

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Lungenwurminfektionen bei Robben und serologische
Nachweismöglichkeiten**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Sophia Arlena Ulrich

aus Kassel

Hannover 2016

Wissenschaftliche Betreuung: 1. Prof. Dr. Christina Strube, PhD, Institut für Parasitologie
2. apl. Prof. Prof. h. c. Dr. Ursula Siebert, Institut für Terrestrische und Aquatische Wildtierforschung

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Strube, PhD, und apl. Prof. Prof. h. c. Dr. U. Siebert
2. Gutachter: Apl. Prof. Dr. Dr. Martin Runge

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2016

Teile dieser Arbeit wurden durch die *Crowd* über Startnext Crowdfunding GmbH gefördert.

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf folgenden Tagungen vorgestellt:

Ulrich, S.A., Strube, C., Buschbaum S., Lehnert, K., Siebert, U. (2014)

Serological lungworm detection in seals

28th Annual Conference der European Cetacean Society

Liège, Belgien, 05.04.-09.04.2014

Ulrich, S.A., Siebert, U., Buschbaum, S., Lehnert, K., Strube, C. (2014)

Evaluierung eines ELISAs zur Detektion von Lungenwurminfektionen bei Seehunden

Tagung der DVG-Fachgruppe „Parasitologie und Parasitäre Krankheiten“

Leipzig, 30.06.-02.07.2014

Ulrich, S.A., Janecek, E., Lehnert, K., Siebert, U., Strube, C. (2015)

Antikörper gegen Lungenwürmer: Profile und Trends freilebender Seehunde in der Nordsee und Seeelefanten im Pazifik

Tagung der DVG-Fachgruppe „Parasitologie und Parasitäre Krankheiten“

Stralsund, 29.06.-01.07.2015

Ulrich, S.A., Lehnert, K., Strube, C., Siebert, U. (2015)

Lungenparasiten beim Seehund

Infektionssymposium „Zoonosen und andere Erkrankungen bei Wildtieren“ der Tierärztlichen Hochschule Hannover und des niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz

Hannover, 13.11.2015

Ulrich, S.A., Janecek, E., Lehnert, K., Siebert, U., Strube, C. (2016)

Lungworm seroprevalence and age distribution in free-ranging harbour seals of the North and Baltic Sea

27th Annual Meeting of the German Society for Parasitology

Göttingen, 09.-12.3.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Publikationen	9
	2.1 Ein rekombinanter Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Lungenwurmdetektion bei Robben	9
	2.2 Seroprävalenz von Lungenwürmern bei freilebenden Seehunden und molekulare Charakterisierung von MSP mariner Säugetiere	11
3	Diskussion.....	13
	ELISA	13
	Phylogenetische Analysen am Major Sperm Protein	20
4	Zusammenfassung.....	22
5	Summary	24
6	Literaturverzeichnis	26
7	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	37

1 Einleitung

Die Robbenarten Seehund (*Phoca vitulina*) und Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) sind neben dem Schweinswal (*Phocoena phocoena*) die einzigen Meeressäuger, die regelmäßig in der deutschen Nord- und Ostsee anzutreffen sind (BENKE et al. 1998; SIEBERT et al. 2006; REIJNDERS et al. 2009). Seit 1976 sind sie durch internationale Abkommen wie dem Washingtoner Artenschutzabkommen, der Berner Konvention des Europarats von 1979 und Regionalabkommen wie dem Abkommen zur Erhaltung der Seehunde (*Phoca vitulina*) im Wattenmeer von 1991 und dem *Agreement on the Conservation of Small Cetaceans in the Baltic, North East Atlantic, Irish and North Seas* (ASCOBANS) von 1991 geschützt.

Seehunde und Kegelrobben gehören zu den Hundsrobben (Phocidae). Ihre Ohren sind äußerlich nicht sichtbar und die Hinterflossen sind nach hinten ausgerichtet, was die Fortbewegung an Land erschwert, jedoch im Wasser zusätzlichen Antrieb gibt (BONNER 1994).

Seehunde reproduzieren sich jährlich, wobei die Wurfzeit zum großen Teil auf den Juni fällt (ABT 2002; LIEBSCH et al. 2006). Unter anderem wird auf Grund dieser Information das ungefähre Alter von Seehunden geschätzt. Diese Zeit und auch die folgende Laktationszeit, die vier Wochen dauert (ROSS et al. 1994), verbringen die Tiere größtenteils auf Sandbänken in Kolonien, wobei sie im Wasser als Einzelgänger anzutreffen sind (HERR et al. 2009). Nach der Laktation fastet das Jungtier für zirka 15-17 Tage (MUELBERT u. BOWEN 1993). Länge der Laktations- und Fastenzeit sind wichtig um abzuschätzen, ab wann Seehunde feste Nahrung und somit potenzielle Zwischenwirte mit infektiösen Parasitenstadien aufnehmen. Die Seehundpopulation wurde bis Mitte der 70-er Jahre durch Jagd und Industrie kontinuierlich dezimiert (REIJNDERS 1983; HEIDE-JØRGENSEN u. HÄRKÖNEN 1988; BROUWER et al. 1989). Seitdem die Jagd auf Seehunde eingestellt und Nationalparks im Wattenmeer eingerichtet wurden, erholte sich die Population jedoch stetig (ABT 2002; REIJNDERS et al. 2009). Danach dezimierten zwei Staupe-Epidemien, ausgelöst von einem phozinen Morbillivirus, im Jahre 1988/89 und 2002 die Population jeweils um mehr als die Hälfte, wobei 2014 ein Rekordhoch von 26.576 Seehunden an Land gezählt wurde (REIJNDERS et al. 2005, 2009; GALATIUS et al. 2014). Im Jahr 2015 waren es 26.435 Individuen, da 2014 durch den neuen Influenza A Stamm H10N7 einen Rückgang der

Population erfolgte (ZOHARI et al. 2014; BODEWES et al. 2015; GALATIUS et al., 2015). Seehunde sind opportunistische Jäger, die sich vorwiegend von benthischen Fischen, die je nach Alter des Seehundes in der Größe variieren, ernähren (SIEVERS 1989; SIEBERT et al. 2012).

Kegelrobben sind im Wattenmeer und der dänischen Nordsee vermutlich um 1500 v. Chr. ausgestorben (REIJNDERS et al. 1995). Eine sich neu formende Kolonie wurde dort erstmals in den 1960-er Jahren vor der deutschen Nordseeinsel Amrum gesichtet (QUEDENS u. LEIPERSBERGER-NIELSEN 1988; SCHEIBEL u. WEIDEL, 1988). Im Jahr 2013 wurden 623 Kegelrobben auf der Nordseeinsel Helgoland gezählt, 62 im Wattenmeer-Gebiet Schleswig-Holsteins, 227 in Niedersachsen und Hamburg und 3.364 in den Niederlanden (BRASSEUR et al. 2015).

Im Wattenmeer werden Kegelrobben zwischen Dezember und Januar geboren (HALL u. THOMPSON 2009). Sie jagen am Boden lebende Fische und Zephalopoden (HAMMOND et al. 1994a, 1994b). Nach einer ungefähr 18 Tage dauernden Laktationszeit gehen die jungen Kegelrobben in eine ca. 25 Tage dauernde Fastenphase über, während der sie ihr Lanugo, das charakteristische weiße Fell, verlieren (BENNETT et al. 2007; HÄRKÖNEN et al. 2007; HALL u. THOMPSON 2009).

Mit dem Ausbruch der Seehundstaupe im Jahr 1988/89 wurde ein Strandungsnetzwerk in Schleswig-Holstein eingeführt, um eine möglichst lückenlose Erfassung von Daten dieser Tiere gewährleisten zu können. Seehunde unterstehen dem Jagdgesetz, allerdings wurde die Jagd seit 1976 eingestellt. Mit Hilfe speziell ausgebildeter Seehundjäger werden gestrandete marine Säugetiere geborgen und an das Institut für Terrestrische und Aquatische Wildtierforschung (ITAW) der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover weitergeleitet. Die Überwachung der Gesundheit der marinen Säugetiere ist ein Beitrag zur Arterhaltung. Um die Gesundheitsüberwachung umfassend gewährleisten zu können, werden im ITAW im Rahmen des Totfund-Monitorings Obduktionen bei gestrandeten Tieren durchgeführt und weiterführende virologische, mikrobiologische und histologische Untersuchungen eingeleitet. Neben Seehunden und Kegelrobben schließen diese Untersuchungen auch Schweinswale mit ein, die zu den Zahnwalen (Odontoceti) gehören. Sie jagen opportunistisch und ernähren sich von benthischen Fischen (SANTOS u. PIERCE 2003; GILLES et al. 2008).

Im Rahmen des Lebend-Monitorings werden regelmäßig Beprobungen (Blut, Abstriche,

Gewicht, Länge, etc.) bei freilebenden Seehunden durchgeführt. Bei den Obduktionen sowie beim Lebend-Monitoring werden Parasiten entnommen und bestimmt, da ihr Vorkommen und ihre Prävalenz Indikatoren für die Fitness und die Gesundheit einer Population sein können (STROUD u. DAILEY 1978; LACY 1997; COLTMAN et al. 1999; RIJKS et al. 2008).

Bei Wildtieren spielen Parasiten eine wichtige Rolle. Sie sind in der Natur allgegenwärtig und sie parasitieren bei sämtlichen Tierstämmen und Klassen. Parasitismus hat sich polyphyletisch entwickelt, hat eine wichtige Funktion in der Biozönose und kann als natürlicher Auslesemechanismus die Wirtspopulation regulieren (MOORE u. WILSON 2002). Im Verlauf der Evolution hat sich ein ökologisches Gleichgewicht zwischen Wirt und Parasit gebildet, welches allerdings, z. B. auf Grund anthropogener Einflüsse, verändert werden und zu schwerwiegenden pathologischen Veränderungen im Wirt führen kann (ECKERT et al. 2008). Daher sollte die Erfassung von Parasiten bei der Gesundheitsüberwachung der Wirtstiere mitberücksichtigt werden.

Besondere Bedeutung sollte Parasiten auch bei der Beleuchtung der Ethologie und Ökologie ihrer Wirtstiere beigemessen werden. Soziale Interaktionen zwischen Wirtstieren begünstigten beispielsweise die Übertragung von Parasiten. So wurden die durch soziale Kontakte übertragenen Parasiten am häufigsten bei Wirtspopulationen mit einer hohen Populationsdichte festgestellt (LOEHLE 1995; ARNEBERG et al. 1998). Wenn sich Wirtstierstämme geographisch trennten und andere ökologische Nischen erschlossen, wiesen auch die jeweiligen Parasitenspezies Unterschiede auf (NOBLE u. NOBLE 1982). Parasiten mariner Säugetiere können als wichtige biologische Indikatoren fungieren und Informationen über Verhalten, Migration, Nahrung und den Gesundheitszustand ihrer Wirte liefern (PERRIN u. POWERS 1980; DAILEY u. OTTO 1982; RAGA et al. 1997). Sie haben im Laufe der Geschichte eine Koevolution mit ihrem Wirt durchlaufen, die das Fortbestehen einiger Parasitenspezies, die an Land bereits ausgestorben sind, ermöglichte (ANDERSON 1984).

Bei marinen Säugetieren kommen Ektoparasiten sowie Endoparasiten vor (DELYAMURE 1955), wobei bei Obduktionen am häufigsten Nematoden gefunden werden (LEHNERT et al. 2005; LEHNERT et al. 2007). Zu den bei Seehunden und Kegelrobben in der europäischen Nord- und Ostsee vorkommenden Nematoden gehören die Magenwürmer *Pseudoterranova*

decipiens und *Contracaecum osculatum* (Anisakidae, Ascaridoidea), der Herzwurm *Acanthocheilonema spirocauda* (Onchocercidae, Filarioidea) sowie die Lungenwürmer *Parafilaroides gymnurus* (Filaroididae, Metastrongyloidea) und *Otostrongylus circumlitus* (Crenosomatidae, Metastrongyloidea) (DELYAMURE 1955). Bei Schweinswalen ist in der europäischen Nord- und Ostsee der Nematode *Anisakis simplex* (Anisakidae, Ascaridoidea) im Magen anzutreffen, in der Lunge sind es *Pseudalius inflexus*, *Torynurus convolutus*, *Halocercus invaginatus* und im Ohr *Stenurus minor* (Pseudaliidae, Metastrongyloidea). Letztgenannter Nematode wird ebenfalls zu den Lungenwürmern gezählt, da er mit der *Bulla tympanica* lediglich eine weitere Nische besetzt hat (DELYAMURE 1955; ARNOLD u. GASKIN 1975).

Lungenwürmer (Metastrongyloidea) sind vor allem bei Seehunden sehr pathogene Parasitenarten (LEHNERT et al. 2007; SIEBERT et al. 2007). *O. circumlitus*, der „große Lungenwurm“, kommt in den Bronchien, der Trachea, der rechten Herzkammer, in der *Vena pulmonalis* und in den Blutgefäßen der Leber vor (DE BRUYN 1933; ONDERKA 1989; CLAUSSEN et al. 1991; MEASURES 2001; LEHNERT et al. 2007), während *P. gymnurus*, der „kleine Lungenwurm“, vorwiegend in den Alveolen und Bronchiolen parasitiert (STROUD u. DAILEY 1978; CLAUSSEN et al. 1991). Die weiß bis gelblichen, adulten weiblichen Individuen von *O. circumlitus* sind 32-144 mm lang und 0,64-2,4 mm breit, die männlichen sind mit 30-155 mm Länge und 0,53-1,3 mm Breite etwas kleiner (RAILLIET 1899; DE BRUYN 1933; DELYAMURE 1955). Larven des ersten Entwicklungsstadiums (L1) sind 393-469 µm lang und 19-27 µm breit (BERGERON et al. 1997a). Die adulten Individuen von *Parafilaroides* spp. dagegen sind kleiner. Die weiblichen Nematoden sind 5-90 mm lang und 0,051-0,397 mm breit, die männlichen 3-37 mm lang und 0,068-0,165 mm breit (RAILLIET 1899; DOUGHERTY u. HERMAN 1947; DELYAMURE 1955). Die L1 von *Parafilaroides* spp. sind ca. 240 µm lang und 5 µm breit (DAILEY u. GILMARTIN 1980).

O. circumlitus und *P. gymnurus* infizieren ausschließlich Hundsrobben und sind in der nördlichen Hemisphäre verbreitet (DAILEY 1975; CLAUSSEN et al. 1991; MEASURES 2001). Die Befallsintensität und die Prävalenz können zwischen den verschiedenen Hundsrobbenarten stark variieren. Beispielsweise sind Kegelrobben im Vergleich zu Seehunden weniger häufig und mit geringerer Intensität mit diesen Nematoden befallen

(BONNER 1972; OSINGA et al. 2012). Kalifornische Seeelefanten (*Mirounga angustirostris*), die im Pazifik bei den kalifornischen Kanalinseln, USA, und vor Baja California, Mexiko, beheimatet sind, zeigen ausnahmslos Infektionen mit *O. circumlitus* (STROUD u. DAILEY 1978; DAILEY u. OTTO 1982; GULLAND et al. 1997). Dessen Anpassung an den Wirt „Seeelefant“ scheint weniger ausgeprägt als bei Seehunden oder Kegelrobben zu sein, da die Mehrheit der Seeelefanten bereits während der Präpatenz verstirbt (GULLAND et al. 1996, 1997; COLEGROVE et al. 2005). Dabei ist die Intensität der Infektion nicht zwingend mit der Schwere der Erkrankung korreliert, selbst als „mild“ eingestufte Lungenwurmbefälle können zum Tode des Tieres führen (GULLAND et al. 1997).

Infektionen mit *O. circumlitus* können zu partieller bis vollständiger Obstruktion der Bronchien führen (VAN DEN BROEK u. WENSVOORT 1959; GERACI u. AUBIN 1987; SIEBERT et al. 2007). Die Lungenwurmart *O. circumlitus* und *P. gymnurus* treten bei Seehunden vorwiegend gemeinsam auf und können in Verbindung mit bakteriellen Sekundärinfektionen zu schwerwiegenden suppurativen, suppurativ-nekrotisierenden, bzw. granulomatösen und teilweise auch abszedierenden Bronchopneumonien führen (CLAUSSEN et al. 1991; GULLAND et al. 1997). Bei geringer Befallsintensität kann die Infektion inapparent verlaufen (MEASURES 2001), mittel- bis hochgradige Befallsintensitäten können hingegen mit Dehydratation, blutigem Bronchialschleim und Anorexie einhergehen (CLAUSSEN et al. 1991; GULLAND et al. 1996, 1997; SIEBERT et al. 2007). Weitere klinische Symptome reichen von verminderter Tauchfähigkeit und damit reduzierter Nahrungsaufnahme und schlechtem Ernährungszustand über vermehrten (Blut-) Husten bis hin zu vollständiger Dyspnoe und Apathie (ONDERKA 1989; BERGERON et al. 1997 a, b). Die Infektion wird vermehrt bei Seehunden im Alter zwischen zwei und 18 Monaten beobachtet und kann zum Tod der Tiere führen (CLAUSSEN et al. 1991; MEASURES 2001; SIEBERT et al. 2007). Adulte Seehunde sind seltener mit Lungenwürmern infiziert und zeigen auch meist eine weitaus geringere Befallsintensität (CLAUSSEN et al. 1991; LEHNERT et al. 2007; SIEBERT et al. 2007).

Der Lebenszyklus beider Lungenwurmspezies ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Adulte Nematoden finden sich vorwiegend in der Lunge, wobei immature Stadien von *O. circumlitus* in der *Arteria pulmonalis* und im Herzen beobachtet wurden (BERGERON et al. 1997b; GULLAND et al. 1997). Weibliche Würmer sind ovovivipar, d.h. sie legen

larvenhaltige Eier ab, aus denen alsbald die L1 in den luftführenden Wegen schlüpfen, sodass diese im Bronchialschleim detektiert werden können (MEASURES 2001). Über einen passiven Transport mit dem Flimmerepithel der Trachea gelangen die L1 in den Rachen, wo sie abgeschluckt und nach Passage des Magen-Darm-Trakts mit dem Kot ausgeschieden werden (DAILEY 1970; BERGERON et al. 1997a). Man geht davon aus, dass der Parasit Zwischenwirte für seine Entwicklung benötigt. In benthischen Fischen wie Nagebarschen, Klieschen und Schollen wurden Lungenwurmlarven von *P. decorus* und *O. circumlitus* identifiziert (DAILEY 1970; BERGERON et al. 1997a), ferner konnte mittels In situ-Hybridisierung ribosomale DNA von *P. gymnurus* nachgewiesen werden (LEHNERT et al. 2010). Eine experimentelle Infektion von Robben mit larventragenden Fischen erfolgte jedoch bislang nur für *P. decorus* und auch mit nur jeweils einem Seelöwen als Wirts- bzw. Kontrolltier (DAILEY 1970). Somit sind zumindest für *O. circumlitus* und *P. gymnurus* die Henle-Koch'schen Postulate noch nicht erfüllt, so dass hier notwendiger Forschungsbedarf besteht. Auf Grund der Tatsache, dass Lungenwurminfektionen größtenteils bei über zwei Monate alten Tieren nachgewiesen werden, wird davon ausgegangen, dass sich junge Seehunde nach dem Säugen und dem darauffolgenden Fasten infizieren, wenn sie benthische Fische aufnehmen (MEASURES 2001; LEHNERT et al. 2010).

Für *O. circumlitus* wurden bisher Prävalenzen von bis zu 76 % im Wattenmeer (BORGSTEEDE et al. 1991; CLAUSSEN et al. 1991; LEHNERT et al. 2007; SIEBERT et al. 2007), 35 % in New England, USA, (GERACI u. AUBIN 1987) und in Kalifornien, USA, bis zu 12 % bei Seehunden sowie bis zu 89 % bei nordischen Seeelefanten festgestellt (GULLAND et al. 1997; COLEGROVE et al. 2005). Hierbei handelte es sich zum größten Teil um Individuen, die unter 18 Monate alt waren.

Lungenwurminfektionen wurden bislang hauptsächlich im Rahmen von Obduktionen erkrankter Tiere festgestellt (CLAUSSEN et al. 1991; SIEBERT et al. 2007; RIJKS et al. 2008). Über Obduktionen erhobene Daten können durch verschiedene Faktoren wie das Alter der Tiere, Krankheiten und anthropogene Aktivitäten beeinflusst werden (CLAUSSEN et al. 1991; MEASURES 2001; SIEBERT et al. 2007). Allerdings sind die bislang zugänglichen *in vivo*-Methoden, wie die Diagnosestellung über eine Larvendetektion im Kot mittels Auswanderverfahren (BAERMANN 1917; BERGERON et al. 1997b) oder über *O. circumlitus*-Individuen im Auswurf von Seehunden und ferner die Stellung einer

Verdachtsdiagnose bei hinweisenden klinischen Symptomen (BERGERON et al. 1997b) in ihrer Sensitivität äußerst limitiert. Zudem wäre es eine große logistische Herausforderung, Kot für eine Larvendetektion von freilebenden Robben zu sammeln und den Individuen zuzuordnen. Deshalb ist eine zuverlässige Methode zur serologischen Detektion von Lungenwürmern bei lebenden Seehunden wünschenswert und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit realisiert werden. Für die Immundiagnostik des bovinen Lungenwurms *Dictyocaulus viviparus* wurde ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), der gegen den Parasiten gerichtete Serumantikörper detektiert, entwickelt (SCHNIEDER 1992; VON HOLTUM et al. 2008). Als Antigen dient rekombinant exprimiertes Major Sperm Protein (MSP), da dieses eine Proteinfamilie repräsentiert, die nur im Sperma von Nematoden vorkommt (KLASS u. HIRSH 1981; WARD 1987). So lassen sich Kreuzreaktionen mit Trematoden, Zestoden oder Acanthozephalen weitestgehend ausschließen. MSP ist Teil des Zytoskeletts von Nematodenspermien und dient diesen zur Fortbewegung, weshalb es ein entscheidendes Element bei der Befruchtung der Eizelle darstellt (HIRSH et al. 1976; KLASS et al. 1976; WARD u. CARREL 1979). Außerdem dient die Sekretion von MSP als Signalmolekül für die Eizellreifung und Ovulation (MILLER et al. 2001). Auf Grund der Tatsache, dass MSP durch seine Natur als Spermienprotein ausschließlich von adulten männlichen Nematoden exprimiert wird (KLASS u. HIRSH 1981; WARD et al. 1988), ist die Diagnose hauptsächlich auf patente Infektionen beschränkt.

Der ELISA zur Lungenwurmdetektion bei Rindern besitzt eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % (VON HOLTUM et al. 2008). Daher war es das Ziel dieser Arbeit, diesen Test an Seehunde und Kegelrobben anzupassen. Weiterhin sollte dessen Potenzial für die Lungenwurmdetektion bei kalifornischen Seeelefanten evaluiert werden, da diese Tiere mit einer Mortalitätsrate von 89 % bei Jungtieren hoch empfänglich für den Parasiten sind (GULLAND et al. 1997). Auf Grund der Schwierigkeit Lungenwurminfektionen bei lebenden Robben festzustellen, fehlten Prävalenzdaten über die freilebende Seehundpopulation. Daher sollte im Anschluss an die Evaluierung des ELISAs die Seroprävalenzen bei in freier Wildbahn lebenden Robben verschiedener Altersgruppen erhoben werden. Um Informationen über die Persistenz von anti-MSP-Antikörpern zu erhalten, wurden sequentielle Serumproben von in Rehabilitation befindlichen Seehunden analysiert.

Informationen über die molekulare Struktur des MSP von Nematoden der Seehunde und

Schweinswale sind derzeit nicht verfügbar. Bisherige phylogenetische Studien innerhalb der Metastrongyloidea wurden auf Grundlage der *large*- und *small-subunit* ribosomaler RNA bzw. der ribosomalen 18S- und 28S-RNA (CARRENO u. NADLER 2003; CHILTON et al. 2006) und der ITS-2 Region der ribosomalen DNA (LEHNERT et al. 2010) vorgenommen. Diese Analysen bestätigten den engen Verwandtschaftsgrad von Lungenwürmern mariner Säugetiere innerhalb der Superfamilie Metastrongyloidea, einer evolutionsgenetisch alten Gruppe, die von den terrestrischen Vorfahren von Robben und Schweinswalen abstammt (ANDERSON 1984; CARRENO u. NADLER 2003). Um die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse des MSP verschiedener mariner Säugetiernematoden zu eruieren, sollten entsprechende Sequenzen erstmals identifiziert und sequenziert und anschließend ein phylogenetischer Stammbaum unter Hinzunahme von publizierten MSP-Sequenzen terrestrischer parasitischer Nematoden erstellt werden.

2 Publikationen

2.1 Ein rekombinanter Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Lungenwurmdetektion bei Robben

ULRICH, S.A.^{1,2}, LEHNERT, K.¹, SIEBERT, U.¹, C. STRUBE² (2015):

A recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for lungworm detection in seals

Parasites and Vectors 8, 443

doi 10.1186/s13071-015-1054-4

¹Institut für Terrestrische und Aquatische Wildtierforschung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

²Institut für Parasitologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Abstract:

Background:

Pinnipeds are frequently infected by the lungworms *Otostrongylus circumlitus* and *Parafilaroides gymnurus* (Metastrongyloidea). Infections are frequently associated with secondary bacterial bronchopneumonia and are often lethal. To date, a reliable lungworm diagnosis in individual seals is only possible during necropsy as examination of faeces collected from resting places does not allow assignment to individuals. Therefore, a diagnostic tool for lungworm detection in living seals is desirable for monitoring health of seals in the wild and in captivity. Previously, an ELISA based on recombinant bovine lungworm major sperm protein (MSP) as diagnostic antigen was developed for lungworm diagnosis in cattle. In the present study, this test was adapted for detection of antibodies against lungworms in harbour (*Phoca vitulina*) and grey seals (*Halichoerus grypus*). Furthermore, sera of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) were tested to evaluate whether the harbour/grey seal ELISA is suitable for this seal species as well.

Methods:

For ELISA evaluation, lungworm-positive and -negative sera of harbour and grey seals were analysed using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated Protein A as secondary antibody.

Optical density was measured and a receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to determine a cut-off value. Potential cross-reactions were examined by testing serum of seals positive for gastrointestinal and heart nematodes, but negative for lungworm infections. In addition, sera of northern elephant seals were analysed.

Results:

Harbour and grey seal serum samples showed significant differences in optical density (OD) between serum of infected and uninfected animals resulting in a cut-off value of 0.422 OD with a specificity of 100 % (95 % CI: 87.23-100 %) and a sensitivity of 97.83 % (95 % CI: 88.47-99.94 %). Cross-reactions with heart or gastrointestinal nematodes were not observed. Analysis of northern elephant seal samples resulted in detection of antibodies in animals positive for lungworm larvae at faecal examination.

Conclusions:

The ELISA presented is a valuable method for detection of lungworm infections in live harbour and grey seals, providing a monitoring tool to reveal epidemiological dynamics of lungworm infections during health surveillance in free-ranging seals. Furthermore, ELISA results may aid institutions with harbour and grey seals under human care on decisions regarding anthelmintic treatment of individual animals.

Erklärung über den eigenen Anteil an der Publikation:

Konzept, Versuchsplanung: Christina Strube, Ursula Siebert

Experimentelle Durchführung: Sophia Arlena Ulrich

Diskussion, Beratung: Sophia Arlena Ulrich, Kristina Lehnert, Ursula Siebert, Christina Strube

Manuskript, Korrespondenz: Sophia Arlena Ulrich, Christina Strube

2.2 Seroprävalenz von Lungenwürmern bei freilebenden Seehunden und molekulare Charakterisierung von MSP mariner Säugetiere

ULRICH, S.A.^{1,2}, LEHNERT, K.¹, RUBIO-GARCIA, A.³, SANCHEZ-CONTRERAS, G.J.³, STRUBE, C.² und U. SIEBERT¹ (2016):

Lungworm seroprevalence in free-ranging harbour seals and molecular characterisation of marine mammal MSP

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 5, 48–55

doi: 10.1016/j.ijppaw.2016.02.001

¹Institut für Terrestrische und Aquatische Wildtierforschung, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

²Institut für Parasitologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

³Seal Rehabilitation and Research Centre, Pieterburen, Niederlande

Abstract:

Harbour seals (*Phoca vitulina*) are frequently infected with the lungworms *Otostrongylus circumlitus* and *Parafilaroides gymnuris*. The infection is often accompanied by secondary bacterial infections and can cause severe bronchopneumonia and even death in affected animals. Hitherto, the detection of lungworm infections was based on post mortem investigations from animals collected within stranding networks and a valid detection method for live free-ranging harbour seals was not available. Recently, an ELISA was developed for detecting lungworm antibodies in harbour seal serum, using major sperm protein (MSP) of the bovine lungworm, *Dictyocaulus viviparus* as recombinant diagnostic antigen. To determine lungworm seroprevalence in free-ranging harbour seals, serum was taken from four different seal age groups (n=313) resulting in an overall prevalence of 17.9% (18.9% of males, 16.7% of females). 0.7% of harbour seals up to six weeks of age were seropositive, as were 89% of seals between six weeks and six months, 53.6% between six and 18 months and 24.2% of seals over 18 months of age. In the 18 months and over age group, seropositive animals showed statistically significant reductions in body weight (P=0.003) and length (P<0.001).

Sera from lungworm infected harbour seals in rehabilitation (n=6) revealed that duration of

antibody persistence may be similar to that of lungworm infected cattle, but further studies are needed to confirm this.

Phylogenetic analyses of MSP sequences of different marine and terrestrial mammal parasitic nematodes revealed that lungworm MSP of the genus *Dictyocaulus* (superfamily Trichostrongyloidea) is more closely related to metastrongylid marine mammal lungworms than to trichostrongylid nematodes of terrestrial hosts.

Erklärung über den eigenen Anteil an der Publikation:

Konzept, Versuchsplanung: Christina Strube, Ursula Siebert

Experimentelle Durchführung: Sophia Arlena Ulrich

Diskussion, Beratung: Sophia Arlena Ulrich, Kristina Lehnert, Ana Rubio-Garcia, Guillermo J. Sanchez-Contreras, Christina Strube, Ursula Siebert

Manuskript, Korrespondenz: Sophia Arlena Ulrich, Christina Strube, Ursula Siebert

3 Diskussion

ELISA

Lungenwürmer und andere Parasiten können Hinweise über den Gesundheitszustand ihrer Wirtsspezies geben (RAGA et al. 1997). Die Erfassung der Lungenwurmprävalenz ist ein wichtiger Bestandteil des Managements und der Gesundheitsüberwachung von Seehunden in der Nordsee (LEHNERT et al. 2007; SIEBERT et al. 2007; RIJKS et al. 2008), da diese Aussagen über die Dynamik der Infektion zulässt und bei eventuellen Abweichungen vom Durchschnittswert zugrundeliegende Ursachen evaluiert werden können. Bislang war eine diagnostische Methode mit hoher Spezifität und Sensitivität zur Detektion von Lungenwürmern bei freilebenden Seehunden nicht existent. Klinische Symptome konnten lediglich zu einer Verdachtsdiagnose führen und die Detektion von Larven im Kot der Tiere hat sich bei freilebenden Seehunden als schwer umsetzbar erwiesen, außerdem mangelt es dieser Methode an Sensitivität (SCHNIEDER 1992). Andere Methoden wie Blutuntersuchungen oder Auskultation können zur Diagnosefindung beitragen, zudem husten Seehunde die Parasiten teilweise auch aus (BERGERON et al. 1997a). Allerdings sind diese Methoden in ihrer Sensitivität der Detektion von Antikörpern in Serum voraussichtlich unterlegen. Die Immundiagnostik ist folglich eine erstrebenswerte Methode zur Überprüfung von Lungenwurminfektionen und somit des Gesundheitszustandes freilebender Seehunde. Mit dem ELISA, der in dieser Arbeit evaluiert wurde, lassen sich Lungenwurminfektionen beim lebenden Tier mit hoher Sensitivität und Spezifität erfassen und so Prävalenzdaten bei Seehundpopulationen erheben. Als Grundlage für diesen Test diente rekombinant exprimiertes MSP des bovinen Lungenwurms *Dictyocaulus viviparus* als ELISA-Antigen, wie es auch zur Detektion von Antikörpern gegen Lungenwurminfektionen beim Rind eingesetzt wird (FIEDOR et al. 2009; SCHNIEDER 1992; SCHUNN et al., 2012; VON HOLTUM et al. 2008). Dieses als Glutathion-S-Transferase (GST)-MSP-Fusionsprotein eingesetzte Antigen detektiert im Serum-ELISA bei einem Cut-off von 0,5 OD anti-*D. viviparus* MSP-Antikörper mit einer Sensitivität und Spezifität von 100 % (VON HOLTUM et al. 2008). Aufgrund dieser sehr guten Testparameter wurde mit dem gleichen Antigen der ELISA für die Detektion von Seehund- und Kegelrobben-Antikörpern gegen MSP der Lungenwürmer *O.*

circumlitus und *P. gymnurus*, die oft in Mischinfektionen vorkommen (LEHNERT et al. 2007), entwickelt. Dieses Vorhaben erschien insofern vielversprechend, da für MSP, das essenziell für die Reproduktion und damit den Fortbestand der Nematoden ist, eine funktionelle Konservierung zu erwarten war (KLASS u. HIRSH 1981; MILLER et al. 2001; SMITH 2014).

Die Bindung von anti-MSP-Antikörpern der Seehunde bzw. Kegelrobben an das rekombinante Antigen wurde durch HRP-konjugiertes Protein A sichtbar detektiert. Dieses Protein, welches ursprünglich aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* isoliert wurde (SJÖQUIST et al. 1972), dient im ELISA als sekundärer Antikörper, da es vor allem Immunglobulin G (IgG) bindet (NILSSON et al. 1987). Protein G ist ein weiteres Immunglobulin-bindendes Protein, welches aus Streptokokken stammt (BJÖRCK u. KRONVALL 1984). Allerdings wurde Protein A dem Protein G vorgezogen, da es eine höhere Affinität zu Hunde- und Katzen-IgG aufweist (ELIASSON et al. 1988), die wie Seehunde Carnivoren sind. In der Tat hat sich Protein A als wirksamer Reagent zur Visualisierung der anti-MSP-Antikörper erwiesen. Bei der Testentwicklung für Rinder resultierte die Evaluierung unter Verwendung von 1:40 verdünntem Serum Helminthen-freier Kälber in einem arithmetischen Mittelwert von 0,17 OD (SD 0,083), der Serummittelwert der Lungenwurm-infizierten Kälber hingegen in einer OD von 0,98 (SD 0,053) (VON HOLTUM et al. 2008). Die Robbensereren wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, die Protein A-Konjugat-Verdünnung betrug 1:50.000. Dieser so an Robbensereren angepasste MSP-ELISA resultierte für Lungenwurm-negative Proben in einem arithmetischen Mittel von 0,17 OD (SD 0,082) und für Lungenwurm-positive Proben in 1,775 OD (SD 0,674). Während Negativseren von Rindern und Robben ähnliche OD-Werte im arithmetischen Mittel zeigten, war der arithmetische OD-Mittelwert der Lungenwurm-positiven Kegelrobben und Seehunden beachtlich höher als der der positiven Rinder. Trotzdem kalkulierte die *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Analyse mit 0,422 OD einen niedrigeren Cut-off für Robben im Gegensatz zu 0,5 OD für Rinder. Der Grund dafür war, dass die positiven Proben hohen OD-Schwankungen (niedrigster positiver Wert: 0,467 OD, höchster positiver Wert: 2,742 OD) unterlegen waren. Dies könnte darin begründet sein, dass die Durchführung einer experimentellen, kontrollierten Infektion nicht möglich war. So wurden bei der Testevaluierung für Rinder Kälber experimentell mit 3000-3300 infektiösen Larven von *D.*

viviparus infiziert (VON HOLTUM et al. 2008), während die freilebenden Robben natürlich infiziert waren und weder der Zeitpunkt noch die Befallsintensität bekannt und vermutlich auch sehr variabel waren.

Ähnlich der Sensitivität und Spezifität von 100 % (VON HOLTUM et al. 2008) resultierte der Robben-ELISA bei einem Cut-off von 0,422 OD in einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von 97,83 %. Bei 72 positiven Serumproben von Seehunden bzw. Kegelrobben wurde lediglich ein Seehund, bei dessen Sektion ein starker Lungenwurmbefall festgestellt wurde, falsch-negativ detektiert. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass das Immunsystem des Seehundes auf Grund der hohen Befallsintensität und damit einhergehender Schwere der Erkrankung nicht mehr adäquat Antikörper bilden konnte. Andererseits könnte die Infektion noch nicht weit genug für die ausreichende Bildung von Anti-MSP Antikörpern fortgeschritten gewesen sein. Rinder zeigten eine Serokonversion zwischen dem 26. und 41. Tag *post infectionem* (*p.i.*) (DE LEEUW u. CORNELISSEN 1991; SCHNIEDER 1992; TENTER et al. 1993; VON HOLTUM et al. 2008), diese erfolgt also etwa eine Woche nach Beginn der Patenz. Da MSP eine Spermienkomponente darstellt, wird es vor Beginn der Reproduktion nicht exprimiert. Deshalb ist es für das Immunsystem des Wirtes erst dann ein antigener Stimulus, nachdem männliche Parasiten das Adultstadium erreicht und kopuliert haben. Eine Begründung für das falsch-negative Ergebnis könnte also sein, dass das Tier sich in der späten Präpatenz oder frühen Patenz befand und somit noch keine Antikörper gegen MSP gebildet hat. Bei Rindern wurde festgestellt, dass MSP-spezifische Antikörper nur in Lungenwurm-infizierten Individuen nachweisbar waren, aber nicht bei solchen, die mit gastrointestinalen Nematoden befallen waren (VON HOLTUM et al. 2008). Das trifft ebenfalls für die vorgestellte Studie zu, da Seren von Lungenwurm-negativen Seehunden, die mit Herzwürmern oder gastrointestinalen Nematoden befallen waren, keinerlei Kreuzreaktionen im ELISA zeigten.

Immunoblots mit Seren von Lungenwurm-positiven und -negativen Robben bestätigten, dass die durch den ELISA detektierten Antikörper an das MSP banden. Sämtliche Serumproben zeigten eine positive Reaktion mit dem GST-MSP Fusionsprotein sowie purem GST. Dies ist durch Kreuzreaktionen von Antikörpern, die gegen das GST von Lungenwürmern oder anderen Helminthen gerichtet ist, mit dem GST des Tremadoden *S. japonicum*, welches mit dem rekombinant exprimierten MSP fusioniert wurde, erklärbar. Nach dem Entfernen des

GST mittels Thrombin-Abspaltung war es möglich, zwischen positiven und negativen Seehundseren zu unterscheiden, da nur Seren von Lungenwurm-positiven Individuen pures MSP erkannten.

Seeelefanten

Die Immunoblot-Ergebnisse der Seeelefanten bestätigten die ELISA-Ergebnisse, bei denen zwei von 27 Lungenwurm-positiven Tieren als positiv erkannt wurden, da diese zwei Proben im Immunoblot pures MSP detektierten. Trotzdem zeigten die ELISA-negativen Proben der Seeelefanten, unabhängig davon ob in der Sektion Lungenwürmer festgestellt wurden oder nicht, neben einer Bande mit MSP-GST und purem GST auch eine schwache Bande auf Höhe des puren MSP. Da diese schwache Bande auch bei in menschlicher Obhut geborenen und ohne Lungenwurm-Infektionsrisiko aufgewachsenen und daher als negativ determinierten Kegelrobben sichtbar war, kann diese Bande als unerwünschte Kreuzreaktion eingestuft werden. Da die schwache Kreuzreaktionsbande sowohl bei Seeelefanten als auch Kegelrobben erkennbar war, ist vermutlich das als Sekundärantikörper genutzte, an Alkalische Phosphatase (AP) konjugierte Protein A für die Kreuzreaktion verantwortlich. Bei Seehunden blieb diese Reaktion aus, was auf eine frühere Abstopfung der Farbreaktion auf Grund einer generell intensiveren Färbungsreaktion zurückzuführen ist, sodass die unerwünschte Kreuzreaktion nicht als Bande zutage treten konnte. Bei den Seeelefanten, die ein positives ELISA-Ergebnis hervorriefen und pures MSP im Immunoblot erkannten, wurden bei der Kotuntersuchung Lungenwurmlarven detektiert, was auf die Präsenz adulter Lungenwürmer schließen lässt. Alle übrigen Seeelefanten wiesen keine Lungenwurmlarven bei der Kotuntersuchung auf. In der Tat wurden bei Seeelefanten fast ausschließlich immature *O. circumlitus*, die sich meist im rechten Herzventrikel und nicht in der Lunge befanden, gefunden (GULLAND et al. 1997). Möglicherweise sind die physiologischen Bedingungen im Seeelefanten-Organismus für *O. circumlitus* nicht optimal - zumal es sich wahrscheinlich um eine relativ neue Parasit-Wirt-Verbindung handelt - sodass sich der Parasit nicht zu reproduktionsfähigen Adulten entwickeln kann (GULLAND et al. 1997). Folglich wurden keine Larven im Kot gefunden und im ELISA konnten keine anti-MSP-Antikörper detektiert werden. Eine andere Erklärung für das Vorherrschen von immaturren Stadien von *O. circumlitus* bei Seeelefanten ist, dass diese hoch empfänglich für den Parasiten sind, bzw. der

Parasit schlecht an diesen Wirt angepasst ist, sodass die Tiere versterben bevor der Lungenwurm Geschlechtsreife erreichen kann. Die hohe Mortalitätsrate von 89 % bei jungen Seeelefanten nach Lungenwurminfektion basierte auf einer disseminierten intravaskulären Koagulation (GULLAND et al. 1997). Unklar ist, ob diese Gerinnung durch Gefäßschädigungen durch die Larven selbst ausgelöst wird oder ob sie auf toxischen Produkten im Zuge bakterieller Sekundärinfektionen beruht (GULLAND et al. 1996). Unabhängig von den zugrundeliegenden Ursachen kann der Seehund- und Kegelrobben-Lungenwurm-ELISA nicht für die Anwendung bei Seeelefanten empfohlen werden.

Seroprävalenzen bei freilebenden Seehunden

Der ELISA wurde nach der Evaluierung zur Bestimmung der Lungenwurm-Seroprävalenz bei aus der deutschen Nordsee und dem dänischen Kattegat stammenden Seehunden angewendet. Erstmals konnten so Seroprävalenzen bei lebenden Seehunden mehrerer Altersgruppen (AG) bestimmt werden. Ausgehend von einer Larvenübertragung über Zwischenwirte war es unwahrscheinlich, dass säugende sogenannte „Heuler“ mit *O. circumlitus* und/oder *P. gymnorus* infiziert waren, da sie noch keinen Fisch oder andere potenzielle Zwischenwirte aufgenommen haben (DAILEY 1970; BERGERON et al. 1997a; LEHNERT et al. 2010). Diese Annahme wurde durch eine Seroprävalenz von 0,7 % in dieser Altersgruppe (AG 1) bestätigt. Das eine positive Individuum der AG 1 wurde Mitte Juli beprobt, also etwa sechs Wochen nachdem die Mehrheit der Seehunde geboren wird (BONNER 1972; SIEBERT et al. 2012). Nach dem Säugen und einer Fastenzeit von insgesamt zirka sechs Wochen (MUELBERT u. BOWEN 1993; ROSS et al. 1994) könnte das Lungenwurm-positive Individuum bereits gejagt haben und adulte Stadien des Parasiten ausgebildet haben, wenn man von einer sehr frühen Geburt während der Wurfperiode ausgeht (MEASURES 2001). Außerdem liegt der gemessene OD-Wert des seropositiven Seehundjungen mit 0.582 OD relativ nah am Cut-off-Wert von 0.422 OD und zudem weit entfernt vom arithmetischen OD-Mittel der Lungenwurm-positiven Tiere der AG 2 (1.264 OD) und AG 3 (1.019 OD). Das weist darauf hin, dass sich dieses Tier in der frühen Patenz befand und somit gerade erst begonnen hat, anti-MSP Antikörper zu bilden, was die oben genannten zeitlichen Aspekte unterstützt.

In der AG 2 bis 4 waren 32,5 % der freilebenden Seehunde des deutschen Wattenmeers und

dänischen Kattegats seropositiv für Lungenwurminfektionen. Es wurde keine Korrelation zwischen dem Geschlecht der Tiere und einer Lungenwurminfektion festgestellt. Die Mehrheit der seropositiven Tiere gehörte AG 2 (88.9 %) und AG 3 (53.6 %) an, welche das Alter von sieben Wochen bis 18 Monaten umfassen und somit die beschriebene Altersabhängigkeit von Lungenwurminfektionen bei Robben (ONDERKA 1989; CLAUSSEN et al. 1991; LEHNERT et al. 2007; SIEBERT et al. 2007) bestätigen. AG 3 repräsentiert den Übergang zwischen jungen, häufig infizierten Seehunden (AG 2) und ausgewachsenen Tieren (AG 4), die nur eine Seroprävalenz von 24,2 % aufwiesen. Im Gegensatz zu Seehunden scheinen in Schweinswalen Lungenwurminfektionen mit dem Alter zu akkumulieren und lebenslang aufzutreten (MEASURES 2001; LEHNERT et al. 2005). Der Grund dafür könnte sein, dass Schweinswale länger gesäugt werden und erst nach acht bis zehn Monaten keine Muttermilch mehr aufnehmen. Sie infizieren sich demzufolge erst später mit Lungenwurmlarven, wenn auch sie anfangen, Nahrung selbst zu erjagen (LOCKYER 2003). Die Übertragungswege von Lungenwürmern mariner Säugetiere sind jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Neben einer möglichen Infektion über die Nahrung wurde eine transplazentale Übertragung diskutiert (DAILEY et al. 1991) und auch eine transmammäre Übertragung kann nicht ausgeschlossen werden (CONLOGUE et al. 1985). Eine andere Begründung für die Akkumulation von Lungenwürmern in adulten Schweinswalen könnte eine fehlende Ausbildung einer protektiven Immunität bei dieser marinen Säugerspezies sein. Man kann davon ausgehen, dass Seehunde, die eine Infektion relativ früh überwunden haben, bedarfsgerecht tauchen und jagen können, während dies von Lungenwurm-infizierten Tieren nicht hinreichend geleistet werden kann. So können infizierte Tiere auf Grund respiratorischer Einschränkungen weniger an Gewicht und Länge zunehmen, da sie kürzer und insgesamt auch weniger tauchen und somit auch weniger Nahrung erjagen können (ONDERKA 1989; MEASURES 2001). Dies wurde in AG 4 deutlich, in der seropositive Seehunde statistisch signifikant reduzierte Körperlängen und Körpergewichte im Vergleich mit den seronegativen Tieren derselben AG aufwiesen. Auch Lungenwurm-infizierte Seehunde der AG 3 zeigten einen Trend zu reduziertem Körpergewicht ($P=0,051$), wohingegen die Körperlänge unbeeinflusst war. Ähnlich wurde bei Ringelrobben eine negative Korrelation zwischen der Infektion mit *O. circumlitus* und der Dicke der Fettschicht beschrieben (BERGERON et al. 1997b).

Immunität

Da adulte Seehunde weniger häufig als junge infiziert sind, wurde die Entwicklung einer protektiven Immunität angenommen (CLAUSSEN et al. 1991; BERGERON et al. 1997b). Bei Rindern hält diese protektive Immunität gegen den bovinen Lungenwurm *D. viviparus* sechs bis zwölf Monate an (JARRETT et al. 1958, 1959; MICHEL et al. 1965; ENIGK u. HILDEBRANDT 1969; MCKEAND et al. 1995). Ob seropositive Ergebnisse innerhalb der AG 4 aus Reinfektionen nach einem Verlust der Immunität oder aus noch bestehenden Antikörpern gegen eine Infektion im früheren Alter resultieren, bleibt unklar. Um erste Informationen über die Persistenz von anti-Lungenwurm-Antikörpern bei Seehunden zu gewinnen, wurden sechs in Rehabilitation befindliche Individuen sequentiell serologisch überprüft. Diese Tiere wurden nach der Ankunft im Rehabilitationszentrum mit Anthelminthika behandelt, was jedoch keinen Einfluss auf die Antikörperpersistenz haben muss. So wurde bei Rindern gezeigt, dass die Behandlung mit Anthelminthika bei fortgeschrittener Patenz keinen Einfluss auf den Antikörperverlauf hatte (FIEDOR et al. 2009). Alle sechs Seehunde hatten bei Ankunft im Rehabilitationszentrum positive OD-Werte. Die längste Seropositivität zeigte ein Individuum, das noch 132 Tage nach der Ankunft positive Werte aufwies. Ein anderer Seehund wurde zwischen Tag 100 (vierte Blutabnahme) und Tag 109 (fünfte Blutabnahme) seronegativ und ein weiteres Tier war noch seropositiv, als es an Tag 92 entlassen wurde. Die andere Hälfte der beprobten Tiere zeigte jedoch eine kürzere Periode der Antikörperpersistenz: Zwei Tiere wurden zwischen Tag 13 (zweite Blutabnahme) und Tag 81 (dritte Blutabnahme) seronegativ, ein Tier war schon bei der zweiten Blutabnahme an Tag 13 seronegativ. Da dieser Seehund bereits bei der Ankunft sehr niedrige positive OD-Werte hatte, kann angenommen werden, dass sich dieses Individuum bereits in der Postpatenz befand. Da allerdings weder der Infektionszeitpunkt noch die Dauer der Patenz bekannt sind (MEASURES 2001), kann nur vermutet werden, dass sich die Seehunde mit länger anhaltenden Antikörpertitern später infiziert haben als die, deren OD-Werte früher sanken. Studien über die Persistenz von Serum-Antikörpern bei Rindern zeigten positive OD-Werte bis Tag 41-203 *p.i.* bei einer mittleren Detektionsperiode bis Tag 126-143 *p.i.* (CORNELISSEN et al. 1997; FIEDOR et al. 2009). Die Dauer der Antikörperpersistenz könnte nach der vorliegenden Arbeit bei Seehunden ähnlich sein, jedoch sind weitere Studien mit größerer Tierzahl oder experimentell infizierten Tieren notwendig, um diese Vermutung

zu bestätigen.

Phylogenetische Analysen am Major Sperm Protein

Lungenwürmer besitzen wie alle Nematoden das Spermienprotein MSP, welches die Spermienmotilität ermöglicht (MILLER et al. 2001; SMITH 2014). Die molekulare Struktur dieses Proteins wurde bereits für einige Nematoden von terrestrischen Wirtsspezies einschließlich des bovinen Lungenwurms *D. viviparus* (STRUBE et al. 2009), dessen MSP als diagnostisches Antigen im Rinder- als auch im Robben-ELISA dient, beschrieben. Bislang fehlen jedoch Informationen über die molekulare Struktur des MSP von Nematoden, die Seehunde und Schweinswale befallen. Daher wurden die MSP-Sequenzen verschiedener Nematoden genannter mariner Säugetiere identifiziert und sequenziert. Die phylogenetischen Analysen auf Nuklein- und Aminosäureebene zeigten, dass MSP-Sequenzen der zu den Trichostrongyliden zählenden Dictyocaulidae näher mit dem MSP der zu den Metastrongyliden gehörenden Lungenwürmern mariner Säugetiere verwandt sind als mit intestinalen Trichostrongyliden terrestrischer Säugetiere. Letztgenannte formten ein separates Cluster mit Repräsentanten der Strongyliden und Ancylostomatiden. Das könnte zu der Annahme führen, dass Lungenwürmer der Gattung *Dictyocaulus* eher zu der Superfamilie Metastrongyloidea als zu den Trichostrongyloidea gehören. Phylogenetische Analysen mitochondrial kodierter Proteine zeigten hingegen, dass die Dictyocaulidae zwar ein eigenes Cluster bilden, aber einen höheren Verwandtschaftsgrad zu dem Trichostrongyliden *Haemonchus contortus*, dem Strongyliden *Oesophagostomum dentatum* und dem Ancylostomatiden *Ancylostoma caninum* aufwiesen als zu den terrestrischen metastrongyliden Lungenwürmern des Genus *Metastrongylus* und *Angiostrongylus* (GASSER et al. 2012). Da die vorliegende Arbeit nur auf einem einzigen Gen basiert, sind weitere Analysen notwendig, um die aktuelle taxonomische Zuordnung der Dictyocaulidae zur Superfamilie der Trichostrongyloidea zu verifizieren oder zu widerlegen.

Fazit

Der in der vorliegenden Arbeit evaluierte ELISA, der rekombinantes MSP des bovinen Lungenwurms *D. viviparus* als Antigen nutzt, ermöglicht eine hoch sensitive und spezifische Detektion von Serum-Antikörpern gegen Lungenwürmer der Seehunde und Kegelrobber. Für den Lungenwurmnachweis bei Seeelefanten kann der Test jedoch auf Grund des veränderten

Krankheitsgeschehens nicht empfohlen werden. Mittels des ELISA können nun Lungenwurminfektionen bei lebenden Seehunden nachgewiesen werden, was Untersuchungen zur epidemiologischen und immunologischen Dynamik der Infektion zulässt, da mit diesem Test die Möglichkeit einer breiteren Erfassung der Prävalenz besteht, ohne Einflüsse wie Alter oder Krankheit bei von Seehundjägern übersandten Robben in Kauf nehmen zu müssen.

Die vorliegende Arbeit ermittelte erstmalig die Lungenwurmprävalenz bei lebenden Seehunden aus freier Wildbahn, wobei 32,5 % der über sieben Wochen alten Seehunde seropositiv waren. Dabei zeigte sich eine deutliche Altersabhängigkeit mit den meisten positiven Ergebnissen bei Tieren im Alter zwischen sieben Wochen und 18 Monaten. Analysen der Persistenz von anti-Lungenwurm-Antikörpern bei Seehunden zeigten, dass eine Immunitätsbildung wahrscheinlich ist und dass das Muster der Antikörperpersistenz ähnlich wie bei Rindern verlaufen könnte. Insgesamt kann gesagt werden, dass der ELISA eine wertvolle Methode zur Erfassung von Lungenwurminfektionen bei freilebenden Seehund- und Kegelrobberpopulationen darstellt und wichtige Daten zur Gesundheitsüberwachung, Verbesserung des Managements und der Arterhaltung dieser Tiere liefern kann.

Molekularbiologische MSP-Analysen bestätigten erneut den konservierten Charakter dieses Proteins und konnten die genetischen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen parasitischen Nematoden mariner und terrestrischer Säugetiere näher beleuchten. Darüber hinaus weist diese Ähnlichkeit der MSP-Proteine und der erfolgreiche Einsatz des Rinderlungenwurm-MSP zur Detektion von Antikörpern gegen Robbenlungenwürmer auf das Potenzial einer zukünftigen ELISA-Entwicklung für die Lungenwurmdiagnostik bei Schweinswalen hin.

4 Zusammenfassung

Sophia Arlena Ulrich (2016)

Lungenwurminfektionen bei Robben und serologische Nachweismöglichkeiten

Die Robbenarten Seehund und Kegelrobbe sind neben Schweinswalen die einzigen heimischen Meeressäuger in deutschen Gewässern. Ein regelmäßiger Befund bei Obduktionen von Seehunden sind die Lungenwürmer *Otostrongylus circumlitus* und *Parafilaroides gymnurus*, die eine Obstruktion der Bronchien nach sich ziehen können. In Verbindung mit bakteriellen Sekundärinfektionen können sie zu schwerwiegenden Bronchopneumonien bis hin zum Tod der Tiere führen. Die Diagnose wurde bislang überwiegend beim toten Tier gestellt, da Larvenauswanderverfahren eine begrenzte Sensitivität aufweisen und zudem bei Seehunden in der Wildbahn nicht mit vertretbarem Aufwand durchführbar sind. Deshalb war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, eine serologische Nachweismöglichkeit von Lungenwürmern bei Seehunden und Kegelrobben zu etablieren. Hierfür wurde ein bestehender *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) für die Lungenwurmdetektion bei Rindern an Seehunde und Kegelrobben angepasst. Als Antigen wurde rekombinant exprimiertes *Major Sperm Protein* (MSP) von *Dictyocaulus viviparus*, dem Lungenwurm des Rindes, eingesetzt. MSP ist ein Spermienprotein, welches nur in adulten Nematoden exprimiert wird und demzufolge nur während der Patenz gebildete Antikörper nachweisen kann. Für die Evaluierung des ELISAs wurden Lungenwurm-positive und -negative Seren von Seehunden und Kegelrobben mittels *horseradish peroxidase* (HRP)-konjugiertem Protein A als Sekundärantikörper analysiert und über eine *receiver operating characteristic* (ROC)-Analyse ein Cut-off von 0,422 optischer Dichte (OD) bestimmt. Der Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen den OD-Werten von Seren Lungenwurm-positiver und -negativer Tiere ($P < 0,0001$). Mit einer Sensitivität von 97,83 % und einer Spezifität von 100 % stellt der Assay eine wertvolle Methode zur Lungenwurmdetektion bei Seehunden und Kegelrobben dar.

Lungenwurminfektionen bei Robben sind nicht nur in Nordeuropa verbreitet, sondern sind auch bei kalifornischen Seeelefanten eine häufige Todesursache. Deshalb wurde die Übertragbarkeit des Assays auf diese Tiere getestet. Es wurden nur solche Seeelefanten als

Lungenwurm-positiv im ELISA erkannt, bei denen mittels Auswanderverfahren Lungenwurmlarven nachgewiesen werden konnten. Kalifornische Seeelefanten sterben aber oft schon bevor die Parasiten Geschlechtsreife erlangen, sodass der ELISA nicht für diese Robbenspezies zu empfehlen ist, da dieser nur patente Infektionen detektiert.

Der ELISA wurde zur Bestimmung der Lungenwurmprävalenz bei freilebenden Seehunden (n=313) der deutschen Nordsee und des dänischen Kattegats, die in verschiedene Altersgruppen (AG) eingeteilt wurden, angewandt. Die Ergebnisse zeigten eine Gesamtprävalenz von 17,9 %. Die Seroprävalenz bei bis zu sechs Wochen alten Seehunden (AG 1) betrug 0,7 %, bei einem Alter bis zu sechs Monaten (AG 2) 88,9 %, bis zu 18 Monaten (AG 3) 53,6 % und bei adulten Tieren (AG 4) 24,5 %, was die Altersabhängigkeit der Infektion bestätigt. In AG 4 zeigten seropositive Tiere eine statistisch signifikante Reduktion des Körpergewichts ($P=0,003$) und der Körperlänge ($P<0,001$). Seren von Lungenwurm-infizierten Seehunden (n=6) in Rehabilitation wurden mittels ELISA analysiert, um erste Informationen über die Persistenz von anti-Lungenwurm-Antikörpern zu erhalten. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die Dauer der Antikörperpersistenz ähnlich der von Lungenwurm-infizierten Rindern zu sein scheint. Allerdings sind weitere Studien nötig, um diese Annahme zu verifizieren. MSP von neun Nematodenspezies, die bei Seehunden und Schweinswalen parasitieren, wurde aufgrund bislang fehlender Informationen molekularbiologisch charakterisiert. Die Ergebnisse bestätigen den hochkonservierten Charakter dieses nur bei Nematoden vorkommenden Spermienproteins. Phylogenetische Analysen mit MSP-Sequenzen von neun marinen und neun terrestrischen parasitischen Nematoden zeigten, dass MSP des Genus *Dictyocaulus* (Trichostrongyloidea) näher mit den Metastrongyloidea der marinen Säugetiere als mit den Trichostrongyloidea der terrestrischen Säugetiere verwandt ist. Weitere Studien mit einer größeren Anzahl an Genen sind notwendig, um dieses Ergebnis zu be- oder entkräften.

Der entwickelte ELISA ist eine gut geeignete Methode, um freilebende Seehunde auf Lungenwurmbefall zu untersuchen und die daraus resultierenden Daten sind für das Management und die Gesundheitsüberwachung der Seehundpopulation von großem Wert.

5 Summary

Sophia Arlena Ulrich (2016)

Lungworm infections in seals and their serological detection

The seal species harbour and grey seal are the only native marine mammals in German waters besides harbour porpoises. The lungworm species *Otostrongylus circumlitus* and *Parafilaroides gymnurus* are frequently found during necropsies of harbour seals and may cause obstruction of the bronchi. In connection with secondary bacterial infections, they can lead to severe bronchopneumonia and death of the animals. To date, diagnosis of the infection was mostly determined *post mortem* as the sensitivity of faecal larvae detection is limited and the method not logistically feasible for free-living seals. Therefore, the aim of the study was to establish a serological detection method for immunodiagnosis of lungworms in harbour and grey seals. Thus, an existing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for lungworm detection in cattle was adapted to harbour and grey seals. Major sperm protein (MSP), isolated from the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*, was used as recombinant antigen. MSP is a sperm protein that only occurs in adult nematodes and therefore is detected only in the patent phase of infection. For ELISA evaluation, lungworm-positive and -negative sera of harbour and grey seals were analysed using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated Protein A as secondary antibody. A cut-off of 0.422 optical density (OD) was calculated by receiver operating characteristic (ROC) analysis. The test showed significant OD differences between lungworm-negative and -positive sera ($P < 0.0001$). The resulting sensitivity of 97.83% and specificity of 100% showed that the ELISA is a valuable tool for lungworm detection in harbour and grey seals.

Lungworm infections in seals are present outside of Northern Europe. They often cause death in northern elephant seals, native in California, USA, wherefore the transferability of the ELISA to northern elephant seals was tested. The ELISA detected only those specimens with positive faecal larvae results as lungworm-positive. However, as Northern elephant seals often die before the parasites reach adulthood, but the ELISA mostly detects patent infections, so the test cannot be recommended for use on northern elephant seals.

The ELISA was applied for the analysis of lungworm prevalence in free-living harbour seals including four different age groups (n=313) from the German North Sea and the Danish Kattegat. The results showed an overall lungworm seroprevalence of 17.9%. Animals up to six weeks old (age group [AG] 1) showed a seroprevalence of 0.7%, those up to six months (AG 2) of 88.9%, up to 18 months (AG 3) of 53.6% and adult animals (AG 4) of 24.5%, confirming an age-related infection. In AG 4, seropositive animals showed statistically significant reductions in body weight ($P=0.003$) and length ($P<0.001$). Sera from lungworm infected harbour seals (n=6) in rehabilitation were analysed with the ELISA, showing antibody-positive results in all samples at the arrival examination. Results revealed that duration of antibody persistence may be similar to that of lungworm infected cattle, but further studies are needed for confirmation.

MSP of nine nematode species infecting harbour seals and harbour porpoises was characterised molecularly, as information about their molecular structure was missing. Phylogenetic analyses of MSP sequences of nine marine and nine terrestrial mammal parasitic nematodes showed that lungworm MSP of the genus *Dictyocaulus* (Trichostrongyloidea) is more closely related to the Metastrongyloidea of marine mammals than to the Trichostrongyloidea of terrestrial hosts. As the analyses were conducted on one gene only, further studies are needed to verify or falsify this result.

The ELISA presented in this study is a suitable technique to screen free-living species for lungworm antibodies and the resulting data is valuable for the management and health surveillance of the harbour seal population.

6 Literaturverzeichnis

ABT, K.F. (2002):

Phänologie und Populationsdynamik des Seehundes (*Phoca vitulina*) im Wattenmeer:
Grundlagen zur Messung von Statusparametern
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Diss.

ANDERSON, R. (1984):

The origins of zooparasitic nematodes
Canad J Zool 62, 317-328

ARNEBERG, P., A. SKORPING, B. GRENFELL u. A.F. READ (1998):

Host densities as determinants of abundance in parasite communities
Proc Biol Sci. 265, 1283-1289

ARNOLD, P.W. u. D. GASKIN (1975):

Lungworms (Metastrongyloidea: Pseudaliidae) of harbor porpoise *Phocoena phocoena*
(LINNÉ 1758)
Canad J Zool 53, 713-735

BAERMANN, G. (1917):

Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in
Erdproben
Geneeskunding Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië 57, 131-137

BENKE, H., U. SIEBERT, R. LICK u. B. BANDOMIR (1998):

The current status of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in German waters
Arch Fish Mar Res 46, 97-123

BENNETT, K.A., J.R. SPEAKMAN, S.E. MOSS, P. POMEROY u. M.A. FEDAK (2007):

Effects of mass and body composition on fasting fuel utilisation in grey seal pups
(*Halichoerus grypus fabricius*): An experimental study using supplementary feeding
J Exp Biol 210, 3043-3053

BERGERON, E., J. HUOT u. L.N. MEASURES (1997a):

Experimental transmission of *Otostrongylus circumlitus* (RAILLIET 1899)
(Metastrongyloidea: Crenosomatidae), a lungworm of seals in eastern arctic Canada
Can J Zool 75, 1364-1371

BERGERON, E., L.N. MEASURES, J. HUOT (1997b):

Lungworm (*Otostrongylus circumlitus*) infections in ringed seals (*Phoca hispida*) from
eastern Arctic Canada
Can J Fish Aquat Sci 54, 2443-2448

BJÖRCK, L. u. G. KRONVALL (1984):

Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent
J Immunol 133, 969-974

BODEWES, R., T.M. BESTEBROER, E. VAN DER VRIES, J.H. VERHAGEN, S. HERFST, M.P. KOOPMANS, R.A. FOUCHIER, V.M. PFANKUCHE, P. WOHLSEIN u. U. SIEBERT (2015):

Avian Influenza A (H10N7) virus-associated mass deaths among harbor seals
Emerg Infect Dis 21, 720-722

BONNER, W.N. (1972):

The grey seal and common seal in European waters
Oceanogr Mar Biol Annu Rev 10, 461-507

BONNER, N. (1994):

Seals and Sea Lions of the World.
1. Aufl., Verlag Blandford, England

BORGSTEEDE, F.H.M., H.G.J. BUS, J.A.W. VERPLANKE u. W.P.J. VAN BURG (1991):

Endoparasitic helminths of the harbour seal, *Phoca vitulina*, in the Netherlands
Neth J Sea Res 28, 247-250

BRASSEUR, S.M.J.M., T.D. VAN POLANEN PETEL, T. GERRODETTE, E.H.W.G.

MEESTERS, P.J.H. REIJNDERS u. G. AARTS (2015):
Rapid recovery of Dutch gray seal colonies fueled by immigration
Mar Mam Sci 31, 405-426

BROUWER, A., P. REIJNDERS u. J. KOEMAN (1989):

Polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated fish induces vitamin A and thyroid hormone deficiency in the common seal (*Phoca vitulina*)
Aquat Toxicol 15, 99-105

CARRENO, R.A. u. S.A. NADLER (2003):

Phylogenetic analysis of the Metastrongyloidea (Nematoda: Strongylida) inferred from ribosomal RNA gene sequences
J Parasitol 89, 965-973

CHILTON, N.B., F. HUBY-CHILTON, R.B. GASSER u. I. BEVERIDGE (2006):

The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts
Mol Phylogenet Evol 40, 118-128

CLAUSSEN, D., V. STRAUSS, S. ISING, M. JÄGER, T. SCHNIEDER u. M. STOYE (1991):

The helminth fauna from the common seal (*Phoca vitulina vitulina*, LINNÉ, 1758) of the Wadden Sea in Lower Saxony
J Vet Med B 38, 649-656

- COLEGROVE, K.M., D.J. GREIG u. F.M. GULLAND (2005):
Causes of live strandings of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) and pacific harbor seals (*Phoca vitulina*) along the Central California Coast, 1992-2001
Aquat Mamm 31, 1-10
- COLTMAN, D.W., J.G. PILKINGTON, J.A. SMITH u. J.M. PEMBERTON (1999):
Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population
Evolution 53, 1259-1267
- CONLOGUE, G., J. OGDEN u. W. FOREYT (1985):
Parasites of the Dall's porpoise (*Phocoenoides dalli* True)
J Wildl Dis 21, 160-166
- CORNELISSEN, J., F. BORGSTEEDE u. F. VAN MILLIGEN (1997):
Evaluation of an ELISA for the routine diagnosis of *Dictyocaulus viviparus* infections in cattle
Vet Parasitol 70, 153-164
- DAILEY, M.D. (1970):
The transmission of *Parafilaroides decorus* (Nematoda: Metastrongyloidea) in the California sea lion (*Zalophus californianus*)
Proc Helminthol Soc Wash 37, 215-222
- DAILEY, M. (1975):
The distribution and intraspecific variation of helminth parasites in pinnipeds
Rapports et Proces-Verbaux des Reunion Conseil International pour l'Exploration de la Mer 169, 338-352
- DAILEY, M.D. u. W.G. GILMARTIN (1980):
Diagnostic key to the parasites of some marine mammals
Naval Ocean Systems Center, San Diego, California, Technical Document 295
- DAILEY, M. u. K. OTTO (1982):
Parasites as biological indicators of the distributions and diets of marine mammals common to the eastern Pacific
NOAA National Marine Fisheries Service, Southwest Fisheries Center, La Jolla, California, Admin Rep, LJ-82-13C
- DAILEY, M., M. WALSH, D. ODELL u. T. CAMPBELL (1991):
Evidence of prenatal infection in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) with the lungworm *Halocercus lagenorhynchi* (Nematoda: Pseudaliidae)
J Wildl Dis 27, 164-165

DE BRUYN, W. (1933):

Beiträge zur Kenntnis von *Strongylus circumlitus*, RAILLIET, aus den Lungen des Seehundes: die neue Gattung *Otostrongylus*
Zool Anz 103, 142-153

DE LEEUW, W. u. J. CORNELISSEN (1991):

Identification and isolation of a specific antigen with diagnostic potential from *Dictyocaulus viviparus*
Vet Parasitol 39, 137-147

DELYAMURE, S.L. (1955):

The helminth fauna of marine mammals in the light of their ecology and phylogeny
Akademiya Nauk SSSR, Moscow, S. 517 (Übersetzung: Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem, 1968, S. 522)

DOUGHERTY, E. u. C. HERMAN (1947):

New species of the genus *Parafilaroides* DOUGHERTY, 1946 (Nematoda: Metastrongylidae) from sea-lions, with a list of the lungworms of the Pinnipedia
Proc Helminthol Soc Wash 14, 77-87

ECKERT, J., K.T. FRIEDHOFF, H. ZAHNER u. P. DEPLAZES (2008):

Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin
2. Aufl. Verlag Enke, Stuttgart, S. 3

ELIASSON, M., A. OLSSON, E. PALMCRANTZ, K. WIBERG, M. INGANÄS, B. GUSS, M. LINDBERG u. M. UHLEN (1988):

Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G
J Biol Chem 263, 4323-4327

ELLIS, R.E. u. G.M. STANFIELD (2014):

The regulation of spermatogenesis and sperm function in nematodes
Sem Cell Dev Biol, 29, 17-30

ENIGK, K. u. J. HILDEBRANDT (1969):

Zur Empfänglichkeit der Wiederkäuer für *Dictyocaulus viviparus* und *Dictyocaulus filaria* (Strongyloidea, Nematoda)
Zentralbl Veterinarmed B 16, 67-76

FIEDOR, C., C. STRUBE, A. FORBES, S. BUSCHBAUM, A. M. KLEWER, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA u. T. SCHNIEDER (2009):

Evaluation of a milk ELISA for the serodiagnosis of *Dictyocaulus viviparus* in dairy cows
Vet Parasitol 166, 255-261

- GALATIUS, A., S. BRASSEUR, R. CZECK, B. DIEDERICHS, L.F. JENSEN, P. KÖRBER, U. SIEBERT, J. TEILMANN u. S. KLÖPPER (2014):
Aerial surveys of Harbour Seals in the Wadden Sea in 2014. Common Wadden Sea Secretariat, Wilhelmshaven
- GALATIUS, A., S. BRASSEUR, R. CZECK, L.F. JENSEN, A. JEß, P. KÖRBER, R. PUND, U. SIEBERT, J. TEILMANN u. S. KLÖPPER (2015): Aerial surveys of Harbour Seals in the Wadden Sea in 2015. Common Wadden Sea Secretariat, Wilhelmshaven
- GASSER, R.B., A. JABBAR, N. MOHANDAS, J. HÖGLUND, R.S. HALL, D.T. LITTLEWOOD u. A.R. JEX (2012):
Assessment of the genetic relationship between *Dictyocaulus* species from *Bos taurus* and *Cervus elaphus* using complete mitochondrial genomic datasets
Parasit Vectors 5, 241
- GERACI, J.R. u. D.J.S. AUBIN (1987):
Effects of parasites on marine mammals
Int J Parasitol 17, 407-414
- GILLES, A., H. ANDREASEN, S. MÜLLER u. U. SIEBERT (2008):
Nahrungsökologie von marinen Säugetieren und Seevögeln für das Management von NATURA 2000 Gebieten. Teil: Marine Säugetiere
Final report, submitted to the German Federal Agency for Nature Conservation (BfN). F+E Vorhaben FKZ 805 85 018, Büsum
- GULLAND, F., L. WERNER, S. O'NEILL, L. LOWENSTINE, J. TRUPKIEWITZ, D. SMITH, B. ROYAL u. I. STRUBEL (1996):
Baseline coagulation assay values for northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*), and disseminated intravascular coagulation in this species
J Wildl Dis 32, 536-540
- GULLAND, F.M.D., K. BECKMEN, K. BUREK, L. LOWENSTINE, L. WERNER, T. SPRAKER, M. DAILEY u. E. HARRIS (1997):
Nematode (*Otostrongylus circumlitus*) infestation of Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*) stranded along the central California coast
Mar Mam Sci 13, 446-459
- HÄRKÖNEN, T., S. BRASSEUR, J. TEILMANN, C. VINCENT, R. DIETZ, K. ABT u. P. REIJNDERS (2007):
Status of grey seals along mainland Europe from the Southwestern Baltic to France
NAMMCO Sci Publ 6, 57-68
- HALL, A. u. D. THOMPSON (2009):
Gray Seal: *Halichoerus grypus*
In: W.F. Perrin, B. Würsig u. J.G.M. Thewissen (Hrsg.): *Encyclopedia of Marine Mammals*. 2. Aufl., Verlag Academic Press, London, S. 500-503

HAMMOND, P., A. HALL u. J. PRIME (1994a):
The diet of grey seals around Orkney and other island and mainland sites in north-eastern Scotland
J Appl Ecol 31, 340-350

HAMMOND, P., A. HALL u. J. PRIME (1994b):
The diet of grey seals in the Inner and Outer Hebrides
J Appl Ecol 31, 737-746

HEIDE-JØRGENSEN, M.-P. u. T.J. HÄRKÖNEN (1988):
Rebuilding seal stocks in the Kattegat-Skagerrak
Mar Mam Sci 4, 231-246

HERR, H., M. SCHEIDAT, K. LEHNERT u. U. SIEBERT (2009):
Seals at sea: Modelling seal distribution in the German bight based on aerial survey data
Mar Biol 156, 811-820

HIRSH, D., D. OPPENHEIM u. M. KLASS (1976):
Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*
Dev Biol 49, 200-219

JARRETT, W., F. JENNINGS, W. MCINTYRE, W. MULLIGAN u. G. URQUHART (1958):
Irradiated helminth larvae in vaccination
Proc R Soc Med 51, 743

JARRETT, W., F. JENNINGS, W. MCINTYRE, W. MULLIGAN, B. A. THOMAS u. G. URQUHART (1959):
Dictyocaulus viviparus: Immunological studies on infection: The immunity resulting from experimental infection
Immunology 2, 252-261

KLASS, M., N. WOLF u. D. HIRSH (1976):
Development of the male reproductive system and sexual transformation in the nematode *Caenorhabditis elegans*
Dev Biol 52, 1-18

KLASS, M.R. u. D. HIRSH (1981):
Sperm isolation and biochemical analysis of the major sperm protein from *Caenorhabditis elegans*
Dev Biol 84, 299-312

LACY, R.C. (1997): Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. J Mammal 78, 320-335

- LEHNERT, K., J. RAGA u. U. SIEBERT (2005):
Macroparasites in stranded and bycaught harbour porpoises from German and Norwegian waters
Dis Aquat Organ 64, 265-269
- LEHNERT, K., J.A. RAGA u. U. SIEBERT (2007):
Parasites in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the German Wadden Sea between two Phocine Distemper Virus epidemics
Helgol Mar Res 61, 239-245
- LEHNERT, K., G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, D. SCHAUDIEN, C. BLEIDORN, P. WOHLSEIN u. U. SIEBERT (2010):
Transmission of lungworms of harbour porpoises and harbour seals: Molecular tools determine potential vertebrate intermediate hosts
Int J Parasitol 40, 845-853
- LIEBSCH, N., R. WILSON, D. ADELUNG (2006):
Utilisation of time and space by harbour seals (*Phoca vitulina vitulina*) determined by new remote-sensing methods
In: H. VON NORDHEIM, D. BOEDEKER, J.C. KRAUSE (Hrsg.): Progress in Marine Conservation in Europe-NATURA 2000 Sites in German Offshore Waters. 1. Aufl., Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 179-188
- LOCKYER, C. (2003):
Harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in the North Atlantic: Biological parameters
NAMMCO Sci Publ 5, 71-89
- LOEHLE, C. (1995):
Social barriers to pathogen transmission in wild animal populations
Ecology 76, 326-335
- MCKEAND, J., D. KNOX, J. DUNCAN u. M. KENNEDY (1995):
Protective immunisation of guinea pigs against *Dictyocaulus viviparus* using excretory/secretory products of adult parasites
Int J Parasitol 25, 95-104
- MEASURES, L.N. (2001):
Lungworms of Marine Mammals.
In: W.M. Samuel, M.J. Pybus u. A.A.Kocan (Hrsg.): Parasitic Diseases of Wild Mammals. 2. Aufl., Verlag Iowa State University Press, Ames, S. 279-300
- MICHEL, J.F., A. MACKENZIE, C.D. BRACEWELL, R.L. CORNWELL, J. ELIOT, C.N. HERBERT, H.H. HOLMAN u. I.J.B. SINCLAIR (1965):
Duration of the acquired resistance of calves to infections with *Dictyocaulus viviparus*
Res Vet Sci 6, 344-395

MILLER, M.A., V.Q. NGUYEN, M.-H. LEE, M. KOSINSKI, T. SCHEDL, R.M. CAPRIOLI u. D. GREENSTEIN (2001):

A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation
Science 291, 2144-2147

MOORE, S.L. u. K. WILSON (2002):

Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals
Science 297, 2015-2018

MUELBERT, M. u. W. BOWEN (1993):

Duration of lactation and postweaning changes in mass and body composition of harbour seal, *Phoca vitulina*, pups
Can J Zool 71, 1405-1414

NILSSON, B., T. MOKS, B. JANSSON, L. ABRAHMSEN, A. ELMBLAD, E. HOLMGREN, C. HENRICHSON, T.A. JONES u. M. UHLEN (1987):

A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A
Protein Eng 1, 107-113

NOBLE, E. u. G. NOBLE (1982):

Parasitology. The biology of animal parasites
6. Aufl., Verlag Lea & Febiger, Philadelphia, S. 496

ONDERKA, D. (1989):

Prevalence and pathology of nematode infections in the lungs of ringed seals (*Phoca hispida*) of the western arctic of Canada
J Wildl Dis 25, 218-224

OSINGA, N., M.M. SHAHI FERDOUS, D. MORICK, M. GARCÍA HARTMANN, J.A. ULLOA, L. VEDDER, H.A. UDO DE HAES, P.M. BRAKEFIELD, A.D.M.E.

OSTERHAUS u. T. KUIKEN (2012):

Patterns of Stranding and Mortality in Common Seals (*Phoca vitulina*) and Grey Seals (*Halichoerus grypus*) in The Netherlands between 1979 and 2008
J Comp Path 147, 550-565

PERRIN, W.F. u. J.E. POWERS (1980):

Role of a Nematode in Natural Mortality of Spotted Dolphins
J Wildl Manage 44, 960-963

QUEDENS, G. u. C. LEIPERSBERGER-NIELSEN (1988):

Amrum 1988 - Jahreschronik einer Insel
Verlag Jens Quedens, Amrum

RAGA, J.A., J.A. BALBUENA, J. AZNAR u. M. FERNÁNDEZ (1997):

The impact of parasites on marine mammals: A review
Parassitologia 39, 293-296

RAILLIET, M. (1899):

Sur quelques parasites rencontrés à l'autopsie d'un phoque (*Phoca vitulina* L.)

C R Seances Soc Biol Fil 51, 128-130

REIJNDERS, P. (1983):

The effect of seal hunting in Germany on the further existence of a harbour seal population in the Dutch Wadden Sea

Z. Saugetierkd. 48, 50-54

REIJNDERS, P.J., K. ABT, S. BRASSEUR, K. CAMPHUYSEN, B. REINEKING, M.

SCHEIDAT, U. SIEBERT, M. STEDE, J. TOUGAARD u. S. TOUGAARD (2005):

Marine mammals.

In: K. Essink, C. Dettmann, H. Farke, K. Laursen, G. Lüerßen, H. Marencic und W.

Wiersinga (Hrsg.): Wadden Sea quality status report 2004. Wadden Sea Ecosystem No. 19.

Trilateral Monitoring and Assessment Group, Common Wadden Sea Secretariat,

Wilhelmshaven, S. 305-318

REIJNDERS, P.J., J. VAN DIJK u. D. KUIPER (1995):

Recolonization of the Dutch Wadden Sea by the grey seal *Halichoerus grypus*

Biol Conserv 71, 231-235

RIJKS, J.M., J. I. HOFFMAN, T. KUIKEN, A.D. OSTERHAUS u. W. AMOS (2008):

Heterozygosity and lungworm burdens in harbour seals (*Phoca vitulina*)

Heredity (Edinb) 100, 587-593

ROSS, P.S., R.L. DE SWART, I.K. VISSER, L.J. VEDDER, W. MURK, W.D. BOWEN u.

A.D.M.E. OSTERHAUS (1994):

Relative immunocompetence of the newborn harbour seal, *Phoca vitulina*

Vet Immunol Immunopathol 42, 331-348

SANTOS, M. u. G. PIERCE (2003):

The diet of harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) in the northeast Atlantic

Oceanogr Mar Biol 41, 355-390

SCHEIBEL, W. u. H. WEIDEL (1988):

Zum Vorkommen von Kegelrobben (*Halichoerus grypus* FABRICIUS, 1791, Phocidae,

Pinnipedia) in Schleswig-Holstein

Zool Anz, 220, 65-70

SCHNIEDER, T. (1992):

Use of a recombinant *Dictyocaulus viviparus* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of bovine dictyocaulosis

Parasitol Res 78, 298-302

- SCHUNN, A.M., FORBES, A., SCHNIEDER, T., u. C. STRUBE (2012):
Validation of a *Dictyocaulus viviparus* MSP-ELISA and cut-off adjustment in a one-year longitudinal field study in dairy cattle herds
Vet. Parasitol. 189, 291–298
- SIEBERT, U., A. GILLES, K. LUCKE, M. LUDWIG, H. BENKE, K.-H. KOCK u. M. SCHEIDAT (2006):
A decade of harbour porpoise occurrence in German waters - Analyses of aerial surveys, incidental sightings and strandings
J Sea Res 56, 65-80
- SIEBERT, U., P. WOHLSEIN, K. LEHNERT u. W. BAUMGÄRTNER (2007):
Pathological findings in harbour seals (*Phoca vitulina*): 1996-2005
J Comp Pathol 137, 47-58
- SIEBERT, U., S. MÜLLER, A. GILLES, J. SUNDERMEYER u. I. NARBERHAUS (2012):
Species Profiles Marine Mammals
In: I. NARBERHAUS, J. KRAUSE und U. BERNITT, (Hrsg.): Threatened Biodiversity in the German North and Baltic Seas - Sensitivities towards Human Activities and the Effects of Climate Change. Naturschutz und Biologische Vielfalt, Heft 116, Bonn, S. 487-542
- SIEVERS, U. (1989):
Stomach content analysis in the harbour seal (*Phoca vitulina*) from the Schleswig-Holstein Waddensea
Zool Anz 222, 249-60
- SJÖQUIST, J., B. MELOUN u. H. HJELM (1972):
Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin
Eur J Biochem 29, 572-578
- SMITH, H.E. (2014):
Nematode sperm motility
In: EISERMANN, D.M., Wnt signaling (Hrsg.): WormBook. The *C. elegans* Research Community
- STROUD, R.K. u. M.D. DAILEY (1978):
Parasites and associated pathology observed in pinnipeds stranded along the Oregon coast
J Wildl Dis 14, 292-298
- STRUBE, C., S. BUSCHBAUM u. T. SCHNIEDER (2009):
Molecular characterization and real-time PCR transcriptional analysis of *Dictyocaulus viviparus* major sperm proteins
Parasitol Res 104, 543-551
- TENTER, A., A. BELLMER u. T. SCHNIEDER (1993):
Evaluation of an ELISA for *Dictyocaulus viviparus*-specific antibodies in cattle
Vet Parasitol 47, 301-314

VAN DEN BROEK, E. u. P. WENSVOORT (1959):

On parasites of seals from the Dutch coastal waters and their pathogenity
Säugetierkd. Mitt. 7, 58-61

VON HOLTUM, C., C. STRUBE, T. SCHNIEDER u. G. VON SAMSON-
HIMMELSTJERNA (2008):

Development and evaluation of a recombinant antigen-based ELISA for serodiagnosis of
cattle lungworm
Vet Parasitol 151, 218-226

WARD, S. (1987):

Expression of sperm-specific genes during nematode spermatogenesis
Ann N Y Acad Sci 513, 128-133

WARD, S., D.J. BURKE, J.E. SULSTON, A.R. COULSON, D.G. ALBERTSON, D.
AMMONS, M. KLASS u. E. HOGAN (1988):

Genomic organization of major sperm protein genes and pseudogenes in the nematode
Caenorhabditis elegans
J Mol Biol 1, 1-13

WARD, S. u. J.S. CARREL (1979):

Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*
Dev Biol 73, 304-321

ZOHARI, S., A. NEIMANIS, T. HÄRKÖNEN, C. MORAEUS u. J.-F. VALARCHER
(2014):

Avian influenza A (H10N7) virus involvement in mass mortality of harbour seals (*Phoca
vitulina*) in Sweden, March through October 2014
Euro Surveill 19, 1-6

7 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AG	Altersgruppe
AP	Alkalische Phosphatase
ASCOBANS	<i>Agreement on the Conservation of Small Cetaceans in the Baltic, North East Atlantic, Irish and North Seas</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter, immunsorbierender Assay)
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
ITAW	Institut für Terrestrische und Aquatische Wildtierforschung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
L1	1. Larvenstadium
MSP	<i>Major sperm protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)

Danksagung

Frau Prof. Strube, PhD möchte ich für den Entwurf des Themas der Dissertation und die stetige, immer motivierende Betreuung danken. Ich danke ihr für die zahlreichen Beratungsgespräche, in denen sie mir mit viel Geduld und Fachkompetenz stets neue Ideen und Hilfestellungen gab. Ich danke ihr für die sorgfältigen und verlässlichen Korrekturen, wodurch die Dissertation in einem angemessenen Zeitraum fertiggestellt werden konnte. Ich danke ihr für ihre mentale Unterstützung und dafür, dass sie mich an Ihrem überragenden Wissen über Parasitologie teilhaben ließ. Danke, dass die Institutstüren stets offen für mich standen!

Frau Prof. Prof. h. c. Siebert danke ich ebenfalls für die Gestaltung des Themas und der Betreuung meiner Dissertation. Ich danke ihr für die professionelle und kompetente Einführung in das breite Gebiet der Wildtierforschung und die freundliche und motivierende Arbeitsatmosphäre unter der ich in ihrem Institut arbeiten durfte. Sie ermöglichte mir, auf internationalen Konferenzen meinen Horizont zu erweitern und unterstützte meinen 5-wöchigen USA-Forschungsaufenthalt, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

Dr. Kristina Lehnert möchte ich für ihr stets offenes Ohr, die fachliche Beratung und das Teilen ihres großen Wissens über marine Parasiten danken. Danke für die Geduld und das wiederholte Durchlesen verschiedener Komponenten der Dissertation.

Ich danke all den Institutionen, ohne die eine Probenbeschaffung unmöglich gewesen wäre, u.a. The Marine Mammal Center, Kalifornien und dem Seal Rehabilitation Centre Pieterburen, Niederlande. Vor allem möchte ich den Menschen danken, die bei Crowdfunding Geld für mein Forschungsprojekt in den USA gespendet haben und so einen Beitrag für eine Verbesserung der Gesundheitsüberwachung von freilebenden Robben geleistet haben.

Dem gesamten Team des ITAW bin ich dankbar für die erlebnisreiche Zeit in Büsum, für den Mut, den sie mir gemacht haben, die stetige emotionale Unterstützung- sei es in der Sektionshalle, abends am Deich oder morgens mit Kaffee und Aspirin... ihr seid ein Traum und unsere Zeit trage ich in meinem Herzen!

Natürlich danke ich auch dem herzensguten Team der Parasitologie- wie oft wurde gelacht, geweint, sich beklagt und wieder gelacht! Danke für die fachliche und emotionale Unterstützung! Besonders Sandra danke ich für ihre Geduld und ihren Humor, die sie an meiner Seite zu Tage legte, wenn es mal wieder hieß: "Uuuuups!!"

Meiner Familie, vor allem meinen Eltern danke ich zutiefst. Sie haben mich mit allen Mitteln unterstützt und ohne sie wäre ich nun nicht an diesem Punkt. Ein großer Dank für ihr Vertrauen in mich und für die vielen aufbauenden Worte, die mentale und auch finanzielle Unterstützung. Danke für die Sprüche: „Es geht immer alles irgendwie!“ und: „Verteile nicht das Fell des Bären, bevor du ihn erlegt hast!“

Katharina danke ich für ihre Freundschaft. Seit über die Hälfte meines Lebens ist sie mein Fels in der Brandung, was sehr wichtig war in der Doktorarbeitszeit. Mareile danke ich für die Begleitung mit ihrer erfrischenden, anders-denkenden Art, die mich oft daran erinnert hat, dass es auch noch andere Dinge gibt im Leben.

Meinem geliebten Wolf möchte ich danken, da er mich durch gute und schlechte Phasen begleitet hat und mir das Gefühl von Ruhe und Angenommen-sein vermittelt hat, wenn ich es am meisten gebraucht habe.

Zu guter Letzt danke ich dem Übungsweg des Yoga und allen LehrerInnen, die mir geholfen haben, in Yoga die Lebensstabilität zu finden, die ich gesucht habe. Vor allem danke ich Anika und Heike.