7-Ifngr	Anstieg der Bakteriämie	12 Tage†	IFN-Gamma-Rezeptor K/O
B6.129S7-IL10	Keine Unterschiede beobachtbar	15 Tage†	Interleukin-10 K/O

*Minimale Infektionsdauer, basierend auf dem lichtmikroskopischen Nachweis von Morulae im Blut

†Minimale Infektionsdauer, basierend auf dem Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

‡Keine weiteren Nachweise ab dem angegebenen Zeitpunkt durchgeführt

Die kontinuierliche Passage in immunkompetenten Mäusen ist jedoch mit einem Verlust der Pathogenität verbunden (HODZIC et al., 1998b). Durch Übertragung und Vermehrung in immundefizienten Mäusen kann die Pathogenität erhalten werden. In Blut von infizierten SCID-Mäusen wurde nach 2 Monaten eine aktiv erhaltene Infektion nachgewiesen. Nach mehrmaliger Passage über einen längeren Zeitraum konnte durch die Übertragung von infiziertem Blut der SCID-Mäuse auf immunkompetente C3H/HeN-Mäuse erneut eine Infektion mit *A. phagocytophilum* verursacht werden (BORJESSON & BARTHOLD, 2002). Am Tag 2 *post infectionem* waren in 2 - 4 % der Neutrophilen „Morulae“ sichtbar, am Tag 7 zum Zeitpunkt des Höhepunktes der Infektion waren in 7 – 13 % der Granulozyten „Morulae“ sichtbar (HODZIC et al., 1998b; CARLYON, 2005). Die Infektionskinetik zwischen SCID-Mäusen und immunkompetenten Mäusen verlief in den ersten 7 Tagen *post infectionem* identisch, danach verblieb der Anteil der

neutrophilen Granulozyten mit bakteriellen Inklusionen bei 7 - 13 %, während es bei den immunkompetenten Mäusen zu einer Abnahme kam (HODZIC et al., 1998b).

5.2. In-vitro-Kultivierung in Zellkulturen

Zellkulturen stellen ideale Systeme dar, um Erreger *in vitro* zu vermehren sowie pathophysiologische Stoffwechselfvorgänge und Erreger-Wirt-Interaktionen auf zellulärer Ebene zu untersuchen (LINDL, 2008; WOLDEHIWET, 2010). *A. phagocytophilum* ist ein herausfordernder Krankheitserreger, welcher sich in Kultur nur in spezifischen Wirtszellen replizieren kann (MUNDERLOH et al., 2004; BORJESSON, 2008). Dabei ist jedoch ein sorgfältiger Umgang mit den infizierten Zelllinien notwendig, da *A. phagocytophilum* sehr sensitiv gegenüber mechanischem Stress und osmotischen Veränderungen ist. So können beispielsweise Verzögerungen beim Einfrieren und Auftauen der Kulturen schon zu einem erhöhten Verlust an Zellen bzw. Erregern führen (RIKIHISA et al., 1997; LIN & RIKIHISA, 2003). Für die Isolierung und Aufreinigung der Bakterien aus Zellkulturen wurden spezielle, schonende mechanische Methoden entwickelt, um die Wirtszellen zu lysieren ohne eine Schädigung der Anaplasmen herbeizuführen (LIN & RIKIHISA, 2003; CARLYON, 2005).

5.2.1. Anzucht in Zeckenzelllinien

Die Etablierung von kontinuierlichen Zeckenzelllinien führte zu einer Vereinfachung der Isolierung und Vermehrung neuer Stämme von *A. phagocytophilum* (Abb. 6) (MUNDERLOH et al., 1994). In Kultur können die Zellen als Monolayer, in Suspension oder in einer Mischung der beiden Formen anwachsen. Zeckenzellen haben eine langsame Wachstumsrate und können über eine lange Dauer ohne Subkultivierung überleben. Sie können zudem pH-Wert-Änderungen und osmolare Schwankungen gut tolerieren, wachsen jedoch schlechter bei kontinuierlicher bzw. anhaltender Zugabe von Bicarbonat, was ebenfalls in geringeren Infektionsraten von *A. phagocytophilum* resultiert (BELL-SAKYI et al., 2007). Die erste erfolgreiche Kultivierung erfolgte unter Verwendung der Zelllinien IDE8 und ISE6, welche aus embryonalen Zellen von *Ixodes scapularis* gezüchtet wurden. Die Kulturen wurden mit Blut von experimentell infizierten Tieren, sowie mit humanpathogenen Erregerstämmen infiziert (MUNDERLOH et al., 1996; MUNDERLOH et al., 1999). IDE8 und ISE6

sind die am häufigsten verwendeten Zelllinien zur Isolierung neuer Stämme von *A. phagocytophilum*. Der Vorteil besteht in der breiten Empfänglichkeit gegenüber den genetischen Varianten von *A. phagocytophilum* mit unterschiedlicher Wirtsspezifität und Epidemiologie (MASSUNG et al., 2006b; DYACHENKO et al., 2013). Die Anzucht und Vermehrung konnte aus Blut von unterschiedlichen Säugetieren als auch direkt aus Zeckengewebe erfolgen/etabliert werden (WOLDEHIWET et al., 2002; MASSUNG et al., 2006b; ZWEYGARTH et al., 2006; SILAGHI et al., 2011b). Ebenfalls konnte *A. phagocytophilum* in Zellen (IRE/CTVM19, IRE/CTVM20) von der in Europa vorkommenden Zeckenspezies *Ixodes ricinus* isoliert und vermehrt werden (PEDRA et al., 2010; DYACHENKO et al., 2013). Aufgrund der hohen Anforderungen an das Nährmedium und der teils über Wochen andauernden Inkubationsperiode hat sich die Anzucht in Zeckenzellen nicht in der Diagnostik etabliert (CARRADE et al., 2009). Die Zelllinien werden jedoch häufig in Experimenten zur Untersuchung der Entwicklung und des Replikationszyklus von *A. phagocytophilum* in Vektoren eingesetzt (MUNDERLOH et al., 1999; RIKIHISA, 2011).

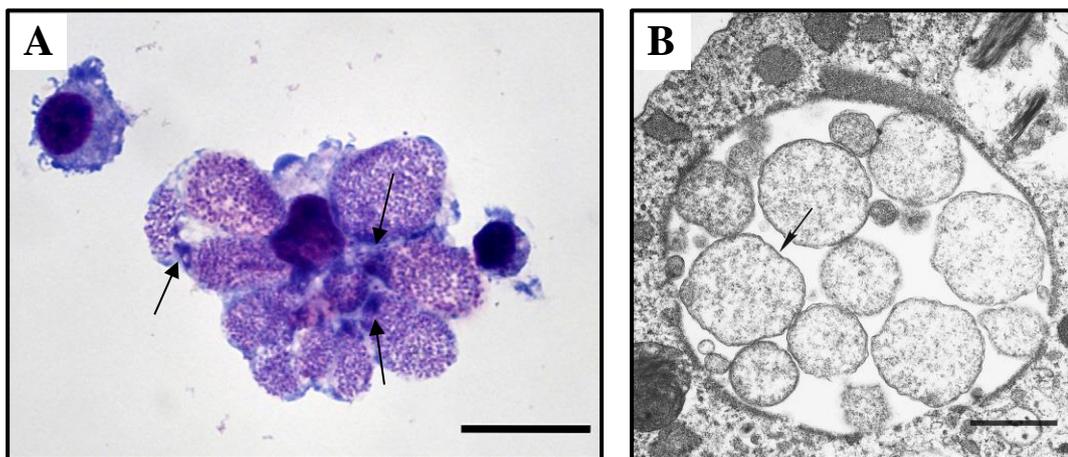


Abbildung 6: *Anaplasma phagocytophilum* in Zeckenzellen

Modifiziert nach Dyachenko et al. (DYACHENKO et al., 2013) [A]

und Munderloh et al. (MUNDERLOH et al., 1996) [B]

[A] Hochgradig infizierte IRE/CTVM20-Zellkultur; Bakterielle Endosomen intrazellulär nach Giemsa-Wright-Färbung erkennbar; Skalierungsbalken 10 μm .

[B] Elektronenmikroskopische Darstellung von *Anaplasma phagocytophilum* (RCs) in einer IDE8-Zelle; Skalierungsbalken 1 μm .

5.2.2. Anzucht in eukaryotischen Zelllinien

A. phagocytophilum besitzt ein breites Wirtsspektrum was sich in der Fähigkeit verschiedene eukaryotischer Zelllinien zu infizieren widerspiegelt. Varianten von HGA- und EGA auslösenden Stämmen wurden in einer humanen promyeloischen Leukämiezelllinie (HL-60) kultiviert sowie in humanen (HMEC-1, MVEC), bovinen (BCE C/D-1b) und von Affen stammenden (RF/6A) Endothelzellen (GOODMAN et al., 1996; MUNDERLOH et al., 2004; WANG et al., 2015). Varianten von TBF auslösenden Stämmen konnten bis jetzt nicht erfolgreich in Kulturen von Säugetierzellen isoliert und repliziert werden (MASSUNG et al., 2006b; WOLDEHIWET, 2010). Aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften und der guten Empfänglichkeit gegen über *A. phagocytophilum* haben sich HL-60-Zellkulturen als Standard für die *in-vitro*-Kultivierung als auch für die kulturelle Diagnostik von HGA etabliert (Abb. 7) (BORJESSON, 2008). HL-60-Zellen sind Promyelozyten, welche aus dem peripheren Blut einer Patientin mit akuter myeloischer Leukämie (AML) isoliert wurden (COLLINS et al., 1977). Leukämiezellen von Patienten mit AML besitzen das Potential einer unbeschränkten Proliferation, jedoch wurde in Kultur oft nur eine kurze Lebensdauer beobachtet, bedingt durch die Abwesenheit spezifischer Wachstumsfaktoren *in vitro*, wodurch es zu einer Einschränkung der Proliferationskapazität in Suspension kommt (GALLAGHER et al., 1979). Im Unterschied dazu wurde bei den HL-60-Zellen nach 3-wöchiger Inkubation in Suspension ein anhaltendes kontinuierliches Wachstum beobachtet werden. Das aktive Wachstum wird zurückgeführt auf die Expression von Transferrin- und Insulinrezeptoren auf der Zelloberfläche, welche eine Schlüsselrolle in der Proliferation einnehmen. In Anwesenheit von Transferrin und Insulin können sich HL-60-Zellen ohne Limitierung in Standardzellkulturmedien (z.B. RPMI-1640) ohne den Zusatz spezieller Wachstumsfaktoren replizieren (COLLINS et al., 1977; COLLINS, 1987). Als Granulozytenvorläuferzellen besitzen sie eine Zellteilungsrate von 36 - 48h und können sich in Abhängigkeit verschiedener Faktoren zu maturen Zellen differenzieren. In Kultur kommt es zu einer spontanen Differenzierung zu reifen Granulozyten, Monozyten oder zu Makrophagen-ähnlichen Zellen von bis zu 5 % der Zellen. Die Differenzierungsrate kann durch eine Überalterung der Kultur (> Passage 60), eine hohe Zelldichte (>1.0 x 10⁶ Zellen/ml) oder durch die Zugabe spezifischer Reagenzien ansteigen (GALLAGHER et al., 1979; COLLINS, 1987). Die Ausdifferenzierung der HL-60-

Zellen zu reifen Granulozyten führt zu einer gesteigerten Empfänglichkeit gegenüber *A. phagocytophilum*, jedoch ebenfalls zu einer Limitation der Zellreplikation (BAYARD-MC NEELEY et al., 2004). Eine sorgfältige Handhabung und eine regelmäßige Kontrolle der infizierten Zellkulturen ist für die Erregervermehrung essentiell. Zudem sollten die Zellen vor Versuchsbeginn auf die Expression des P-Selektin Glykoproteinliganden-1 (PSGL-1) auf der Oberfläche untersucht werden. Dieser dient *A. phagocytophilum* als Rezeptor zur Adhäsion und Eintritt in die Zelle. Bei Verlust oder Rückbildung des PSGL-1 lassen sich keine fortführenden Infektionen mit *A. phagocytophilum* etablieren (Nachweis des PSGL-1-Rezeptors in HL-60-Zellkulturen siehe Diskussion Abb. 11).

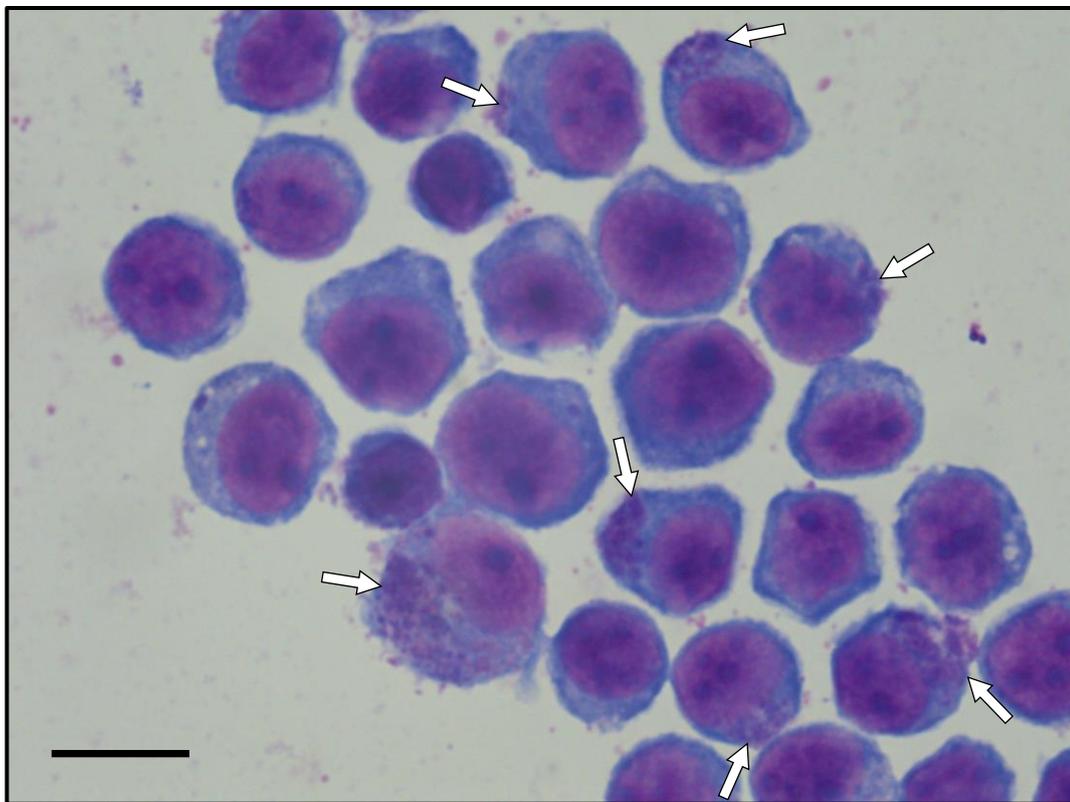


Abbildung 7: Darstellung einer HL-60-Zellkultur nach Infektion mit *Anaplasma phagocytophilum*

Anzucht der HL-60-Zellen in modifizierten RPMI-1640 Medium; Darstellung der intrazellulären „Morulae“ nach Giemsa-Färbung; Skalierungsbalken 10 μm .

5.2.3. Aufreinigung von *Anaplasma phagocytophilum* aus Zellkultur

Für verschiedene *in-vitro*-Applikationen oder Infektionsversuche werden wirtszellfreie Ansätze von *A. phagocytophilum* präpariert. Dazu werden unterschiedliche mechanische Methoden – wie z.B. die Verwendung feiner Kanülen („syringe lysis“; CARLYON, 2005), Ultraschallgeräten (FELSHEIM et al., 2006) oder Gewebehomogenisatoren („Dounce homogenizer“; LIN & RIKIHASA, 2003) – zur Wirtszelllyse eingesetzt. Die Schwierigkeit bei der Aufreinigung besteht darin, die infizierten Zellen zu lysieren ohne die Erreger zu beschädigen und den Zelldebris zu ohne einen Verlust der Bakterien zu entfernen. Ein neuer Ansatz besteht aus der Verwendung eines feinen Mineralsandes („rock tumbler grit“), um die Erreger bzw. Erreger-DNA mittels Reibungskräfte aus den Wirtszellen freizusetzen und anschließender Filtration zur Entfernung von Zellkomponenten (CHENG et al., 2013; WANG et al., 2015). Die Untersuchung der physischen Integrität sowie der Vitalität von *A. phagocytophilum* nach Aufreinigung aus Wirtszellen unter der Verwendung von „rock tumbler grit“ waren Gegenstand der vorliegenden Studie.

Die Verwendung von Spritzen mit feinen, aufgesetzten Kanülen zur Lyse der Wirtszellen und die anschließende Entfernung von Zelldebris mittels verschiedener Zentrifugationsschritte hat sich als ein Standardprotokoll für die Aufreinigung von *A. phagocytophilum* etabliert (Abb.8). Bei dieser als „syringe lysis“ bezeichneten Methode werden 5-ml- oder 10-ml-Spritzen und Kanülen mit einer Größe von 27-G, ½-in (0,4 x 12,7 mm) oder von 25-G, ½-in (0,50 x 12,7 mm) eingesetzt. Die Spritzenkolben werden zunächst entfernt und die Zellsuspension aus den Kulturflaschen mit einer serologischen Pipette übertragen. Nach Wiedereinsetzen des Kolbens wird ein konstanter Druck erzeugt, sodass die Zellkulturflüssigkeit die Kanülen gleichmäßig durchfließt. Beim Durchfluss entstehen Scherkräfte, welche zu einem Aufbrechen der Wirtszellen und zur Freisetzung der Erreger führen. Um einen Großteil der infizierten Zellen zu lysieren muss dieser Vorgang jedoch mehrfach wiederholt werden. Es sollten daher mindestens 4 - 5 Spritzensets im Vorfeld vorbereitet werden. Das Abziehen und Wiederverwenden der Kanülen birgt eine Verletzungs- und Infektionsgefahr, weswegen die Sets nach einmaliger Benutzung entsorgt werden. Ebenso sollte ein retrogrades Aufziehen der Zellsuspension durch die Kanülen vermieden werden, da aufgrund von Verwirbelungen starke, ungerichtete, mechanische Kräfte entstehen, welche zu

einer Schädigung der Bakterien führen können. Nach der Lyse der Wirtszellen erfolgen dann mehrere Zentrifugationsschritte mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (Differentialzentrifugation), um die Erreger von den Zellbruchstücken aufzutrennen und einen Großteil des Zelldebris zu entfernen (CARLYON, 2005; BORJESSON, 2008).

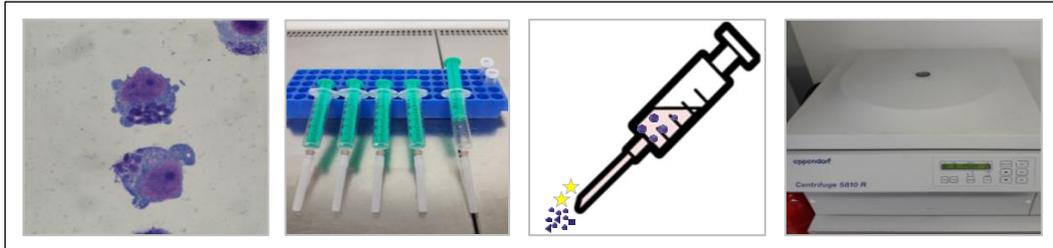


Abbildung 8: Schematische Darstellung des „syringe lysis“-Protokolls

Zellkulturen mit einer Infektionsrate von $> 80\%$ wurden für die Versuche verwendet. Die Lyse der Wirtszellen erfolgt beim mehrmaligen Durchfluss der auf Spritzen aufgesetzten Kanülen. Zellbruchstücke werden im Anschluss mittels Differentialzentrifugation entfernt.

Eine neue Methode unter Verwendung des Silizium-Carbid-Gemisches „rock tumbler grit“ wurde erstmals im Jahr 2013 eingesetzt, um eine größere Menge DNA von *A. phagocytophilum* aus kultivierten Zeckenzellen freizusetzen und um *E. chaffeensis* aus Zeckenzelllinien zu isolieren (CHENG et al., 2013). Die Lyse der Wirtszellen erfolgt dabei durch Reibungskräfte, welche beim Vermischen der infizierten Zellen mit dem „rock tumbler grit“ entstehen. Mittels Vortexmischer wird die Zellsuspension für 1 min. in einem Reaktionsgefäß zusammen mit 100 - 200 μl des feinen Mineralsandes stark durchmischt (Abb. 9). Um eine Schädigung der Erreger durch die entstehende Reibungswärme zu vermeiden, müssen die Proben vorher kurze Zeit auf Eis inkubiert werden. Die Entfernung von Zellbruchstücken erfolgt im Anschluss durch den Einsatz eines Filters. Dieses Protokoll wurde auch bereits für den Einsatz zur Aufreinigung von *A. phagocytophilum* aus HL-60-Zellen übertragen (WANG et al., 2015). Es war jedoch nicht bekannt, ob der Einsatz von „rock tumbler grit“ zur Lyse der Wirtszellen zu einer Schädigung der Erreger, speziell der fragilen RCs führt. Ziel dieser Arbeit war es daher die strukturelle Integrität der DCs und RCs nach der Freisetzung aus den HL-60-Zellen zu überprüfen. Zudem wurde ein quantitativer Vergleich der beiden beschriebenen Methoden angefertigt, um zu bestimmen, ob

das „rock tumbler grit“-Protokoll sich als zuverlässige Methode für die Aufreinigung von *A. phagocytophilum* aus HL-60-Zellen eignet.

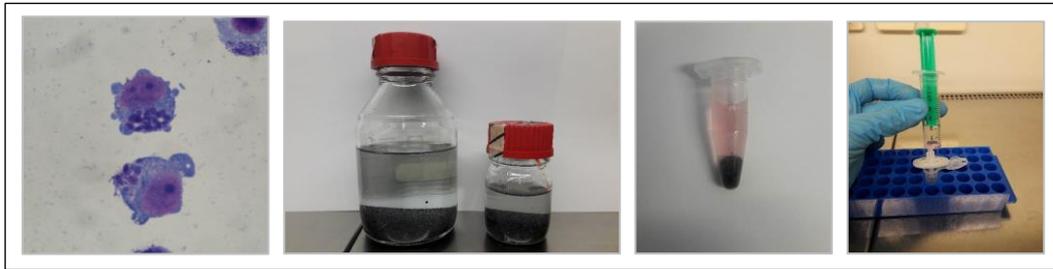


Abbildung 9: Schematische Darstellung des „rock tumbler grit“-Protokolls

Zellkulturen mit einer Infektionsrate von $> 80\%$ wurden für die Versuche verwendet. Die Wirtszellen werden beim Durchmischen der Zellsuspension mit dem Mineralsand aufgebrochen. Im Anschluss erfolgt die Filtration zur Entfernung von Zelldebris.

Für eine hochaufgereinigte Präparation von *A. phagocytophilum* kann anschließend eine Dichtezentrifugation (Ultrazentrifugation) angewendet werden. Dabei erfolgt eine Trennung der Bakterien und der Zellbruchstücke bzw. Zellkomponenten anhand ihrer Masse in unterschiedlichen Schichten (Abb. 10). Diese Ansätze werden für Infektionsversuche zur Gewinnung von Antiserum verwendet, welche eine möglichst geringe Kontamination durch Zellkomponenten der HL-60-Zellen voraussetzen, ebenso wie für die Isolierung von Nukleinsäuren, Proteinen oder Membranbestandteile der Erreger (CARLYON, 2005).

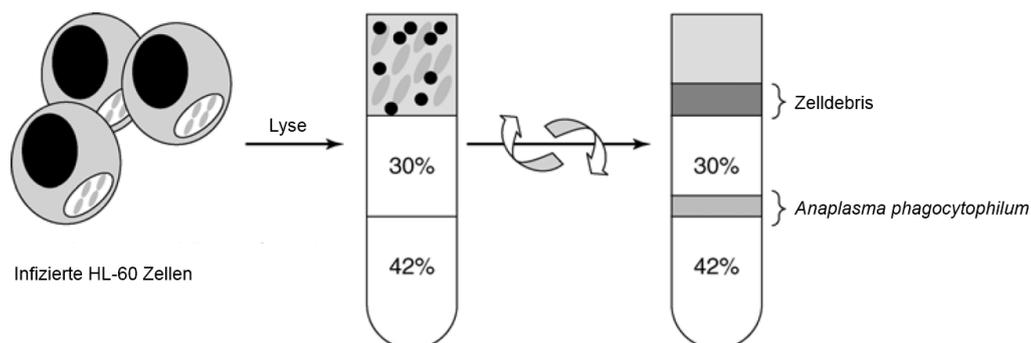


Abbildung 10: Dichtezentrifugation zur weiteren Aufreinigung von

Anaplasma phagocytophilum; Modifiziert nach Carlyon (CARLYON, 2005)

Die Auftrennung der Bakterien und der Zellbruchstücke nach Lyse der Wirtszellen erfolgt über einen Dichtegradienten der durch den Einsatz unterschiedlicher Renografiekonzentrationen erzeugt werden kann.

III. PUBLIKATION

Ticks and Tick-borne Diseases 10 (2019) 280–285



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis

Short communication

Recovering host cell-free *Anaplasma phagocytophilum* from HL-60 cells by using rock tumbler grit in comparison to the syringe lysis methodThu Phong Nguyen Trong^a, Jinyong Wang^b, Monir Majzoub-Altweck^c, Shari Fell^a, Reinhard K. Straubinger^{a,*}^a Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinaerstr. 13, 80539, Munich, Germany^b Department of Microbiology & Immunology Chicago Medical School Rosalind Franklin University of Medicine and Science, 3333 Green Bay Road 2-407, North Chicago, IL, 60064, USA^c Institute of Veterinary Pathology, Center for Clinical Veterinary Medicine Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinaerstr. 13, 80539, Munich, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Anaplasma phagocytophilum
 Mechanical stress
 Rock tumbler grit
 Syringe lysis

ABSTRACT

Anaplasma phagocytophilum (*Ap*) is a tick-transmitted obligate intracellular bacterium and the causative agent of the granulocytic anaplasmosis in various species of domestic animals and in humans. During intracellular development *Ap* transforms from a dense-cored cell form into a reticulate cell form and vice versa. For isolation of intracellular bacteria, a range of different purification methods is used. However, unlike other Gram-negative bacteria *Ap* is considered to be sensitive to mechanical stress and osmolarity changes. An updated semi-purification method using rock tumbler grit is introduced here to increase the outcome of bacteria and to facilitate the procedure of host cell lysis. The objective of this study was to evaluate the structural integrity and infectivity of *Ap* after lysis of the host cells using rock tumbler grit and to compare the outcome to that of the frequently used method, syringe lysis. Human promyelocytic leukemia cell lines (HL-60) were infected with *Ap* and following host cell-free bacteria were assessed by transmission electron microscopy. The outcome of the different purification methods was compared using live/dead-staining based on immunofluorescence to count the number of viable bacteria and real-time PCR to compare the amount of DNA. Subsequently the isolated bacteria were tested to infect naive cell cultures. We observed that both *Ap* dense-cored cells and reticulate cells are preserved intact after the application of rock tumbler grit. The number of viable, host cell-free bacteria was higher by factor 1.7–2.4 compared to the syringe lysis protocol. Quantitative analysis based on real-time PCR showed an increase of bacterial DNA up to 1.6–2.9 times higher using the rock tumbler grit protocol. Bacteria released from the same number of infected host cells were used for new infections. Flow cytometric analysis of the cell cultures confirmed that the number of *Ap* organisms recovered by using the rock tumbler grit protocol resulted in higher infection rates than the number of *Ap* organisms recovered by using syringe lysis protocol. Our observations indicate that the rock tumbler grit protocol can be applied as a safe, robust and convenient method to recover *Ap* compared to syringe lysis.

1. Introduction

Anaplasma phagocytophilum (*Ap*) is a Gram-negative, obligate intracellular bacteria and the causative agent of the granulocytic anaplasmosis (Bakken and Dumler, 2006; Chen et al., 1994). Clinical illness is documented for humans and domestic animals such as dogs, cats, horses and ruminants after transmission of the pathogen from natural hosts by ticks of the *Ixodes persulcatus* complex (Woldehiwet, 2010).

According to the Center of Disease Control and Prevention (CDC), the clinical diagnosis of human granulocytic anaplasmosis (HGA) can be confirmed by PCR, serological evidence of a fourfold change in IgG-specific antibody titer or isolation in culture (Aguero-Rosenfeld, 2002; Centers for Disease Control and Prevention, 2018). For *in vitro* cultivation of *Ap* from infected blood and to maintain the bacteria for laboratory research, a human promyelocytic leukemia cell (HL60) line is routinely used (Goodman et al., 1996). During the proliferation within

* Corresponding author at: Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinaerstr. 13, 80539, Munich, Germany.

E-mail addresses: Trong@lmu.de (T.P. Nguyen Trong), Jinyong.Wang@rosalindfranklin.edu (J. Wang), Majzoub@patho.vetmed.uni-muenchen.de (M. Majzoub-Altweck), S.Fell@lmu.de (S. Fell), R.Straubinger@lmu.de (R.K. Straubinger).

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.001>

Received 31 July 2018; Received in revised form 26 October 2018; Accepted 8 November 2018

Available online 13 November 2018

1877-959X/ © 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

host cells, the bacteria accumulate in vacuoles, the so called “morulae” (Popov et al., 1998). These intracytoplasmic macrocolonies are detectable by light microscopy after Giemsa or Romanowsky staining (Chen et al., 1994; Rikihisa, 1991). During intracellular development two ultrastructural morphologies are observed: a smaller electron dense-core cell (DC), which has a dense nucleoid, and a larger electron lucent reticulate cell (RC), which has a dispersed nucleoid (Troese and Carlyon, 2009). Furthermore, it is known that *Ap*, especially the fragile RC, is very sensitive to mechanical stress such as sonication, freezing, thawing, and osmolarity changes (Lin and Rikihisa, 2003). Unlike other Gram-negative bacteria, they are enveloped with a thin outer membrane that shows no sign of peptidoglycan layer or lipopolysaccharides (LPS) (Rikihisa et al., 1997). For *in vitro* applications, infection studies or transformation assays, mechanical methods are widely used for liberation of intracellular bacteria. *Anaplasma phagocytophilum* is generally released from infected host cells by different, sensitive methods including syringe lysis (Carlyon, 2005), sonication (Felsheim et al., 2006) or using a Dounce homogenizer (Lin and Rikihisa, 2003). It is challenging to lyse the infected host cells and to remove the remnant cellular debris without damaging the bacteria. A new semi-purification method using rock tumbler grit was initially introduced to improve the yield of DNA from *Ap* grown in tick cells and has also been used for *Ehrlichia chaffeensis* purification from tick cell cultures (Cheng et al., 2013). The fine-grained grit was used to lyse the host cells and filtration was applied to remove most of cellular debris and to retain a semipure bacterial preparation (majority of suspension is host cell-free bacteria and a minor portion consists cellular debris of the host cells). In a previous study the isolation of *Ap* from HL-60 cells using the rock tumbler grit method was used to establish infections in endothelial cells (Wang et al., 2015). However, it was still not known whether the use of rock tumbler grit destroyed DCs or RCs during the purification procedure. The aim of this study was to evaluate the structural integrity of *Ap* after host cell lysis using rock tumbler grit and to assess and compare the outcome to the frequently used method, the syringe lysis.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultivation and infection with *Ap*

A human promyelocytic cell line HL-60 (ATCC CCL-240) was obtained from the American Type Culture Collection (LGC Standards GmbH, Wesel, Germany) to propagate *Ap* in culture (Wang et al., 2015). The cells were screened for the expression of the P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on the surface to verify the susceptibility for *Ap* infection. Therefore, HL60 cells were centrifuged on a glass slide and fixed with acetone for 10 min at room temperature. Following fixation, cells were incubated for 20 min with human serum to block Fc receptors and were gently washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5–1.0% (w/v) bovine serum albumin (BSA) (pH 7.2–7.4), afterwards. The cells were stained with a purified mouse-anti-human CD162 (PSGL-1) - antibody (eBioscience, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) and a FITCconjugated goatantimouse IgG (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific), each 30 min at room temperature in the dark. The cell nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and visualization was performed with a fluorescence microscope (Leica DMS5000, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) (Wang et al., 2015). After confirmation of expression of the PSGL-1 on the cell surface, cell cultures were infected with a mCherry-transformed *Ap* strain *HGE1* (Felsheim et al., 2006). The uninfected and infected HL-60 cells were maintained in RPMI1640 medium (ThermoFisher Scientific), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (SigmaAldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) and 2 mM L-glutamine (SigmaAldrich Chemie GmbH) in a humidified 5% CO₂ air atmosphere at 37 °C (Goodman et al., 1996). The culture medium was buffered with 25 mM HEPES, 0.1% NaHCO₃ and the pH was adjusted to 7.5 (Silaghi et al., 2011).

Trypan blue (0,5%) staining was used to determine cell viability (Strober, 2015) and medium was replaced three times a week to maintain a cell density of 2 to 5 × 10⁵ cells per ml in culture (Carlyon, 2005). Every two days, aliquots of *Ap*-infected HL-60 cells were cyto-centrifuged onto glass slides (Microscope Slides, Henry Schein, Munich, Germany) using a table top centrifuge (Rotofix 23 A, VWR International, Pennsylvania, USA) to monitor the infected cell fraction. Cells were examined after Giemsa staining to visualize morulae and determine the infection rate, counting 100 cells per slide using a light microscope (Leica DMS5000, Leica Microsystems GmbH).

2.2. Purification of *Ap* from infected cell cultures

Prior to bacterial purification, continuously cultured HL-60 cells infected with *Ap* were harvested when they were heavily infected (> 80%). One aliquot of the infected cell culture was transferred to a microcentrifuge tube and centrifuged at 200 × g for 5 min at 4 °C and functioned as a positive control for transmission electron microscopy (TEM). The rest of the infected cells was divided equally into two subsets and centrifuged at 2300 × g, 4 °C for 10 min.

The first subset of *Ap* infected cells was then processed by syringe lysis, using 27-G, ½-in (0.4 × 20 mm) needles after resuspension in PBS. The suspension was filled into a 5-ml Luer lock syringes and expelled through the needles. This procedure was repeated five times to lyse the HL-60 cells without damaging the bacteria. A differential centrifugation was used to separate *Ap* from host cell debris (Carlyon, 2005).

The second subset of *Ap* infected cells was processed by using rock tumbler grit (60/90 grit silicon carbide; Lortone, Inc. Mukilteo, WA, USA). The pellet was resuspended in 1.5 ml culture medium and transferred to a 2.0-ml sterile tube containing 0.2 ml grit. The cell suspension was vortexed vigorously for 30 s and subsequently kept on ice. After the grit settled to the ground the supernatant was transferred to a 5-ml Luer lock syringe and passed through a 2.0-µm pore size syringe filter (Puradisc™ 25 GD, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany) into a sterile 2ml microcentrifuge tube to remove the remnant HL60 debris (Borjesson, 2008). Host cellfree bacteria were finally collected by centrifugation at 11,000 × g for 5 min at 4 °C (Wang et al., 2015). After processing the samples according to the respective protocols, the preserved pellets of released bacteria were used for analysis by TEM, immunofluorescence staining and real-time PCR.

2.3. Transmission electron microscopy

Host cell-free *Ap* was obtained from infected HL-60 cells using the method of rock tumbler grit and syringe lysis as described before. Additionally, an aliquot of the original infected cell culture was used as a positive control. The cell pellets of host cell-free *Ap* and infected HL-60 cells were resuspended in 2.5% glutaraldehyde solution in Sorenson's sodium phosphate buffer and fixed for 1 h at 4 °C.

After washing cells twice with Sorenson's sodium phosphate buffer, they were postfixed in 1% osmium tetroxide for 1 h at 4 °C and dehydration was achieved in an ascending acetone series. The samples were embedded in epoxy resin and harden at 60 °C for two days. Ultrathin sections were prepared and examined with EM10 transmission electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) as described previously (Dyachenko et al., 2013).

2.4. Immunofluorescence assay

Immunofluorescence microscopy was performed to detect and count individual organisms after purification. Infected HL-60 cells were collected and divided equally into two subsets. Each subset, containing 5.0 × 10⁶ highly infected cells, was purified as described before using rock tumbler grit or syringe lysis. The pellets with host cell-free *Ap* were washed with 0.9% NaCl and resuspended in 100 µl of 0.9% NaCl. 50 µl of suspension were used for Baclight Bacterial Viability staining (Syto 9

T.P. Nguyen Trong et al.

Ticks and Tick-borne Diseases 10 (2019) 280–285

and PI stain, Molecular Probes). Finally, fluorescence microscopic images were taken and viable *Ap* (Syto 9 positive but PI negative) were counted using a Petroff-Hausser counting chamber (Goodman et al., 1999).

2.5. Quantification by real-time PCR

In order to quantify and compare the outcome of DNA of *Ap* obtained from lysed HL-60 cells using the two different semipurification protocols, a real-time PCR was performed. The infected host cell population was again divided equally into two subsets and after semipurification, DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Subsequently both methods – filtration and differential centrifugation – to remove unwanted cellular debris were compared separately. Filtration using a 2.0- μm pore size syringe filter and differential centrifugation to further clarify the lysate were applied after host cell lysis and the yield was used for DNA extraction. The DNA was diluted by 1:1000 and a real-time PCR was performed as described previously (Courtney et al., 2004). Each DNA sample was evaluated in triplicates. DNA extracted from an uninfected HL60 cell culture was used as negative control. The TaqMan probe (QuantiNova Probe PCR Kit, Qiagen) was labeled at the 5' and 3' ends with 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) and Black Hole Quencher-1 (BHQ-1), respectively. A volume of 2.5 μl target DNA and a total reaction volume of 20 μl were used. For the initial activation of the QuantiNova Taq DNA Polymerase, a temperature of 95 °C was applied for 2 min, followed by 40 cycles of a 5 s denaturation step at 95 °C and by a 30 s annealing elongation step at 60 °C. PCR amplification was performed in 96-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) using a Light Cycler 480 (Roche, Basel, Switzerland). The experiment was repeated with five infected cell cultures and infection rates ranging from 70–90%. To quantify and compare the DNA yield of both methods, an artificial standard (DNA duplex molecule) of a length of 108 bp (Metabion, Planegg, Germany) was designed. The initial concentration of the standard was 0.5 nmol/l and eight different concentrations using a 10-fold dilution series were applied to generate a standard curve. The standard was measured in triplicate for each concentration and the Ct-values were plotted against the logarithm of input amount of standard material. The standard curve and efficiency were calculated with the Light Cycler 480 Software.

2.6. Infection of naive cells with isolated *Ap*

Naive cell cultures were infected with host cell-free *Ap* recovered from infected HL-60 cells using the different purification protocols. The population of *Ap* obtained by using the rock tumbler grit protocol resulted in higher infection rates than the population recovered by using the syringe lysis protocol.

In order to see whether the bacteria were still equally infectious after exposure to high mechanical stress caused by lysis of the host cells using rock tumbler grit, naive cell cultures of HL-60 cells with a concentration of 2.0×10^5 cells per ml were infected. Host cell-free *Ap* was isolated from the same number of infected cells by using the syringe lysis and rock tumbler grit method. The progress of infection was monitored microscopically by Giemsa staining (SigmaAldrich) daily. A multiplicity of infection of one was used for the initial inoculation and semi-purification respectively (MOI 1:1 refer to the number of infected cells used for purification to the number of uninfected target cell) (Borjesson, 2008).

Analysis of the cell culture based on fluorescence-activated cell sorting (FACS) was performed additionally to monitor and compare the progress of the *Ap* infection. Therefore, one aliquot of 500 μl from every infected culture and from the uninfected negative control were collected and washed twice with PBS containing 0.5–1.0% (w/v) BSA and 0.09% NaN_3 . The cells were fixed for at least 30 min with 2% ice-cold paraformaldehyde (PFA) before mCherrypositive cells were detected

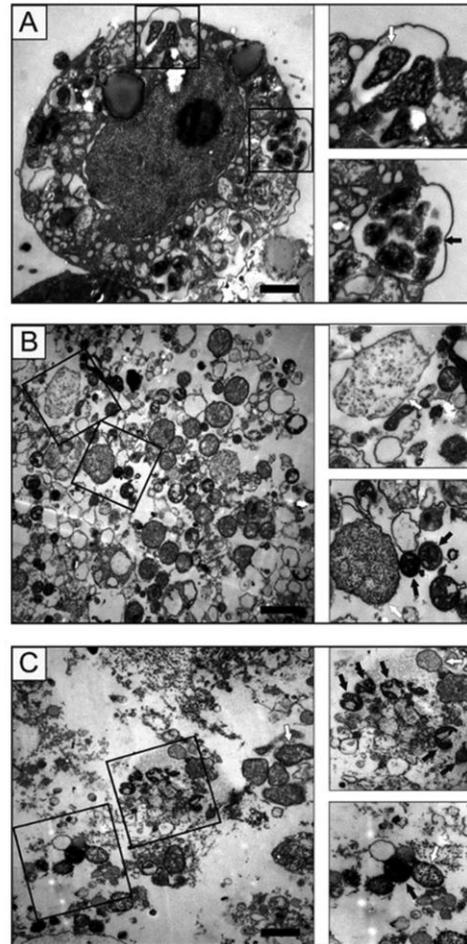


Fig. 1. Ultrastructure of *Anaplasma phagocytophilum*. (A) Ultrastructure of *Ap* in a HL-60 cell. Several *Ap* inclusions in a HL-60 cell showing electron-dense cell forms (DCs, black arrows) and reticulate cell forms (RCs, white arrows). (B) Ultrastructure of *Ap* released with the rock tumbler grit lysis procedure. Many DCs (indicated by black arrows) as well as RCs (indicated by white arrows) are visible using the rock tumbler grit lysis procedure. The area marked with solid lines and shown on the lower right contains both DC and RC forms. One lysing RC form with damaged membrane presented in the upper right box (white arrow). (C) Ultrastructure of *Ap* purified with syringe lysis procedure. Electron-dense (DCs, black arrows) and reticulate cells (RCs, white arrows) obtained after using syringe lysis procedure. Scale bars, 1.0 μm .

and analyzed in the MACS Quant VYB (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (Wang et al., 2015).

Statistical analysis was conducted using the Minitab Software version 17. (Minitab Inc., Pennsylvania, USA). Student's *t*-test was performed for paired samples at a confidence level of 95%.

3. Results

Electron microscopic images of infected HL-60 cells as well as

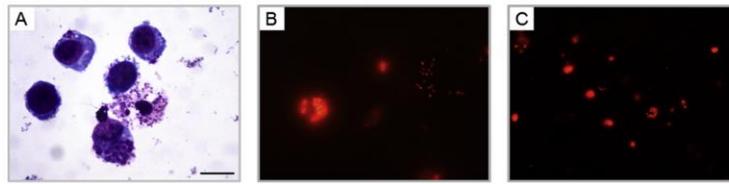


Fig. 2. Giemsa staining of *Ap* infected HL-60 cells and images of host cell-free fluorescent *Ap* organisms. *Ap* was propagated in HL-60 cells and harvested when > 80% of the cells were infected. For each experiment the infected cell culture was divided and release of the bacteria from host cell populations were carried out by the use of syringe lysis procedure and the rock tumbler grit procedure. (A) Representative image of Giemsa stained *Ap*

infected HL-60 cells. (B) Representative image of fluorescent *Ap* prepared using syringe lysis. (C) Representative image of fluorescent *Ap* prepared using rock tumbler grit. Scale bar, 10 μ m.

released *Ap* from lysed host cells using the syringe lyses and rock tumbler grit method were examined. Both stages of *Ap* development were present in the intracytoplasmic vacuoles of the infected HL-60 cells (Fig. 1A). The vacuoles were present in a variable size and with a different number of bacteria inside. No intact HL-60 cells were visible after using the rock tumbler grit or syringe lysis procedure for host cell-lysis. We detected dense-cored cells as well as reticulate cells of *Ap* after host-cell-lysis using rock tumbler grit (Fig. 1B). Dense-cored cells and reticulate cells were also visible after host-cell-lysis using the syringe lysis method (Fig. 1C). In both methods intact, round-cocci DCs were seen with rippled membranes. Also the larger, pleomorphic RCs with smooth and slightly ruffled membranes were found. Most of the bacteria were undamaged however, in some cases using rock tumbler grit and syringe lysis we detected few RCs with a damaged membrane probably caused by mechanical stress.

Immunofluorescence assays showed that using the rock tumbler grit protocol resulted in a higher number of isolated *Ap* compared to the syringe lysis protocol (Fig. 2). The same number of infected cells was used for both methods of host cell lysis and isolation of the bacteria. After counting, the concentration of viable bacteria recovered by syringe lysis ranged from 3.2×10^7 to 6.08×10^7 cells per ml. The concentration of viable bacteria recovered by rock tumbler grit ranged from 7.6×10^7 cells per ml to 9.45×10^7 cells per ml. The efficiency of bacterial isolation was compared in four independent experiments. It became evident that more bacteria were recovered using the rock tumbler grit protocol with a fold change (F) of 1.7–2.4 compared to the syringe lysis method. Only viable bacteria were counted. Concentrations of *Ap* determined after purification were different at a significance level of $p = 0010$ (*t*-test for paired samples).

In the next step, relative quantification was carried out by determining the yield of DNA after purification. We analyzed the Ct values and designed an artificial standard to calculate and compare the total number of copies and the fold change of both methods (Table 1). The average of Ct value of triplicate was used for data interpretation. The efficiency of the artificial standard based on a 10-fold dilution series was 94.92% (slope: -3.450). The PCR results indicate an increase of the yield of *Ap*-DNA using the rock tumbler grit protocol compared to the

syringe lysis protocol. Based on the total number of copies the fold change of efficiency (F) in different experiments was $F = 1.6$ – 2.9 (rock tumbler grit versus syringe lysis), which describes the ratio between the yield of *Ap* DNA using the different purification protocols. Resulting Ct-values of both purification protocols were proven to be statistically different at a significance level of $p = 0.001$ (*t*-test for paired samples).

In order to see whether the bacteria were still equally infectious after exposure to high mechanical stress caused by lysis of the host cells, naive HL-60 cells were tried to be reinfected. The cell cultures were exposed to preparations of host cell-free *Ap* obtained by semi-purification with either syringe lysis or rock tumbler grit and were screened microscopically for the presence of morulae after Giemsa staining. The typical intracellular formations were initially observed on day one or day two after inoculation. Flow cytometry analysis revealed an initial infection between 3% and 11% of the HL60 cells. The infection rate increased to 100% associated with lysis of the host cell population within 5–7 days of incubation (Fig. 3). In all batches the same number of infected cells were used for the different protocols and the total amount of released bacteria were used to infect naive cell cultures. Higher infection rates in cell cultures infected with the lysate obtained using the rock tumbler grit procedure were detected 24 h after inoculation. This result was confirmed in four independent experiments. The number of infected HL-60 cells were 1.2–2.1 times higher compared to cell cultures infected with the lysate obtained using the syringe lysis protocol. It became evident that the larger number of isolated bacteria using the rock tumbler protocol lead to higher infection rates and therefore to a faster course of infection and finally lysis of the host cell population respectively. Infection rates of the HL-60 cell cultures at day one were different at a significance level of $p = 0017$ (*t*-test for paired samples).

Furthermore, we compared the efficiency of the different procedures to remove cellular debris after host cell lysis considering the outcome of DNA. Therefore, both methods including centrifugation and filtration were applied after lysis of the infected HL-60 cells by the use of rock tumbler grit and syringe lysis. We observed that using filtration results in an increase of DNA by a fold change from 1.1 up to 1.5 (data not shown).

Table 1

Relative quantification of the outcome of the different protocols: comparison of Ct values and calculation of the total number of copies based on precise standards (plasmid controls). The yield of recovered bacterial DNA by using the rock tumbler grit protocol and the syringe lysis protocol was compared in five independent experiments.

PCR No.	rock tumbler grit		syringe lysis		fold change in efficiency (F)
	Ct-Value	total copy number	Ct-Value	total copy number	
1	22.82	267.000	23.55	164.000	1,6
2	23.63	189.333	25.11	70.600	2,7
3	22.79	265.417	24.08	115.000	2,3
4	20.78	1.270.000	21.94	585.667	2,2
5	20.12	1.966.667	21.72	679.667	2,9

4. Discussion

The sensitive, intracellular bacterium *Ap* can be cultured and propagated in a human promyelocytic cell line (HL-60). To recover a host cell-free enrichment of this bacteria - these organisms are predisposed toward mechanical stress - an updated semi-purification method using rock tumbler grit was used in this study. This updated protocol was introduced to increase the number of released bacteria and to facilitate the handling. The outcome was evaluated and compared to the syringe lysis method. *Anaplasma phagocytophilum* displays unique characteristics in its physics of the cell wall. Genome sequences revealed a lack of all genes encoding lipid A and most genes for the biosynthesis of peptidoglycan (Lin and Rikihisa, 2003), which play a significant role in providing strength to the outer membrane and maintaining the structural integrity of Gram-negative bacteria (Benson, 1998; Høltje, 1998).

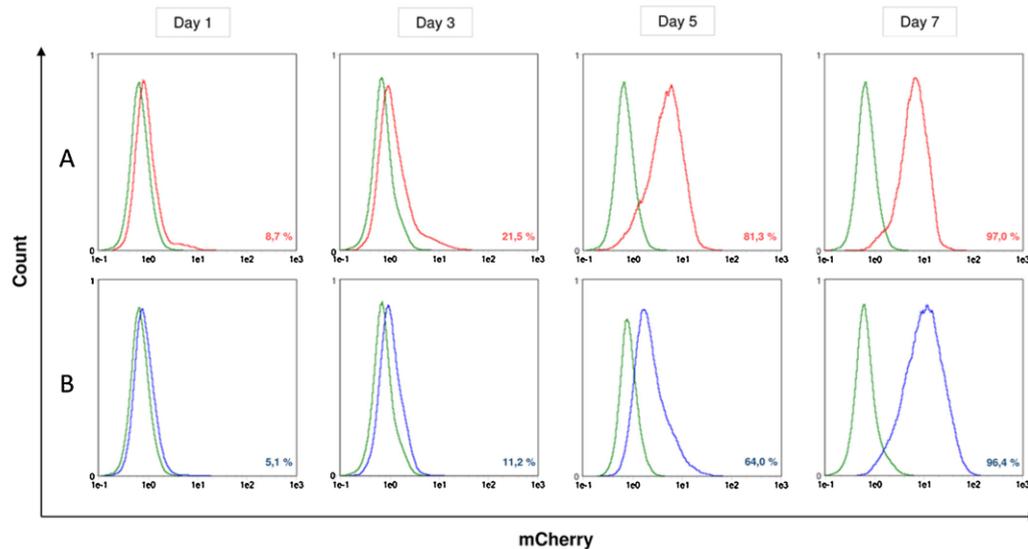


Fig. 3. Flow cytometric analysis of HL-60 cell cultures after infection with host cell-free *Ap*. Naive cell cultures were infected with *Ap* released from a defined number of HL-60 cells (MOI 1:1) using the rock tumbler grit protocol (A) and the syringe lysis protocol (B). Cell cultures were screened for mCherry-positive cells on day 1, 3, 5 and 7 post inoculation. In the first days after exposure the fraction of infected cells was higher when the rock tumbler grit protocol was applied. After logarithmic expansion of *Ap* organisms in HL-60 cells, infection rates of the HL-60 cell cultures increased continuously and cultures became completely infected. blue/red panels: infected cell population; green panel: uninfected cell population (negative control) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Unlike the situation seen with other obligatory vacuolar pathogens that exhibit biphasic development, such as *Chlamydia pneumoniae* (Abdelrahman and Belland, 2005) or *Coxiella burnetii* (Mccaul And Williams, 1981), *Anaplasma* spp. are extremely susceptible to mechanical stress and osmolarity changes due to the lack of a peptidoglycan layer or synthesized lipopolysaccharides (Ristic and Kreiser, 1984; Severo et al., 2012). The release of *C. burnetii* and *Ch. pneumoniae* from infected cells is achieved by a freeze-thaw technique or by the use of deionized water (Henning and Sting, 1999; Thiele, 1992). These methods induce a strong impact on the host's cell walls and result in a subsequent breakdown of the cell wall integrity. In contrast, to avoid damage to the shape of the bacterial cell, different, less damaging methods are used for the isolation of *Ap* such as syringe lysis (Borjesson, 2008; Carlyon, 2005) or rock tumbler grit (Wang et al., 2015). Troese and Carlyon (2009) could show using TEM that a host cell-free population of DC and RC organism was recovered following syringe lysis, which was also confirmed in following studies (Huang et al., 2010a, 2010b). In the same way, we demonstrated for the first time that both *Ap* DCs and RCs were recovered with a sustained physical integrity by the usage of rock tumbler grit. However, we clearly observed and confirmed that *Ap* are sensitive to mechanical stress as indicated by the presence of some RCs that appeared to undergo lysis as suggested by a damaged outer membrane. Moreover it is reported that high mechanical stress such as sonication causes the lysis of the fragile RC form and only the DC form is received (Felsheim et al., 2006).

The count of viable bacteria with immunofluorescence after isolation showed a higher number of *Ap* using the rock tumbler grit protocol compared to syringe lysis protocol. A similar increase of the outcome was confirmed by PCR to compare the amount of bacterial DNA recovered after purification (Table 1). The variance of the Ct value ranges between the individual experiments are due to minute variations in starting cell concentrations and infection rates. We conclude that the

increase is due to an effective host cell lysis with only few losses of bacteria during the procedure. Furthermore, we observed that a higher yield of bacterial DNA could be achieved using filtration compared to centrifugation to remove cellular debris. For generating *Ap* preparations that are more highly purified from contaminating host cell components, density gradient centrifugation can be used, which separates bacteria and host cellular debris into different layers (Carlyon, 2005). *Ap* population isolated from host cells by lysis was used to infect naive cell cultures in order to verify their infectivity. In the first days after exposure, we detected higher rates of infected HL-60 cells using the suspension of host cell-free bacteria recovered by the rock tumbler grit protocol compared to syringe lysis protocol. Although using the same MOI 1:1 for all of our experiments, we observed a lenient variation of the initial infection rate in target cell cultures 24 h after incubation. The fraction of infected cells was determined by Giemsa staining. However, it is not possible to differentiate and count the separate intracellular forms of *Ap* under light microscopy. It has been shown that only DCs are infectious for HL-60 cells, while RCs are considered to be in the genome replication stage of *Ap* development that is not infectious for HL-60 cells (Troese and Carlyon, 2009). Thus, we conclude that the diverse bacterial load was likely due to the varying numbers of infectious DCs present in different batches of HL-60 cells cultures, which were used for semi-purification. Besides the human promyelocytic cell line, tick cell lines such as IDE8 or ISE6 are also used for isolation and propagation for *in vitro* culture of *Ap*. Host cell-free *E. chaffeensis* organisms were successfully isolated from tick cells by the usage of rock tumbler grit (Wang et al., 2017). It stands to reason that this convenient method may be used to release *Ap* from tick cell cultures, since both bacterial organisms display very similar characteristics in terms of intracellular development and cell envelope structure (Lin and Rikihisa, 2003; Rikihisa, 2010). However, in this study *Ap* was not isolated from tick derived cell lines using rock tumbler grit and this has to be proven in

T.P. Nguyen Trong et al.

Ticks and Tick-borne Diseases 10 (2019) 280–285

further experiments.

We conclude that the application of rock tumbler grit is an effective method to lyse the infected host cells and following filtration is appropriate to retain *Ap* and remove remnant HL-60 debris. We showed that more bacteria could be received, compared to the syringe lysis protocol and that the product can be used for subsequent enrichment of DCs and RCs respectively. The updated protocol facilitates the procedure for host cell lysis and semi-purification and it is a faster and easier method to recover host cell-free *Ap* from HL-60 cells compared to the syringe lysis protocol. In consequence, saving time for preparation of the samples is achieved and a minor instrument setting is required.

Declarations of interest

None.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgments

The authors gratefully thank Anke Schiller and Stephanie Hiereth for their assistance in cell and bacterial culture. We also thank Heidrun Schöl for her technical assistance with the ultrathin section preparation.

References

- Abdelrahman, Y.M., Belland, R.J., 2005. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 949–959. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.03.002>.
- Aguero-Rosenfeld, M.E., 2002. Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: state of the art. *Vector Borne Zoon. Dis.* 2, 233–239. <https://doi.org/10.1089/153036602321653815>.
- Bakken, J.S., Dumler, J.S., 2006. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 236–247. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.042>.
- Benson, S.A., 1998. The bacterial outer membrane and surface permeability. Chapter 2 In: Bittar, E.E., Bittar, N. (Eds.), *Principles of Medical Biology*, pp. 15–22.
- Borjesson, D.L., 2008. Culture, isolation, and labeling of *Anaplasma phagocytophilum* for subsequent infection of human neutrophils. *Methods Mol. Biol.* 431, 159–171.
- Carlyon, J.A., 2005. Laboratory maintenance of *Anaplasma phagocytophilum*. *Curr. Protoc. Microbiol.* <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc03a02s00>. Chapter 3, Unit 3A.2.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2018. Anaplasmosis. Symptoms, Diagnosis and Treatment. [Online]. Available: . (Accessed 04 April 2018 2018). <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/symptoms/index.html>.
- 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.
- Cheng, C., Nair, A.D.S., Indukuri, V.V., Gong, S., Felsheim, R.F., Jaworski, D., Munderloh, U.G., Ganta, R.R., 2013. Targeted and random mutagenesis of *Ehrlichia chaffeensis* for the identification of genes required for in vivo infection. *PLoS Pathog.* 9, e1003171. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003171>.
- 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.7.3164-3168.2004>.
- Dyachenko, V., Geiger, C., Pantchev, N., Majzoub, M., Bell-Sakyi, L., Krupka, L., Straubinger, R.K., 2013. Isolation of canine *Anaplasma phagocytophilum* strains from clinical blood samples using the *Ixodes ricinus* cell line IRE/CTVM20. *Vet. Microbiol.* 162, 980–986. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.021>.
- Felsheim, R.F., Herron, M.J., Nelson, C.M., Burkhardt, N.Y., Barbet, A.F., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2006. Transformation of *Anaplasma phagocytophilum*. *BMC Biotechnol.* 6, 42. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-42>.
- 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. <https://doi.org/10.1056/nejm199601253340401>.
- Goodman, J.L., Nelson, C.M., Klein, M.B., Hayes, S.F., Weston, B.W., 1999. Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. *J. Clin. Invest.* 103, 407–412.
- Henning, K., Sting, R., 1999. Filtrationsmethode zur Isolierung von Chlamydien aus mikrobiell-kontaminiertem Probenmaterial. *Tierärztliche Umschau.* 54, 274–277.
- Höltje, J.-V., 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 181–203.
- Huang, B., Troese, M.J., Howe, D., Ye, S., Sims, J.T., Heinzen, R.A., Borjesson, D.L., Carlyon, J.A., 2010a. *Anaplasma phagocytophilum* APH_0032 is expressed late during infection and localizes to the pathogen-occupied vacuolar membrane. *Microb. Pathog.* 49, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.06.009>.
- Huang, B., Troese, M.J., Ye, S., Sims, J.T., Galloway, N.L., Borjesson, D.L., Carlyon, J.A., 2010b. *Anaplasma phagocytophilum* APH_1387 is expressed throughout bacterial intracellular development and localizes to the pathogen-occupied vacuolar membrane. *Infect. Immun.* 78, 1864–1873. <https://doi.org/10.1128/IAI.01418-09>.
- Lin, M., Rikihisa, Y., 2003. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect. Immun.* 71, 5324–5331.
- Mecaul, T.F., Williams, J.C., 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J. Bacteriol.* 147, 1063–1076.
- 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. <https://doi.org/10.1099/00222615-47-3-235>.
- Rikihisa, Y., 1991. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 286–308.
- Rikihisa, Y., 2010. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 328–339. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2318>.
- Rikihisa, Y., Zhi, N., Wormser, G.P., Wen, B., Horowitz, H.W., Hechemy, K.E., 1997. Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent directly isolated and stably cultivated from a patient in New York State. *J. Infect. Dis.* 175, 210–213. <https://doi.org/10.1093/infdis/175.1.210>.
- Ristic, M., Kreiser, J.P., 1984. Genus I *Anaplasma* Theiler 1970. In: Krieg, N.R., Hold, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed. pp. 720–722 Baltimore.
- Severo, M.S., Stephens, K.D., Kotsyfakis, M., Pedra, J.H., 2012. *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiol.* 7, 719–731. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.45>.
- Silaghi, C., Kauffmann, M., Passos, L.M., Pfister, K., Zweygarth, E., 2011. Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. *Ticks Tick. Dis.* 2, 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.tiddis.2011.09.002>.
- Strober, W., 2015. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 111, 1–3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111.A3.b>.
- Thiele, W.K., 1992. Neue Möglichkeiten zur Diagnose des Q-Fiebers und zur Differenzierung des Erregers. *Berliner Münchner Tierärztliche Wochenschrift.* 105, 045–049.
- Troese, M.J., Carlyon, J.A., 2009. *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infect. Immun.* 77, 4018–4027. <https://doi.org/10.1128/IAI.00527-09>.
- Wang, J., Dyachenko, V., Munderloh, U.G., Straubinger, R.K., 2015. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from endothelial cells to peripheral granulocytes in vitro under shear flow conditions. *Med. Microbiol. Immunol.* 204, 593–603. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0387-0>.
- Wang, Y., Wei, L., Liu, H., Cheng, C., Ganta, R.R., 2017. A genetic system for targeted mutations to disrupt and restore genes in the obligate bacterium, *Ehrlichia chaffeensis*. *Sci. Rep.* 7, 15801. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16023-y>.
- Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167, 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.013>.

IV. DISKUSSION

Anaplasma phagocytophilum ist ein vektorübertragenes, obligat intrazelluläres Bakterium, welches aufgrund seines breiten Wirtsspektrums weltweit verbreitet ist (WOLDEHIWET, 2010). Die komplexen epidemiologischen Zyklen aufgrund der genetischen Variabilität und die speziellen Strategien, um den antimikrobiellen Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems zu entkommen, machen *A. phagocytophilum* weiterhin zum Gegenstand aktueller Forschungen (SEVERO et al., 2012). So besitzt *A. phagocytophilum* besondere morphologische Eigenschaften für die angepasste, intravakuoläre Entwicklung in den Wirtszellen. Diese strukturellen Besonderheiten sind jedoch mit einer hohen Sensibilität der Erreger gegenüber äußeren Einflüssen verbunden (LIN & RIKIHISA, 2003). Die intrazelluläre Vermehrung von *A. phagocytophilum* in Zellkultur, sowie die Isolierung der Bakterien aus den Wirtszellen ist daher mit verschiedenen Herausforderungen verbunden. Die Aufreinigung und die Anreicherung des wirtszellfreien Pathogens ist jedoch für eine Vielzahl an Untersuchungen im Labor notwendig. Um einen Verlust von *A. phagocytophilum* während der Freisetzung aus den Wirtszellen, wie z.B. HL-60-Zellen (promyeolische Vorläuferzellen), zu vermeiden, werden verschiedene mechanische Techniken eingesetzt, welche jedoch mit einem hohen Arbeits- oder apparativen Aufwand verbunden sind (CARLYON, 2005; BORJESSON, 2008). Für eine vereinfachte und schnellere Isolierung von Bakterien bzw. bakterieller DNA aus Zellkulturen wurde bereits in vorherigen Studien ein neues Protokoll unter Verwendung des Silicium-Carbid-Gemisches „rock tumbler grit“ entwickelt und vorgestellt (CHENG et al., 2013; WANG et al., 2015). Dabei blieb jedoch die Frage unbeantwortet, ob nach dem Einsatz von „rock tumbler grit“ zur Freisetzung von *A. phagocytophilum* aus HL-60-Zellen, die „dense-cored cells“ (DCs) und die „reticulate cells“ (RCs) vollständig intakt erhalten werden können. Ziel dieser Arbeit war es daher die strukturelle Integrität der beiden morphologischen Entwicklungsformen mittels Elektronenmikroskopie nach Aufreinigung zu überprüfen, sowie nach Infektion naiver HL-60-Zellkulturen die *in-vitro*-Infektiösität zu evaluieren. Dabei erfolgte anhand von Immunfluoreszenzfärbung und PCR ein quantitativer Vergleich der beiden Aufreinigungsprotokolle „rock tumbler grit“ und „syringe lysis“.

1. Herausforderungen bei der Anzucht von *Anaplasma phagocytophilum* in Zellkultur

Die *in-vitro*-Kultivierung ist aufgrund der genetischen Variabilität und der besonderen Zellwandstruktur von *A. phagocytophilum* mit speziellen Anforderungen verbunden. Die Erregerstämme können eine unterschiedliche Wirtsspezifität aufweisen, weswegen für die Vermehrung der Bakterien in Kultur verschiedene Zelllinien verwendet werden (RIKIHISA, 2010). Für die Replikation in den Membran-gebundenen Vakuolen hat *A. phagocytophilum* eine elastische Zellhülle entwickelt, welche jedoch nur geringen mechanischen und osmotischen Belastungen standhält (LIN & RIKIHISA, 2003). Daher war ein besonders schonender und sorgfältiger Umgang mit den infizierten Kulturen während der Infektionsversuche notwendig. Für die Vermehrung der Bakterien in Kultur stehen Zeckenzelllinien (IDE8, ISE6, ICTM19/20) und die humane promyeloische Leukämiezelllinie (HL-60) zur Verfügung (GOODMAN et al., 1996; MUNDERLOH et al., 1996; DYACHENKO et al., 2013). Die aus den embryonalen Zecken gewonnenen Zelllinien besitzen gegenüber den HL-60-Zellen den Vorteil, dass sie empfänglich gegenüber den unterschiedlichen genetischen Varianten von *A. phagocytophilum* sind, die Anzucht dieser Zeckenzelllinien ist jedoch mit einem hohen Aufwand und speziellen Anforderungen an das Wachstumsmedium verbunden (MUNDERLOH & KURTTI, 1989). Zudem kann die Etablierung einer Infektion in solchen Zelllinien mit *A. phagocytophilum* mit einer Inkubationsperiode von mehreren Wochen bis zum Auftreten der ersten „Morulae“ einhergehen (MUNDERLOH et al., 1999; DYACHENKO et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund HL-60-Zellen für die Experimente verwendet (Anhang, Abb. A4), welche sich ebenfalls für die Diagnostik von HGA, sowie für die routinemäßige *in-vitro*-Kultivierung verschiedener humanpathogener Stämme von *A. phagocytophilum* etabliert haben. Die schnelle Wachstumsrate und die Permissivität der Zellen gegenüber *A. phagocytophilum* ermöglichen eine rasche Vermehrung des Erregers, verbunden mit der Anreicherung einer hohen Anzahl an Bakterien in der Zellkultur (CARLYON, 2005). Jedoch zeigte sich in den anfänglichen Versuchen, dass es nicht in allen HL-60-Zellkulturen zu einer Ausbreitung und Vermehrung von *A. phagocytophilum* kam. Ein entscheidendes Kriterium ist dabei die Expression des PSGL-1-Rezeptors auf der Oberfläche der humanen promyeloischen Zellen, über den der Eintritt des Pathogens in die

Wirtszellen vermittelt wird. Ein Verlust des Rezeptors in der Zelllinie führt zu einer stark reduzierten Empfänglichkeit gegenüber *A. phagocytophilum* (HERRON et al., 2000). Im Rahmen der Studie wurden daher die Zellkulturen zusätzlich mittels antikörpervermittelter Immunfluoreszenzfärbung auf die PSGL-1-Expression untersucht. Zelllinien mit einem nur schwachen oder ohne ein positives Signal wurden verworfen und nicht für die Versuche verwendet (Abb. 11). Nach Selektion der PSGL-1 positiven HL-60-Zellen ließen sich in den Kulturen erfolgreich eine Infektion mit *A. phagocytophilum* etablieren.

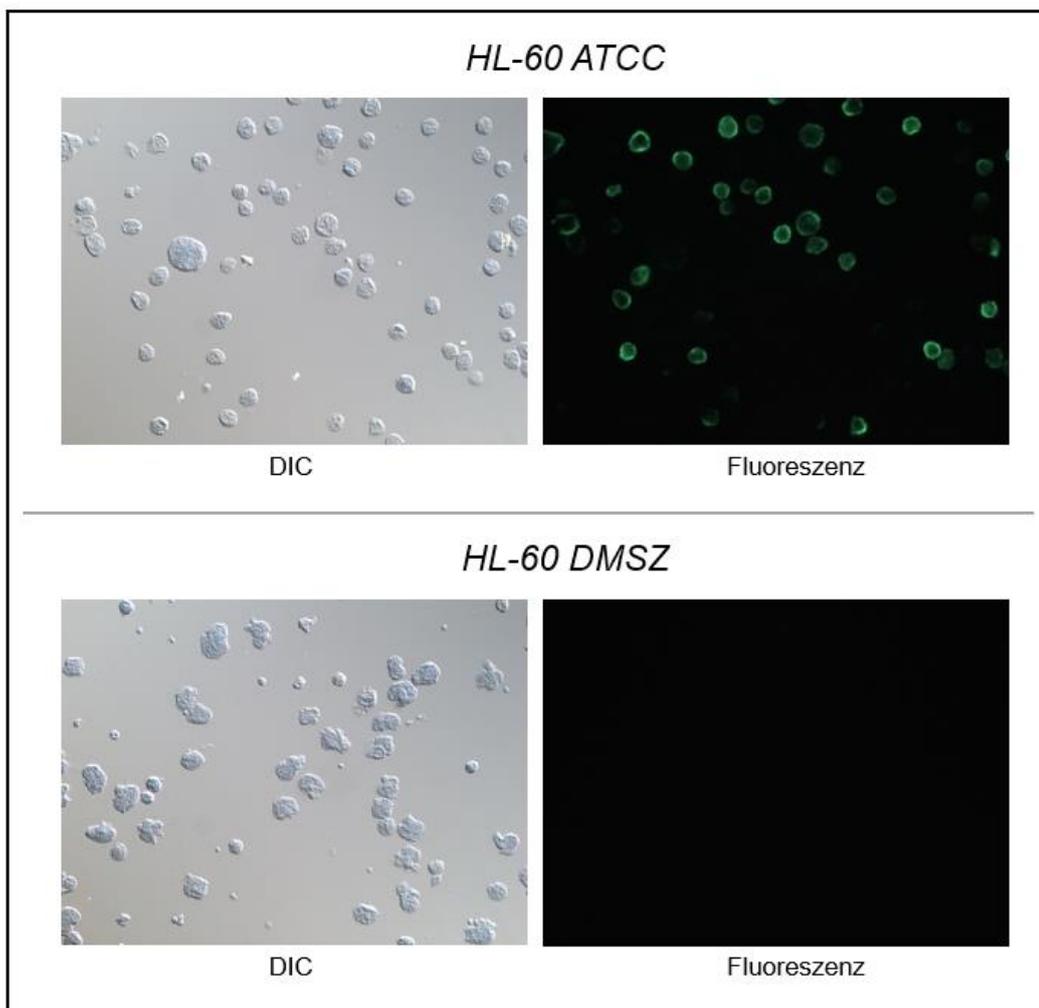


Abbildung 11: Expression des PSGL-1-Rezeptors auf der Zelloberfläche
Vergleich zweier HL-60-Stämme mittels Differentialinterferenzkontrast (DIC)
und Immunfluoreszenzfärbung.

Weiterhin wurden für neue Infektionen nur Zellkulturen mit einer niedrigen Passage verwendet (< P60), um eine Überalterung der Zellen zu vermeiden, welche zu einer gesteigerten spontanen Differenzierung der HL-60-Zellen und somit zu einer Limitierung der Zellproliferation führen kann (COLLINS, 1987). Eine erhöhte terminale Differenzierung der promyeloischen Zellen wurde ebenso für Suspensionen mit hoher Zelldichte beschrieben, sodass die Wirtszellkulturen während der Anzucht und der Inokulation mit *A. phagocytophilum* auf eine Konzentration von $2,0 - 5,0 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt wurden (ATCC, 2018). Weiterhin wurde während der Versuche beobachtet, dass die Kryokonservierung von infizierten HL-60-Zellen mit einem signifikanten Verlust der Bakterien einhergehen kann. Aufgrund der morphologischen Eigenschaften von *A. phagocytophilum* können die beim Einfrieren und Auftauen wirkenden Kräfte zu einer Schädigung der Erreger führen (LIN & RIKIHISA, 2003). Es wurde daher beim Einfrieren besonders auf eine rasche und sorgfältige Arbeitsweise geachtet und die Proben schrittweise abgekühlt, um eine kontrollierte Abkühlungsrate von -1°C pro Minute zu gewährleisten. Das als Kryokonservierungsmittel eingesetzte Dimethylsulfoxid (DMSO) besitzt bei Raumtemperatur eine zytotoxische Wirkung (BRAYTON, 1986) und wurde deshalb direkt nach Auftauen mittels Zentrifugation entfernt, um eine Schädigung der Bakterien und eine Beeinflussung der Wirtszellen zu vermeiden. Ebenso ist für ein optimales Wachstum in Zellkultur ein stabiles Milieu in Form des Zellkulturmediums erforderlich (MUNDERLOH et al., 1996). Während der Dauer der Infektionsversuche ließen sich jedoch bei längerer Aufbewahrung des Zellkulturmediums Schwankungen hinsichtlich des pH-Wertes feststellen, weswegen eine wiederholte Kontrolle des pH-Wertes vor Nutzung stattfand. Zudem wurde zusätzlich 0,1 % Bicarbonat für eine längere Stabilisierung des Mediums eingesetzt. Da *A. phagocytophilum* jedoch eine hohe Sensitivität gegen osmotische Einflüsse besitzt, wurde vor der Zusammensetzung des Mediums die Osmolarität berechnet und überprüft. Eine weitere Herausforderung bei der Vermehrung von *A. phagocytophilum* stellen die großen Zellkerne der HL-60-Zellen dar, welche nach Giemsa-Färbung zur routinemäßigen Bestimmung der Infektionsrate die intrazellulären „Morulae“ überdecken können. Bei der Bewertung einer vorliegenden Infektion wurde dies berücksichtigt, um die bakteriellen zytoplasmatischen Inklusionen nicht mit den ebenfalls basophilen Nucleoli zu verwechseln (CHEN et al., 1994; CARLYON, 2005).

A. phagocytophilum ist ein herausforderndes, obligat intrazelluläres Bakterium. Die erfolgreiche Etablierung einer Infektion ist von den oben genannten Faktoren abhängig. Fehler in der Handhabung können schnell zu einem Abfall der Infektionsrate und zu einem Zellverlust führen. Für die Anzucht von *A. phagocytophilum* für *in-vivo*-Infektionsversuche muss zudem beachtet werden, dass es bei längerer Passage in Zellkultur sowie in immunkompetenten Mäusen zu einem Verlust der Infektiosität kommt. Die Kultivierung in SCID-Mäusen bietet eine entsprechende Möglichkeit diese zu erhalten (HODZIC et al., 1998b; BORJESSON & BARTHOLD, 2002).

2. Strukturelle Besonderheiten und Aufreinigung von *Anaplasma phagocytophilum*

Für eine Vielzahl mikrobieller Untersuchungen im Labor wie Proteomanalysen, Antigencharakterisierungen oder Infektionsversuche werden intrazelluläre Erreger nach der Vermehrung *in vitro* aus den Zellkulturen isoliert (CARLYON, 2005). Die Auswahl der Methoden zur Wirtszelllyse und zur Entfernung des Zelldebris sind dabei abhängig von der Zellwandstruktur der Bakterien und den morphologischen Eigenschaften der für die Anzucht verwendeten Zellen. Bei Gram-negativen Bakterien spielen für gewöhnlich die Peptidoglykanschicht (Murein) und die LPS bei der Stabilisation der Zellhülle und bei der Aufrechterhaltung der Zellstruktur eine wichtige Rolle (BENSON, 1998; HÖLTJE, 1998). Im Gegensatz dazu zeigten Genomsequenzanalysen von *A. phagocytophilum*, dass keine codierenden Gene für Lipid A und für die Peptidoglykan-Synthese im Erbgut vorhanden sind (LIN & RIKIHISA, 2003). Die Reduktion der Mureinschicht ermöglicht die Ausbildung einer flexibleren Zellhülle und damit eine Anpassung an die räumlich begrenzte, intravakuoläre Entwicklung in den Wirtszellen. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass durch die Entwicklung in den Leukozyten und der damit verbundenen Exposition gegenüber immunologischen Erkennungsmechanismen ein Selektionsdruck zur Reduktion der Peptidoglykanschicht und LPS entstand (OTTEN et al., 2018). Eine Rückbildung dieser Zellwandbestandteile, welche charakteristische pathogen-assoziierte Strukturen enthalten, ermöglichte damit eine Verringerung des Risikos von spezifischen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt zu werden. Diese besonderen morphologischen Eigenschaften zur Anpassung an die intrazelluläre Entwicklung führen jedoch

ebenfalls zu einer hohen Sensitivität von *A. phagocytophilum* gegenüber osmotischen Veränderungen und mechanischen Stress (RIKIHISA, 2011). So kann der Zellinnendruck nur aufrechterhalten werden, da der Erreger im Zytoplasma der Wirtszellen einem isotonischen Milieu und damit geringeren osmotischen Belastungen ausgesetzt ist (SILHAVY et al., 2010). Ähnliche Beobachtungen wurden ebenfalls für *E. chaffeensis* berichtet, welche wie *A. phagocytophilum* elektronenmikroskopisch eine pleomorphe Struktur mit einer dünnen äußeren Membran besitzen (RIKIHISA, 1991, 1999). Die DCs und RCs von *A. phagocytophilum* sind dabei mit den analogen Erscheinungsformen von *Ehrlichia chaffeensis* vergleichbar (POPOV et al., 1998; ZHANG et al., 2007). Im Unterschied zu anderen Gram-negativen Bakterien mit zweiphasigen, intrazellulären Entwicklungszyklus, wie *Chlamydia pneumonia* (ABDELRAHMAN & BELLAND, 2005) oder *Coxiella burnetii* (MCCAUL & WILLIAMS, 1981), sind *Anaplasma* spp. und *Ehrlichia* spp. äußerst empfindlich gegenüber mechanischem Stress und osmolaren Veränderungen, bedingt durch das Fehlen der Lipopolysaccharide und der Peptidoglykanschicht (LIN & RIKIHISA, 2003). Anhand der unterschiedlicher Genexpression und des Peptidoglykan-Stoffwechsels werden *A. phagocytophilum* und *E. chaffeensis* der Peptidoglykan-negativen Gruppe zugeteilt, während Coxiellen zur klassischen und Chlamydien zur intermediären Peptidoglykangruppe zählen (OTTEN et al., 2018). Die Freisetzung von *Coxiella burnetii* und *Chlamydia pneumonia* aus infizierten Zellen kann durch Gefriertauen oder durch den Einsatz von deionisiertem Wasser erfolgen. Bei beiden Methoden wirken starke Kräfte auf die Wirtszellen ein und führen so zum Aufbrechen der Zellwand und damit zur Freisetzung der Erreger (THIELE, 1992; HENNING & STING, 1999). Im Gegensatz dazu müssen für Erreger der Peptidoglykan-negativen Gruppe schonendere Methoden zur Wirtszellyse eingesetzt werden, um Schädigungen der bakteriellen Zellhülle zu vermeiden. Das „syringe lysis“-Protokoll ist dabei eine weit verbreitete Methode zur Aufreinigung von *A. phagocytophilum* aus Wirtszellen. Im Vergleich zur Freisetzung der Erreger unter Einsatz eines Gewebssomogenisators mit Stößel erfolgt eine gleichmäßige Lyse der Wirtszellen beim Durchfluss der Zellsuspension durch die Kanülen. Dabei konnten Troese und Carlyon anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen erstmals zeigen, dass beide Entwicklungsformen (DCs und RCs) nach Aufreinigung mittels „syringe lysis“ aus HL-60-Zellen unversehrt erhalten werden konnten. (TROESE & CARLYON, 2009). Dies wurde im Rahmen weiterer Studien

ebenfalls bestätigt (HUANG et al., 2010a; HUANG et al., 2010b). Weiterhin ist beschrieben, dass durch den Einsatz von Ultraschall die Wirtszellen lysiert werden können. Allerdings führen die für zum Aufbrechen der Zellwand benötigten Ultraschallwellen zu einer Schädigung der fragilen RCs von *A. phagocytophilum*, weswegen diese Methode nur für die Anreicherung von DCs für Infektionsversuche verwendet werden kann (FELSHEIM et al., 2006).

In der vorliegenden Studie wurde der Einsatz des Mineralsands „rock tumbler grit“ zur Freisetzung von *A. phagocytophilum* aus HL-60-Zellen getestet. Der Einsatz dieses optimierten Protokolls ermöglicht dabei eine vereinfachte Handhabung der Proben und einen geringeren instrumentellen Aufwand. Die Methode wurde erstmal zur Gewinnung von *A. phagocytophilum*-DNA aus Zeckenzellkulturen und zur Isolierung von *E. chaffeensis*, welche ebenfalls in Zeckenzelllinien angezüchtet wurden, eingesetzt (CHENG et al., 2013). Zudem wurde ein Protokoll unter Einsatz von „rock tumbler grit“ verwendet, um *A. phagocytophilum* für einen Infektionsversuch aus HL-60-Zellen zu isolieren (WANG et al., 2015). Es war jedoch nicht bekannt, ob der Einsatz des Mineralsandes zur Lyse der Wirtszellen zu einer Schädigung der Erreger, speziell der fragilen RCs führt. Analog der ultrastrukturellen Darstellung von Troese und Carlyon zeigten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Rahmen dieser Studie, dass die DCs und RCs von *A. phagocytophilum* nach Anwendung des optimierten von „rock tumbler grit“-Protokolls intakt erhalten werden konnten. (Fig. 1, Publikation, Seite 36). Die Zählung lebender Bakterien nach Immunfluoreszenzfärbung ergab dabei eine Steigerung der Anzahl isolierter Bakterien um den Faktor 1,7 - 2,4 im Vergleich zum „syringe lysis“-Protokoll, was auf eine effektivere Wirtszellyse und auf geringere Verluste beim Handling während der Aufreinigung zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich mittels real-time PCR durch einen Anstieg der aus Zellkultur extrahierten bakteriellen DNA im gleichen Verhältnis bestätigt (Anhang, Tabelle A1). Eine relative Quantifizierung der Menge an freigesetzter bakterieller DNA fand dabei über die Etablierung eines artifiziellen Standards statt, über den eine Standardkurve errechnet wurde (Anhang Abb. A2). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Filtern im Vergleich zur Differentialzentrifugation zur Entfernung von Zelldebris mehr bakterielle DNA erhalten werden kann. Dafür erfolgte die Lyse infizierter Zellkulturen einheitlich mit der gleichen Methode - entweder „syringe lysis“ oder „rock tumbler grit“ - und

im Anschluss wurde der Zelldebris mittels Zentrifugation oder Filtration entfernt und die Menge an isolierter bakterieller DNA mittels real-time PCR verglichen (Anhang, Tabelle A2). Mikroskopische Aufnahmen zeigten, dass kleinere Zellkomponenten und geringe Mengen an Zelldebris in den wirtstellfreien Präparationen der Erreger verbleiben können. Daher wurden für die anschließenden Infektionsversuche parallel uninfizierte HL-60-Zellen auf die gleiche Art und Weise behandelt und aufgereinigt und für die Inokulation naiver Zellkulturen verwendet. So konnte im Vergleich bei den Infektionen neuer Zellkulturen ein Einfluss auf die Infektionsraten durch die verbliebenen Zellbruchstücke ausgeschlossen werden. In der Literatur ist eine Dichtezentrifugation (Ultrazentrifugation) mit unterschiedlichen Renografiekonzentrationen für die Aufbereitung hochaufgereinigter Präparationen wirtszellfreier Erreger beschrieben (CARLYON, 2005). Allerdings besitzen verschiedene Zellkomponenten z.B. Mitochondrien die gleiche Dichte und eine ähnliche Größe wie *A. phagocytophilum* und eine vollständige Fraktionierung der Bakterien von Wirtszellbestandteilen ist daher nicht gewährleistet. Für immunologische Untersuchungen müssen daher auch für hochaufgereinigte Ansätze isolierter Erreger die oben beschriebenen Kontrollen mitgeführt werden, um unspezifische Reaktionen oder Einflüsse durch Zelldebris ausschließen zu können.

Um die Infektiosität *in vitro* nach der Aufreinigung zu überprüfen, wurden naive Zellkulturen mit wirtszellfreien Präparaten von *A. phagocytophilum* infiziert. Die Isolierung der Erreger erfolgte dabei in parallelen Ansätzen, unter Einsatz der „syringe lysis“- und der „rock tumbler grit“-Methode. Die naiven Zellkulturen wurden anschließend mit den jeweiligen gewonnenen Erregersuspensionen infiziert und über die Anfertigung von Zytospinpräparaten täglich auf die Präsenz von „Morulae“ untersucht (Anhang, Tabelle A4). Der Verlauf der Infektion und die Infektionsrate wurden zusätzlich mittels Durchflusszytometrie detektiert (Fig. 3, Publikation, Seite 38). In alle Zellkulturen konnten Infektionen am ersten oder zweiten Tag *post infectionem* lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. In den Kulturen, welche mit dem nach „rock tumbler grit“-Protokoll hergestellten Ansätzen infiziert wurden, zeigte sich in den ersten Tagen eine größere Anzahl an infizierten HL-60-Zellen. Nach Einsetzen der logarithmischen Wachstumsphase kam es innerhalb von 5 - 7 Tagen zu einer vollständigen Infektion und zu einer Lyse der Wirtszellpopulation. Ein ähnlicher Infektionsverlauf ist auch für andere

humanpathogene Stämme von *A. phagocytophilum* beschrieben (YOSHIIIE et al., 2000). Für die Infektion naiver Kulturen wurde in allen Experimenten eine *Multiplicity of Infection* (MOI) von 1:1 angewendet (MOI 1:1 = Anzahl der für die Aufreinigung verwendeten infizierten Zellen im Verhältnis zu der Anzahl naiver Zellen) (BORJESSON, 2008). Trotzdem wurden bei den Versuchen Schwankungen der anfänglichen Infektionsrate 24 h *post infectionem* beobachtet. Diese Beobachtung wird auf einen unterschiedlichen Entwicklungsstand der Erreger zum Zeitpunkt der Entnahme für die Aufreinigung bzw. Infektion zurückgeführt. Es wurde gezeigt, dass die DCs infektiös sind und die in die Wirtszelle eindringen können, während die RCs zum Zeitpunkt der Genomreplikation vorliegen (TROESE & CARLYON, 2009). Die Infektionsrate einer Zellkultur wird nach Giemsa-Färbung über die Anzahl an Zellen mit sichtbaren „Morulae“ bestimmt. Lichtmikroskopisch lassen sich dabei jedoch nicht die DCs von den RCs unterscheiden. So können Zellkulturen mit gleicher Infektionsrate eine unterschiedliche Anzahl an infektiösen DCs besitzen, wodurch es bei Infektionen von naiven Zellkulturen auch zu einer unterschiedlichen Anzahl neu infizierter Zellen kommen kann. Auch die gleichzeitige Infektion einer Zelle mit mehreren Bakterien könnte zu unterschiedlichen Infektionsraten in den ersten Tagen *post infectionem* führen.

Die kulturelle Anzucht von *A. phagocytophilum* erfolgt im Labor meist unter Verwendung der humanen promyelotischen Leukämiezelllinie (HL-60), eine Vermehrung des Erregers kann jedoch ebenfalls in Zeckenzelllinien stattfinden (CARLYON, 2005; MASSUNG et al., 2006b). Das „rock tumbler grit“-Protokoll wurde zudem schon verwendet um *E. chaffeensis* aus Zeckenzellkulturen zu isolieren (WANG et al., 2017). Genau wie *A. phagocytophilum* zählt *E. chaffeensis* zu der Peptidoglykan-negativen Gruppe. Da beide Spezies eine sehr ähnliche Zellmorphologie sowie Replikationszyklus besitzen liegt die Vermutung nahe, dass die „rock tumbler grit“-Methode ebenfalls zur Aufreinigung von *A. phagocytophilum* aus Zeckenzellen verwendet werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung von *A. phagocytophilum* aus Zeckenzellen jedoch nicht getestet und muss in weiteren Experimenten erst bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Verwendung des Siliziums-Carbid-Gemisches „rock tumbler grit“ eine effektive Methode zur Lyse der Wirtszellen darstellt. Dabei ist das Verfahren schonend genug um sowohl die

DC und die RC Form von *A. phagocytophilum* intakt zu erhalten. Das optimierte „rock tumbler grit“-Protokoll führt im Vergleich zur „syringe lysis“-Methode zu einer höheren Ausbeute an freigesetzten Bakterien und ermöglicht gleichzeitig eine schnellere und vereinfachte Handhabung der Zellkulturproben, verbunden mit einem geringeren apparativen Aufwand. Zusätzlich wird das Infektionsrisiko durch versehentliche Stichverletzungen durch Kanülen eliminiert und bietet damit eine zuverlässige und sichere Methode zur Präparation von wirtszellfreien Ansätzen mit *A. phagocytophilum*.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Anaplasma phagocytophilum ist ein durch Zecken übertragenes, Gram-negatives Bakterium und Auslöser der granulozytären Anaplasiose. Der Erreger besitzt ein breites Wirtsspektrum und zeichnet sich in seinen eukaryotischen Wirten durch einen Zelltropismus zu neutrophilen Granulozyten aus. Zur Anpassung an die obligat intrazelluläre Entwicklung hat *A. phagocytophilum* eine spezielle Morphologie der Zellwand ausgebildet. Durch den Verlust der Peptidoglykanschicht und von Lipopolysacchariden ist eine dünne, elastische Zellhülle entstanden, welche eine räumlich angepasste Vermehrung der Bakterien in den zytoplasmatischen Vakuolen ermöglicht und zudem Schutz vor den Erkennungsmechanismen des angeborenen Immunsystems bietet. Allerdings geht diese strukturelle Besonderheit mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber mechanischem Stress, wie Ultraschall, Einfrieren oder Auftauen einher, sowie einer geringen Belastbarkeit gegenüber osmotischen Veränderungen. Die Kultivierung von *A. phagocytophilum* und die anschließende Isolierung des Pathogens aus der Zellkultur für weiterführende Untersuchungen sind daher mit besonderen Anforderungen verbunden.

Für die Isolierung intrazellulärer Bakterien aus der Zellkultur werden verschiedene mechanische Methoden verwendet. Aufgrund der Sensitivität von *A. phagocytophilum* gegenüber äußeren Einflüssen werden besonders schonende Techniken, wie das „syringe lysis“-Protokoll, für die Freisetzung der Erreger verwendet. Dieses Standardprotokoll ist jedoch mit einem hohen zeitlichen und instrumentellen Aufwand verbunden. Für eine effektivere und einfachere Aufbereitung von *A. phagocytophilum* aus der routinemäßig verwendeten humanen promyeloischen Leukämiezelllinie (HL-60) wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode unter Verwendung des Mineralsands „rock tumbler grit“ angewandt und überprüft. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde dabei die bakterielle Struktur, insbesondere die der Zellhülle, nach Aufreinigung der Erreger aus den Wirtszellen untersucht. Die ultrastrukturellen Darstellungen zeigten, dass beide morphologischen Entwicklungsformen von *A. phagocytophilum* – „dense-cored cells“ und „reticulate cells“ – mit einer intakten physischen Integrität isoliert werden konnten. Im weiteren Verlauf der Studie wurde ein quantitativer Vergleich der beiden Aufreinigungsprotokolle „syringe lysis“ und „rock tumbler grit“ mittels

Immunfluoreszenzfärbung und real-time PCR durchgeführt. So ergab die Auszählung vitaler, wirtszellfreier Bakterien nach Anwendung der „rock tumbler grit“-Methode eine Steigerung um den Faktor 1,7 - 2,4 im Vergleich zum „syringe lysis“-Protokoll. Dieses Resultat spiegelte sich auch in den Ergebnissen der real-time PCR wider, welche einen Anstieg der isolierten bakteriellen DNA um den Faktor 1,6 - 2,9 bei Verwendung des „rock tumbler grit“-Protokolls zeigten. Zusätzlich wurden die freigesetzten Erreger im Anschluss für die Infektion naiver HL-60-Zellen verwendet, um die *in-vitro*-Infektiösität zu überprüfen. Die Analyse der Infektionsrate erfolgte mittels Durchflusszytometrie und bestätigte, dass die größere Anzahl an freigesetzten Erregern ebenfalls in einem höheren Anteil neu infizierter Wirtszellen resultierte.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse dieser Studie durch eine effektivere Wirtszelllyse, geringe Verluste bei der Handhabung der Proben und eine optimierte Entfernung von Zelldebris über Filtration beim Einsatz des „rock tumbler grit“-Protokolls erklären. Zudem ermöglicht das optimierte Protokoll im Vergleich zur ansonsten häufig verwendeten herkömmlichen „syringe lysis“-Methode eine schnellere und vereinfachte Bearbeitung der Proben und reduziert das Infektionsrisiko durch versehentliche Verletzungen bei der Verwendung von Kanülen. Der Einsatz des „rock tumbler grit“-Protokolls stellt somit eine effektive und sichere Methode zur Aufreinigung von *A. phagocytophilum* aus HL-60-Zellen dar. Die erweiterte Anwendung der „rock tumbler grit“-Methode zur Aufreinigung von *A. phagocytophilum* aus verschiedenen Zeckenzelllinien könnte dabei Gegenstand zukünftiger Experimente sein, um wirtszellfreie Bakterien für verschiedene Untersuchungen zur Erreger-Wirts-Interaktion zu isolieren.

VI. SUMMARY

Anaplasma phagocytophilum is a tick-borne, Gram-negative bacteria and the causative agent of granulocytic anaplasmosis. The pathogen can infect various species of livestock, companion animals and also humans and shows a strong cell tropism to neutrophil granulocytes within eukaryotic host cells. The loss of peptidoglycan layer and lipopolysaccharides results in a thin and more flexible envelope of the cell, which enables the replication of bacteria in small cytoplasmatic vacuoles and the protection against different recognition mechanisms of the host innate immune system. However, this particular structure of the cell wall leads to an extreme sensitivity towards mechanical stress like such as sonication, freezing or thawing, and osmolarity changes. Thus, cultivation and subsequent isolation of *A. phagocytophilum* from cell cultures for a variety of *in vitro*-applications are associated with special requirements.

Different mechanical methods are widely used for bacterial purification. Due to the fact that *A. phagocytophilum* is very sensitive to changes of the osmolarity and mechanical stress, different less damaging methods such as „syringe lysis“ are used to obtain host cell-free bacteria. The „syringe lysis“-protocol is a basic method to recover *A. phagocytophilum* from cell cultures but it is associated with high effort and instrumental setting. An updated semi-purification method using „rock tumbler grit“ was introduced in this study to increase the outcome of bacteria and to facilitate the procedure of host cell lysis. For this reason, the structural integrity of the bacteria (in particular the cell wall) was assessed by transmission electron microscopy. The ultrastructural analysis showed that both forms of *A. phagocytophilum* during intracellular development – “dense-cored cells” and “reticulated cells” – were preserved intact after the application of „rock tumbler grit“. Afterwards the outcome of the two purification methods „syringe lysis“ and „rock tumbler grit“ was compared using live/dead staining based on immunofluorescence to count the number of viable bacteria and real-time PCR to compare the amount of DNA. It became evident, that the number of viable, host cell-free bacteria was higher by the factor of 1.7 - 2.4 using the „rock tumbler grit“-protocol compared to the „syringe lysis“-protocol. This result was confirmed by quantitative analysis based on real-time PCR, which showed an increase of bacterial DNA up to 1.6 - 2.9 times higher using the „rock tumbler grit“-protocol. Finally,

naive cell cultures of HL-60 cells were infected to see whether the bacteria were still equally infectious after exposure to high mechanical stress caused by lysis of the host cells using „rock tumbler grit“. To analyze the population of infected host cells flow cytometry was performed. The larger number of isolated bacteria using the „rock tumbler grit“-protocol lead to higher infection rates and therefore to a faster course of infection and finally lysis of the host cell population respectively.

In summary the results of this study indicate that the „rock tumbler grit“-protocol leads to an increase of host cell-free bacteria due to an effective host cell lysis and only few losses of bacteria during the purification procedure. Furthermore, a higher yield of bacterial DNA could be obtained using filtration to remove cellular debris compared to centrifugation. The updated protocol facilitates the procedure for host cell lysis and semi-purification and allows a faster and easier handling of the samples. Thus, time for preparation of the samples is reduced and a minor instrumental effort is required. Moreover, it prevents accidental needle stick injuries and provides a convenient and safer way for the recovery of host cell-free bacteria from HL-60 cells. The application of „rock tumbler grit“ to recover *A. phagocytophilum* from different tick cell cultures could be subject of further experiments and might be a useful tool to isolate host cell-free bacteria for a various investigations of the pathogen-host interaction.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelrahman YM, Belland RJ. The chlamydial developmental cycle. FEMS Microbiol Rev 2005; 29: 949-59.

Adaszek L, Górna M, Skrzypczak M, Buczek K, Balicki I, Winiarczyk S. Three clinical cases of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in Poland. J Feline Med Surg 2013; 15: 333-7.

Aguero-Rosenfeld ME, Horowitz HW, Wormser GP, McKenna DF, Nowakowski J, Munoz J, Dumler JS. Human granulocytic ehrlichiosis: a case series from a medical center in New York State. Ann Intern Med 1996; 125: 904-8.

Aguero-Rosenfeld ME. Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis: state of the art. Vector Borne Zoonotic Dis 2002; 2: 233-9.

Akkoyunlu M, Malawista SE, Anguita J, Fikrig E. Exploitation of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. Infect Immun 2001; 69: 5577-88.

Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Pinna Parpaglia ML, Cubeddu T, Pintori G, Pittau M. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 6418-22.

Alekseev AN, Dubinina HV, Semenov AV, Bolshakov CV. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. J Med Entomol 2001; 38: 471-4.

ATCC. HL-60 (ATCC CCL-20™) CULTURE METHOD. 2018: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-240.aspx?geo_country=de#culturemethod. 15 September 2018.

Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *Jama* 1994; 272: 212-8.

Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, Tilden RL, Asanovich K, Dumler JS. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *Jama* 1996a; 275: 199-205.

Bakken JS, Krueth JK, Lund T, Malkovitch D, Asanovich K, Dumler JS. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 1996b; 23: 198.

Bakken JS, Haller I, Riddell D, Walls JJ, Dumler JS. The serological response of patients infected with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 22-7.

Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078: 236-47.

Bakken JS, Dumler S. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22: 433-48, viii.

Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 2015; 29: 341-55.

Baldrige GD, Scoles GA, Burkhardt NY, Schloeder B, Kurtti TJ, Munderloh UG. Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2009; 46: 625-32.

Barbet AF, Al-Khedery B, Stuen S, Granquist EG, Felsheim RF, Munderloh UG. An emerging tick-borne disease of humans is caused by a subset of strains with conserved genome structure. *Pathogens* 2013; 2: 544-55.

Barlough JE, Madigan JE, Turoff DR, Clover JR, Shelly SM, Dumler JS. An Ehrlichia strain from a llama (*Lama glama*) and Llama-associated ticks (*Ixodes pacificus*). J Clin Microbiol 1997; 35: 1005-7.

Barth C, Straubinger RK, Muller E, Sauter-Louis C, Hartmann K. Comparison of different diagnostic tools for the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in dogs. Vet Clin Pathol 2014; 43: 180-4.

Bayard-Mc Neeley M, Bansal A, Chowdhury I, Girao G, Small CB, Seiter K, Nelson J, Liveris D, Schwartz I, Mc Neeley DF, Wormser GP, Agüero-Rosenfeld ME. In vivo and in vitro studies on *Anaplasma phagocytophilum* infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Pathol 2004; 57: 499-503.

Beaufils JP (1997) Ehrlichiosis: Clinical aspects in dogs and cats. International Forum on Ticks and Tick-Borne Disease, Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 57-61

Bell-Sakyi L, Zwegarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. Trends Parasitol 2007; 23: 450-7.

Benson SA. Chapter 2 The bacterial outer membrane and surface permeability. In: Principles of Medical Biology. Bittar EE, Bittar N, eds.: Elsevier 1998: 15-22.

Bjoersdorff A, Svendenius L, Owens JH, Massung RF. Feline granulocytic ehrlichiosis--a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. J Small Anim Pract 1999; 40: 20-4.

Borjesson DL, Barthold SW. The mouse as a model for investigation of human granulocytic ehrlichiosis: current knowledge and future directions. Comp Med 2002; 52: 403-13.

Borjesson DL. Culture, isolation, and labeling of *Anaplasma phagocytophilum* for subsequent infection of human neutrophils. Methods Mol Biol 2008; 431: 159-71.

Bowman D, Little SE, Lorentzen L, Shields J, Sullivan MP, Carlin EP. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. *Vet Parasitol* 2009; 160: 138-48.

Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Petrovec M, Shaw SE, Woldehiwet Z, Birtles RJ. High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1771-6.

Bown KJ, Lambin X, Telford G, Heyder-Bruckner D, Ogden NH, Birtles RJ. The common shrew (*Sorex araneus*): a neglected host of tick-borne infections? *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 947-53.

Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell veterinarian* 1986; 76: 61-90.

Brodie TA, Holmes PH, Urquhart GM. Some aspects of tick-borne diseases of British sheep. *Vet Rec* 1986; 118: 415-8.

Carlyon JA, Chan WT, Galan J, Roos D, Fikrig E. Repression of *rac2* mRNA expression by *Anaplasma phagocytophila* is essential to the inhibition of superoxide production and bacterial proliferation. *J Immunol* 2002; 169: 7009-18.

Carlyon JA, Akkoyunlu M, Xia L, Yago T, Wang T, Cummings RD, McEver RP, Fikrig E. Murine neutrophils require alpha1,3-fucosylation but not PSGL-1 for productive infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Blood* 2003; 102: 3387-95.

Carlyon JA, Fikrig E. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* 2003; 5: 743-54.

Carlyon JA. Laboratory Maintenance of *Anaplasma phagocytophilum*. *Curr Protoc Microbiol* 2005; Chapter 3: Unit 3A.2.

Carrade DD, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1129-41.

Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and Statistics of Anaplasmosis. 2018a; 28.07.2018: <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats/index.html>. 02 August.

Centers for Disease Control and Prevention. Anaplasmosis. Symptoms, Diagnosis and Treatment. 2018b; 19.04.2018: <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/symptoms/index.html>. 04 April.

Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol 1994; 32: 589-95.

Cheng C, Nair ADS, Indukuri VV, Gong S, Felsheim RF, Jaworski D, Munderloh UG, Ganta RR. Targeted and Random Mutagenesis of *Ehrlichia chaffeensis* for the Identification of Genes Required for In vivo Infection. PLoS Pathogens 2013; 9: e1003171.

Choi KS, Garyu J, Park J, Dumler JS. Diminished adhesion of *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils to endothelial cells is associated with reduced expression of leukocyte surface selectin. Infect Immun 2003; 71: 4586-94.

Choi KS, Dumler JS. Early induction and late abrogation of respiratory burst in *A. phagocytophilum*-infected neutrophils. Ann N Y Acad Sci 2003; 990: 488-93.

Choi KS, Park JT, Dumler JS. *Anaplasma phagocytophilum* delay of neutrophil apoptosis through the p38 mitogen-activated protein kinase signal pathway. Infect Immun 2005; 73: 8209-18.

Cohen MS. Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. Clin Infect Dis 1994; 18 Suppl 2: S170-9.

Cohn LA. Ehrlichiosis and related infections. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003; 33: 863-84.

Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature 1977; 270: 347-9.

Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 1987; 70: 1233-44.

Courtney JW, Dryden RL, Montgomery J, Schneider BS, Smith G, Massung RF. Molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks from Pennsylvania. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1569-73.

Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3164-8.

Cranwell MP, Gibbons JA. Tick-borne fever in dairy herd. *Vet Rec* 1986; 119: 531-2.

Dark MJ, Lundgren AM, Barbet AF. Determining the repertoire of immunodominant proteins via whole-genome amplification of intracellular pathogens. *PLoS One* 2012; 7: e36456.

De La Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Höfle U, Fernández De Mera IG, Villanúa D, Almazán C, Torina A, Caracappa S, Kocan KM, Gortázar C. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5: 390-401.

Des Vignes F, Levin ML, Fish D. Comparative vector competence of *Dermacentor variabilis* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) for the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Med Entomol* 1999; 36: 182-5.

Des Vignes F, Piesman J, Heffernan R, Schulze TL, Stafford KC, Fish D. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 2001; 183: 773-8.

Drazenovich N, Foley J, Brown RN. Use of real-time quantitative PCR targeting the *msp2* protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animals. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006; 6: 83-90.

Dugat T, Loux V, Marthey S, Moroldo M, Lagrée A-C, Boulouis H-J, Haddad N, Maillard R. Comparative genomics of first available bovine *Anaplasma phagocytophilum* genome obtained with targeted sequence capture. *BMC genomics* 2014; 15: 973.

Dugat T, Lagrée A-C, Maillard R, Boulouis H-J, Haddad N. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5: 61.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 2145-65.

Dumler JS, Asanovich KM, Bakken JS. Analysis of Genetic Identity of North American *Anaplasma phagocytophilum* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3392-4.

Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis* 2007; 45 Suppl 1: S45-51.

Dumler JS. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 64: 13-20.

Dunning Hotopp JC, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli SV, Eisen J, Seshadri R, Ren Q, Wu M, Utterback TR. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS genetics* 2006; 2: e21.

Dyachenko V, Geiger C, Pantchev N, Majzoub M, Bell-Sakyi L, Krupka I, Straubinger RK. Isolation of canine *Anaplasma phagocytophilum* strains from clinical blood samples using the *Ixodes ricinus* cell line IRE/CTVM20. *Vet Microbiol* 2013; 162: 980-6.

Dzięgiel B, Adaszek Ł, Kalinowski M, Winiarczyk S. Equine granulocytic anaplasmosis. *Res Vet Sci* 2013; 95: 316-20.

Egenvall A, Bjoersdorff A, Lilliehook I, Olsson Engvall E, Karlstam E, Artursson K, Hedhammar A, Gunnarsson A. Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia* species isolate. *Vet Rec* 1998; 143: 412-7.

Egenvall A, Lilliehöök I, Bjoersdorff A, Engvall EO, Karlstam E, Artursson K, Heldtander M, Gunnarsson A. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet Rec* 2000; 146: 186-90.

Egenvall AE, Hedhammar AA, Bjoersdorff AI. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec* 1997; 140: 222-6.

Ekman AK, Cardell LO. The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. *Immunology* 2010; 130: 55-63.

Engvall EO, Pettersson B, Persson M, Artursson K, Johansson KE. A 16S rRNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses, and cattle. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2170-4.

Felek S, Telford S, Falco RC, Rikihisa Y. Sequence analysis of p44 homologs expressed by *Anaplasma phagocytophilum* in infected ticks feeding on naive hosts and in mice infected by tick attachment. *Infect Immun* 2004; 72: 659-66.

Felsheim RF, Herron MJ, Nelson CM, Burkhardt NY, Barbet AF, Kurtti TJ, Munderloh UG. Transformation of *Anaplasma phagocytophilum*. *BMC Biotechnol* 2006; 6: 42.

Foggie A. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1951; 63: 1-15.

Foggie A (1962) Studies on tick pyaemia and tick-borne fever. *Symp. Zoo. Soc. Lond.* 51-8

Foley J, Nieto NC, Madigan J, Sykes J. Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the Western United States. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1149: 94-7.

Franzén P, Aspan A, Egenvall A, Gunnarsson A, Aberg L, Pringle J. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 232-9.

Franzén P, Aspan A, Egenvall A, Gunnarsson A, Karlstam E, Pringle J. Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 636-42.

Gabriel MW, Brown RN, Foley JE, Higley JM, Botzler RG. Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* infection in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) in northwestern California. *J Wildl Dis* 2009; 45: 344-54.

Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie K, Ahearn M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1979; 54: 713-33.

Garcia-Garcia JC, Rennoll-Bankert KE, Pelly S, Milstone AM, Dumler JS. Silencing of host cell CYBB gene expression by the nuclear effector AnkA of the intracellular pathogen *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun* 2009; 77: 2385-91.

Garyu JW, Choi KS, Grab DJ, Dumler JS. Defective phagocytosis in *Anaplasma phagocytophilum*-infected neutrophils. *Infect Immun* 2005; 73: 1187-90.

Goel R, Westblade LF, Kessler DA, Sfeir M, Slavinski S, Backenson B, Gebhardt L, Kane K, Laurence J, Scherr D, Bussel J, Dumler JS, Cushing MM. Death from Transfusion-Transmitted Anaplasmosis, New York, USA, 2017. *Emerg Infect Dis* 2018; 24: 1548-50.

Gokce HI, Ross G, Woldehiwet Z. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in ovine polymorphonuclear leucocytes by *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*. J Comp Pathol 1999; 120: 369-81.

Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Kurtti TJ, Munderloh UG. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. N Engl J Med 1996; 334: 209-15.

Goodman JL, Nelson CM, Klein MB, Hayes SF, Weston BW. Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. Journal of Clinical Investigation 1999; 103: 407-12.

Gordon W, Brownlee A, Wilson D (1940) Studies in louping-ill, tick-borne fever and scrapie. Proceedings: 3rd International Congress of Microbiology. 362-3

Gordon WS, Brownlee A, Wilson DR, Macleod J. Tick-Borne Fever: A Hitherto Undescribed Disease of Sheep. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics 1932; 45: 301-7.

Granquist EG, Aleksandersen M, Bergstrom K, Dumler SJ, Torsteinbo WO, Stuen S. A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. Acta Vet Scand 2010; 52: 43.

Greene GE (2012) Infectious Diseases Of The Dog And The Cat, 4 edn. Saunders, Philadelphia. 1376

Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. J Clin Microbiol 1996; 34: 44-8.

Greig B, Armstrong PJ. Canine granulocytotropic anaplasmosis (*A. phagocytophilum* Infection). Infectious Diseases of the Dog and the Cat. Greene CE, ed. Philadelphia: Saunders Elsevier 2006 2006: 219-24.

- Gribble DH. Equine ehrlichiosis. J Am Vet Med Assoc 1969; 155: 462-9.
- Hagedorn P, Imhoff M, Fischer C, Domingo C, Niedrig M. Human granulocytic anaplasmosis acquired in Scotland, 2013. Emerg Infect Dis 2014; 20: 1079-81.
- Hartelt K, Pluta S, Oehme R, Kimmig P. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. Parasitol Res 2008; 103 Suppl 1: S109-16.
- Heikkila HM, Bondarenko A, Mihalkov A, Pfister K, Spillmann T. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. Acta Vet Scand 2010; 52: 62.
- Heine S, Thiet W, Liebisch G. Anaplasmose beim Hund - Fallbericht. Der praktische Tierarzt 2007; 88: 20-7.
- Henning K, Sting R. Filtrationsmethode zur Isolierung von Chlamydien aus mikrobiell-kontaminiertem Probenmaterial. Tierärztliche Umschau 1999; 54: 274-7.
- Herron MJ, Nelson CM, Larson J, Snapp KR, Kansas GS, Goodman JL. Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. Science 2000; 288: 1653-6.
- Herron MJ, Ericson ME, Kurtti TJ, Munderloh UG. The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. Ann N Y Acad Sci 2005; 1063: 374-82.
- Hildebrandt A, Franke J, Meier F, Sachse S, Dorn W, Straube E. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. Ticks Tick Borne Dis 2010; 1: 105-7.
- Hodzic E, Fish D, Maretzki CM, De Silva AM, Feng S, Barthold SW. Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. J Clin Microbiol 1998a; 36: 3574-8.

Hodzic E, Ijdo JW, Feng S, Katavolos P, Sun W, Maretzki CH, Fish D, Fikrig E, Telford SR, 3rd, Barthold SW. Granulocytic ehrlichiosis in the laboratory mouse. *J Infect Dis* 1998b; 177: 737-45.

Höltje J-V. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62: 181-203.

Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Agüero-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK, Wong SJ, Chu F, Liveris D, Schwartz I. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med* 1998; 339: 375-8.

Huang B, Troese MJ, Howe D, Ye S, Sims JT, Heinzen RA, Borjesson DL, Carlyon JA. *Anaplasma phagocytophilum* APH_0032 is expressed late during infection and localizes to the pathogen-occupied vacuolar membrane. *Microb Pathog* 2010a; 49: 273-84.

Huang B, Troese MJ, Ye S, Sims JT, Galloway NL, Borjesson DL, Carlyon JA. *Anaplasma phagocytophilum* APH_1387 Is Expressed throughout Bacterial Intracellular Development and Localizes to the Pathogen-Occupied Vacuolar Membrane. *Infect Immun* 2010b; 78: 1864-73.

Hudson JR. The recognition of tick-borne fever as a disease of cattle. *British Veterinary Journal* 1950; 106: 3-17.

Hulínská D, Langrová K, Pejcoch M, Pavlásek I. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. *Apmis* 2004; 112: 239-47.

Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *Clinics in laboratory medicine* 2010; 30: 261-92.

Jäderlund KH, Egenvall A, Bergstrom K, Hedhammar A. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. *Vet Rec* 2007; 160: 825-31.

Jäderlund KH, Bergström K, Egenvall A, Hedhammar A. Cerebrospinal fluid PCR and antibody concentrations against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in dogs with neurological signs. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 669-72.

Kahl O, Gern L, Eisen L, Lane RS. Ecological research on *Borrelia burgdorferi sensu lato*: Terminology and some methodological pitfalls. In: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G, eds. U.K.: CABI 2002: 29-46.

Katavolos P, Armstrong PM, Dawson JE, Telford SR, 3rd. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 1998; 177: 1422-5.

Klein MB, Miller JS, Nelson CM, Goodman JL. Primary bone marrow progenitors of both granulocytic and monocytic lineages are susceptible to infection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 1997; 176: 1405-9.

Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1289-95.

Levin ML, Fish D. Immunity Reduces Reservoir Host Competence of *Peromyscus leucopus* for *Ehrlichia phagocytophila*. *Infect Immun* 2000; 68: 1514-8.

Lewis GE, Jr., Huxsoll DL, Ristic M, Johnson AJ. Experimentally induced infection of dogs, cats, and nonhuman primates with *Ehrlichia equi*, etiologic agent of equine ehrlichiosis. *Am J Vet Res* 1975; 36: 85-8.

Lin M, Rikihisa Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect Immun* 2003; 71: 5324-31.

Lindl TG, G. (2008) Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank, 6 edn. Springer Verlag, Heidelberg. 406

Little SE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 1121-40.

Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, Brossard M. PCR Detection of Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* Ticks and Wild Small Mammals in Western Switzerland. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1002-7.

Madewell BR, Gribble DH. Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichia equi*. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 512-4.

Madigan JE, Gribble D. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). *J Am Vet Med Assoc* 1987; 190: 445-8.

Madigan JE, Pusterla N. Ehrlichial diseases. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2000; 16: 487-99, ix.

Magnarelli LA, Ijdo JW, Van Andel AE, Wu C, Fikrig E. 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* 2001; 62: 29-32.

Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 717-22.

Massung RF, Priestley RA, Miller NJ, Mather TN, Levin ML. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *J Infect Dis* 2003a; 188: 1757-63.

Massung RF, Mather TN, Priestley RA, Levin ML. Transmission efficiency of the AP-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophila*. *Ann N Y Acad Sci* 2003b; 990: 75-9.

Massung RF, Courtney JW, Hiratzka SL, Pitzer VE, Smith G, Dryden RL. *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1604-6.

Massung RF, Mather TN, Levin ML. Reservoir competency of goats for the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun* 2006a; 74: 1373-5.

Massung RF, Levin ML, Munderloh UG, Silverman DJ, Lynch MJ, Kurtti TJ. Isolation of *Anaplasma phagocytophilum* strain Ap-variant 1 in a tick-derived cell line. *Ann N Y Acad Sci* 2006b; 1078: 541-4.

Massung RF, Levin ML, Munderloh UG, Silverman DJ, Lynch MJ, Gaywee JK, Kurtti TJ. Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2138-43.

Materna J, Daniel M, Danielová V. Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health* 2005; 13: 24-8.

McCaul TF, Williams JC. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *Journal of Bacteriology* 1981; 147: 1063-76.

McFee RB. Tick borne illness - Anaplasmosis. *Dis Mon* 2018; 64: 181-4.

Mott J, Barnewall RE, Rikihisa Y. Human granulocytic ehrlichiosis agent and *Ehrlichia chaffeensis* reside in different cytoplasmic compartments in HL-60 cells. *Infect Immun* 1999; 67: 1368-78.

Munderloh UG, Kurtti TJ. Formulation of medium for tick cell culture. *Exp Appl Acarol* 1989; 7: 219-29.

Munderloh UG, Liu Y, Wang M, Chen C, Kurtti TJ. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 1994; 80: 533-43.

Munderloh UG, Madigan JE, Dumler JS, Goodman JL, Hayes SF, Barlough JE, Nelson CM, Kurtti TJ. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 664-70.

Munderloh UG, Jauron SD, Fingerle V, Leitritz L, Hayes SF, Hautman JM, Nelson CM, Huberty BW, Kurtti TJ, Ahlstrand GG, Greig B, Mellencamp MA, Goodman JL. Invasion and Intracellular Development of the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in Tick Cell Culture. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2518-24.

Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtti TJ, Nelson RD, Goodman JL. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet Microbiol* 2004; 101: 53-64.

Neyen C, Lemaitre B. Sensing Gram-negative bacteria: a phylogenetic perspective. *Curr Opin Immunol* 2016; 38: 8-17.

Nicholson WL, Muir S, Sumner JW, Childs JE. Serologic evidence of infection with *Ehrlichia* spp. in wild rodents (Muridae: Sigmodontinae) in the United States. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 695-700.

Nieto NC, Foley JE. Evaluation of squirrels (Rodentia: Sciuridae) as ecologically significant hosts for *Anaplasma phagocytophilum* in California. *J Med Entomol* 2008; 45: 763-9.

Nieto NC, Foley JE, Bettaso J, Lane RS. Reptile infection with *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of granulocytic anaplasmosis. *J Parasitol* 2009; 95: 1165-70.

Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M. Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the UK. *Medical and veterinary entomology* 1998; 12: 423-9.

Ogden NH, Casey ANJ, Woldehiwet Z, French NP. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* Ticks from Sheep in the Acute and Post-Acute Phases of Infection. *Infect Immun* 2003; 71: 2071-8.

Ogden NH, Lindsay LR, Hanincova K, Barker IK, Bigras-Poulin M, Charron DF, Heagy A, Francis CM, O'Callaghan CJ, Schwartz I, Thompson RA. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 1780-90.

Otten C, Brill M, Vollmer W, Viollier PH, Salje J. Peptidoglycan in obligate intracellular bacteria. *Mol Microbiol* 2018; 107: 142-63.

Pedra JH, Narasimhan S, Rendic D, DePonte K, Bell-Sakyi L, Wilson IB, Fikrig E. Fucosylation enhances colonization of ticks by *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* 2010; 12: 1222-34.

Philip CB. Tribe, II Ehrlichieae Philip 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 1974: 893-7.

Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 796-801.

Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol* 1998; 47: 235-51.

Pusterla N, Braun U, Wolfensberger C, Lutz H. Intrauterine infection with *Ehrlichia phagocytophila* in a cow. *Vet Rec* 1997; 141: 101-2.

Pusterla N, Leutenegger CM, Chae JS, Lutz H, Kimsey RB, Dumler JS, Madigan JE. Quantitative evaluation of ehrlichial burden in horses after experimental transmission of human granulocytic *Ehrlichia* agent by intravenous inoculation with infected leukocytes and by infected ticks. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 4042-4.

Pusterla N, Madigan JE. Equine Granulocytic Anaplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013; 33: 493-6.

Rar V, Golovljova I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus Neoehrlichia*" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 1842-61.

Reichard MV, Roman RM, Kocan KM, Blouin EF, de la Fuente J, Snider TA, Heinz RE, West MD, Little SE, Massung RF. Inoculation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with Ap-V1 Or NY-18 strains of *Anaplasma phagocytophilum* and microscopic demonstration of Ap-V1 In *Ixodes scapularis* adults that acquired infection from deer as nymphs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; 9: 565-8.

Rikihisa Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 286-308.

Rikihisa Y, Zhi N, Wormser GP, Wen B, Horowitz HW, Hechemy KE. Ultrastructural and Antigenic Characterization of a Granulocytic Ehrlichiosis Agent Directly Isolated and Stably Cultivated from a Patient in New York State. *The Journal of Infectious Diseases* 1997; 175: 210-3.

Rikihisa Y. Clinical and biological aspects of infection caused by *Ehrlichia chaffeensis*. *Microbes Infect* 1999; 1: 367-76.

Rikihisa Y. *Ehrlichia* subversion of host innate responses. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 95-101.

Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 328-39.

Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 469-89.

RKI (2014) Epidemiologisches Bulletin. Robert Koch Institut

Rolle M, Mayr A (2011) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9 edn. Enke Verlag, Stuttgart. 710

Sainz Á, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors* 2015; 8: 75.

Scaife H, Woldehiwet Z, Hart CA, Edwards SW. *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Infect Immun* 2003; 71: 1995-2001.

Schaff UY, Trott KA, Chase S, Tam K, Johns JL, Carlyon JA, Genetos DC, Walker NJ, Simon SI, Borjesson DL. Neutrophils exposed to *A. phagocytophilum* under shear stress fail to fully activate, polarize, and transmigrate across inflamed endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C87-96.

Severo MS, Stephens KD, Kotsyfakis M, Pedra JH. *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiol* 2012; 7: 719-31.

Silaghi C, Liebisch G, Pfister K. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasit Vectors* 2011a; 4: 161.

Silaghi C, Kauffmann M, Passos LM, Pfister K, Zweggarth E. Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. *Ticks Tick Borne Dis* 2011b; 2: 204-8.

Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010; 2: a000414.

Skuballa J, Petney T, Pfaffle M, Taraschewski H. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and its ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10: 1055-7.

Sonenshine DE, Roe RM (1993) *Biology of Ticks* Oxford University Press, New York. 491

Stanek G. Büchse der Pandora: Krankheitserreger in *Ixodes ricinus*-Zecken in Mitteleuropa. *Wiener klinische Wochenschrift* 2009; 121: 673-83.

Stannard AA, Gribble DH, Smith RS. Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. *Vet Rec* 1969; 84: 149-50.

Stuen S, Artursson K, Olsson Engvall E. Experimental infection of lambs with an equine granulocytic *Ehrlichia* species resembling the agent that causes human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *Acta Vet Scand* 1998; 39: 491-7.

Stuen S, Handeland K, Frammarsvik T, Bergstrom K. Experimental *Ehrlichia phagocytophila* infection in red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Rec* 2001; 149: 390-2.

Stuen S, Nevland S, Moum T. Fatal cases of Tick-borne fever (TBF) in sheep caused by several 16S rRNA gene variants of *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990: 433-4.

Stuen S, Oppegaard AS, Bergström K, Moum T. *Anaplasma phagocytophilum* infection in north Norway. The first laboratory confirmed case. *Acta Vet Scand* 2005; 46: 167-71.

Stuen S. Tick-Borne Fever (*Anaplasma phagocytophilum* Infection) in Sheep—A Review. *Journal of Veterinary Medicine and Research* 2006; 3: 1062.

Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol* 2013a; 3: 31.

Stuen S, Pettersen KS, Granquist EG, Bergstrom K, Bown KJ, Birtles RJ. *Anaplasma phagocytophilum* variants in sympatric red deer (*Cervus elaphus*) and sheep in southern Norway. *Ticks Tick Borne Dis* 2013b; 4: 197-201.

Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Anil Kumar V, Biswas R. Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. *Microbiol Res* 2013; 168: 396-406.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-76.

Teglas MB, Foley J. Differences in the transmissibility of two *Anaplasma phagocytophilum* strains by the North American tick vector species, *Ixodes pacificus* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 2006; 38: 47-58.

Telford SR, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6209-14.

Thiele WK. Neue Möglichkeiten zur Diagnose des Q - Fiebers und zur Differenzierung des Erregers. *Berliner Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 1992; 105: 045-9.

Thomas V, Fikrig E. *Anaplasma phagocytophilum* specifically induces tyrosine phosphorylation of ROCK1 during infection. *Cell Microbiol* 2007; 9: 1730-7.

Troese MJ, Carlyon JA. *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infect Immun* 2009; 77: 4018-27.

Tuomi J. 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* 1967; 70: 429-45.

Víchová B, Majláthová V, Nováková M, Straka M, Pet'ko B. First molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in European brown bear (*Ursus arctos*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10: 543-5.

Vor T, Kiffner C, Hagedorn P, Niedrig M, Ruhe F. Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Exp Appl Acarol* 2010; 51: 405-17.

Wang J, Dyachenko V, Munderloh UG, Straubinger RK. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* from endothelial cells to peripheral granulocytes in vitro under shear flow conditions. *Med Microbiol Immunol* 2015; 204: 593-603.

Wang T, Malawista SE, Pal U, Grey M, Meek J, Akkoyunlu M, Thomas V, Fikrig E. Superoxide anion production during *Anaplasma phagocytophila* infection. *J Infect Dis* 2002; 186: 274-80.

Wang Y, Wei L, Liu H, Cheng C, Ganta RR. A genetic system for targeted mutations to disrupt and restore genes in the obligate bacterium, *Ehrlichia chaffeensis*. *Scientific Reports* 2017; 7: 15801.

Webster P, JW II, Chicoine LM, Fikrig E. The agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis resides in an endosomal compartment. *J Clin Invest* 1998; 101: 1932-41.

Wientjes FB, Segal AW. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin Cell Biol* 1995; 6: 357-65.

Woldehiwet Z. Tick-borne fever: A review. *Veterinary Research Communications* 1983; 6: 163-75.

Woldehiwet Z. The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. *J Comp Pathol* 1987; 97: 481-5.

Woldehiwet Z, Horrocks BK, Scaife H, Ross G, Munderloh UG, Bown K, Edwards SW, Hart CA. Cultivation of an ovine strain of *Ehrlichia phagocytophila* in tick cell cultures. *J Comp Pathol* 2002; 127: 142-9.

Woldehiwet Z. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078: 446-60.

Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 2010; 167: 108-22.

Yoshiie K, Kim HY, Mott J, Rikihisa Y. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. *Infect Immun* 2000; 68: 1125-33.

Zeidner NS, Burkot TR, Massung R, Nicholson WL, Dolan MC, Rutherford JS, Biggerstaff BJ, Maupin GO. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in Northern Colorado. *J Infect Dis* 2000; 182: 616-9.

Zhang JZ, Popov VL, Gao S, Walker DH, Yu XJ. The developmental cycle of *Ehrlichia chaffeensis* in vertebrate cells. *Cell Microbiol* 2007; 9: 610-8.

Zhang L, Liu Y, Ni D, Li Q, Yu Y, Yu XJ, Wan K, Li D, Liang G, Jiang X, Jing H, Run J, Luan M, Fu X, Zhang J, Yang W, Wang Y, Dumler JS, Feng Z, Ren J, Xu J. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *Jama* 2008; 300: 2263-70.

Zweygarth E, Josemans AI, Spickett AM, Steyn HC, Putterill J, Troskie PC, Mtshali MS, Bell-Sakyi L, Shkap V, Fish L, Kocan KM, Blouin EF. In vitro cultivation of a south African isolate of an *Anaplasma* sp. in tick cell cultures. *Onderstepoort J Vet Res* 2006; 73: 251-5.

VIII. ANHANG

A	Vergleich: PCR - Ct Werte				
	1.	2.	3.	4.	5.
"syringe lysis"	23,55	24,08	21,72	21,94	25,11
"rock tumbler grit"	22,82	22,79	20,12	20,78	23,63
Differenz	0,73	1,29	1,60	1,16	1,48

B	Vergleich: PCR - Gesamtkopienanzahl				
	1.	2.	3.	4.	5.
"syringe lysis"	164.000	115.000	679.667	585.667	70.600
"rock tumbler grit"	267.000	265.417	1.966.667	1.270.000	189.333
Vielfaches	1,63	2,31	2,89	2,17	2,68

Tabelle A1: Relative Quantifizierung und Vergleich der Aufreinigungsprotokolle mittels qPCR
Zur Aufreinigung der bakteriellen DNA von *Anaplasma phagocytophilum* aus HL-60-Zellkulturen wurden die beiden Methoden „syringe lysis“ und „rock tumbler grit“ im Vergleich angewendet. Zur Bestimmung der Menge an freigesetzter DNA wurde nach Extraktion eine real-time PCR mit dem *msp4*-Gen als Zielsequenz durchgeführt [A]. Eine relative Quantifizierung erfolgte dabei über den Einsatz eines externen Standards zur Errechnung der Gesamtkopienanzahl [B].

A	Vergleich: Filtration vs. Zentrifugation - Ct Werte				
	1.	2.	3.	4.	5.
Zentrifugation	21,94	20,78	25,46	24,24	27,77
Filtration	21,72	20,12	25,11	23,63	27,07
Differenz	0,22	0,66	0,35	0,61	0,70

B	Vergleich: Filtration vs. Zentrifugation - Gesamtkopienanzahl				
	1.	2.	3.	4.	5.
Zentrifugation	585.667	1.270.000	55.967	125.667	11.933
Filtration	679.667	1.966.667	70.600	189.333	19.000
Vielfaches	1,16	1,55	1,26	1,51	1,59

Tabelle A2: Relative Quantifizierung und Vergleich der Methoden zur Entfernung von Zellbruchstücken nach Wirtszelllyse

Zur Isolierung der bakteriellen DNA wurde über Differentialzentrifugation oder durch den Einsatz spezieller Filter die Zellbruchstücke entfernt. Die Lyse der Wirtszellen erfolgte in Durchlauf 1 und 2 mittels „syringe lysis“ und im Durchlauf 3, 4 und 5 mittels „rock tumbler grit“. Im Anschluss erfolgte über real-time PCR [A] und mit Hilfe eines externen Standards eine relative Quantifizierung und ein Vergleich zwischen Filtration und Zentrifugation [B]. Dabei zeigte sich durchgängig, dass durch den Einsatz von Filtern eine größere Menge DNA von *Anaplasma phagocytophilum* nach Freisetzung aus den Wirtszellen gewonnen werden kann.

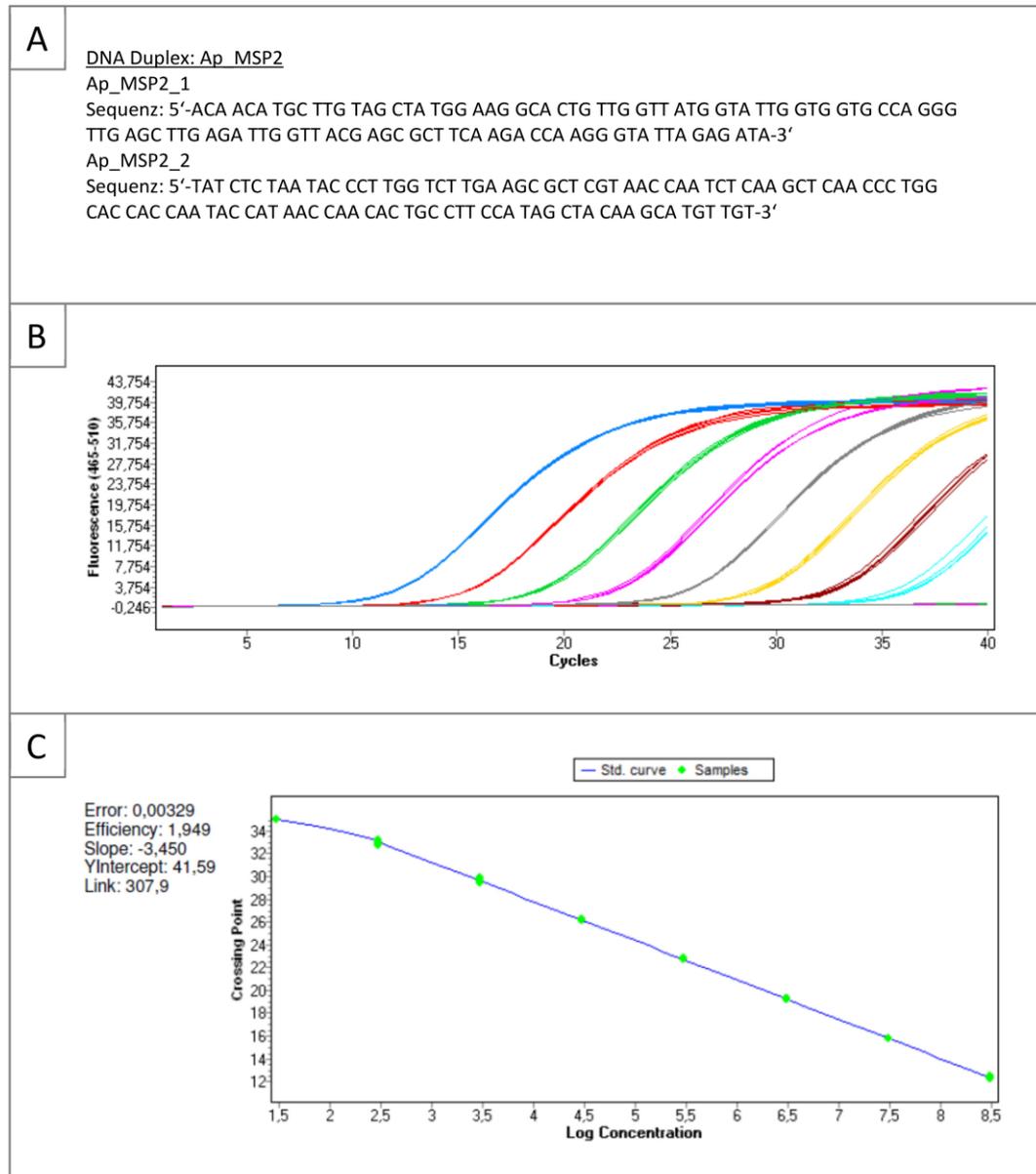


Abbildung A1: Erstellung eines externen Standards zur Quantifizierung mittels real-time PCR

Aus dem Genom des Stammes *Anaplasma phagocytophilum* HGE1 wurde eine Sequenz mit einer Länge von 108bp für das Design eines artifiziellen Standards ausgewählt [A]. Im Anschluss wurden über eine aufsteigende 10er-Verdünnungsreihe acht unterschiedliche Konzentrationen der synthetisierten DNA-Duplex hergestellt und in das real-time PCR – Protokoll eingesetzt [B]. Die Ct-Werte wurden gegen den Logarithmus der jeweiligen Ausgangskonzentrationen aufgetragen und die Standardkurve berechnet [C]. Dabei ergab sich ein Anstieg von -3,45 was einer Effizienz von 94,92 % entspricht. Bei den anschließenden Versuchen wurde eine Probe des externen Standards mit bekannter Konzentration eingesetzt, um über die hinterlegte Standardkurve die Gesamtkopienanzahl zu berechnen und die aufgereinigte Menge bakterieller DNA zu quantifizieren.

Versuchsnummer	Aufreinigungsmethode	Infektionsrate			
		Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7
1	„rock tumbler grit“	8 %	21 %	81 %	> 90 %
	„syringe lysis“	5 %	11 %	64 %	> 90 %
2	„rock tumbler grit“	11 %	22 %	90 %	> 90 %
	„syringe lysis“	< 5 %	15 %	73 %	> 90 %
3	„rock tumbler grit“	10 %	63 %	> 90 %	> 90 %
	„syringe lysis“	9 %	45 %	> 90 %	> 90 %
4	„rock tumbler grit“	< 5 %	7 %	51 %	> 90 %
	„syringe lysis“	< 5 %	< 5 %	30 %	68 %

Tabelle A4: Dokumentation der Infektionsrate von *Anaplasma phagocytophilum* in neu-infizierten HL-60-Zellkulturen

Naive HL-60-Zellkulturen wurden mit den Suspensionen wirtszellfreier Bakterien, welche mittels „syringe lysis“ oder „rock tumbler grit“ aufgereinigt wurden, infiziert. Nach Einsetzen der logarithmischen Wachstumsphase zeigte sich innerhalb von 5-7 Tagen eine vollständige Infektion der Zellkultur und damit verbunden eine Lyse der Wirtszellen. Für alle Versuche wurde eine MOI von 1:1 eingesetzt (bezogen auf die Anzahl für die Aufreinigung verwendete infizierter Wirtszellen im Verhältnis zu der Anzahl frischer, naiver Wirtszellen).

Datum	Identifizierung	Passage	C(Zellen) = [Z/ml]	Infekt.- rate	Behandlung	Kommentar
Fr. 05.01.2018	L1 "JW20120702"	P16	4,25x10 ⁵		aufgetaut eingestellt auf 200.000 Z/ml (6 ml)	Neues Medium hergestellt: pH 7.45 Zellkulturen mit insgesamt 20 % FKS eingestellt.
	L2 "AS20141205"	P35	4,2x10 ⁵		aufgetaut eingestellt auf 200.000 Z/ml (6 ml)	
So. 07.01.2018	L1 "JW20120702"	P17	3,75x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (6 ml)	Zellkulturen mit insgesamt 20 % FKS eingestellt. L2 zentrifugiert für Mediumwechsel.
	L2 "AS20141205"	P36	2,3x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (6 ml)	
Di. 09.01.2018	L1	P18	6,4x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (15 ml)	Umgestellt auf T75-Flaschen. Kontaminationskontrollen angelegt (Blutplatten).
	L2	P37	9,2x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (15 ml)	
Do. 11.01.2018	L1	P19	7,15x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (20 ml)	L1 und L2 mit je +1 ml FKS (+5 %). "JW20141119" - 50 % mCherry/HGE1 ca. 4,0x10 ⁶ Zellen aufgetaut und in 9 ml aufgenommen, gewaschen (210 g, 10 min) und mit 5 ml resuspendiert mit 1 ml L1/L2.
	L2	P38	7,95x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (20 ml)	
Fr. 12.01.2018	L1	P19	3,45x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (20 ml)	Sehr viele tote Zellen bei den aufgetauten, infizierten Zelllinien. Zellsuspensionen auf ein Volumen von insgesamt 20 ml aufgestockt. Ansätze für mCherry/HGE1 und mCherry/HGE2 in neuer T75-Flasche.
	L2	P38	4,25x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (20 ml)	
	mCherry/HGE 1	P5	1,5x10 ⁵	+	15 ml frische Zellen (200.000Z/ml) + 5 ml Ap (Ansatz: 8,7ml ZS L1 + 5 ml Ap + 6,3 ml Medium)	
	mCherry/HGE 2	P5	1,4x10 ⁵	++	15 ml frische Zellen (200.000Z/ml) + 5 ml Ap (Ansatz: 7 ml ZS L2 + 5 ml Ap + 8 ml Medium)	
Mo. 15.01.2018	L1	P20	9,4x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (20 ml)	Es erfolgte zusätzlich ein Split von "mCherry/HGE1" und "mCherry/HGE2" die jeweils auf 300.000 Z/ml (20 ml) in einer T75-Flasche eingestellt wurden. Zusätzlich soll am folgenden Tag eine weitere infizierte Kultur ohne Waschen aufgetaut werden.
	L2	P39	1,0x10 ⁶		eingestellt auf 200.000 Z/ml (20 ml)	
	mCherry/HGE 1	P6	9,6x10 ⁵	+	eingestellt auf 150.000 Z/ml (20 ml)	
	mCherry/HGE 2	P6	8,9x10 ⁵	20 % ++	eingestellt auf 150.000 Z/ml (20 ml)	
Di. 16.01.2018	L1	P20			keine Behandlung	"JW20141117" - mCherry/HGE P3 ca. 4,5x10 ⁶ Zellen, 60-80 % infiziert, aufgetaut. In T25-Flasche mit 1 ml L2 und 4 ml Medium.
	L2	P39			Split für neue Infektion (- 1 ml)	
	mCherry/HGE 1	P6			keine Behandlung	
	mCherry/HGE 2	P6			keine Behandlung	
	mCherry/HGE 3	P7			keine Behandlung	
	mCherry/HGE 4	P7			keine Behandlung	
Mi 17.01.2018	L1	P21	7,75x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (15 ml)	Bei der Zählung zeigte "mCherry/HGE1" sehr viele tote Zellen. Die Zahl an vitalen Zellen entsprach der Anzahl der von L2 eingesetzten Zellen. Der große Verlust an HL-60-Zellen könnte auf das Einfrieren mittels SPG-Puffer zurückzuführen sein. "mcherry/HGE 5" sehr viele tote Zellen im Zytoplast nach Giemsa-Färbung.
	L2	P40	5,225x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (15 ml)	
	mCherry/HGE 1	P7	5,13x10 ⁵	< 5 %	eingestellt auf 100.000 Z/ml (20 ml), keine frischen Zellen	
	mCherry/HGE 2	P7	3,875x10 ⁵	10 %	eingestellt auf 200.000 Z/ml (20 ml), keine frischen Zellen	
	mCherry/HGE 3	P7	8,8x10 ⁵		eingestellt auf 300.000 Z/ml (20 ml), keine frischen Zellen	
	mCherry/HGE 4	P7	6,625x10 ⁵		+ 1 ml Medium für Aufreinigung / PCR (Donnerstag)	
	mCherry/HGE 5	P4	8,25x10 ⁴		5 ml inf.Z. + 5 ml L2 (200.000Z/ml) (10ml in T75)	

Datum	Identifizierung	Passage	C(Zellen) = [Z/ml]	Infekt.-rate	Behandlung	Kommentar
Fr 19.01.2018	L1	P22	7,4x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (15 ml)	Sehr schönes Wachstum der Anaplasmen in allen HL-60-Zellkulturen. "mCherry/HGE 1": 10 ml inf. ZS + 1,3 ml L1 + 8,7 ml Medium; "mCherry/HGE 2": 5,5ml inf. ZS + 2,4 ml L2 + 12,1 ml Medium - Split "mCherry/HGE 6": 2 ml inf. ZS + 3,2 ml L2 + 14,9 ml Medium; "mCherry/HGE 3": 3,8 ml inf. ZS + 16,2 ml Medium; "mCherry/HGE 5": 3,8 ml inf. ZS + 6,2 ml Medium Gering infizierte Kulturen auf 200.000 Z/ml eingestellt. Stark infizierte Kultur mit frischen Zellen angesetzt.
	L2	P41	8,325x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (15 ml)	
	mCherry/HGE 1	P8	2,725x10 ⁵	20 %	eingestellt auf ca. 180.000 Z/ml (20 ml) mit frischen Zellen	
	mCherry/HGE 2	P8	3,675x10 ⁵	60 %	eingestellt auf 200.000 Z/ml (20 ml); Split "mCherry/HGE 6" (2+18 ml)	
	mCherry/HGE 3	P8	1,06x10 ⁵	10 %	eingestellt auf 200.000 Z/ml (20 ml), keine frischen Zellen	
	mCherry/HGE 5	P5	5,25x10 ⁵	10 %	eingestellt auf 200.000 Z/ml (10 ml), keine frischen Zellen	
Mo 22.01.2018	L1	P23	1,05x10 ⁶		eingestellt auf 200.000 Z/ml (15 ml)	Sehr schönes Wachstum der Anaplasmen in allen HL-60-Zellkulturen. "mCherry/HGE 1": 1,5ml infz. ZS + 1,6 ml L1 + 6,9 ml Medium "mCherry/HGE 2": 2ml inf. ZS + 1,6 ml L2 + 6,4 ml Medium "mCherry/HGE 3": 3 ml Medium, Aufreinigung für PCR (Montag) "mCherry/HGE 5": 5 ml inf. ZS + 1 ml L2 + 4 ml Medium; Einfrieren am Freitag, Mittwoch auf 20 ml einstellen "mCherry/HGE 6": 5 ml Medium; Aufreinigung und neue Infektion am Dienstag RPMI TP20180115 verwendet.
	L2	P42	9,9x10 ⁵		eingestellt auf 200.000 Z/ml (15 ml)	
	mCherry/HGE 1 (L1)	P9	2,65x10 ⁵	100 % +++	eingestellt auf 200.000Z/ml (10 ml) mit frischen Zellen	
	mCherry/HGE 2 (L2)	P9	1,45x10 ⁵	90 % +++	eingestellt auf 200.000Z/ml (10 ml) mit frischen Zellen	
	mCherry/HGE 3 (L1)	P9	2,9x10 ⁵	80-90 % +++	Aufreinigung für PCR	
	mCherry/HGE 5 (L2)	P6	2,4x10 ⁵	70 % +++	Einfrieren am Freitag, Mittwoch auf 20 ml bringen	
Di 23.01.2018	L1	P24	3,775x10 ⁵		+ 5 ml	"mCherry/HGE 6": 10 ml Kultur zur Reinigung nach Protokoll "syringe lysis" und 10 ml Kultur zur Reinigung nach Protokoll "rock tumbler grit" verwendet; der Rest ca. 2 ml wurden verworfen, die gereinigten Lösungen wurden in 6 ml (150.000 Z/ml) aus L1 gegeben. 1 ml von L1 und "mCherry/HGE 6" wurden zur Analyse mittels FACS abgenommen.
	L2	P43	4,4x10 ⁵		nicht verwendet	
	mCherry/HGE 6 (L2)	P10	1,65x10 ⁵	90 % +++	Aufreinigung + Neuinfektion am Dienstag	

Tabelle A5: Infektionsprotokoll zur Kultivierung von *Anaplasma phagocytophilum*

Das hier abgebildete Infektionsprotokoll zeigt exemplarisch die typische Behandlung der Zellkulturen und den Verlauf der Infektion nach Inokulation mit *Anaplasma phagocytophilum*. Naive HL-60-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 0,3 % Bicarbonat kultiviert. Das Wachstumsmedium wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und im Anschluss sterilfiltriert (Porengröße: 0,2 µm). Die infizierten Zellkulturen einer Infektionsrate von > 80 % für die Aufreinigung verwendet.

* Bestimmung der Infektionsrate durch die Anfertigung von Zytospins mit Giemsa-Färbung

** Bewertung der „Morulaegröße“ mit + / ++ /+++

IX. DANKSAGUNG

Ein großes Dankeschön möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Straubinger für die Projektbetreuung im Rahmen der Doktorarbeit und für seine Unterstützung aussprechen. Für die stets entgegenkommende Art, den freundlichen Umgang und vor allem für die Förderung der Umsetzung neuer Ideen gilt ihm mein herzlichster Dank.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Shari Fell, als Betreuerin, Kollegin und gute Freundin. Vielen Dank für die fachliche und moralische Unterstützung während der Doktorarbeit, für die besten Tage im Büro und für den leckersten Döner Berlins!

Ebenso möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Bakteriologie & Mykologie bedanken. Dabei möchte ich speziell Stephanie Hiereth und Anke Schiller meinen Dank für ihre Hilfe aussprechen. Eure Unterstützung und die Zusammenarbeit hatten einen großen Anteil für das Gelingen der Versuche.

Ich danke Jinyong Wang für seine fachliche Beratung und für die Hilfe bei Detailfragen, sowie Herrn Dr. Majzoub-Altweck und Frau Heidrun Schöl für ihre Unterstützung bei der Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Zudem möchte ich mich bei meinen Eltern und bei meiner Schwester aus vollem Herzen bedanken. Ihr wart immer für mich ein wichtiger Rückhalt und ohne euch wäre ich nie so weit gekommen. Danke für eure Unterstützung und für euer Vertrauen!

Zum Abschluss will ich meinen Freunden danken: den Burschen aus München, der Bouldercrew, meinen Freunden aus der Heimat und allen die mich während dieser Zeit unterstützt und dafür gesorgt haben, dass ich die Zeit als Doktorand mit vielen Highlights verbinden kann!