

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	VI
-----------------------------	----

Tabellenverzeichnis	VII
---------------------------	-----

Abkürzungsverzeichnis	VIII
-----------------------------	------

I Einleitung und Zielsetzung	1
--	----------

II Literaturübersicht	3
---	----------

1. Piroplasmida	3
----------------------------	---

1.1 Allgemeines	3
---------------------------	---

1.2 „Große“ Babesien: <i>Babesia canis</i> , <i>Babesia rossi</i> , <i>Babesia vogeli</i>	3
---	---

1.2.1 Morphologie und Entwicklungszyklus	3
--	---

1.2.2 Geographische Verbreitung	4
---	---

1.2.3 Vektoren und Wirte	5
----------------------------------	---

1.2.4 Symptomatik und Diagnose	6
--	---

1.3 „Kleine“ Babesien: <i>Babesia gibsoni</i> , <i>Babesia-microti-like</i> , <i>Babesia conradae</i>	8
---	---

1.3.1 Morphologie und Entwicklungszyklus	9
--	---

1.3.2 Geographische Verbreitung	9
---	---

1.3.3 Vektoren und Wirte	10
----------------------------------	----

1.3.4 Symptomatik und Diagnose	10
--	----

2 Rickettsiales	11
-----------------------------	----

2.1 Allgemeines	11
---------------------------	----

2.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	12
--	----

2.2.1 Morphologie und Vermehrungszyklus	12
---	----

2.2.2 Geographische Verbreitung	13
---	----

2.2.3 Vektoren und Wirte	13
----------------------------------	----

2.2.4 Symptomatik und Diagnose	15
--	----

2.3 <i>Ehrlichia canis</i>	16
----------------------------------	----

2.3.1 Morphologie und Vermehrungszyklus	16
---	----

2.3.2 Geographische Verbreitung	17
---	----

2.3.3 Vektoren und Wirte	17
----------------------------------	----

2.3.4 Symptomatik und Diagnose	18
--	----

2.4 <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i>	20
---	----

2.4.1 Morphologie und Vermehrungszyklus	20
---	----

2.4.2	Geographische Verbreitung	20
2.4.3	Vektoren und Wirte	21
2.4.4	Symptomatik und Diagnose	21
2.5	<i>Rickettsia</i> spp.	23
2.5.1	Morphologie und Vermehrungszyklus	23
2.5.2	Geographische Verbreitung	24
2.5.3	Vektoren und Wirte	24
2.5.4	Symptomatik und Diagnose	25
3	Onchocercidae	26
3.1	Allgemeines	26
3.2	<i>Dirofilaria immitis</i>	27
3.2.1	Morphologie und Entwicklungszyklus	27
3.2.2	Geographische Verbreitung	28
3.2.3	Vektoren und Wirte	29
3.2.4	Symptomatik und Diagnose	30
3.2	<i>Dirofilaria repens</i>	32
3.2.1	Morphologie und Entwicklungszyklus	32
3.2.2	Geographische Verbreitung	33
3.2.3	Vektoren und Wirte	34
3.2.4	Symptomatik und Diagnose	34
4	Diagnostikverfahren	35
4.1	Mikroskopie	35
4.2	Serologische Diagnostikverfahren	36
4.3	Molekularbiologische Diagnostikverfahren	37
4.4	Multiplex-Diagnostikverfahren	39
4.4.1	Die Multiplex-PCR	39
4.4.2	Der Reverse Line Blot (RLB)	39
4.4.2	Bead-basiertes Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®)	40
III	Material und Methoden	41
1	Material	41
1.1	Verbrauchsmaterialien	41
1.2	Reagenzien	42
1.3	Puffer und Lösungen	45

1.4	Medien und Mikroorganismen.....	49
1.5	Reaktionskits und Enzyme.....	49
1.6	Primer.....	51
1.7	Oligonukleotidsonden.....	52
1.8	Positivkontrollen.....	55
1.9	Laborgeräte.....	56
1.10	Software.....	59
2	Methoden.....	60
2.1	Probenmaterial.....	60
2.1.1	Gewinnung der Blutproben.....	60
2.1.2	Transport und Lagerung.....	62
2.1.3	Isolierung der DNA aus den Blutproben.....	62
2.1.4	Untersuchung der Blutproben.....	63
2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	63
2.2.1	Entwicklung und Durchführung der PCR.....	64
2.2.1.1	Singleplex-PCR.....	64
2.2.1.2	Duplex-PCR.....	66
2.2.1.3	Triplex-PCR.....	66
2.2.1.4	Quadruplex-PCR.....	68
2.2.1.5	Ermittlung der Nachweisgrenzen der Singleplex-, Duplex-, Triplex- und Quadruplex-PCRs.....	69
2.2.2	Gelelektrophorese.....	69
2.3	Erstellung der Plasmidpositivkontrollen.....	70
2.3.1	Gewinnung der DNA.....	71
2.3.2	Fällung und Aufreinigung von PCR-Produkten.....	72
2.3.3	Klonierung.....	73
2.3.4	Isolierung des Plasmids.....	75
2.3.5	Quantifizierung des DNA-Gehalts.....	76
2.3.6	Überprüfung der Plasmid-DNA.....	77
2.3.7	Sequenzierung.....	77
2.3.8	Verdünnung und Lagerung.....	77
2.4	Entwicklung eines Bead-basierten Multiplex-Diagnostikverfahrens (Luminex®-xMAP®-Technologie).....	78
2.4.1	Luminex®-Beads.....	79

2.4.2	Oligonukleotidsonden für das Luminex®-Verfahren	79
2.4.3	Kopplung der Luminex®-Beads	79
2.4.4	Verifizierung der Sonden und Überprüfung der Kopplungsreaktion.....	81
2.4.5	Biotinylierung der PCR-Produkte	81
2.4.6	Reverse Line Blot (RLB) zur Verifikation der Biotinylierung	82
2.4.6.1	Oligonukleotidsonden für den Reverse Line Blot (RLB)	82
2.4.6.2	Der Reverse Line Blot (RLB)	82
2.4.7	Luminex®-Hybridisierungsreaktion	84
2.4.7.1	Optimierung der Hybridisierungsreaktion	86
2.4.8	Bio-Plex®-System (Bio-Rad)	87
2.5	Statistische Auswertungen	87
IV	Ergebnisse	90
1	Ergebnisse der Polymerasekettenreaktionen (PCR).....	90
1.1	Nachweisgrenzen der Singleplex-PCR-Verfahren.....	90
1.1.1	Piroplasmida.....	90
1.1.2	Anaplasmatidae (<i>Anaplasma</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp. und <i>Cand. Neohrlichia</i> mikurensis).....	91
1.1.3	Onchocercidae	92
1.1.4	<i>Rickettsia</i> spp.	93
1.2	Nachweisgrenze der Duplex-PCR	94
1.3	Nachweisgrenze der Triplex-PCR	95
1.4	Nachweisgrenze der Quadruplex-PCR	96
1.5	Untersuchung der Blutproben	97
1.5.1	Ergebnisse der Triplex-PCR	98
1.5.2	Ergebnisse der Quadruplex-PCR	102
2	Ergebnisse des Bead-basierten Multiplex-Diagnostikverfahrens (Luminex®- xMAP®-Technologie)	106
2.1	Konstruktion der Oligonukleotidsonden	106
2.2	Die Bead-Kopplung und ihre Verifizierung.....	108
2.3	Der Reverse Line Blot (RLB)	109
2.4	Hybridisierung der Beads mit PCR-Produkten	111
2.4.1	Optimierungsansätze	113
V	Diskussion	114

1	Die Multiplex-Polymerasekettenreaktion	115
1.1	Entwicklung und Anwendung der Multiplex-PCR	115
1.2	Untersuchung der Blutproben mittels Multiplex-PCR.....	118
1.2.1	Probenmaterial	118
1.2.2	Erregernachweis mittels Triplex-PCR und Quadruplex-PCR	120
2	Das Bead-basierte Multiplex-Diagnostikverfahren (Luminex®-xMAP®- Technologie)	122
2.1	Entwicklung des Verfahrens	122
2.1.1	Die Beads	122
2.1.2	Die Oligonukleotidsonden	123
2.1.3	Die Bead-Kopplung	123
2.1.4	Verifizierung der Bead-Kopplung.....	124
2.1.5	Hybridisierung der Beads mit PCR-Produkten	125
2.1.6	Ansätze zur Überprüfung und Optimierung des Verfahrens.....	126
2.1.7	Ausblick	129
VI	Zusammenfassung.....	131
VII	Summary.....	133
VIII	Literaturverzeichnis.....	135
IX	Danksagung	157
X	Selbstständigkeitserklärung	158