

# Labordiagnostische und klinische Aspekte der kaninen Anaplasmosis und Ehrlichiose

D. Schaarschmidt-Kiener, W. Müller

Aus dem Labor ALOMED, Radolfzell

## Schlüsselwörter:

*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, Real-Time-PCR, Serologie, Anaplasmosis, Ehrlichiose

## Zusammenfassung:

**Gegenstand und Ziel:** Prospektive Untersuchung über das Vorkommen von Infektionen mit Anaplasmen und Ehrlichien bei Hunden aus Deutschland und der Schweiz. **Material und Methode:** In die Studie einbezogen wurden Hunde aus Deutschland und der Schweiz (nördlich der Alpen), die entweder serologisch positiv waren, d. h. bei denen Antikörper gegen *Ehrlichia canis* oder *Anaplasma phagocytophilum* nachgewiesen wurden, oder bei denen Erreger-DNA mittels PCR im EDTA-Blut detektiert werden konnte. Anhand eines einheitlichen Dokumentationsbogens stellten die behandelnden Tierärzte anamnestische und klinische Daten zusammen. **Ergebnisse:** Im Untersuchungszeitraum von April 2005 bis Mai 2006 gingen 101 Fälle in die Studie ein. Für 82 von ihnen lagen anamnestische und klinische Daten vor. Bei 56 Hunden ließen sich sowohl Erreger-DNA als auch spezifische Antikörper nachweisen. Dagegen waren 19 Fälle nur in der PCR und 26 Fälle nur serologisch positiv. Im zweiten Teil der Studie konnte bei 245 zufällig ausgewählten Hundeseren eine Prävalenz von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* von 19% festgestellt werden. Bei 271 zur „Borreliose“-Abklärung eingesandten Hundeseren lag die Seroprävalenz dagegen bei 32%. **Schlussfolgerung und klinische Relevanz:** Die Gefahr einer Infektion mit *E. canis* in Deutschland und der nördlichen Schweiz scheint gering zu sein. Betroffen sind vorwiegend Reise- oder Importhunde. Im Gegensatz dazu muss die Anaplasmosis beim Hund als endemisch eingestuft und bei Zeckenbefall und klinischer Symptomatik (z. B. Gelenkprobleme, Lahmheit oder ZNS-Symptome) differenzialdiagnostisch in Betracht gezogen werden. Der direkte Erregernachweis mittels PCR zum Nachweis von frischen oder reaktivierten Infektionen und zur Kontrolle des Therapieerfolgs ist diagnostisch sehr hoch einzuschätzen.

## Key words:

*Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, PCR, serologic testing, anaplasmosis, ehrlichiosis

## Summary:

**Objective:** Prospective study on the occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* infections in dogs in Germany and Northern Switzerland. **Material and methods:** The study covered cases of dogs in Germany and Switzerland (north of the Alps) that were either serologically positive (detection of *E. canis* or *A. phagocytophilum* antibodies) or PCR positive for *Ehrlichia species* DNA. Anamnestic and clinical data were compiled by the treating veterinarians on uniform documentation sheets. **Results:** The study covered 101 cases (anamnestic and clinical data being available for 82 cases). 56 of these dogs were serologically and PCR positive. In contrast 19 dogs were solely PCR positive and 26 were solely serologically positive. In the second part of the study a 19% prevalence of *A. phagocytophilum* antibodies was found within 245 randomly chosen dog sera. In contrast the prevalence was 32% within 271 dogs originally requested for *Borrelia* Western Blot analysis. **Conclusion and clinical relevance:** The risk of autochthon canine *E. canis* infections seems to be low in Germany and Northern Switzerland, and mainly travelling or imported dogs are affected. In contrast canine anaplasmosis must be classified as endemic and considered as differential diagnosis in case of tick exposure and clinical pathology (e. g. arthritic problems, lameness or neurological abnormalities). For diagnostic investigation PCR analysis is very helpful to detect fresh or reactivated infections and for therapy control.

## Diagnostic and clinical aspects of canine anaplasmosis and ehrlichiosis

Tierärztl Prax 2007; 35 (K): 129-136

## Einleitung

In der tierärztlichen Praxis in Deutschland und der Schweiz sind beim Hund heute vorwiegend zwei Formen von Ehrlichiosen von Bedeutung: zum einen Infektionen mit *Ehrlichia canis* (*E. canis*), dem Verursacher der kaninen monozytären Ehrlichiose (CME), zum anderen Infektionen mit *Anaplasma phagocytophilum*

(*A. phagocytophilum*), die beim Hund die granulozytäre Ehrlichiose (CGE, zur besseren Abgrenzung als Anaplasmosis bezeichnet) hervorrufen. Bei beiden Erregern handelt es sich um gramnegative, obligat intrazelluläre pleomorphe Bakterien der Gattung *Rickettsiaceae*, die von Zecken übertragen werden.

Als Vektor von *E. canis* fungiert *Rhipicephalus sanguineus*, die Braune Hundezecke (13, 19), die ab Zentralfrankreich südwärts in allen europäischen Mittelmeerländern vorkommt (7). Die monozytäre Ehrlichiose beim Hund ist daher in der Praxis schon

lange als klassische Reiseinfektion bekannt. Der zunehmende Hundetourismus und Importe von Hunden aus südlichen Ländern führen aber immer häufiger zur Einschleppung infizierter Zecken und zu autochthonen Infektionen in unseren Breiten (8, 12). Auch wenn die günstigsten Temperaturen für die Entwicklung von *Rhipicephalus sanguineus* zwischen 20 und 30 °C bei hoher relativer Luftfeuchte liegen, findet die Zecke in Häusern und Zwingern geeignete Bedingungen für ihre Vermehrung (5, 11, 12).

Der Vektor von *A. phagocytophilum*, *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock), ist in Deutschland und der Schweiz weit verbreitet und überträgt auch Borreliose und FSME (Frühsommer-Meningoenzephalitis). Während in Deutschland Infektionen mit *A. phagocytophilum* erst seit kurzer Zeit Beachtung finden (1, 2, 20), werden Fälle von Anaplasmen in der Schweiz schon seit einigen Jahren beim Hund, Pferd und auch beim Menschen beschrieben (18, 27–29, 32), weshalb auch von der „Schweizerischen Ehrlichiose“ gesprochen wird (22). In Deutschland wurden für *A. phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* Prävalenzen von 1–4,1% ermittelt (3, 10, 14, 15, 36). In der Schweiz lag die Durchseuchungsrate zwischen 0,8 und 1,4% (21, 30, 31).

Bei beiden Infektionen sind die beschriebenen klinischen Symptome äußerst vielseitig und hängen von der Krankheitsphase ab (6, 35). Eine CME lässt sich in der Akutphase meist nicht von einer Anaplasrose unterscheiden. Bis heute wird aber die Meinung vertreten, dass Infektionen mit *E. canis* meist schwerer verlaufen als Anaplasmen (4). Bei beiden Infektionen stellen Thrombozytopenie, Anämie und Leukopenie die typischen Laborbefunde dar. Zudem findet man häufig Hyperproteinämie, Hypoalbuminämie und zum Teil erhöhte Leberenzymwerte. Zur Diagnosesicherung erfolgt üblicherweise der serologische Nachweis von spezifischen Antikörpern mittels Immunfluoreszenz-Antikörpertest (IFAT) (23, 34).

Während eine endemische Infektion differenzialdiagnostisch oft nicht in Betracht gezogen wird, beinhalten andererseits Laborprofile zur Abklärung von Reiseinfektionen meist nur einen Nachweis von Antikörpern gegen *E. canis*, nicht aber gegen *A. phagocytophilum*. Die vorliegende Studie sollte folgende Fragen beantworten:

1. Inwieweit muss Infektionen mit *A. phagocytophilum* beim Hund verstärkt Beachtung geschenkt werden?
2. Welche Bedeutung hat der direkte, molekulargenetische Nachweis von *A. phagocytophilum*, *E. canis* und *A. platys* mittels PCR zum Nachweis von frischen oder reaktivierten Infektionen und zur Kontrolle des Therapieerfolgs?

## Material und Methoden

### Studienaufbau

Teil 1 der Studie fand im Zeitraum von April 2005 bis Mai 2006 im Labor ALOMED statt. Einbezogen wurden Hunde, die entweder serologisch positiv waren, d. h. bei denen Antikörper gegen *E. canis* oder *A. phagocytophilum* nachweisbar waren, oder bei denen Erreger-DNA mittels PCR im EDTA-Blut nachgewiesen

wurde. Die zur Analyse eingeschickten Blutproben stammten von Hunden aus Deutschland und der Schweiz (nördlich der Alpen), die bei verschiedenen kooperierenden Tierärzten vorgestellt wurden.

Die Fälle rekrutierten sich aus drei Gruppen:

- „Verdachtsfälle Praxis“ (n = 19): gezielter Auftrag der behandelnden Tierärzte, die klinische Verdachtdiagnose „Anaplasrose/Ehrlichiose“ labor-diagnostisch abzuklären
- „Reiseinfektionsprofil“ (n = 44): Auftrag der behandelnden Tierärzte, die Proben eines Import- oder Reishundes auf mediterrane Infektionskrankheiten zu untersuchen
- „Verdachtsfälle ALOMED“ (n = 38): Untersuchung von Patienten mit auffälligen Laborwerten oder klinischen Anzeichen mittels PCR

Die behandelnden Tierärzte stellten anamnestische und klinische Daten in einem einheitlichen Dokumentationsbogen zusammen. Für die Therapie wurde Doxycyclin (10–20 mg/kg KM/d verteilt auf zwei Portionen täglich) für drei Wochen (bei chronischen Infektionen auch für vier bis sechs Wochen) als Mittel der Wahl empfohlen.

In Teil 2 der Studie erfolgte bei zwei Kollektiven die Bestimmung der Seroprävalenz von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum*. Zum einen wurden 245 im Mai 2006 an das Labor ALOMED eingesandte und zufällig ausgewählte Seren von Hunden getestet. Das zweite Kollektiv beinhaltete 271 Hundeseren, die zwischen Februar und August 2006 von deutschen und schweizerischen Tierärzten zum Nachweis von Borrelien-spezifischen Antikörpern mittels Western-Blot-Analyse (recomBlot *Borrelia canis* IgM/IgG, MIKROGEN, D-Martinsried) eingesandt wurden.

### Probenmaterial und durchgeführte Tests

Die kooperierenden Tierärzte führten die Blutprobenentnahme durch und schickten EDTA-Blut, Serum und frisch angefertigte Blutausschläge zur Analyse an das Labor ALOMED. Die klinisch-chemischen Profile wurden mit dem Wako-20R-Biochemical-Analyser (Wako, D-Neuss) bestimmt, die Untersuchung des kleinen Blutbildes erfolgte mit dem Technicon H\*1E Vet. Med. (Bayer, D-Fernwald). Für die Erstellung von Differenzialblutbildern und den Nachweis von Blutparasiten wurden nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa-Färbung) gefärbte Blutausschläge mikroskopisch untersucht. Der indirekte Nachweis eines möglichen Erregerkontaktes erfolgte mittels IFAT, bei dem mit *E.-canis*- oder *A. phagocytophilum*-infizierte Zellen als Antigen dienten (FLUO-EHRlichia *canis*® und FLUOANAPLASMA ph.®, MegaCor, AUT-Hörbranz). Die Tests wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und ab einem Titer von 1 : 80 als positiv gewertet.

Die molekulargenetischen Untersuchungen wurden wie früher beschrieben vorgenommen (16). Zur Aufreinigung von DNA für den molekulargenetischen Ehrlichien-Nachweis fand der „NucleoSpin-Blood“-Kit (Macherey-Nagel, D-Düren) Anwendung. Dazu wurden 200 µl EDTA-Blut, Synovia, Knochenmark- oder Lymphknotenpunktat extrahiert und die DNA am Ende der Reinigung in 50 µl Elutionspuffer gelöst. 5 µl der gereinigten DNA wurden in einer quantitativen Real-Time-PCR mittels LightCycler® (Roche Diagnostics, D-Penzberg) amplifiziert. Die Reaktionsmischung enthielt neben der Polymerase alle benötigten Zusatzkomponenten (Mix Fast start DNA Master SYBR GreenI, Roche Diagnostics), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> sowie eine Konzentration von je 0,4 µM der universellen Ehrlichien-Primer EHR-For (5'-GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC-3') und EHR-Rev (5'-TAG CAC TCA TCG TTT ACA GC-3') (25). Zu Beginn wurde die Polymerase für 10 Minuten bei 95 °C aktiviert. Es folgten 45 Zyklen von je einer Sekunde Denaturierung bei 95 °C, fünf Sekunden Annealing bei 55 °C und 15 Sekunden Elongation bei 72 °C. Dem schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse an, anhand derer die Fragmentlängen und dadurch die Spezifität bestimmt werden konnte. Um die Sensitivität des verwendeten Real-Time-PCR-Assays zu bestimmen, wurden definierte Kopienzahlen der 16S rRNA-Gene von *E. canis* und *A. phagocytophilum* (jeweils kloniert in einen Vektor) 200 µl EDTA-Blut eines nicht infizierten Hundes zugesetzt. Nach der DNA-Extraktion konnten noch Verdünnungen von bis zu je einer Kopie der Erreger-DNA pro 200 µl Blut mittels PCR detektiert werden. Zur weiteren Spezies-typisierung wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die PCR-Produkte aller

**Tab. 1**

Ergebnisse des direkten Nachweises (PCR) von Infektionen mit *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* und *Anaplasma platys* sowie des indirekten Nachweises (IgG-Antikörper-Bestimmung, „Serologie“) eines Kontakts mit diesen Erregern in den drei Kollektiven

	PCR positiv Serologie positiv	PCR positiv Serologie negativ	PCR negativ Serologie positiv
<b>Fallzahl (n = 101)</b>	<b>56</b>	<b>19</b>	<b>26</b>
„Verdachtsfälle Praxis“ (193 Anforderungen)	10 (4 / 6 / 0)*	–	9 (3 / 6 / 0)
„Reiseinfektionsprofil“ (142 Anforderungen)	15 (8 / 7 / 0)	12 (4 / 5 / 3)	17 (14 / 3 / 0)
„Verdachtsfälle ALOMED“ (211 PCR-Analysen)	31 (5 / 26 / 0)	7 (0 / 7 / 0)	–

\* (*Ehrlichia canis* / *Anaplasma phagocytophilum* / *Anaplasma platys*)

positiven Proben wurden dafür über den „Quiaquick Gel Extraction“-Kit (Qiagen, D-Hilden) gereinigt und in einem ABI Prism 310 (ABI Applied Biosystems, USA-Foster City) analysiert. Der nachfolgende Datenbankvergleich fand mittels BLAST-Analyse statt.

## Ergebnisse

Im Untersuchungszeitraum von April 2005 bis Mai 2006 gingen 101 Fälle in die Studie ein. Anamnestische und klinische Daten konnten von 82 Hunden dokumentiert werden. Tabelle 1 listet die Ergebnisse des direkten Nachweises (PCR) von Infektionen mit *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* und *Anaplasma platys* sowie des indirekten Nachweises (IgG-Antikörper-Bestimmung) eines Kontakts mit diesen Erregern in den drei Kollektiven.

## Fälle von monozytärer Ehrlichiose (Infektion/Kontakt mit *E. canis*)

Die labordiagnostischen und klinischen Daten der 38 *E.-canis*-Fälle sind in Tabelle 2 angegeben. Von den 17 serologisch und in der PCR positiven Hunden waren 14 Tiere aus dem südlichen Ausland importiert worden (8× Spanien, 4× Griechenland, 1× Bulgarien, 1× Portugal). Zwei Hunde hatten ihre Besitzer vor dem Auftreten von ersten Symptomen in den Urlaub nach Spanien begleitet. Bei einem Hund lagen keine Informationen über Herkunft und Auslandsreisen vor. Zum Zeitpunkt der Diagnose waren 14 Hunde (88%) symptomatisch, zwei Hunde zeigten keinerlei Auffälligkeiten und zu einem fehlten entsprechende Angaben. Die beiden asymptomatischen Tiere waren innerhalb der letzten 14 Tage vor Untersuchung aus Spanien bzw. Griechenland importiert worden. Bei allen dokumentierten Fällen besserte sich die

**Tab. 2**

Ehrlichiosen – Fallzahl, ausgewählte Laborwerte und klinische Daten

	PCR positiv Serologie positiv	PCR positiv Serologie negativ	PCR negativ Serologie positiv
<b>Fallzahl (n = 38)</b>	<b>17</b>	<b>4</b>	<b>17</b>
<b>Ausgewählte Laborwerte</b>			
Thrombozytopenie	16 (94%)	4 (100%)	5 (29%)
Leukopenie	13 (76%)	3 (75%)	1 (6%)
Anämie	10 (59%)	2 (50%)	4 (23%)
Hyperproteinämie	16 (94%)	3 (75%)	2 (11%)
Hypoalbuminämie	16 (94%)	1 (25%)	2 (11%)
AP erhöht	16 (94%)	0	2 (11%)
ALT erhöht	12 (71%)	0	3 (18%)
Eisen erniedrigt	17 (100%)	2 (50%)	2 (11%)
<b>Klinische Daten (n = 36)</b>	16/17	4/4	16/17
Fieber	14 (88%)	2 (50%)	3 (19%)
Lethargie	13 (81%)	2 (50%)	8 (50%)
Anorexie	11 (69%)	1 (25%)	2 (13%)
Gewichtsverlust	8 (50%)	0	4 (25%)
Lymphknotenschwellung	9 (56%)	1 (25%)	1 (6%)
Milzvergrößerung	7 (44%)	0	0
Blutungsneigung (Epistaxis, Petechien)	4 (26%)	0	0

Symptomatik nach Doxycyclintherapie. In acht Fällen erfolgte als Therapiekontrolle eine PCR aus EDTA-Blut. Bei sieben dieser Hunde konnte keine Erreger-DNA mehr nachgewiesen werden. Der weiterhin PCR-positive Hund hatte das Doxycyclin Angaben zufolge unregelmäßig erhalten. Bei zwei der sieben erfolgreich therapierten Hunde rezidierten die Symptome nach einiger Zeit, ohne dass sich Erreger-DNA im Blut nachweisen ließ.

Der Import aller vier nur in der PCR positiv getesteten Hunde hatte unmittelbar vor der Vorstellung stattgefunden (3× Spanien, 1× Griechenland). Zum Zeitpunkt der Untersuchung lag das Alter bei drei Hunden unter 12 Monaten, das vierte Tier war 16 Monate alt. Zwei Hunde wiesen keinerlei klinische Symptomatik auf. Die beiden symptomatischen Tiere waren drei bzw. fünf Tage nach Beginn einer Doxycyclintherapie symptomfrei.

Auch in der dritten Gruppe der 17 nur serologisch auffälligen Hunde handelte es sich ausschließlich (n = 16) um Importtiere (10× Spanien, 3× Griechenland, 1× Sizilien, 2× Portugal). In einem Fall fehlten anamnestiche Informationen. Acht Tiere (50%) wurden als symptomatisch beschrieben, während bei den anderen acht Hunden zum Zeitpunkt der Untersuchung weder klinische Symptome noch auffällige hämatologische oder klinisch-chemische Werte bestanden. In zwei Fällen mit massiver Symptomatik und auffälligen Laborwerten stellte sich heraus, dass vor der Blutentnahme prophylaktisch bereits eine Doxycyclintherapie eingeleitet worden war. Symptomatische Tiere zeigten nach Doxycyclintherapie eine deutliche Besserung. Bei zwei Hunden konnte *E.-canis*-DNA im Knochenmark, bei einem Hund in einem Lymphknotenpunkt

nachgewiesen werden. Alle drei Hunde hatten einen hohen *E.-canis*-Titer von > 1:1280. Dennoch waren zwei dieser Tiere symptomfrei. Bei dem symptomatischen Hund wurde als Therapiekontrolle eine PCR aus Knochenmark durchgeführt, die negativ ausfiel.

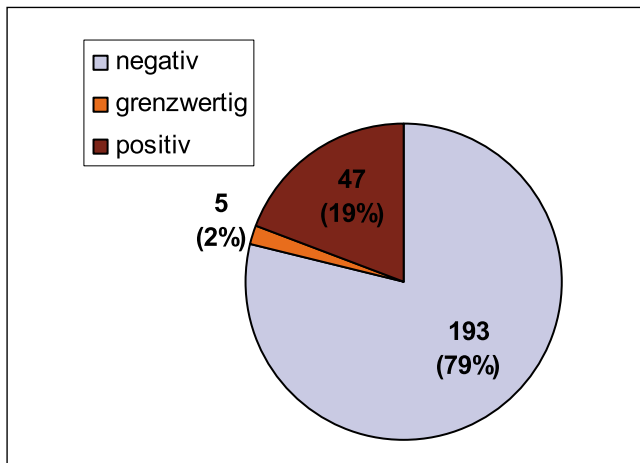
### Fälle von granulozytärer Ehrlichiose (Infektion/Kontakt mit *A. phagocytophilum*)

Die labordiagnostischen und klinischen Daten der 60 Anaplasrose-Fälle finden sich in Tabelle 3. Für 24 der 39 serologisch und in der PCR positiv getesteten Hunden lagen Informationen über Anamnese und Klinik vor. Laut Besitzerangaben waren 18 dieser Hunde nie im südlichen Ausland gewesen, wobei zehn Hunde aus der Schweiz und acht aus Deutschland stammten. Drei Hunde waren importiert worden (2× Ungarn, 1× Spanien), drei Hunde hatten ihre Besitzer vor dem Auftreten erster Symptome in den Urlaub nach Frankreich (n = 2) bzw. Ungarn (n = 1) begleitet. Zum Zeitpunkt der Diagnose wiesen 18 Hunde (75%) Symptome auf, sechs Hunde zeigten keinerlei Auffälligkeiten. Bei 16 Patienten wurden sowohl neurologische als auch arthritische Symptome beschrieben. In allen dokumentierten Fällen besserten sich die Symptome nach Doxycyclintherapie schnell. Bei acht Hunden erfolgte als Therapiekontrolle eine PCR aus EDTA-Blut, die durchweg einen negativen Befund ergab. Eine rezidivierende Symptomatik wurde von keinem Fall berichtet.

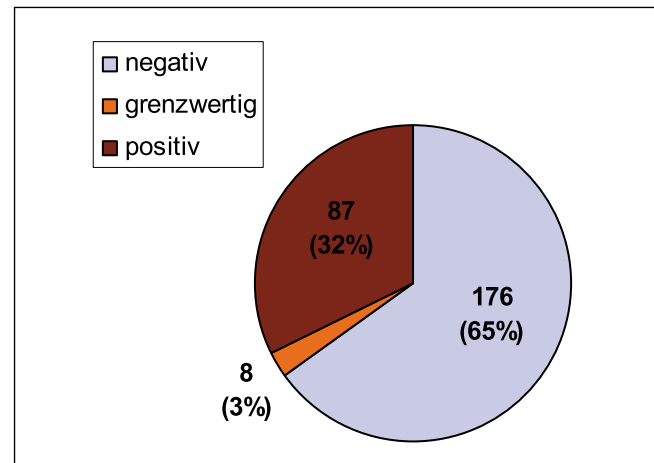
Für 10 der 12 nur in der PCR positiven Hunde ließen sich klinische und anamnestiche Daten erheben. Diesen zufolge hatten

	PCR positiv Serologie positiv	PCR positiv Serologie negativ	PCR negativ Serologie positiv
<b>Fallzahl (n = 60)</b>	<b>39</b>	<b>12</b>	<b>9</b>
<b>Ausgewählte Laborwerte</b>			
Thrombozytopenie	34 (87%)	9 (75%)	4 (44%)
Leukopenie	25 (64%)	8 (67%)	2 (22%)
Anämie	24 (62%)	6 (50%)	3 (33%)
Hyperproteinämie	32 (82%)	9 (75%)	1 (11%)
Hypoalbuminämie	29 (74%)	5 (41%)	1 (11%)
AP erhöht	31 (79%)	3 (25%)	1 (11%)
ALT erhöht	11 (28%)	3 (25%)	1 (11%)
Eisen erniedrigt	36 (92%)	7 (58%)	1 (11%)
<b>Klinische Daten (n = 43)</b>	<b>24/39</b>	<b>10/12</b>	<b>9/9</b>
Arthritische Symptome	18 (75%)	3 (30%)	8(88%)
Lethargie	17 (71%)	7 (70%)	4(44%)
Lymphknotenschwellung	17 (71%)	2 (20%)	1(11%)
Neurologische Symptome	16 (67%)	9 (90%)	3(33%)
Fieber	16 (67%)	6 (60%)	3(33%)
Gewichtsverlust	15 (63%)	2 (20%)	2(22%)
Anorexie	13 (54%)	4 (40%)	4(44%)
Milzvergrößerung	12 (50%)	2 (20%)	1(11%)
Erbrechen	7 (29%)	4 (40%)	0

**Tab. 3**  
Anaplasosen – Fallzahl,  
ausgewählte Laborwerte und  
klinische Daten



**Abb. 1** Seroprävalenz von *Anaplasma phagocytophilum* in 245 zufällig ausgewählte Hundeseren im Mai 2006. Antikörpertiter von < 1:40 wurden als negativ, solche von 1:40 als grenzwertig und Titer von  $\geq 1:80$  als positiv gewertet.



**Abb. 2** Seroprävalenz von *Anaplasma phagocytophilum* in 271 zur „Borreliose“-Abklärung eingesandten Hundeseren

sich neun dieser aus Deutschland ( $n = 5$ ) und der Schweiz ( $n = 4$ ) stammenden Tiere nie im südlichen Ausland aufgehalten. Ein Hund war vor dem Auftreten von ersten Symptomen als Urlaubsbegleiter in Italien gewesen. Neun von zehn Hunden wiesen neurologische Symptome auf, drei von ihnen zusätzlich arthritische Symptome. Bei allen dokumentierten Fällen kam es nach Doxycyclintherapie zu einer schnellen Besserung der Symptomatik. In drei Fällen wurde als Therapiekontrolle eine PCR aus EDTA-Blut durchgeführt, jeweils mit negativem Ergebnis.

Auch in der dritten Gruppe der neun nur serologisch auffälligen Hunde waren sieben Hunde nie im südlichen Ausland gewesen (4× Schweiz, 3× Deutschland). Zwei Tiere hatten ihre Besitzer in den Urlaub nach Ungarn bzw. Südfrankreich begleitet. Drei Hunde litten laut Anamnese seit Monaten bzw. Jahren an rezidivierenden epileptischen Anfällen, die nach Doxycyclintherapie nicht mehr auftraten. Bei acht Hunden wurden massive Gelenksbeschwerden angegeben, drei von ihnen zeigten zusätzlich neurologische Symptome. Auch hier kam es bei sechs Hunden nach der Doxycyclinbehandlung zu einer Besserung, wenngleich der Erfolg teilweise erst nach mehr als drei Wochen Therapie feststellbar war. Bei fünf der neun serologisch positiven Hunde war anfangs die Verdachtsdiagnose „Borreliose“ gestellt worden, wobei sich bei vier dieser fünf Patienten keine Borrelien-spezifischen Antikörper im Western-Blot nachweisen ließen.

### Eine weitere festgestellte Ehrlichiose (Infektion mit *Anaplasma platys*)

Bei drei serologisch unauffälligen Hunden verlief die beschriebene PCR mit positivem Befund. Die Sequenzanalyse des amplifizierten PCR-Produkts ergab jeweils eine Infektion mit *Anaplasma platys*. Zwei dieser Hunde stammten aus dem Ausland (Türkei bzw. Südamerika), bei dem dritten traten massive Symptome un-

mittelbar nach einem Spanienurlaub auf. Alle Hunde wiesen neben einer ausgeprägten Thrombozytopenie eine Anämie und Leukopenie auf. Als klinische Symptome wurden Gewichtsverlust (2×), Lethargie (3×), Apathie (3×), Anorexie (2×), Fieber (2×) sowie neurologische (2×) und arthritische Symptome (2×) angegeben.

### Seroprävalenz von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum*

Teil 2 dieser Studie widmete sich der Frage nach der Bedeutung von autochthonen Infektionen mit *A. phagocytophilum* beim Hund in Deutschland und der Schweiz. Bis heute sind nur wenige Daten über die Seroprävalenz von *A. phagocytophilum* beim Hund publiziert (1, 2, 32). Aus diesem Grund wurden zwei Hundekollektive untersucht.

Zum einen wurde von 245 im Mai 2006 eingesandten und zufällig ausgesuchten Hundeseren mittels IFAT ein Antikörpernachweis durchgeführt. Abbildung 1 veranschaulicht die Ergebnisse dieser Untersuchung. Von 29 der 47 serologisch positiven Hunde lagen klinisch-chemische und hämatologische Parameter vor. Nur 11 dieser Fälle wären aufgrund oben erwähnter Parameter als verdächtig eingestuft worden. Von 14 Hunden wurde der Direktnachweis mittels PCR nachgefordert, wobei sich in vier Fällen DNA von *A. phagocytophilum* im Blut nachweisen ließ.

Das zweite Kollektiv beinhaltete 271 Hundeseren, die zwischen Februar und August 2006 von deutschen und schweizerischen Tierärzten zum Nachweis von Borrelien-spezifischen Antikörpern mittels Western-Blot-Analyse eingesandt wurden. Das Ergebnis dieser zum Teil retrospektiven Untersuchung ist in Abbildung 2 dargestellt. Während bei 187 dieser Seren keine signifikante Konzentration von Borrelien-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnte, waren 70 (37%) davon im *A. phagocyto-*

*philum*-IFAT positiv. Klinisch-chemische und hämatologische Parameter lagen von 18 der insgesamt 87 serologisch positiven Hunde vor. Fünf von ihnen wären aufgrund oben erwähnter Laborparameter als verdächtig eingestuft worden. Von acht Hunden wurde der Direktnachweis mittels PCR nachgefordert, der in drei Fällen positiv war. Bei drei Hunden aus diesem Kollektiv konnte DNA von *A. phagocytophilum* in der Synovia nachgewiesen werden. Alle drei Tiere wiesen massive arthritische Symptome auf.

## Diskussion

Ziel der vorgestellten Studie war, Informationen über die Bedeutung von Anaplasosen und Ehrlichiosen bei Hunden aus Deutschland und den nördlichen Kantonen der Schweiz zusammenzutragen. In einem Zeitraum von 13 Monaten konnten 101 Fälle in die Studie einbezogen werden. Den 63 klinischen Verdachtsfällen – gezielte Anforderung der behandelnden Tierärzte von serologischen Tests oder dem direkten Erregernachweis mittels PCR – stehen dabei 38 labordiagnostische Verdachtsfälle gegenüber, bei denen anhand auffälliger Laborparameter eine PCR durchgeführt wurde.

Die beschriebenen Resultate bestätigen einerseits frühere Beobachtungen, dass authochthone Infektionen von Hunden mit *E. canis* in unseren Breiten keine Rolle spielen (8, 11, 12, 16). Bei allen 36 Fällen mit bekannter Anamnese handelte es sich um Importhunde aus Mittelmeerländern oder um Hunde, bei denen kurz nach dem Aufenthalt in einem mediterranen Land eine Infektion festgestellt wurde. Auf der anderen Seite hatten von den 43 Anaplasrose-Fällen mit bekannter Anamnese 34 Hunde laut Besitzerangaben Deutschland oder die Schweiz nie verlassen. Der typischen Importinfektion durch *E. canis* steht mit der Anaplasrose demnach eine offenbar einheimische Ehrlichiose gegenüber. Die klinischen und labordiagnostischen Daten dieser Fälle weisen zusammen mit der bei zufällig ausgewählten Hunden ermittelten Seroprävalenz von 19% deutlich darauf hin, dass Infektionen mit *A. phagocytophilum* eine beachtliche veterinärmedizinische Relevanz besitzen. Systematische epidemiologische Untersuchungen müssen klären, wo und in welcher Verteilung *A. phagocytophilum* authochthon in Deutschland und der Schweiz vorkommt.

Beide Infektionen zeichnen sich durch unspezifische Krankheitssymptome aus, was die Diagnosestellung für den Tierarzt oft sehr schwierig macht. Aus den vorliegenden Daten geht aber deutlich hervor, dass sich Infektionen mit *A. phagocytophilum* durch das Auftreten von neurologischen und arthritischen Symptomen von einer *E.-canis*-Infektion unterscheiden lassen. Unter dem Begriff „neurologische Symptome“ sind epileptische Anfälle, Angstattacken, Kopfschiefhaltung, Kreislaufen, Ataxie und kurzzeitiger Gleichgewichtsverlust zusammengefasst. Obwohl diese Symptome sehr häufig in der Frühphase der Infektion aufzutreten scheinen, in der teilweise noch keine Antikörper nachweisbar waren und der Nachweis einer Infektion nur mittels PCR möglich war, gab es auch drei Fälle, bei denen eine solche Symptomatik rezidivierend

auftrat. Der Begriff „arthritische Symptomatik“ fasst beschriebene klinische Merkmale wie wechselnde Lahmheiten, Steifheit, Gelenkschwellungen und Gelenkschmerzen sowie Mono- und Polyarthritiden zusammen. Diese Symptomatik wurde überwiegend bei Patienten mit chronischer Anaplasrose beschrieben. In einigen Fällen ließ sich hier keine Erreger-DNA im Blut mehr nachweisen, dafür aber bei drei Patienten in der Synovia. Insgesamt wiesen jedoch 22 (61%) der beschriebenen Hunde mit Anaplasrose dabei sowohl neurologische als auch arthritische Symptome auf.

Eine sichere Ehrlichiose-Diagnostik ist aus drei Gründen bisher schwierig und aufwendig. Erstens gibt die mikroskopische Untersuchung eines Blutausstrichs nur sehr selten morphologische Hinweise. Zweitens kann die Serokonversion sehr verzögert erfolgen oder ganz ausbleiben. Drittens gibt es, wie beschrieben, mehrere Erreger, die kaum eine Kreuzreaktivität im IFAT zeigen. Dennoch ist der serologische Nachweis von *E.-canis*- oder *A.-phagocytophilum*-spezifischen Antikörpern bisher häufig Mittel der Wahl zur Diagnosesicherung (24). In vielen Fällen erscheint es jedoch bedenklich, anhand des Vorhandenseins von Antikörpern auf eine Präsenz des Erregers zu folgern und eine Therapie einzuleiten.

Der direkte Erregernachweis mit dem hier beschriebenen hochsensitiven molekulargenetischen Nachweisverfahren bietet dagegen den Vorteil, dass eine akute Infektion von einer möglichen „Seronarbe“ unterschieden werden kann (9) und zudem in einem Testverfahren die DNA von drei relevanten Ehrlichien-Spezies erfasst wird. Neben *E. canis* und *A. phagocytophilum* wird *Anaplasma platys*, der Erreger der infektiösen kaninen zyklischen Thrombozytopenie, detektiert. Diese Erkrankung tritt weltweit in warmen Klimazonen auf, wobei in den europäischen Ländern von einer Verbreitung in Griechenland (17), Frankreich, Spanien (33) und Süditalien (26) ausgegangen wird. Bei Reisen in diese Länder oder bei importierten Tieren muss demnach mit einer Infektion gerechnet werden.

Dem standardmäßigen Einsatz der PCR in der Ehrlichiose-Diagnostik werden jedoch zahlreiche Argumente entgegengehalten. Es sind dies vor allem die Gefahr von falsch positiven Resultaten durch Kontamination, ein zu hoher Kosten- und Zeitaufwand sowie eine nur bedingt routinemäßige Durchführbarkeit. Alle diese Punkte treffen auf die von uns etablierte Real-Time-PCR (16) nicht mehr zu. Diese ist hochspezifisch, sehr sensitiv und es bedarf im Notfall nur etwa zwei Stunden, um die DNA aus dem Blut zu extrahieren und mittels PCR zu untersuchen. Das geschlossene System der Real-Time-PCR reduziert die Kontaminationsgefahr auf ein Minimum.

## Fazit für die Praxis

Aus den vorliegenden Daten ergeben sich folgende diagnostische Empfehlungen:

1. Der PCR-Nachweis von Ehrlichien-DNA aus EDTA-Blut ist zum Nachweis einer Ehrlichiose oder Anaplasrose im Anfangs- oder Akutstadium, bei reaktivierten Infektionen und als Therapiekontrolle das labordiagnostische Mittel der Wahl.

- Der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *E. canis* oder *A. phagocytophilum* kann bei asymptomatischen Hunden (z. B. Importtiere) dann sinnvoll sein, wenn es darum geht, einen zurückliegenden Kontakt oder eine latente Infektion auszuschließen.
- Da sich bei chronischen Infektionen aber oft kein Erreger mehr im Blut nachweisen lässt, sind bei Verdacht zusätzlich serologische Tests durchzuführen. Wahlweise wäre hier auch der direkte Erregernachweis im Knochenmark, in einem Lymphknotenpunkt oder in der Synovia anzuraten.
- Durch eine Kombination aus PCR und serologischem Nachweisverfahren in Verbindung mit einer hämatologischen und klinisch-chemischen Laboruntersuchung ist eine Diagnosestellung am sichersten möglich.
- Bei Zeckenbefall und arthritischer oder neurologischer Symptomatik sollte in unseren Breiten differenzialdiagnostisch auch eine Anaplasrose abgeklärt werden.

## Danksagung

Unser Dank geht an Frau A. Hahmann-Müller, Frau S. Blum, Frau S. Wolf für ihre hervorragende technische Unterstützung. Bedanken wollen wir uns auch ganz herzlich bei den kooperierenden Tierärzten für die große Hilfe beim Zusammenstellen der anamnestischen und klinischen Daten.

Dr. Kathrin Hartelt und Dr. Rainer Oehme vom Landesgesundheitsamt in Stuttgart danken wir für die Durchführung der DNA-Sequenzierungen. Der Firma MegaCor danken wir für die finanzielle Unterstützung.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts danken wir Dr. K. Rohner (CH-Niederglatt) und Dr. P. Engelhardt (Tierklinik Hofheim, D-Hofheim am Taunus).

Ein Teil der Materialkosten dieser Studie wurde mit dem Preisgeld für den Dr.-Ernst-Forschner-Gedächtnispreis 2005 des Arbeitskreises für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID) der DVG finanziert.

## Literatur

- Barutzki D. *Anaplasma-phagocytophilum*-Infektionen bei Hunden. Vet-Med Report 2005; V6: 4–5.
- Barutzki D, De Nicola A, Zeziola M, Reule M. Seroprävalenz der *Anaplasma phagocytophilum*-Infektion bei Hunden in Deutschland. Berl Münch Tierärztl Wschr 2006; 119 (7–8): 342–347.
- Baumgarten BU, Rollinghoff M, Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. J Clin Microbiol 1999; 37 (11): 3448–3451.
- Breitschwerdt E. Canine and feline ehrlichiosis: New developments. Referatesammlung. Tagung der Schweiz. Verein. Kleintiermedizin, Basel 2005.
- Centurion C, Gothe R, Hoffmann G, Liebisch A, Schein E. Die braune Hundezecke. *Rhipicephalus sanguineus*. (Latreille, 1806) in Deutschland, ein Problem in der Kleintierpraxis. Berl Münch Tierärztl Wschr 1979; 92 (23): 472–477.
- Cohn LA. Ehrlichiosis and related infections. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003; 33 (4): 863–884.
- Davoust B. L'ehrlichiose canine. Point Vét 1993; 25: 43–51.
- Dongus H, Zahler M, Gothe R. Die Braune Hundezecke, *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae), in Deutschland: eine epidemiologische Studie und Bekämpfungsmaßnahmen. Berl Münch Tierärztl Wschr 1996; 109 (6–7): 245–248.
- Dumler JS, Brouqui P. Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4 (4): 559–569.
- Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh UG, Wilske B. Epidemiological aspects of human granulocytic Ehrlichiosis in southern Germany. Wien Klin Wschr 1999; 111 (22–23): 1000–1004.
- Gothé R. *Ehrlichia-canis*-Infektionen der Hunde in Deutschland: Zur Epidemiologie, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. Tierärztl Prax 1998; 26 (K): 396–401.
- Gothé R. Zum Vorkommen von *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) in Deutschland. Z Tropenmed Parasitol 1968; 19 (3): 305–307.
- Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL. Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). Am J Vet Res 1975; 36 (7): 937–940.
- Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia sp.*), *Wolbachia sp.*, *Rickettsia sp.*, and *Babesia sp.* in Southern Germany. Int J Med Microbiol 2004; 293 Suppl 37: 86–92.
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22 (6): 364–367.
- Jensen J, Simon D, Schaarschmidt D, Müller W, Nolte I. Vorkommen von *Ehrlichia canis* bei Hunden in Deutschland. Tierärztl Prax 2007; 35 (K): 123–128.
- Kontos VI, Papadopoulos O, French TW. Natural and experimental canine infections with a Greek strain of *Ehrlichia platys*. Vet Clin Pathol 1991; 20 (4): 101–105.
- Leutenegger CM, Pusterla N, Mislin CN, Weber R, Lutz H. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. J Clin Microbiol 1999; 37 (10): 3390–3391.
- Lewis GE, Jr., Ristic M, Smith RD, Lincoln T, Stephenson EH. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the dog as experimental hosts of *Ehrlichia canis*. Am J Vet Res 1977; 38 (12): 1953–1955.

20. Liebisch G, Thiet W, Liebisch A. Die canine monozytäre (CME) und die canine granulozytäre Ehrlichiose (CGE), zwei durch Zecken übertragene Infektionskrankheiten bei Hunden in Deutschland. *Prakt Tierarzt* 2006; 87 (5): 342–353.
21. Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, et al. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (3): 1002–1007.
22. Lutz H, Hoffmann R, Marina E. *Anaplasma phagocytophilum*, die „schweizerische Ehrlichiose“. Referatesammlung. Tagung der Schweiz. Verein. Kleintiermedizin, Basel 2005.
23. Mathew JS, Ewing SA, Malayer JR, Fox JC, Kocan KM. Efficacy of a modified polymerase chain reaction assay for detection of *Ehrlichia canis* infection. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12 (5): 456–459.
24. Neer TM, Breitschwerdt EB, Greene RT, Lappin MR. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. *J Vet Intern Med* 2002; 16 (3): 309–315.
25. Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94 (6): 707–708.
26. Pennisi MG. Infection of small ruminants with *Ehrlichia* spp. in Sicily. *Parasitologia* 1999; 41 Suppl 1: 85–88.
27. Pusterla N, Braun U, Leutenegger CM, Reusch C, Lutz H. Ehrlichiose in der Schweiz – Bedeutung für die Veterinärmedizin. *Schweiz Arch Tierheilk* 2000; 142 (7): 367–373.
28. Pusterla N, Huder J, Wolfensberger C, Litschi B, Parvis A, Lutz H. Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (9): 2307–2309.
29. Pusterla N, Huder JB, Feige K, Lutz H. Identification of a granulocytic Ehrlichia strain isolated from a horse in Switzerland and comparison with other rickettsiae of the Ehrlichia phagocytophila genogroup. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (7): 2035–2037.
30. Pusterla N, Huder JB, Lutz H, Braun U. Detection of *Ehrlichia phagocytophila* DNA in *Ixodes ricinus* ticks from areas in Switzerland where tick-borne fever is endemic. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (9): 2735–2736.
31. Pusterla N, Leutenegger CM, Huder JB, Weber R, Braun U, Lutz H. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (5): 1332–1334.
32. Pusterla N, Pusterla JB, Deplazes P, Wolfensberger C, Müller W, Horauf A, et al. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine granulocytic Ehrlichia infection in dogs in Switzerland. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (12): 3460–3462.
33. Sainz A, Amusatogui I, Tesouro MA. *Ehrlichia platys* infection and disease in dogs in Spain. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11 (4): 382–384.
34. Suksawat J, Hegarty BC, Breitschwerdt EB. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med* 2000; 14 (1): 50–55.
35. Suter P. Ehrlichiosen, Anaplasmosen, Neorickettsiosen (Rickettsiales-Infektionen, Hunderickettsiosen, canine rickettsiosis). In: *Praktikum der Hundeklinik*. Suter P, Kohn B, Hrsg. Stuttgart: Parey 2006; 299–302.
36. Von Loewenich FD, Stumpf G, Baumgarten BU, Rollinghoff M, Dumler JS, Bogdan C. A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22 (5): 303–305.

Dr. Daniel Schaarschmidt-Kiener  
 ALOMED – Analytisches Labor Dr. Werner Müller  
 Öschlestraße 77  
 78315 Radolfzell  
 E-Mail: schaarschmidt@alomed.de