

Forschungsbericht KLIMOPASS

Leishmania bei Füchsen -

Untersuchungen zum Vorkommen der viszeralen Leishmaniose in Baden-Württemberg

von Dr. S. Pluta, Dipl. Biol. L. Stenger,
Prof. Dr. Dr. P. Kimmig, Prof. Dr. U. Mackenstedt

Gefördert mit Mitteln des Ministeriums für Umwelt, Klima und
Energiewirtschaft Baden-Württemberg (UM)

März 2012

HERAUSGEBER	LUBW Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg Postfach 100163, 76231 Karlsruhe
KONTAKT	Dr. Kai Höpker, Referat Medienübergreifende Umweltbeobachtung, Klimawandel; Tel.:0721/56001465, Kai.Hoepker@lubw.bwl.de ;
AUFTRAGGEBER	Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg - Forschungsprogramm Klimawandel und modellhafte Anpassung in Baden- Württemberg (KLIMOPASS)
BEARBEITUNG	Prof. Dr. Ute Mackenstedt Universität Hohenheim, Fachgebiet Parasitologie Schloss Hohenheim 70593 Stuttgart
BEZUG	http://www.fachdokumente.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/91063/ ID Umweltbeobachtung U50-W03-N10
STAND	März 2012, Internetausgabe Mai 2013

Nachdruck für kommerzielle Zwecke - auch auszugsweise - ist nur mit Zustimmung der LUBW unter Quellenangabe und Überlassung von Belegexemplaren gestattet.

ZUSAMMENFASSUNG	5
1 EINLEITUNG	6
1.1 <i>Leishmania</i> spp.	6
1.2 <i>Phlebotomus</i> spp.	7
1.3 Canine Leishmaniose	8
1.4 Wildtiere	9
1.5 Ziele	10
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Herkunft der Proben	11
2.1.1 Fuchsproben	11
2.1.2 Hundeseren	11
2.2 Serologische Untersuchungen	12
2.2.1 Herkunft der Kontrollseren und Antigene	12
2.2.2 Aufbereitung des Probenmaterials	12
2.2.3 Herstellung der Antigen-beschichteten Objektträger	13
2.2.4 Nachweis von Antikörpern gegen <i>Leishmania</i> spp. mittels IFT	13
2.3 Molekularbiologische Untersuchungen	15
2.3.1 DNA-Aufreinigung	15
2.3.2 Nachweis von <i>Leishmania</i> spp. mittels PCR	16
2.3.3 Nachweis von Fuchs-DNA mittels PCR	16
3 ERGEBNISSE	18
3.1 Herkunft der Proben	18
3.1.1 Fuchsproben	18
3.1.2 Hundeseren	19
3.2 Serologische Untersuchungen	20
3.2.1 Nachweis von Antikörpern gegen <i>Leishmania</i> spp. mittels IFT	20
3.2.1.1 Fuchsseren	20
3.2.1.2 Hundeseren	21
3.3 Molekularbiologische Untersuchungen	22
3.3.1 Etablierung der PCR-Methodik	22

3.3.2	Nachweis von <i>Leishmania</i> spp. mittels PCR	22
3.3.3	Nachweis von Fuchs-DNA mittels PCR	23
3.4	Zusammenfassung der serologischen und molekularbiologischen Ergebnisse	23
4	DISKUSSION	25
4.1	Serologische Untersuchungen von Füchsen und Hunden	25
4.2	Molekularbiologische Untersuchung von Füchsen	26
4.3	Vergleich der serologischen und molekularbiologischen Ergebnisse	27
4.4	Bedeutung von Füchsen in der Epidemiologie von <i>Leishmania</i> spp.	28
4.5	Fazit	30
5	LITERATUR	31
6	ANHANG	35

Zusammenfassung

Die Leishmaniose, hervorgerufen durch Parasiten der Gattung *Leishmania*, ist eine insbesondere im Mittelmeerraum verbreitete Erkrankung, die durch Sandmücken (*Phlebotomus* spp.) übertragen wird. Auch in Süddeutschland wurden die als Vektoren dienenden Arthropoden bereits entdeckt; eine Einschleppung der Parasiten in der Zukunft wird erwartet.

Um das Vorhandensein von Leishmanien in Süddeutschland zu untersuchen, wurden Füchse aus Baden-Württemberg serologisch mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT) auf Antikörper gegen *Leishmania* spp. in Blut- bzw. Serumproben untersucht. Außerdem wurden Proben verschiedener Organe (Leber, Milz und Lymphknoten) molekularbiologisch mittels realtime-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) auf *Leishmania*-DNA überprüft. Auf diese Weise wurden insgesamt 199 Rotfüchse aus dem südlichen Baden-Württemberg, insbesondere der Rheinebene, getestet. Außerdem dienten 102 Füchse von der kühleren Schwäbischen Alb als Kontrollgruppe.

In sechs von 196 Blutproben (Prävalenz: 3,06%) aus Süddeutschland wurden IgG-Antikörper gegen *Leishmania* spp. nachgewiesen. Molekularbiologisch ließ sich allerdings in keinem der 199 Füchse Leishmanien-DNA detektieren. Im Gegensatz dazu erwiesen sich alle 102 Tiere von der Schwäbischen Alb sowohl in der Serologie als auch in der PCR als *Leishmania*-negativ.

Des Weiteren wurden 84 Hundeseren aus dem Freiburger Raum mittels IFT analysiert, sie stellten sich jedoch alle als negativ heraus.

Da bei der serologischen Untersuchung auf Leishmanien einige positive Füchse gefunden wurden und zudem Sandmücken als potenzielle Vektoren in Süddeutschland anzutreffen sind, kann deren Funktion als mögliches Reservoir für diese Parasiten auch in Deutschland nicht ausgeschlossen werden. Für genauere Aussagen, zum Beispiel über das potenzielle Risiko einer Übertragung von *Leishmania* spp. zwischen Füchsen und anderen Tieren oder Menschen, sowie auch über die Immunreaktionen oder den Krankheitsverlauf in den Reservoirwirten müssen jedoch noch weitere Untersuchungen folgen.

1 Einleitung

Besonders im Hinblick auf die voranschreitenden Klimaveränderungen gewinnen bestimmte Infektionskrankheiten, insbesondere solche, die von Vektoren übertragen werden, auch in unseren Breiten immer mehr an Bedeutung. Denn zusammen mit den Überträgern breiten sich die Krankheitserreger zunehmend in Regionen aus, die bisher für eine Etablierung dieser Pathogene durch die klimatisch eher ungünstigen Bedingungen nicht in Frage kamen. Ein Beispiel, das in letzter Zeit deutlich an (medizinischer) Relevanz zugenommen hat und in den Blickpunkt der Öffentlichkeit gerückt ist, stellt die Ausbreitung der Leishmaniose sogar bis in nördlichere Länder Mitteleuropas dar. Zwar wurden die als Vektoren dienenden Sandmücken der Gattung *Phlebotomus* bereits vor einigen Jahren in Ländern wie Österreich, der Schweiz und Deutschland nachgewiesen, doch erst in jüngster Zeit steigt die Anzahl autochthoner Leishmaniose-Fälle bei Mensch und Tier, hauptsächlich im Zusammenhang mit der Art *Leishmania infantum*, stetig an. Für die Verbreitung der Erreger spielen die als Reservoirwirte fungierenden Tierarten, insbesondere Wildtiere, eine wichtige Rolle. Denn zum einen gewährleisten diese die Aufrechterhaltung stabiler Populationen bestimmter Pathogene in sogenannten Naturherden, und zum anderen werden die Berührungspunkte von Mensch und Tier immer vielfältiger, sodass ein Aufeinandertreffen von Menschen und Krankheitserregern über die als Reservoir dienenden Tiere immer wahrscheinlicher und häufiger wird. Um das Risiko einer Infektion von Mensch und Tier mit bestimmten Arthropoden-übertragenen Pathogenen einschätzen und eventuell entsprechende Maßnahmen zur Vorkehrung, Eindämmung bzw. Kontrolle ergreifen zu können, ist zunächst fundiertes Wissen zur Epidemiologie, d.h. zur Häufigkeit und geografischen Verbreitung, der Vektoren und Reservoirwirten dieser Erreger erforderlich.

Für (Süd-)Deutschland liegen diesbezüglich bislang jedoch nur wenige Daten vor. Im Rahmen des vorliegenden Projekts sollte daher mit verschiedenen serologischen und molekularbiologischen Methoden das Vorkommen der viszerale Leishmaniose in Baden-Württemberg in Hunden sowie Füchsen (*Vulpes vulpes*) als potenziellem Wildreservoir untersucht werden.

1.1 *LEISHMANIA* SPP.

Bei den Vertretern der Gattung *Leishmania* handelt es sich um parasitische, dimorphe Protozoen. Sie werden systematisch in die Familie der *Trypanosomatidae* innerhalb der Ordnung der *Kinetoplastida* eingeordnet und gehören somit zum Stamm der *Euglenozoa*.

In Bezug auf das Verbreitungsgebiet und die Form der hervorgerufenen Erkrankung kann man zwischen verschiedenen Arten der Gattung *Leishmania* unterscheiden, wobei jedoch alle in ihrem Entwicklungszyklus einen obligatorischen Wirtswechsel zwischen Arthropoden und Wirbeltieren aufweisen.

Bei den Insekten, die als Endwirte und gleichzeitig Überträger für Leishmanien dienen, handelt es sich um Vertreter verschiedener Sandmückengattungen, vor allem der Gattung *Phlebotomus*. Als Zwischenwirte fungieren Säugetiere wie zum Beispiel Hunde, Füchse, Schakale und Nagetiere sowie auch der Mensch.

Mit dem Stich einer infizierten Sandmücke gelangen die Leishmanien-Stadien zunächst in die Haut des Wirbeltierwirtes, wo sie hauptsächlich von Makrophagen aufgenommen werden. In diesen wandeln sie sich in intrazelluläre Formen um und vermehren sich anschließend durch Zweiteilung, bis die Wirtszellen aufplatzen. Die auf diese Weise frei gewordenen Leishmanien befallen je nach Leishmanien-Art und Immunstatus des Wirts entweder weitere Makrophagen in der unmittelbaren Umgebung oder werden über das Lymphsystem zunächst in die Blutbahnen und über diese weiter in die Zellen verschiedener innerer Organe, unter anderem von Leber, Milz und Knochenmark sowie auch der Lymphknoten, verteilt. Mit der Blutmahlzeit werden die freien Leishmanien oder auch infizierte Wirtszellen von einer weiteren Sandmücke aufgenommen und durchlaufen neben einer starken Vermehrung auch eine erneute Formumwandlung. Schließlich werden sie beim nächsten Stich wieder auf einen Wirbeltierwirt übertragen (Mehlhorn & Piekarski, 2002).

Die durch Parasiten der Gattung *Leishmania* hervorgerufenen Erkrankungen werden als Leishmaniosen bezeichnet. Es handelt sich dabei um bereits lange bekannte Krankheiten, an der jährlich bis zu 80.000 Menschen sterben. Weltweit sind laut Angaben der WHO etwa 12 Millionen Menschen infiziert, wobei die Rate der Neuinfektionen auf ca. 1,5 – 2 Millionen pro Jahr geschätzt wird. Hinsichtlich der geografischen Verbreitung und der Symptome muss man zwischen verschiedenen Formen der Erkrankung unterscheiden. Eine Form ist die kutane Leishmaniose oder auch Hautleishmaniose, deren Verbreitungsgebiet sich hauptsächlich auf den Nahen und Mittleren Osten sowie Afrika beschränkt. Sie wird durch dermatrope Arten wie zum Beispiel *L. tropica* und *L. major* hervorgerufen und ist durch klinische Hautmanifestationen (zum Beispiel die klassische Orientbeule) gekennzeichnet. Eine weitere Ausprägung der Erkrankung ist die viszerale Leishmaniose, die durch viszerotrope Arten, zu denen unter anderem *L. donovani* und *L. infantum* zählen, ausgelöst wird. Neben Asien kommt diese Form auch in den meisten Mittelmeerländern vor und ist durch den vorrangigen Befall der inneren Organe, besonders der Milz, Leber und des Knochenmarks („Kala azar“) charakterisiert (Lucius & Loos-Frank, 2008).

Auch in Ländern Mitteleuropas wie der Schweiz, Österreich und Deutschland sind in den letzten Jahren einige autochthone Fälle bei Mensch und Tier aufgetreten, die alle auf die Art *Leishmania infantum* zurückzuführen sind (Köhler *et al.*, 2002; Bogdan *et al.*, 2001; Dornbusch *et al.*, 1999; Gothe, 1991; Kollaritsch *et al.*, 1989; Schawalder, 1977; Mazzi, 1976). Die Leishmaniose ist somit nicht mehr länger nur auf die Tropen und Subtropen beschränkt, sondern breitet sich infolge der Klimaerwärmung zusammen mit den als Vektoren dienenden Sandmückenarten immer mehr auch in ursprünglich kälteren Regionen aus.

1.2 PHLEBOTOMUS SPP.

Die Leishmanien-übertragenden Sandmückenarten in der alten Welt sind Vertreter der Gattung *Phlebotomus*, die zur Familie der Schmetterlingsmücken (*Psychodidae*) in der Ordnung der Zweiflügler (*Diptera*) gehören. Sandmücken sind kleine, zarte, gelblich-bräunliche und dicht behaarte Insekten mit relativ großen, schmalen Flügeln. Wie viele andere hämatophage Insekten benötigen die weiblichen Sandmücken für die Reifung der Eier mehrmals Blut, wobei sie während der Blutmahlzeit auch etwaige Krankheitserreger aufnehmen. Je nach Mückenart werden verschiedene Wirtstiere gestochen, darunter neben dem Menschen auch Hunde,

Nagetiere, Vögel oder Reptilien. Während einige Phlebotomen unterschiedliche Tierarten und manche sogar fast alle Wirbeltiere in ihrem Wirtsspektrum vorweisen können, kommen für andere Arten wiederum nur einzelne Wirte in Frage, das heißt, die Wirtsspezifität der einzelnen Arten variiert sehr stark. Generell bevorzugen Sandmücken dünnere Hautpartien für ihren Stich, bei Hunden sind dies häufig Nase, Augenlider, Bauchseite oder Genitalien. Da die adulten Tiere streng nacht- bzw. dämmerungsaktiv und die Larven sehr austrocknungs- und temperaturempfindlich sind, bevorzugen Sandmücken vor allem dunkle, feuchte und kühle sowie windgeschützte Stellen wie zum Beispiel Nagetierbauten, Höhlen, Tierställe, Scheunen oder Häuserkeller als Habitate und Brutplätze (Aspöck, 2002; Naucke, 2002).

Obwohl Sandmücken bisher hauptsächlich in tropischen und subtropischen Gegenden verbreitet sind, findet man verschiedene Arten wie zum Beispiel *P. ariasi*, *P. neglectus*, *P. perniciosus*, *P. perfiliewi*, *P. major*, *P. tobbi*, *P. simici*, *P. balcanicus* und *P. mascitii* auch in Südwest- und Mitteleuropa, nämlich neben den klassischen Mittelmeerländern seit einigen Jahren auch in Ländern wie Portugal, der Schweiz, Belgien und Deutschland, und durchaus im Zusammenhang mit autochthonen Leishmaniosefällen. Inzwischen gilt die Art *Phlebotomus mascitii* in Deutschland im südlichen Baden-Württemberg entlang des Rheingrabens als heimisch und weit verbreitet (Schmitt, 2002; Naucke & Pesson, 2000). Auch *Phlebotomus perniciosus*, die als Überträger der viszeralen Leishmaniose in Südeuropa bekannt ist, wurde bereits in Deutschland in Rheinland-Pfalz gefangen (Naucke, 2009). Abhängig von der jeweiligen Sandmückenart und Temperatur dauert die Entwicklung von der Blutmahlzeit bis zum adulten Insekt im mediterranen Raum etwa 40 – 57 Tage, wobei beispielsweise *P. mascitii* in Deutschland jährlich nur eine Generation erzeugt. Auch die jahreszeitliche Aktivität beschränkt sich in Abhängigkeit von der Temperatur in Süd- und Mitteleuropa auf Mai bis Oktober, in Süddeutschland dauert die Flugperiode von *P. mascitii* jedoch nur von Juni bis August (Schmitt, 2002).

1.3 CANINE LEISHMANIOSE

Neben verschiedenen wilden Tieren kommt in der mediterranen Region Südeuropas unter den domestizierten Säugetieren zweifelsfrei dem Haushund (*Canis familiaris*) die größte Bedeutung als natürliches Reservoir für Leishmanien, insbesondere *Leishmania infantum*, zu (Fich, 1994; Pozio et al., 1981); die Erkrankung des Hundes wird als canine Leishmaniose bezeichnet. Mit Werten von durchschnittlich fast 40% liegen die Infektionsraten von *L. infantum* bei Hunden in den Anrainerstaaten des Mittelmeeres, vor allem Frankreich, Spanien, Italien, Griechenland und Portugal, besonders hoch (Solano Gallego et al., 2001; Orndorff, 2000; Fisa et al., 1999; Maroli et al., 1999; Sideris et al., 1999; Morillas Marquez et al., 1996; Abranches et al., 1993; Argyriadis & Litke, 1991). Damit gilt die canine Leishmaniose in diesen Mittelmeerländern als endemisch und ist sogar noch um einiges häufiger und geografisch weiter verbreitet als die humane viszerale Leishmaniose. Bei Hunden findet man im Gegensatz zu Menschen, die mit *L. infantum* infiziert sind, nach einer anfänglichen asymptomatischen Phase typischerweise sowohl Eingeweidesymptome als auch Hautmanifestationen. Dazu gehören insbesondere verschiedene zu Blutungen und Krustenbildung neigende Läsionen im Bereich des Kopfes und der Extremitäten, Haarausfall und abnormer Krallenwuchs sowie auch charakteristische Milz- und/oder Leberschwellungen und Lymphknotenvergrößerungen. Neben den

generellen Krankheitsanzeichen sind auch eine Beteiligung der Nieren, verschiedene Manifestationen an den Augen und zahlreiche neurologische Symptome beschrieben. Es handelt sich bei der caninen Leishmaniose also um eine schwere systemische Erkrankung mit chronischem Verlauf, der schließlich zum Multiorganversagen führen kann. Zur Feststellung der Diagnose stehen verschiedene serologische (IFT, ELISA) und molekularbiologische (PCR) Methoden zur Verfügung (Baneth *et al.*, 2008; Solano Gallego *et al.*, 2001; Ferrer, 1999; Abranches *et al.*, 1991; Gothe, 1991).

1.4 WILDTIERE

Unter dem Begriff Reservoirwirt sind alle Tiere, in denen eine Parasitenpopulation langfristig aufrechterhalten werden kann, zusammengefasst (Ashford, 1996). Es kann sich dabei sowohl um domestizierte als auch um wilde Tierarten handeln, die an erster Stelle eine Vermehrung und/oder Entwicklung der entsprechenden Erreger, aber auch die Übertragung auf andere Individuen mittels sogenannter Vektoren ermöglichen. Ein tierisches Reservoir stellt somit eine wichtige Infektionsquelle für den Menschen (und dessen Haustiere) dar, wobei besonders Wildtiere als natürliches Reservoir verschiedenster Zoonosen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewinnen und in den Fokus der Öffentlichkeit rücken (Thompson *et al.*, 2009; Kruse *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2001).

Denn mittlerweile ist bekannt, dass viele Pathogene ursprünglich von wilden Tieren in natürlichen Infektionsherden stammen und auf verschiedene Weise auch in native Populationen eingeschleppt werden. Genau durch dieses Auftreten von Parasiten in neuen Wirten und auch durch die stark zunehmenden Berührungspunkte von Menschen und Haustieren mit der Wildnis infolge demografischer und ökologischer Veränderungen wird es unter anderem für die Kontrolle von Zoonosen immer wichtiger, mehr Informationen über die Biologie und Ökologie eines Wildtierreservoirs sowie auch der entsprechenden Überträger eines Krankheitserregers zu erhalten (Abdussalam, 1959).

Auch bei den Leishmaniosen handelt es sich um Zoonosen mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Säugetierarten, die als Reservoirwirte fungieren. Von Bedeutung hinsichtlich ihrer Funktion als potenzielles Reservoir sind neben den domestizierten dabei vor allem wilde Säugetiere. Insbesondere kommen in diesem Fall sylvatische Carnivoren (Raubtiere), vor allem verschiedene Caniden in Betracht, und zwar meistens solche Arten, die sich oftmals in Menschennähe aufhalten (Aguirre, 2009). Neben Schakalen (*Canis aureus*), Kojoten (*Canis latrans*), Wölfen (*Canis lupus* und *Chrysocyon brachyurus*), Marderhunden (*Nyctereutes procyonoides*), Waldhunden (*Speothos venaticus*) und Mardern (*Meles meles*), in denen bereits Leishmanien nachgewiesen wurden, stellt der Fuchs unter den wilden Caniden jedoch eindeutig den repräsentativsten Vertreter dar, weil bei diesem die Parasiten (hauptsächlich *Leishmania infantum*) bereits in mehreren verschiedenen Ländern der alten und neuen Welt sowie in verschiedenen Arten und Gattungen gefunden wurden (Beck *et al.*, 2008; Sastre *et al.*, 2008; Luppi *et al.*, 2008; Sobrino *et al.*, 2008; Curi *et al.*, 2006; Mohebbali *et al.*, 2005; Criado-Fornelio *et al.*, 2000; Baneth *et al.*, 1998; Macri *et al.*, 1997). Beispielsweise dienen in Brasilien der Brasilianische Kampfuchs (*Lycalopex vetulus*) und der Maikong (*Cerdocyon thous*) als Wirte für Leishmanien, doch auch in Ländern des Mittelmeerraumes wie Frankreich, Italien, Spanien und Portugal deuten einige Parasitenfunde in infizierten Füchsen (*Vulpes vulpes*, *Vulpes corsac* und *Vulpes*

zerda) auf die Existenz eines sylvatischen Zyklus hin (Conroy *et al.*, 1970; Rioux *et al.*, 1968; Abranches *et al.*, 1983; Gradoni *et al.*, 1983; Fisa *et al.*, 1999). Die Durchseuchungsraten liegen dabei mit bis zu 74% bei *L. infantum* in Hochendemiegebieten sehr hoch (Criado Fornelio *et al.*, 2000). Abgesehen von den eben erwähnten Caniden wurden verschiedene Arten der Gattung *Leishmania* auch aus Katzenartigen (zum Beispiel *Genetta genetta* und *Felis serval*) sowie Nagetieren bzw. Ratten- und Mäusearten isoliert. Lässt man den Hund außer Acht, dann sind die meisten bisher bekannten Reservoirwirte infolge langer Koevolution und entsprechend ihrer Funktion gut an die Parasiten angepasst, sodass die Infektionen, wenn überhaupt, einen sehr milden, latenten bzw. chronischen Verlauf, oftmals ohne offensichtliche Anzeichen der Erkrankung, zeigen (Ashford, 1996; Abranches, 1989).

1.5 ZIELE

Die Leishmaniose gilt als „re-emerging disease“; eine Ausbreitung in nichtendemische Gebiete wurde bereits in verschiedenen Ländern beobachtet, beispielsweise in Norditalien oder Frankreich (Sobrinho *et al.*, 2008). In Leishmaniose-Endemiegebieten wie dem Mittelmeerraum stellen Hunde das wichtigste Erregerreservoir dar. Durch den Import von infizierten Hunden aus diesen Gebieten werden die Parasiten regelmäßig auch nach Deutschland eingeschleppt (Walochnik und Aspöck, 2010). Da im Bereich des Rheingrabens im Südwesten Deutschlands bereits die als Vektoren dienenden Phlebotomen (*Phlebotomus mascitii* und *Phlebotomus perniciosus*) nachgewiesen wurden (Naucke *et al.*, 2008), ermöglicht der Import des Erregers in diese Gebiete die Etablierung von Übertragungszyklen. Das Auftreten von autochthonen Leishmaniose-Fällen bei Mensch und Tier deutet darauf hin, dass dieser Vorgang bereits im Gange ist (Naucke *et al.*, 2008).

Im Rahmen des vorliegenden Projekts soll untersucht werden, ob *Leishmania* spp. in Süddeutschland bereits in Naturherden endemisch ist. Da neben domestizierten Hunden auch Wildtiere, insbesondere andere Caniden-Arten, als Reservoirwirte in Frage kommen, werden in der vorliegenden Untersuchung Füchse aus dem südlichen Rheintal serologisch und molekularbiologisch auf Infektionen mit Leishmanien untersucht. Füchse aus dem Gebiet der Schwäbischen Alb, in dem aufgrund der niedrigeren Temperaturen nicht mit einem Vorkommen von Phlebotomen gerechnet wird, dienen als Kontrollgruppe. Daneben werden Seren von Hunden aus Süddeutschland auf Leishmanien-Antikörper getestet.

2 Material und Methoden

2.1 HERKUNFT DER PROBEN

2.1.1 FUCHSPROBEN

Die für die vorliegende Studie verwendeten Fuchsproben stammten aus zwei verschiedenen Untersuchungsgebieten.

Da für das Rheintal die Verbreitung von Phlebotomen bereits belegt und somit auch ein Vorkommen von Leishmanien plausibel ist, wurden in erster Linie Füchse aus dem südwestlichen Baden-Württemberg (Regierungsbezirk Freiburg) untersucht. Die Proben wurden im Rahmen von Fuchssektionen im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA, Dr. K. Danner und Dr M. Sunz) in Freiburg entnommen und dem Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt.

53 Füchse wurden im Rahmen des vorliegenden Projekts serologisch und molekularbiologisch auf Leishmanien-Infektionen untersucht. Darüber hinaus wurden 146 Tiere, die bereits im Rahmen einer Diplomarbeit serologisch auf Leishmanien-Antikörper untersucht wurden (Stenger, 2011), molekularbiologisch auf Leishmanien getestet.

Als Kontrollgruppe wurden Füchse von der Schwäbischen Alb untersucht, da dort aufgrund der niedrigeren Temperaturen nicht mit dem Vorkommen von Phlebotomen gerechnet wird. Die Tiere wurden im Rahmen eines Projekts zum Vorkommen von *Echinococcus multilocularis* geschossen und im Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim seziiert. Aus diesem Gebiet standen 102 Füchse zur Verfügung, die sowohl serologisch als auch molekularbiologisch getestet wurden.

Das Probenmaterial jedes Tieres umfasste Leber, Milz, Popliteal-(Kniekehlen)Lymphknoten und Blut.

2.1.2 HUNDESEREN

Die Hundeseren wurden von zwei Kleintierkliniken im südlichen Baden-Württemberg (Kleintierklinik Dr. Frank in Freiburg und Kleintierklinik Dres. Kasa in Lörrach) zur Verfügung gestellt. Das Einzugsgebiet der Kliniken umfasst in erster Linie das südliche Rheintal, es werden jedoch auch Tiere aus der Schweiz oder dem Elsass behandelt. Insgesamt wurden von beiden Kliniken 85 Seren zur Verfügung gestellt, die im Rahmen anderer tiermedizinischer Untersuchungen von Hunden genommen wurden. Das Abnahmedatum ist für alle Proben bekannt. Für die Proben der Klinik in Lörrach sind zudem genaue Angaben zur Herkunft der Tiere vorhanden.

2.2 SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

2.2.1 HERKUNFT DER KONTROLLSEREN UND ANTIGENE

Zur Auswertung und Beurteilung der Ergebnisse des Immunfluoreszenztests wurden zum Vergleich verschiedene *Leishmania*-Positiv- und Negativkontrollseren verwendet. Im Einzelnen handelt es sich dabei um Seren von Hunden verschiedener Rassen, Herkunft und unterschiedlichen Alters, die mit *Leishmania* spp. infiziert waren bzw. sind, sodass deren Blut bzw. Serum Antikörper gegen Leishmanien enthält (Antikörpertiter von 1:2000 bis 1:4000). Alle *Leishmania*-positiven Hunde wurden aus Ländern der Mittelmeerregion, zum Beispiel Portugal, Italien und der Türkei, importiert, in Deutschland wurde jeweils eine canine Leishmaniose diagnostiziert. Das verwendete Negativserum stammt von einem nicht infizierten Hund aus Italien. Insgesamt wurden dem Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim bereits im Rahmen früherer Arbeiten sieben verschiedene positive und vier negative Kontrollseren überlassen, die von Dr. rer. nat. Torsten J. Naucke (Parasitus Ex e. V., Niederkassel) gesammelt und zur Verfügung gestellt wurden (s. Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Kontrollseren mit Angabe von Rasse, Alter und Herkunftsland der Spenderhunde sowie dem Einsendedatum der Proben und medizinischem Befund.

Name (Hund)	Alter (Hund)	Herkunft (Land)	Einsendedatum (Blut/Serum)	Befund (Antikörpertiter)
„Angeli (Irina)“	–	Portugal	20. & 22.01.2010	<i>Leishmania</i> -positiv (1:4000)
Bretonen-Mix „Pingu“	ca. 3 Jahre	Italien (Sardinien) importiert 07.03.2010	24.03.2010	<i>Leishmania</i> -positiv (1:4000)
Boxer/Ridgeback-Mix „Inka“	ca. 7 Jahre	Türkei (Alanya) importiert 10/2005	14.05.2010	<i>Leishmania</i> -positiv (1:2000)
Maremmano-Mischling „Isotta“	ca. 3 Monate	Italien (Sardinien)	10.06.2010	<i>Leishmania</i> -negativ

Als Antigen für den Immunfluoreszenztest diente mit *Leishmania* spp. infiziertes Lebergewebe von Goldhamster. Die Tiere wurden bereits einige Jahre zuvor im Landesgesundheitsamt (LGA) Baden-Württemberg mit den Parasiten infiziert und anschließend, nach Absiedelung der Leishmanien in den entsprechenden Organen, sezirt. Dabei wurden jeweils Milz und Leber der Hamster entnommen und für weitere Untersuchungen dem Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim überlassen, sodass das Antigen für diese Arbeit bereits vorhanden war.

2.2.2 AUFBEREITUNG DES PROBENMATERIALS

Für die serologischen Untersuchungen wurde aus dem übersandten bzw. selbst entnommenen Herzblut der Füchse zunächst das Serum gewonnen und dieses anschließend portioniert, um häufiges Auftauen und

wieder Einfrieren sowie Kontaminationen zu vermeiden. Um aus dem Vollblut das Serum zu erhalten, wurde das Blut zunächst aufgetaut, in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und anschließend in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 16.000 g für 20 min. abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (Serum) abgenommen, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß gefüllt und pro Probe in jeweils sechs Aliquots à ca. 50µl aufgeteilt. Das Pellet wurde verworfen. Die Serumportionen wurden anschließend bei -25°C eingefroren und bis zur späteren Verwendung gelagert.

2.2.3 HERSTELLUNG DER ANTIGEN-BESCHICHTETEN OBJEKTTRÄGER

Von den mit *Leishmania* spp. infizierten Hamsterlebern, die als Antigen zur Bindung der eventuell im Serum vorhandenen Antikörper dienen sollten, wurden Gefriergewebeschnitte angefertigt und diese als Substrat auf vorbehandelte Objektträger aufgebracht.

Hierzu wurden die Lebern in kleinere Gewebestücke (3x3 – 5x5 mm) zerschnitten und diese einzeln in spezielles Gefriermedium eingebettet. Durch anschließendes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden mehrere schnittfähige „Blöckchen“ mit jeweils einem Leberstückchen hergestellt. Diese wurden entweder direkt geschnitten oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Anfertigung der eigentlichen mikroskopischen Schnittpräparate erfolgte mit einem Kryomikrotom (Model CM3050) der Firma LEICA. Um ein Abschwimmen der Schnitte vom Objektträger zu verhindern, wurden diese zuvor mit Aceton (100%) entfettet und mit jeweils 10µl Poly-L-Lysin-Hydrobromid (0,1%) pro well beschichtet. Insgesamt wurden auf diese Weise aus zwei Gewebestückchen circa 65 Objektträger à 10 Schnitten mit einer Dicke von 12 µm angefertigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.4 NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN *LEISHMANIA* SPP. MITTELS IFT

Der Indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) ist eine gängige Methode der Serologie zum Nachweis von Antikörpern gegen Pathogene, in diesem Fall gegen Leishmanien, der an Zell- und Gewebeschnitten durchgeführt wird. Die Methodik der zugrundeliegenden Antigen-Antikörper-Reaktion lässt sich in zwei Teile gliedern: Im ersten Schritt findet die Bindung der Antigen-spezifischen Primärantikörper, beispielsweise aus (Wild-)Tierseren, an die auf einem Objektträger befindlichen Antigene statt. In einem zweiten Schritt binden Sekundärantikörper an die Primärantikörper. Diese Sekundärantikörper werden auch als Antikörperkonjugate bezeichnet, da sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff (in diesem Fall FITC) zur Detektion gekoppelt sind. Der Antikörper-Nachweis erfolgt bei dieser Methode direkt im Anschluss mittels Fluoreszenzmikroskopie durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Da auf diese Weise die gegen die Parasiten gerichteten spezifischen Antikörper nicht direkt, sondern über die Bindung von Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern an die Primärantikörper nachgewiesen werden, spricht man von der sogenannten „indirekten“ Immunfluoreszenz.

Die Methode des IFT zum Nachweis von Antikörpern gegen *Leishmania* spp. im Serum von Füchsen bzw. Hunden ist am Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim bereits etabliert. Die Rahmenparameter wie Antigen, Antikörperkonjugat, Positiv- und Negativkontrollseren, Konzentrationen der Seren bzw. des Antikörperkonjugats etc. wurden bereits zuvor in mehreren Versuchsreihen getestet und aufeinander abgestimmt (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Zusammenfassung der Versuchparameter zum serologischen Nachweis von Antikörpern gegen *Leishmania* spp. mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFT).

Rahmenparameter zum serologischen Nachweis von Antikörpern gegen <i>Leishmania</i> spp. mittels IFT im Serum von Füchsen bzw. Hunden		
	Füchse	Hunde
Testserum	196 Tiere (Großraum Freiburg)	84 Tiere (Freiburg & Lörrach)
	98 Tiere (Schwäbische Alb)	
	1:50-Verdünnung	
	Doppelwerte	Einzelwerte
Antigen	mit <i>Leishmania</i> spp. infizierte (Hamster-)Leberzellen (selbst beschichtete Objektträger)	
Antikörperkonjugat	MegaScreen FLUO VET FITC anti dog IgG-Konjugat (MegaCorDiagnostik GmbH) unverdünnt (1 Tropfen; entspricht ca. 20 µl; enthält Evan`s Blue)	
Positivhundeserum	Serum „Angeli“, „Pingu“ und „Inka“ 1:50- & 1:200-Verdünnung	
Negativhundeserum	Serum „Isotta“ 1:50 & 1:200-Verdünnung	

Da das Mitführen der Doppelwerte bei den Fuchsseren keine neuen Erkenntnisse brachte, wurde bei den Hundeseren nach Abwägen der Vor- und Nachteile aus Gründen der Zeit-, Material- und Kostenersparnis darauf verzichtet.

Durchführung:

Entsprechend des allgemeinen Versuchsprinzips eines IFT, kann man die eigentliche Durchführung ebenfalls in zwei Abschnitte unterteilen, nämlich zum einen das Auftragen und die Inkubation der entsprechenden Seren und zum anderen das Aufbringen und die Inkubation des passenden Antikörperkonjugats (MegaScreen FLUO VET FITC antidog IgG-Konjugat von MegaCor Diagnostik GmbH).

Zunächst werden die benötigten Aliquots der zu untersuchenden Seren sowie die Antigen-beschichteten Objektträger ca. 20 min. aufgetaut. Die Seren werden kurz (1 min.) bei 16.000g und 4°C abzentrifugiert und anschließend die jeweiligen Verdünnungen in 1xPBS hergestellt. Die Objektträger werden nun für 10 min. in reinen Aceton (100%) eingestellt, sodass ein Abschwimmen der Schnitte vom Objektträger vermieden und die Antigene fixiert werden. Anschließend werden die Schnitte zunächst für 3 Minuten luftgetrocknet, bevor jeweils 20 µl der entsprechenden Serumverdünnungen auf die Schnitte pipettiert werden. Nach dem Auftragen der Seren folgt die erste Inkubationsphase von 45 min bei 37°C in einer feuchten Kammer. In dieser Zeit findet die entscheidende Antigen-Antikörper-Reaktion statt, d.h. etwa vorhandene Serumantikörper binden an die Antigene in den Leberschnitten. Um ungebundene Serumproteine wieder von den Schnitten zu entfernen und unspezifische Bindungen so gering wie möglich zu halten, folgen auf die

Seruminkubation sofort 3x2 Waschschritte mit 1xPBS für jeweils 1,5 min. Danach werden die Objektträger getrocknet und das FITC-markierte anti-dog-Antikörperkonjugat auf die Schnitte aufgetragen (pro Schnitt bzw. well jeweils 1 Tropfen, entspricht ca. 20 µl). Nach dem Aufbringen des Konjugats beginnt die zweite Inkubationsperiode von ebenfalls 45 min. bei 37°C in der feuchten Kammer. Dabei können die konjugierten Sekundärantikörper an die eventuell zuvor gebundenen Primärantikörper aus dem Tierserum binden. Nach der Konjugatinkubation erfolgen 4x2 Waschschritte mit 1xPBS für jeweils 2,5 min., um ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Antikörperkonjugate zu entfernen. Abschließend werden die Objektträger für weitere 10 min. getrocknet und zur mikroskopischen Auswertung mit einem Einbettmedium für Fluoreszenzpräparate (Roti®-Mount FluorCare von ROTH®) eingedeckt. Die Beurteilung der Proben findet etwa 20 min. nach dem Einbetten der Schnitte am Fluoreszenzmikroskop Axiophot von ZEISS bei 400facher Vergrößerung statt. Dabei werden die einzelnen Seren bzw. die resultierenden Reaktionen hinsichtlich Art und Intensität der Fluoreszenz mit den entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen verglichen. Positive Reaktionen erscheinen hierbei als klar abgegrenzte gelb- bis apfelgrüne Fluoreszenz. Als negativ hingegen sind rot gefärbte Zellen (Gegenfärbung mit Evan's Blue) oder fluoreszierende Signale, die aber nicht der Positivkontrolle entsprechen, zu bewerten.

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Für den molekularbiologischen Nachweis von Leishmanien in Fuchs-Organen wurden jeweils Milz und popliteale Lymphknoten jedes Tieres verwendet. Von den 146 Füchsen, die bereits in einer Diplomarbeit serologisch untersucht worden waren (Stenger, 2011), wurden zusätzlich Leberproben untersucht. Diese erwiesen sich jedoch aufgrund des fortgeschrittenen Verwesungsgrades als ungeeignet für die molekularbiologischen Untersuchungen; daher wurden die Untersuchungen im weiteren Verlauf auf Milz- und Lymphknotenproben beschränkt.

2.3.1 DNA-AUFREINIGUNG

Die DNA-Aufreinigung aus den Fuchsorganen erfolgte automatisiert mit Hilfe des Maxwell 16™ (Fa. Promega) nach Angaben des Herstellers.

Von jedem Fuchs wurde die DNA aus zwei 5x5mm großen Stücken des Kniekehlenlymphknotens einzeln extrahiert. Zudem wurde die DNA von jeweils drei Milzstücken à 5x5mm gemeinsam aufgereinigt, um einen größeren Bereich des Organs untersuchen zu können. Die Elution der DNA erfolgte in jedem Fall mit 200µl Elutionspuffer.

Die DNA-Aufreinigung wurde im Molekularbiologie-Labor des Landesgesundheitsamts Baden-Württemberg im Regierungspräsidium Stuttgart bei Dr. Rainer Oehme durchgeführt.

2.3.2 NACHWEIS VON *LEISHMANIA* SPP. MITTELS PCR

Für den molekularbiologischen Nachweis von *Leishmania* spp. in Fuchsorganen wurde eine realtime-PCR nach Galletti et al. (2011) verwendet. Die Zielsequenz der PCR mit einer Länge von 132bp befindet sich innerhalb eines zirkulären, in mehreren tausend Kopien vorhandenen Bereichs („Minizirkel“) der Kinetoplasten-DNA. Aufgrund dieser vielfach vorhandenen Zielsequenz zeichnet sich diese PCR durch eine hohe Sensitivität aus, sodass auch bei geringer Menge an Erreger-DNA im untersuchten Gewebe ein Nachweis möglich ist.

Die verwendeten Primer sind spezifisch für die Gattung *Leishmania*; neben der im Mittelmeerraum verbreiteten Art *Leishmania infantum* können somit auch andere Arten erfasst werden. Zur Artdifferenzierung muss gegebenenfalls eine DNA-Sequenzierung durchgeführt werden.

Die PCR wurde mit Hilfe des SensiMixCapillary Kit (Fa. Bionline) auf einem LightCycler 2.0 (Fa. Roche) durchgeführt. Der 20µl-Ansatz der PCR setzte sich wie folgt zusammen: 1x SensiMixCapillary Mix (SensiMixCapillary Kit), je 0,3µM der Primer Leish-F (5'-ACTTTTCTGGTCTCCGGGTAG-3') und Leish-R (5'-CCTATTTTACACCAACCCCAAGT-3'), 0,2µM TaqMan-Sonde (5'-FAM-ATTTCTGCACCCATTTT-TAMRA-3') sowie 1x Enzym-Mix (SensiMixCapillary Kit). Als Template wurden 2µl aufgereinigte DNA eingesetzt. Das Temperaturprofil der PCR beinhaltete eine Eingangsdenaturierung bei 95°C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung (95°C, 15s) und Annealing (60°C, 60s) sowie einer abschließenden Kühlung auf 40°C für 30s. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 530nm.

Als Positivkontrolle diente DNA-Aufreinigung der Leber eines Hamsters, der mit *Leishmania donovani* infiziert wurde. Die Kontrolle wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Astrid Kirch (Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg im Regierungspräsidium Stuttgart). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Wasser anstelle von DNA-Template.

Zur Überprüfung der Sensitivität der PCR-Methodik wurde in einem ersten Versuch eine Verdünnungsreihe der Positivkontrolle (Ausgangskonzentration: 112,5µg/ml, Verdünnungsstufen 1:10 bis 1:10⁸) hergestellt und in die oben beschriebene Leishmanien-PCR eingesetzt.

Um falsch-negative Ergebnisse durch eine Hemmung der PCR, die durch das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren in den Proben zustande kommen kann, auszuschließen, wurden zudem stichprobenartig einige DNA-Aufreinigungen mit geringen Konzentrationen an Positivkontrolle versetzt und in der Leishmanien-spezifischen PCR untersucht.

2.3.3 NACHWEIS VON FUCHS-DNA MITTELS PCR

Um falsch-negative Ergebnisse in der *Leishmania*-spezifischen PCR aufgrund einer fehlerhaften DNA-Extraktion auszuschließen, wurde stichprobenartig eine PCR zum Nachweis der Fuchs-DNA durchgeführt. Die Zielsequenz der Caniden-spezifischen nested-PCR nach Dinkel et al. (2011) liegt innerhalb des mitochondrialen Cytochrom b-Gens. Die erste PCR wurde auf einem Thermocycler (2720 Thermal Cycler,

Fa. Applied Biosystems) durchgeführt, die realtime-nested-PCR und die Schmelzkurven-Analyse auf einem LightCycler 2.0 (Fa. Roche).

Der 50µl-Ansatz der ersten PCR setzte sich zusammen aus 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 2,5mM MgCl₂, 40,2mM Tris-HCl (pH 9), jeweils 200µM Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 0,5µM der Primer CVFor (5'-TTA ATG ACC AAC ATT CGA AA-3') und CVRev (5'-AGG/T ACA/G TAG/C CCC ATA/G AAA/T GC-3') sowie 1,5 units Taq-Polymerase (Fa. Applied Biosystems). Als Template wurden 5µl aufgereinigte DNA eingesetzt. Das Temperaturprofil beinhaltete eine Eingangsdenaturierung von 95°C für 3min, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung (94°C, 30s), Annealing (54°C, 60s) und Elongation (72°C, 40s) sowie einer abschließenden Elongation bei 72°C für 5min.

Der 20µl-Ansatz der nested-PCR enthielt 1x SensiMixCapillary Mix (SensiMixCapillary Kit, Fa. Bioline), je 0,5µM der Primer CVF light for (5'-TCA/T GCC/T TGA TGA/G ACC TTC GGA/G TCC-3') und CVF light rev (5'-AC/TA/G ATT CCA ATA/G TTT CAT GTC/T TCT-3'), 0,2µM der Sonde CaVuFe1-fl (5'-ATA CAC TAT ACA TCT GAC AC-FL-3'), 0,4µM der Sonde CaVuFe2-640 (LC640-GCT ACT GCT TTC TCA TCT G-PH) sowie 1x Enzym-Mix (SensiMixCapillary Kit, Fa. Bioline). Als Template diente 1µl des Amplifikationsprodukts der 1. PCR. Das Temperaturprofil beinhaltete eine Eingangsdenaturierung von 94°C für 10min, gefolgt von 45 Zyklen Denaturierung (94°C, 4s), Annealing (50°C, 15s) und Elongation (72°C, 25s). Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 640nm.

Die Schmelzkurven-Analyse wurde direkt im Anschluss an die realtime-nested-PCR mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 95°C für 10s und 37°C für 10s, gefolgt von einer schrittweisen Temperaturerhöhung auf 90°C mit 0,2°C/s und anschließendem Abkühlen auf 40°C. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 640nm.

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Wasser anstelle von DNA-Template. Auf den Einsatz einer Positivkontrolle wurde verzichtet, da es sich bei allen Proben um Fuchsproben handelte und somit in jedem Fall ein positives Ergebnis erwartet wurde.

3 Ergebnisse

3.1 HERKUNFT DER PROBEN

3.1.1 FUCHSPROBEN

Die 199 untersuchten Füchse, die vom CVUA in Freiburg zur Verfügung gestellt wurden, stammten zum größten Teil aus dem Regierungsbezirk Freiburg, insbesondere aus den Landkreisen Ortenau, Emmendingen, Breisgau-Hochschwarzwald, Lörrach, Waldshut und dem Stadtkreis Freiburg (s. Abb. 1). Einige Tiere wurden zudem in den Regierungsbezirken Karlsruhe (Landkreis Pforzheim), Stuttgart (Landkreise Esslingen und Hohenlohe) sowie Tübingen (Landkreise Zollernalb und Bodensee) geschossen. 10 Tiere stammten aus dem Schweizer Kanton Schaffhausen; diese wurden ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. Das Kontrollgebiet Schwäbische Alb umfasste die Landkreise Reutlingen und Göppingen; von hier standen insgesamt 102 Tiere zur Verfügung. Details zu Probenherkunft und –anzahl sind im Anhang aufgelistet.

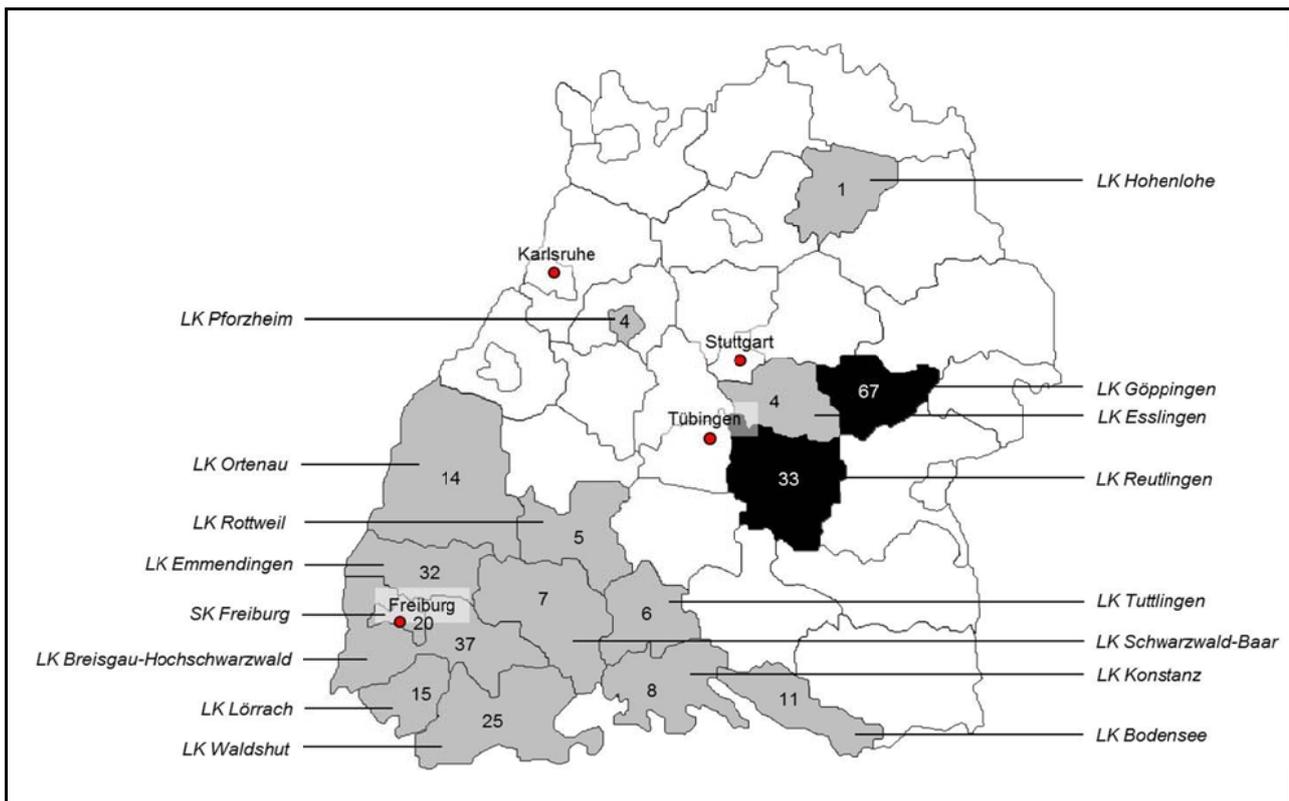


Abb. 1: Anzahl an untersuchten Füchsen pro Landkreis (Baden-Württemberg). Die Tiere wurden vom CVUA Freiburg (grau hervorgehobene Landkreise) zur Verfügung gestellt bzw. stammen aus einem Projekt des Fachgebiets Parasitologie der Universität Hohenheim zum Vorkommen von *Echinococcus multilocularis* (schwarz markierte Landkreise). LK: Landkreis; SK: Stadtkreis.

3.1.2 HUNDESEREN

Für die serologische Untersuchung von Hunden standen insgesamt 85 Seren zur Verfügung, die von zwei Kleintierkliniken in Lörrach und Freiburg stammten. Für die Seren der Kleintierklinik Dres. Kasa in Lörrach (32 Stück) waren Angaben zum genauen Herkunftsort vorhanden. Der Großteil dieser Seren (21 Stück) stammte aus Baden-Württemberg, insbesondere aus dem Landkreis Lörrach (s. Abb. 2). Daneben wurden auch Seren aus Hessen (1), dem Elsass (3) und der Schweiz (7) untersucht. Die genaue Herkunft der Seren der Kleintierklinik Dr. Frank in Freiburg (53 Stück) war nicht bekannt; in Abb. 2 ist das ungefähre Einzugsgebiet der Klinik hervorgehoben. Details zur Probenherkunft und -anzahl sind im Anhang aufgelistet.

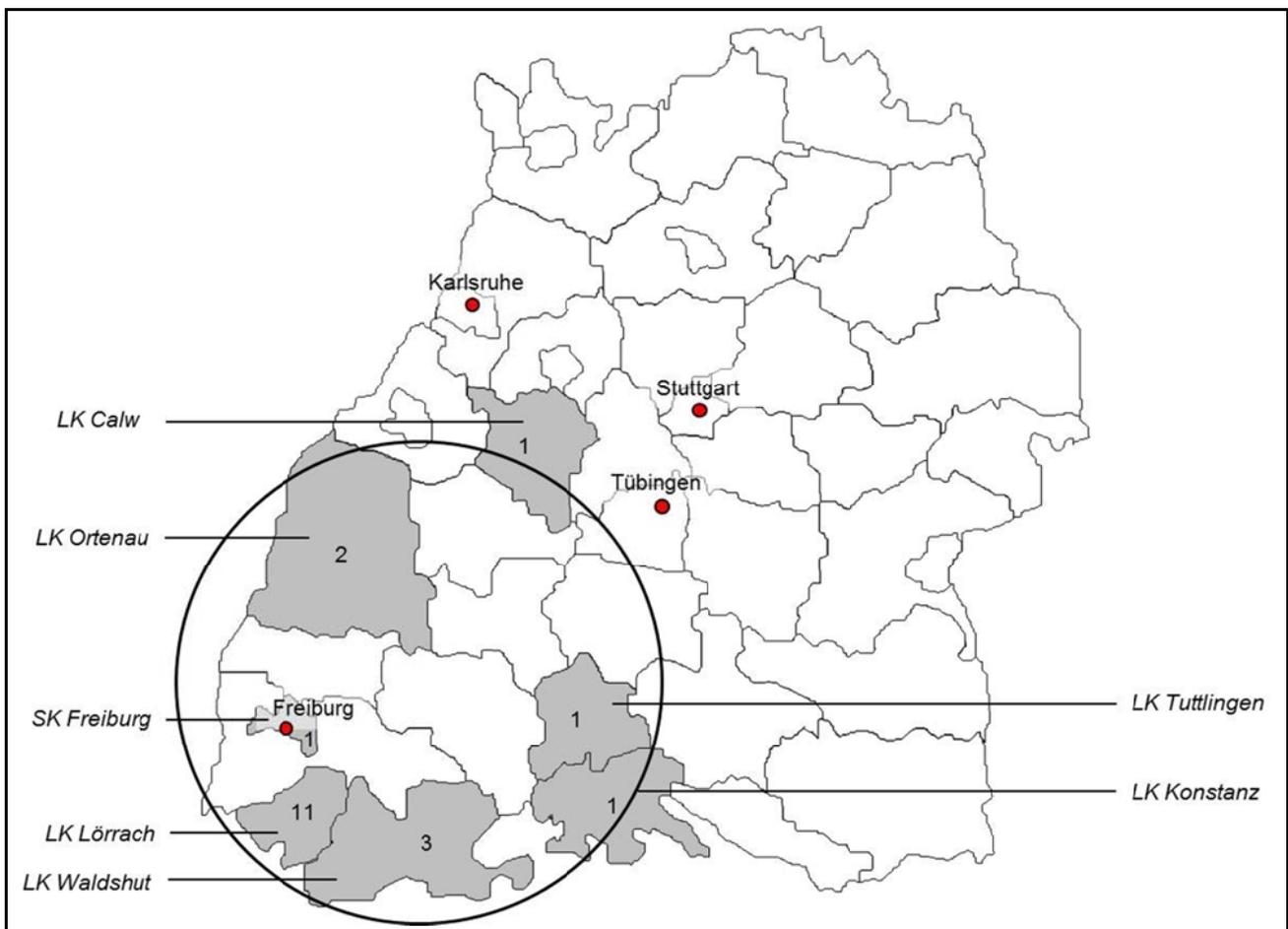


Abb. 2: Anzahl der untersuchten Hundeseren pro Landkreis (Baden-Württemberg). Die Hundeseren wurden zur Verfügung gestellt von der Kleintierklinik Dres. Kasa in Lörrach (grau hervorgehobene Landkreise) und der Kleintierklinik Frank in Freiburg (der schwarze Kreis markiert das ungefähre Einzugsgebiet der Klinik).

3.2 SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.2.1 NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN *LEISHMANIA* SPP. MITTELS IFT

Prinzipiell war bei mikroskopischer Betrachtung aller Objektträger zunächst ein Gewebe aus Leberzellen zu sehen. Diese Zellen waren durch die Gegenfärbung mit dem im Konjugat enthaltenen Evan's Blue intensiv rot gefärbt. Im Falle einer positiven Reaktion, wie sie zum Beispiel bei den Positivkontrollseren, aber auch bei einigen positiven Fuchsseren aus dem Großraum Freiburg auftrat, war eine grüne Fluoreszenz durch den an den Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff (FITC) auszumachen. Diese äußerte sich in Form fluoreszierender abgegrenzter großflächiger Bereiche, die Parasitennester/Herde repräsentieren. Im Falle der *Leishmania*-positiven Fuchsseren waren die positiven Signale zwar insgesamt schwächer und mengenmäßig weniger als bei den verwendeten Positivkontrollseren, aber dennoch immer deutlich von der Negativkontrolle zu unterscheiden. Zwar wiesen auch einige negative Seren schwach leuchtende Partikel, Strukturen und Bereiche bzw. grün-fluoreszierende Pünktchen oder auch größere, helle Bereiche und Schleier auf. Hier ist jedoch von falsch-positiven Signalen auszugehen, die auf Konjugatreste, unspezifische Bindungen oder sonstige Verunreinigungen zurückzuführen und somit vernachlässigbar sind. Die Kontrollen ließen sich generell gut voneinander unterscheiden.

3.2.1.1 Fuchsseren

Insgesamt wurden 196 Füchse aus dem südwestlichen Baden-Württemberg serologisch mittels IFT auf Antikörper gegen Parasiten der Gattung *Leishmania* untersucht. Von diesen Füchsen wiesen sechs (3,06%) Antikörper gegen Leishmanien auf. Diese seropositiven Füchse stammten aus den Landkreisen Breisgau-Hochschwarzwald (1), Emmendingen (2), Lörrach (1), Ortenaukreis (1) sowie aus dem Kanton Schaffhausen in der Schweiz (1) (s. Tab. 3). Zwar waren bei allen sechs Proben die positiven Signale insgesamt schwächer ausgeprägt als bei der Positivkontrolle, aber trotzdem deutlich von der Negativkontrolle zu unterscheiden. Die restlichen 190 Füchse (96,94%) wurden allesamt negativ bewertet (s.).

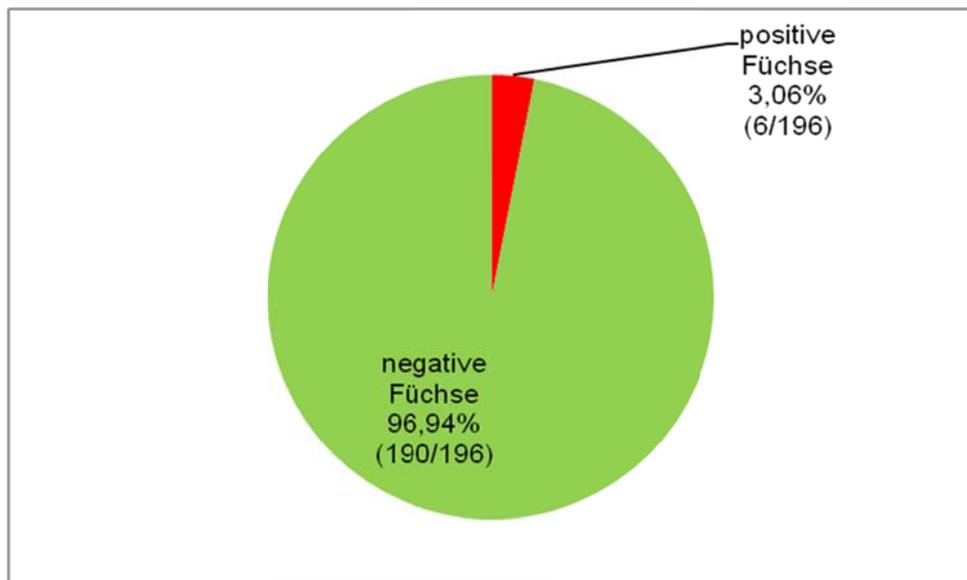


Abb. 3: Prozentuale Verteilung der positiv und negativ auf Antikörper gegen *Leishmania* spp. getesteten Füchse aus dem südlichen Baden-Württemberg.

Als Kontrollgruppe dienten insgesamt 98 Füchse von der Schwäbischen Alb, die ebenfalls serologisch mittels IFT auf anti-*Leishmania* spp.-Antikörper getestet wurden. Hier erwiesen sich alle untersuchten 98 Seren als negativ, d.h. es wurden keine Antikörper gegen Leishmanien in diesen Tieren nachgewiesen.

3.2.1.2 Hundeseren

Um auch die Frage nach der Infektionsrate einheimischer Hunde, die ebenfalls als Quelle autochthoner Infektionen dienen können, zu klären, wurden neben den Füchsen auch Hunde aus Südwestdeutschland, die bisher nicht in Südeuropa waren, getestet.

Die insgesamt 84 untersuchten Hundeseren wiesen dabei alle negative Ergebnisse auf, d.h. keiner der Hunde war bisher mit Leishmanien in Kontakt gekommen.

3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

3.3.1 ETABLIERUNG DER PCR-METHODIK

Für die molekularbiologische Untersuchung von Füchsen wurde eine realtime-PCR nach Galletti et al. (2011) verwendet, deren Zielsequenz innerhalb der Kinetoplasten-DNA liegt.

Zur Etablierung der PCR-Methode wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der Positivkontrolle (DNA-Aufreinigung der Leber eines *Leishmania donovani*-infizierten Hamsters) von 1:10 bis 1:10⁸ hergestellt. Die DNA-Konzentration der Positivkontrolle betrug 112,5µg/ml. Über die darin enthaltene Menge an Leishmanien-DNA läßt sich jedoch keine Angabe machen, da es sich nicht um reine Parasiten-DNA, sondern um ein Gemisch aus Parasiten- und Wirts-DNA handelt.

Die Leishmanien-spezifische PCR zeigte positive Ergebnisse bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:10⁷, wobei der ct-Wert bei der geringsten nachweisbaren DNA-Konzentration bei ~ 30 lag. Dies zeigt die hohe Sensitivität der verwendeten PCR-Methodik.

Um auszuschließen, dass die *Leishmania*-spezifische PCR aufgrund von Inhibitoren in den Proben falsch-negative Ergebnisse liefert, wurden stichprobenartig 15 Proben mit einer geringen Konzentration an Positivkontrolle (Verdünnungsstufe 1:10⁷) versetzt und in der PCR getestet. Dabei zeigte sich bei allen Proben ein positives Ergebnis. Negative Ergebnisse in der Leishmanien-PCR sind somit nicht auf eine Hemmung der PCR zurückzuführen.

3.3.2 NACHWEIS VON *LEISHMANIA* SPP. MITTELS PCR

Mit Hilfe der *Leishmania*-spezifischen PCR wurden insgesamt 199 Füchse aus dem südlichen Baden-Württemberg untersucht, die vom CVUA Freiburg zur Verfügung gestellt wurden.

Es wurde in keiner der getesteten Organproben (Milz und Kniekehlenlymphknoten; von 146 Tieren zusätzlich Leber) Leishmanien-DNA nachgewiesen. Insbesondere ist hervorzuheben, dass auch bei sechs Füchsen, die serologisch positiv auf Leishmanien-Antikörper getestet wurden, der Erreger molekularbiologisch nicht nachgewiesen wurde.

Aus dem Kontrollgebiet Schwäbische Alb wurden Proben (Milz und Kniekehlenlymphknoten) von insgesamt 102 Füchsen molekularbiologisch untersucht. Auch bei diesen Tieren wurden keine Leishmanien nachgewiesen.

3.3.3 NACHWEIS VON FUCHS-DNA MITTELS PCR

Um auszuschließen, dass negative Ergebnisse in der Leishmanien-PCR durch fehlerhafte DNA-Extraktion bedingt wurden, wurden stichprobenartig in einigen Proben Untersuchungen auf Fuchs-DNA vorgenommen. Hierzu wurden DNA-Aufreinigungen von 15 Lymphknotenproben in einer Caniden-spezifischen realtime-nested-PCR (Dinkel et al., 2011) getestet. Alle Proben zeigten positive Ergebnisse in der realtime-PCR, sodass von einer erfolgreichen DNA-Extraktion ausgegangen werden kann. Falsch-negative Ergebnisse der Leishmanien-spezifischen PCR durch Fehler bei der Isolierung der DNA können somit ausgeschlossen werden.

3.4 ZUSAMMENFASSUNG DER SEROLOGISCHEN UND MOLEKULARBIOLOGISCHEN ERGEBNISSE

Zum Nachweis einer möglichen Leishmanien-Infektion verschiedener potenzieller Reservoirwirte in Südwestdeutschland wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl Füchse als auch Hunde mit Hilfe serologischer und molekularbiologischer Methoden untersucht. Um Antikörper gegen die Parasiten der Gattung *Leishmania* in den Tieren nachzuweisen, wurden zwei Gruppen von Füchsen, nämlich insgesamt 196 Tiere aus der warmen Region um Freiburg (mit nachgewiesenem Sandmückenvorkommen) und 98 Tiere von der Schwäbischen Alb mittels IFT untersucht. Dabei wurden sechs Tiere (3,06%) aus dem Rheintal positiv getestet, während in der Kontrollgruppe aus der kälteren Region alle Füchse negativ waren.

Mit Hilfe der PCR sollte außerdem der Nachweis der Erreger-DNA aus Milz und Popliteal-Lymphknoten der Füchse erfolgen. Alle getesteten Proben erwiesen sich jedoch als negativ. Auch in den serologisch positiven Füchsen wurde mittels PCR keine Parasiten-DNA detektiert.

Die Seren von Hunden aus dem südlichen Baden-Württemberg wurden ebenfalls mittels IFT getestet; hier waren jedoch alle 84 untersuchten Proben negativ.

Die Tab. 3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der serologischen und molekularbiologischen Untersuchung der Füchse aus allen Untersuchungsgebieten.

Tab. 3: Zusammengefasste Ergebnisse der serologischen und molekularbiologischen Untersuchung von Füchsen

Herkunft (Landkreis)	Serologie (IFT) positiv/getestet	Molekularbiologie (PCR) positiv/getestet
<u>Süddeutschland (CVUA Freiburg)</u>		
Breisgau- Hochschwarzwald	0/37	0/37
Emmendingen	2/30	0/32
Waldshut	0/24	0/25
Freiburg	1/20	0/20
Lörrach	1/15	0/15
Ortenau	1/14	0/14
Bodensee	0/11	0/11
Konstanz	0/8	0/8
Schwarzwald- Baar	0/7	0/7
Tuttlingen	0/6	0/6
Rottweil	0/5	0/5
Esslingen	0/4	0/4
Pforzheim	0/4	0/4
Hohenlohe	0/1	0/1
Kanton Schaffhausen (Schweiz)	1/10	0/10
gesamt	6/196	0/199
<u>Kontrollgebiet Schwäbische Alb</u>		
Göppingen	0/63	0/67
Reutlingen	0/33	0/33
unbekannt	0/2	0/2
gesamt	0/98	0/102

4 Diskussion

4.1 SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN VON FÜCHSEN UND HUNDEN

Zum serologischen Nachweis von Antikörpern gegen *Leishmania* spp. in Blutproben von Füchsen aus dem südlichen Baden-Württemberg wurden insgesamt 196 Wildtiserseren mittels IFT untersucht. Dabei wurden 190 negative Proben (96,94 %) und sechs positive Seren (3,06 %) ermittelt. Als Kontrollgruppe wurden außerdem 98 Füchse von der Schwäbischen Alb ebenfalls mittels IFT getestet, erwiesen sich jedoch allesamt als seronegativ in Bezug auf Leishmanien. Des Weiteren wurden auch Hunde (insgesamt 84 Stück) aus dem südlichen Baden-Württemberg in die Untersuchungen mit einbezogen, aber auch in deren Seren wurden keine Antikörper gegen Leishmanien festgestellt.

Generell lässt sich feststellen, dass die positiven Signale, vor allem im Vergleich zu den entsprechenden Positivkontrollen, insgesamt relativ schwach waren. Dies kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden, zum ersten auf niedrige Antikörpertiter und zum zweiten auf eine schlechtere Bindung des Antikörperkonjugats an Fuchsantikörper (im Vergleich zu Hundantikörpern).

Niedrige Antikörpertiter können real sein und durch eine allgemein schwächere Immunreaktion der Füchse gegenüber Leishmanien zustande kommen. Darüber hinaus ist die Stärke der Immunreaktion speziell bei Leishmanien aber auch individuell sehr verschieden und vom jeweiligen Immunstatus des Wirts abhängig. Es ist schließlich aber auch zu berücksichtigen, daß die Lagerbedingungen für Blut bzw. Serum der Füchse nicht ideal sein konnten (Einfrieren und Auftauen), was ein Absinken des Antikörpertiters zur Folge hat.

Da als Konjugat kein Anti-Fuchs zur Verfügung stand, wurde stattdessen anti-Hund eingesetzt. Zwar gehören sowohl der Hund (im engeren Sinn) als auch der Fuchs als „Wildhund“ zur Familie der Hunde (*Canidae*), es ist aber davon auszugehen, dass die Bindung des Anti-Hund Konjugats gegenüber dem homologen Antigen (Antikörpern vom Hund) stärker ausgeprägt ist als gegenüber dem heterologen Antigen (Antikörper vom Fuchs). Dies würde zu einer insgesamt schwächeren Reaktion führen. Da auch bereits die Tests zur Festlegung der Versuchsparameter mit den Hundeseren stattfanden, kann es möglich sein, dass einige Seren falsch-negativ sind. Im direkten Vergleich zu positiven Fuchskontrollseren wären eventuell höhere Serum- oder Konjugatkonzentrationen zur Detektion auch schwach positiver Proben verwendet worden. Leider standen jedoch als Kontrollen nur Hundeseren zur Verfügung.

Ein generelles Problem in der parasitologisch-serologischen Diagnostik sind Kreuzreaktionen. Im Gegensatz zur Virologie, in der heute sehr reine rekombinante Antigene zur Verfügung stehen, ist das in der Parasitologie nicht der Fall, mit dem Effekt, dass die anti-parasitären Antikörper i.d.R. nicht artspezifisch sind, sondern auch an verwandte Parasiten binden können, zu denen Antigengemeinschaften bestehen. Bekannte Kreuzreaktionen der Leishmanien bestehen zu den humanpathogenen Trypanosomen, die jedoch in Afrika und Südamerika beheimatet sind. Es gibt zwar einige wenige tierpathogene Trypanosomen auch in den gemäßigten Breiten, bei Füchsen sind solche Erreger indessen nicht bekannt. Kreuzreaktionen der Leishmanien sind auch gegenüber Nicht-Parasiten wie Tuberkuloseerregern vereinzelt beschrieben, derartige

Infektionen wären indessen bei der Obduktion aufgefallen. Insgesamt erscheinen bei den vorliegenden Untersuchungen derartige Kreuzreaktionen schon aus serologischer Sicht unwahrscheinlich.

Aus epidemiologischer Sicht hätten sich solche Kreuzreaktionen auch in der Kontrollgruppe der Schwäbischen Alb zeigen müssen. In den Füchsen von der Schwäbischen Alb wurden indessen keine Leishmanien-Antikörper nachgewiesen, die positiven Fälle beschränken sich vielmehr auf den wärmeren Süden Deutschlands mit nachgewiesenem Phlebotomen-Vorkommen.

Nach der Beurteilung aller Einschränkungen der Methode muss die Möglichkeit, dass die positiven Seren tatsächlich auf Leishmanien-Infektionen zurückzuführen sind, als real angesehen werden. Dies bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, dass es sich bei den seropositiven Tieren auch tatsächlich um Füchse handelt, die ursprünglich aus Deutschland stammen. Denkbar wäre auch, dass die betroffenen Tiere aus umliegenden Nachbarländern stammen, wo sie sich auch infiziert haben und dann nach Deutschland eingewandert sind. Doch selbst in diesem Fall bleibt ihre Funktion als Träger von Leishmanien zu bedenken.

Was die getesteten Hunde angeht, so scheinen sie in Deutschland (sofern sie nicht importiert oder im europäischen Ausland mit Leishmanien infiziert wurden) noch keine Rolle als Wirtstiere für Leishmanien zu spielen. Es war allerdings nicht möglich die Seren von speziell exponierten Tieren – jagdlich geführten Hunden oder Hofhunden – zu erhalten. Endgültige Aussagen über die epidemiologische Rolle der Hunde in Mitteleuropa sind daher derzeit noch nicht möglich.

4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG VON FÜCHSEN

Bei der molekularbiologischen Untersuchung von 199 Füchsen aus dem südlichen Baden-Württemberg (in erster Linie aus der Rheinebene) zeigten sich keine Hinweise auf Infektionen mit *Leishmania* spp. In 102 Füchsen des Kontrollgebiets auf der Schwäbischen Alb wurde mit Hilfe der PCR ebenfalls keine Leishmanien-DNA nachgewiesen.

Die Zielsequenz der verwendeten realtime-PCR nach Galletti et al. (2011) befindet sich auf sogenannten Minizirkeln innerhalb der Kinetoplasten-DNA der Leishmanien. Dieser DNA-Bereich liegt im Leishmanien-Genom in mehreren tausend Kopien vor (Walochnik und Aspöck, 2010). Aufgrund dessen können mit dieser PCR sehr geringe Mengen an Parasiten-DNA im untersuchten Gewebe nachgewiesen werden. Galletti et al. (2011) geben für die beschriebene PCR eine Nachweisgrenze von 2fg Leishmanien-DNA an; dies entspricht weniger als einem *Leishmania*-Parasiten. Um die hohe Sensitivität der PCR zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Untersuchung eine Verdünnungsreihe der Positivkontrolle (DNA-Aufreinigung aus der Leber eines *Leishmania donovani*-infizierten Hamsters) in der realtime-PCR getestet. Ausgehend von einer DNA-Ausgangskonzentration von 112,5µg/ml ließ sich die Leishmanien-DNA bis zu einer Verdünnung von 1:10⁷ nachweisen. Da es sich bei der verwendeten Positivkontrolle nicht um reine Leishmanien-DNA, sondern um ein Gemisch aus Parasiten- und Wirts-DNA handelt, kann keine Nachweisgrenze der PCR angegeben werden. Die Untersuchungen bestätigen jedoch die hohe Sensitivität dieser PCR-Methodik. Daher lässt sich

nahezu ausschließen, dass die untersuchten Proben aufgrund einer zu geringen Sensitivität der PCR falsch-negativ beurteilt wurden.

Auch eine Inhibition der PCR aufgrund von Hemmstoffen in den Proben (z.B. Hämoglobin oder Proteine) wurde überprüft. Hierzu wurden einige Proben mit geringen Mengen an Positivkontrolle versetzt. Alle Proben zeigten in der PCR deutlich positive Signale, sodass falsch-negative Ergebnisse aufgrund von Inhibitoren ausgeschlossen werden können.

Eine weitere Fehlerquelle stellt die Extraktion der DNA dar. Mit Hilfe einer Caniden-spezifischen nested-realttime-PCR nach Dinkel et al. (2011) wurde jedoch die Wirts-DNA stichprobenartig ausgewählter Proben erfolgreich nachgewiesen, sodass falsch-negative Ergebnisse aufgrund fehlerhafter DNA-Extraktion ebenfalls ausgeschlossen werden können.

Zusammengefasst sind die durchweg negativen PCR-Ergebnisse somit nicht auf methodische Probleme zurückzuführen. Sie zeigen vielmehr, dass in den untersuchten Proben tatsächlich keine Leishmanien-DNA vorhanden war.

Für die molekularbiologische Untersuchung der Füchse wurden Proben von Milz und Kniekehlenlymphknoten verwendet. In diesen Organen wurden bereits mehrfach in anderen Studien Leishmanien molekularbiologisch nachgewiesen (Criado-Fornelio et al., 2000; Dipineto et al., 2007; Sobrino et al., 2008; Talmi-Frank et al., 2010). Dies lässt sich auch anhand des Lebenszyklus der Parasiten erklären, da sich die Erreger über die Lymphbahnen und damit die Lymphknoten im Körper verbreiten und die Milz bei systemischen Infektionen zu den betroffenen Organen gehört (Lucius und Loos-Frank, 2008). Lima et al. (2004) zeigten zudem mit histopathologischen Untersuchungen, dass sich bei *Leishmania*-infizierten Hunden große Mengen der Parasiten in den Kniekehlenlymphknoten sowie in zervikalen und Achselhöhlenlymphknoten finden. Neben Milz und Lymphknoten eignen sich auch Knochenmark und Hautbiopsien (insbesondere von Ohr und Schnauze) für einen molekularbiologischen Nachweis von *Leishmania* spp. (Talmi-Frank et al., 2010; Dipineto et al., 2007; Leontides et al., 2002; Solano-Gallego et al., 2001). Diese Materialien standen in der vorliegenden Studie jedoch nur für wenige Füchse zur Verfügung und wurden daher nicht untersucht.

Insgesamt betrachtet erscheinen somit die verwendeten Probenmaterialien sowie die angewandte PCR-Methodik trotz der durchweg negativen Untersuchungsergebnisse für den Nachweis von Leishmanien in Füchsen als geeignet.

4.3 VERGLEICH DER SEROLOGISCHEN UND MOLEKULARBIOLOGISCHEN ERGEBNISSE

Wie oben dargestellt, lieferten die serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen unterschiedliche Ergebnisse. Während mittels IIFT sechs Leishmanien-positive Füchse gefunden wurden, war in keinem der Füchse (auch nicht in den serologisch positiven) mittels PCR Leishmanien- DNA nachzuweisen.

Hierbei sind die grundlegenden Eigenschaften dieser beiden Untersuchungsmethoden zu berücksichtigen, die je nach Fragestellung jeweils Vorteile und Nachteile haben:

Bei der PCR handelt es sich um einen *direkten* Erregernachweis anhand erregerspezifischer DNA-Sequenzen. Das Verfahren hat den Vorteil einer hohen Sensitivität und Spezifität, die sich durch anschließende Sequenzierung der DNA noch steigern lässt. Diese Verfahren sind jedoch nur bei akuten und chronischen Infektionen verwendbar, bei denen sich noch Erreger im Organismus befinden; für den Nachweis abgelaufener Infektionen, bei denen diese eliminiert sind, sind sie nicht geeignet. Leishmanien-Infektionen von Füchsen könnten aber durchaus passagerer Natur sein. Es dürfte sich hier, im Gegensatz zu Hunden, um Reservoirwirte handeln, bei denen sich infolge einer langen Koevolution nur milde und vor allem kurz dauernde Infektionen entwickeln. In diesem Fall wären mit der PCR nur die akuten Infektionsphasen erfassbar, was naturgemäß zufällig bleiben muss.

Bei serologischen Verfahren wie dem IIFT handelt es sich um *indirekte* Nachweisverfahren, bei denen nicht die Erreger selbst sondern die gegen Leishmanien gerichteten spezifischen Antikörper erfasst werden. Gegenüber der PCR und Sequenzierung ist der Antikörpernachweis in Hinsicht auf Sensitivität und Spezifität unterlegen, Probleme bereiten vor allem Kreuzreaktionen mit anderen Erregern.

Der entscheidende Vorteil der Serologie liegt jedoch in der langen Persistenz der Antikörper, die bei manchen Infektionen lebenslang ist. Für epidemiologische Fragestellungen wie das Vorkommen von Erregern und diesbezügliche Durchseuchungsraten ist daher die Serologie die Methode der Wahl. Der Nachweis von Leishmanien-Antikörpern bei 3% der untersuchten Füchse ist daher von größerer Relevanz wie die negativen PCR-Untersuchungen. Kreuzreaktionen mit anderen Erregern sind in Mitteleuropa, wie oben ausgeführt, weitgehend auszuschließen, so dass man von einem realen Kontakt der Füchse mit Leishmanien ausgehen muss. Dies wird auch dadurch unterstrichen, dass serologisch positive Füchse ausschließlich in Gebieten gefunden wurden, die als Phlebotomen-Regionen bekannt sind, nicht dagegen auf der klimabedingt „Phlebotomen-feindlichen“ Schwäbischen Alb.

Leider ist mit Hilfe der Serologie eine Spezies-spezifische Diagnostik nicht möglich. Es spricht jedoch alles dafür, dass die positiven Füchse mit *Leishmania infantum* in Kontakt gekommen sind, die typischerweise in Caniden als Wirten vorkommt (s.u.) und im Mittelmeerraum außerordentlich verbreitet ist. Den endgültigen Beweis können jedoch nur PCR-Untersuchungen mit positivem Ergebnis bei akut erkrankten bzw. infizierten heimischen Hunden und Füchsen erbringen.

4.4 BEDEUTUNG VON FÜCHSEN IN DER EPIDEMIOLOGIE VON *LEISHMANIA* SPP.

Wie bereits dargelegt, spielen im Mittelmeerraum Hunde die weitaus größte Rolle als Reservoirwirt für *Leishmania* spp. (Walochnik und Aspöck, 2010). Daneben werden wildlebende Caniden als potentiell wichtige Reservoirwirte angesehen. Damit ein Tier als Reservoirwirt eines Arthropoden-übertragenen Erregers geeignet ist, muss sich der Erreger in ihm zum einen stark vermehren. Zum anderen muss der Wirt

in der Lage sein, den Erreger wieder an den Vektor weiterzugeben. Nur auf diese Weise können sich stabile Zyklen etablieren (Quinnell und Courtenay, 2009).

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, das Vorkommen von Leishmanien in einem Gebiet zu überprüfen. Zum einen können (potentielle) Reservoirwirte wie Füchse auf Infektionen untersucht werden. Zum anderen kann die Prävalenz des Erregers in den Vektoren, Sandmücken der Gattung *Phlebotomus*, bestimmt werden. Die Untersuchung der Vektoren ist mit einigen Nachteilen verbunden. *Phlebotomus mascitii*, ein potentieller Vektor von Leishmanien, wurde an 16 Orten entlang des Rheins in Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz nachgewiesen (Naucke et al., 2008). Die Art *Phlebotomus perniciosus*, die im Mittelmeerraum einen wichtigen Überträger darstellt, wurde an einem Ort in Rheinland-Pfalz gefunden, in dem darüber hinaus ein möglicherweise autochthoner Fall von Leishmaniose bei einem Hund auftrat (Naucke et al., 2008). Es ist nicht bekannt, wie groß die Sandmücken-Populationen in den genannten Gebieten sind und ob die Sandmücken darüber hinaus in Baden-Württemberg vorkommen. Für die Bestimmung der Leishmanien-Prävalenz im Vektor ist jedoch eine große Zahl an Individuen nötig, um auch bei einer sehr geringen Prävalenz aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Selbst in Endemiegebieten liegt die Erreger-Prävalenz häufig sehr niedrig. So wurden beispielsweise in Portugal bei nur 1 von 213 untersuchten *P. mascitii*-Weibchen (0,47%) Leishmanien detektiert (Maia et al., 2009). Bei der gegenwärtig anzunehmenden geringen Verbreitung der Phlebotomen in Baden-Württemberg erscheint es kaum möglich, ausreichend viele Tiere für aussagekräftige Untersuchungen zu fangen. Füchse als potentielle Reservoirwirte sind hingegen flächendeckend und in großer Zahl vorhanden, sodass hier eine Bereitstellung größerer Probenzahlen möglich ist.

In der vorliegenden Untersuchung wurden in 6 von 199 Füchsen aus dem südlichen Baden-Württemberg serologische Hinweise auf Antikörper gegen *Leishmania* spp. gefunden. Dies entspricht einer Prävalenz von 3%. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei dem Untersuchungsgebiet nicht um ein bekanntes Endemiegebiet für Leishmanien handelt. Bei Untersuchungen von Füchsen aus Endemiegebieten, d.h. aus Gegenden, in denen regelmäßig eine größere Zahl an viszeraler Leishmaniose des Menschen oder an caniner Leishmaniose auftreten, zeigten sich deutlich höhere Prävalenzen. So wiesen Mancianti et al. in Italien eine Antikörperprävalenz von 18% (9/50) nach, während Dipineto et al. (2007) mittels PCR in 40% (20/50) der untersuchten Tiere Leishmanien-DNA fanden. Eine extrem hohe Prävalenz von 74,6% (50/67) wiesen Criado-Fornelio et al. (2000) bei molekularbiologischen Untersuchungen von Füchsen in einem Hochendemiegebiet in Zentralspanien nach. In anderen Gebieten des Landes lag die Prävalenz mit 14,1% (Sobrino et al., 2008) hingegen deutlich niedriger. In allen genannten Studien wurde *Leishmania infantum* als Erreger identifiziert.

Die geschilderten serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen aus Leishmaniose-Endemiegebieten zeigen, dass Füchse häufig mit Leishmanien infiziert sind. Ob sie tatsächlich als Reservoirwirte dienen können, d.h. ob sie in der Lage sind, den Parasiten an Sandmücken weiterzugeben und somit stabile Zyklen aufzubauen, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

4.5 FAZIT

In der vorliegenden Studie wurden in sechs Füchsen aus der Rheinebene, d.h. einem Gebiet, aus dem das Vorkommen von Phlebotomen bereits bekannt ist, Leishmanien-Antikörper detektiert. Molekularbiologisch wurden jedoch keine Leishmanien nachgewiesen. Die serologische Untersuchung von Hunden erbrachte ebenfalls keine Hinweise auf Infektionen mit *Leishmania* spp.

Insgesamt betrachtet erscheint es daher unwahrscheinlich, dass sich im südlichen Baden-Württemberg bereits Leishmanien-Zyklen gebildet haben. Es besteht daher momentan wohl kein Infektionsrisiko für Mensch und Tier in den untersuchten Gebieten. Da jedoch aufgrund der vorhergesagten Klimaveränderungen weiterhin mit einer Ausbreitung der Phlebotomen gerechnet wird und auch eine Einschleppung von Leishmanien über infizierte Hunde aus dem Mittelmeerraum weiterhin gegeben ist, kann sich die Situation jederzeit ändern. In den letzten Jahren wurden auch Berichte veröffentlicht, die der braunen Hundezecke (*Rhipicephalus sanguineus*) eine Vektorkompetenz zuschreibt (Dantas-Torres et al. 2011). Obgleich nach derzeitigem Kenntnisstand diese Zeckenart noch nicht in Deutschland etablierte Populationen aufbauen konnte, so wird diese Zecke mit den Hunden immer wieder aus Südeuropa eingeschleppt. Die Möglichkeit einer Etablierung der Leishmaniose in Süddeutschland sollte daher auch zukünftig nicht außer Acht gelassen werden.

5 Literatur

- Abdussalam M. (1959):** Significance of Ecological Studies of Wild Animal Reservoirs of Zoonoses. *Bull. Org. mond. Santé, Bull. Wld Hlth Org.* 21, 179-186.
- Abranches P (1989):** Reservoirs of visceral leishmaniasis. In *Leishmaniasis. The Current Status and New Strategies for Control* (Ed. D. T. Hart). *Plenum Press, New York*, pp. 61-69.
- Abranches P, Da Conceicao Silva FM, Ribeiro MMS, Lopes FJ, Gomes, LT (1983):** Kala-azar in Portugal. V. The wild reservoir: The isolation of a *Leishmania* from a fox. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 420-421.
- Abranches P, Sampaio Silva ML, Santos Gomes GM, Avelino IC, Pires AC, Conceicao Silva FM, Seixas Lopes A, Silva Periera MCD, Janz JG (1993):** Kala-azar in Portugal. VII. Epidemiological survey in Alijo (endemic region of Alto-Douro). *Res. Rev. Parasitol.* 52, 121-124.
- Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes G, Janz JG (1991):** Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77, 557-561.
- Aguirre AA (2009):** Wild Canids as sentinals of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl. 1): S7.
- Argyriadis D und Litke O (1991):** Epizootiological study of canine leishmaniasis in central and eastern Macedonia and in Thessaly (in Greek). *Bull. Hellenic Vet. Med. Soc.* 42, 30-34.
- Ashford RW (1996):** Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in Dermatology* 14, 523-532.
- Aspöck H (2002):** Zecken, Insekten und andere Gliederfüßer als Erreger und Überträger von Krankheiten. *Denisia 6, zugleich Kataloge des OÖ. Landesmuseums, Neue Folge Nr. 184*, 397-445
- Baneth G, Dank G, Keren-Kornblatt E, Sekeles E, Adini I, Eisenberger CL, Schnur LF, King R, Jaffe CL (1998):** Emergence of visceral leishmaniasis in Central Israel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59(5), 722-725.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L (2008):** Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology Vol 24 No.7*, 324-330.
- Beck A, Beck R, Kusak J, Gudan A, Martinkovic F, Artukovic B, Hohstetter M, Huber D, Marinculic A, Grabar Z (2008):** A case of visceral leishmaniosis in a gray wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *J. Wildl. Diseases* 44(2), 451-456.
- Bogdan C, Schönian G, Banuls AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, Röllinghoff M, Mertens R (2001):** Visceral Leishmaniasis in a German Child Who Had Never Entered a Known Endemic Area: Case Report and Review of the Literature. *Clin. Infect. Dis.* 32, 302-306.
- Conroy JD, Levine ND, Small E (1970):** Visceral Leishmaniosis in a Fenner Fox (*Fennecus zerda*). *Pathologia Veterinaria* 7, 163-170.

- Criado-Fornelio A, Gutierrez-Garcia L, Rodriguez Caabeiro F, Reus Garcia E, Roldan Soriano MA, Diaz Sanchez MA (2000):** A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.* 92(4), 245-251.
- Curi NH, Mranda I, Talamoni SA (2006):** Serological evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park, Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101(1), 99-101.
- Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D (2011):** Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors* 4, 56.
- Dinkel A, Kern S, Brinker A, Oehme R, Vaniscotte A, Giradoux P, Mackenstedt U, Romig T (2011):** A real-time multiplex-nested PCR system for coprological diagnosis of *Echinococcus multilocularis* and host species. *Parasitol Res* 109(2), 493-498.
- Dipineto L, Manna L, Baiano A, Gala M, Fioretti A, Gravino AE, Menna LF (2007):** Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. *J Wildl Dis* 43(3), 518-520.
- Dornbusch HJ, Urban C, Kerbl C, Lackner H, Schwinger W, Sovinz P, Zottner H, Aspöck H (1999):** Viszerale Leishmaniose bei einem 10 Monate alten österreichischen Mädchen. *XXXIII. Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie.*
- Ferrer LM (1999):** Clinical Aspects of canine leishmaniasis; in Canine Leishmaniasis: an update. (Ed. R. Killick-Kendrick). *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum; Barcelona (Sitges), Spain, pp. 6-10.*
- Fich C (1994):** Isolierung und Kultivierung von *Leishmania spp.* aus Mensch, Hund und Sandmücke in Nordgriechenland (Thessaloniki). *Diplomarbeit, Institut für Med. Parasitologie, Universität Bonn: 1-85.*
- Fisa R, Gallego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrio J, Gallego J, Portus M (1999):** Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87-97.
- Galletti E, Bonilauri P, Bardasi L, Fontana MC, Ramini M, Renzi M, Dosa G, Merialdi G (2011):** Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Res Vet Sci* 91(2), 243-245.
- Gothe R (1991):** Leishmaniosen des Hundes in Deutschland: Erregerfauna und -biologie, Epidemiologie, Klinik, Pathogenese, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. *Kleintierpraxis* 36, 69-84.
- Gradoni L, Pozio E, Gramiccia M, Maroli M, Bettini S (1983):** Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 427-431.
- Köhler K, Hetzel U, Domingo M, Schönian G, Zahner H, Burkhardt E (2002):** Kutane Leishmaniose bei einem Pferd in Süddeutschland: Ein autochthoner Fall? *DVG-Tagung, Bekämpfung und Epidemiologie von Parasitosen: 55.*
- Kollaritsch H, Emminger W, Zaunschirm A, Aspöck H (1989):** Suspected autochthonous kala-azar in Austria. *Lancet*, 901-902.
- Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K (2004):** Wildlife as Source of Zoonotic Infections. *Emerging Infectious Diseases, Vol. 10, No 12, 2067-2072.*

- Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME (2002):** A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol* 109, 19-27.
- Lucius R und Loos-Frank B (2008):** Biologie von Parasiten. *Springer Verlag, 2. Auflage. ISBN: 978-3-540-37707-8.*
- Luppi MM, Malta MCC, Silva TMA, Silva FL, Motta ROC, Miranda I, Ecco R, Santos RL (2008):** Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. *Veterinary Parasitol.* 155(1-2), 146-151.
- Macri B, Galofaro V, Mazzullo G, Grunari M, Mazzacuva N, Borrelli GM (1997):** First report in Italy of *Leishmania* infection in a wolf. *Prax. Vet. Milano* 18(3), 25-28.
- Maia C, Afonso MO, Neto L, Dionisio L, Campino L (2009):** Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *J Vect Borne Dis* 46, 268-272.
- Maroli M, Gradoni L, Mizzoni V, Siragusa C (1999):** Deltamethrin-impregnated dog collars (Scalibor®) to control canine leishmaniasis transmission: A pilot field study in an endemic focus of southern Italy. *Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona*, 96-99.
- Mazzi R (1976):** Cutaneous leishmaniasis: An autochthonous case in Switzerland? (in German). *Dermatologica* 153, 104-105.
- Mehlhorn H und Piekarski G (2002):** Grundriss der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere. *Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg Berlin Gustav Fischer, 6., überarb. und erw. Aufl.*
- Moherbali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M (2005):** Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitol.* 129(3-4), 243-251.
- Morillas Mrquez F, Sanchez Rabasco F, Ocana J, Martin Sanchez J, Ocana Wilhelmi J, Acedo Sanchez C, Sanchis Marin MC (1996):** Leishmaniasis in the focus of the Axarquia region, Malaga province, southern Spain: A survey of the human, dog and vector. *Parasitol. Res.* 82, 569-570.
- Naucke TJ (2009):** Leishmaniose – Einzug in Deutschland. *Kleintiermedizin* 3-4(Suppl.: Parasiten-Spezial), 4-10.
- Naucke TJ (2002):** Leishmaniose, eine Tropenkrankheit und deren Vektoren (*Diptera, Psychodidae, Phlebotominae*) in Mitteleuropa. *Denisia* 6, zugleich Kataloge des OÖ. Landesmuseums, Neue Folge Nr. 184, 163-178
- Naucke TJ und Pesson B (2000):** Presence of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascitii* GRASSI, 1908 (*Diptera: Psychodidae*) in Germany. *Parasitol. Res.* 86, 335-336.
- Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S (2008):** Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res* 103 (Suppl. 1), S65-S68.
- Orndorff GR (2000):** Canine visceral leishmaniasis in Sicily. *Mil. Med.* 165, 29-32.
- Pozio E, Gradoni L, Bettini S, Gramiccia M (1981):** Leishmaniasis in Tuscany (Italy). V. Further isolation of *Leishmania* from *Rattus rattus* in the province of Grosseto. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 75, 393-395.
- Quinnell R.J. und Courtenay O (2009):** Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915-1934.

- Rioux JA, Albaret JL, Houin R, Dedet JP, Lanotte G (1968):** Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes* L.). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 43, 421-428.
- Sastre N, Francino O, Ramirez O, Ensenat C, Sanchez, Altet L (2008):** Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from southwestern Europe. *Veterinary Parasitology* 158(1-2), 117-120.
- Schawalder P (1977):** Leishmaniose bei Hund und Katze. Autochthone Fälle in der Schweiz. *Kleintierpraxis* 22, 237-246.
- Schmitt C (2002):** Untersuchungen zu Biologie und Verbreitung von *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascitii* GRASSI 1908 (Diptera: Psychodidae) in Deutschland. *Diplomarbeit, Institut für Med. Parasitologie, Universität Bonn, 1-93.*
- Sideris V, Papadopoulou E, Dotsika E, Karagouni E (1999):** Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur. J. Epidemiol.* 15, 271-276.
- Sobrinho R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A, Cortazar C (2008):** Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 198-203.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L (2001):** Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 39(2), 560-563.
- Stenger L (2011):** Füchse als Reservoirwirte Arthropoden-übertragener Infektionskrankheiten: *Leishmania* sp., *Rickettsia* sp., FSME-Virus. *Diplomarbeit aus dem Institut für Zoologie, Fachgebiet Parasitologie, der Universität Hohenheim.*
- Talmi-Frank D, Kedem-Vaanunu N, King R, Bar-Gal GK, Edery N, Jaffe CL, Baneth G (2010):** *Leishmania tropica* infection in golden jackals and red foxes, Israel. *Emerg Infect Dis* 16(12), 1973-1975.
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME (2001):** Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 356, 983-9.
- Thompson RCA, Kutz SJ, Smitz A (2009):** Parasite Zoonoses and Wildlife: Emerging Issues. Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 678-693.
- Walochnik J und Aspöck H (2010):** Sandmücken, Leishmanien und Leishmaniosen – neue Dimensionen alter Krankheiten. In: Aspöck H (Hrsg.): *Krank durch Arthropoden. Denisia* 30, 673-694.

6 Anhang

Tab. 4: Tabellarische Übersicht aller untersuchten Fuchsproben von der Schwäbischen Alb.
 IFT = Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Antikörpern gegen *Leishmania* spp.,
 PCR = Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von Leishmanien-DNA in Organproben.
 neg. = negativ, pos. = positiv, k.S. = kein Serum vorhanden.

Fuchs	Herkunft (Landkreis)	Schuss-/Entnahmedatum	IFT	PCR
S 751/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	20.07.2009	neg.	neg.
S 766/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	27.07.2009	pos.	neg.
S 770	Ettenheim (Ortenaukreis)	28.07.2009	neg.	neg.
S 771	Gengenbach (Ortenaukreis)	28.07.2009	neg.	neg.
S 772	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	28.07.2009	neg.	neg.
S 773	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	28.07.2009	neg.	neg.
S 774	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	28.07.2009	neg.	neg.
S 775	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	28.07.2009	neg.	neg.
S 776	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	28.07.2009	neg.	neg.
S 781	Ettenheim (Ortenaukreis)	28.07.2009	neg.	neg.
S 788/09	Bollschweil (Breisgau-Hochschwarzwald)	30.07.2009	neg.	neg.
S 792/09	Bräunlingen (Schwarzwald-Baar-Kreis)	31.07.2009	neg.	neg.
S 806/09	Emmendingen (Emmendingen)	03.08.2009	neg.	neg.
S 808/09	Emmendingen (Emmendingen)	03.08.2009	pos.	neg.
S 809/09	Emmendingen (Emmendingen)	03.08.2009	neg.	neg.
S 810/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	03.08.2009	neg.	neg.
S 817/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	05.08.2009	neg.	neg.
S 818/09	Achern (Ortenaukreis)	05.08.2009	neg.	neg.
S 822/09	Singen/Hohentwiel (Konstanz)	06.08.2009	neg.	neg.
S 831/09	Simonswald (Emmendingen)	10.08.2009	neg.	neg.
S 832/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	10.08.2009	neg.	neg.
S 833/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	10.08.2009	neg.	neg.
S 834/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	10.08.2009	neg.	neg.
S 839/09	Eigeltingen (Konstanz)	12.08.2009	neg.	neg.
S 845/09	Gundelfingen/Breisgau (Breisgau-Hochschwarzwald)	13.08.2009	neg.	neg.
S 851/09	Gundelfingen/Breisgau (Breisgau-Hochschwarzwald)	17.08.2009	neg.	neg.
S 861/09	Höchenschwand (Waldshut)	21.08.2009	neg.	neg.
S 862/09	Höchenschwand (Waldshut)	21.08.2009	neg.	neg.
S 863/09	Klettgau-Erzingen (Waldshut)	21.08.2009	neg.	neg.
S 887/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	31.08.2009	neg.	neg.
S 888/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	31.08.2009	neg.	neg.
S 890/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	01.09.2009	neg.	neg.
S 897/09	Titisee-Neustadt (Breisgau-Hochschwarzwald)	03.09.2009	neg.	neg.
S 910/09	Staufen im Breisgau (Breisgau-Hochschwarzwald)	08.09.2009	neg.	neg.
S 932/09	Herbolzheim (Emmendingen)	18.09.2009	neg.	neg.
S 936/09	Oberndorf am Neckar (Rottweil)	18.09.2009	neg.	neg.
S 952/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	27.09.2009	neg.	neg.
S 953/09	Laufenburg/Baden (Waldshut)	27.09.2009	neg.	neg.
S 954/09	Bad Säckingen (Waldshut)	27.09.2009	neg.	neg.
S 955/09	Bad Säckingen (Waldshut)	27.09.2009	neg.	neg.
S 956/09	Bad Säckingen (Waldshut)	27.09.2009	neg.	neg.
S 957/09	Wehr (Waldshut)	27.09.2009	neg.	neg.
S 958/09	Rickenbach/Hotzenwald (Waldshut)	27.09.2009	neg.	neg.
S 959/09	Bad Säckingen (Waldshut)	27.09.2009	neg.	neg.
S 984/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	28.09.2009	neg.	neg.
S 1087/09	Simonswald (Emmendingen)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1088/09	Simonswald (Emmendingen)	16.11.2009	neg.	neg.

S 1089/09	Simonswald (Emmendingen)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1090/09	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1091/09	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1092/09	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1093/09	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1094/09	Wilchingen (Schaffhausen, Schweiz)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1095/09	Tettngang (Bodenseekreis)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1097/09	Waldkirch (Emmendingen)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1098/09	Waldkirch (Emmendingen)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1099/09	Kandern (Lörrach)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1100/09	Kandern (Lörrach)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1101/09	Stühlingen (Waldshut)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1102/09	Stühlingen (Waldshut)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1103/09	Jestetten (Waldshut)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1104/09	Jestetten (Waldshut)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1105/09	Laufenburg/Baden (Waldshut)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1106/09	Laufenburg/Baden (Waldshut)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1107/09	Jestetten (Waldshut)	16.11.2009	neg.	neg.
S 1113/09	Müllheim (Breisgau-Hochschwarzwald)	17.11.2009	neg.	neg.
S 1123/09	Holzhausen/Sulz am Neckar (Rottweil)	19.11.2009	neg.	neg.
S 1142/09	Simonswald (Emmendingen)	30.11.2009	neg.	neg.
S 1143/09	Simonswald (Emmendingen)	30.11.2009	neg.	neg.
S 1149/09	Geißlingen/Klettgau (Waldshut)	02.12.2009	neg.	neg.
S 1157/09	Jestetten (Waldshut)	08.12.2009	neg.	neg.
S 1158/09	Jestetten (Waldshut)	08.12.2009	neg.	neg.
S 1159/09	Bonndorf im Schwarzwald (Waldshut)	08.12.2009	neg.	neg.
S 1165/09	Kressbronn am Bodensee (Bodenseekreis)	10.12.2009	neg.	neg.
S 1175/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	14.12.2009	neg.	neg.
S 1189/09	Oberkirch/Baden (Ortenaukreis)	22.12.2009	neg.	neg.
S 1191/09	Horben (Breisgau-Hochschwarzwald)	22.12.2009	neg.	neg.
S 1192/09	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	22.12.2009	neg.	neg.
S 1193/09	Lörrach (Lörrach)	22.12.2009	neg.	neg.
S 1198/09	Lörrach/Lörrach)	22.12.2009	pos.	neg.
S 1212/09	Buckenberg (Pforzheim)	29.12.2009	neg.	neg.
S 1213/09	Buckenberg (Pforzheim)	29.12.2009	neg.	neg.
S 1214/09	Buckenberg (Pforzheim)	29.12.2009	neg.	neg.
S 1215/09	Buckenberg (Pforzheim)	29.12.2009	neg.	neg.
S 1217/09	Ettenheim (Ortenaukreis)	29.12.2009	neg.	neg.
S 1218/09	Schonach im Schwarzwald (Schwarzwald-Baar-Kreis)	29.12.2009	neg.	neg.
S 1219/09	Schonach im Schwarzwald (Schwarzwald-Baar-Kreis)	29.12.2009	neg.	neg.
S 1220/09	Triberg im Schwarzwald (Schwarzwald-Baar-Kreis)	29.12.2009	neg.	neg.
S 1221/09	Triberg im Schwarzwald (Schwarzwald-Baar-Kreis)	29.12.2009	neg.	neg.
S 1225/09	Blumberg (Schwarzwald-Baar-Kreis)	30.12.2009	neg.	neg.
XS 6/10	Breitnau (Breisgau-Hochschwarzwald)	04.01.2010	neg.	neg.
XS 7/10	St. Märgen (Breisgau-Hochschwarzwald)	04.01.2010	neg.	neg.
XS 8/10	Hinterzarten (Breisgau-Hochschwarzwald)	04.01.2010	neg.	neg.
XS 9/10	Hinterzarten (Breisgau-Hochschwarzwald)	04.01.2010	neg.	neg.
XS 10/10	Breitnau (Breisgau-Hochschwarzwald)	04.01.2010	neg.	neg.
XS 11/10	Breitnau (Breisgau-Hochschwarzwald)	04.01.2010	neg.	neg.
XS 12/10	Breitnau (Breisgau-Hochschwarzwald)	04.01.2010	neg.	neg.
XS 13/10	St. Märgen (Breisgau-Hochschwarzwald)	04.01.2010	neg.	neg.
XS 14/10	St. Märgen (Breisgau-Hochschwarzwald)	04.01.2010	neg.	neg.
XS 16/10	Horben (Breisgau-Hochschwarzwald)	05.01.2010	neg.	neg.
XS 17/10	Buchenbach (Breisgau-Hochschwarzwald)	05.01.2010	neg.	neg.
XS 18/10	Müllheim (Breisgau-Hochschwarzwald)	05.01.2010	neg.	neg.
XS 19/10	Buchenbach (Breisgau-Hochschwarzwald)	05.01.2010	neg.	neg.
XS 20/10	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	05.01.2010	neg.	neg.

XS 22/10	Friedrichshafen (Bodenseekreis)	07.01.2010	neg.	neg.
XS 23/10	Blumberg (Schwarzwald-Baar-Kreis)	07.01.2010	neg.	neg.
XS 24/10	Schiltach (Rottweil)	07.01.2010	neg.	neg.
XS 32/10	Wyhl am Kaiserstuhl (Emmendingen)	08.01.2010	neg.	neg.
XS 33/10	Wyhl am Kaiserstuhl (Emmendingen)	08.01.2010	pos.	neg.
XS 34/10	Wyhl am Kaiserstuhl (Emmendingen)	08.01.2010	neg.	neg.
XS 42/10	Oberkirch/Baden (Ortenaukreis)	12.01.2010	neg.	neg.
XS 43/10	Oberkirch/Baden (Ortenaukreis)	12.01.2010	pos.	neg.
XS 44/10	Oppenau (Ortenaukreis)	12.01.2010	neg.	neg.
XS 45/10	Oppenau (Ortenaukreis)	12.01.2010	neg.	neg.
XS 46/10	Waldkirch (Emmendingen)	12.01.2010	neg.	neg.
XS 47/10	Waldkirch (Emmendingen)	12.01.2010	neg.	neg.
XS 48/10	Waldkirch (Emmendingen)	12.01.2010	neg.	neg.
XS 49/10	Waldkirch (Emmendingen)	12.01.2010	neg.	neg.
XS 52	Deggenhausertal (Bodenseekreis)	13.01.2010	neg.	neg.
XS 53	Deggenhausertal (Bodenseekreis)	13.01.2010	neg.	neg.
XS 54	Deggenhausertal (Bodenseekreis)	13.01.2010	neg.	neg.
XS 55	Deggenhausertal (Bodenseekreis)	13.01.2010	neg.	neg.
XS 56	Deggenhausertal (Bodenseekreis)	13.01.2010	neg.	neg.
XS 57	Markdorf (Bodenseekreis)	13.01.2010	neg.	neg.
XS 63	Stühlingen (Waldshut)	14.01.2010	neg.	neg.
XS 64	Kirchen-Hausen/Geisingen (Tuttlingen)	14.01.2010	neg.	neg.
XS 65	Immendingen (Tuttlingen)	14.01.2010	neg.	neg.
XS 66	Immendingen (Tuttlingen)	14.01.2010	neg.	neg.
XS 67	Hilzingen (Konstanz)	14.01.2010	neg.	neg.
XS 68	Hilzingen (Konstanz)	14.01.2010	neg.	neg.
XS 69	Stühlingen (Waldshut)	-	neg.	neg.
XS 74/10	Freiburg i.Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 75/10	Moos am Bodensee (Konstanz)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 76/10	Tettngang (Bodenseekreis)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 77/10	Sulz am Neckar (Rottweil)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 78/10	Sulz am Neckar (Rottweil)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 79/10	Offenburg (Ortenaukreis)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 80/10	Ostfildern (Esslingen)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 81/10	Ostfildern (Esslingen)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 82/10	Ostfildern (Esslingen)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 83/10	Ostfildern (Esslingen)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 84/10	Geisingen (Tuttlingen)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 85/10	Geisingen (Tuttlingen)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 86/10	Geisingen (Tuttlingen)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 87/10	Öhringen (Hohenlohekreis)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 89/10	Konstanz (Konstanz)	18.01.2010	neg.	neg.
XS 463	Oberkirch/Baden (Ortenaukreis)	09.05.2011	neg.	neg.
XS 481	Badenweiler (Breisgau-Hochschwarzwald)	13.05.2011	neg.	neg.
XS 482	Tengen (Konstanz)	13.05.2011	neg.	neg.
XS 489	Rust/Baden (Ortenaukreis)	16.05.2011	neg.	neg.
XS 490	Waldkirch (Emmendingen)	16.05.2011	k.S.	neg.
XS 491	Waldshut-Tiengen (Waldshut)	16.05.2011	k.S.	neg.
XS 498	Endingen am Kaiserstuhl (Emmendingen)	20.05.2011	neg.	neg.
XS 499	Kenzingen (Emmendingen)	20.05.2011	neg.	neg.
XS 507	Salem/Baden (Bodenseekreis)	23.05.2011	neg.	neg.
XS 509	Schopfheim (Lörrach)	24.05.2011	neg.	neg.
XS 517	Denzlingen (Emmendingen)	27.05.2011	neg.	neg.
XS 518	Freiamt/Schwarzwald (Emmendingen)	27.05.2011	neg.	neg.
XS 519	Freiamt/Schwarzwald (Emmendingen)	27.05.2011	neg.	neg.
XS 520	Elzach (Emmendingen)	27.05.2011	neg.	neg.
XS 521	Freiburg i. Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	27.05.2011	neg.	neg.
XS 522	Elzach (Emmendingen)	27.05.2011	neg.	neg.
XS 533/11	Wehr/Baden (Waldshut)	01.06.2011	neg.	neg.
XS 538	Engen (Konstanz)	03.06.2011	neg.	neg.
XS 553	Hornberg (Ortenaukreis)	09.06.2011	neg.	neg.

XS 575/11 Freiburg	Vogtsburg im Kaiserstuhl (Breisgau-Hochschwarzwald)	21.06.2011	neg.	neg.
XS 578 Freiburg	Vogtsburg im Kaiserstuhl (Breisgau-Hochschwarzwald)	21.06.2011	neg.	neg.
XS 618	Grenzach-Wyhlen (Lörrach)	05.07.2011	neg.	neg.
XS 619	Grenzach-Wyhlen (Lörrach)	05.07.2011	neg.	neg.
XS 642	Vogtsburg im Kaiserstuhl (Breisgau-Hochschwarzwald)	14.07.2011	neg.	neg.
XS 643	Elzach (Emmendingen)	14.07.2011	neg.	neg.
XS 706	Vogtsburg im Kaiserstuhl (Breisgau-Hochschwarzwald)	05.08.2011	neg.	neg.
XS 726/11	Vogtsburg im Kaiserstuhl (Breisgau-Hochschwarzwald)	15.08.2011	neg.	neg.
XS 730/11	Gottenheim (Breisgau-Hochschwarzwald)	16.08.2011	neg.	neg.
XS 733	Vogtsburg im Kaiserstuhl (Breisgau-Hochschwarzwald)	19.08.2011	neg.	neg.
XS 748/11	Münstertal/Schwarzwald (Breisgau-Hochschwarzwald)	25.08.2011	neg.	neg.
XS 767/11	Vogtsburg im Kaiserstuhl (Breisgau-Hochschwarzwald)	02.09.2011	neg.	neg.
XS 768/11	Breisach am Rhein (Breisgau-Hochschwarzwald)	02.09.2011	neg.	neg.
XS 777	Vogtsburg im Kaiserstuhl (Breisgau-Hochschwarzwald)	09.09.2011	neg.	neg.
XS 869	Rheinfelden/Baden (Lörrach)	14.10.2011	neg.	neg.
XS 935	Breisach am Rhein (Breisgau-Hochschwarzwald)	09.11.2011	neg.	neg.
XS 936	Schallstadt (Breisgau-Hochschwarzwald)	09.11.2011	neg.	neg.
XS 937	Vogtsburg im Kaiserstuhl (Breisgau-Hochschwarzwald)	09.11.2011	neg.	neg.
XS 956	Schliengen (Lörrach)	15.11.2011	neg.	neg.
XS 957	Schliengen (Lörrach)	15.11.2011	neg.	neg.
XS 958	Schliengen (Lörrach)	15.11.2011	neg.	neg.
XS 959	Wittnau/Breisgau (Breisgau-Hochschwarzwald)	15.11.2011	neg.	neg.
XS 980	Freiburg i. Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	24.11.2011	neg.	neg.
XS 981	Bahlingen am Kaiserstuhl (Emmendingen)	25.11.2011	neg.	neg.
XS 982	Bahlingen am Kaiserstuhl (Emmendingen)	25.11.2011	neg.	neg.
XS 983	Bahlingen am Kaiserstuhl (Emmendingen)	25.11.2011	neg.	neg.
XS 984	Merzhausen (Breisgau-Hochschwarzwald)	24.11.2011	neg.	neg.
XS 994	Freiburg i. Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	29.11.2011	neg.	neg.
XS 995	Freiburg i. Br. (Breisgau-Hochschwarzwald)	29.11.2011	neg.	neg.
XS 1005	Zell im Wiesental (Lörrach)	02.12.2011	neg.	neg.
XS 1019	Lörrach (Lörrach)	09.12.2011	neg.	neg.
XS 1020	Lörrach (Lörrach)	09.12.2011	neg.	neg.
XS 1021	Lörrach (Lörrach)	09.12.2011	neg.	neg.
XS 7	Endingen am Kaiserstuhl (Emmendingen)	03.01.2012	neg.	neg.

Tab. 5: Tabellarische Übersicht aller untersuchten Fuchsproben von der Schwäbischen Alb.
 IFT = Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Antikörpern gegen *Leishmania* spp.
 PCR = Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von Leishmanien-DNA in Organproben.
 neg. = negativ, k.S. = kein Serum vorhanden.

Fuchs	Herkunft (Landkreis)	Schussdatum	IFT	PCR
F _{SA} 1	Wiesensteig (Göppingen)	30.01.2011	neg.	neg.
F _{SA} 2	Wiesensteig (Göppingen)	31.01.2011	neg.	neg.
F _{SA} 3	Bad Ditzenbach (Göppingen)	–	neg.	neg.
F _{SA} 4	Bad Ditzenbach (Göppingen)	25.02.2011	neg.	neg.
F _{SA} 5	Wiesensteig (Göppingen)	05.02.2011	neg.	neg.
F _{SA} 6	Mühlhausen im Täle (Göppingen)	20.02.2011	neg.	neg.

F _{SA} 7	Römerstein (Reutlingen)	19.03.2011	neg.	neg.
F _{SA} 8	Römerstein (Reutlingen)	11.03.2011	neg.	neg.
F _{SA} 9	Wiesensteig (Göppingen)	25.01.2011	neg.	neg.
F _{SA} 10	Wiesensteig (Göppingen)	14.02.2011	neg.	neg.
F _{SA} 11	Wiesensteig (Göppingen)	19.01.2011	neg.	neg.
F _{SA} 12	Wiesensteig (Göppingen)	30.06.2011	neg.	neg.
F _{SA} 13	Bad Ditzenbach (Göppingen)	15.06.2011	neg.	neg.
F _{SA} 14	Bad Ditzenbach (Göppingen)	11.06.2011	neg.	neg.
F _{SA} 15	Bad Ditzenbach (Göppingen)	26.06.2011	neg.	neg.
F _{SA} 16	Bad Ditzenbach (Göppingen)	02.07.2011	k.S.	neg.
F _{SA} 17	Wiesensteig (Göppingen)	21.03.2011	neg.	neg.
F _{SA} 18	Römerstein (Reutlingen)	28.05.2011	neg.	neg.
F _{SA} 19	Wiesensteig (Göppingen)	16.03.2011	k.S.	neg.
F _{SA} 20	Römerstein (Reutlingen)	24.06.2011	neg.	neg.
F _{SA} 21	Bad Ditzenbach (Göppingen)	14.06.2011	neg.	neg.
F _{SA} 22	Wiesensteig (Göppingen)	04.02.2011	neg.	neg.
F _{SA} 23	Wiesensteig (Göppingen)	30.01.2011	neg.	neg.
F _{SA} 24	Bad Ditzenbach (Göppingen)	26.05.2011	neg.	neg.
F _{SA} 25	Bad Ditzenbach (Göppingen)	26.05.2011	neg.	neg.
F _{SA} 26	Wiesensteig (Göppingen)	01.03.2011	neg.	neg.
F _{SA} 27	Wiesensteig (Göppingen)	30.02.2011	neg.	neg.
F _{SA} 28	Wiesensteig (Göppingen)	05.03.2011	k.S.	neg.
F _{SA} 29	Bad Ditzenbach (Göppingen)	–	neg.	neg.
F _{SA} 30	Wiesensteig (Göppingen)	03.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 31	Römerstein (Reutlingen)	23.08.2011	neg.	neg.
F _{SA} 32	Wiesensteig (Göppingen)	03.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 33	Mühlhausen im Täle (Göppingen)	02.09.2011	neg.	neg.
F _{SA} 34	Mühlhausen im Täle (Göppingen)	01.09.2011	neg.	neg.
F _{SA} 35	Wiesensteig (Göppingen)	04.07.2011	neg.	neg.
F _{SA} 36	Wiesensteig (Göppingen)	31.07.2011	neg.	neg.
F _{SA} 37	Wiesensteig (Göppingen)	15.06.2011	neg.	neg.
F _{SA} 38	Wiesensteig (Göppingen)	20.08.2011	neg.	neg.
F _{SA} 39	Römerstein (Reutlingen)	15.09.2011	neg.	neg.
F _{SA} 40	Wiesensteig (Göppingen)	01.07.2011	neg.	neg.
F _{SA} 41	Römerstein (Reutlingen)	09.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 42	Wiesensteig (Göppingen)	03.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 43	Bad Ditzenbach (Göppingen)	11.09.2011	neg.	neg.
F _{SA} 44	Drackenstein (Göppingen)	27.08.2011	neg.	neg.
F _{SA} 45	Römerstein (Reutlingen)	29.09.2011	neg.	neg.
F _{SA} 46	Wiesensteig (Göppingen)	28.06.2011	neg.	neg.
F _{SA} 47	Drackenstein (Göppingen)	01.09.2011	neg.	neg.
F _{SA} 48	Bad Ditzenbach (Göppingen)	14.09.2011	neg.	neg.
F _{SA} 49	Römerstein (Reutlingen)	03.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 50	Römerstein (Reutlingen)	11.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 51	Römerstein (Reutlingen)	11.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 52	Römerstein (Reutlingen)	–	neg.	neg.
F _{SA} 53	Römerstein (Reutlingen)	–	neg.	neg.
F _{SA} 54	Bad Ditzenbach (Göppingen)	28.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 55	Bad Ditzenbach (Göppingen)	28.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 56	Römerstein (Reutlingen)	12.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 57	Römerstein (Reutlingen)	30.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 58	Römerstein (Reutlingen)	30.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 59	Römerstein (Reutlingen)	12.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 60	Römerstein (Reutlingen)	11.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 61	Römerstein (Reutlingen)	21.10.2011	neg.	neg.
F _{SA} 62	Wiesensteig (Göppingen)	23.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 63	Wiesensteig (Göppingen)	13.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 64	Bad Ditzenbach (Göppingen)	05.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 65	Bad Ditzenbach (Göppingen)	15.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 66	–	–	neg.	neg.
F _{SA} 67	Wiesensteig (Göppingen)	27.12.2011	neg.	neg.

F _{SA} 68	Bad Ditzenbach (Göppingen)	07.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 69	Wiesensteig (Göppingen)	04.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 70	Drackenstein (Göppingen)	11.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 71	Bad Ditzenbach (Göppingen)	15.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 72	Wiesensteig (Göppingen)	03.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 73	Drackenstein (Göppingen)	30.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 74	Wiesensteig (Göppingen)	16.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 75	Römerstein (Reutlingen)	24.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 76	Römerstein (Reutlingen)	24.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 77	Römerstein (Reutlingen)	24.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 78	Römerstein (Reutlingen)	24.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 79	Römerstein (Reutlingen)	24.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 80	Römerstein (Reutlingen)	24.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 81	Römerstein (Reutlingen)	24.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 82	Drackenstein (Göppingen)	30.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 83	Drackenstein (Göppingen)	24.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 84	Drackenstein (Göppingen)	21.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 85	Römerstein (Reutlingen)	06.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 86	Römerstein (Reutlingen)	06.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 87	Drackenstein (Göppingen)	31.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 88	Römerstein (Reutlingen)	25.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 89	Drackenstein (Göppingen)	31.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 90	Römerstein (Reutlingen)	19.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 91	Mühlhausen im Täle (Göppingen)	03.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 92	Bad Ditzenbach (Göppingen)	15.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 93	Römerstein (Reutlingen)	17.12.2011	neg.	neg.
F _{SA} 94	–	–	neg.	neg.
F _{SA} 95	Mühlhausen im Täle (Göppingen)	31.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 96	Mühlhausen im Täle (Göppingen)	31.11.2011	neg.	neg.
F _{SA} 97	Bad Ditzenbach (Göppingen)	29.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 98	Römerstein (Reutlingen)	11.12.2011	k.S.	neg.
F _{SA} 99	Drackenstein (Göppingen)	14.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 100	Drackenstein (Göppingen)	10.01.2012	neg.	neg.
F _{SA} 101	Römerstein (Reutlingen)	01.02.2012	neg.	neg.
F _{SA} 102	Drackenstein (Göppingen)	21.01.2012	neg.	neg.

Tab. 6: Tabellarische Übersicht aller untersuchten Hundeseren aus dem südlichen Baden-Württemberg mit Entnahmedatum, Wohnort, Geburtsdatum und Angaben zur Verwendung. IFT = Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Antikörpern gegen *Leishmania* spp.; neg. = negativ. Angaben zum Wohnort und Geburtsdatum des Hundes waren nur für die Proben der Kleintierklinik Dres. Kasa in Lörrach verfügbar.

Hund (Probennr. Tierklinik)	Entnahmedatum	Wohnort	Geburtsdatum	jagdlich geführt	Hof-/Hütehund	IFT
<u>Kleintierklinik Frank, Freiburg</u>						
H1 (41120 2)	03.02.2012	–	–	–	–	neg.
H2 (46395 3)	10./11.02.2012	–	–	–	–	neg.
H3 (47796 14)	06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H4 (51140 1)	10./11.02.2012	–	–	–	–	neg.
H5 (51698 16)	06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H6 (52234 8)	02.02.2012	–	–	–	–	neg.
H7 (56484 8)	09.02.2012	–	–	–	–	neg.
H8 (60921 5)	04.02.2012	–	–	–	–	neg.
H9 (61041 2)	09.02.2012	–	–	–	–	neg.
H10 (61571 3)	06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H11 (65272 10)	10./11.02.2012	–	–	–	–	neg.
H12 (65653 6)	02.02.2012	–	–	–	–	neg.

H13 (67069 4)	04.02.2012	–	–	–	–	neg.
H14 (67677 3)	10./11.02.2012	–	–	–	–	neg.
H15 (74484 5)	09.02.2012	–	–	–	–	neg.
H16 (76035 10)	08.02.2012	–	–	–	–	neg.
H17 (77309 2)	10./11.02.2012	–	–	–	–	neg.
H18 (78202)	24.01.2012	–	–	–	–	neg.
H19 (79413 2)	06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H20 (81746 1)	04.02.2012	–	–	–	–	neg.
H21 (81870 6)	07.02.2012	–	–	–	–	neg.
H22 (81973 20)	03.02.2012	–	–	–	–	neg.
H23 (81982 8)	03.02.2012	–	–	–	–	neg.
H24 (82866 12)	10./11.02.2012	–	–	–	–	neg.
H25 (82979 1)	06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H26 (83205 10)	01.02.2012	–	–	–	–	neg.
H27 (86334 8)	08.02.2012	–	–	–	–	neg.
H28 (87608 9)	08.02.2012	–	–	–	–	neg.
H29 (87964 3)	02.02.2012	–	–	–	–	neg.
H30 (88278)	25./31.01.2012	–	–	–	–	neg.
H31 (88384 4)	03.02.2012	–	–	–	–	neg.
H32 (88766 6)	03.02.2012	–	–	–	–	neg.
H33 (89042 1)	10./11.02.2012	–	–	–	–	neg.
H34 (89003 13)	01.02.2012	–	–	–	–	neg.
H35 (89167)	25./31.01.2012	–	–	–	–	neg.
H36 (89267 5)	01.02.2012	–	–	–	–	neg.
H37 (89360)	24.01.2012	–	–	–	–	neg.
H38 (89392 10)	03.02.2012	–	–	–	–	neg.
H39 (89456 2)	25./31.01.2012	–	–	–	–	neg.
H40 (89469)	25./31.01.2012	–	–	–	–	neg.
H41 (89494 14,9)	01./03./06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H42 (89510 4)	09.02.2012	–	–	–	–	neg.
H43 (89525 5, 15)	01./02./06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H44 (89552 15)	03.02.2012	–	–	–	–	neg.
H45 (89556 1)	03.02.2012	–	–	–	–	neg.
H46 (89560 5)	06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H47 (89576 4)	06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H48 (89577 18)	06.02.2012	–	–	–	–	neg.
H49 (89581 1)	07.02.2012	–	–	–	–	neg.
H50 (89583 3)	07.02.2012	–	–	–	–	neg.
H51 (89592 1)	08.02.2012	–	–	–	–	neg.
H52 (89602 10)	09.02.2012	–	–	–	–	neg.
H53 (89605 9)	10./11.02.2012	–	–	–	–	neg.
H54	06.02.2012	–	–	–	–	neg.
Kleintierklinik Dres. Kasa, Lörrach						
H55 (T-NR 18861)	11.01.2012	Efringen-Kirchen	16.09.1998	nein	nein	neg.
H56 (T-NR 26999)	13.12.2011	–	11.09.2000	ja	nein	neg.
H57 (T-NR 34270)	03.02.2012	Lörrach	12.10.2000	nein	nein	neg.
H58 (T-NR 34381)	15./24.01.2012	Therwil (CH)	01.08.2003	nein	nein	neg.
H59 (T-34491)	11.01.2012	Weil am Rhein	15.03.2004	nein	nein	neg.
H60 (T-40015)	23.12.2011	Schopfheim	01.01.2001	nein	nein	neg.
H61 (T-NR 40819)	07.02.2012	Basel (CH)	18.10.2000	nein	nein	neg.
H62 (T-NR 41776)	26.01.2012	Basel (CH)	20.11.1998	nein	nein	neg.
H63 (T-NR 42090)	12.01.2012	Waldshut-Tiengen	25.02.2005	nein	nein	neg.
H64 (T-NR 42676)	22.12.2011	Gunningen	27.07.1997	nein	nein	neg.
H65 (T-NR 45562)	15.12.2011	Lörrach	24.04.2008	nein	nein	neg.
H67 (T-NR 49572)	16.01.2012	Kandern	01.01.2007	nein	nein	neg.
H68 (T 50751)	08.02.2012	Tengen	22.03.2009	nein	nein	neg.
H69 (T-NR 51172)	06.02.2012	Freiburg i. Br.	24.06.2010	nein	ja	neg.
H70 (T-NR 51431)	22.12.2011	Offenburg	27.04.2010	nein	nein	neg.

H71 (T-52565)	13.01.2012	Lörrach	25.12.2010	nein	nein	neg.
H72 (T-NR 52656)	23.12.2011	Bad Teinach-Zavelstein	05.04.2007	nein	nein	neg.
H73 (T-NR 53148)	06.02.2011	Riedisheim (F)	05.01.2004	nein	nein	neg.
H74 (T-NR 54527)	03.02.2012	Wohlenschwil (CH)	25.05.2006	nein	nein	neg.
H75 (T-NR 54928)	22.12.2011	Schopfheim	15.04.2011	nein	nein	neg.
H76 (T-NR 54947)	23.12.2011	Riehen (CH)	01.01.2001	ja	nein	neg.
H77 (T-NR 54978)	03.02.2012	Saint-Louis (F)	04.04.2003	nein	nein	neg.
H78 (T-NR 55119)	11.01.2012	Neustadt	10.08.2007	nein	nein	neg.
H79 (T-NR 55131)	13.01.2012	Pratteln (CH)	22.06.2000	nein	nein	neg.
H80 (T-NR 55161)	19.01.2012	Weilheim	01.06.2003	nein	nein	neg.
H81 (T-NR 55170)	19.01.2012	Weil am Rhein	15.06.2000	nein	nein	neg.
H82 (T-NR 55179)	22.01.2012	Hohberg	12.08.2004	nein	nein	neg.
H83 (T-NR 55185)	23.01.2012	Murg	03.10.1995	nein	nein	neg.
H84 (T-55217)	27.01.2012	Kanton Hirsingue (F)	08.05.2002	nein	nein	neg.
H85 (T-55246)	30.01.2012	Schallbach	01.04.2006	nein	nein	neg.

