

**Open Access**

DOI 10.2376/0005-9366-17005 // Republikation aus der Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift

DOI 10.2376/0032-681X-1909

Klinik für kleine Haustiere, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland<sup>1</sup>Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, LMU München, München, Deutschland<sup>2</sup>Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald – Insel Riems<sup>3</sup>

Peer-reviewed | Eingegangen: 09.01.2017 | Angenommen: 19.04.2017

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

Aleksandra Chirek<sup>1</sup>, Cornelia Silaghi<sup>2,3</sup>, Kurt Pfister<sup>2</sup>, Barbara Kohn<sup>1</sup>

Korrespondenzadresse: chirek@laboklin.com

**Zusammenfassung** *Anaplasma phagocytophilum*, der Erreger der caninen granulozytären Anaplasmose, ist ein obligat intrazelluläres Bakterium, welches in erster Linie von Zecken der Gattung *Ixodes* (in Mitteleuropa v. a. *I. ricinus*) übertragen wird. Eine Übertragung über Bluttransfusionen ist ebenfalls möglich. Bei gesunden Hunden im Raum Berlin/Brandenburg betrug die Seroprävalenz in früheren Untersuchungen 39,8%. Ziel dieser Studie war es, die Ergebnisse aller PCR-Untersuchungen auf *A. phagocytophilum* sowie die vor jeder Blutspende erfolgten klinischen Untersuchungen und Laboruntersuchungen bei gesunden Blutspenderhunden zwischen 2006 und 2012 retrospektiv auszuwerten.

Insgesamt 917 EDTA-Blutproben von 517 Blutspenderhunden wurden mittels real-time PCR auf das Vorkommen von *A. phagocytophilum*-DNA getestet. Dabei wurden 158 der Hunde mehrmals getestet (2- bis 11-mal, Median 3). Bei 21 der 917 (2,3%) Blutproben von 21 Blutspenderhunden war die PCR positiv, hauptsächlich in den Monaten Juni (n=8), Mai (n=5) und Juli (n=3), aber auch in fünf weiteren Monaten. Keiner der getesteten Hunde war mehrfach positiv. Eine leicht erhöhte Rektaltemperatur ( $\geq 39,0^\circ\text{C}$ ) lag bei drei der 21 Hunde vor. Bei elf Hunden fielen geringgradige Laborwertveränderungen auf: Thrombozytopenie (n=3), Leukozytose (n=2), Leukopenie (n=2), Anämie (n=1), Hyperproteinämie (6 von 18 getesteten Hunden). Im Hinblick auf die Laborwertveränderungen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den PCR-positiven und PCR-negativen Blutproben.

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

**Schlüsselwörter** Vektorübertragener Erreger, transfusionsübertragene Erkrankung, canine granulozytäre Anaplasmose, PCR

## The occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* in canine blood donors in Berlin/Brandenburg (2006–2012): retrospective analysis of clinical data and relevance for transfusion medicine

**Summary** *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of canine granulocytic anaplasmosis, is an obligatory intracellular bacterium transmitted by *Ixodes* ticks (in Central Europe mainly *I. ricinus*). Transmission via blood transfusion is also possible. In the Berlin/Brandenburg area the seroprevalence in healthy dogs was 39.8% in previous studies. The aim of this study was to retrospectively evaluate PCR-screening results for *A. phagocytophilum* as well as results of physical and laboratory examinations in healthy blood donor dogs between 2006–2012. Altogether 917 EDTA blood samples from 517 dogs were submitted for *A. phagocytophilum* real-time PCR-testing. 158 dogs were tested several times (2–11 times, median 3). The PCR test was positive for 21 of the 917 samples from 21 blood donor dogs. Positive results were most often detected in June (n=8), May (n=5), and July (n=3), but also in five other months. None of the dogs tested PCR-positive more than once. In three of 21 dogs a mild increase in rectal temperature ( $\geq 39.0^\circ\text{C}$ ) was documented. Mild laboratory abnormalities were noted in eleven dogs: thrombocytopenia (n=3), leukocytosis (n=2), leukopenia (n=2), anemia (n=1) and hyperproteinemia (6 of 18 tested dogs). There was no significant difference between the PCR-negative and -positive blood samples with regard to laboratory abnormalities.

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

**Keywords** vector-borne pathogen, transfusion transmitted disease, canine granulocytic anaplasmosis, PCR





## Einleitung

Das Verabreichen von Blutprodukten spielt in der Intensivmedizin eine große Rolle und kann lebensrettend sein, aber auch Risiken mit sich bringen. Zum einen können immunmedierte (z. B. hämolytische Transfusionsreaktionen) und nicht-immunmedierte Komplikationen (z. B. Thrombosen, Citratintoxikation) auftreten, zum anderen ist eine Übertragung von Infektionserregern möglich (Crawford et al. 2013, Wardrop et al. 2016). Beim Menschen nimmt die Bedeutung vektorübertragener Erreger aufgrund diverser Faktoren zu. So übertragen Zecken über ein Dutzend Pathogene, von denen bei einigen die Gefahr einer Übertragung über Bluttransfusionen besteht (Leiby und Gill 2004). Aus humanmedizinischer Sicht sind weltweit besonders Vertreter der Gattung *Babesia* sowie *Anaplasma* (*A. phagocytophilum*) und andere Rickettsien von Interesse (Annen et al. 2012, Bloch et al. 2012, McQuiston et al. 2000). Beim Hund sind transfusionsbedingte Übertragungen von Leishmanien, Babesien und auch Anaplasmen dokumentiert (de Freitas et al. 2006, Kohn 2010, Owens et al. 2001, Stegeman et al. 2003).

*Anaplasma phagocytophilum*, der Erreger der caninen und humanen granulozytären Anaplasmoze, ist ein obligat intrazelluläres Bakterium der Ordnung Rickettsiales und wird in erster Linie von Zecken der Gattung *Ixodes* (in Mitteleuropa v. a. *I. ricinus*) übertragen. Die canine granulozytäre Anaplasmoze ist eine Infektionserkrankung, die mit akuten Symptomen einhergehen, aber auch asymptomatisch verlaufen kann (Beall et al. 2008, Foley et al. 2001). Erkrankte Hunde zeigen meist unspezifische Symptome wie Fieber, Inappetenz und Apathie. Des Weiteren können Lahmheiten und Blutungen auftreten. Häufige Laborwertveränderungen sind Thrombozytopenie und Anämie, eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase-Aktivität sowie Leukozytose oder Leukopenie (Beall et al. 2008, Chirek et al. 2013, Eberts et al. 2011, Granick et al. 2009, Greig et al. 1996, Jensen et al. 2007, Kohn et al. 2008, Poutout et al. 2005, Ravnik et al. 2009, Schaarschmidt-Kiener und Müller 2007). Eine Übertragung des Erregers über Bluttransfusionen wurde beim Menschen bereits mehrfach beschrieben (Alhumaidan et al. 2013, Annen et al. 2012, Bachowski et al. 2009, Eastlund et al. 1999, Fine et al. 2015, Jereb et al. 2012, Kemperman et al. 2008, Shields et al. 2015, Townsend et al. 2014). Auch beim Hund ist eine Übertragung über Blut möglich und experimentell nachgewiesen (Egenvall et al. 1998, Wardrop et al. 2016). In der Veterinärmedizin ist ein Fall einer transfusionsübertragenen caninen granulozytären Anaplasmoze bekannt. Es handelte sich um einen splenektomierten Hund nach Hämangiosarkom unter Chemotherapie. Sowohl Spender als auch Empfänger wurden PCR-positiv auf den Erreger getestet (Kohn 2010).

Beim Menschen wurden weltweit mehrere Studien zur Seroprävalenz von *A. phagocytophilum* bei Blutspendern veröffentlicht. Diese beträgt in den USA je nach Region zwischen 0,5 % und 11,3 % und in Europa zwischen 2 % und 21,4 % (Aguero-Rosenfeld et al. 2002, Chochlakis et al. 2008, Grzeszczuk et al. 2004, Leiby et al. 2002, Santos et al. 2006, Walder et al. 2003). Bei gesunden Blutspenderhunden in Italien wurde eine Seroprävalenz von 4,7 % für *A. phagocytophilum* festgestellt. Alle diese Hunde hatten ein negatives PCR-Ergebnis und keine nachweisbaren Morulae im Blutausschick (Vascellari et al. 2016). Auch in den USA wurde bei gesunden Blutspenderhunden mittels ELISA und PCR und in England mittels PCR

kein Vorkommen des Erregers nachgewiesen (Balakrishnan et al. 2014, Crawford et al. 2013). Folgt man den Richtlinien des ACVIM Consensus Statements von 2016 zum Screening von Blutspendern auf Infektionserreger, so ist eine Untersuchung auf *A. phagocytophilum* empfehlenswert. Der Erreger erfüllt drei nötige Kriterien, die eine Untersuchung der Blutspender rechtfertigen: (i) Er kann über Blut übertragen werden; (ii) eine Infektion kann klinisch inapparent verlaufen; (iii) der Erreger ist mit molekularbiologischen Methoden im Blut eines infizierten Tieres nachweisbar. Auch die Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich von 2011 empfehlen unter anderem die Untersuchung auf *A. phagocytophilum* mittels PCR in endemischen Gebieten (Feige et al. 2011).

Daher werden alle Blutspenderhunde der Klinik für kleine Haustiere (Freie Universität Berlin) bei jeder Blutspende auf das Vorhandensein von *A. phagocytophilum*-DNA mittels PCR getestet, um ein Risiko der Erregerübertragung von Spender auf Empfänger zu minimieren.

Ziel dieser Studie war es, die Ergebnisse aller PCR-Untersuchungen auf *A. phagocytophilum* von Hunden, die zwischen 2006 und 2012 zum Blutspenden vorgestellt wurden, sowie deren klinische und labordiagnostische Befunde retrospektiv auszuwerten.

## Studie

Im Untersuchungszeitraum wurden 917 EDTA-Blutproben von 517 verschiedenen Blutspenderhunden untersucht. Insgesamt 158 Hunde spendeten im Untersuchungszeitraum 2006–2012 mehrmals Blut und wurden somit mehrfach (2- bis 11-mal, Median 3) getestet. Insgesamt 258 Hunde waren männlich, davon 98 kastriert, und 259 Hunde weiblich, davon 115 kastriert. Die Auswahl der Blutspender erfolgte nach allgemeinen Richtlinien. Hunde, die zur Blutspende vorstellig wurden, sollten zwischen einem und rasseabhängig etwa zehn Jahren alt sowie regelmäßig geimpft und entwurmt sein, möglichst nicht unter 20 kg wiegen und nicht im Ausland gewesen sein. Die Befunde der klinischen Untersuchung und der Laboruntersuchungen der PCR-positiven sowie die Laboruntersuchungen der PCR-negativen Blutspender wurden anhand der Krankenakten retrospektiv vergleichend ausgewertet.

DNA wurde aus den EDTA-Blutroben mit dem QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstelleranleitung extrahiert. Quantität und Qualität der extrahierten DNA wurden mittels Spektrophotometrie überprüft (NanoDrop ND-100; Peqlab, Deutschland). Das Vorhandensein von *A. phagocytophilum*-DNA wurde mit einer real-time PCR getestet. Nachgewiesen wurde dabei ein 77bp langes multi-copy fragment des Oberflächenprotein 2 (major surface protein 2, *mSP2*)-Gens unter der Verwendung folgender Primer: ApMSP2f (5'-ATGGAAGG-TAGTGTGGTTATGGTTATT-3') und ApMSP2r (5'-TTGGTCTT-GAAGCGCTCGTA-3') sowie der TaqMan® Sonde ApMSP2p: FAM 5'-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-3' TAMRA (Courtney et al. 2004, Silaghi et al. 2011). Die PCR-Reaktion wurde mit 5 µl extrahierter DNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit dem TaqMan® Gen Expression Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) auf einem real-time PCR-System AB7500 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Temperaturbedingungen waren die folgenden: je ein Zyklus 50 °C 5 min und 95 °C 10 min, gefolgt



von 40 Zyklen 95 °C 15 s und 60 °C 1 min. RNase/DNase freies Wasser diente als Negativkontrolle („no-template“-control), DNA von *A. phagocytophilum* aus natürlich infizierten Hunden (mittels Sequenzierung eindeutig zugeordnet) als Positivkontrolle in jedem PCR-Lauf. Die Nachweisgrenze liegt bei einer Kopienzahl pro Reaktionsansatz (unpublizierte Daten).

Die hämatologischen Parameter (Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MHC, MCHC und Thrombozyten) wurden im Jahr 2006 mit dem Blutanalysegerät CELL-DYN® 3500 (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und ab dem Jahr 2007 mit dem SYSMEX® XT-2000i Hämatologiesystem (Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) aus EDTA-Blut bestimmt. Die Bestimmung der klinisch-chemischen Laborparameter (Kreatinin und Totalprotein) erfolgte aus Lithium-Heparin-Plasma mit Standardmethoden (Random-Access-Analyser Kone Lab 30i®, Thermo Fisher Scientific Inc, Vantaa, Finnland, bis Dezember 2009; ab Dezember 2009 Kone Lab 60i®, Thermo Fisher Scientific Inc, Vantaa, Finnland).

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 17.0 mittels Fisher's Exact Test. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## Ergebnisse

### Vorkommen von *Anaplasma phagocytophilum*

Von den 917 untersuchten Blutproben von 517 verschiedenen Blutspenderhunden waren 21 (2,3 %) PCR-positiv. Diese stammten von 21 Hunden, wobei zehn der PCR-positiven Hunde nur einmal Blut spendeten und elf Hunde Mehrfachspender waren. Letztere spendeten im Untersuchungszeitraum zwei bis zehn Mal und hatten bei ihrer ersten bis achten Blutspende (Median 3) nur zu einem Testzeitpunkt ein positives PCR-Ergebnis. Keiner der Hunde war mehrfach PCR-positiv. Bezogen auf die Anzahl der 517 Blutspenderhunde betrug die Prävalenz 4,06 %.

Insgesamt 15 der positiven Hunde waren männlich (davon 6 kastriert), sechs Hunde weiblich (davon 1 Hund kastriert). Das Alter der positiv getesteten Hunde lag zwischen einem und neun Jahren (Median 4). Von den negativ getesteten Hunden waren 243 männlich (davon 92 kastriert) und 253 Hunde weiblich (davon 114 kastriert). Ihr Alter lag zwischen einem und zwölf Jahren (Median 4).

Auf die Monate Mai bis Juli verteilten sich 76 % ( $n = 16$ ) der positiven Ergebnisse (► Abb. 1).

### Klinische Daten

Alle Hunde, unabhängig ob PCR-negativ oder PCR-positiv, waren laut Aussage der Besitzer gesund. Es lagen keine klinischen Befunde vor, die hinweisend für eine canine granulozytäre Anaplasiose waren. Drei der 16 PCR-positiven Hunde hatten eine geringgradig erhöhte Rektaltemperatur (39,0 °C; 39,2 °C; 39,3 °C), während diese bei 600 von 896 negativ getesteten Blutspenderhunden im Median 38,6 °C (Spanne 37,6–40,0 °C) und bei 54 dieser Hunde  $> 39,0$  °C (Spanne 39,1–40,0 °C, Median 39,2 °C) betrug. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,72$ ).

Elf PCR-positive Hunde hatten geringgradige Veränderungen der Laborparameter wie Leukozytose, Leukopenie, Thrombozytopenie, Anämie und Hyperproteinämie. Vier Hunde zeigten mehr

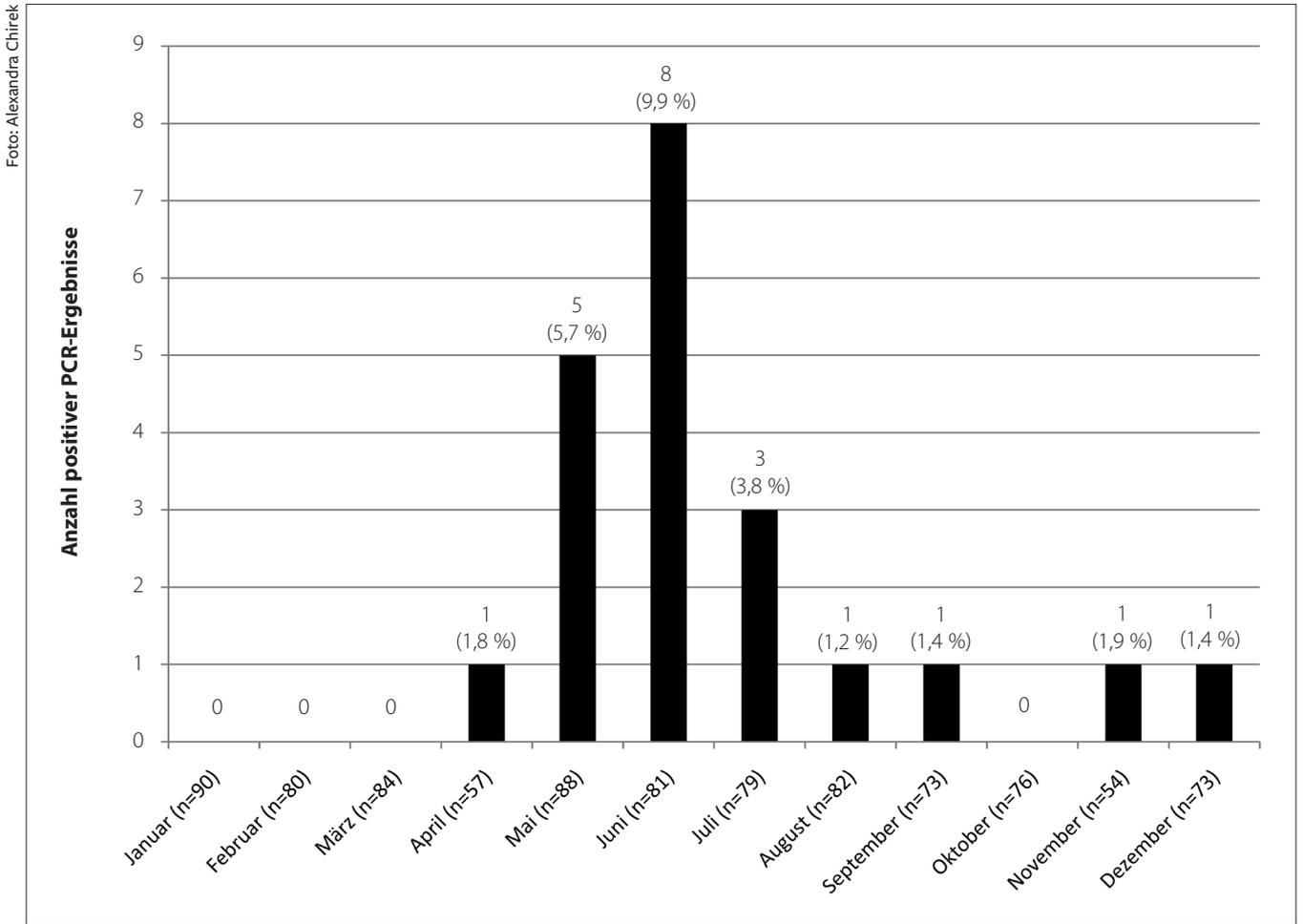


Abb. 1: Anzahl positiver PCR-Ergebnisse auf *Anaplasma phagocytophilum* pro Monat bei 917 untersuchten Blutproben von 517 Blutspenderhunden im Raum Berlin/Brandenburg im Zeitraum 2006–2012 (in Klammern n = Anzahl insgesamt untersuchter Proben im jeweiligen Monat)

als eine Veränderung: Leukozytose und Anämie (n = 1), Leukozytose und Hyperproteinämie (n = 1), Thrombozytopenie und Hyperproteinämie (n = 1), Thrombozytopenie, Leukopenie und Hyperproteinämie (n = 1). Zehn Hunde wiesen keine Laborwertveränderungen auf. Die Ergebnisse der untersuchten Parameter Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämatokrit und Totalprotein aller getesteten Blutproben beider Gruppen (PCR-positive und PCR-negative Blutproben) sind in ► Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Laborwertveränderungen der PCR-positiven Blutspender wurden mit denen der PCR-negativen Blutspender verglichen (► Tab. 2). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den PCR-positiven und PCR-negativen Blutspenderhunden im Hinblick auf das Vorkommen von Laborwertabweichungen (► Tab. 2).

Bei einem Hund wurde wegen niedriger Thrombozytenzahl (151 G/l) auf die Blutspende verzichtet. Bei allen anderen Hunden wurde Vollblut abgenommen (n = 20) und anschließend in Plasma und Erythrozytenkonzentrat aufgetrennt. Nach Erhalt des positiven PCR-Ergebnisses wurden 17 der Erythrozytenkonzentrate verworfen.

Drei der Erythrozytenkonzentrate mussten aufgrund von Notfallsituationen verabreicht werden, bevor das Ergebnis der Anaplasmen-PCR vorlag. Die erste Konserve erhielt ein Hund mit immunhämolytischer Anämie (Schnauzer, männlich, 3 Jahre alt), die zweite ein Hund mit Anämie aufgrund eines multiplen Myeloms (Beauceron, weiblich, 1 Jahr alt) und die dritte ein Hund mit immunbedingter Thrombozytopenie und Anämie (Rauhaardackel, männlich, Alter unbekannt). Bei keinem der Empfängerhunde wurde nach Transfusion eine Untersuchung auf *A. phagocytophilum*-DNA durchgeführt. Alle drei erhielten aber aufgrund ihrer Grunderkrankung Doxycyclin.

Insgesamt zwölf der 21 positiv auf *A. phagocytophilum* getesteten Blutspenderhunde wurden mit Doxycyclin behandelt. Vier dieser Hunde wurden drei bis sechs Monate (Median 3) nach der Blutspende mit dem positiven PCR-Ergebnis erneut zur Blutspende vorgestellt, der PCR-Test war zu diesem Zeitpunkt negativ. Sie spendeten im Untersuchungszeitraum insgesamt noch 1- bis 7-mal Blut (Median 4). Bei neun Hunden war die Therapie nicht dokumentiert. Drei dieser neun Hunde wurden erneut zur Blutspende vorgestellt:



ein Hund einmal (4 Monate nach der Spende mit dem positiven PCR-Ergebnis), ein Hund viermal (6–28 Monate nach dem positiven PCR-Ergebnis) und ein weiterer sechsmal (4–34 Monate nach dem positiven PCR-Ergebnis). Bei allen Blutspenden wurden erneute PCR-Untersuchungen durchgeführt, die alle negativ waren.

## Diskussion

Insgesamt 2,3 % der Blutproben gesunder Blutspenderhunde der Klinik für kleine Haustiere (FU Berlin) wurden im Zeitraum 2006–2012 positiv auf DNA des Erregers der caninen granulozytären Anaplasmose, *A. phagocytophilum*, getestet. Der Nachweis des Erregers erfolgte mittels real-time PCR, wobei spezifische DNA-Sequenzen eines Erregers vervielfältigt werden. Ein positives Ergebnis weist also das gegenwärtige Vorkommen des Erregers nach, erlaubt allerdings keine Aussage über dessen Lebensfähigkeit oder Infektiosität. Mittels Bestimmung eines Antikörpertiters hingegen kann nur ein stattgefundenen Erregerkontakt nachgewiesen werden, ein Rückschluss auf eine aktuell vorliegende Infektion ist nicht möglich. Bisher war in keiner Studie bei gesunden Blutspenderhunden *A. phagocytophilum*-DNA nachgewiesen worden (Balakrishnan et al. 2014, Crawford et al. 2013, Vascellari et al. 2016). In dieser Untersuchung wurden lediglich Antikörper gegen den Erreger mittels IFAT nachgewiesen (Vascellari et al. 2016). Bei 4,06 % aller Hunde der vorliegenden Studie wurde *A. phagocytophilum*-DNA mittels PCR nachgewiesen. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen einer früheren Untersuchung im Raum Berlin/Brandenburg, in der Erreger-DNA mittels PCR bei 3,78 % von 264 gesunden Hunden nachgewiesen werden konnte (Kohn et al. 2011). Studien bei gesunden oder zufällig ausgewählten Hunden weltweit wiesen eine Prävalenz für *A. phagocytophilum*-DNA (PCR-Test) von 0,5–4,0 % nach (Beall et al. 2008, Hamel et al. 2012, Jensen et al. 2007, Rymaszewska und Adamska 2011, Zygnier et al. 2009).

Positive PCR-Ergebnisse in vorliegender Studie wurden hauptsächlich in den Monaten Mai bis Juli, der Hauptaktivitätszeit des Vektors *I. ricinus*, gefunden, können aber ganzjährig vorkommen. Dies stimmt mit den Ergebnissen in der Literatur überein (Granick et al. 2009, Greig et al. 1996, Kohn et al. 2008, Poitout et al. 2005). Keiner der Hunde der vorliegenden Studie hatte klinische Befunde, die auf eine Infektion hätten hindeuten können. Es ist bekannt, dass Infektionen mit *A. phagocytophilum* häufig klinisch inapparent verlaufen (Beall et al. 2008, Foley et al. 2001, Jensen et al. 2007, Kohn et al. 2011, Moroff et al. 2014).

Auch die Ergebnisse der Laboruntersuchungen waren zwischen den positiv und negativ getesteten Hunden dieser Studie nicht signifikant unterschiedlich. Somit war anhand der Parameter Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämatokrit und Totalprotein kein Rückschluss auf eine Infektion möglich. Nicht alle PCR-positiven Hunde dieser Studie wurden im Anschluss therapiert. Drei der unbehandelten Hunde wurden vier bis sechs Monate nach der Spende mit dem positiven PCR-Ergebnis erneut zum Blutspenden vorgestellt. Die dabei durchgeführten PCR-Untersuchungen waren bei allen negativ, der Erreger scheint also trotz fehlender Therapie aus dem Blut eliminiert worden zu sein. Dies konnte auch in einer experimentellen Studie gezeigt werden, in der der Erreger bei einem Hund neun Wochen nach Inokulation trotz ausbleibender Therapie nicht mehr nachweisbar war (Moroff et al. 2014).

**Tab. 1: Ergebnisse der Laboruntersuchungen aller auf *Anaplasma phagocytophilum*-DNA getesteten Blutproben (\* n = 879; \*\* n = 877; \*\*\* n = 715)**

Parameter	Referenzbereich	PCR negativ n = 896		PCR positiv n = 21	
		Spanne	Median	Spanne	Median
Leukozyten* (G/l)	6–14	4,4–48,6	9,09	4,9–15,2	10,13
Thrombozyten** (G/l)	165–500	48–666**	244	151–396	227
Hämatokrit** (l/l)	0,42–0,56	0,35–0,74**	0,48	0,39–0,53	0,48
Totalprotein*** (g/dl)	54–66	46,3–83,6***	62,6	55,6–72,5	63,6

**Tab. 2: Ergebnisse der Laborwertveränderungen (Leukozyten-/Thrombozytenzahl, Hämatokrit, Totalprotein) von *Anaplasma phagocytophilum*-PCR-positiven und -negativen Blutspenderhunden im Vergleich**

	n (%)	PCR-negativ	n (%)	PCR-positiv	p-Wert
		Median (Min.–Max.)		Median (Min.–Max.)	
Leukozytose (> 14 G/l)	41 (4,7)	15,65 (14,0–48,6)	2 (9,5)	14,94 (14,7–15,2)	0,26
Leukopenie (< 6 G/l)	32 (3,6)	5,28 (4,4–5,6)	2 (9,5)	5,12 (4,9–5,3)	0,17
Thrombozytopenie (< 165 G/l)	43 (4,9)	150 (48–164)	3 (14,3)	156 (151; 156; 156)	0,08
Anämie (< 0,42 l/l)	49 (5,6)	0,41 (0,35–0,42)	1 (4,8)	0,39	1,00
Hyperproteinämie (> 66 g/l)	161 (22,5)	69,1 (66,1–83,6)	6 (33,3)	68,5 (66,5–72,5)	0,27

Da es sich bei *A. phagocytophilum* um ein intrazelluläres Bakterium handelt, welches vorwiegend in neutrophilen Granulozyten im Blut zirkuliert, und da der Erreger die Fähigkeit besitzt, in gekühltem Blut einige Zeit zu überleben (Proctor und Leiby 2015), besteht das Risiko der Übertragung über Bluttransfusionen.

Im Gegensatz zum Menschen wurde unseres Wissens nach bisher nur ein Fall einer granulozytären Anaplasmose beim Hund

nach Erhalt einer Bluttransfusion beschrieben (Kohn 2010), obwohl die Seroprävalenz höher ist als beim Menschen (Barutzki 2006, Kirtz et al. 2007, Santos et al. 2009). Im optimalen Fall erfolgt eine Untersuchung des Blutspenders mittels PCR und sein Blut wird erst nach Erhalt eines negativen Ergebnisses verabreicht. Blutprodukte positiv getesteter Blutspenderhunde sollten verworfen werden. In Notfallsituationen ist ein Abwarten des Ergebnisses unter Umständen jedoch nicht möglich und das Risiko einer Übertragung muss in Kauf genommen werden.

In dieser Studie wurde *A. phagocytophilum*-DNA positives Blut in Notfallsituationen an drei Hunde verabreicht. Keiner der Hunde entwickelte, soweit nachverfolgbar, Symptome einer Anaplasmose. Allerdings erhielten diese Hunde wegen ihrer Grunderkrankung bereits Doxycyclin. Es können daher keine Rückschlüsse gezogen werden, ob eine Erregerübertragung stattgefunden hat.

In einer früheren Studie wurde untersucht, ob der Einsatz von Filtern zur Leukozytenreduktion in Blutabnahmesystemen das Risiko einer Übertragung minimieren kann. Es wurde herausgefunden, dass der Prozess zwar das Risiko einer Übertragung reduziert, aber nicht eliminiert (Proctor und Leiby 2015). Die bei der Blutspende in der Klinik für kleine Haustiere eingesetzten Blutabnahmesysteme (Fenwal, Lake Zurich, USA) enthalten keine Leukozytenfilter. Blutabnahmesysteme mit Leukozytenfiltern werden in der Tiermedizin nicht routinemäßig eingesetzt. Weitere Faktoren, die das Risiko einer Übertragung senken können, sind regelmäßige

## Fazit für die Praxis

Das meist über Zecken der Gattung *Ixodes* übertragene, obligat intrazelluläre Bakterium *Anaplasma phagocytophilum* ist Verursacher der caninen Anaplasmose. Diese Infektionserkrankung kann mit verschiedenen klinischen Befunden einhergehen, verläuft aber häufig auch klinisch inapparent. Da Hunde im Raum Berlin/Brandenburg eine hohe Seroprävalenz für den Erreger aufweisen und eine Übertragung über Bluttransfusionen möglich ist, sollten im Idealfall alle Blutspenderhunde in endemischen Gebieten mittels PCR auf Erreger-DNA untersucht werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich Hunde nach jedem Zeckenbiss neu oder wieder infizieren können, ist eine jährliche Screeninguntersuchung nicht ausreichend.





Ektoparasitenprophylaxe sowie eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung des Blutspenders (Wardrop et al. 2016). Die Zeckenexposition der Blutspenderhunde wurde in der vorliegenden Studie nicht evaluiert.

Um ein hohes Maß an Transfusionssicherheit zu gewährleisten, sollten aufgrund der hohen Seroprävalenz und der häufig klinisch inapparent verlaufenden Infektionen alle Blutspender in endemischen Gebieten vor jeder Blutspende auf DNA von *A. phagocytophilum* untersucht werden. Folgt man den Anforderungen des ACVIM Consensus Statements von 2016 zum Screening von Blutspendern auf Infektionserreger, so ist eine jährliche Testung auf Infektionserreger ausreichend. Im optimalen Fall werden nur Hunde zur Blutspende ausgesucht, die auch seronegativ sind. Dies ist allerdings besonders in Gebieten mit hoher Seroprävalenz schwierig und engt, abgesehen vom steigenden wirtschaftlichen Aufwand, die Auswahl der zur Blutspende infrage kommenden Hunde deutlich ein.

## Conflict of interest

Es bestehen keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma, welche die im oben genannten Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten. ■

## Literatur

- Aguero-Rosenfeld ME, Donnarumma L, Zentmaier L, Jacob J, Frey M, Noto R, Carbonaro CA, Wormser GP (2002): Seroprevalence of antibodies that react with *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, in different populations in Westchester County, New York. *J Clin Microbiol* 40: 2612–2615.
- Alhumaidan H, Westley B, Esteve C, Berardi V, Young C, Sweeney J (2013): Transfusion-transmitted anaplasmosis from leukoreduced red blood cells. *Transfusion* 53: 181–186.
- Annen K, Friedman K, Eshoa C, Horowitz M, Gottschall J, Straus T (2012): Two cases of transfusion-transmitted *Anaplasma phagocytophilum*. *Am J Clin Pathol* 137: 562–565.
- Bachowski G, Kemperman MM, Skeate RC, Mair DC (2009): Transfusion-related *Babesia*: outbreak and investigations in the St. Paul, Minnesota Red Cross Region 2008 (abstract). *Transfusion* 49: Suppl35A.
- Balakrishnan N, Musulin S, Varanat M, Bradley JM, Breitschwerdt EB (2014): Serological and molecular prevalence of selected canine vector borne pathogens in blood donor candidates, clinically healthy volunteers, and stray dogs in North Carolina. *Parasit Vectors* 7: 116.
- Barutzki D (2006): Seroprävalenz der *Anaplasma phagozytophilum*-Infektion bei Hunden in Deutschland. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 119: 342–347.
- Beall MJ, Chandrashekar R, Eberts MD, Cyr KE, Diniz PP, Mainville C, Hegarty BC, Crawford JM, Breitschwerdt EB (2008): Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia species* in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8: 455–464.
- Bloch EM, Herwaldt BL, Leiby DA, Shaieb A, Herron RM, Chervenak M, Reed W, Hunter R, Ryals R, Hagar W, Xayavong MV, Slemenda SB, Pieniazek NJ, Wilkins PP, Kjemtrup AM (2012): The third described case of transfusion-transmitted *Babesia duncani*. *Transfusion* 52: 1517–1522.
- Chirek A, Silaghi C, Pfister K, Kohn B (2013): Granulozytäre Anaplasmosis bei 63 Hunden (2006–2012): Klinische und labordiagnostische Befunde und Verlauf. Abstracts der 21. Jahrestagung der FG „Innere Medizin und klinische Labordiagnostik“ der DVG (Innlab), München 2013, A21.
- Chochlak D, Papaeustathiou A, Minadakis G, Psaroulaki A, Tselentis Y (2008): A serosurvey of *Anaplasma phagocytophilum* in blood donors in Crete, Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27: 473–475.
- Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF (2004): Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 42(7): 3164–3168.
- Crawford K, Walton J, Lewis D, Tasker S, Warman SM (2013): Infectious agent screening in canine blood donors in the United Kingdom. *J Small Anim Pract* 54: 414–417.
- de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS (2006): Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol* 137: 159–167.
- Eastlund T, Persing D, Mathiesen D (1999): Human granulocytic ehrlichiosis after red cell transfusion (abstract). *Transfusion* 39: Suppl 117.
- Eberts MD, Vissotto de Paiva Diniz PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB (2011): Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 47: 86–94.
- Egenvall A, Björnsdóttir A, Lilliehöök I, Olsson Engvall E, Karlstam E, Artursson K, Hedhammar A, Gunnarsson A (1998): Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally with a Swedish *Ehrlichia species* isolate. *Vet Rec* 143: 412–417.
- Feige K, Grabner A, Gyra H, Kohn B, Moritz A, Schlumbohm W, Schwarz C, Werner E (2011): Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.
- Fine AB, Sweeney JD, Nixon CP, Knoll BM (2015): Transfusion-transmitted anaplasmosis from a leukoreduced platelet pool. *Transfusion* 56: 699–704.
- Foley JE, Foley P, Madigan JE (2001): Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. *Am J Vet Res* 62: 1599–1605.
- Granick JL, Armstrong PJ, Bender JB (2009): *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000–2007). *J Am Vet Med Assoc* 234: 1559–1565.
- Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS (1996): Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *J Clin Microbiol* 34: 44–48.
- Grzeszczuk A, Stanczak J, Kubica-Biernat B, Racewicz M, Kruminis-Lozowska W, Prokopowicz D (2004): Human anaplasmosis in north-eastern Poland: seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. *Ann Agric Environ Med* 11: 99–103.
- Hamel D, Silaghi C, Lescai D, Pfister K (2012): Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol Res* 110: 1537–1545.
- Jensen J, Simon D, Murua Escobar H, Soller JT, Bullerdiek J, Beelitz P, Pfister K, Nolte I (2007): *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses Public Health* 54: 169.



- Jereb M, Pecaver B, Tomazic J, Muzlovic I, Avsic-Zupanc T, Premru-Srsen T, Levicnik-Stezinar S, Karner P, Strle F (2012): Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion. *Emerg Infect Dis* 18: 1354–1357.
- Kemperman G, Neitzel D, Jensen K, Gorlin J, Perry E, Myers T, Miley T, McQuiston J, Ereemeeva ME, Nicholson W, Adjemian J (2008): *Anaplasma phagocytophilum* transmitted through blood-transfusion – Minnesota, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 57: 1145–1148.
- Kirtz B, Czettel B, Thum D, Leidinger E (2007): *Anaplasma phagocytophilum* in einer österreichischen Hundepopulation: eine Prävalenz-Studie (2001–2006). *Kleintierpraxis* 52: 562–568.
- Kohn B (2010): *Anaplasma phagocytophilum* in the dog – update on epidemiology and clinical disease. Proceedings of the Canine vector-borne disease meeting, New York, 2016, 36–43.
- Kohn B, Galke D, Beelitz P, Pfister K (2008): Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *J Vet Intern Med* 22: 1289–1295.
- Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K (2011): Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Res Vet Sci* 91: 71–76.
- Leiby DA, Chung AP, Cable RG, Trouern-Trend J, McCullough J, Homer MJ, Reynolds LD, Houghton RL, Lodes MJ, Persing DH (2002): Relationship between tick bites and the seroprevalence of *Babesia microti* and *Anaplasma phagocytophilum* (previously *Ehrlichia* sp.) in blood donors. *Transfusion* 42: 1585–1591.
- Leiby DA, Gill JE (2004): Transfusion-transmitted tick-borne infections: a cornucopia of threats. *Transfus Med Rev* 18: 293–306.
- McQuiston JH, Childs JE, Chamberland ME, Tabor E (2000): Transmission of tick-borne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States. *Transfusion* 40: 274–284.
- Moroff S, Sokolchik I, Woodring T, Woodruff C, Atkinson B, Lappin MR (2014): Detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* in dogs using an automated fluorescence based system. *Vet J* 202: 348–352.
- Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U (2001): Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc* 219: 1076–1083.
- Poitout FM, Shinozaki JK, Stockwell PJ, Holland CJ, Shukla SK (2005): Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* infecting dogs in Western Washington State. *J Clin Microbiol* 43: 796–801.
- Proctor MC, Leiby DA (2015): Do leukoreduction filters passively reduce the transmission risk of human granulocytic anaplasmosis? *Transfusion* 55: 1242–1248.
- Ravnik U, Tozon N, Strasek K, Avsic Zupanc T (2009): Clinical and haematological features in *Anaplasma phagocytophilum* seropositive dogs. *Clin Microbiol Infect* 15 (Suppl 2): 39–40.
- Rymaszewska A, Adamska M (2011): Molecular evidence of vector-borne pathogens coinfecting dogs from Poland. *Acta Vet Hung* 59: 2215–2023.
- Santos AS, Alexandre N, Sousa R, Nuncio MS, Bacellar F, Dumler JS (2009): Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec* 164: 168–171.
- Santos AS, Bacellar F, Dumler JS (2006): Human exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in Portugal. *Ann N Y Acad Sci* 1078: 100–105.
- Schaarschmidt-Kiener D, Müller W (2007): Labordiagnostische und klinische Aspekte der kaninen Anaplasrose und Ehrlichiose. *Tierärztl Praxis* 35: 129–136.
- Shields K, Cumming M, Rios J, Wong MT, Zwicker JI, Stramer SL, Alonso CD (2015): Transfusion-associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient with thalassemia trait: a case report. *Transfusion* 55: 719–725.
- Silaghi C, Kauffmann M, Passos LM, Pfister K, Zweggarth E (2011): Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. *Ticks Tick Borne Dis* 2: 204–208.
- Stegeman JR, Birkenheuer AJ, Kruger JM, Breitschwerdt EB (2003): Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 222: 959–963.
- Townsend RL, Moritz ED, Fialkow LB, Berardi V, Stramer SL (2014): Probable transfusion-transmission of *Anaplasma phagocytophilum* by leukoreduced platelets. *Transfusion* 54: 2828–2832.
- Vascellari M, Ravagnan S, Carminato A, Cazzin S, Carli E, Da Rold G, Lucchese L, Natale A, Otranto D, Capelli G (2016): Exposure to vector-borne pathogens in candidate blood donor and free-roaming dogs of northeast Italy. *Parasit Vectors* 9: 369.
- Waldner G, Tiwald G, Dierich MP, Wurzner R (2003): Serological evidence for human granulocytic ehrlichiosis in Western Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22: 543–547.
- Wardrop KJ, Birkenheuer A, Blais MC, Callan MB, Kohn B, Lappin MR, Sykes J (2016): Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. *J Vet Intern Med* 30: 15–35.
- Zygner W, Gorski P, Wedrychowicz H (2009): Detection of the DNA of *Borrelia afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia canis* in blood samples from dogs in Warsaw. *Vet Rec* 164: 465–467.

## Aleksandra Chirek



Nach dem Studium der Veterinärmedizin in München und Berlin Internship an der Kleintierklinik der FU Berlin mit anschließender mehrjähriger Assistenz in der Abteilung Innere Medizin unter der Leitung von Frau Prof. Barbara Kohn. 2018 Promotion zum Thema „Studien zu *Anaplasma phagocytophilum* beim Hund: Klinik der granulocytären Anaplasrose und Bedeutung für die Transfusionsmedizin“. Darauf folgend Anstellung in einer Kleintierpraxis, Schwerpunkt Innere Medizin. Derzeit tätig als Tierärztin in der Abteilung klinische Laboratoriumsdiagnostik bei Laboklin und Gastwissenschaftlerin an der Kleintierklinik der FU Berlin.

### Korrespondenzadresse:

Dr. Aleksandra Chirek, Klinische Laboratoriumsdiagnostik, LABOKLIN GmbH & Co. KG, Steubenstr. 4, 97688 Bad Kissingen, [chirek@laboklin.com](mailto:chirek@laboklin.com)