

# LEISHMANIA SIAMENSIS ALS ERREGER VON AUTOCHTHONER KUTANER LEISHMANIOSE BEI PFERDEN IN DEUTSCHLAND – EINE NEUE INFektionsKRANKHEIT IN MITTELEUROPA?

Denise Sinning, Kernt Köhler, Lutz-Ferdinand Litzke, Gabriele Schönian, Marcus Frohme, Katrin Kuhls

## Zusammenfassung

Aus mitteleuropäischer Sicht ist die durch Parasiten verursachte und von Sandmücken übertragene Leishmaniose eine in Ländern tropischer und subtropischer Regionen auftretende Infektionskrankheit. In zunehmendem Maße werden jedoch autochthone Fälle in Mitteleuropa, insbesondere in Süddeutschland, verzeichnet. Dies ist vermutlich auf die globale Erwärmung und die Ausdehnung des Verbreitungsgebietes der Sandmücken nach Norden zurückzuführen. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Identifizierung und phylogenetischen Charakterisierung der Erreger dieser Fälle. Dazu wurden verschiedene Marker im Leishmaniengenom sequenziert und mit bekannten Arten verglichen. Die untersuchte DNA stammte von autochthonen kutanen Leishmaniosen bei Pferden und einem Rind, die in den letzten zehn Jahren in Deutschland und der Schweiz auftraten. Aufgrund identischer Sequenzen konnten die Parasiten als *L. siamensis* identifiziert bzw. verifiziert werden, eine erst im Jahr 2008 neu beschriebene Art, die in Thailand humane viszerale Leishmaniose verursacht. Die phylogenetischen Analysen zeigten die Ähnlichkeit von *L. siamensis* mit weiteren bisher nicht identifizierten Stämmen aus Martinique und Ghana, die kutane Leishmaniose bei Menschen verursachen. Um die Frage zu beantworten, ob sich die Leishmaniose zu einer in Mitteleuropa endemischen zoonotischen Krankheit entwickeln könnte, müssen weitere Studien über kompatible Vektoren, mögliche Reservoir- und zur Virulenz durchgeführt werden.

## Abstract

From our Central European point of view leishmaniasis is a vector-borne parasitic disease that occurs mainly in tropical and subtropical countries. In recent years there is however an increasing number of reports of autochthonous cases in Central Europe, especially in southern Germany. This is probably caused by climate change and global warming and the northward shift of the occurrence of the sandfly vectors. The aim of the present study was the identification and phylogenetic characterization of the causative agents of these cases. To this end we sequenced several markers of the *Leishmania* genome and compared them with those of the known *Leishmania* species. The studied DNA originated from several autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in horses and a cow that occurred during the last decade in Germany and Switzerland. The parasites were identified or verified as *L. siamensis*, a newly described species that causes human visceral leishmaniasis in Thailand. The phylogenetic analyses also showed the similarity with previously not identified strains that caused human cutaneous leishmaniasis in Ghana and Martinique. To answer the question whether leishmaniasis is becoming endemic as a zoonotic disease in Central Europe further research has to be done on vector compatibility, virulence and possible reservoir animals.

## I. EINFÜHRUNG

Die Leishmaniose ist eine durch Vektoren übertragene Infektionskrankheit, die von obligaten Protozoen der Gattung *Leishmania* verursacht wird. Laut WHO [WHO 2010] ist die Leishmaniose in 88 Ländern endemisch, mit ca. 12 Mio. infizierten Menschen weltweit und jährlich ca. 2 Mio. Neuinfektionen. Das Verbreitungsgebiet der Leishmaniose umfasst die tropischen und subtropischen Regionen aller Kontinente, einschließlich des europäischen Mittelmeerraumes. Die Parasiten werden durch Phlebotomen (Sandmü-

cken) übertragen. Je nach Erreger und Verbreitungsgebiet kann die Leishmaniose anthroponotisch oder zoonotisch sein, der Transmissionszyklus umfasst je nach Ökosystem spezifische Parasiten-, Sandmücken- und tierische Wirtsarten bzw. den Menschen.

Es gibt verschiedene klinische Ausprägungen der Erkrankung, bei denen entweder die Haut bzw. Schleimhaut (kutane und mukokutane Leishmaniose – CL und MCL) oder das gesamte Immunsystem und innere Organe des Infizierten (viszerale Leishmaniose, auch Kala-Azar genannt - VL) betrof-

fen sind (**Abb. 1**), wobei die viszerale Leishmaniose bei Nichtbehandlung gewöhnlich letal verläuft. Es existieren ungefähr 30 Leishmanienarten, von denen etwa 20 im Menschen Leishmaniose auslösen können. Zu den wichtigsten gehören *L. infantum* und *L. donovani* (Auslöser der VL), *L. major*, *L. tropica* (Auslöser der CL) und *L. braziliensis* und *L. guyanensis* (Auslöser der CL und MCL). Die im europäischen Mittelmeerraum auftretende Leishmaniose wird durch *L. infantum* verursacht.

In Deutschland tritt die Leishmaniose üblicherweise nur in Verbindung mit



Abb. 1) Beispiele für die kutane Leishmaniose bei verschiedenen Patienten (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Amer Al-Jawabreh, Leishmaniasis Research Unit, Jericho, Palestine).

Reisen in Endemiegebiete auf [Harms et al. 2003, Weitzel et al. 2005] und ist bisher nicht meldepflichtig. Im Jahr 1991 wurde jedoch der erste autochthone (-einheimische) Fall beschrieben [Gothe 1991], ca. 17 weitere kamen in den folgenden Jahren bis 2012 dazu. Zwischen 1991 und 2008 wurden 11 autochthone Fälle bestätigt, von denen jedoch nur vier publiziert wurden [Naucke et al. 2008], weitere 7 Fälle kamen bis 2012 dazu [Müller et al. 2009, Kuhls et al. 2013]. Generell sind verschiedene autochthone Fälle aus Mitteleuropa (Schweiz, Österreich, Deutschland, Niederlande) bei Menschen, Hunden und Pferden seit den 60er Jahren bekannt geworden, jedoch nur wenige davon wurden veröffentlicht (Tabelle 1). Diesen Meldungen wurde bis 1999 wenig Bedeutung zugeschrieben, da man davon ausging, dass der Vektor in diesen Ländern nicht vorkommt.

Im Jahr 1999 wurden das erste Mal Sandmücken in Deutschland (Baden-Württemberg) nachgewiesen [Naucke & Pesson 2000, Naucke 2002], es handelte sich um *Phlebotomus mascittii*, dessen Transmissionspotenzial für *Leishmania* jedoch bisher nicht getestet wurde. Bis 2007 wurde *Ph. mascittii* an 16 verschiedenen Stellen in Baden-Württemberg und einer Stelle in Rheinland-Pfalz (Cochem-Mosel)

gefunden. Cochem ist die bisher nördlichste Fundstelle von Sandmücken in Europa (50°19'41.2"N). Im Jahr 2001 wurde *Phlebotomus perniciosus* (Vektor für *L. infantum*) das erste Mal in Deutschland entdeckt [Naucke & Schmitt 2004]. Es wird angenommen, dass *Ph. perniciosus* von Frankreich über das Saarland nach Deutschland gekommen ist. Die Ausbreitung von *Ph. mascittii* verläuft entlang des Rheingrabels und der Mosel. Desweiteren muss man davon ausgehen, dass die bisherigen Funde nicht das eigentliche Ausmaß der Verbreitung und die Häufigkeit dieser Sandmücken widerspiegeln. Auch in Österreich (Kärnten) [Naucke et al. 2011], der Süd- und Westschweiz [Galli-Valerio 1912, Vogel 1931, Knechtli & Jenni 1990, Grimm et al. 1990, 1993], Belgien [Depaquit et al. 2005] und Frankreich nahe der Grenze zu Deutschland [Callot 1950] treten Sandmücken (*Ph. mascittii*) auf. Die theoretische Verbreitungsgrenze stellt die 10°C-Jahresisotherme dar. Auch das Verbreitungsgebiet von *Ph. perfiliewi*, eines in Norditalien zirkulierenden Vektors für *L. infantum*, verschiebt sich aufgrund der globalen Erwärmung derzeit nordwärts [Maroli et al. 2008], so dass diese Art in den nächsten Jahren bis zum 49. Breitengrad vorkommen wird (Baden-Württemberg, Bayern, Schweiz, Österreich). Erste Modellingsansätze hinsichtlich der zukünftigen Klimaveränderungen in Mitteleuropa und den Auswirkungen auf die Verbreitung von Sandmücken deuten darauf hin, dass sich die Habitat-Bedingungen bis zur Hälfte des 21. Jahrhunderts so stark ändern werden, dass sie für alle der untersuchten *L. infantum* Vektoren geeignet sind [Fischer et al. 2010, 2011]. Alle bisherigen autochthonen Leishmaniosen in Deutschland traten im Verbreitungsgebiet von *Ph. mascittii* und *Ph. perniciosus* auf.

Zu den nachgewiesenen Reservoiren von Leishmanien (*L. infantum*) in Europa zählen in erster Linie die Hunde, aber auch Katzen, Füchse und Nagetiere. Infektionen wurden auch bei Pferden, Eseln und Kühen gefunden. In vielen Regionen Südeuropas (z.B. auf Mallorca oder Sizilien) liegt die Infektionsrate bei Hunden bei bis zu 70 % und die Anzahl der von dort nach

Deutschland importierten Hunde nimmt zu. Man nimmt an, dass es in Deutschland ca. 20.000 infizierte Hunde – entweder durch Urlaubsreisen in die Endemiegebiete oder das Mitbringen von infizierten Hunden - gibt [Naucke et al. 2008, Menn et al. 2010]. Über diese Tiere und lokale Sandmücken in Deutschland könnten sich die Infektionen somit weiter ausbreiten.

Nur wenige der autochthonen Infektionen wurden publiziert und die Erreger auf Artebene diagnostiziert. Bis 2009 wurde davon ausgegangen, dass nur *L. infantum* als Erreger dieser autochthonen Fälle in Frage kommt. Umso bemerkenswerter ist es, dass bereits 2004 in Deutschland ein Fall von Hautleishmaniose bei einem Pferd auftrat, bei dem jedoch zum damaligen Zeitpunkt der Erreger keiner bis dahin bekannten Leishmaniaart zugeordnet werden konnte. Es handelte sich um einen ca. 4 Jahre alten Warmblut-Wallach mit einer Hautläsion am Augenlid (Abb. 2).

Das Pferd wurde im Bayerischen Wald geboren und kam mit ca. 6 Monaten nach Aschaffenburg. Sechs Monate



Abb. 2a) Ca. kirschgroße Umfangsvermehrung unmittelbar am Lidrand bei einem 4-jährigen Wallach (präoperativer Befund).

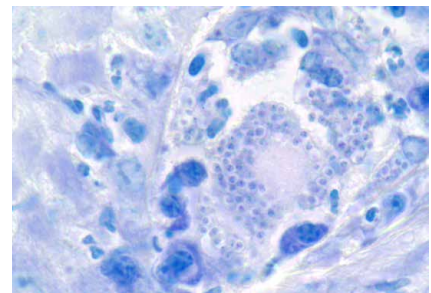


Abb. 2b) Giemsa gefärbtes Präparat mit 1000-facher Vergrößerung einer intraepithelialen Pustel mit zahlreichen Makrophagen und darin massenhaft amastigote Protozoenstadien (Leishmanien).

vor der Erkrankung wurde das Pferd nach Gießen umgestellt. Nach der chirurgischen Entfernung der Läsion wur-

Land	Region	Jahr des Auftretens der Infektion	Referenz	Wirt (Anzahl der Fälle)	Spezies
Deutschland (seit 1991 12 bestätigte autochthone Fälle bei Mensch, Hund, Pferd, Katze)	Nordrhein-Westfalen (Köln)	-	Gothe (1991)	Hund (1)	<i>L. spec.</i>
	Bayern (Landsberg/Lech)	-	Gothe (1991)	Hund (1)	<i>L. spec.</i>
	Nordrhein-Westfalen (Aachen)	1997	Bogdan et al. (2001)	Mensch (1)	<i>L. infantum</i>
	Bayern (Augsburg)	2000	Koehler et al. (2002)	Pferd (1)	<i>L. infantum</i>
	Rheinland-Pfalz (Gehrweiler)	1998/99	nicht publiziert	Hund (1)	<i>L. spec.</i>
	Bayern	-	Müller et al. (2009)	Pferd (1)	<i>L. siamensis*</i>
	Rheinland-Pfalz	-	Müller et al. (2009)	Pferd (5)	<i>L. siamensis*</i>
	Bayern (Aschaffenburg) und Hessen (Gießen)	2004	Kuhls et al. (2013), Litzke et al. (2006)	Pferd (1)	<i>L. siamensis*</i>
Schweiz	Südschweiz	-	Mazzi (1976)	Mensch	<i>L. infantum</i>
	-	-	Schawalder (1977)	Hund	<i>L. spec.</i>
	Nordschweiz	-	Müller et al. (2009)	Pferd (2)	<i>L. siamensis</i>
	Züricher Oberland	2009	Lobsiger et al. (2010)	Kuh (1)	<i>L. siamensis*</i>
Österreich	Niederösterreich	-	Beyreder (1962)	Mensch	<i>L. spec.</i>
	-	-	Kollaritsch et al. (1989)	Mensch	<i>L. spec.</i>
	-	-	Dornbusch et al. (1999)	Mensch (1)	<i>L. spec.</i>
Niederlande	-	-	Slappendel (1988)	Hund	<i>L. spec.</i>
	-	-	Diaz-Espineira & Slappendel (1997)	Hund	<i>L. spec.</i>

\*Die in dieser Arbeit in die Sequenzierung einbezogenen Fälle. k. A. – keine Angaben

Tab. 1) Autochthone Leishmaniose-Fälle in Mitteleuropa

de aus dem Gewebe die Parasiten-DNA extrahiert und eine Sequenzanalyse der ITS1-Region der ribosomalen DNA sowie des DNA-Polymerase- $\alpha$ -Gens durchgeführt, eine Artidentifizierung war jedoch nicht möglich [Litzke et al. 2006, Kuhls et al. 2013]. Das Pferd erlitt vier Wochen nach dem chirurgischen Eingriff einen Rückfall. Ein weiterer Verdacht auf Leishmaniose bei einem Pferd aus Gießen wurde im Jahr 2006 dokumentiert. Auch in einem Rind und

weiteren Pferden aus der Schweiz und Südwestdeutschland wurden 2009 autochthone, kutane Leishmaniosen beschrieben. Die Erreger dieser Fälle konnten jedoch inzwischen als *L. siamensis* identifiziert werden [Müller et al. 2009, Lobsiger et al. 2010]. Weitere solcher equinen Fälle wurden kürzlich auch in den USA berichtet [Reuss et al. 2012]. *Leishmania siamensis* ist eine neu beschriebene Art, die 2008 in Thailand entdeckt wurde und dort

VL bei Menschen verursacht [Sukmee et al. 2008]. In den folgenden Jahren wurden etliche weitere humane Fälle, u.a. auch als HIV+ Koinfektion, in Thailand bekannt [Kongkaew et al. 2007, Maharom et al. 2008, Suankratay et al. 2010, Chusri et al. 2012, Bualert et al. 2012, Leelayoova et al. 2013]. Desweiteren liegen weitere bisher ungeklärte Fälle, die verursachende Leishmanienart betreffend, in Martinique von 1992 (humane VL), Ghana von 2006 (hu-

mane VL) und in Australien von 2004 (bei Kängurus) vor [Noyes et al. 2002, Villinski et al., 2008, Rose et al., 2004, Dougall et al. 2009].

Europa wurde erst kürzlich als „hot spot“ für neu und wieder auftretende Infektionskrankheiten („(re)-emerging infectious diseases“ - EID) aufgrund von Klimaveränderung und Globalisierung (Reisen, Migration, weltweiter Handel) bezeichnet und es wurde die Notwendigkeit unterstrichen, die Monitoringsysteme entsprechend anzupassen. Die viszerale Leishmaniose wurde 2012 als EID in Europa deklariert und große gesundheitspolitische Auswirkungen werden prognostiziert [Lindgren et al. 2012]. Insbesondere Mittel- und Osteuropa werden in diesem Zusammenhang als besonders wichtig eingeschätzt und es wird in Betracht gezogen, die Leishmaniose als meldepflichtige Krankheit bei der

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) einzuführen.

Für die Planung präventiver Maßnahmen und aufgrund der vielen noch nicht genau untersuchten Fälle der neuen Art *L. siamensis* erscheint es umso wichtiger, diese Art genauer zu erforschen sowie alle bekannten und neu auftretenden autochthonen Fälle in Deutschland (bzw. in Mitteleuropa) genau zu identifizieren und zu typisieren.

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, einen erneuten Versuch zur Identifizierung der Pferdeprobe aus dem Jahr 2004 zu unternehmen. Zum anderen sollte die phylogenetische Einordnung dieser Probe sowie von *L. siamensis* in die bestehenden Arten vorgenommen werden. Dazu wurden mehrere DNA-Marker untersucht, für die in der Literatur und bei der Sequenzdatenbank GenBank für die bekannten Leishma-

niaarten schon Sequenzinformationen vorliegen.

## II. MATERIAL UND METHODEN

Zu den für die Identifizierung und für phylogenetische Untersuchungen der Leishmanien am häufigsten verwendeten genetischen Markern gehören die sog. Internal Transcribed Spacer (ITS1, ITS2) sowie die kleine Untereinheit (18S) der ribosomalen DNA, die DNA Polymerase  $\alpha$ , die große Untereinheit der RNA Polymerase II, das Cytochrom b Gen (*cytb*) und das Heatshock Protein 70 Gen (*hsp70*). Zu diesen Markern liegen auch die meisten Einträge bei der Sequenzdatenbank GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) vor. Diese bereits veröffentlichten Sequenzen von Leishmanien und anderen Vertretern der Ordnung Kinetoplastidae sowie die Informationen zu den verschiedenen

Marker	Name	Sequenz 5'-3'	T <sub>an</sub>	Größe	Referenz
ITS1 rDNA	LITSR 5.8S	CTGGATCATTTTCCGATG TGATACCACTTATCGCACTT	53 °C	ca. 320 bp	El Tai et al. 2001
ITS2 rDNA	5.8SR LITSV	AAGTGCATAAGTGTA ACACTCAGGTCTGTAAAC	53 °C	ca. 600 bp	El Tai et al. 2001
SSU rDNA, 1. Runde	R221 R332	GGTTCCTTTCCTGATTACG GGCCGGTAAAGGCCGAATAG	53 °C	ca. 600 bp	Schönian et al. 2003
SSU rDNA, 2. Runde	R223 R333	TCCCATCGCAACCTCGGTT AAAGCGGGCGCGGTGCTG	65 °C	ca. 353 bp	Schönian et al. 2003
<i>hsp70</i>	<i>hsp70</i> for <i>hsp70</i> rev	GACGGTGCCTGCCTACTTCAA CCGCCATGCTCTGGTACATC	61 °C	ca. 1300 bp	Garcia et al. 2004, Montalvo et al. 2010
<i>cytb</i> kDNA	Lcyt-S =LCBF1 Lcyt-R =LCBR2	GGTGTAGGTTTTAGTYTAGG CTACAATAAACAAATCATAATATRCAATT	55 °C	ca. 865 bp	Kato et al. 2007, Luyo-Acero et al. 2004
DNA Polyme- rase $\alpha$ (POLA)	DNAP DPO2	AACGAGCGGCRCTGCTYACTGG GCCGAGGCAGCCATACAT	52 °C	ca. 900 bp	Noyes et al. 2002
RNA Polymerase large subunit (RPOIILS)	RPOF1=RPO1F RPOR1	GACACAGCCGTCAGAC GCAGCCGCACAATGCGCT	45 °C	ca. 1300 bp	Croan et al. 1997

Tab. 2) Aufstellung der zur Sequenzierung eingesetzten Primer

Arten und Stämmen wurden für eine *Leishmania*-Datenbank zusammengestellt. Hinzugefügt werden sollten die Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Proben: die des deutschen Pferdes von 2004 T8316/2004 (MEQU/2004/DE/T8316), des Rezi-divs T8316Rez/2004, eines weiteren Pferdes aus Deutschland (H-2009) und des Rindes (MBOV/CH/2009/C1) aus der Schweiz (Lobsiger et al. 2010, Müller et al. 2009), der thailändischen *L. siamensis*-Kultur Stamm MHOM/TH/2010/PCM2 (Bualert et al. 2012), der nicht identifizierten Probe MHOM/MQ/1992/MAR1 der VL-Fälle in Martinique (Noyes et al. 2002) sowie um einige andere seltene Leishmanienarten aus Südamerika, zu denen bisher keine Sequenzinformationen für bestimmte Marker publiziert wurden, so u.a. *L. enrietti* MCAV/BR/1945/LV90. Dafür wurden die verschiedenen Marker mittels PCR amplifiziert und mit einem ABI 3130xl Genetic Analyzer sequenziert.

Der PCR-Ansatz mit 25 µl Volumen setzte sich wie folgt zusammen: 1fach DreamTaq Puffer, 0,2 mM je dNTP, je 25 pmol forward- und reverse-Primer, 1 U Dream Taq DNA Polymerase und 2,0 µl DNA (aus Kulturen mit einer Konzentration von 10 ng/µl). Die DNA aus biologischem Material wurde unverdünnt unter Zugabe von 0,65 µl Dimethylsulfoxid und 2,5 µl 25mM MgCl<sub>2</sub> eingesetzt. Negativ- und Hemmkontrollen wurden standardmäßig durchgeführt. Für die verschiedenen Marker wurden unterschiedliche Thermocyclerprogramme etabliert, die sich in der Annealingtemperatur, der Dauer der einzelnen Schritte und der Anzahl der Zyklen unterscheiden. Die Primersequenzen, die Annealingtemperaturen sowie die entsprechenden Referenzen sind in **Tabelle 2** zusammengefasst. Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese in 1%igen Agarosegelen überprüft. Die Sequenzierung wurde mit dem Genetic Analyzer 3130xl von Applied Biosystems durch die Firma Services in Molecular Biology (SMB) GmbH durchgeführt.

Mit Hilfe des Programms BioEdit Version 7.1.11 und der Applikation ClustalW wurden Alignments der erhaltenen und der zuvor aus GenBank herausgesuchten Sequenzen für je-

den der untersuchten genetischen Marker erstellt. Basierend auf diesen Alignments wurden in dem Programm MEGA Version 5.2.1 die phylogenetischen Bäume konstruiert. Die dabei verwendeten Methoden beruhen auf den Prinzipien Maximum Parsimony (kladistische Analyse) und Neighbour Joining (distanzbasierte Methode). Zusätzlich wurden Bootstrap-Analysen durchgeführt, um die Stabilität der Gruppierungen zu prüfen.

### III. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere genetische Marker für verschiedene Leishmanienproben, von denen vermutet wird, dass es sich um *L. siamensis* handelt, mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Dazu wurde die aus biologischem Material (Biopsien) autochthoner Leishmaniosefälle bei Pferden und einem Rind in Deutschland und der Schweiz gewonnene DNA verwendet, ebenso die DNA eines der thailändischen *L. siamensis* Referenzstämmen sowie von weiteren *L. siamensis*-ähnlichen

Stämmen, wie u.a. *L. spec.* aus humanen VL-Fällen auf Martinique und *L. enrietti*.

Mit der Software BioEdit wurden die Amplikon-Sequenzen und die Sequenzen sämtlicher Leishmanienarten und einiger Vertreter anderer Trypanosomatiden (*Endotrypanum schaudinii*, *Endotrypanum monterogei*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas costaricensis*), sofern bei GenBank vorhanden, für jeden der untersuchten Marker mittels multiplen Alignments verglichen. Diese Alignments stellten die Basis für die Konstruktion der phylogenetischen Bäume dar. Um die Verzweigung und Einordnung der untersuchten DNA zweifach zu bestätigen, wurden die beiden Konstruktionsmethoden Maximum Parsimony und Neighbour Joining mit zusätzlicher Bootstrap-Analyse angewendet und somit zu jedem Marker zwei Bäume erstellt.

Eines der Hauptziele der Arbeit war die Identifizierung der Pferdeprobe aus dem Jahr 2004, die zum damaligen

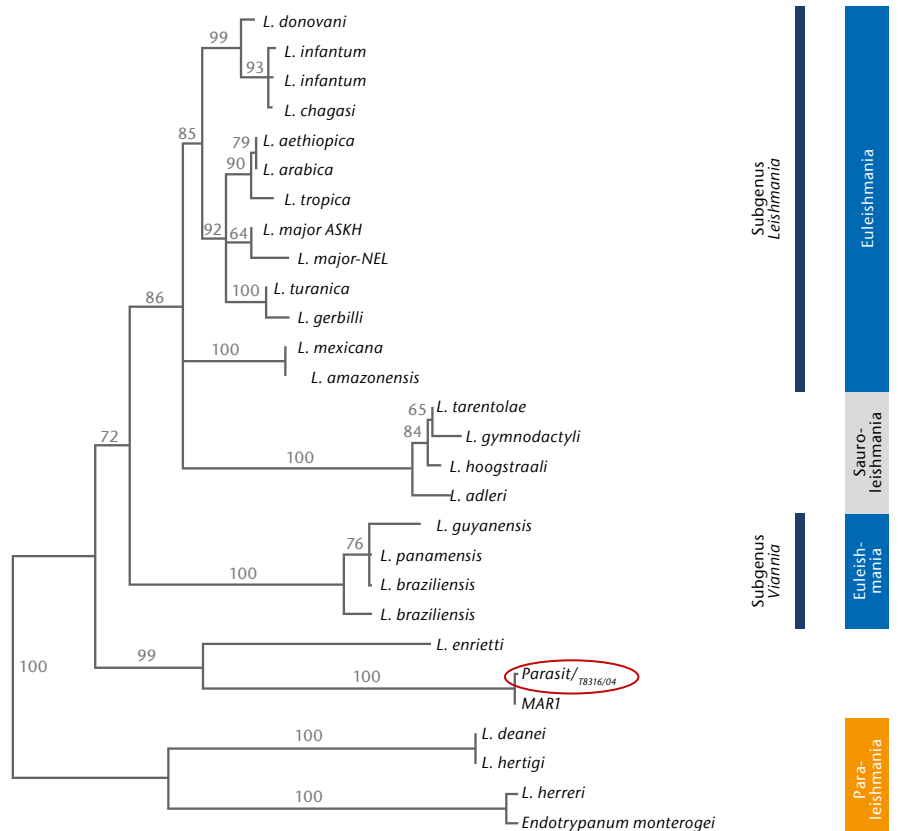


Abb. 3) Phylogenetische Position der Pferdeprobe T8316/2004 innerhalb der Gattung *Leishmania*. Der Stammbaum basiert auf den Sequenzen des DNA-Polymerase- $\alpha$ -Gens und wurde mit der Parsimonieanalyse ermittelt. Bootstrapwerte (in Prozent) sind angegeben.

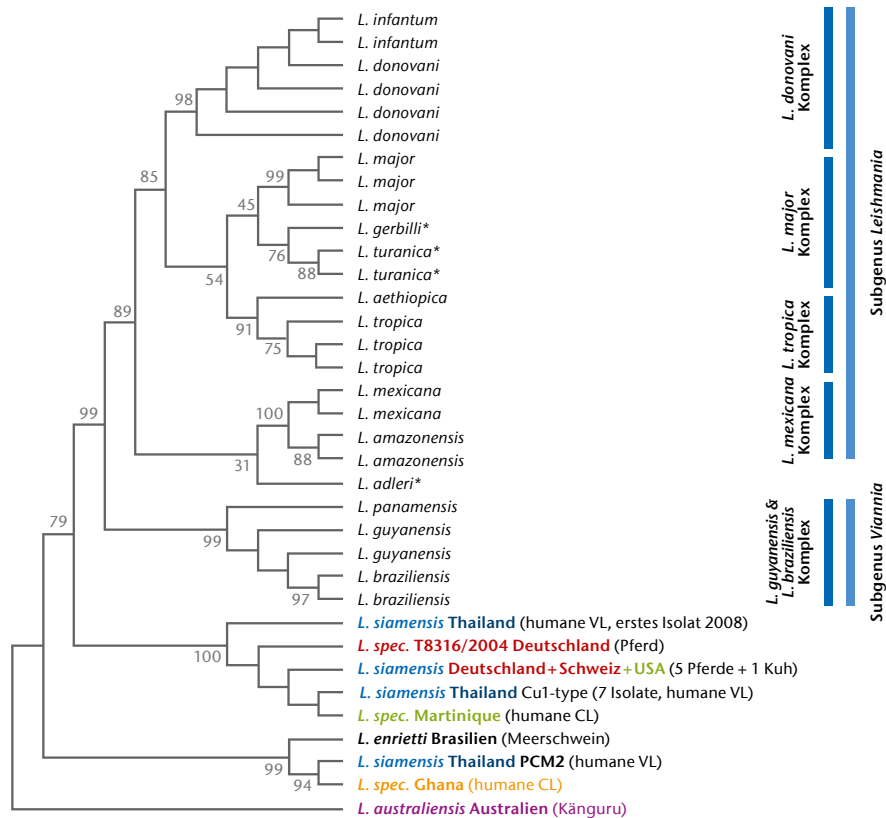


Abb. 4) Phylogenetische Position der Pferdeprobe T8316/2004 innerhalb der Gattung *Leishmania*. Der Stammbaum basiert auf den Sequenzen der ITS1-Region der ribosomalen DNA und wurde mit der distanzbasierten Neighbor-Joining Methode ermittelt. Bootstrapwerte (in Prozent) sowie die taxonomische Einordnung der einzelnen Arten in die zwei Untergattungen sowie die Artkomplexe sind angegeben. \* nicht humanpathogene Arten

Zeitpunkt zwar der Gattung *Leishmania*, jedoch keiner bekannten Leishmaniaart zugeordnet werden konnte. Die Amplifikation der ITS1-Region zeigte zunächst, dass es sich bei dem unbekanntem Parasiten um einen Vertreter der Trypanosomatiden handelt. Erst die Sequenzierung des DNA-Polymerase- $\alpha$ -Gens (POLA) ergab die Zugehörigkeit zur Gattung *Leishmania*. Es zeigte sich, dass dieser Parasit innerhalb des Stammbaums dieser Gattung eine basale Position einnimmt, d.h. relativ entfernt verwandt zu den anderen in Europa vorkommenden Leishmanien ist und eine eigenständige phylogenetische Gruppe mit *L. enrietti*, einem bei Meerschweinchen in Südamerika auftretenden Parasiten, sowie dem 1992 in Martinique isolierten Stamm MAR1 eines humanen CL-Falls bildet (Abb. 3). Interessanterweise unterschieden sich die Sequenzen der Pferdeprobe und des MAR1-Stammes nur durch einen einzigen Basenaustausch.

Erst die erneute Sequenzanalyse der ITS1-Region in diesem Jahr ergab, dass

es sich bei der Pferdeprobe um die im Jahr 2008 neu beschriebene Art *L. siamensis* handelt. Es zeigte sich, dass die sehr variable ITS1-Region bei folgenden Proben identisch war: der Pferdeprobe T8316/2004 aus Deutschland, den 2009 in der Schweiz und Deutschland aufgetretenen equinen und bovinen Leishmaniosefällen [Müller et al. 2009, Lobsiger et al. 2010], dem erst kürzlich in den USA beschriebenen Fällen von Pferdeleishmaniose [Reuss et al. 2012], dem bisher nicht identifizierten *Leishmania*-ähnlichen VL-Stamm aus Martinique [Noyes et al. 2002] sowie 7 der 8 in Thailand beschriebenen humanen VL-Fälle aus den Jahren 2008-2012. Interessanterweise scheint es zwei phylogenetische Gruppen innerhalb von *L. siamensis* zu geben, da sich einer der VL-Stämme aus Thailand in der ITS1-Sequenz deutlich von der ersten Gruppe unterscheidet und eine nahezu identische Sequenz zu einem *Leishmania*-ähnlichen Isolat, das bei humanen CL-Fällen in Ghana gefunden wurde und bisher auch nicht zugeordnet werden konnte, aufweist.

Die größte Ähnlichkeit dieser zweiten Gruppe bestand zu *L. enrietti*. Wie in dem Stammbaum in Abb. 4 zu sehen ist, sind die zwei *L. siamensis* Gruppen nur entfernt verwandt zu den anderen humanpathogenen Leishmaniaarten der Untergattungen *Viannia* und *Leishmania*. Innerhalb der Gattung *Leishmania* sind die auch erst 2004 bei Kängurus gefundenen Parasiten (*L. australiensis*) phylogenetisch am weitesten entfernt. In dem mit der Parsimonie-Analyse erstellten Baum (hier nicht gezeigt) ist *L. australiensis* Teil der zweiten Gruppe, so wie auch *L. enrietti*.

Die meisten publizierten Sequenzen liegen z.Z. für die ITS1-Region vor, einschließlich der *L. siamensis* Stämme. Der SSU-Marker ist derjenige mit dem geringsten Differenzierungspotential, gibt aber wichtige Aufschlüsse, wenn es um die Einordnung der Isolate auf Gattungsebene geht – auch für diesen Marker liegen viele Sequenzen vor, problematisch ist jedoch, dass z.T. unterschiedliche Teilfragmente durch die einzelnen Autoren sequenziert wurden und die Sequenzen nicht homolog sind. Die Marker *cytb* und *hsp70* eignen sich wiederum sehr gut für die Differenzierung auf der Artebene. Grundsätzlich zeigten sowohl ITS1 als auch *hsp70* und *cytb* die Ähnlichkeit von *L. siamensis* zu *L. enrietti* und *L. spec.* aus Martinique (MAR1). Für *L. australiensis* und den *L. siamensis*-ähnlichen Stamm aus Ghana liegen leider bisher keine Sequenzen für *cytb* und *hsp70* vor. Alle Marker ordneten *L. siamensis* (mit Ausnahme des Stammes PCM2) als monophyletische Gruppe innerhalb der Gattung *Leishmania* ein, die möglicherweise eine dritte bisher nicht klassifizierte Untergattung neben den Subgenera *Viannia* und *Leishmania* darstellt.

#### IV. DISKUSSION

Zur Untersuchung autochthoner Leishmaniosefälle bei Nutztieren in Deutschland und der Schweiz in Zusammenhang mit der neuen Leishmanienart *L. siamensis* wurden mittels PCR sieben verschiedene genetische Marker mehrerer entsprechender Proben amplifiziert und sequenziert sowie mit den Sequenzen anderer

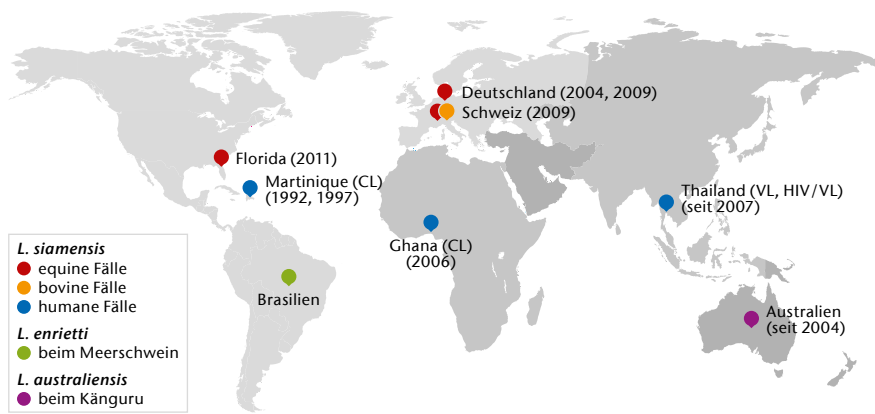


Abb. 5) Bisherige Leishmaniose-Fälle, die durch *L. siamensis* bzw. die nah verwandten Arten *L. enrietti* und *L. australiensis* verursacht wurden. In Klammern ist das Jahr des Auftretens der Erkrankung angegeben. CL – kutane Leishmaniose, VL – viszerale Leishmaniose.

Leishmaniaarten verglichen. So konnte u.a. der Erreger der schon 2004 diagnostizierten Hautleishmaniose bei einem Pferd aus Deutschland als *L. siamensis* identifiziert werden. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass es sich bei den 1992 in Martinique aufgetretenen VL-Fällen bei Menschen sowie den 2006/2007 in Ghana diagnostizierten humanen CL-Fällen auch um *L. siamensis* handelt, d.h. dass diese Art schon viel länger als Erreger der Leishmaniose zirkuliert. *Leishmania siamensis* ist somit die einzige Leishmaniaart, die auf vier bzw. fünf Kontinenten (Europa, Asien, Süd- und Nordamerika, Afrika) vorkommt, d.h. die weiteste Verbreitung aller Arten aufweist und trotzdem erst vor kurzem als Auslöser von Leishmaniosen beschrieben wurde (Abb. 5). Interessanterweise ist auch das Spektrum der klinischen Bilder sehr komplex – einerseits sind sowohl Menschen als auch Tiere betroffen, andererseits treten sowohl kutane als auch viszerale Fälle auf, desweiteren auch Koinfektionen mit HIV. In Mitteleuropa gab es allerdings bisher nur Fälle bei Nutztieren, das Auftreten von humanen Infektionen kann aber auch hier nicht ausgeschlossen werden, so dass es sich um eine neu auftretende zoonotische Infektionskrankheit handeln könnte. Völlig unklar ist bis jetzt, wie *L. siamensis* übertragen wird, d.h. welche Vektoren dafür in Frage kommen, das betrifft nicht nur die Fälle in Mitteleuropa. Da in Deutschland und der Schweiz bisher nur *Ph. mascittii* und *Ph. perniciosus* auftreten, könnte man vermuten, dass eine oder beide

dieser Sandmückenarten als Vektor fungieren, allerdings gibt es noch keinerlei Untersuchungen zum Transmissionspotential dieser Sandmückenarten für *L. siamensis*. Des Weiteren gibt es bisher auch noch keinerlei Erkenntnisse dazu, ob *Ph. mascittii* überhaupt Leishmanien überträgt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten anhand der Marker *cytb*, *hsp70* und ITS1 auch, dass es zwei unterschiedliche phylogenetische Gruppen innerhalb von *L. siamensis* gibt, was auch kürzlich in einer Studie der thailändischen Fälle festgestellt wurde [Leelayoova et al. 2013]. Interessanterweise scheint einer der *L. siamensis* Genotypen aus Thailand (PCM2) enger mit *L. enrietti* und dem bisher nicht identifizierten Parasiten in Ghana verwandt zu sein als mit allen anderen *L. siamensis* Stämmen. Eine enge Verwandtschaft des PCM2 Stammes zu *L. enrietti* zeigte sich auch bei der Sequenzanalyse von drei anderen proteinkodierenden Genen [Bualert et al. 2012]. Die Sequenzvariabilität innerhalb der ITS1-Region zwischen diesen beiden Gruppen entspricht den Werten, die sonst zwischen verschiedenen Leishmaniaarten zu finden sind, so dass es nicht auszuschließen ist, dass es sich hier um Subspezies, wenn nicht sogar verschiedene Arten, handelt. Auch die phylogenetisch-taxonomische Position der bei Kangurus auftretenden Leishmanien ist bislang noch nicht geklärt. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Parasiten eng mit der zweiten Gruppe von *L. siamensis* (einschließlich *L. enrietti*)

verwandt sind, so dass auch hier sich die Frage stellt, ob es sich tatsächlich bei dieser Gruppe um drei verschiedene Arten - *L. enrietti*, *L. siamensis* und *L. australiensis* - handelt. In diesem Fall wäre *L. siamensis* paraphyletisch.

Um diese Fragen klären zu können, müssen einerseits viel mehr Stämme dieser drei Arten untersucht werden, um die Sequenzvariabilität innerhalb der einzelnen Arten abschätzen zu können. Problematisch ist des Weiteren, dass nicht für alle Arten und auch die untersuchten *L. siamensis* Stämme sowie einige der bisher nicht identifizierten *L. siamensis*-ähnlichen Stämme die Sequenzen für alle untersuchten Marker vorliegen, so dass nicht mit einem identischen Stammset für alle Marker gearbeitet werden konnte. Diese fehlenden Arten müssen in zukünftigen Studien für die entsprechenden Marker komplettiert werden. Bedauerlicherweise existiert von vielen der als *L. siamensis* identifizierten Proben kein Material (Biopsie, DNA oder Kultur) mehr.

Phylogenetische Studien sind wichtig, um bestimmte biologische Eigenschaften der einzelnen Taxa vergleichen zu können und auch Rückschlüsse zum Ursprung und zur Verbreitung der Organismen zu ziehen. Die Möglichkeit, dass sich Deutschland und andere Länder in Mitteleuropa als neue Foci für Leishmaniosen entwickeln könnten, ist in jedem Fall ernst zu nehmen. Deshalb ist es wichtig, weitere Forschung zu diesem Thema zu betreiben. Die Studien zu *L. siamensis* als Verursacher von autochthonen Leishmaniosen sind ein erster Schritt in diese Richtung.

Um die Gefährdung von Menschen in Mitteleuropa besser einschätzen zu können, sind weitere Untersuchungen zur Virulenz, Wirtspräferenz, Medikamentensensitivität und zum Transmissionszyklus von *L. siamensis* (insbesondere der europäischen Parasiten) notwendig. Diese Studien erfordern das erfolgreiche Ansetzen einer Kultur, was bis jetzt leider noch für keinen der in Deutschland und der Schweiz aufgetretenen Fälle gelungen ist. Epidemiologische Studien einschließlich der Surveillance, dem Screening von Nutztieren sowie der Menschen in den be-

troffenen Regionen, der genetischen Typisierung und Untersuchungen zum Ursprung und der Verbreitung der Infektionen und die Identifizierung des Vektors sind die Hauptaufgaben für eine effektive Prävention und Kontrolle dieser neuen Infektionskrankheit in Mitteleuropa.

## DANKSAGUNG

Wir möchten uns bei Harry Noyes (Institute of Integrative Biology, Dept. of Functional and Comparative Genomics, University of Liverpool, UK), Norbert Müller (Institut für Parasitologie der Vetsuisse Fakultät und der Medizinischen Fakultät, Universität Bern), Mohamed Kasbari (ANSES - Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Laboratoire de Santé Animale, Mission Leishmanioses & Phlébotomes, Maisons Alfort, France), Elisa Cupolillo (Istituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Rio de Janeiro, Brasilien) und Christophe Ravel (Université de Montpellier 1, Faculté de Médecine, France) für die Zurverfügungstellung von DNA verschiedener *Leishmania*-Proben bedanken.

## LITERATUR

- Beyreder J. (1962): Ein Fall von Leishmaniose in Niederösterreich. *Wien Med Wochenschr* 115:900-901.
- Bogdan C, Schönian G, Banuls AL, Hide M, Pratleng 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 Inf Dis* 31: 302-306.
- Bualert L, Charungkiattikul W, Thongsuksai P, Mungthin M, Siripattanapibong S, Khositnithikul R, Naaglor T, Ravel C, El Baidouri F, Leelayoova S. (2012): Case report: Autochthonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient, Southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 86(5): 821-824.
- Callot J. (1959): Présence de *Phlebotomus larrouseii* en Alsace. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 25:112.
- Chusri S, Hortiwakul T, Silpapojakul K, Sirivasatien P. (2012): Case report: Consecutive cutaneous and visceral leishmaniasis manifestations involving a novel *Leishmania* species in two HIV patients in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 87(1): 76-80.
- Croan DG, Morrison DA, Ellis JT (1997): Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol*. Nov;89(2):149-59.
- Depaquit J, Naucke TJ, Schmitt C, Ferté H, Léger N. (2005): A molecular analysis of the subgenus *Transphlebotomus* *Artemiev*, 1984 (*Phlebotomus*, *Diptera*, *Psychodidae*) inferred from ND4 mtDNA with new northern records of *Phlebotomus mascittii* Grassi, 1908. *Parasitol Res* 43: 113-116.
- Diaz-Espineira MM, Slappendel RJ. (1997): A case of autochthonous canine leishmaniasis in The Netherlands. *Vet Q* 19: 69-71.
- Dornbusch HJ, Urban C, Kerbl C, Lackner H, Schwinger W, Sovinz P, Zottner H, Aspöck H. (1999): Viscerale Leishmaniose bei einem 10 Monate alten österreichischen Mädchen. XXXIII. Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie (1999).
- Dougall A, Shilton C, Low Choy J, Alexander B, Walton S. (2009): New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in northern Australian macropods. *Epidemiol Infect* 137:1516-1520.
- El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, Presber WH, Schönian G. (2001): *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol*. Jan 97(1):35-44.
- Fischer D, Moeller P, Thomas SM, Naucke TJ, Beierkuhnlein C. (2011): Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. *PLoS NTD* 5(11): e1407.
- Fischer D, Thomas SM, Beierkuhnlein C. (2010): Temperature-derived potential for the establishment of phlebotomine sandflies and visceral leishmaniasis in Germany. *Geospatial Health* 5(1): 59-69.
- Galli-Valerio B. (1912): Beobachtungen über *Culiciden* und Mitteilung über das Vorkommen von *Phlebotomus papatasi* (Scop.) im Kanton Waadt. *Zentralblatt für Bakteriologie* 43: 222-226.
- García L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Wilber Quispe Tintaya K, Dujardin JC. (2004): Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol*. May;42(5):2294-7.
- Gothe R. (1991): Leishmaniosen des Hundes in Deutschland: Erregerfauna und -biologie, Epidemiologie, Klinik, Pathogenese, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. *Kleintierpraxis* 36: 69-84.
- Grimm F, Knechtli R, Gessler M, Jenni L. (1990): Biology of sandflies in southern Switzerland. *Rev Suisse Zool* 97: 778-779.
- Grimm F, Gessler M, Jenni L. (1993): Aspects of sandfly biology in Southern Switzerland. *Med Vet Entomol* 7: 170-176.
- Harms G, Schönian G, Feldmeier H. (2003): Leishmaniasis in Germany. *Emerg Inf Dis* 9 (7): 872-875.
- Kato H, Uezato H, Gomez EA, Terayama Y, Calvoña M, Iwata H, Hashiguchi Y. (2007): Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for *Leishmania* infection by molecular biological methods. *Am J Trop Med Hyg*. Aug 77(2):324-9.
- Knechtli R & Jenni L. (1990): Experimental transmission of *Leishmania infantum* by the bite of *Phlebotomus perniciosus* from Switzerland. *Acta Tropica* 47:213-216.
- Koehler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schönian G, Zahner H, Burkhardt E. (2002): Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 109: 9-17.
- Kollaritsch H, Emminger W, Zauschirm A, Aspöck H. (1989): Suspected autochthonous kala-azar in Austria. *Lancet* 22: 901-902.
- Kongkaew W, Siriayaporn P, Leelayoova S, Supparatpinyo K, Areechokchai D, Duang-ngern P, Chanachai K, Sukmee T, Samung Y, Sridurongkathum P. (2007): Autochthonous visceral leishmaniasis: a report of a second case in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Publ Health* 38(1): 8-12.
- Kuhls K, Sinning D, Rauhut F, Köhler K, Litzke LF, Schönian G. (2013): *Leishmania siamensis* as the cause of autochthonous cutaneous leishmaniasis of horses in Germany – a new emerging zoonotic disease? *World-Leish* 5 2013. Abstract
- Leelayoova S, Siripattanapibong S, Hitakarun A, Kato H, Tan-ariya P, Siriyasatien P, Osatakul S, Mungthin M. (2013): Multilocus characterization and phylogenetic analysis of *Leishmania siamensis* isolated from autochthonous visceral leishmaniasis cases, southern Thailand. *BMC Microbiology* 13:60
- Lindgren E, Andersson Y, Suk JE, Sudre B, Semenza JC. (2012): Monitoring EU emerging infectious disease risk due to climate change. *Science* 336:418-419.
- Litzke, L-F, Köhler, K, Schoenian, G, Zahner, H. (2006): Autochthone Hautleishmaniose beim Pferd. Tagung „Diagnostik, Epidemiologie und Bekämpfung von Parasitosen“ der Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Wetzlar, 2006.
- Lobsiger L, Müller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B, Gottstein B. (2010): An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol* 169: 408-414.
- Lollaritsch H, Emminger W, Zauschirm A, Aspöck H. (1989): Suspected autochthonous kala-azar in Austria [letter]. *Lancet* 1: 901-902.
- Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, Gomez-Landires E, Hashiguchi Y, Nonaka S (2004): Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology* May128(Pt 5):483-91.
- Maharom P, Siripattanapibong S, Mungthin M, Naaglor T, Sukkawee R, Pudkorn R, Wattana W, Wanachawanawin D, Areechokchai D, Leelayoova S. (2008): Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 39(6): 88-990.
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobello M, Gradoni L. (2008): The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health* 13(2): 256-264.
- Mazzi R. (1976): Kutane Leishmaniose: Autochthone Fall in der Schweiz? *Dermatologica* 153: 104-105.
- Menn B, Lorentz S, Naucke TJ. (2010): Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasites & Vectors* 3, 34.
- Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. (2010): Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* Jul;137(8):1159-68.
- Müller N, Welle M, Lobsiger L, Stoffel MH, Kühni Boghenbor K, Hilbe M, Gottstein B, Frey CF, Geyer C, von Bomhard W. (2009): Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Vet Parasitol* 166: 346-351.
- Naucke TJ, Pesson B. (2000): Presence of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908 (*Diptera*: *Psychodidae*) in Germany. *Parasitol Res* 86: 335-336.
- Naucke TJ. (2002): Leishmaniose, eine Tropenkrankheit und deren Vektoren (*Diptera*, *Psychodidae*, *Phlebotominae*) in Mitteleuropa. *Denisia* 6 Nr. 184: 163-178.
- Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S. (2008): Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res* (Suppl 1) 103: 65-68.



Naucke TJ, Lorentz S, Rauchenwald F, Aspöck H. (2011): Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii Grassii, 1908, in Carinthia: first record of the occurrence of sandflies in Austria (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Parasitol Res 109(4): 1161-1164.

Naucke TJ & Schmitt C. (2004): Is leishmaniasis becoming endemic in Germany? Int J Microbiol 293 (Suppl. 37):179-181.

Noyes H, Pratlong F, Chance M, Ellis J, Lanotte G, Dedet JP. (2002): A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus Leishmania ss. Parasitology 124: 17-24.

Reuss SM, Dunbar MD, Calderwood Mays MB, Owen JL, Mallicote MF, Archer LL, Wellehan Jr JFX. (2012): Autochthonous Leishmania siamensis in Horse, Florida, USA. Emerging Infectious Diseases 18(9): 1545-46.

Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, Spurck T, Low Choy J, Handman E. (2004): Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos isolation and characterization of the causative organisms. Int J Parasitol 34: 655-664.

Schwalder P. (1977): Leishmaniose bei Hund und Katze. Autochthone Fälle in der Schweiz. Kleintierpraxis 22: 237-246.

Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. (2003): PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis Sep 47(1):349-58.

Slappendel RJ. (1988): Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in The Netherlands. Vet Q 10: 1-16.

Suankratay C, Suwanpimolkul G, Wilde H, Siriyasattien P. (2010): Case report: Autochthonous visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient: the first in Thailand and review of the literature. Am J Trop Med Hyg 82(1): 4-8.

Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y, Kongkaew W, Bumrungrana K, Chanachai K, Apiwathanasorn C, Rujirojindakul P, Wattanasri S, Ungchusak K, Leelayoova S. (2008): A suspected new species of Leishmania, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. Int J Parasitol 38: 617-622.

Villinski JT, Klena JD, Abbassy M, Hoel DF, Pupilampu N, Mehta S, Boakye D, Raczniak G. (2008): Evidence for a new species of Leishmania associated with a focal disease outbreak in Ghana. Diagn Microbiol Infect Dis 60: 323- 327.

Vogel R. (1931): Beobachtungen über blutsaugende Zweiflügler im Kanton Tessin. Zool Anz): 1-3.

Weitzel T, Mühlberger N, Jelinek T, Schunk M, Ehrhardt S et al. (2005): Imported leishmaniasis in Germany 2001-2004: data of the SIMPID surveillance network. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24: 471-476

World Health Organization (2010): Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010, WHO technical support series (2010), No. 949.

Wiwanitkit V. (2011): Bone marrow leishmaniasis: a review of situation in Thailand. Asian Pacific J Trop Med 757-759.

## AUTOREN

**Denise Sinning, B.Sc.**  
Biosystemtechnik/Bioinformatik  
Labor für Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik  
Technische Hochschule Wildau [FH]  
sinning@th-wildau.de

**Dr. Kernt Köhler**  
Institut für Veterinär-Pathologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Kernt.Koehler@vetmed.uni-giessen.de

**Prof. Dr. Lutz-Ferdinand Litzke**  
Klinik für Pferde (Chirurgie) der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
lutz-f.litzke@vetmed.uni-giessen.de

**Dr. rer. nat. Gabriele Schönian**  
Institut für Mikrobiologie und Hygiene,  
Charité Universitätsmedizin Berlin  
Gabriele.Schoenian@charite.de

**Prof. Dr. sc. hum. Marcus Frohme**  
Labor für Molekulare Biotechnologie  
und Funktionelle Genomik  
Technische Hochschule Wildau [FH]  
marcus.frohme@th-wildau.de

**Dr. rer. nat. Katrin Kuhls (korrespondierender Autor)**  
Labor für Molekulare Biotechnologie und  
Funktionelle Genomik  
Technische Hochschule Wildau [FH]  
Katrin.Kuhls@th-wildau.de