

---

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Kurt Pfister

---

Arbeit unter der Leitung von Dr. J. Hirzmann

# **Untersuchungen zur Epidemiologie der Caninen Babesiose im Bundesstaat Minas Gerais, Brasilien**

INAUGURALE-DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doktors der Veterinärmedizin

der Ludwig-Maximilian-Universität München

(Dr. med. vet.)

vorgelegt der tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilian-Universität in München

von Karin Rembeck

geboren in Burghausen

München 2005

---

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilian-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

**Referent:** Univ.-Prof. Dr. K. Pfister

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. J. Peters

**Tag der Promotion: 10. Februar 2006**

I	Einleitung und Problemstellung	1
II	Literaturübersicht	3
1	Biologie und Taxonomie der Piroplasmen	3
1.1	Allgemeines zu den Piroplasmen	3
1.2	Taxonomische Stellung der Gattungen <i>Babesia</i> , <i>Theileria</i> und <i>Hepatozoon</i>	4
1.3	Entwicklungszyklus	5
2	Babesien und Theilerien beim Hund	7
2.1	„Grosse“ Babesien	7
2.1.1	<i>Babesia canis canis</i>	8
2.1.2	<i>Babesia canis vogeli</i>	9
2.1.3	<i>Babesia canis rossi</i>	9
2.1.4	<i>Babesia</i> sp. Coco ( <i>Birkenheuer et al. 2004</i> )	10
2.2	„Kleine“ Babesien	10
2.2.1	<i>Babesia gibsoni</i>	11
2.2.2	„ <i>Theileria annae</i> “ (Syn. <i>Babesia annae</i> )	12
2.3	Theilerien beim Hund	13
3	Therapie der Babesiose des Hundes	14
4	Prophylaxe gegen Babesiose beim Hund	14
4.1	Zeckenprophylaxe	14
4.2	Babesienvakzine	15
5	Vorkommen von Zecken in Minas Gerais, mit Vektorpotential für die Hundebabesiose	15
5.1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	15
5.2	<i>Amblyomma cajennense</i>	16
5.3	Andere <i>Amblyomma</i> -Arten	17
5.4	<i>Boophilus microplus</i>	17
5.5	<i>Anocentor nitens</i>	18

6	Babesiose bei Hunden in Brasilien	19
III	Material und Methoden	21
1	Untersuchungsgebiet	21
2	Biologisches Material	23
2.1	Probenumfang	23
2.2	Probenmaterial	25
3	Verwendete Materialien	26
3.1	Kits, Oligonukleotide, Reagenzien	26
3.2	Enzym	27
3.3	Lösungen und Puffer	28
3.3.1	<i>Lösungen und Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese</i>	28
3.3.2	<i>Lösungen und Puffer für den Indirekten Immunfluoreszenz antikörpertest</i>	28
4	Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest	29
5	DNA-Extraktion	30
6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
6.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion	31
6.2	Real-Time PCR	32
7	Agarosegel-Elektrophorese	34
8	Nachweis von <i>Babesia</i> spp. beim Hund	35
8.1	Real-Time PCR zur Detektion von Piroplasmen	35
8.2	Real-time PCR zur Detektion von <i>B. canis vogeli</i>	36
8.3	PCR zur Detektion von <i>Babesia</i> spp. (nach Birkenheuer et al., 2003)	38
9	Statistik	39
IV	Ergebnisse	43
1.	Prävalenz von <i>Babesia canis vogeli</i>	43
1.1	Seroprävalenz	43
1.2	Prävalenz von <i>B. canis vogeli</i> im direkten Nachweis	44

1.2.1	<i>Prävalenz mittels PCR</i>	44
1.2.2	<i>Prävalenz im Blutaussstrich</i>	46
2	Statistische Datenanalyse zur Prävalenz von <i>B. canis vogeli</i>	46
2.1	Seroprävalenz und Alter	46
2.2	PCR-Prävalenz und Alter	47
2.3	Prävalenz und Geschlecht der Hunde	48
2.4	Prävalenz und Hämatokritwert	49
2.5	Prävalenz und Trocken- bzw. Regenzeit	51
2.6	Prävalenz und Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde	52
2.6.1	<i>Ergebnisse für die Gesamtzahl der Hunde</i>	52
2.6.2	<i>Auswertung getrennt für Carrancas, Carlos Chagas und Igarapé</i>	53
2.6.2.1	Beziehung zwischen PCR-Prävalenz und Lebensraum	53
2.6.2.2	Beziehung der Seroprävalenz und Lebensraum	55
3	Untersuchungen zur Prävalenz anderer <i>Babesia</i> spp. mittels PCR	56
V	Diskussion	59
1	Prävalenz von <i>Babesia canis vogeli</i>	59
2	Vergleich zwischen konventioneller und Real-Time PCR	65
3	Koinfektionen	66
4	Ausblick	67
VI	Zusammenfassung	69
VII	Summary	71
VIII	Literaturverzeichnis	73
IX	Abkürzungen	81
X	Anhang	83
Anhang 1.	Datenerhebungsbogen	83
Anhang 2.	Patientendaten der Hunde aus Carrancas	84
Anhang 3.	Patientendaten der Hunde aus Carlos Chagas	87
Anhang 4.	Patientendaten der Hunde aus Igarapé	90

Anhang 5.	Patientendaten der Hunde aus Menderos Neto (Carlos Chagas)	91
Anhang 6.	18S rDNA- Sequenz von <i>Babesia canis vogeli</i> (AY072925) mit den Primern der Piroplasmen Real-time PCR	92
Anhang 7.	ITS2-rDNA-Sequenz von <i>Babesia canis vogeli</i> (AF394534) mit Primern und Sonde für die spezifische <i>Babesia canis vogeli</i> Real-time PCR	93
Anhang 8.	Homologievergleich der 18S rDNA-Sequenzen von <i>Babesia gibsoni</i> (Bg), <i>Babesia canis vogeli</i> (Bv), <i>Babesia canis canis</i> (Bc) und <i>Hepatozoon canis</i> (Hc) und Spezifität der Primer aus Birkenheuer et al. (2003)	94
Anhang 9.	Statistische Tabellen	97
XI	Danksagung	103

## I Einleitung und Problemstellung

Die Babesiose des Hundes zählt weltweit zu den veterinärmedizinisch bedeutendsten Blutparasitosen und wird durch „grosse“ Babesien der Art *Babesia canis* mit den Unterarten *B. canis canis*, *B. canis rossi* und *B. canis vogeli*, sowie durch „kleine“ Babesien bisher meist der Art *B. gibsoni* zugeordnet, verursacht. In vielen Ländern warmer Klimazonen werden hohe Infektionsraten der Hunde mit Babesien beschrieben. Selbst in Ländern mit niedriger Prävalenz steigt die Zahl der klinisch manifesten Babesiosen bei Hunden. Die Gründe hierfür liegen im Reisetourismus, im Import von Hunden aus subtropischen Regionen und in der Zunahme infizierter Zecken, die als Endwirte und Vektoren fungieren (Dauguschies, 2001).

In Brasilien gehört die Babesiose in einigen Regionen zu den häufigsten Erkrankungen der Hunde durch Blutparasiten (O'Dwyer et al., 2001; Bastos et al., 2004). Die klinischen Erscheinungen bei Infektionen mit „grossen“ Babesien wurden anhand zahlreicher Fälle beschrieben (Ribeiro et al., 1990). Das Vorkommen von „kleinen“ Babesienarten ist bisher nicht hinreichend belegt; es gibt nur wenige Berichte von Einzelfällen in der mikroskopischen Diagnostik. Um die Relevanz der Caninen Babesiose in Brasilien zu beurteilen, fehlen ausreichende epidemiologische Daten, sowie Untersuchungen zur Verbreitung von Zeckenvektoren und Reservoirwirten. Nicht nur in Brasilien, sondern in ganz Südamerika wurde bisher überwiegend auf dem Gebiet der Bovinen Babesiose gearbeitet, da dort die wirtschaftlichen Verluste am grössten sind. Von den 60 Publikationen zur Babesiose in Südamerika in der PubMed-Datenbank (Stand: 10/2005) sind 37 zur Bovinen Babesiose, 12 zur Equinen Babesiose, aber nur drei auf dem Gebiet der Caninen Babesiose.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines deutsch-brasilianischen Kooperations-Projekts und die erste Feldstudie zur Caninen Babesiose, die im Bundesstaat Minas Gerais durchgeführt wurde. Dabei sollte, erstmals für Brasilien, die Prävalenz der Caninen Babesiose sowohl mit serologischen als auch molekulardiagnostischen Methoden untersucht werden.

Neben den Daten zur Prävalenz aus geographisch verschiedenen Regionen sollten auch Unterschiede in der Prävalenz bezüglich Jahreszeit, Haltung und Alter erfasst werden. Deswegen wurden zwei Aufenthalte geplant, einer in der Regenzeit und einer in der Trockenzeit, bei denen Hunde aus der ländlichen Umgebung und aus angrenzenden Städten untersucht werden sollten. Hierbei sollten Blutproben für die serologische und molekularbiologische Diagnostik genommen und Blutausstriche angefertigt werden. Ausserdem sollten weitere demographische Daten in Form eines Fragebogens erfasst werden. Zusätzlich wurden für das brasilianische Teilprojekt gesaugte Zecken abgesammelt.



## II Literaturübersicht

### 1 Biologie und Taxonomie der Piroplasmen

#### 1.1 Allgemeines zu den Piroplasmen

Piroplasmen sind durch Schildzecken übertragene Protozoen, die dem Stamm der *Apikomplexa* angehören. Sie sind pleomorph, parasitieren in Vertebraten meist intraerythrozytär und verursachen bei einer Vielzahl von Säugetieren schwere Erkrankungen, die häufig auch tödlich verlaufen (Eckert et al., 2005).

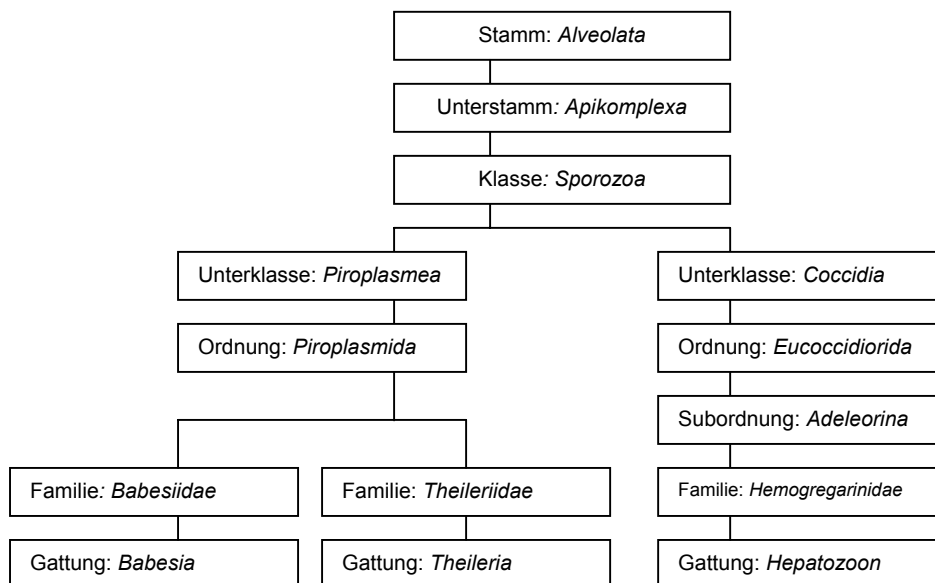
Die derzeit gültige Klassifizierung der Piroplasmen in die beiden Familien *Babesiidae* und *Theileriidae* basiert hauptsächlich auf Unterschieden in ihren Entwicklungsstadien und morphologischen Eigenschaften. Babesien sind meist deutlich grösser als 1-2  $\mu\text{m}$  und vermehren sich durch Merogonie nur in den Erythrozyten (Ausnahme: *Babesia microti*), während Theilerien meist kleiner als 1-2  $\mu\text{m}$  sind und sich zunächst in mononukleären Leukozyten und danach in Erythrozyten vermehren. Desweiteren unterscheiden sich die beiden Familien bei der Entwicklung im Zeckenvektor, in dem die Gamogonie und Sporogonie stattfindet. Babesien werden in den Zecken sowohl transstadial als auch transovarial übertragen, d. h. nicht nur von einem Entwicklungsstadium der Zecken auf das Nächste, sondern auch über die Eier der Zecken auf die folgende Generation (Ausnahme: *Babesia microti*). Theilerien werden nur transstadial übertragen.

Eine eindeutige Zuordnung neuer Piroplasmen zur Gattung *Babesia* bzw. *Theileria* ist problematisch, wenn der Entwicklungszyklus nur lückenhaft bekannt ist. In den letzten Jahren erfolgt durch die Sequenzierung zahlreicher homologer Gene und deren Vergleich eine Neuordnung der Taxonomie, die noch nicht abgeschlossen ist und vermutlich zu weiteren Umbenennungen führen wird.

So wurde *Babesia equi*, nachdem man präerythrozytäre Stadien in Lymphozyten und eine ausschliesslich transstadiale Übertragung nachgewiesen hatte, in *Theileria equi* umbenannt (Mehlhorn und Schein, 1998).

Geschichtlich wurden Babesien erstmals durch den rumänischen Tierarzt Viktor Babès im Jahr 1888 entdeckt, als Erreger der „Seuchenhaften Hämoglobinurie der Rinder“. Da er annahm es handle sich bei dem Erreger um ein Bakterium, nannte er es *Haematococcus bovis* (Babès 1888, 1889). Starcovici, ein Mitglied aus Babès Forschungsgruppe, ordnete den Erreger den Protozoen zu und prägte den heute gültigen Namen *Babesiidae* (Starcovici 1893). Die Theilerien wurden nach Sir Arnold Theiler, einem Schweizer Tierarzt, Wissenschaftler und Pionier des südafrikanischen Veterinärwesens (geb. 1867; gest. 1936), benannt.

### 1.2 Taxonomische Stellung der Gattungen *Babesia*, *Theileria* und *Hepatozoon*



**Abbildung 1:** Taxonomische Stellung der Gattung *Babesia*, *Theileria* und *Hepatozoon* (Eckert et al., 2005; Levine 1982; Levine et al., 1980)

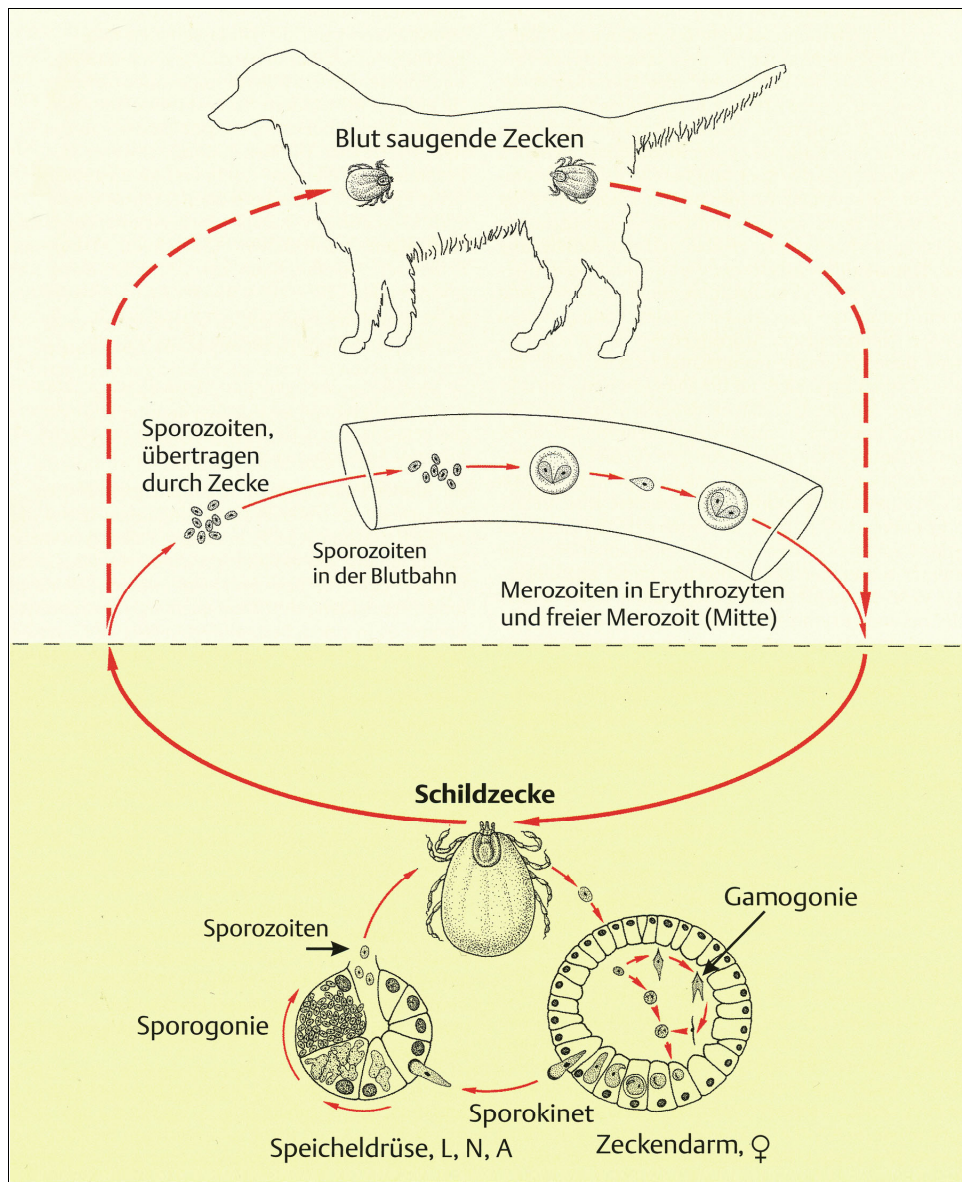
Derzeit umfasst die Gattung *Babesia* mehr als 111 Arten (Levine 1988), die in der Familie Babesiidae zusammengefasst sind. Alle *Babesiidae* werden von Schildzecken auf Wirbeltiere übertragen. Ihr Lebenszyklus ist heterogenetisch, d. h. während ihrer Entwicklung durchlaufen sie im Wechsel mehrere geschlechtliche und ungeschlechtliche Vermehrungen (Mehlhorn und Schein 1984).

### 1.3 Entwicklungszyklus

Bei der Entwicklung der Babesien des Hundes findet zwischen Schildzecke und Hund ein obligater Wirtswechsel statt. Die Merogonie, eine ungeschlechtliche Vermehrungsphase findet dabei in den Erythrozyten des Säugetieres (hier: Hund) statt. Im Vektor, der Zecke, dagegen findet die geschlechtliche Vermehrung, die Gamogonie, und im Anschluss daran, die Sporogonie, die aus mehreren ungeschlechtlichen Vermehrungsphasen besteht, statt. Dabei stellt der Hund für den Erreger, definitionsgemäss, den Zwischenwirt und die Zecke den Endwirt dar. Der nachfolgend beschriebene Entwicklungszyklus stellt die Entwicklung bei *B. canis vogeli* dar (Abbildung 2).

Durch den Biss der Schildzecke werden während des Saugaktes, mit dem Speichel der Zecke, infektiöse Sporozoiten auf den Hund übertragen. Diese dringen passiv in die Erythrozyten ein. Dort bilden sie zunächst ringförmige oder amöboide Trophozoiten. Die meist paarigen birnen- oder tropfenförmigen Merozoiten, entstehen durch eine äussere Knospung, der Exodyogenie. Die freigesetzten Merozoiten infizieren weitere Erythrozyten und leiten dort weitere Merogonien ein, wodurch jahrelang persistierende Infektionen entstehen können. Durch den Saugakt nimmt die Zecke mit dem Blut infizierter Wirbeltiere Merogoniestadien der Babesien auf. Aus diesen entwickeln sich dann im Darm der Zecke männliche und weibliche Gamonten. Durch die Gamogonie (geschlechtliche Vermehrung) entstehen Zygoten, welche sich ihrerseits wiederum zu beweglichen Kineten differenzieren, die in die Darmzellen eindringen, sich dort vermehren und Sporokineten (infektiös) bilden.

Die Sporokineten wandern in die Hämolymphe, befallen dort die Hämozyten und teilweise andere Körperzellen, in denen dann fortlaufende Sporogoniezuklen stattfinden. Im Ovar können die Oozysten mit Babesien befallen werden, die dann transovarial, d. h. über die Eier an die Nachkommen weitergegeben werden. Ist eine Zeckenlarve aus einem infizierten Ei geschlüpft, dringen die Sporokineten in Speicheldrüsenzellen ein, in denen sich dann Sporozoiten bilden. Beim Biss werden die Sporozoiten über den Speichel an den Säugetierwirt weitergegeben (Eckert et al., 2005).



**Abbildung 2:** Entwicklungszyklus von *Babesia canis vogeli* (aus Eckert et al., 2005).

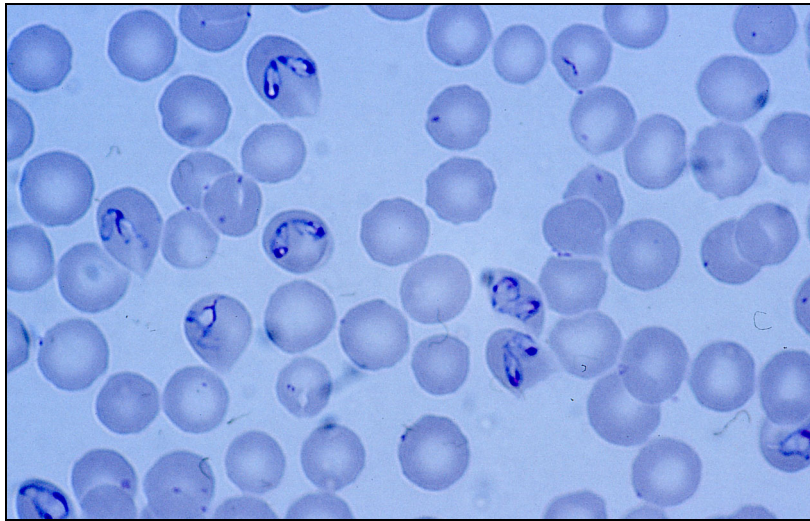
## 2 Babesien und Theilerien beim Hund

Die Erreger der Babesiose des Hundes wurden aufgrund ihrer Grösse historisch in zwei Hauptgruppen unterteilt, die „grossen“ und „kleinen“ Babesien. Diese unterscheiden sich in morphologischer Hinsicht, Wirtsspezifität, Pathogenität und der Epidemiologie. Nach aktueller Auffassung besteht die Gruppe der „grossen“ Babesien aus drei Arten, die *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* und *Babesia canis vogeli*, genannt werden (Zahler et al., 1998). Da mittlerweile die Meinungen, ob sie Artstatus oder Unterartstatus besitzen, auseinander gehen, werden sie in einigen Publikationen auch als *Babesia canis*, *Babesia vogeli* und *Babesia rossi* bezeichnet. In dieser Arbeit werden sie mit dem Namen der Unterart angegeben. Ferner wurde in Nord-Carolina eine weitere grosse Babesienart (*Babesia sp. Coco*) entdeckt, deren Zuordnung und Benennung bis heute noch nicht erfolgt ist (Birkenheuer et al., 2004).

Der Gruppe der „kleinen“ Babesien wird vorwiegend *Babesia gibsoni* mit zwei verschiedenen Unterarten zugeordnet, dem Asiatischen und dem Kalifornischen Isolat. Darüber hinaus werden einige *Babesia gibsoni*-like und *Babsia microti*-like (u. a. „*Theileria annae*“) Isolate zu den kleinen Babesien gezählt (Boozer und MacIntire, 2003). Neuere phylogenetische Studien zeigen das die Einteilung in „grosse“ und „kleine“ Babesien des Hundes durch eine Zuordnung in die drei Gruppen *Babesia*, *Babesia microti*-like und *Theileria* ersetzt werden wird und einige als *Babesia gibsoni*-Isolate beschriebene Babesien in die Gruppe der Theilerien einzuordnen sind (Zahler et al., 2000a und b).

### 2.1 „Grosse“ Babesien

Die „grossen“ Babesien sind ca. 3 bis 5 µm gross, pyriform und meist paarig im Erythrozyten angeordnet (Abbildung 3). Man unterscheidet: *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* und *Babesia canis rossi* (Boozer und MacIntire, 2003).



**Abbildung 3:** *Babesia canis* in Erythrozyten

### **2.1.1 *Babesia canis canis***

*Babesia canis* wurde erstmals 1934 in den USA erwähnt (Boozer und MacIntire, 2003). Die Unterart *B. canis canis* wird durch die Zecke *Dermacentor reticulatus* auf den Hund übertragen. Die Krankheitsfälle mit *B. canis canis* werden in Mitteleuropa zu den typischen Reisekrankheiten gezählt (Dauguschies, 2001), da Infektionen mit dem Erreger meist aus der Mittelmeerregion oder Osteuropa importiert werden (Tabelle 1). Mittlerweile gibt es auch in Süddeutschland, Österreich, der Schweiz und auch weiter nördlich gelegenen Teilen Mitteleuropas, wie z. B. in Nordfrankreich und den Niederlanden (Matjila et al., 2005), stabile endemische Herde in denen die *D. reticulatus* Zecke und der Erreger der Babesiose vorkommt.

Die Inkubationszeit einer natürlichen Infektion mit *B. canis canis* beträgt 10 bis 21 Tage. Das Krankheitsbild, das *B. canis canis* beim Hund verursacht, wird als „schwere Form“ der Babesiose bezeichnet und zeichnet sich durch eine hohe Pathogenität aus. Dabei können sich verschiedene Stämme von *B. canis canis* in ihrer Virulenz unterscheiden. Hunde gleich welchen Alters und welcher Rasse können an Babesiose erkranken.

Es existiert keine Resistenz bei Junghunden, jedoch kann die Nachkommenschaft in endemischen Gebieten durch Antikörper der Mutter geschützt sein (Eckert et al., 2005). Die Infektion mit *B. canis canis* verläuft meist akut und äussert sich in Fieber, Anämie, Apathie, Inappetenz, Ikterus, Hämoglobinurie, zerebralen Störungen und führt unbehandelt häufig zum Tod. Auch akutes Nierenversagen bis zum Versagen mehrerer Organe und disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie (DIK) mit postthrombotischer Azidose und Gewebsnekrose sind nicht selten. DIK ist durch verstärkte Blutungsneigung und hämorrhagische Diathese gekennzeichnet. Chronische Verlaufsformen zeichnen sich durch Apathie, Anämie, Inappetenz, Fieber und Leberinsuffizienz mit Ikterus aus (Eckert et al., 2005; Zahler und Rinder, 1998).

### **2.1.2 *Babesia canis vogeli***

Der Vektor für *B. canis vogeli* ist die braune Hundezecke, *Rhipicephalus sanguineus*. *B. canis vogeli* ist sowohl in den gesamten Tropen und Subtropen, als auch in ganz Südeuropa und Teilen Ost- und Mitteleuropas endemisch. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich ungefähr vom 35° S bis zum 56° N (Tabelle 1). Rund um das Mittelmeer ist sowohl die Hundezecke als auch die Babesiose endemisch. Die Infektion mit *B. canis vogeli* verläuft oft ohne schwere Symptome, fast inapparent und wird deshalb auch als „milde“ Verlaufsform der Babesiose bezeichnet. Die von ihr verursachte Parasitämie ist geringgradig, dauert meistens drei bis sieben Tage und geht mit leichtem Fieber und einer geringgradigen Anämie einher (Eckert et al., 2005).

### **2.1.3 *Babesia canis rossi***

*B. canis rossi* wird von der Zecke *Haemaphysalis leachi* übertragen und ist die Unterart mit der höchsten Pathogenität unter den Babesien beim Hund. Ihr Verbreitungsgebiet ist bisher ausschliesslich der Süden Afrikas (Tabelle 1).

Die Infektion mit *B. canis rossi* verläuft oft perakut und verursacht eine schwere klinische Symptomatik. Die perakute Verlaufsform endet meistens innerhalb von 24 Stunden mit dem Tod, der durch hypovolämischen Schock und Lungenversagen eintritt, wahrscheinlich unter Beteiligung des Plasmakallikreinsystems (Eckert et al., 2005).

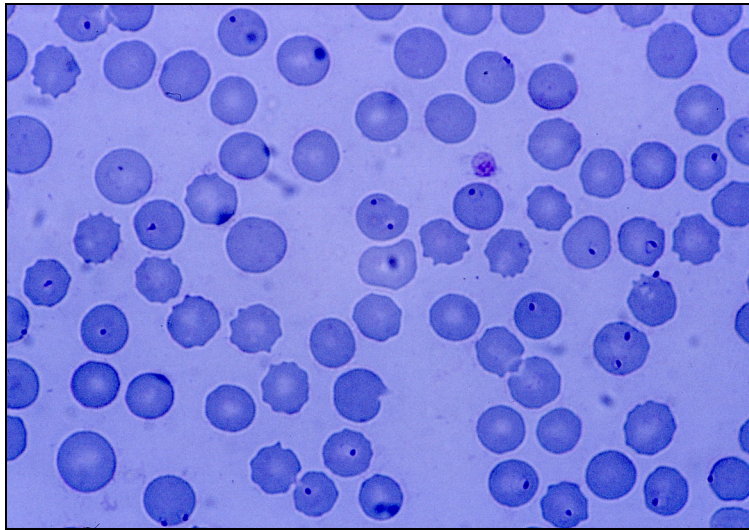
### **2.1.4 *Babesia sp. Coco* (Birkenheuer et al. 2004)**

In der North Carolina State University wurde im Jahr 2002 bei einer sieben Jahre alten Labradorhündin die gerade in Chemotherapie wegen eines Lymphosarkoms war und wegen Fieber (40,72 °C), Anämie, Trombozytopenie und Leukopenie untersucht wurde, mittels Blutaussstriche, eine Babesiose festgestellt. Unter dem Mikroskop war morphologisch kein Unterschied zu *Babesia canis* Arten festzustellen. Alle PCR's und Antikörper-Tests auf bekannte Babesienarten waren negativ. Die darauf folgende Sequenzanalyse ergab, dass die vorliegende Babesienart (*Babesia sp. Coco*) mit keiner Sequenz in der Genbank zu 100 % übereinstimmte. Die grösste Ähnlichkeit bestand mit den Sequenzen von *B. bigemina* (93,9 %) und *B. caballi* (93,5 %). Mit den Sequenzen der *Babesia canis* Gruppe stimmte sie nur zu 91,2 – 91,6 % überein. Die Autoren gehen davon aus, dass es sich bei dem Babesiosefall um eine Erkrankung handelt, die durch eine neue „grosse“ Babesienart hervorgerufen wurde (Tabelle 1).

## **2.2 „Kleine“ Babesien**

Die „kleinen“ Babesien sind zwischen 0,5 µm und 2,5 µm gross und somit etwa halb so gross wie die „grossen“ Babesien (Abbildung 4). Sie treten in circa fünf bis sechs verschiedenen Formen auf, sind meist oval und einzeln zu finden, können aber auch in einer Ringform auftreten (Boozer und MacIntire, 2003).





**Abbildung 4:** *Babesia gibsoni* in Erythrozyten

### **2.2.1 *Babesia gibsoni***

*B. gibsoni* wurde erstmals 1910 in Indien dokumentiert. Im Jahr 1968 wurde die erste Infektion mit *B. gibsoni* in den USA festgestellt. Seither gab es Fälle in Asien, Nord- und Ostafrika, USA und seltener in Europa. Der Zeckenvektor ist *R. sanguineus* (Tabelle 1). Früher wurden alle „kleinen“ Babesien *Babesia gibsoni* zugeordnet. Heute weiss man, dass es sich dabei um einen Artenkomplex handelte, der nun in *B. gibsoni* Asiatisches Isolat, *B. gibsoni* Kalifornisches Isolat, *Babesia gibsoni*-like und *Babesia microti*-like (*Theileria annae*) Isolate unterteilt wird (Zahler et al., 2000a). Im Allgemeinen erscheint *B. gibsoni* (Asiatisches Isolat) weniger virulent als das Kalifornische Isolat, d. h. die Parasitämie und Mortalitätsraten sind niedriger. Das Kalifornische Isolat geht mit einer höheren Parasitämie und Mortalität einher und verursacht dabei schwere Leberveränderungen. Darüber hinaus scheint es Rassedispositionen zu geben. Besonders anfällig für eine Infektion mit *B. gibsoni* (Asiatisches Isolat) sind demnach Pit Bulls und American Staffordshire. Die Infektion mit dem Kalifornischen Isolat ist bei vielen unterschiedlichen Rassen zu finden (Boozer und MacIntire, 2003).

### 2.2.2 „*Theileria annae*“ (Syn. *Babesia annae*)

„*Theileria annae*“ (Abbildung 5) wurde erstmals 1994 bei einem Deutschen Schäferhund, der sich offensichtlich in Spanien infiziert hatte, isoliert (Zahler et al., 2000b). Die Erkrankung wird wahrscheinlich durch die Zecke *Ixodes hexagonus* (Camacho et al., 2003) übertragen (Tabelle 1). Der Erreger besitzt deutlich mehr Ähnlichkeit mit *B. microti*, *B. rodhainii* oder *Theileria equi*, als mit *B. gibsoni*.

Seit der Entdeckung von „*Theileria annae*“ wurden mehr als 150 Fälle in Nord-West Spanien (Galizien) festgestellt (Camacho et al., 2001). Die Parasitämie ist selten hoch, die Infektion geht meist mit starker Anämie und Thrombozytopenie einher. Auch akute Niereninsuffizienz wurde mehrfach festgestellt, die Leber war kaum betroffen (Gutián et al., 2003; Zahler et al., 2000b).

Die Zuordnung von „*Theileria annae*“ zur Gattung *Theileria* ist nicht unumstritten, da ein Nachweis der typischen Merkmale des Entwicklungszyklus von Theilerien fehlt. Einige Autoren bezeichnen diese Piroplasmen deshalb als „*Babesia annae*“ (Camacho et al., 2005). Um solche Unklarheiten nicht aufkommen zu lassen schlagen Herwaldt et al. (2003), ein genotypisch neues *Babesia*-Isolat als *Babesia* sp. mit Zusatz, zum Beispiel: *Babesia* sp. (EU1), zu beschreiben



**Abbildung 5:** *Theileria annae* in Erythrozyten (Camacho et al., 2001)

**Tabelle 1:** Piroplasmen bei Caniden

	<i>B. canis canis</i>	<i>B. canis vogeli</i>	<i>B. canis rossi</i>	<i>B. sp. Coco</i>	<i>B. gibsoni</i>	<i>Th. annae</i>
<b>Grösse</b>	4 - 5 µm	4 - 5 µm	4 - 5 µm	4 - 5 µm	1 - 2 µm	1 - 2 µm
<b>Charakteristische Morphologie</b>	pleomorph, paarige Birnenform	pleomorph, paarige Birnenform	pleomorph, paarige Birnenform	pleomorph, paarige Birnenform	pleomorph, einzeln oder ringförmige Anordnung	pleomorph, einzeln oder ringförmig
<b>Lage im Erythrozyten</b>	zentral, Vielfachbefall	zentral, Vielfachbefall	zentral, Vielfachbefall	zentral, Vielfachbefall	zentral	zentral
<b>Pathogenität</b>	+++	+	+++	?	++	?
<b>Verbreitungsgebiet</b>	Südeuropa, Herde in Mitteleuropa	Südeuropa, Tropen, Subtropen	Südafrika	Nord-Carolina	Nordafrika, Amerika, Asien, Australien	Spanien
<b>Zwischenwirt (Wirbeltier)</b>	Caniden	Caniden	Caniden	Caniden	Caniden	Caniden
<b>Endwirt (Zecke)</b>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Haemaphysalis leachi</i>	?	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Ixodes hexagonus</i>

### 2.3 Theilerien beim Hund

Bei einer Studie über Piroplasmen (*Babesia* spp., *Theileria* spp. und *Hepatozoon* spp.) in Südeuropa wurden Blutproben von 10 Hunden mit klinischen Symptomen und von 12 klinisch gesunden Hunden untersucht (Criado-Fornelio et al., 2003). Bei der Auswertung dieser Proben mittels verschiedener PCR's wurde die Präsenz von *Theileria equi* bei einem Hund mit klinischen Symptomen und bei drei Hunden aus der klinisch gesunden Gruppe, festgestellt. Dabei stammten die Proben der Hunde aus drei unterschiedlichen spanischen Provinzen.

### **3 Therapie der Babesiose des Hundes**

Eine akute Babesiose ist immer als Notfall zu behandeln. Die Therapie der Babesiose beim Hund erfolgt mit einer zweimaligen im 14-tägigen Intervall subkutan verabreichten Dosis von 6 mg/kg Imidocarb Dipropionat, z. B. Imizol® (Vercammen et al., 1996; Beelitz und Pfister, 2004) oder mit einer einmaligen subkutan verabreichten Dosis von 7,5 mg/kg (Boozer und MacIntire, 2003; Penzhorn et al., 1995). Phenamidin, Trypan Blau, Diminazene Aceturat und Quinoronium Sulfat sind weitere verwendbare Mittel beim Hund. Kleine Babesien sind schwer zu behandeln, da es noch keinen Wirkstoff gibt, der eine Parasitenelimination bewirkt. Die Behandlung kann versucht werden mit einer einmalig subkutan verabreichten Injektion mit Buparvaquon (Butalex®) in einer Dosierung von 2,5- 5,0 mg/kg KM (Beelitz und Pfister, 2004). Imidocarb Dipropionat und Buparvaquon sind in Deutschland nur über die Internationale Apotheke erhältlich, da sie nicht zugelassen sind.

### **4 Prophylaxe gegen Babesiose beim Hund**

#### **4.1 Zeckenprophylaxe**

Um das Risiko einer Infektion mit Babesien oder mit anderen durch Zecken übertragbaren Krankheiten zu mindern, ist es ratsam vorbeugend vor Zeckenbefall zu schützen, z. B. mit einem Spot-on-Präparat (Advantix®) oder akarizidhaltigen Halsbändern (Hellmann et al., 2003; Young et al., 2003).

## 4.2 Babesienvakzine

Bei Hunden besteht die Möglichkeit mit einem kommerziellen Impfstoff auf SPA-Basis (soluble parasite antigens) gegen eine Infektion mit *B. canis canis* (Pirodog, Merial) zu impfen (Eckert und Deplazes, 1996) oder eine chemoprophylaktische Behandlung mit Imidocarb durchzuführen, die etwa vier Wochen vor einer Infektion schützt (Eckert et al., 2005). Es ist noch nicht klar, ob Impfstoffe auf SPA-Basis gegen *B. canis canis* auch zum Schutz vor anderen Babesioseerregern des Hundes sinnvoll sind (Schetters et al., 2005).

## 5 Vorkommen von Zecken in Minas Gerais, mit Vektorpotential für die Hundebabesiose

### 5.1 *Rhipicephalus sanguineus*

Die braune Hundezecke (*R. sanguineus*) gehört der Familie der *Ixodidae* (Schildzecken), Gattung *Rhipicephalus*, die aus ca. 70 Unterarten besteht, an. *R. sanguineus* gehört zu den dreiwirtigen, monotropen Zecken, d. h., sie weisen eine sehr hohe Wirtsspezifität auf und befallen fast ausschliesslich Hunde. Ihr Verbreitungsgebiet erstreckt sich mittlerweile ungefähr von 35° S bis zum 50° N und umfasst sowohl die gesamten Tropen und Subtropen, wie auch Gebiete der gemässigten Zonen (gesamter Mittelmeerraum, sowie grosse Teile Osteuropas und mehrere Teile Mitteleuropas). Während die Zecke in den Tropen und Subtropen im Freien überlebt, hat sie sich in den gemässigten Zonen, um zu überleben, an das Raumklima in Häusern angepasst.

Während die dunkelbraunen Männchen nur 3-3,8 mm lang sind können die rötlichen Weibchen im voll gesogenen Zustand eine Länge von 1 cm erreichen (Abbildung 6). *R. sanguineus* ist als Vektor für verschiedene Krankheiten des Hundes (*B. canis vogeli*, *B. gibsoni*, *Ehrlichia canis* oder *Hepatozoon canis*) bekannt.



**Abbildung 6** : *Rhipicephalus sanguineus* Zecke

### **5.2 *Amblyomma cajennense***

Die Gattung *Amblyomma* gehört zu der Familie der *Ixodidae* (Schildzecken) und besteht aus circa 100 verschiedenen Arten (Abbildung 7). In Südamerika findet man sie vorwiegend in den tropischen und subtropisch feuchten Regionen. *Amblyomma* spp. sind grundsätzlich dreiwirtig und kommen bei einer Vielzahl unterschiedlicher Tiere vor (Reptilien, Säuger, Vögel und manchmal auch bei Amphibien). Menschen werden hauptsächlich durch Nymphen befallen (Eckert et al., 2005).

Aus *Amblyomma cajennense* wurde das Bakterium *Borrelia brasiliensis* isoliert. Diese Zeckenart kann somit als potentieller Vektor für Krankheitserreger angesehen werden (Evans et al., 2000).



**Abbildung 7:** *Amblyomma cajennense* Zecke

### 5.3 Andere *Amblyomma*-Arten

In Brasilien gibt es noch eine Vielzahl anderer *Amblyomma*-Arten, die beim Hund vorkommen und somit als Krankheitsüberträger fungieren können (Evans et al., 2000): *Amblyomma fuscum*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma tigrinum* und *Amblyomma triste*.

### 5.4 *Boophilus microplus*

Die Gattung *Boophilus* besteht aus fünf Arten und wird zu der Familie der *Ixodidae* gezählt (Abbildung 8). Ihr Verbreitungsgebiet sind die Tropen und Subtropen. Alle Arten der Gattung zeichnen sich durch hohe Wirtsspezifität aus und befallen fast ausschliesslich Rinder. Sie sind einwirtig und verbleiben, bis auf die Eiablage, während ihrer gesamten Entwicklung (drei Wochen) auf dem Rind. Sie gelten als Vektor von *Anaplasma marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* und *Theileria equi*. Infektionen mit *T. equi* wurden in Spanien schon bei Hunden festgestellt (Eckert et al., 2005; Criado-Fornelio et al., 2003).



**Abbildung 8:** *Boophilus microplus* Zecke

### 5.5 *Anocentor nitens*

*A. nitens* wird als die tropische Pferdezecke bezeichnet und ist in den Tropen und Subtropen weit verbreitet (Abbildung 9). Sie ist einwirtig, d. h. die gesamte Entwicklung, von der Nymphe bis zur adulten Zecke, findet auf dem Pferd statt. Im Bundesstaat São Paulo gilt sie als die am weitesten verbreitete Zecke beim Pferd (Labruna et al., 2002). Sie ist als Überträger der Babesiose (*Babesia caballi*) beim Pferd (Evans et al., 2000) bekannt.



**Abbildung 9:** *Anocentor nitens* Zecke  
(<http://www.afpmb.org>)



## 6 Babesiose bei Hunden in Brasilien

In Brasilien ist die Canine Babesiose weit verbreitet. Bislang existieren nur wenige epidemiologische Studien zur Caninen Babesiose in Brasilien, obwohl ihre Bedeutung auch dort in den letzten Jahren zugenommen hat.

Erste Studien die serologische Diagnostikmethoden (IFAT) verwendeten, zeigten in Minas Gerais, eine hohe Seroprävalenz von *B. canis vogeli* beim Hund (Ribeiro et al., 1990, Spiewak et al., 1992). Eine retrospektive Studie, die von März 1998 bis September 2001 an der Tiermedizinischen Klinik der Universidade Federal de Minas Gerais in Belo Horizonte durchgeführt wurde, zeigte, dass von insgesamt 145 Hunden, die im Verdacht standen an einer Infektion mit Blutparasiten erkrankt zu sein, 61 (42 %) im Blutaussstrich positiv für *Babesia* spp. waren (Bastos et al., 2004). Bei einer weiteren Studie, aus dem Bundesstaat Rio de Janeiro, an der 250 Hunde beteiligt waren, ergab die Auswertung der Blutaussstriche auf *Babesia* spp eine Prävalenz von 5,2 % (O'Dwyer et al., 2001). In einer Voruntersuchung zu der hier vorgestellten Studie, die 2004 durchgeführt wurde, wurden erstmals fünf Proben von Hunden aus verschiedenen Regionen Südbrasilien (vier aus dem Bundesstaat Minas Gerais, davon zwei aus Belo Horizonte, eine aus Lavras, eine aus Uberlândia und einer Probe aus São Paulo) molekulardiagnostisch untersucht. Aus den Blutproben der Hunde wurde DNA extrahiert und die 18S-rDNA amplifiziert und sequenziert. Alle Infektionen konnten ausnahmslos auf eine Infektion mit *B. canis vogeli* zurückgeführt werden (Passos et al., 2005). Die Sequenzen der brasilianischen Hunde waren zu 100 % identisch. Der Vergleich mit Sequenzen von *B. canis vogeli*-Isolaten aus anderen Ländern ergab geringfügige Unterschiede.

Die klimatischen Bedingungen in tropischen und subtropischen Regionen, wie sie in grossen Teilen Minas Gerais vorkommen, fördert die Fortpflanzung und Entwicklung der Zeckenarten und erlaubt ihnen eine Entwicklung von bis zu vier Generationen pro Jahr (Passos, persönl. Mitteilung). Deshalb sind dort in grossen Teilen des Bundesstaates Hunde einer massiven Zeckenexposition ausgesetzt. Entsprechend hoch ist die Infektionsgefahr mit Babesien und anderen durch Zecken übertragene Krankheiten. Das Vektorpotential endemischer Zecken ist noch unbekannt.

## III Material und Methoden

### 1 Untersuchungsgebiet

Im Rahmen zweier Probensammelperioden in drei verschiedenen Regionen im Bundesstaat Minas Gerais in Brasilien (Carrancas, Carlos Chagas und Igarapé) (Abbildung 10 und 11) wurden insgesamt 552 Blutproben von 385 Hunden gesammelt. Die Probensammelperioden wurden während der Trockenzeit (Juni und Juli 2004), sowie während der Regenzeit (November und Dezember) durchgeführt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Probengewinnung von gleichen Tieren in beiden Sammlerperioden gelegt.

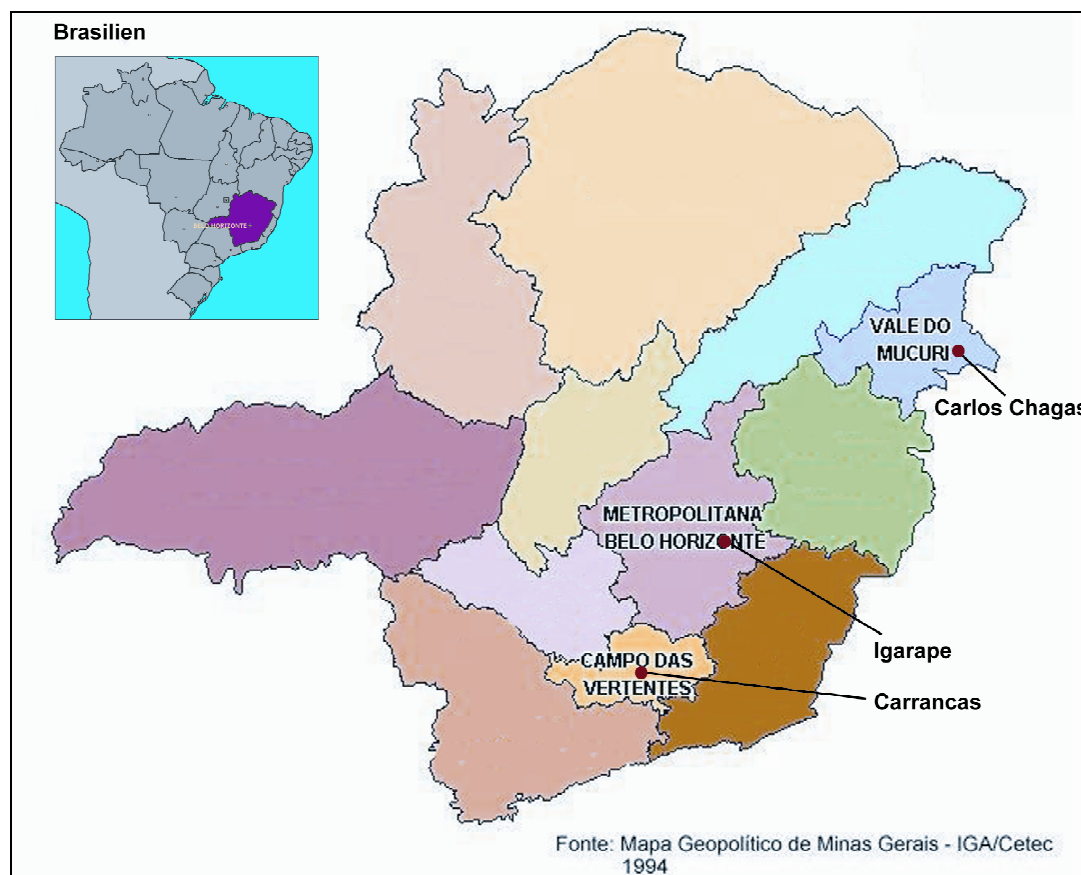


Abbildung 10: Untersuchungsgebiete in Minas Gerais, Brasilien

### III. Material und Methoden



**Abbildung 11:** Untersuchungsgebiete in Minas Gerais, Brasilien

Carrancas (3.690 Einwohner) liegt im Süden des Bundesstaates Minas Gerais ( $21^{\circ}48' S$ ,  $44^{\circ}64' O$ ) auf 1060 m NN. Die Jahresdurchschnittstemperatur beträgt  $19,2^{\circ} C$ , die relative Luftfeuchtigkeit  $76,2\%$  und der durchschnittliche Niederschlag beträgt 1470 mm jährlich. Die Gegend um Carrancas ist hügeliges landwirtschaftlich genutztes Gebiet in dem Milchviehwirtschaft vorherrscht (s. Tabelle 2).

Carlos Chagas (21.600 Ew.) liegt im Nord-Osten von Minas Gerais, nahe der Grenze zum Bundesstaat Bahia ( $17^{\circ}70' S$ ,  $40^{\circ}76' O$ ) auf 159 m NN. Die Jahresdurchschnittstemperatur beträgt  $22,4^{\circ} C$ , die relative Luftfeuchtigkeit  $79,0\%$  und die durchschnittliche Niederschlagsmenge 1059 mm pro Jahr. Das Gebiet um Carlos Chagas lässt sich als weitestgehend ebenes Weideland beschreiben auf dem Rinder primär zur Fleischerzeugung herangezüchtet werden (s. Tabelle 2).

Das dritte Sammelgebiet, Igarapé (27.625 Ew.), liegt östlich von Belo Horizonte im Zentrum des Bundesstaates (20°07 S, 44°30 O) auf 780 m NN. Die jährlichen Durchschnittswerte lauten: Temperatur 21,8 °C, relative Luftfeuchtigkeit 76,2 % und Niederschlagsmenge 1272 mm (s. Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Klimatische Daten der drei unterschiedlichen Regionen

Parameter	Carrancas		Igarapé		Carlos Chagas	
	Trockenzeit	Regenzeit	Trockenzeit	Regenzeit	Trockenzeit	Regenzeit
Breitengrad – S	21° 48'		20° 07'		17° 70'	
Längengrad – W	44° 64'		44° 30'		40° 76'	
Höhe – m	1060		780		159	
Durchschnittl. Min. Temperatur - °C	13,48	19,50	16,30	19,63	20,25	22,87
Durchschnittl. Max. Temperatur - °C	25,81	27,55	25,73	28,08	31,25	34,13
Durchschnittl. Regenmengen - mm	30,43	110,85	10,90	134,37	40,50	142,12

## 2 Biologisches Material

### 2.1 Probenumfang

#### 1. Probensammelperiode (Trockenzeit):

Während der ersten Probensammelperiode fanden drei Sammelaktionen statt. Die erste Sammelaktion wurde in Carrancas durchgeführt. Dort wurden von 100 Hunden aus der ländlichen und von sechs Hunden aus der städtischen Umgebung Proben gesammelt (Abbildung 13). Während der zweiten Sammelaktion in Carlos Chagas wurden von 117 Hunden aus der ländlichen Umgebung Proben genommen (Abbildung 12). Im Rahmen der dritten Sammelaktion wurden Proben von 50 Hunden in Igarapé aus ebenfalls ländlich geprägter Umgebung genommen (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Anzahl der in Carrancas, Carlos Chagas und Igarapé gesammelten Blutproben während des ersten und zweiten Aufenthaltes.

Region	1. Probensammelperiode (Trockenzeit)			2. Probensammelperiode (Regenzeit)		
	Carrancas	Carlos Chagas	Igarapé	Carrancas	Carlos Chagas	Igarapé
Land	100	117	50	71	75	29
Stadt	6	0	0	42	41	21
Gesamt	106	117	50	113	116	50



**Abbildung 12:** Hund aus der Region Carlos Chagas

#### **2. Probensammelperiode (Regenzeit):**

Beim zweiten Aufenthalt wurden die Sammelaktionen in Carrancas und Carlos Chagas wiederholt, wobei Proben von denselben Hunden der ersten Probensammelperiode genommen werden sollten. Von den Hunden der ersten Sammlung in Carrancas waren jedoch 30 Tiere (29 Landhunde und ein Stadthund) nicht mehr verfügbar. In Carlos Chagas waren mittlerweile acht Hunde verstorben und 42 nicht mehr aufzufinden.

Des Weiteren wurde auch die Probensammlung in Igarapé wiederholt, hier waren 21 Hunde entweder nicht mehr auffindbar oder verstorben. Allen Tieren, die in den Untersuchungsgebieten wieder gefunden werden konnten, wurden Proben entnommen. Darüber hinaus wurden in Carrancas von 39 neuen Hunden, in Carlos Chagas von 41 und in Igarapé von 21 vorher nicht untersuchten Hunden, aus städtischer Umgebung, Blutproben genommen (Tabelle 3).



**Abbildung 13:** Hund aus Carrancas

## 2.2 Probenmaterial

Da es sich hier um eine Feldstudie handelt wurden die Hunde nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und nicht nach Verdacht auf eine Infektion mit Hämoparasiten. Zuerst wurde jedem Tier mittels Vakutainersystem Blut aus der *V. cephalica antebrachii* (Unterarmvene) entnommen und danach wurden mit einem Tropfen Blut aus der *V. auricularis lateralis* (Ohrrandvene) auf insgesamt drei Objektträgern Blutausstriche angefertigt. Darüber hinaus wurde zusammen mit dem Besitzer der Hunde ein Fragebogen ausgefüllt.

### **Blutausstriche:**

Mit Blut aus der *V. auricularis lateralis* (Ohrrandvene) wurden auf drei Objektträgern Blutausstriche von jedem Hund angefertigt und luftgetrocknet, mit Giemsa-Lösung gefärbt und unter dem Lichtmikroskop auf grosse und kleine Babesien untersucht, indem die Blutausstriche mäanderförmig für mind. 10 Minuten im Fahnenbereich durchmustert wurden.

#### **Blutproben (Serumröhrchen):**

Das Blut wurde aus der *V. cephalica antebrachii* (Unterarmvene) mittels Vakutainersystem entnommen, der Hämatokrit bestimmt und sofort gekühlt. Das Blut aus dem Serumröhrchen (EDTA) wurde aufgeteilt, in Blut, von dem Blutserum gewonnen und Blut aus dem DNA extrahiert wurde. Um Serum zu gewinnen wurde das Blut zentrifugiert (Tischzentrifuge, höchste Stufe für 10 min.) und das Serum danach von der zellhaltigen Fraktion abpipettiert. Beide Anteile wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **Fragebogen:**

Der Fragebogen wurde zusammen mit dem Hunde-Besitzer ausgefüllt und später ausgewertet. Über diesen wurden grundsätzliche Informationen für die Diagnostik (z. B. Alter, Geschlecht, Kontakt mit Wildtieren und anderen Haustieren, Befall mit Ektoparasiten, feststellbare Anämie, Hämatokritwert, usw.) gewonnen und auch wichtige Details ermittelt, die verwendet wurden um die Hunde bei einer wiederholten Sammelaktion eindeutig zu identifizieren (s. Anhang 1).

## **3 Verwendete Materialien**

### **3.1 Kits, Oligonukleotide, Reagenzien**

Wizard® Genomic DNA                   (Promega Corporation, Madison, USA)  
Purification Kit

dATP, dCTP, dGTP, dTTP               (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

Primer: BC-2, BC-3, PIR-2,           (Thermo Electron GmbH, Ulm)  
PIR-3, 455-479 F, 793-772 R

Sonden: PIR-S-3, BV-S-2           (Thermo Electron GmbH, Ulm)



Probenauftragspuffer:	(Fermentas, Life Sciences, Leonrot)
6x Loading Dye	
GeneRuler™ 50bp DNA Ladder Mix	(Fermentas, Life Sciences, Leonrot)
Ethanol >99,8 %	(Roth, Karlsruhe)
Tris 14g/mol (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan)	(Roth, Karlsruhe)
EDTA >99 %	(Roth, Karlsruhe)
Natriumacetat	(Roth, Karlsruhe)
Natriumchlorid	(Roth, Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	(Fluka Chemie AG, Neu-Ulm)
Tween®20	(Roth, Karlsruhe)
Glycerin >99,5 %	(Roth, Karlsruhe)
Roti®garose	(Roth, Karlsruhe)
Ethidiumbromid 10 mg / ml	(Roth, Karlsruhe)
Evans-Blau	(Fluka Chemie AG, Neu-Ulm)

### 3.2 Enzym

HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN, Hilden)

### 3.3 Lösungen und Puffer

#### 3.3.1 Lösungen und Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese

50x TAE-Puffer      40 mM Tris  
                         20 mM Natriumacetat  
                         1 mM EDTA  
                         mit konzentrierter Essigsäure (Eisessig) auf pH 8,3 eingestellt

Ethidiumbromid-Färbebad: 1:20.000 Verdünnung der Ethidiumbromid-Stammlösung

#### 3.3.2 Lösungen und Puffer für den Indirekten Immunfluoreszenz antikörpertest

1x PBS-Puffer      10,7 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt)  
                         135 mM NaCl (Merck, Darmstadt)  
                         15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3 x H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt)  
                         2,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)  
                         ad 1000 ml mit *Aqua dest.* lösen

PBS/Tween 0,05 %    PBS-Puffer  
                         Tween 0,05 % v/v

## 4 Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest

In Minas Gerais wurden zunächst die gesammelten Proben der Hunde serologisch mittels Indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) ausgewertet.

Der IFAT dient zum Nachweis spezifischer Antikörper aus dem Serum der Blutproben der Hunde. Hierbei binden die Serumantikörper an das vorher an einem Objektträger fixierte Antigen und werden mit Fluoreszein-Isothiocyanat konjugiertem Ziege-Anti-Hund-Antikörper (Sekundärantikörper) unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. In der vorliegenden Studie wurde Blut von einem experimentell mit *B. canis vogeli* infizierten Hund, als Antigen verwendet. Die Durchführung des Tests erfolgte im Labor des brasilianischen Instituts nach folgendem Protokoll.

Präparierte Objektträger mit den Blutaussstrichen und die Testseren wurden aus dem Gefrierfach genommen und aufgetaut. Auf Blutaussstriche ohne vorgezeichnete Markierungen wurden Kreise mit einem gut sichtbaren Nagellack aufgebracht (für 15 Seren werden 18 Markierungen aufgebracht, sechs Kreise in drei Reihen und getrocknet). Die Seren und Kontrollen wurden auf die Objektträger pipettiert. Auf die erste vertikale Dreierreihe wurde die Positivkontrolle, die Negativkontrolle und eine Probe mit unverdünntem PBS aufgebracht. PBS wurde je nach gewünschter zu testender Konzentration in eine Mikrotiterplatte vorpipettiert, z. B. für eine 1:40 Konzentration 39  $\mu$ l PBS und 1  $\mu$ l Serum. Um eine Verdünnungsreihe anzulegen, pipettiert man 50  $\mu$ l PBS in das folgende Feld und vermischt es mit 50  $\mu$ l aus dem vorhergehenden Feld, usw. man erhält so Verdünnungen von 1:80, 1:160, 1:320, 1:640,.... Angefangen wurde mit der höchsten Serumkonzentration von der man einen kleinen Tropfen auf den vorbereiteten Objektträger auftrug, daneben die nächst höhere Verdünnung, usw.. Danach wurden die Blutaussstriche in einer speziellen feuchten und lichtundurchlässigen Box bei 37° C für 30 Minuten im Trockenschrank inkubiert. Die Blutaussstriche wurden zweimal mit PBS gut gewaschen (mit PBS bedecken, fünf Minuten einwirken lassen, PBS ablaufen lassen) und anschliessend mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet (mit Ventilator).

PBS/TWEEN 0,05 % wurde 1:49 mit Evansblau gemischt, (Menge je nach Anzahl der Objektträger). Das Konjugat wurde mit 1:100 der vorbereiteten Mischung verdünnt und ein kleiner Tropfen davon auf jede Markierung (Kreis mit Probe) aufgebracht. Erneut wurden die Objektträger für 30 Minuten in der bereits erwähnten Box im Trockenschrank inkubiert, zweimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen (je fünf Minuten einwirken lassen), dann mit destilliertem Wasser abgewaschen und getrocknet (Ventilator). Etwas Glycerin wurde auf jede Markierung aufgetragen, ein Deckglas aufgelegt und die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

## **5 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion aus den Blutproben der Hunde erfolgte mit dem Wizard® Genomic DNA Purification Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Promega, Madison, USA).

Die gefrorenen Blutproben wurden aufgetaut, gut durchmischt und je 300 µl einer Blutprobe in einem sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 900 µl „Cell Lysis“ Lösung (Promega, Madison, USA) vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Probe bei 13.000 bis 16.000 rpm für 20 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand, so weit wie möglich, entfernt (weisse Pellets nicht zerstören). Ist das Pellet noch nicht weiss, muss man die oben aufgeführten Schritte so lange wiederholen, bis alle Erythrozyten lysiert sind. Danach wurde die Lösung kurz gemischt, 300 µl der „Nuclei Lysis“ Lösung hinzugefügt und mittels fünf bis sechsmaligen pipettieren wurden die Zellkerne resuspendiert. Enthielt die Suspension nicht lysierte Zellkerne wurde sie bei 37° C solange inkubiert bis diese vollständig gelöst waren. Anschliessend wurden 1,5 µl Rnase A-Lösung zu jeder Probe hinzugefügt, gut gemischt, für 15 Minuten bei 37° C inkubiert und danach auf Raumtemperatur abgekühlt.

100 µl „Protein Precipitation“ Lösung wurden hinzugefügt und für 10 – 20 Sekunden gemischt. Danach wurde die Lösung für drei Minuten bei Raumtemperatur und 13.000 – 16.000 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand in ein steriles, mit 300 µl Isopropanol (Raumtemperatur) gefülltes, 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert, gut gemischt und erneut drei Minuten bei Zimmertemperatur und 13.000 – 16.000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, 300 µl 70 % Ethanol zum Pellet hinzugefügt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Überschüssiges Ethanol wurde ebenfalls vorsichtig dekantiert und das DNA-Pellet für 10 Minuten an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl „Rehydration“ Lösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die DNA bei – 20° C gelagert.

## **6 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

### **6.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion**

Die PCR ist die Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnitts mittels flankierender Primer-Oligonukleotide und einer hitzestabilen DNA-Polymerase.

Die drei verschiedenen Phasen der Amplifikationszyklen einer PCR sind:

1. Denaturierungsphase: zuerst wird die doppelsträngige DNA bei 95 °C in Einzelstränge „aufgeschmolzen“.
2. Annealingphase: die Primer hybridisieren nach Abkühlung auf die Annealing-Temperatur mit dem jeweils komplementären Strang der nun einzelsträngigen Matrizen-DNA.
3. Elongationsphase: bei ca. 72 °C verlängert die DNA-Polymerase die Primer von ihrem 3'-Ende aus entsprechend dem Komplementärstrang.

Bei jedem Amplifikationszyklus werden diese Phasen durchlaufen und führen idealerweise zu einer exponentiellen Amplifizierung des durch die Primer flankierten DNA-Abschnitts.

Bei einer konventionellen PCR wird die Grösse und Menge an PCR-Produkt durch anschliessende Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung des Gels dokumentiert.

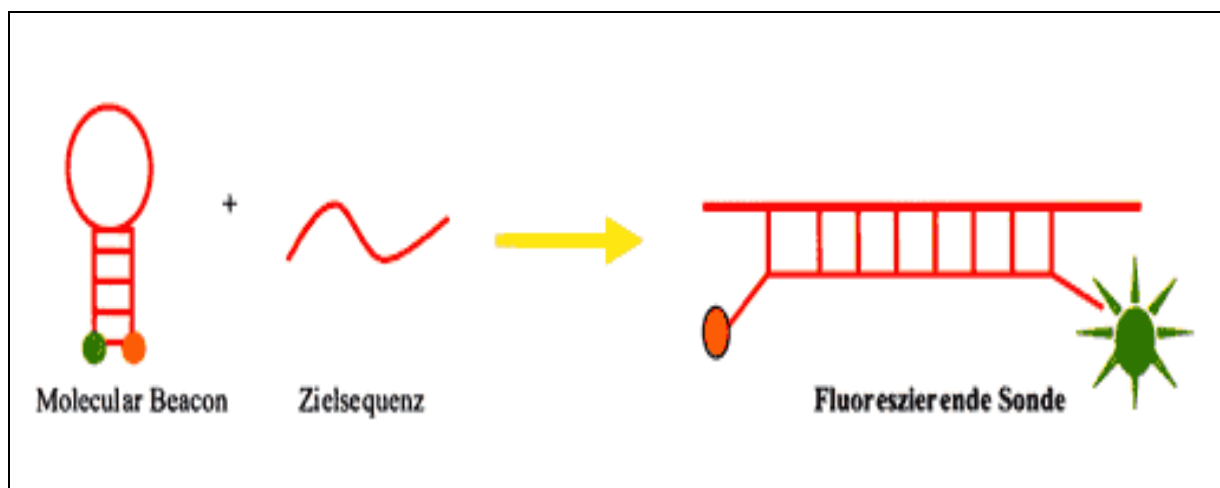
## 6.2 Real-Time PCR

Wie bei der konventionellen PCR, werden bei der Real-Time PCR Abschnitte der DNA vervielfältigt. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass die PCR-Produkte nicht erst nach Ende des PCR-Laufs, sondern während der einzelnen Amplifikationszyklen durch Hybridisierung Fluoreszenz-markierter Sonden oder Anlagerung von DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden können. Dadurch wird eine Quantifizierung der Zielsequenzen in Echtzeit ermöglicht. Auf die bei der konventionellen PCR nachfolgende Agarosegel-Elektrophorese kann somit verzichtet werden. Neben „real-time“-Quantifizierung sind damit die Einsparung von Arbeitsschritten und die geringe Kontaminationsgefahr weitere Vorteile.

Durch das Design von spezifischen Hybridisierungssonden kann das Problem der mangelnden Spezifität bei Verwendung von DNA-bindenden Farbstoffen gelöst werden. Hybridisierungssonden sind markierte Oligonukleotide, die an Sequenzabschnitten zwischen den „Primern“ binden. Die bevorzugt verwendeten Sondentypen sind: Molecular Beacons und TaqMan-Sonden. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Molecular Beacon-Sonden verwendet. Die Sonden besitzen am 3'-Ende ein Quencher-Molekül und am 5'-Ende ein Reporter-Molekül. Die Energie des Fluorophors mit dem höheren Energieniveau (Reporter-Molekül) wird auf das Fluorophor mit niedrigerem Energieniveau (Quencher-Molekül) übertragen, wenn diese Fluorophore in der Hybridisierungssonde benachbart zueinander liegen. Dabei wird die Fluoreszenz des Reporter-Moleküls zunächst unterdrückt („gequencht“) und es findet ein sog. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt.

#### **Molecular Beacons:**

Molecular Beacons sind Fluoreszenz-markierte Hairpin-Hybridisierungssonden. Die zum Zielstrang komplementäre Sequenz („Loop“) ist dabei am 5'- und am 3'-Ende um einen selbstkomplementären Sequenzabschnitt („Stem“) mit einer Basenlänge von etwa sechs Nukleotiden erweitert. Es entsteht die Haarnadelstruktur (Hairpin) des Moleküls. Dabei befinden sich Quencher- und Reportermolekül am 5'- und am 3'-Ende. Die Konformation des Moleküls in diesem Grundzustand, der Haarnadelstruktur, bedingt durch die räumliche Nähe des „Quenchers“ zum „Reporter“ die Unterdrückung einer messbaren Fluoreszenz. Die Haarnadel-Konformation wird durch den Hybridisierungsvorgang an der spezifische Zielsequenz aufgelöst, und durch die räumliche Trennung der beiden Fluorophore wird die Fluoreszenz des „Reporters“ messbar (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Molecular Beacons: Bei Hybridisierung der Sonde wird die Haarnadelstruktur aufgelöst, die Reporterfluoreszenz wird dadurch messbar (modifiziert nach [www.antibiotikamonitor.at](http://www.antibiotikamonitor.at)).

Bei den einzelnen PCR-Zyklen wird jeweils die Fluoreszenzzunahme gemessen. Die Fluoreszenz ist direkt proportional zu der Menge des PCR-Produkts. Für das vorliegende Projekt wurden Molecular Beacon-Sonden verwendet. Für die Piroplasmen Real-time PCR wurde ROX als Reporter und Dabcyl als Quencher verwendet. Für die *Babesia canis vogeli* spezifische Real-time PCR wurde HEX als Reporter und Dabcyl als Quencher verwendet.

Wird bei einer PCR die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl aufgetragen, ergibt sich daraus eine Kurve mit einer initial exponentiellen, einer linearen und einer, gegen Ende der Reaktion, plateauartigen Phase (s. Kap. Ergebnisse Abbildung 16). Dabei wird der Zeitpunkt des exponentiellen Fluoreszenzanstiegs durch die Ausgangsmengen an Ziel-DNA in der Probe bestimmt.

## 7 Agarosegel-Elektrophorese

Mittels Agarosegel-Elektrophorese erfolgt die analytische Auftrennung und Sichtbarmachung von DNA-Fragmenten aus PCR-Produkten. Dabei werden die DNA-Fragmente im elektrischen Feld durch einen Molekularsieb-Effekt aufgetrennt, dann mit Ethidiumbromid (interkalierender Fluoreszenzfarbstoff) gefärbt und durch UV-Licht sichtbar gemacht. Zum Längenvergleich diente ein parallel aufgetragener Standard mit DNA-Fragmenten bekannter Länge (DNA Gene Ruler). Die Agarosegel-Elektrophorese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Das Gemisch aus Agarose und Elektrophoresepuffer (TAE Puffer) wurde in der Mikrowelle aufgekocht, in den abgedichteten Gelschlitten gegossen und ein Gelkamm für die Probenaussparungen eingesetzt. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt, 5 mm hoch mit TAE-Puffer überschichtet und danach die Proben sowie der Längenstandard aufgetragen. Dazu wurden je 10 µl der zu analysierenden DNA mit 2-3 µl Probenauftragspuffer vermischt. Vom Längenstandard wurden jeweils 10 µl aufgetragen.

Die DNA wurde bei 120 Volt für ca. 60 min aufgetrennt. Danach wurde das Agarosegel für zehn Minuten in einem Ethidiumbromidbad (1 µg Ethidiumbromid/ml) gefärbt. Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basenpaare der DNA Doppelhelix ein, somit konnten im UV-Licht sichtbar gewordene DNA-Fragmente als fluoreszierende Banden fotografiert werden. Der mitgeführte Längenstandard diente zur Abschätzung der Größen und Konzentration der DNA-Fragmente.



## 8 Nachweis von *Babesia* spp. beim Hund

### 8.1 Real-Time PCR zur Detektion von Piroplasmen

Zum Nachweis von Piroplasmen wurde mit Hilfe der Primer PIR-2 und PIR-3 (Tabelle 4) ein ca.120 bp langes Fragment vom 3'-Ende der 18S rDNA amplifiziert. Die Sonde PIR-S3 (Tabelle 4) hybridisiert mit einer hochkonservierten Sequenz des Zielgens (s. Anhang 6, Zahler-Rinder et al., 2004).

Die Amplifikation erfolgte in einem iCycler (BioRad, München). Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 5 bzw. 6 wieder gegeben. Als Positivkontrolle diente genomische DNA von *Babesia canis vogeli*. Als Negativkontrolle wurde DNA von nicht infizierten Hunden verwendet.

**Tabelle 4:** Sequenzen der Primer und der Sonde der Piroplasmen Real-Time PCR.

PIR2, reverse primer	5'-CGA ATA ATT CAC CGG ATC AC-3'
PIR3, forward primer	5'-AAT CAT GAA CGA GGA ATG C-3'
PIR-S-3, Sonde	5'-cgc gat ACA CAC CGC CCG TCG CT tc gcg-3'
Modifikation	5'-ROX    3'-Dabcyl

**Tabelle 5:** Reaktionsansatz für die Piroplasmen Real-Time PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	9,55 µl	
PCR 10 x Puffer	2,5 µl	1 x
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	6,5 µl	6,5 mM
PIR2, 50 µM	0,5 µl	1 µM
PIR3, 50 µM	0,5 µl	1 µM
PIR-S-3, 50 µM	0,1 µl	0,1 µM
dNTP's, 10 mM	0,5 µl	0,5 mM
HotStarTaq Polymerase, 5U/µl	0,25 µl	1,25 U/Ansatz
DNA	5 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

**Tabelle 6:** PCR-Protokoll für Piroplasmen Real-Time PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Inkubation (zur Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase)	95°C	13 min	1 x
Denaturierung	95°C	30 sec	50 x
Annealing	50°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	

## 8.2 Real-time PCR zur Detektion von *B. canis vogeli*

Um eine Infektion mit *B. canis vogeli* nachzuweisen wurde eine spezifische Real-Time PCR zur Detektion des `internal transcribed spacers 2´ (ITS2) des rRNA-Gens von *B. canis vogeli* nach Zahler-Rinder et al. (2004) durchgeführt. Die Primer BC-2 und BC-3 und die Sonde BV-S2 (Tabelle 7) hybridisieren mit *B. canis vogeli*-spezifischen Sequenz der ITS2-Sequenz (s. Anhang 7).

### III. Material und Methoden

---

Die PCR wurde in einem iCycler (BioRad, München) durchgeführt. Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 8 bzw. 9 dargestellt. Es wurden die gleichen Positiv- und Negativkontrollen wie in der bereits beschriebenen Piroplasma Real-time PCR verwendet.

**Tabelle 7:** Sequenzen der Primer und der Sonde der *Babesia canis vogeli* spezifischen Real-Time PCR.

BC-2, reverse primer	5'-TGC TTA AAT TCA GCG GAT AG-3'
BC-3, forward primer	5'-TGT GTA TGT GAT ACC GAA TCT TC-3'
BV-S-2, Sonde	5'-cgc gat GTG AGC CGT CTG ACT CCG TGT atc gcg-3'
Modifikation	5'-HEX 3'-Dabcyl

**Tabelle 8:** Reaktionsansatz für die *Babesia canis vogeli* spezifische Real-Time PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest.	8,65 µl	
PCR 10 x Puffer	2,5 µl	1 x
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	6,5 µl	6,5 mM
BC-2, 50 µM	0,5 µl	1 µM
BC-3, 50 µM	0,5 µl	1 µM
BV-S-2, 50 µM	0,1 µl	0,1 µM
dNTP's, 10 mM	0,5 µl	0,5 mM
HotStarTaq Polymerase 5U/µl	0,25 µl	1,25 U/Ansatz
DNA	5 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

**Tabelle 9:** Reaktionsprotokoll für die *Babesia canis vogeli* spezifische Real-Time PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Inkubation (Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase)	95°C	13 min	1 x
Denaturierung	95°C	30 sec	50 x
Annealing	50°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	

### 8.3 PCR zur Detektion von *Babesia* spp. (nach Birkenheuer et al., 2003)

Die PCR nach Birkenheuer et al. (2003) ist eine konventionelle PCR zum Nachweis von *Babesia* spp.. Die Primer (Tabelle 10) 455-479F und 793-772R amplifizieren einen 340 bp grossen Abschnitt der 18S rRNA-Sequenz. Mit dieser PCR können *Babesia canis* spp. und *Babesia gibsoni* nachgewiesen werden (s. Anhang 8). Reaktionsansatz und PCR-Protokoll sind in den Tabellen 11 und 12 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Sequenzen der Primer der PCR nach Birkenheuer et al. (2003)

455-479F, reverse primer	5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG TGA C-3'
793-772R, forward primer	5'-ATG CCC CCA ACC GTT CCT ATT A-3'

**Tabelle 11:** Reaktionsansatz für die PCR nach Birkenheuer et al. (2003)

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	36,6 µl	
PCR 10 x Puffer	5,0 µl	1 x
455-479F, 100 µM	1,0 µl	25 pmol
793-772R, 100 µM	1,0 µl	25 pmol
dNTP's, 10 mM	1,0 µl	0,2 mM
HotStarTaq Polymerase 5 U/µl	0,4 µl	2,5 U/Ansatz
DNA	5 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

**Tabelle 12:** Reaktionsprotokoll für die PCR nach Birkenheuer et al. (2003)

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Inkubation (Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase)	95°C	5 min	1 x
Denaturierung	95°C	45 sec	40 x
Annealing	58°C	45 sec	
Elongation	72°C	45 sec	

## 9 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe des Statistischen Beratungslabors (STABLAB) des Instituts für Statistik der LMU München unter Verwendung des Programmpakets SPSS. Die Prävalenzen wurden in Microsoft Excel® erstellt. Konfidenzintervalle, d.h. die Intervalle, in dem sich der wahre Wert der Prävalenz um den zuvor errechneten Prozentwert bewegt, wurden mit Hilfe von Microsoft Excel® unter Zugrundelegung der Binomialverteilung bei einem Vertrauensbereich von 99 % errechnet. Um die Prävalenzen zu vergleichen, wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet und danach über Microsoft Excel® der Wert der Wahrscheinlichkeit (p), dass zwei Gruppen identisch sind, berechnet.

Der dabei erhaltene Wert wurde folgendermassen interpretiert:

- ist ein Wert grösser oder gleich 5 % ( $p < 0,05$ ) = kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Klassen
- ein Wert kleiner als 5 % ( $p > 0,05$ ) = ein signifikanter Unterschied.
- ein Wert unter 1 % ( $p > 0,01$ ) = ein hochsignifikanter Zusammenhang.

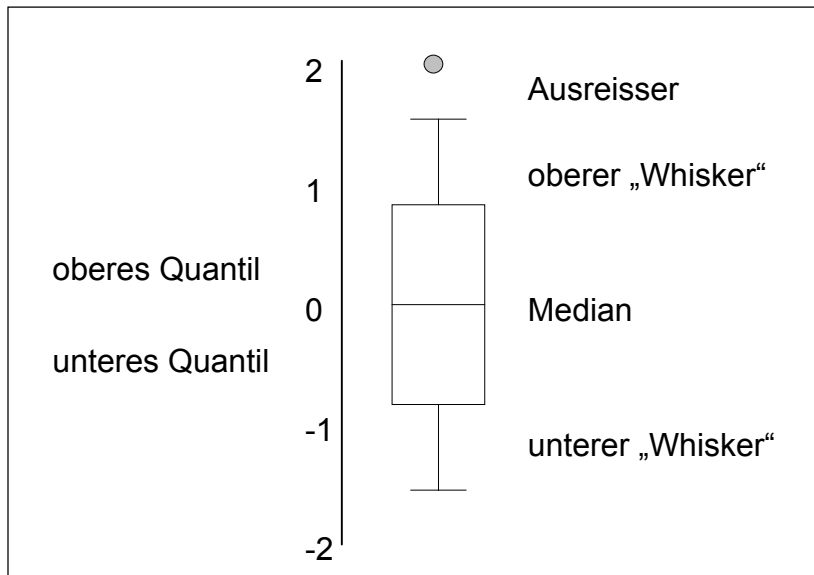
In Tabellen und im Text wurde jeweils der exakte p-Wert angegeben.

Der McNemar-Test wird auch als Vierfeldersymmetrietest bezeichnet, dabei steht hinter der Nullhypothese die Annahme, dass die Veränderungen in den Ausprägungen rein zufällig sind. Abseits der Hauptdiagonalen wird hier eine symmetrische Häufigkeitsverteilung erwartet. Weichen die beobachteten Häufigkeiten stark ab, so spricht dies gegen die Richtigkeit der Nullhypothese. Ist die Nullhypothese gültig, ist die Teststatistik approximativ chi-quadrat-verteilt mit einem Freiheitsgrad.

Die einseitige Signifikanz hat als Grundlage die Nullhypothese (kein Unterschied), testet jedoch auf eine Signifikanz in eine bestimmte Richtung, die vorher durch Unterschiede in Prävalenzen beobachtet wurde, d. h. ist die Prävalenz in Region A höher als in Region B testet die einseitige Signifikanz ob dieser beobachtete Unterschied wirklich signifikant ist. Die zweiseitige Signifikanz hat auch als Grundlage die Nullhypothese testet aber die Signifikanz nicht in eine Richtung, die vorher durch Prävalenzunterschiede beobachtet wurde, sondern testet die Richtigkeit der Nullhypothese (kein Unterschied).

Die graphische Darstellung der Hämatokritwerte erfolgte als Box-and-Whisker-Plot. Ein Box-and-Whisker-Plot verschafft einen guten Überblick über die Verteilung der Daten einer Stichprobe. Dabei wird in einem Koordinatensystem, der Interquartilsabstand  $q$  als Kasten (engl. box) eingezeichnet. Vom oberen bzw. unteren Ende wird dann eine Strecke bis zum maximalen bzw. minimalen Wert gezeichnet (oberer bzw. unterer „Whisker“). Diese darf nicht länger als das 1,5 fache des Interquartilsabstandes sein.

In dieser Position werden die mittleren 50 % der Daten im Kasten erfasst. Werte die ausserhalb dieser Grenze liegen, heissen Ausreisser und werden als Punkte dargestellt. Zusätzlich wird die Position des empirischen Medians und manchmal auch des Mittelwertes angegeben (Abbildung: 15).



**Abbildung 15:** Beispiel eines Box-and-Whisker-Plots





## IV Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden von insgesamt 385 Hunden aus drei verschiedenen Regionen im Bundesstaat Minas Gerais, Brasilien (Carrancas, Carlos Chagas, Igarapé) Blutproben auf Infektionen mit Babesien untersucht. Von 167 Hunden wurden Blutproben in der Trockenzeit (1. Probensammelperiode) und der Regenzeit (2. Probensammelperiode) genommen, von 106 Hunden nur in der Trockenzeit und von 114 nur in der Regenzeit. (s. Kap. Material und Methoden, Tabelle 3).

### 1. Prävalenz von *Babesia canis vogeli*

#### 1.1 Seroprävalenz

Zur Bestimmung der Seroprävalenz von *B. canis vogeli*-Infektionen wurden Blutproben von allen Hunden mittels einem Indirekten Immunfluoreszenz-antikörpertests (IFAT) untersucht. Insgesamt waren 30,0 % (82 von 273) der Hunde aus der ersten Probensammelperiode und 21,7 % (61 von 279) der Hunde aus der zweiten Probensammelperiode seropositiv (s. Tabelle 13). Dabei gab es zwischen den drei verschiedenen Regionen grosse Unterschiede. In der am höchsten gelegenen (1000m) südlichen Region Carrancas waren die Seroprävalenzen mit 2,8 % bzw. 2,9 % (erste bzw. zweite Sammelperiode der Hunde vom ländlichen Gebiet) am niedrigsten. In Carlos Chagas und Igarapé schwankte die Seroprävalenz zwischen Werten von 33 % bis 53 % für die Hunde aus den ländlichen Gebieten.

**Tabelle 13:** Seroprävalenzen von Antikörpern gegen *B. canis vogeli* bei Hunden in der Trocken- bzw. Regenzeit

Region/Lebensraum	1. Probensammelperiode (Trockenzeit)			2. Probensammelperiode (Regenzeit)		
	insgesamt n	positiv		insgesamt n	positiv	
		n	%		n	%
Carrancas/Land	100	3	2,8	71	2	2,9
Carrancas/Stadt	6	0	0,0	42	0	0,0
Carlos Chagas/Land	117	62	53,0	75	28	37,3
Carlos Chagas/Stadt	-	-	-	41	9	22,0
Igarapé/Land	50	17	34,0	29	15	51,7
Igarapé/Stadt	-	-	-	21	7	33,3
<b>Gesamt</b>	<b>273</b>	<b>82</b>	<b>30,0</b>	<b>279</b>	<b>61</b>	<b>21,7</b>

Die Verteilung der Anti-*B. canis vogeli*-Antikörpertiter von 104 Hunden, bei denen im IFAT Antikörper nachgewiesen wurden, ist in Tabelle 14 dargestellt. 57,6 % der Blutproben hatten einen Titer von 1:40 bis 1:640. 20,2 % der Blutproben zeigten einen Titer von mehr als 1:2560.

**Tabelle 14:** Verteilung der Anti-*Babesia canis vogeli*-Antikörpertiter in Hundebloodproben (n=104) im IFAT

	Titer									
	0	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Anzahl der Hunde	4	7	17	10	20	6	7	12	9	12
%	3,8	6,7	16,3	9,6	19,2	5,8	6,7	11,5	8,7	11,5

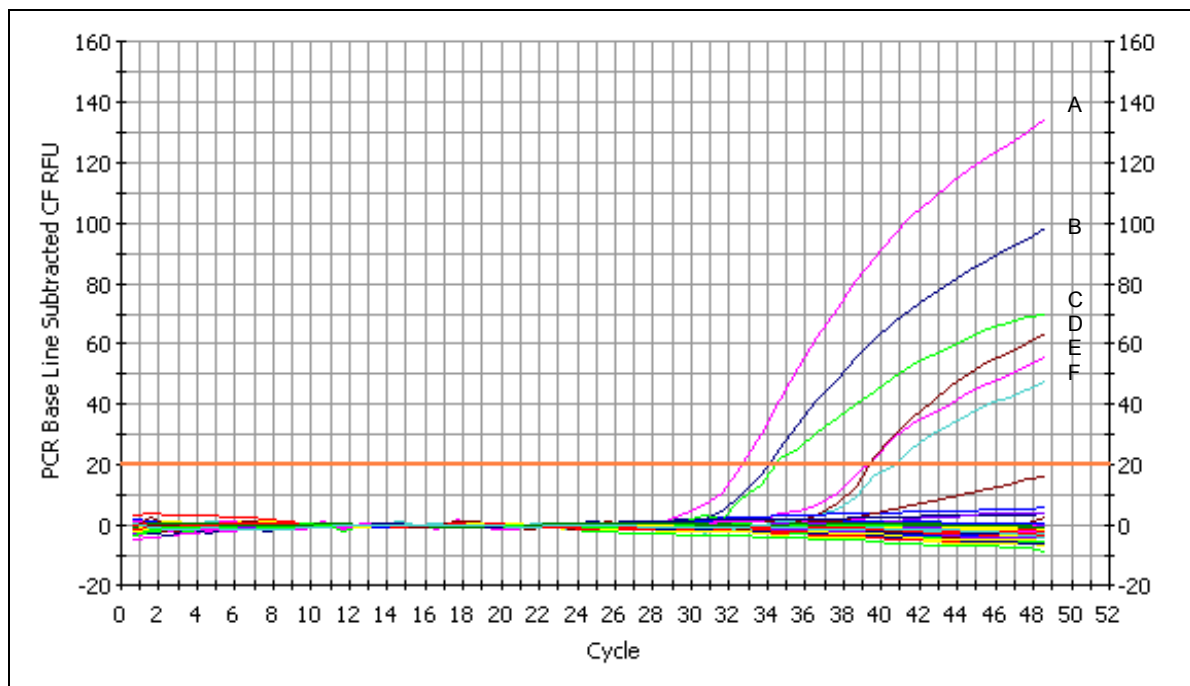
## 1.2 Prävalenz von *B. canis vogeli* im direkten Nachweis

### 1.2.1 Prävalenz mittels PCR

Alle Blutproben wurden durch Amplifikation der ITS2-Sequenz (internal transcribed spacer zwischen 5,8S und 28S rRNA-Genen) mittels Real-Time PCR auf Infektionen mit *B. canis vogeli* untersucht. Dabei wurde eine Probe als positiv definiert, wenn die ITS2-Sequenz vor dem 42. Zyklus amplifiziert wurde und die Zunahme der Fluoreszenz entsprechend einer exponentiellen Zunahme des PCR-Produktes, einen sigmoiden Kurvenverlauf aufwies (Abbildung 16).

## IV. Ergebnisse

Proben die nach dem 42. Amplifikationszyklus einen schwachen Anstieg aufwiesen, wurden als negativ bezeichnet, da die Ergebnisse der PCR ab diesem Zyklus wegen dem Auftreten von falsch positiven Amplifikaten nicht mehr als gesichert beurteilt werden können.



**Abbildung 16:** *B. canis vogeli* Real-Time PCR: Darstellung der Amplifikation in Form von relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU), wobei B) und C) den Kurvenverlauf der Positivkontrollen darstellen, A), D), E), und F) sind positive Proben, Hunde Nr. 111, 112, 106 und 92 aus der ersten Sammelperiode in Carlos Chagas.

Es waren 10,3 % (28 von 273) der Hunde der ersten Probensammelperiode und 8,2 % (23 von 279) der Hunde der zweiten Probensammelperiode positiv (s. Tabelle 15). Wie bei der Seroprävalenz waren auch bei den Ergebnissen der PCR grosse Unterschiede zwischen den Regionen. So war die Prävalenz in der Trockenzeit in Carlos Chagas mit 13,7 % am höchsten, vor Igarapé mit 12 % und Carrancas mit 5,7 % (nur Landhunde). In der Regenzeit war bei den Landhunden aus Carlos Chagas die Prävalenz mit 21,3 % erneut am höchsten vor Igarapé mit 3,5 % und Carrancas mit 1,4 %. In den Städten hingegen, war die Prävalenz von *B. canis vogeli* in Carrancas mit 9,5 % am höchsten vor Carlos Chagas mit 2,4 % und Igarapé mit 0,0 %.

**Tabelle 15:** PCR-Prävalenzen von *B. canis vogeli* bei Hunden in der Trocken- bzw. Regenzeit

Region/Lebensraum	1. Probensammelperiode (Trockenzeit)			2. Probensammelperiode (Regenzeit)		
	Gesamtzahl	positiv		Gesamtzahl	positiv	
		n	%		n	%
Carrancas/Land	100	6	5,7	71	1	1,4
Carrancas/Stadt	6	0	0,0	42	4	9,5
Carlos Chagas/Land	117	16	13,7	75	16	21,3
Carlos Chagas/Stadt	-	-	-	41	1	2,4
Igarapé/Land	50	6	12,0	29	1	3,5
Igarapé/Stadt	-	-	-	21	0	0,0
<b>Gesamt</b>	<b>273</b>	<b>28</b>	<b>10,3</b>	<b>279</b>	<b>23</b>	<b>8,2</b>

### 1.2.2 Prävalenz im Blutausstrich

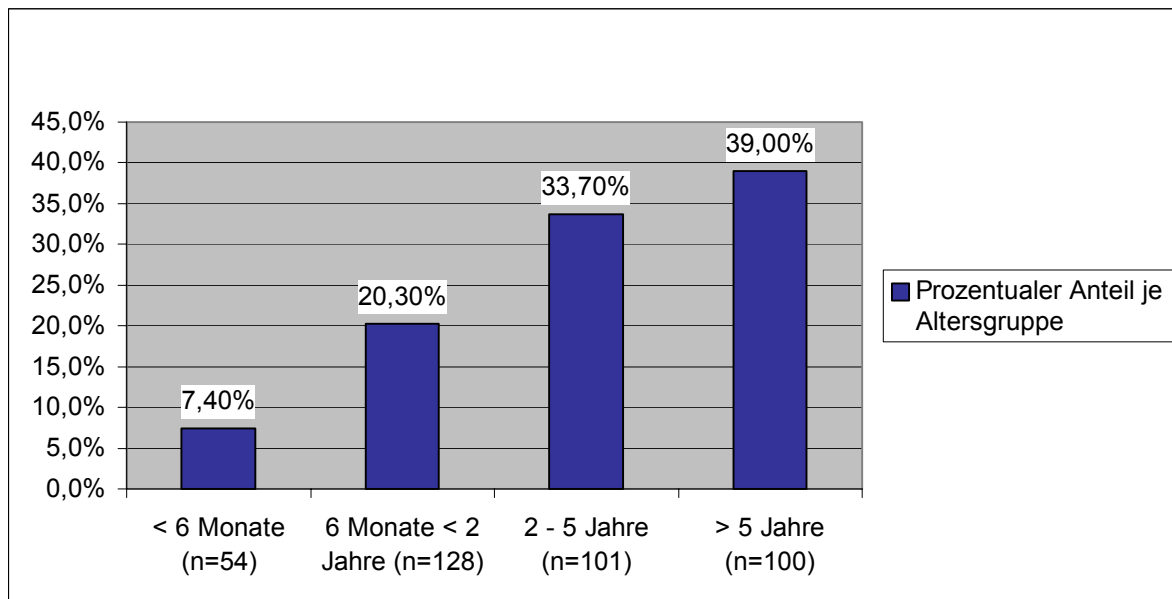
Von allen Hunden wurden Blutausstriche angefertigt und lichtmikroskopisch auf Babesien untersucht. In der ersten Probensammelperiode waren zwei von 273 Blutproben (0,7 %) positiv, in der zweiten Probensammelperiode waren die Blutausstriche von allen Blutproben negativ.

## 2 Statistische Datenanalyse zur Prävalenz von *B. canis vogeli*

### 2.1 Seroprävalenz und Alter

Bei der statistischen Auswertung zur Beziehung zwischen Seroprävalenz und Alter wurden Daten von 383 Hunden berücksichtigt, bei denen nur einmal Proben genommen wurden.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte eine steigende Seroprävalenz mit zunehmendem Alter der Hunde. Die Verteilung auf die verschiedenen Altersgruppen ergab sich wie folgt: 7,4 % der unter sechs Monate alten Hunde waren positiv, 20,3 % der sechs Monate bis zwei Jahre alten Hunde, 33,7 % der zwei bis fünf Jahre alten und 39,0 % der über fünf Jahre alten Hunde (s. Abbildung 17).



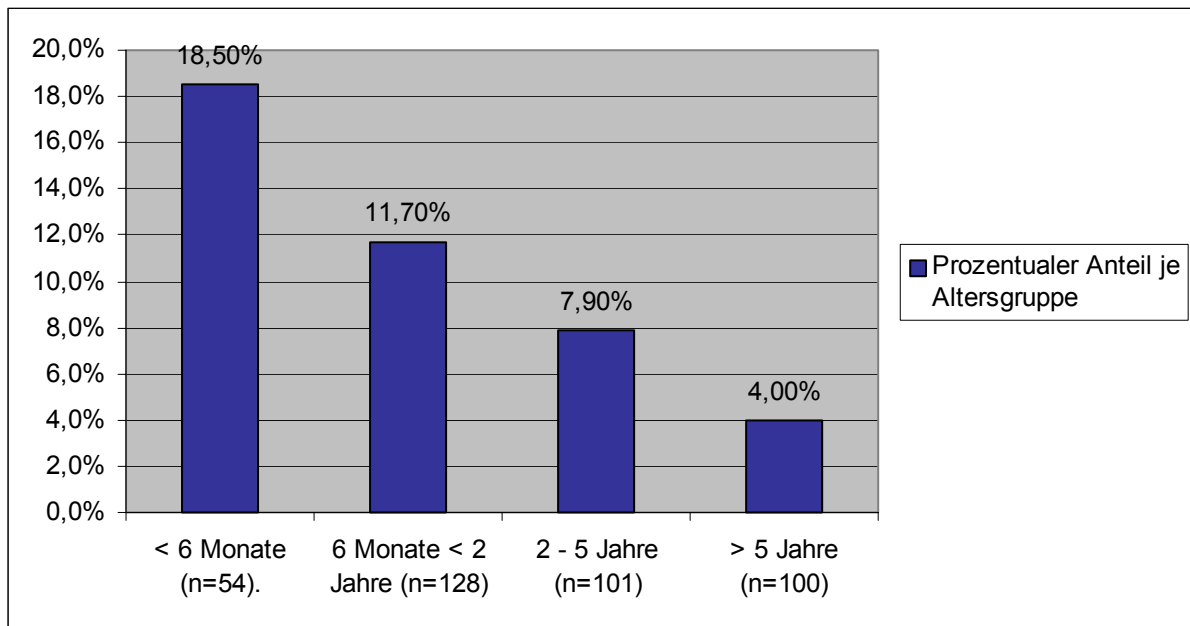
**Abbildung 17:** Seroprävalenzen von Antikörpern gegen *B. canis vogeli* bei Hunden in den verschiedenen Altersgruppen

Die statistische Auswertung zeigte einen hochsignifikanten Unterschied (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,00\%$ ) der Seroprävalenzen zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen (Anhang 9).

### 2.2 PCR-Prävalenz und Alter

Zur Analyse dieser Faktoren wurden Daten derselben 383 Hunde, die in Kap. 2.1. aufgeführt wurden, verwendet.

Der Zusammenhang zwischen PCR-Prävalenz und Alter stellte sich in den verschiedenen Altersgruppen folgendermassen dar: 18,5 % der unter sechs Monate alten Hunde, 11,7 % der sechs Monate bis zwei Jahre alten Hunde, 7,9 % der zwei bis fünf Jahre alten und 4,0 % der über fünf Jahre alten Hunde waren positiv (s. Abbildung 18). Dabei zeigte sich mit zunehmendem Alter der Hunde eine Abnahme der PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli*.



**Abbildung 18:** PCR-Prävalenzen von *B. canis vogeli* bei Hunden in den verschiedenen Altersgruppen

Zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen und der PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli* zeigte sich statistisch ein signifikanter Unterschied (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,023$  %; s. Anhang 9).

### 2.3 Prävalenz und Geschlecht der Hunde

Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens und unterschiedlichen Haltungsarten von männlichen und weiblichen Hunden in Brasilien wurde ein eventuell bestehender Zusammenhang zwischen PCR-Prävalenz bzw. Seroprävalenz und dem Geschlecht (männlich/weiblich) überprüft.

In die statistische Auswertung zur Beurteilung einer Korrelation zwischen PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli* und dem Geschlecht der Hunde gingen Daten von 385 Tieren ein (nur einmalige Probenentnahme je Hund). Von den 167 Hunden mit zwei Probenentnahmen wurden nur die Daten aus der ersten Probensammelperiode verwendet.

Die Auswertung der PCR-Prävalenzen bzw. der Seroprävalenzen hinsichtlich des Geschlechts der Hunde ergab folgende Verteilung: 7,1 % der weiblichen und 10,8 % der männlichen Tiere waren in der Real-Time PCR positiv (Tabelle 16) und 19,0 % der weiblichen und 30,9 % der männlichen Hunde waren im Indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) positiv (Tabelle 16). Die Anzahl positiver Ergebnisse lag bei den männlichen Tieren in der Real-Time PCR ungefähr 1/3 und im IFAT um ca. 2/5 höher als bei den weiblichen Tieren. In der statistischen Auswertung war der Zusammenhang zwischen PCR-Prävalenz und dem Geschlecht der Hunde jedoch nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,276$ ; s. Anhang 9).

**Tabelle 16:** PCR-Prävalenzen und Seroprävalenzen von *B. canis vogeli* bei den Geschlechtern (männlich/weiblich)

	Weiblich (n = 126)		Männlich (n = 259)	
	positiv		positiv	
	n	%	n	%
Real-Time PCR	9	7,10	28	10,80
IFAT	24	19,00	80	30,90

Zwischen den Seroprävalenzen und dem Geschlecht der Hunde besteht ein signifikanter Unterschied (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,015$  %; s. Anhang 9).

### 2.4 Prävalenz und Hämatokritwert

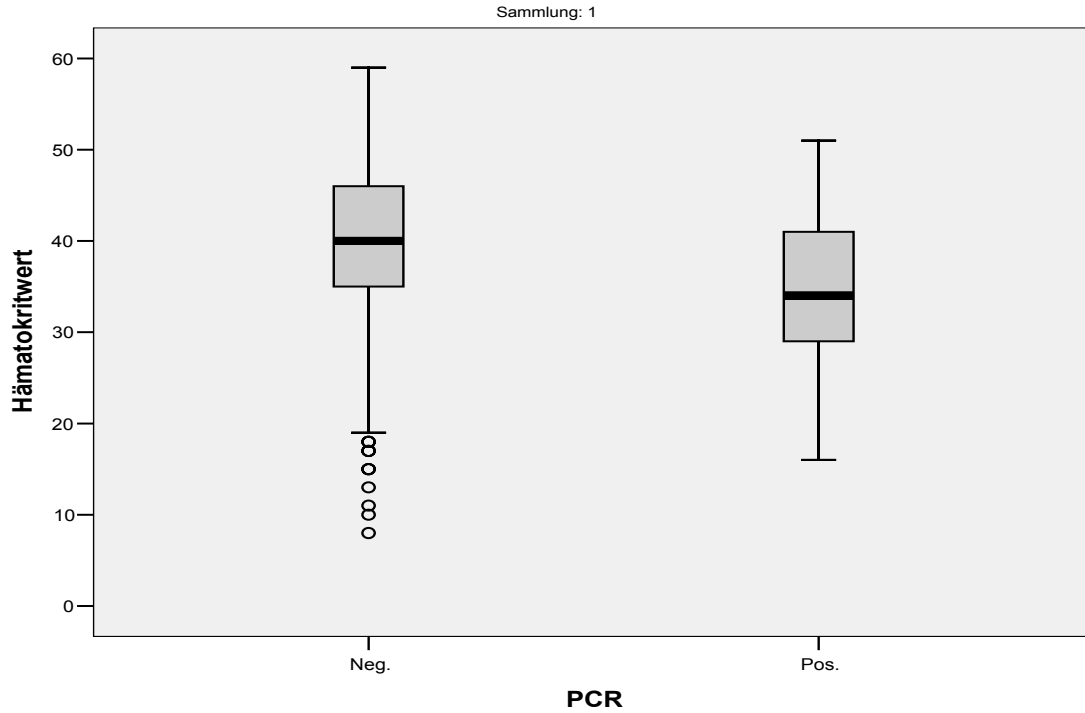
Zu den typischen Symptomen der Caninen Babesiose zählt die Anämie. Der Hämatokrit kann hierbei als eine entsprechende Messgrösse dienen. In der vorliegenden Studie war es von Interesse die Beziehung zwischen PCR-Prävalenz bzw. Seroprävalenz von *B. canis vogeli* und dem Hämatokritwert, zu überprüfen.

Bei der Analyse der Hämatokritwerte lagen von 383 Hunden (s. Kap. 2.3.) Hämatokritwerte vor.

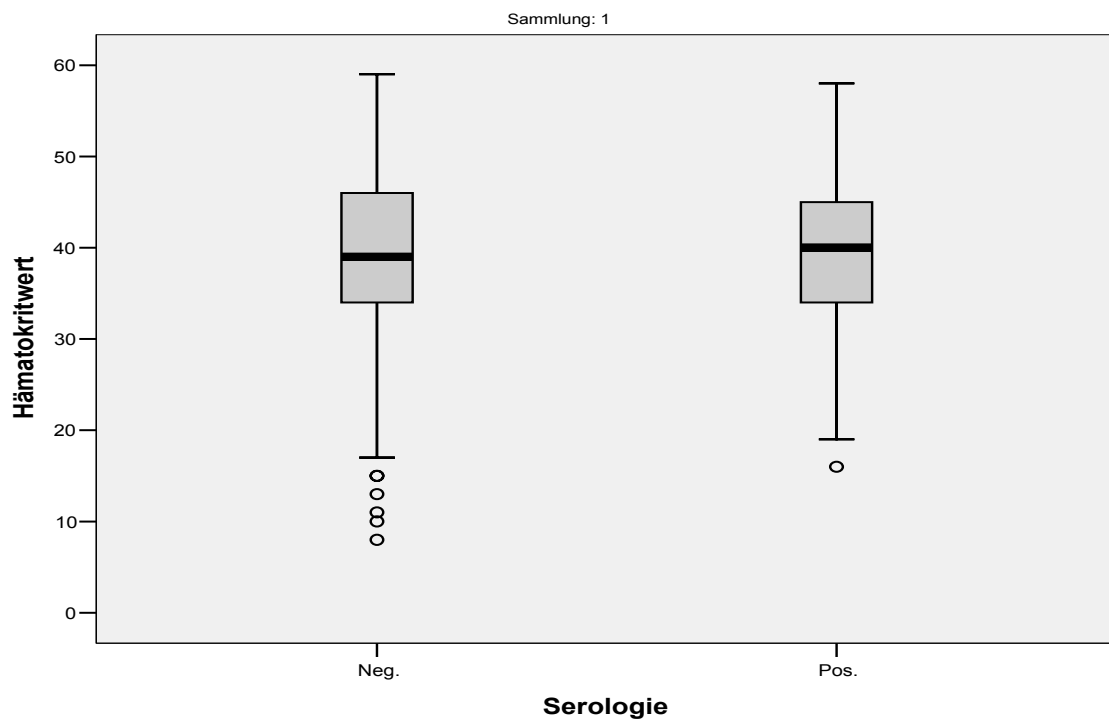
## IV. Ergebnisse

---

Es waren insgesamt 37 Hunde in der Real-Time PCR und 104 Hunde im IFAT positiv. Die Verteilung der Hämatokritwerte ist in Abbildung 19 und 20 ersichtlich.



**Abbildung 19:** Grafische Darstellung der Beziehung zwischen PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli* dem Hämatokritwert



**Abbildung 20:** Grafische Darstellung der Beziehung zwischen der Seroprävalenz gegen Antikörper von *B. canis vogeli* und dem Hämatokritwert



Die statistische Auswertung zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli* und dem Hämatokritwert (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,001$ ; Anhang 9: Tabelle 29) aber keinen signifikanten Unterschied zwischen Seroprävalenz und Hämatokritwert (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,877$  %; Anhang 9).

Hunde die mit Babesien infiziert waren, wiesen einen signifikant niedrigeren Hämatokritwert auf. Bei seropositiven Hunden bestand kein Zusammenhang, zwischen Seroprävalenz und dem Hämatokritwert.

## 2.5 Prävalenz und Trocken- bzw. Regenzeit

Klimatische Unterschiede haben wegen ihrer Auswirkung auf die Häufigkeit von Vektorzecken möglicherweise auch einen grossen Einfluss auf die Prävalenz von *B. canis vogeli*. Deshalb war es von Interesse die Beziehung zwischen Prävalenz und Trocken- bzw. Regenzeit zu untersuchen. Dabei wurden nur Daten der Hunde ( $n = 167$ ) ausgewertet von denen sowohl in der Trocken- als auch in der Regenzeit Proben genommen wurden, um den Einfluss durch andere Faktoren (z. B. Alter) zu vermeiden. Die einzelnen PCR-Prävalenzen und Seroprävalenzen zur Trocken- bzw. Regenzeit sind in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** PCR-Prävalenzen und Seroprävalenzen von *B. canis vogeli* zur Trocken- bzw. Regenzeit

	Trockenzeit		Regenzeit			
	Gesamtzahl	positiv		Gesamtzahl	positiv	
	n	n	%	n	n	%
Real-Time PCR	167	15	9,98	167	18	10,78
IFAT	167	46	27,55	167	44	26,35

Weder für die Seroprävalenz (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,856$ ) noch für die PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli* (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,711$ ) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Trocken- und Regenzeit festgestellt werden (statistische Tabellen s. Anhang 9).

## **2.6 Prävalenz und Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde**

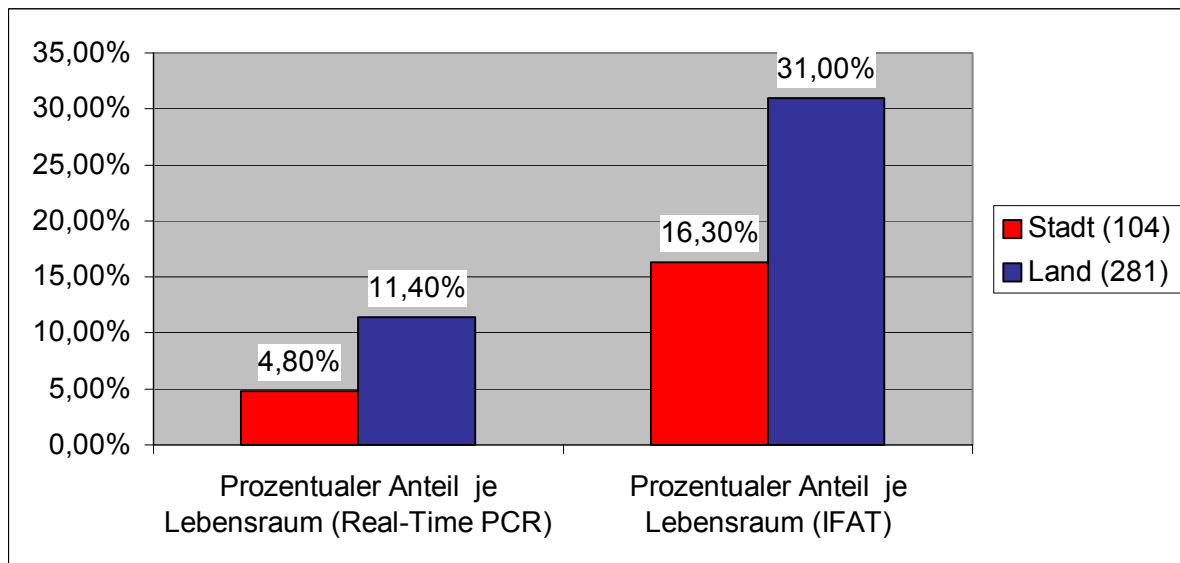
In Brasilien gibt es grosse Unterschiede in der Haltung von Hunden. In den Städten Brasiliens werden Hunde hauptsächlich im Haus oder an der Kette im Garten gehalten, wodurch ein Kontakt mit Wildtieren fast ausgeschlossen ist. Auf dem Land werden die Hunde „freilaufend“ gehalten und zur Arbeit (Gauchos) mitgenommen. Dadurch haben sie Kontakt zu Wild- und Haustieren, weshalb untersucht wurde, ob zwischen der Prävalenz von *B. canis vogeli* und der Herkunft (Lebensraum) der Hunde ein Zusammenhang besteht.

### **2.6.1 Ergebnisse für die Gesamtzahl der Hunde**

Es wurden die Daten von 383 Hunden verwendet. Von den 167 Hunden mit zwei Probenentnahmen wurden nur die Daten aus der ersten Probensammelperiode verwendet. 104 Hunden waren aus der städtischen und 279 Hunden aus der ländlichen Umgebung.

Die Analyse der PCR-Prävalenz hinsichtlich der Lebensräume (Stadt/Land) ergab folgende Verteilung: 4,8 % der Stadthunde (Anzahl: 5) und 11,4 % der Landhunde (Anzahl: 32) waren in der Real-Time PCR positiv (s. Abbildung 21). Damit waren anteilig gesehen mehr als doppelt so viele Landhunde wie Stadthunde infiziert.

Die Verteilung der Seroprävalenzen auf die Lebensräume (Stadt/Land) stellte sich folgendermassen dar: 16,3 % der Stadthunde (Anzahl: 17) und 31,0 % der Landhunde (Anzahl: 87) waren positiv (s. Abbildung 21). Ungefähr doppelt so viele Landhunde wie Stadthunde waren seropositiv.



**Abbildung 21:** Beziehung zwischen Seroprävalenzen bzw. PCR-Prävalenzen von *B. canis vogeli* und dem Lebensraum der Hunde

Die statistische Datenauswertung ergab, zusammengefasst, für die PCR-Prävalenzen einen gerade nicht mehr signifikanten Unterschied (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,053$ ) und bei den Seroprävalenzen war der Unterschied in Bezug auf den Lebensraum der Hunde signifikant (s. Anhang 9).

### 2.6.2 Auswertung getrennt für Carrancas, Carlos Chagas und Igarapé

#### 2.6.2.1 Beziehung zwischen PCR-Prävalenz und Lebensraum

In der Region Carrancas wurden Prävalenz-Daten von 42 Stadthunden und 106 Landhunden, in Carlos Chagas von 41 Stadthunden und 125 Landhunden und in Igarapé von 21 Stadthunden und 29 Landhunden (einmalige Probenentnahme) für die statistische Auswertung verwendet. Dabei wurde die Prävalenz abhängig vom Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde bewertet (Daten der Landhunde wurden aus der jeweils ersten Probensammlung entnommen).

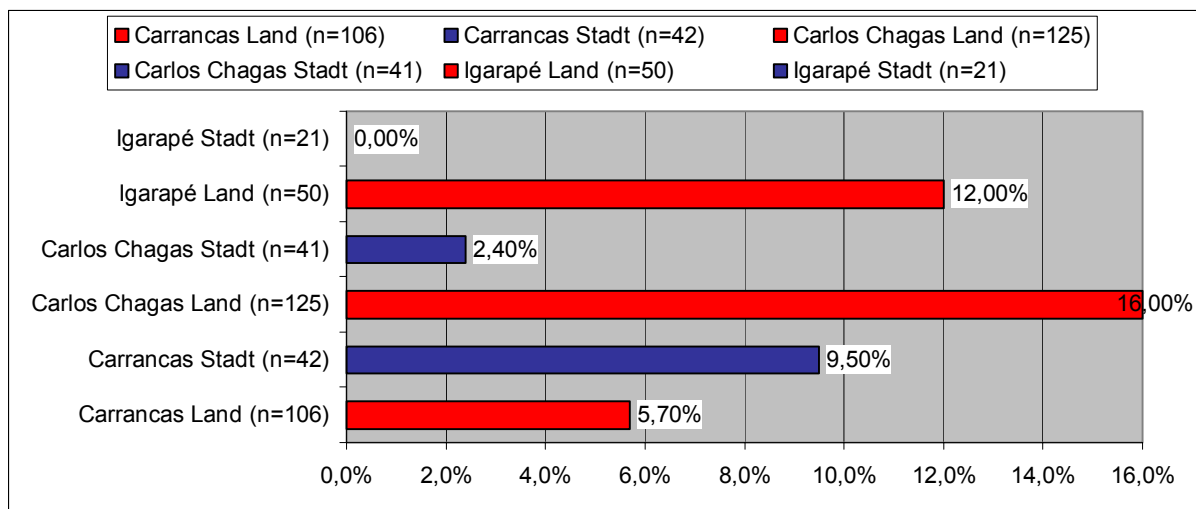
## IV. Ergebnisse

---

In Carrancas waren 9,5 % der Stadthunde (Anzahl: 4) und 5,7 % der Landhunde (Anzahl: 6) positiv (s. Abbildung 22). Hier zeigte sich im Gegensatz zu Carlos Chagas und Igarapé eine höhere Prävalenz bei den, aus der städtischen Umgebung stammenden, Hunden.

In Carlos Chagas waren 2,4 % der Stadthunde (Anzahl: 1) und 16,0 % der Landhunde (Anzahl: 20) positiv (s. Abbildung 21). Hier ist die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit *Babesia canis vogeli* auf dem Land sechseinhalb mal höher als in der Stadt.

Von den aus Igarapé stammenden Hunden war keiner der Stadthunde aber 12,0 % der Landhunde (Anzahl: 6) positiv (s. Abbildung 21).



**Abbildung 22:** Beziehung zwischen PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli* und Lebensraum der Hunde getrennt nach Regionen

In den Regionen Carrancas (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,470$ ) und Igarapé (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,170$ ), konnte kein Zusammenhang zwischen PCR-Prävalenz und Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde festgestellt werden.

In der Region Carlos Chagas war die Beziehung zwischen Prävalenz und dem Lebensraum der Hunde signifikant (statistische Tabellen s. Anhang 9).

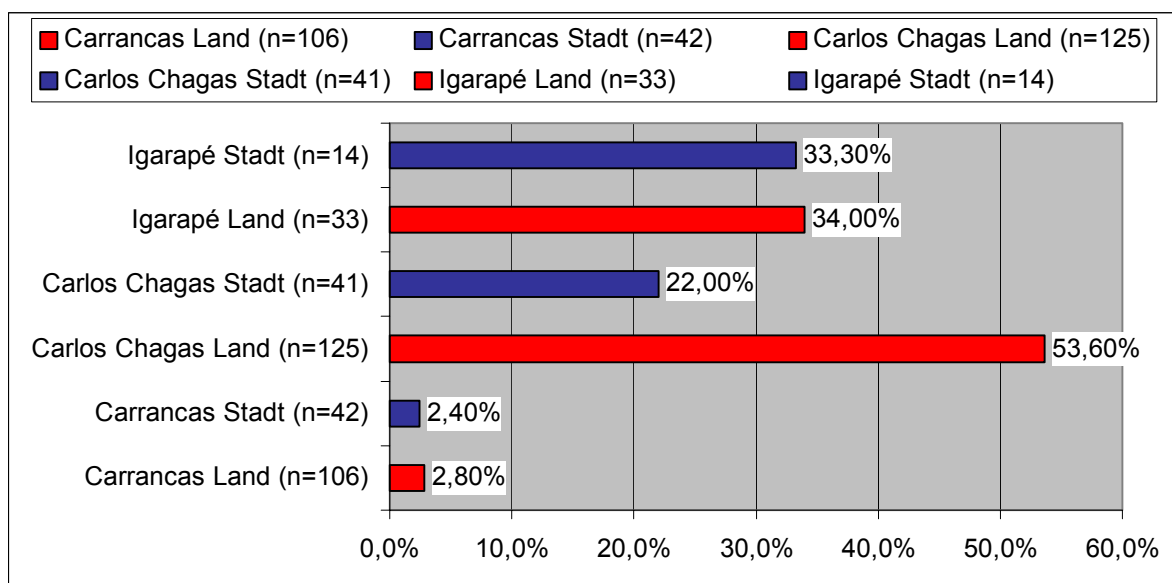
### 2.6.2.2 Beziehung der Seroprävalenz und Lebensraum

Es wurden Daten der unter Kap. 2.6.2. a) aufgeführten Hunde verwendet und die Beziehung zwischen Seroprävalenzen und dem Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde statistisch ausgewertet (verwendete Daten der Landhunde stammen aus der ersten Probensammelperiode).

In Carrancas war kein Unterschied zwischen Seroprävalenzen und den Lebensräumen der Hunde feststellbar: 2,4 % der Stadthunde (Anzahl: 1) und 2,8 % der Landhunde (Anzahl: 3) waren seropositiv (s. Abbildung 23).

In Carlos Chagas waren 22,0 % der Stadthunde (Anzahl: 9) und 53,6 % der Landhunde (Anzahl: 67) seropositiv (s. Abbildung 22). Die Seroprävalenz ist dort auf dem Land ungefähr 2,5 mal höher als in der Stadt.

In Igarapé war die Zahl der positiven Stadt- bzw. Landhunde vergleichbar, 33,3 % (Anzahl:7) bzw. 34,0 % (Anzahl: 17). Von 17 Landhunden und sieben Stadthunden fehlten Daten zur Auswertung).



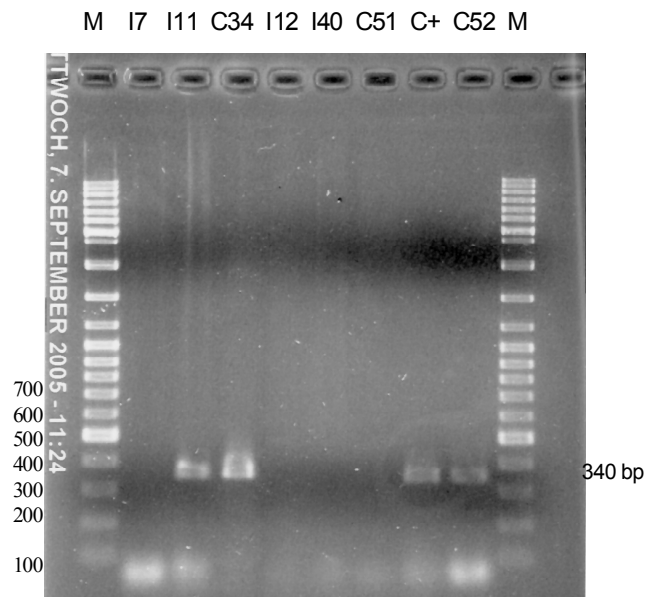
**Abbildung 23:** Seroprävalenzen von Antikörpern gegen *B. canis vogeli* bei Hunden hinsichtlich der Herkunft (Stadt/Land) der Hunde

Die statistische Auswertung ergab für die Regionen Carrancas und Igarapé (bei beiden Chi-Quadrat-Test:  $p = 1,000$ ) keine Korrelation zwischen Seroprävalenz und den Lebensräumen der Hunde. In der Region Carlos Chagas konnte hingegen ein hochsignifikanter Unterschied (Chi-Quadrat-Test:  $p = 0,001$ ) der Seroprävalenzen festgestellt werden (statistische Tabellen s. Anhang 9).

### **3 Untersuchungen zur Prävalenz anderer *Babesia* spp. mittels PCR**

Wie bereits beschrieben (Kap. 3. in der Literaturübersicht), wurden in Brasilien bei Hunden bisher nur Infektionen mit *B. canis vogeli*, nachgewiesen. Um eventuelle Infektionen mit anderen *Babesia* spp. zu identifizieren, wurden zunächst alle 552 Blutproben mit einer spezifischen Real-Time PCR auf das 18S rRNA-Gen von Piroplasmen untersucht (s. Kap. 7.1, Material u. Methoden). Von den 552 Blutproben waren 351 Proben positiv. Ein Homologievergleich der 18S-rRNA-Gensequenzen von Babesien, Theilerien und Hepatozoen (s. Anhang 8) zeigte, dass mit dieser PCR auch die DNA von *Hepatozoon* spp. amplifiziert wird. In Brasilien liegt die Prävalenz von Infektionen mit *Hepatozoon canis* bei 40 % (O'Dwyer et al., 2001). Dadurch erklärt sich die hohe Anzahl positiver Proben in der Piroplasmen-PCR im Vergleich zur spezifischen *B. canis vogeli*-PCR. Für den Nachweis, ob unter den 351 Piroplasmen-positiven Proben neben *B. canis vogeli* andere *Babesia* spp. vorkommen wurden diese Proben mit einer *Babesia*-spezifischen konventionellen PCR untersucht (s. Kap. 8.3, Material u. Methoden).

Die Amplifikation mit den *Babesia* spp. spezifischen Primern ergibt nach Auftrennung in der Agarosegel-Elektrophorese eine Bande von 340 bp. In Abbildung 23 ist ein Beispiel für die Untersuchung der Proben mit dieser PCR dargestellt.



**Abbildung 23:** Nachweis von *Babesia* spp. Injektion bei Hunden durch PCR-Amplifikation eines 340 bp grossen 18S rRNA-Genabschnittes (PCR nach Birkenheuer et al., 2003). Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. M = DNA-Längenstandard. Die Proben I7, I12, I40, C51 zeigen nicht infizierte Tiere. Die Proben I11, C34, C52 infizierte Tiere. C+ zeigt die Positivkontrolle. (C = Carlos Chagas, I = Igarapé)

Da mit der konventionellen *Babesia* spp.-spezifischen PCR keine Differenzierung von Infektionen mit *B. canis vogeli* und anderen Babesien möglich ist konnten nur die Proben beurteilt werden, die in der Piroplasmen-PCR positiv und in der *B. canis vogeli*-PCR negativ waren. Von diesen verbleibenden 300 Blutproben waren alle in der *Babesia* spp.-spezifischen PCR negativ.





## V Diskussion

In Brasilien ist die Babesiose bei Hunden weit verbreitet. Eine retrospektive Studie klinischer Fälle von Caniner Babesiose von März 1998 bis September 2001 in der Veterinärmedizinischen Klinik in Belo Horizonte ergab, dass bei 145 Hunden (74,7 %) von 194 Verdachtsfällen eine Babesiose bestätigt wurde und bei 61 Hunden (42 %) Babesien im Blutausstrich nachgewiesen wurden (Bastos et al., 2004). In einer anderen Studie zur Infektion mit *Hepatozoon canis* in sieben Regionen des Bundesstaats Rio de Janeiro konnten bei 13 (5,2 %) von 250 untersuchten Hunden im Ausstrich Babesien nachgewiesen werden (O'Dwyer et al., 2001). Bisher wurde in Brasilien ausschliesslich *B. canis vogeli* beim Hund nachgewiesen (Passos et al., 2004). Diese Studien belegen die zunehmende Bedeutung der Caninen Babesiose in Brasilien und machen dort weitere Studien zur Epidemiologie nötig.

### 1 Prävalenz von *Babesia canis vogeli*

Während zwei Probensammelperioden, in Brasilien, wurden von April 2004 bis Februar 2005 von 385 Hunden aus drei unterschiedlichen Regionen in Minas Gerais (Carrancas, Carlos Chagas und Igarapé) 552 Blutproben genommen und mikroskopisch, serologisch und molekularbiologisch auf Babesien untersucht. Von 167 Hunden konnten sowohl in der Trocken- als auch der Regenzeit Blutproben entnommen werden. Die erste Probensammelperiode (Juni/Juli 2004) fand während der Trockenzeit, die zweite Probensammelperiode (November/Dezember 2004) zur Regenzeit statt. Während der ersten Probensammelperiode wurden nur Proben von Hunden aus der ländlichen Umgebung der jeweiligen Städte genommen. Bei der zweiten Probensammelperiode wurden sofern möglich erneut Proben von den gleichen Hunden aus der ersten Sammelperiode genommen und darüber hinaus Proben von Hunden aus den jeweiligen Städten. Die Blutausstriche wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Aus den Blutproben wurde DNA extrahiert und mittels Real-Time PCR auf Piroplasmen und spezifisch auf *B. canis vogeli* untersucht. Des Weiteren wurde mit allen Proben ein Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) auf *B. canis* spp. durchgeführt.

In der ersten Probensammelperiode waren 10,3 % (PCR) der Hunde mit *B. canis vogeli* infiziert, in der zweiten Probensammelperiode 8,2 %, wobei es deutliche Unterschiede zwischen den drei untersuchten Regionen in Minas Gerais gab. Am höchsten war die Infektionsrate in Carlos Chagas (erste Sammelperiode: 13,7 %; zweite Sammelperiode: 21,3 % auf dem Land, 2,4 % in der Stadt) gefolgt von Igarapé (erste Sammelperiode: 12 %; zweite Sammelperiode: 3,5 % auf dem Land, 0,0 % in der Stadt) und Carrancas (erste Sammelperiode: 5,7 %; zweite Sammelperiode: 1,4 % auf dem Land, 9,5 % in der Stadt). Die unterschiedlichen Prävalenzen in den drei Gebieten lassen sich wahrscheinlich auf klimatische Gegebenheiten zurückführen. Carlos Chagas liegt im Nord-Osten von Minas Gerais, nahe der Grenze zum Bundesstaat Bahia auf 159 m Höhe. Dort betragen die Temperaturen zur Trockenzeit 20°C bis 31°C und zur Regenzeit 22°C bis 34°C. Die relative Luftfeuchtigkeit beträgt 79 % und die durchschnittliche Niederschlagsmenge 1059 mm pro Jahr. Das Klima ist dort das ganze Jahr sehr warm. Igarapé liegt in der Mitte des Bundesstaates auf 780 m Höhe mit Temperaturwerten von 16°C bis 26°C zur Trockenzeit und 20°C bis 28°C zur Regenzeit und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 76,2 % bei einer Niederschlagsmenge von 1272 mm pro Jahr. Carrancas liegt im Süden des Bundesstaates Minas Gerais auf 1060 m Höhe. Die Durchschnittstemperaturen betragen hier 13°C bis 26°C in der Trockenzeit und 19°C bis 28°C in der Regenzeit mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 76 % und einer Niederschlagsmenge von 1470 mm jährlich (s. Material und Methoden, Kap.1). Hier ist es im Winter kalt und trocken, im Sommer aber warm und feucht. Das ganzjährig vorherrschende warme Klima führt in Carlos Chagas zu einer höheren Zeckenzahl während des ganzen Jahres als in Carrancas. Auch bei den beiden Probensammlungen konnte bei den Hunden aus der Region Carlos Chagas eine deutlich höhere Anzahl an Zecken auf den Hunden beobachtet werden. Daher besteht in Carlos Chagas auch ein höheres Infektionsrisiko für Krankheiten, die von Zecken übertragen werden. Eine Studie zur Befallsintensität und dem abgesammelten Zeckenspektrum wird von der brasilianischen Seite, die an diesem Projekt beteiligt ist, durchgeführt.

Die Ergebnisse der Seroprävalenzen zeigten eine ähnliche Verteilung. So ergab sich für Carlos Chagas auch eine höhere Seroprävalenz (erste Sammelperiode: 53 %; zweite Sammelperiode: 37,3 % auf dem Land, 22 % in der Stadt) als in Igarapé (erste Sammelperiode: 34 %; zweite Sammelperiode: 51,7 % auf dem Land, 33,3 % in der Stadt) und Carrancas (erste Sammelperiode: 2,8 %; zweite Sammelperiode: 2,8 % auf dem Land, 0,0 % in der Stadt).

Bei der Auswertung der Blutausstriche waren nur zwei Blutproben schwach positiv, ein Hund aus Carlos Chagas und ein Hund aus Igarapé. Die geringe Anzahl der positiv bewerteten Blutausstriche ist darauf zurückzuführen, dass mit Babesien infizierte Erythrozyten nur während einer sehr kurzen Zeit – der akuten Phase - im Blutausstrich nachweisbar sind und die Parasitämie bei Infektionen mit *B. canis vogeli* niedrig ist (Passos, persönl. Mitteilung). Eine Erklärung ist die, im Vergleich zu *B. canis rossi* und *B. canis canis* geringere Pathogenität, die zu einer höheren Überlebensrate von Hunden bei Infektionen mit *B. canis vogeli* führt. Ältere Hunde mit einer vorausgegangenen Babesien-Infektion entwickeln eine partielle, Immunität gegen Sporozoitien und Merozoiten, welche die Parasitämie bei Reinfektionen suprimiert (Homer et al., 2000). Aufgrund der geringeren Parasitämie von *B. canis vogeli*-Infektionen sind auch klinische Symptomatiken während der akuten Phase selten (Uilenberg et al., 1989; Hauschild und Schein 1996; Eckert et al., 2005).

Da es sich hier um eine Feldstudie handelt und die Hunde nicht nach Verdacht auf eine Infektion mit einem Hämoparasiten ausgewählt wurden, sondern rein zufällig, ist die Wahrscheinlichkeit gering Proben von vielen Hunden, die sich gerade in der akuten Phase der Infektion befinden, zu erhalten.

Bei der Auswertung der Blutausstriche wurden auch einige Infektionen mit *Hepatozoon* spp. festgestellt, die wiederum die Unterschiede der Prävalenzen zwischen der *B. canis vogeli* Real-Time PCR und der Piroplasmen-PCR erklären.

Die großen Unterschiede, die sich bei den Prävalenzen der Ergebnisse der beiden Real-Time PCR's (für Piroplasmen und spezifisch für *B. canis vogeli*) ergaben, sind darauf zurück zu führen, dass die Piroplasmen Real-Time PCR nicht nur *B. canis vogeli* detektiert, sondern auch andere Babesienarten und *Hepatozoon* spp.. Es ist also anzunehmen, dass die Differenz in der Prävalenzen hauptsächlich durch Infektionen der Hunde mit *Hepatozoon* spp. entstanden ist. Auch bei der Auswertung der Blutausstriche wurden Infektionen mit *Hepatozoon* spp. festgestellt.

Bei der Betrachtung der Altersverteilung im Bezug auf die PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli* ergab sich ein signifikanter Unterschied. Die Prävalenz nahm hier mit zunehmendem Alter ab. Dabei zeigte sich folgendes Verteilungsmuster bei den Hunden: 18,5 % bei den unter sechs Monate alten Hunden, 11,7 % in der Altersklasse von sechs Monaten bis zu zwei Jahren, 7,9 % bei den zwei bis fünf Jahre alten und 4,0 % bei den über fünf Jahre alten Hunden zeigten ein positives Ergebnis in der Real-Time PCR. Die höhere PCR-Prävalenz bei Welpen und Junghunden ist auf eine erhöhte Erstinfektion dieser Altersgruppe und ihrer geringeren Widerstandskraft aufgrund des noch nicht fertig ausgebildeten Immunsystems, zurückzuführen (Farwell et al., 1982; Breitschwerdt et al., 1983; Song et al., 2004). Darüber hinaus wird in anderen Veröffentlichungen die Möglichkeit einer Infektion der Welpen über die Mutter beschrieben (Farwell et al., 1982; Breitschwerdt et al., 1983).

Die statistische Auswertung der Seroprävalenzen der verschiedenen Altersgruppen zeigte eine deutliche Zunahme an seropositiven Hunden mit zunehmenden Alter: 7,4 % bei den unter sechs Monate alten Hunden, 20,3 % in der Altersklasse von sechs Monaten bis zu zwei Jahren, 33,7 % bei den zwei bis fünf Jahre alten und 39 % bei den über fünf Jahre alten Hunden waren seropositiv. Der IFAT erfasst nicht das akute Krankheitsgeschehen sondern die Immunantwort nach einer Infektion. Die erhöhte Seroprävalenz in den höheren Altersklassen ist daher auf gerade überwundene Infektionen mit dem Erreger oder mehrfach überstandene Infektionen und einer daraus resultierenden Ausbildung von Resistenzen zurückzuführen (Bobade et al., 1989; Taboada et al., 1992).

Bei der statistischen Auswertung der Prävalenzen und Seroprävalenzen der beiden Geschlechter (männlich/weiblich) ergab sich nur für die Seroprävalenz ein signifikant höherer Wert bei männlichen Hunden. Es konnte eine Tendenz einer erhöhten Infektionsrate (PCR) bei den männlichen Hunden (10,8 %) gegenüber den weiblichen Hunden (7,1 %) festgestellt werden. Die erhöhte Seroprävalenz und PCR-Prävalenz bei männlichen Hunden ist wahrscheinlich mehr auf die Unterschiede im Wesen von männlichen und weiblichen Hunden und die spezifischen Haltungsbedingungen zurückzuführen, als auf das Geschlecht als solches. Die Proben stammen hauptsächlich aus ländlichen Gebieten in Brasilien (Farmhunde). Dort ist es üblich, dass die weiblichen Hunde vermehrt im Haus oder nahe dem Hof gehalten werden, während die männlichen Hunde ihre Besitzer (Kuhhirten) auf die Felder und Weiden der Farm begleiten. Die männlichen Hunde sind zudem meist aggressiver und zeigen ein ausgeprägteres Revierverhalten. Sie kämpfen mit Ihresgleichen oder Wildtieren häufiger als weibliche Hunde. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon bei Taboada et al. (1992) und Song et al. (2004) beschrieben.

Die Frage, ob zwischen der Prävalenz von *B. canis vogeli* und dem Hämatokritwert der Hunde ein Zusammenhang besteht, ergab für die PCR-Prävalenz einen hochsignifikanten und für die Seroprävalenz keinen signifikanten Unterschied (s. Ergebnisse Kap. 2.4). Andere Studien, die einen Zusammenhang zwischen Hämatokritwert und der Erkrankung an Babesiose beschreiben (Bastos et al., 2004) bestätigen das Ergebnis bezüglich der PCR-Prävalenz. Gründe dafür, dass es in dieser Studie keine Korrelation zwischen der Seroprävalenz und den Hämatokritwerten gibt, können zum einen die geringere Pathogenität von *B. canis vogeli* (Uilenberg et al., 1989; Hauschild und Schein, 1996; Eckert et al., 2005) und zum anderen aber auch mögliche Infektionen, mit anderen Hämoparasiten, die bei *B. canis vogeli*-negativen Tieren in dieser Studie den Hämatokritwert senken (Macieira et al., 2005; O'Dwyer et al., 2001), sein.

Die Fragestellung, ob ein Zusammenhang zwischen PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli* und dem Lebensraum der Hunde (Stadt/Land) besteht, ergab bei der Betrachtung der Gesamtzahl der Hunde keine Signifikanz (s. Ergebnisse Kap. 2.6). Bei den Ergebnissen der Seroprävalenz zeigte sich jedoch ein hochsignifikanter Unterschied. Auch regional konnten für Carrancas und Igarapé zwischen Stadt- und Landhunden keine signifikanten Unterschiede in der PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli* festgestellt werden. Nur in Carlos Chagas ergab sich ein signifikanter Unterschied. Die höhere Prävalenz in dieser Region ist wahrscheinlich auf die konstanteren klimatischen Bedingungen (wärmeres Klima) und der höheren Infestation der Landhunde durch potentielle Vektorzecken zurückzuführen (Levy et al., 1987).

Bei der Seroprävalenz ergab sich für die Regionen Carrancas und Igarapé kein signifikanter und bei Carlos Chagas ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Land- und Stadthunden. Verursacht werden diese unterschiedlichen Signifikanzen höchstwahrscheinlich durch die sehr verschiedenen klimatischen Bedingungen die in den drei Regionen vorherrschen (vergleiche Tab. 2; Kap. 1.; im Material und Methodenteil). Zudem könnten unterschiedliche Haltungsformen ein weiterer Faktor für höhere Seroprävalenzen auf dem Land sein. Landhunde werden meist „freilaufend“ gehalten und sind wahrscheinlich durch den grösseren Aktionsradius einer höheren Zeckenexposition ausgesetzt. Darüber hinaus kann in wärmeren Regionen die sonst temperaturempfindliche Vektorzecke (*R. sanguineus*) im Freien überleben. Stadthunde werden oft im Haus oder im Garten an der Kette gehalten. Des weiteren werden Landhunde weniger gepflegt und seltener mit Akariziden oder anderen Antiparasitika behandelt als Stadthunde.

## 2 Vergleich zwischen konventioneller und Real-Time PCR

Die konventionelle PCR nach Birkenheuer et al. (2003) wurde durchgeführt um jene positiven Ergebnisse der Real-Time PCR auf Piroplasmen näher zu untersuchen, welche in der Real-Time PCR auf *B. canis vogeli* kein positives Ergebnis zeigten, d. h. um eventuelle Infektionen mit anderen *Babesia* spp. zu erfassen und Infektionen mit *Hepatozoon* spp. auszuschließen.

Dabei ist anzumerken, dass alle hier positiven Proben auch in der Real-Time PCR auf *B. canis vogeli* ein positives Ergebnis zeigten. Alle positiven Ergebnisse sind somit höchstwahrscheinlich auf die Infektionen der Hunde mit *B. canis vogeli* zurückzuführen. Die relativ großen Unterschiede in den Prävalenzen zwischen der konventionellen PCR und der spezifischen Real-Time PCR (*B. canis vogeli*) sind auf eine geringere Sensitivität der konventionellen PCR nach Birkenheuer et al. (2003), zurückzuführen. In der konventionellen PCR waren nur jene Proben positiv, die in der Real-Time PCR auf *B. canis vogeli* vor dem 32 Zyklus einen Anstieg über den „Treshold“ verzeichneten. Verglichen mit den Ergebnissen in der Piroplasmen Real-Time PCR verzeichneten diese Tiere einen Anstieg über den „Treshold“ vor dem 33 Zyklus. Es ist daher nicht ganz auszuschließen, dass geringgradige Infektionen mit anderen *Babesia* spp. mit der PCR nach Birkenheuer et al. (2003) in dieser Studie nicht detektiert wurden. Somit kann ein Vorkommen anderer Babesienarten (kleine Babesien) nicht ganz ausgeschlossen werden.

### 3 Koinfektionen

Neben Einzelinfektionen sind auch Koinfektionen mit mehreren Erregern durch Zeckenbisse möglich. Bei einigen in dieser Studie verwendeten Proben wurde, bei einem IFAT auf *Ehrlichia canis* eine hohe Seropositivität festgestellt (Costa, persönliche Mitteilung). Die Analyse der gleichen Proben mittels spezifischer Real-Time PCR auf Ehrlichien ist noch nicht abgeschlossen. Eine vorläufige Auswertung zeigte bei mehreren Tieren dieser Studie eine Infektion mit *E. canis*. Bei einigen Hunden konnte sogar eine Doppelinfektion mit *B. canis vogeli* und *E. canis* mittels Real-Time PCR eindeutig nachgewiesen werden (Costa, persönliche Mitteilung).

Da sowohl *B. canis vogeli* als auch *E. canis* vom selben Zeckenvektor (*R. sanguineus*) übertragen werden und auch *E. canis* in Brasilien endemisch ist, sind Koinfektionen hier sehr wahrscheinlich (Macieira et al., 2005; O'Dwyer et al., 2001). In mehreren Blutaussstrichen konnten auch Gamonten von *Hepatozoon* nachgewiesen werden (O'Dwyer et al., 2001; Paludo et al., 2003; Rubini et al., 2005). Die erst kürzlich wieder aufgekommene Diskussion über *Rangelia vitalli* einem den Piroplasmen zugeordneten und *B. microti* sehr ähnlichem Protozoon (Loretti und Barros, 2005), das bei Hunden in Brasilien diagnostiziert wurde, macht auch eine Koinfektion mit diesem Erreger wahrscheinlich. Fraglich ist ob *R. vitalli* in dieser Studie erfasst worden wäre, da sie sich im Gegensatz zu *Babesia* spp., die sich in Erythrozyten vermehren, in Epithelzellen (intraepithelial) vermehren (Loretti und Barros, 2005).



## **4 Ausblick**

Die ermittelten Daten dieser Studie liefern einen wichtigen Beitrag zur Einschätzung der epidemiologischen Situation der Caninen Babesiose in den Untersuchungsgebieten im Bundesstaat Minas Gerais. Jedoch wären nachfolgende flächendeckende Studien mit einer grösseren Anzahl von Proben, auch in anderen Regionen des Bundesstaates, über einen mehrjährigen Zeitraum nötig, um Veränderungen der epidemiologischen Situation im Laufe der Zeit feststellen zu können. Solche Studien wären auch für andere Regionen und Bundesstaaten in Brasilien, sowie in ganz Südamerika, zur Risikobewertung interessant und relevant. Bei entsprechenden nachfolgenden Studien sollten nicht nur Zecken von den Tieren, sondern auch ungesaugte Zecken der verschiedenen Regionen aus der Umgebung gesammelt werden, um das Vektorpotential verschiedener Zeckenarten untersuchen zu können. Zuverlässige Daten zur Verbreitung der Caninen Babesiose im Vektor (Zecke) und den Reserviertieren (Hund) stellen eine fundierte Basis dar, auf der die Entwicklung von Behandlungs- und Bekämpfungsstrategien erfolgen kann.



## VI Zusammenfassung

Untersuchungen zur Epidemiologie der Caninen Babesiose in Minas Gerais, Brasilien.

Von April 2004 bis Februar 2005 wurden in Brasilien im Bundesstaat Minas Gerais zur Trockenzeit und zur Regenzeit von 385 Hunden aus drei unterschiedlichen Regionen (Carrancas, Carlos Chagas und Igarapé) und verschiedenen Lebensräumen (Land bzw. Stadt) Blutproben auf Babesien untersucht. Von 167 Hunden konnten Blutproben während beider Probensammelperioden genommen werden. Blutaussstriche wurden nach Giemsa-Färbung lichtmikroskopisch auf Babesien untersucht. Zur Bestimmung der Seroprävalenz von Anti-*Babesia canis* Antikörpern wurde für alle Proben ein Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) durchgeführt. Zur Bestimmung der Prävalenz von Infektionen wurde aus den Blutproben DNA extrahiert und mittels Real-Time PCR spezifisch auf *Babesia canis vogeli* und gattungsspezifisch auf *Babesia* spp. untersucht.

Bei den Blutproben der ersten Probensammelperiode (Trockenzeit) betrug die PCR-Prävalenz von *B. canis vogeli*-Infektionen 10,3 % und die Seroprävalenz (IFAT) 30,0 %. Bei der zweiten Probensammelperiode (Regenzeit) ergab der direkte Nachweis von *B. canis vogeli* eine Prävalenz von 8,2 % bei einer Seroprävalenz von 21,7 %. Hierbei bestand eine beträchtliche Schwankung zwischen Carlos Chagas im nördlich gelegenen Tiefland mit Werten von 13,7 % und 53,0 % für PCR und Serologie und dem südlicher und höher gelegenen Carrancas mit Werten von 5,7 % und 2,9 % für PCR und Serologie. Die lichtmikroskopische Untersuchung besitzt nur eine geringe Sensitivität, nur zwei von 552 Proben waren positiv. Beim Vergleich von Trocken- und Regenzeit gab es insgesamt und bezogen auf die drei Regionen keinen signifikanten Unterschied; einzige Ausnahme war die Seroprävalenz von *B. canis vogeli* in Igarapé, die in der Trockenzeit (mit 34 %) eineinhalb mal höher als in der Regenzeit (mit 51,7 %) war.

In der Region Carlos Chagas konnte für Landhunde (mit 21,3 %) eine ungefähr neunmal höhere PCR-Prävalenz und ungefähr zweimal höhere Seroprävalenz (mit 37,3 %) gegenüber Stadthunden (mit 2,4 % bei der PCR bzw. 22,0 % beim IFAT) gefunden werden. Die Gründe für die unterschiedlichen Prävalenzen bezüglich des Lebensraums liegen sehr wahrscheinlich in der unterschiedlichen Haltung und der geringeren Anzahl an Vektorzecken in der Stadt. Landhunde werden „freilaufend“ gehalten und haben somit einen viel grösseren Aktionsradius als Stadthunde, die normalerweise im Haus oder im Garten an der Kette gehalten werden. Für die anderen zwei Regionen war der Land/Stadt-Unterschied nicht signifikant. Hunde, bei denen mittels PCR Babesien diagnostiziert wurden, wiesen einen signifikant niedrigeren Hämatokrit auf als Hunde die serologisch positiv waren. Bei der Altersverteilung ergab sich wie erwartet eine steigende Seroprävalenz und eine abnehmende Zahl positiver PCR-Nachweise mit zunehmendem Alter der Hunde. Die Ursache für diese Altersverteilung liegt in der erhöhten Anfälligkeit von Jungtieren für Neuinfektionen und die Zunahme an überstandenen Infektionen mit *B. canis vogeli* bei älteren Hunden. Die statistische Auswertung der beiden Geschlechter (männlich/weiblich) bezüglich der Prävalenz von Infektionen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die Seroprävalenzen im Bezug auf das Geschlecht der Hunde waren dagegen bei männlichen Hunden signifikant höher, was vermutlich auf Unterschiede in der Haltung und im Verhalten der Hunde zurückzuführen ist. Männliche Hunde begleiten ihre Besitzer (Gauchos) meistens zur Arbeit und haben dort Kontakt zu Wild- und anderen Haustieren. Ausserdem zeigen sie ein ausgeprägteres Revierverhalten. Weibliche Hunde bleiben meist auf dem Hof bei den Frauen im Haus, wo der Kontakt zu anderen Tieren begrenzt ist.

## VII Summary

Studies on the epidemiology of Canine Babesiosis in Minas Gerais, Brazil.

During two stays between April 2004 and February 2005, one in the dry season and the other during the rainy season, a total of 552 samples from 385 dogs (samples from 167 dogs were collected twice) from three different regions (Carrancas, Carlos Chagas and Igarapé) in Minas Gerais, Brazil were collected. While the first collection only included samples from dogs living in rural areas the second collection gathered repeat samples from the dogs from the first collection as well as samples from dogs from the particular urban areas. Blood was taken from each dog and blood smears were prepared. The blood smears were microscopically analysed and the DNA, extracted from the blood, was used for Real-Time PCR analysis of infections with *Babesia canis vogeli* or other piroplasms. A conventional PCR for the detection of *Babesia* sp. was carried out. In addition an indirect immunofluorescent-antibody-test, specific for *Babesia canis vogeli*, was performed with all samples.

The analysis of samples from the first collection period resulted in a percentage of prevalence of 10,3 % in the Real-Time PCR and 30,0 % in the indirect immunofluorescent-antibody-test. The second collection period showed a prevalence of 8,2 % in the Real-Time PCR and 21,7 % in the indirect immunofluorescent-antibody-test. No significant difference has been found in the results from the Real-Time PCR and the origin (urban-/rural area) of the dogs in Minas Gerais, in general. However, on examining the three different regions separately, a significant difference in prevalence emerged in Carlos Chagas. In Minas Gerais there was a highly significant difference shown in the results of the indirect immunofluorescent-antibody-test. While Carrancas showed no significance at all, there was a significant difference shown in the results of Carlos Chagas and a highly significant difference shown in Igarapé. Due to the very low sensitivity of the microscopically analysis only two from the 552 samples were positive.

With regards to the two different time periods (dry and rainy season) in which samples were collected, no significant differences in the results of the Real-Time PCR were recorded in Minas Gerais in general or in the various regions in particular. The results of the indirect immunofluorescent-antibody-test did not show any significance in Minas Gerais, generally, or the regions of Carrancas and Carlos Chagas in particular, whereas in Igarapé a significant difference was visible. Comparing the different age groups, a significant difference was detected in the Real-Time PCR results and a highly significant difference in the results from the indirect immunofluorescent-antibody-test. Concerning the difference in prevalence's of infections and antibodies based on sex (male/female) the results of the PCR showed no significant difference whereas the difference in seroprevalence was significant. The results of the hematocrit and a comparison with the positivity in the different diagnostical methods revealed no significance for the indirect immunofluorescent-antibody-test and a high significance for the Real-Time PCR. A reason for the differences in prevalences across different age groups, as compared to the results from the Real-Time PCR, could be that puppies are more prone to infections. In the results of the indirect immunofluorescent-antibody-test a higher prevalence in the older age groups points to a certain resistance of those animals after recovering from infections with *B. canis vogeli*. A likely cause for the differences in prevalence in the results of the Real-Time PCR and the indirect immunofluorescent-antibody-test compared to the origin (rural or urban area) of the dog samples are differences in keeping the dogs as well as a lower occurrence of the vector ticks in the urban areas.

## VIII Literaturverzeichnis

BASTOS CDEV, MOREIRA SM, PASSOS LMF (2004): Retrospective study (1998-2001) on Canine Babesiosis in Belo Horizonte, Brazil.  
Ann N.Y. Acad Sci. **1026**: 1-3

BEELITZ P, PFISTER K (2004): Diagnostik und Therapie von Reisekrankheiten beim Hund.  
Tierärztl Prax. **32**: 158-165

BIRKENHEUER AJ, NEEL J, RUSLANDER D, LEVY MG, BREITSCHWERDT EB (2004): Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog.  
Vet Parasitol. **124**: 151-160

BIRKENHEUER AJ, LEVY MG, BREITSCHWERDT EB (2003): Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in canine Blood samples.  
J Clin Microbiol. **41**: 4172-4177

BOBADE PA, ODUYE OO, AGHOMO HO, (1989): Prevalence of antibodies against *Babesia canis* in dogs in an endemic area.  
Rev Elev Med Vet Pays Trop. **42**: 211-217

BOOZER AL, MACINTIRE DK (2003): Canine babesiosis.  
Vet Clin North Am Small Anim Pract. **33**: 885-904

BRANDÃO LP, HAGIWARA MK, MYIASHIRO SI (2003): Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate.  
Vet Parasitol. **114**: 253-265

BREITSCHWERDT EB, MALONE JB, MACWILLIAMS P, LEVY MG, QUALLS CW JR., PRUDICK MJ (1983): Babesiosis in the Greyhound.

J Am Vet Med Assoc. **182**: 978-982

CAMACHO AT, GUITIAN FJ, PALLAS E, GESTAL JJ, OLMEDA S, GOETHERT H, TELFORD III SR, SPIELMAN A (2005): Serum protein response and renal failure in canine *Babesia annae* infection.

Vet Res. **36**: 713-22

CAMACHO AT, PALLAS E, GESTAL JJ, GUITIAN FJ, OLMEDA AS, TELFORD III SR, SPIELMAN A (2003): *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain.

Vet Parasitol. **112**: 157-63

CAMACHO AT, PALLAS E, GESTAL JJ, GUITIAN FJ, OLMEDA AS, GOETHERT HK, TELFORD III SR (2001): Infection of dogs in north-west Spain with a *Babesia microti*-like agent.

Vet Rec. **149**: 552-555

COSTA LM JR. (2005), Persönl. Mitteilung, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

CRIADO-FORNELIO A, MARTINEZ-MARCOS A, BULING-SARAÑA A, BARBA-CARRETERO JC (2003): Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part I. Epizootiological aspects.

Vet Parasitol. **113**: 189-201



DAUGSCHIES A (2001): Import von Parasiten durch Tourismus und Tierhandel.

Dtsch tierärztl Wschr. **108**: 348-352

ECKERT J, FRIEDHOFF KT, ZAHNER H, DEPLAZES P (2005): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin.

Enke Verlag Stuttgart 2005: 575

ECKERT J, DEPLAZES P (1996): Vaccines against parasitic diseases of domestic animals.

Tierärztl Prax. **24**: 322-329

EVANS DE, MARTINS JR, GUGLIELMONE AA (2000): A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil.

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro **95**: 453-470

FARWELL GE, LE GRAND EK, COBB CC (1982): Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs.

J Am Vet Med Assoc. **180**: 507-511

GUITIÁN FJ, CAMACHO AT, TELFORD III SR (2003): Case-control study of canine infection by a newly recognised *Babesia microti*-like piroplasm.

Prev Vet Med. **61**: 137-145

HAUSCHILD S, SCHEIN E (1996): Zur Artspezifität von *Babesia canis*.

Berl Münch Tierärztl Wschr. **109**: 216-219

HELLMANN K, KNOPPE T, KRIEGER K, STANNECK D (2003): European multicenter field trial on the efficacy and safety of a topical formulation of imidacloprid and permethrin (Advantix™) in dogs naturally infested with ticks and/or fleas.

Parasitol Res. **90**: 125-126

HERWALDT BL, CACCIO S, GHERLINZONI F, ASPOCK H, SLEMENDA SB, PICCALUGA P, MARTINELLI G, EDELHOFER R, HOLLENSTEIN U, POLETTI G, PAMPIGLIONE S, LOSCHENBERGER K, TURA S, PIENIAZEK NJ (2003): Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe.

Emerg Infect Dis. **9**: 942-948

HOMER MJ, AGUILAR-DELFIN I, TELFORD III SR, KRAUSE PJ, PERSING DH (2000): Babesiosis.

Clin Microbiol Rev. **13**: 451-469

LABRUNA MB, KASAI N, FERREIRA F, FACCINI JLH., GENNARI SM (2002): Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil.

Vet Parasitol. **105**: 65-77

LEVINE ND (1988): Progress in taxonomy of the apicomplexan protozoa.

J Protozool. **35**: 518-20

LEVINE ND (1982): Some corrections in Haemogregarine (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature.

J Protozool. **29**: 601-603

LEVINE ND, CORLISS JO, COX FE, DEROUX G, GRAIN J, HONIGBERG BM, LEEDALE GF, LOEBLICH III AR, LOM J, LYNN D, MERINFELD EG, PAGE FC, POLJANSKY G, SPRAGUE V, VAVRA J, WALLACE FG (1980): A newly revised classification of the protozoa.

J Protozool. **27**: 37-58

LEVY MG, BREITSCHWERDT EB, MONCOL DJ (1987): Antibody activity to *Babesia canis* in dogs in North Carolina.

Am J Vet Res. **48**: 339-341

LORETTI AP, BARROS SS (2005): Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil.

Vet Parasitol. 2005 Sep. 6 (Elektronische Publikation vor der gedruckten Ausgabe)

MACIEIRA DDE B, MESSICK JB, CERQUEIRA ADE M, FREIRE IM, LINHARES GF, ALMEIDA NK, ALMOSNY NR (2005): Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil.

Vet Clin Pathol. **34**: 44-48

MATJILA PT, NIJHOF AM, TAOUFIK A, HOUWERS D, TESKE E, PENZHORN BL, DE LANGE T, JONGEJAN F (2005): Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands.

Vet Parasitol. **131**: 23-29

MEHLHORN H, SCHEIN E (1998): Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi*.

Parasitol Res. **84**: 467-75

MEHLHORN H, SCHEIN E (1984): The piroplasms: life cycle and sexual stages.

Adv Parasitol. **23**: 37-103

O'DWYER LH, MASSARD CL, PEREIRA DE SOUZA JC, (2001): *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil  
Vet Parasitol. **94**: 143-150

PALUDO GR, DELL'PORTO A, DE CASTRO E TRINIDADE AR, MCMANUS C, FRIEDMAN H (2003): *Hepatozoon* spp.: report of some cases in dogs in Brasilia, Brazil.  
Vet Parasitol. **118**: 243-248

PASSOS LMF, GEIGER SM, RIBEIRO MFB, PFISTER K, ZAHLER-RINDER M (2005): First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil.  
Vet Parasitol. **127**: 81-85

PASSOS LMF (2005); Persönl. Mitteilung, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

PENZHORN BL, LEWIS BD, DE WAAL DT, LOPEZ REBOLLAR LM (1995): Sterilisation of *Babesia canis* infections by imidocarb alone or in combination with diminazene.  
J S Afr Vet Assoc. **66**: 157-159

RIBEIRO MFB; LIMA JD, PASSOS LMF, GUIMARÃES AM (1990): Frequência de anticorpos fluorescentes anti-*Babesia canis* em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais.  
Arq Bras Med Vet Zoot. **42**: 511-517

RUBINI AS, DOS SANTOS PADUAN K, CAVALCANTE GG, RIBOLLA PE, O'DWYER LH (2005): Molecular identification and characterisation of canine *Hepatozoon* species from Brazil.  
Parasitol Res. **97**: 91-93

SCHETTERS T (2005): Vaccination against canine babesiosis.

Trends in Parasitol. **21**: 179-184

SONG KH, KIM DH, HAYASAKI M (2004): The PCR-based detection of *Babesia gibsoni* infection in dogs (German sheperds) reared in South Korea.

Annals Trop Med & Parasitol. **98**: 149-153

SPIEWAK G (1992): Aspectos epidemiológicos, clínicos e de diagnóstico da infecção por *Babesia canis* em cães atendidos em clínicas veterinárias em Belo Horizonte.

Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.

TABOADA J, HARVEY JW, LEVY MG, BREITSCHWERDT EB (1992): Seroprevalence of babesiosis in Greyhounds in Florida.

J Am Vet Med Assoc. **200**: 47-50

UILENBERG G, FRANSSSEN FF, PERIE NM, SPANJER AA (1989): Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal of nomenclature.

Vet Q. **11**: 33-40

VERCAMMEN F, DE DEKEN R, MAES L (1996): Prophylactic activity of imidocarb against experimental infection with *Babesia canis*.

Vet Parasitol. **63**: 195-198

YOUNG DR, ARTHUR RG, DAVIS WL (2003): Evaluation of K9 Advantix™ vs. Frontline Plus® topical treatment to repel brown dog ticks (*Rhipizephalus sanguineus*) on dogs.

Parasitol Res. **90**: 116-118

ZHALER-RINDER M, BECK W, KRUX F, GEIGER S (2004): Biodiversity in canine babesiae: molecular and epidemiological investigations.

Int J Med Microbiol. **37**: 117

ZAHLER M, RINDER H, ZWEYGARTH E, FUKATA T, MAEDE Y, SCHEIN E, GOTHE R (2000a): *Babesia gibsoni* of dogs from North America and Asia belong to different species.

Parasitol. **120**: 365-369

ZAHLER M, RINDER H, SCHEIN E, GOTHE R (2000b): Detection of a new pathogenic *Babesia microti* -like species in dogs.

Vet Parasitol. **89**: 241-248

ZAHLER M, SCHEIN E, RINDER H (1998): Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs.

Parasitol Res. **84**: 544-548

## IX Abkürzungen

Bab	Babesien
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
DabcyI	Dimethylaminophenylbenzoesäure
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
Dest.	destilliert
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (=DNS)
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hep	Hepatozoon
Hex	Hexachlorfluoreszein
ITS	internal transcribed spacer
K <sub>2</sub> HPO	Kaliumhydrogenphosphat
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
°O	Grad Ost (Längengrad)

## IX. Abkürzungen

---

pmol	pikomol
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonukleinsäure
Rox	6-carboxy-X-rhodamine
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
°S	Grad Süd (Breitengrad)
SPA	soluble parasite antigens
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen



# X Anhang

## Anhang 1. Datenerhebungsbogen

**Molekularepidemiologie der Babesiose des Hundes in Minas Gerais**

Akte Nr.: \_\_\_\_\_

Gemeinde: \_\_\_\_\_ Zone ( ) Land ( ) Stadt

Datum: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**1. Daten des Besitzers**

1.1. Eigentum: \_\_\_\_\_ 1.2. Besitzer: \_\_\_\_\_

1.3. Ortschaft: \_\_\_\_\_

1.4. Hinweispunkt: \_\_\_\_\_

1.5. Umgebung: \_\_\_\_\_

1.6. Andere Haustiere vorhanden: ( ) Ja ( ) Nein Welche? \_\_\_\_\_

1.7. Wildtiere vorhanden: ( ) Ja ( ) Nein Welche? \_\_\_\_\_

**2. Daten des Hundes**

2.1. Haltung: ( ) Freilaufend ( ) im Haus

2.2. Ernährung: ( ) Hundefutter ( ) Essensreste

2.3. Zugang zu anderen Tieren: ( ) Ja ( ) Nein Welche? \_\_\_\_\_

2.4. Andere Hunde die hier nicht angefuehrt werden: ( ) Ja ( ) Nein

Hund: \_\_\_\_\_

Rasse: \_\_\_\_\_ Geschlecht ( ) M ( ) F

Alter: ( ) <6 Monate ( ) 6 Monate - 2 Jahre ( ) 2 - 5 Jahre ( ) >5 Jahre

Groesse: ( ) Klein ( ) Mittel ( ) Gross

Fellfarbe: \_\_\_\_\_ Felllaenge: \_\_\_\_\_

Sind Ektoparasiten vorhanden: ( ) Ja ( ) Nein

Sind oft Ektoparasiten zu finden: ( ) Ja ( ) Nein Zeitraum? \_\_\_\_\_

Wieviele Ektoparasiten sind vorhanden: ( ) viele ( ) mittel ( ) wenige

Welche Ektoparasiten wurden gesammelt: ( ) Zecken ( ) Floehe ( ) Milben

Anemie: ( ) Ja ( ) Nein

**Anhang 2. Patientendaten der Hunde aus Carrancas**

Tier	Zone	Geschl	Alter	Hämatokrit		Serologie				real-time PCR								Blutausstriche	
				Wert( %)		Ergebnis		Titer		Piroplasmen		Cycle		B. c. v.		Cycle		I.	II.
				I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.		
1	Land	M	6m-2a	50	47	N	N			N	N			N	N			N	N
2	Land	F	2-5a	42	43	N	N			N	P		35,4	N	N			N	N
3	Land	M	2-5a	45		N				P		29,4		N				N	
4	Land	M	>5a	44	44	N	N			N	N			N	N			N	N
5	Land	M	6m-2a	21	54	N	N			N	N			N	N			N	N
6	Land	F	6m-2a	39	40	N	N			P	P	29,6	29,9	P	N	39		N	N
7	Land	M	>5a	40	42	P	P	320	40	P	P	26	25,6	N	N			N	N
8	Land	F	2-5a	36	50	N	N			N	N			N	N			Hep	Hep
9	Land	F	>5a	26	46	N	N			N	N			N	N			N	N
10	Land	F	>5a	31	37	N	N			P	P	27,8	31,1	N	N			N	N
11	Land	M	2-5a	42	44	N	N			P	P	28,6	28,6	N	N			N	N
12	Land	F	<6m	28	47	N	N			N	P		28,6	N	N			N	N
13	Land	M	6m-2a	44	48	N	N			P	P	29,2	25,3	N	N			Hep	Hep
14	Land	F	6m-2a	35	36	N	N			P	P	40,7	27,4	N	N			N	N
15	Land	M	6m-2a	44		N				P		31,2		N				N	
16	Land	M	2-5a	38		N				P		29,7		N				N	
17	Land	F	6m-2a	30		N				P		25,2		N				N	
18	Land	M	2-5a	38	48	N	N			P	P	25,1	29,9	N	N			N	N
19	Land	M	2-5a	47	52	N	N			P	P	25,6	28,9	N	N			N	N
20	Land	F	2-5a	8	24	N	N			P	P	31,3	25	N	N			N	N
21	Land	M	>5a	35	55	N	N			P	P	38,4	39,7	N	N			N	N
22	Land	M	2-5a	15		N				P		28,1		N				N	
23	Land	M	2-5a	42		N				P		25,5		N				N	
24	Land	M	2-5a	46		N				P		28,6		N				N	
25	Land	F	2-5a	25	44	N	N			P	P	26,7	40,5	N	N			N	Hep
26	Land	M	>5a	30	45	N	N			P	N	31,6		N	N			N	N
27	Land	M	2-5a	38	40	N	N			P	P	33,8	25,7	N	N			Hep	Hep
28	Land	F	<6m	39	34	N	N			P	P	29	28,6	N	N			N	N
29	Land	M	2-5a	35	35	N	N			P	P	25,7	28,3	N	N			N	N
30	Land	F	6m-2a	37		N				P		27,6		N				N	
31	Land	F	<6m	29	30	N	N			P	P	26,2	32	N	N			N	N
32	Land	M	<6m	25		N				P		26,9		P		37,4		Hep	
33	Land	M	>5a	50	40	N	N			P	P	31,5	32	N	N			N	N
34	Land	M	<6m	18		N				P		31,6		N				N	
35	Land	M	<6m	32	40	N	N			P	P	31,6	30,5	N	N			N	N
36	Land	M	2-5a	35	43	N	N			P	P	27,1	27	N	N			N	N
37	Land	F	>5a	36	41	N	N			P	P	32,8	25,5	N	N			N	N
38	Land	F	>5a	29	33	N	N			P	P	31,7	27,7	N	N			N	N
39	Land	F	2-5a	38	44	N	N			P	P	29,2	29,3	N	N			Hep	N
40	Land	M	>5a	42	40	N	N			P	P	33	31,6	N	N			N	N
41	Land	M	>5a	42		N				P		27,1		N				N	
42	Land	F	>5a	39		N				N				N				N	
43	Land	M	6m-2a	48		N				N				N				N	
44	Land	M	6m-2a	38	40	N	N			N	N			N	N			N	N
45	Land	M	6m-2a	42		N				P		24,9		N				N	
46	Land	F	>5a	40	52	N	N			N	N			N	N			N	N
47	Land	F	6m-2a	17	44	N	N			N	N			N	N			N	N
48	Land	M	<6m	23	42	N	N			P	N	25,9		N	N			N	N
49	Land	M	2-5a	11		N				P		26,6		N				N	
50	Land	M	2-5a	39	39	N	N			P	P	26,8	27,8	N	N			N	N

## Fortsetzung

Tier	Zone	Geschl	Alter	Hämatokrit		Serologie				real-time PCR						Blutausstriche					
				Wert( %)		Ergebnis		Titer		Piroplasmen		Cycle		B. c. v.		Cycle		I.	II.		
				I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.		
51	Land	F	6m-2a	10						P		23			N					Hep	
52	Land	F	<6m	28	40	N	N			P	P	25,5	23,7	N	N					N	Hep
53	Land	M	>5a	30		N				P		31,3		P		37,8				N	
54	Stadt	F	<6m	30		N				P		34,2		P		38,4				N	
55	Stadt	M	6m-2a	38	44	N	N			P	P	29,6	28,3	N	N					N	N
56	Stadt	M	>5a	35	44	N	P	40		P	P	25,8	30	N	N					N	N
57	Stadt	F	>5a	48	57	N	N			N	N			N	N					N	N
58	Stadt	M	>5a	49	54	N	N			P	P	32	32,7	N	N					N	N
59	Stadt	F	6m-2a	39	38	N	N			P	P	26	26,1	N	N					N	N
60	Land	F	6m-2a	17		N				P		28,6		N						N	
61	Land	F	2-5a	28	43	N	N			P	P	25,2	22,6	P	N	35,8				N	Hep
62	Land	M	6m-2a	32	38	N	N			P	P	24,7	30,7	N	N					N	N
63	Land	M	>5a	43	41	N	N			P	P	29,7	34,7	N	N					N	N
64	Land	M	6m-2a	33	40	N	N			P	P	26,7	26,6	N	N					Hep	Hep
65	Land	M	6m-2a	51	53	N	N			N	P		26,4	N	N					N	N
66	Land	M	2-5a	38	48	N	N			P	P	31,3	31	P	N	39,9				N	N
67	Land	M	>5a	43	47	N	N			P	P	31,5	31,1	N	N					N	N
68	Land	F	>5a	49		N				N				N						N	
69	Land	M	<6m	35	49	N	N			N	N			N	N					N	N
70	Land	M	2-5a	51	53	N	N			N	N			N	N					N	N
71	Land	M	>5a	45	43	P	N	80		N	N			N	N					N	N
72	Land	M	6m-2a	38		N				P		24,8		N						Hep	
73	Land	M	<6m	31	44	N	N			P	P	32,2	28,6	N	N					N	N
74	Land	F	>5a	28	49	N	N			N	N			N	N					N	N
75	Land	F	>5a	36	35	N	N			P	P	26,7	28,8	N	N					N	N
76	Land	F	<6m	39	45	N	N			P	P	34,1	32,2	N	N					N	N
77	Land	M	6m-2a	46	53	N	N			P	P	30,2	28,7	N	P	38,5				N	N
78	Land	M	6m-2a	42	48	N	N			P	P	28	27,7	N	N					N	N
79	Land	M	2-5a	44	54	N	N			P	P	26,3	25,1	N	N					Hep	Hep
80	Land	M	2-5a	54	53	N	N			N	N			N	N					N	N
81	Land	M	>5a	46		N				P		33		N						N	
82	Land	M	2-5a	54		N				N				N						N	
83	Land	M	>5a	44		N				N				N						N	
84	Land	M	>5a	53	45	P	N	160		P	P	34,8	27,6	N	N					N	N
85	Land	F	2-5a	30		N				N				N						N	
86	Land	M	6m-2a	38		N				N				N						N	
87	Land	M	2-5a	52		N				P		34,8		N						N	
88	Land	M	>5a	54	52	N	N			N	N			N	N					N	N
89	Land	M	2-5a	47	48	N	N			P	P	40,5	29,9	N	N					N	N
90	Land	F	6m-2a	34	48	N	N			P	P	26,7	25,9	N	N					N	N
91	Land	M	2-5a	44	47	N	N			P	P	23,3	22,6	N	N					N	N
92	Land	M	6m-2a	52		N				P		28,8		N						N	
93	Land	M	6m-2a	38	44	N	N			N	N			N	N					N	N
94	Land	M	>5a	48		N				P		25,8		N						N	
95	Land	F	<6m	38		N				P		32,8		N						N	
96	Land	M	<6m	37		N				P		37,6		N						N	
97	Land	M	<6m	28		N				P		29,8		N						N	
98	Land	F	6m-2a	36	38	N	N			P	P	26,7	27,5	N	N					Hep	Hep
99	Land	M	2-5a	44	57	N	N			P	P	27,7	29,5	N	N					N	N
100	Land	F	2-5a	33	43	N	N			P	P	27,6	28,4	N	N					Hep	N

## Fortsetzung

Tier	Zone	Geschl	Alter	Hämatokrit		Serologie				real-time PCR								Blutausstriche		
				Wert( %)		Ergebnis		Titer		Piroplasmen		Cycle		B. c. v.		Cycle		I.	II.	
				I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.			
101	Land	M	>5a	48						P			26,9			N			N	
102	Land	M	6m-2a	54	54	N	N			P	P		25,5	24,2	N	N			N	N
103	Land	M	>5a	55	55	N	N			P	P		25	24,6	N	N			N	N
104	Land	M	>5a	49	45	N	N			P	P		30,9	27,2	N	N			Hep	N
105	Land	M	6m-2a	47	41	N	N			P	P		29,6	28,5	N	N			N	N
106	Land	F	6m-2a	44	41	N	N			P	P		24,6	24,8	N	N			N	N
107	Stadt	F	2-5a		51		N				N					N				N
108	Stadt	F	2-5a		38		N				P			35,2		P		38,1		N
109	Stadt	M	6m-2a		34		N				P			27,8		N				N
110	Stadt	F	2-5a		44		N				P			34,8		N				N
111	Stadt	M	6m-2a		41		N				P			37		P		39,2		N
112	Stadt	F	>5a		47		N				N					N				N
113	Stadt	M	2-5a		55		N				N					N				N
114	Stadt	F	>5a		45		N				P			22,8		N				Hep
115	Stadt	M	6m-2a		48		N				N					N				N
116	Stadt	F	>5a		33		N				P			30,4		N				Hep
117	Stadt	F	>5a		43		N				P			26,3		N				N
118	Stadt	M	2-5a		45		N				P			26,3		N				N
119	Stadt	F	>5a		37		N				N					N				N
120	Stadt	M	>5a		44		N				N					N				N
121	Stadt	F	>5a		57		N				P			28		N				N
122	Stadt	M	<6m		36		N				P			31,2		N				N
123	Stadt	M	6m-2a		37		N				P			27		N				Hep
124	Stadt	M	6m-2a		46		N				N					N				N
125	Stadt	F	6m-2a		28		N				N					N				N
126	Stadt	M	<6m		33		N				N					N				N
128	Stadt	F	<6m		40		N				P			31,7		N				N
131	Stadt	F	<6m		44		N				P			32		N				N
132	Stadt	M	2-5a		51		N				P			32,4		N				N
133	Stadt	M	6m-2a		34		N				P			32,5		N				N
134	Stadt	F	6m-2a		47		N				N					N				N
135	Stadt	F	2-5a		47		N				N					N				N
136	Stadt	F	2-5a		45		N				N					N				N
137	Stadt	F	2-5a		48		N				P			36,5		N				N
138	Stadt	F	<6m		38		N				P			27,4		N				N
139	Stadt	F	6m-2a		45		N				N					N				N
140	Stadt	F	6m-2a		41		N				N					N				N
141	Stadt	M	6m-2a		38		N				P			29,4		P		37,7		N
142	Stadt	F	>5a		48		N				N					N				N
143	Stadt	F	<6m		31		N				P			31,3		P		38,4		N
144	Stadt	M	<6m		28		N				P			34,4		N				N
145	Stadt	F	6m-2a		44		N				N					N				N
146	Stadt	M	6m-2a		48		N				P			26,5		N				N

## Anhang 3. Patientendaten der Hunde aus Carlos Chagas

Tier	Zone	Geschl	Alter	Hämatokrit		Serologie				real-time PCR						Blutausstriche					
				Wert( %)		Ergebnis		Titer		Piroplasmen		Cycle		B. c. v.		Cycle		I.	II.		
				I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.				
1	Land M	>5a	38			P		10240			P		31,7			N			N		
2	Land M	6m-2a	38	45	N	N					N	N				N	N		N	N	
3	Land M	>5a	43	47	N	P			1280		N	P		33,2		N	P		32,5	N	N
4	Land M	<6m	25			N					P		26,7			N				N	
5	Land F	6m-2a	48	51	N	N					P	P	30,1	27,7		N	N			N	N
6	Land F	6m-2a	40	47	N	P			40		N	N				N	N			N	N
7	Land M	6m-2a	35			N					N					N				N	
8	Land M	2-5a	43	44	P	P		640	80		P	P	38,7	28,3		N	N			N	N
9	Land F	6m-2a	28	48	N	N					P	P	32	29		N	N			N	N
10	Land M	6m-2a	34	34	N	N					P	P	24,6	22,9		N	N			N	N
11	Land M	>5a	41	50	P	N		320			N	P		30,4		N	N			N	N
12	Land M	2-5a	45	45	P	P		5120	1280		P	P	26,9	25,9		P	N	27,9		N	N
13	Land F	2-5a	19			P		5120			P		25,2			N				N	
14	Land M	>5a	26	49	P	P		1280	640		P	P	25,7	26,1		N	N			N	N
15	Land M	6m-2a	32	48	P	P		5120	1280		P	P	30,7	30,5		P	P	37,2	38,2	Hep	N
16	Land F	>5a	39	36	P	P		2560	160		N	P		31,9		N	N			N	N
17	Land M	>5a	37	30	P	P		160	5240		P	P	29,7	31,6		N	P		37	N	N
18	Land M	6m-2a	36			P		1280			P		24,9			N				N	
19	Land M	6m-2a	40			P		80			P		25,2			N				N	
20	Land M	6m-2a	42			N					P		24,6			N				N	
21	Land M	6m-2a	40	44	P	P		10240	80		N	P		27,9		N	N			N	N
22	Land F	>5a	13	29	N	N					P	P	34,3	33,2		N	N			N	N
23	Land M	2-5a	36	45	P	N		320			N	N				N	N			N	N
24	Land M	6m-2a				N					P		24,1			N				N	
25	Land M	6m-2a	24	51	N	N					P	P	35	23,7		N	N			N	Hep
26	Land M	6m-2a	42			P		160			P		29,3			N				N	
27	Land F	6m-2a	47			P					P		27,1			N				N	
28	Land M	<6m	48			N					P		27			N				N	
29	Land M	<6m	28			N					P		26			N				N	
30	Land F	6m-2a	27			N					P		26			N				Hep	
31	Land F	<6m	38			N					P		34,9			N				N	
32	Land M	<6m	20			N					N					N				N	
33	Land M	2-5a	29	29	P	N		160			P	P	28,2	25,6		N	N			N	N
34	Land M	>5a	32			P		5120			P		27,5			P		28,4		N	
35	Land M	2-5a	27			N					P		23			P		22,6		Babesien	
36	Land F	<6m	49	48	P	P		10240	640		P	P	26,9	25,2		P	P	34	39,5	N	N
37	Land M	2-5a	53	47	P	N		2560			P	P	35,3	26,1		N	P		37,2	N	N
38	Land F	>5a	34	38	P	P		10240	640		P	P	26,9	27,7		N	N			Hep	N
39	Land M	6m-2a	24	39	P	P		10240	320		P	P	25,4	24,5		P	N	38,1		N	N
40	Land M	>5a	46	43	P	P			320		P	P	30,9	25,4		N	N			N	N
41	Land M	2-5a	52			P		40			P		34,9			N				N	
42	Land M	>5a	33	46	P	P		160	160		P	P	23,8	26		N	P		35,3	N	N
43	Land M	2-5a	41	45	P	N		10240			P	P	32,9	29,8		P	N	40,9		N	N
44	Land M	>5a	42			N					P		30,3			N				N	
45	Land M	6m-2a	57			P		10240			P		27,9			N				N	
46	Land M	<6m	27			N					P		26,2			N				N	
47	Land M	>5a	32			P		10240			P		29			P		31,6		N	
48	Land F	6m-2a	36	36	N	N					P	P	30	31,3		N	P		41	N	N
49	Land M	6m-2a	38	41	N	N					P	P	30,1	30,6		N	N			N	N
50	Land M	>5a	22			N					P		29,5			N				N	

Fortsetzung

Tier	Zone	Geschl	Alter	Hämatokrit		Serologie				real-time PCR								Blutausstriche	
				Wert( %)		Ergebnis		Titer		Piroplasmen		Cycle		B. c. v.		Cycle		Blutausstriche	
				I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
51	Land	M	6m-2a	35	40	P	P	320	640	P	P	28,9	27,3	N	N			N	N
52	Land	M	6m-2a	51		P		2560		P		28,8		P		30,8		N	
53	Land	M	>5a	44	59	P	N	40		N	P		25,9	N	N			N	N
54	Land	M	6m-2a	37		N				N				N				N	
55	Land	M	6m-2a	37	41	N	N			N	P		38	N	N			N	N
56	Land	M	6m-2a	33	45	N	N			P	P	23,6	23	N	N			N	N
57	Land	M	6m-2a	38	38	N	N			P	P	27,2	23,8	N	N			N	N
58	Land	M	2-5a	39	46	P	N			P	P	28,6	25,8	N	P		40,7	Hep	N
59	Land	M	>5a	38	38	P	N			N	P		25,8	N	N			N	N
60	Land	M	6m-2a	41	39	N	N			P	P	29,9	36,5	P	N	37,6		N	N
61	Land	M	2-5a	49	54	P	N	320		N	N			N	N			N	N
62	Land	M	<6m	39	47	N	N			P	P	31,2	37,1	N	N			N	N
63	Land	M	>5a	43	44	N	N			P	P	26,3	27,4	N	N			N	N
64	Land	M	>5a	25	26	P	N	1280		N	P		27,8	N	N			N	N
65	Land	M	6m-2a	38	47	N	N			P	P	28,7	41,7	N	N			N	N
66	Land	M	<6m	39	44	N	P		1280	N	P		27,2	N	N			N	N
67	Land	M	2-5a	35	48	P	P	160	80	P	P	26,2	24,6	N	P		40,9	N	N
68	Land	F	2-5a	33	48	P	N	160		N	P		23,9	N	P		38,5	N	N
69	Land	M	>5a	54	53	N	N			P	P	34,7	27,2	N	N			N	N
70	Land	M	2-5a	47	45	P	N	40		P	P	24,9	24,1	N	N			N	N
71	Land	M	2-5a	45		P		160		N				N				N	
72	Land	M	>5a	47	45	P	P	2560	80	N	P		26,8	N	N			N	N
73	Land	F	6m-2a	40		P		2560		P		29,7		P		37,4		N	
74	Land	M	6m-2a	33	56	P	P	5120	10240	P	P	27,7	34,8	P	N	37,8		N	N
75	Land	M	6m-2a	40		P		5120		P		32,2		P		32,1		N	
76	Land	M	>5a	23	40	P	P	2560	10240	P	P	23,2	24,4	N	P		32,6	N	N
77	Land	M	6m-2a	38	37	N	N			P	P	32,5	37	P	N	41,4		N	N
78	Land	M	6m-2a	36	43	N	N			P	P	27,5	29,6	N	N			N	N
79	Land	M	6m-2a	43		N				N				N				N	
80	Land	M	2-5a	49	51	N	N			N	N			N	N			N	N
81	Land	F	2-5a	40		N				N				N				N	
82	Land	M	6m-2a	40	41	N	N			P	P	28,2	28,4	N	P		40,6	N	Hep
83	Land	M	2-5a	38	43	N	N			N	P		28,1	N	N			N	N
84	Land	M	>5a	32	28	P	N	160		P	P	26,3	24,8	N	N			N	N
85	Land	M	6m-2a	51	44	N	N			P	P	26,8	25,3	N	N			N	N
86	Land	M	6m-2a	37	44	P	P	2560	80	P	P	23,9	29,6	N	N			N	N
87	Land	F	2-5a	38	33	N	N			P	P	28,1	28,2	N	N			N	N
88	Land	M	>5a	41	34	P	P	1280	160	P	P	30,7	26	N	N			N	N
89	Land	M	2-5a	45		P		320		P		31,2		N				N	
90	Land	M	6m-2a	40		N				P		26,2		N				N	
91	Land	M	6m-2a	32		N				P		28,8		N				N	
92	Land	M	6m-2a	45	39	P	P	320	5240	N	P		32,3	N	P		31,5	N	N
93	Land	M	2-5a	46		N				P		27,2		N				N	
94	Land	M	2-5a	45	50	N	P		1280	P	P	29	27,2	N	P		36,4	N	N
95	Land	M	6m-2a	48	49	P	N	40		P	P	24,7	23,8	N	N			N	N
96	Land	M	6m-2a	39	46	N	N			P	P	28,5	24,9	N	N			N	N
97	Land	F	6m-2a	40	47	N	N			P	P	25,7	22,8	N	N			N	Hep
98	Land	M		48	44	N	P		640	P	P	26,4	26,4	N	P		34,4	N	N
99	Land	M	6m-2a	42	33	N	P		1280	P	P	28,5	27,4	N	N			N	N
100	Land	M	6m-2a	26	29	N	P		1280	N	N			N	N			N	N

## Fortsetzung

Tier	Zone	Geschl.	Alter	Hämatokrit		Serologie				real-time PCR						Blutausstriche			
				Wert( %)		Ergebnis		Titer		Piroplasmen		Cycle		B. c. v.		Cycle		Blutausstriche	
				I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
101	Land	M	2-5a	45	33	N	P		1280	N	P	34,8	N	P		30,8	N	N	
102	Land	F	2-5a	21		P		5120		N			N				N		
118	Stadt	M	>5a		36		N				N			N				N	
119	Stadt	M	2-5a		43		N				N			N				N	
120	Stadt	M	6m-2a		43		N				N			N				N	
121	Stadt	M	2-5a		52		N				N			N				N	
122	Stadt	M	2-5a		50		N				N			N				N	
123	Stadt	F	>5a		44		N				N			N				N	
124	Stadt	F	>5a		46		N				N			N				N	
125	Stadt	M	>5a		38		N				N			N				N	
126	Stadt	F	2-5a		38		N				N			N				N	
127	Stadt	F	<6m		N reali		N				N			N				N	
128	Stadt	M	6m-2a		43		N				N			N				N	
129	Stadt	F	>5a		51		P		80		N			N				N	
130	Stadt	M	2-5a		50		N				N			N				N	
131	Stadt	M	2-5a		52		N				N			N				N	
132	Stadt	M	2-5a		30		P		320		N			N				N	
133	Stadt	M	2-5a		15		N				N			N				N	
134	Stadt	F	<6m		33		N				N			N				N	
135	Stadt	F	2-5a		46		N				N			N				N	
136	Stadt	M	2-5a		48		N				N			N				N	
137	Stadt	M	2-5a		47		P		160		N			N				N	
138	Stadt	M	<6m		39		N				P	24,3		P		37,7		N	
139	Stadt	M	2-5a		49		N				P	28		N				N	
140	Stadt	M	>5a		34		N				N			N				N	
141	Stadt	M	6m-2a		38		N				N			N				N	
142	Stadt	F	>5a		45		N				N			N				N	
143	Stadt	M	6m-2a		47		N				P	30,3		N				N	
144	Stadt	M	2-5a		44		N				N			N				N	
145	Stadt	F	2-5a		46		N				N			N				N	
146	Stadt	M	>5a		46		N				N			N				N	
147	Stadt	M	>5a		57		P		80		N			N				N	
148	Stadt	M	2-5a		50		N				N			N				N	
149	Stadt	M	>5a		37		N				N			N				N	
150	Stadt	F	6m-2a		44		N				N			N				N	
151	Stadt	M	2-5a		46		P		80		N			N				N	
152	Stadt	M	2-5a		42		P		80		N			N				N	
153	Stadt	F	>5a		43		P		320		N			N				N	
154	Stadt	M	2-5a		47		P		80		N			N				N	
155	Stadt	F	6m-2a		42		N				N			N				N	
156	Stadt	F	>5a		54		N				N			N				N	
157	Stadt	M	2-5a		51		N				N			N				N	
158	Stadt	M	>5a		50		P		80		P	33,7		N				N	
200	Land	F	6m-2a		23		N				P	24		P		29,5		N	
201	Land	M	<6m		34		P		320		P	24,4		P		27,2		N	
202	Land	M	<6m		29		P		320		P	24,1		P		24,1		Hep	
203	Land	F	6m-2a		41		N				P	29		N				N	
204	Land	M	>5a		44		P		10240		P	23,3		P		29,3		Hep	
205	Land	F	6m-2a		39		N				P	27,2		N				N	
206	Land	M	>5a		43		P		320		P	23,9		N				N	
207	Land	M	2-5a		40		P		80		P	24,5		N				N	

## Anhang 4. Patientendaten der Hunde aus Igarapé

Tier	Zone	Geschl	Alter	Hämatokrit		Serologie				real-time PCR						Blutausstriche								
				Wert( %)		Ergebnis		Titer		Piroplasmen		Cycle		B. c. v.				Cycle						
				I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.					
1	Land	M	6m-2a	31		P		10240			N				N			N						
2	Land	F	6m-2a	20	46	N	N				N	N			N	N		N						
3	Land	M	2-5a	43		P		640			N				N			N						
4	Land	M	6m-2a	30		P		320			N				N			N						
5	Land	M	6m-2a	35	31	N	N				N	N			N	N		N						
6	Land	M	<6m	24	42	N	N				N	N			N	N		N						
7	Land	F	<6m	31	33	N	P		160		N	P		27,3	N	N		N						
8	Land	F	>5a	39		P		40			P		31,2		N			N						
9	Land	M		42		N					P		29,4		N			N						
10	Land	F	>5a	41		P		80			N				N			N						
11	Land	M	6m-2a	46	48	N	P		2560		N	P		31	N	P		35	N					
12	Land	M	>5a	59	50	N	P		640		P	P		29,8	27,4	N	N		N					
13	Land	F	2-5a	46	54	N	N				N	N			N	N			N					
14	Land	M	6m-2a	43	51	N	N				N				N	N			N					
15	Land	F	2-5a	41	49	N	N				P	P		34,2	29,4	N	N		N					
16	Land	F	6m-2a	38	49	N	N				P	P		25,8	24,8	N	N		N					
17	Land	M	6m-2a	35		N					N				N				Hep					
18	Land	F	6m-2a	43	51	N	N				N	N			N	N			N					
19	Land	F	6m-2a	24		N					N				N				N					
20	Land	F	>5a	28	23	N	P		10240		N	N			N	N			N					
21	Land	M	<6m	22		N					P		25,7		P		26,6		Bab					
22	Land	M	<6m	39		N					P		23,8		N				N					
23	Land	M	2-5a	49	48	N	N				P	P		32,5	24,5	P	N		36,7	N				
24	Land	M	<6m	35	43	N	N				N	N			N	N				N				
25	Land	F	>5a	45	45	N	N				N	N			N	N				N				
26	Land	M	>5a	39		N					N				N					N				
27	Land	F	6m-2a	45		N					N				N					N				
28	Land	F	6m-2a	40	34	N	N				N	N			N	N				N				
29	Land	F	>5a	37		P		80			N				N					N				
30	Land	M	>5a	42	35	P	P	640	2560		P	P		36,6	26,6	N	N			N				
31	Land	M	>5a	43	36	P	P	80	80		N	P			30,9	N	N			N				
32	Land	M	2-5a	39	42	P	P	320	80		N	P			24,3	N	N			N				
33	Land	M	6m-2a	42	46	N	P		80		P	P		23,9	26,4	P	N			38,5	N			
34	Land	M	<6m	29		N					P		34,6		N						N			
35	Land	M	6m-2a	38	47	N	P		80		P	P		27,8	30	N	N				N			
36	Land	M	2-5a	45	38	P	P	80	320		N	N			N	N					N			
37	Land	M	6m-2a	36		N					N				N						N			
38	Land	M	6m-2a	30	34	N	N				N	N			N	N					N			
39	Land	F	>5a	44	26	P	P	320	640		N	P			29,8	N	N				N			
40	Land	M	<6m	31	39	N	N				P	P		29	25,7	P	N				41,2	N		
41	Land	F	<6m	35		N					N				N							N		
42	Land	M	2-5a	40		P		320			N				N							N		
43	Land	M	6m-2a	50		P		320			N				N							N		
44	Land	M	2-5a	38		N					N				N							N		
45	Land	M	>5a	39	36	P	P	2560	2560		N	P			31	N	N					N		
46	Land	M	6m-2a	42	20	P	P	320	320		P	P		30,8	24,8	P	N					37,3	N	
47	Land	M	6m-2a	46	37	P	P	640	160		N	N			N	N							N	
48	Land	F	2-5a	39	35	P	P	80	80		P	P		29,6	29,5	N	N						N	
49	Land	M	<6m	27		N					P		33,1		P								37,7	N
50	Land	F	6m-2a	42		N					P		32		N									N



**Fortsetzung**

Tier	Zone	Geschl	Alter	Hämatokrit		Serologie				real-time PCR						Blutausstriche	
				Wert( %)		Ergebnis		Titer		Piroplasmen		Cycle		B. c. v.			
				I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
51	Stadt	M	6m-2a	34		P		40		N					N		
52	Stadt	F	<6m	18		N				N					N		
53	Stadt	M	2-5a	55		N				N					N		
54	Stadt	F	2-5a	54		N				N					N		
55	Stadt	F	>5a	45		P		80		N					N		
56	Stadt	M	6m-2a	52		N				N					N		
57	Stadt	M	>5a	54		N				N					N		
58	Stadt	M	>5a	55		N				N					N		
59	Stadt	M	6m-2a	49		N				N					N		
60	Stadt	M	6m-2a	48		N				N					N		
61	Stadt	M	>5a	32		P		1280		N					N		
62	Stadt	M	>5a	49		P		80		N					N		
63	Stadt	M	2-5a	54		N				N					N		
64	Stadt	M	<6m	31		N				N					N		
65	Stadt	M	<6m	35		N				P		25,3			N		
66	Stadt	M	>5a	40		P		80		P		27,6			N		
67	Stadt	M	>5a	37		P		640		N					N		
68	Stadt	F	<6m	38		P		640		N					N		
69	Stadt	F	6m-2a	34		N				N					N		
70	Stadt	F	<6m	38		N				N					N		
71	Stadt	F	6m-2a	41		N				N					N		

**Anhang 5. Patientendaten der Hunde aus Menderos Neto (Carlos Chagas)**

Tier	Zone	Geschl	Alter	Hämatokrit		Serologie				real-time PCR						Blutausstriche		
				Wert( %)		Ergebnis		Titer		Piroplasmen		Cycle		B. c. v.				Cycle
				I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.
103	Land	F	6m-2a	38		P		2560		P		31,2			N			N
104	Land	F	2-5a	34		P		2560		P		26,2			N			N
105	Land	M		58		P		10240		P		27,5			N			N
106	Land	F	2-5a	16		P		320		P		31,2			P		39,3	N
107	Land	M	6m-2a	40		P		320		N					N			N
108	Land	F	>5a	23		P		10240		N					N			N
109	Land	M	2-5a	33		P		1280		P		33,1			N			N
110	Land	M	<6m	31		N				N					N			N
111	Land	M	6m-2a	24		P		5120		P		33,2			P		32,7	N
112	Land	F	2-5a	40		P		2560		N					N			N
113	Land	M	<6m	27		N				P		30,3			N			N
114	Land	F	2-5a	42		P		1280		N					N			N
115	Land	M	<6m	24		N				P		33,9			N			N
116	Land	M	2-5a	34		P		2560		P		30			N			N
117	Land	F	2-5a	36		P		5120		P		27,9			N			N

**Legende:**

B.c.v. = *Babesia canis vogeli*

M = Männlich

F = Weiblich

Geschl = Geschlecht

P = Positiv

N = Negativ

I. = I. Sammlung

II. = II. Sammlung

**Anhang 6. 18S rDNA- Sequenz von *Babesia canis vogeli* (AY072925) mit den Primern der Piroplasmen Real-time PCR**

1 aacctggttgatcctgccagtagtcatatgcttgtcttaaagattaagccatgcatgtct  
61 aagtacaagctttttacggtgaaactgogaatggctcattacaacagttatagtttattt  
121 ggtattcagattcaatggataaccgtgctaattgtagggctaatacacgtttgaggtctt  
181 ttgaccgcggtttattagtttgaaaccgccttggtttcggtgattcataataaactggc  
241 gaatcgcatttagcgatggaccattcaagtttctgacccatcagcttgacggtagggat  
301 tggcctaccgagggcagcaacgggtaacggggaattagggttcgattccggagagggagcc  
361 tgagagacggctaccacatctaaggaaggcagcaggcgcgcaaattacccaatcctgaca  
421 cagggaggtagtgacaagaaataacaatacagggctaattgtcttctaattggaatgatgg  
481 tgaccacaccctcaccagagtagcaattggagggcaagtctggtgccagcagccgcggt  
541 aattccagctccaatagcgtatattaaacttggtgcagttaaaagctcgtagttgaatt  
601 ttagcgtgttcgagtttgccattogtttggtttttcogagttcgcttttggttttccct  
661 ttttactttgagaaaattagagtggttcaagcagacttttgtcttgaatacttcagcatg  
721 gaataatagagtaggactttggttctatatttggttggttattgaaccttagtaatggttaa  
781 taggaacggttgggggcattogtatttaactgtcagaggtgaaattcttagatttgttaa  
841 agacgaactactgcgaaagcatttgccaaggacgtttccattaatcaagaacgaaagtta  
901 ggggatcgaagacgatcagataaccgtogtagtccataaccataaaccatgccgactagtga  
961 ttggaggtcgtcgttttctgaccccttcaggaacttgagagaaatcaaagtctttgggt  
1021 tctggggggagataggtcgcaaggctgaaacttaaaggaattgacggaagggcaccacca  
1081 ggcgtggagcctgcggcttaatttgactcaacacggggaaactcaccaggtccagacaaa  
1141 cggtaggattgacagattgatagctctttcttgattctttgggtggtggtgcatggccgt  
1201 tcttagttggtggagtgatttgtctggttaattccggttaacgaacgagaccttaacctgc  
1261 taactagcggcgggttactgtggtttccggttgcttcttagagggactttggggctctaag  
1321 ccctgaggaagtttaaggcaataacaggtctgtgatgcccttagatgtcctgggctgcac  
1381 gcgcgctacactgatgcattcatogagttgttccttgccgagaggtcttggtaatcttt  
PIR3 5' -AATCATGAACGAGGAATGC-3'  
1441 agtatgcatcgtgacggggattgatttttgaattctaaatcatgaacgaggaatgccta  
Sonde 5' -cgcgatACACACCGCCCGT  
1501 gtatgcgcaagtcacagcttgtgcagattacgtccctgcctttgtacacaccgcccgt  
CGCTtcgcg-3' 3' -CACTAGGCCACTTAATAAGC-5' PIR2  
1561 cgctcctaccgatcagtgatccgggtgaattattcggactgtggcttttccgattcgtcg  
1621 gtttagcttcgaaagttttgtgaaccttatcacttaaaggaaggagaagtcgtaacaag  
1681 gtttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattc

**Anhang 7. ITS2-rDNA-Sequenz von *Babesia canis vogeli* (AF394534) mit Primern und Sonde für die spezifische *Babesia canis vogeli* Real-time PCR**

1 ttaaaggaaggagaagtcgtaacaaggtttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattca  
61 cattgatggtacctagcacttgtgctttcgcgggacgcgctgtcgaggttgcctggcgg  
121 cggctctcgtctggcaacggggcggcgatcgccggttctaccctttgggcggtgccccct  
181 ctccacccccactggggcggttgcgtaagctctgccccgggttaggccccgagcgtggattc  
241 cgttggtttccgggcttggggatgtggcgcgcctgggcgcgctcagggctttgacctctgc  
301 ggcttggccgatttgcaactccgcttgactgtgtcgagtaattgaaattctaaactttcag  
361 cgatggatgtcttggctcacacaacgatgaaggacgcagcgaattgcgatacgcattatg  
421 acttgcagacttctcgcgatttaacagacctccgaacgtaaccaacacaccgcctctgtcg  
481 cacgcggtactcccgtttcagtgagccccctttctgaggcttgcctttttggcagccttg  
541 cgagtgggtggttgtgcccgcgattgcgtggaggagttggctggccaaggctcgtgggtg  
5'-TGTGTATGTGATAACCGAATCT  
601 ttcactctgtggagtgcggccatttgcctogaagcattttgtgtatgtgataccgaatct  
TC-3' BC-3

Sonde 5'-cgcgatGTGAGCCGTCTGACTCCGTGTatcgcg-3'

661 tctgcgaggctgttgggctctgcccagactgcggtgagccgtctgactccgtgtctcta  
3'-GATAGGCGACTTAAATTCGT-5' BC-2  
721 ttccgctcctgaaatcgggtgaggctatccgctgaatttaagcatataattaagcggcag  
781 aaaagaaaataacatgattccctc

**Anhang 8. Homologievergleich der 18S rDNA-Sequenzen von *Babesia gibsoni* (Bg), *Babesia canis vogeli* (Bv), *Babesia canis canis* (Bc) und *Hepatozoon canis* (Hc) und Spezifität der Primer aus Birkenheuer et al. (2003)**

**Legende:**

AY072925	<i>Babesia gibsoni</i>	455-479F	forward primer
AY072926	<i>Babesia canis vogeli</i>	793-772R	reverse primer
AF158702	<i>Babesia canis canis</i>		
DQ111754	<i>Hepatozoon canis</i>		

Bg	1	-----
Bv	1	AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTTAAAGATTAAGCCATGCATGCTCT
Bc	1	-----TCATATGCTTGTCTTAAAGATTAAGCCATGCATGCTCT
Hc	1	-----CAAACCTGCAATGGCT
Bg	1	AAGTACAAGCTTTTACGGTGAAACTGCGAATGGCT---CATT-ACAACAGTTATAGTT
Bv	61	AAGTACAAGCTTTTACGGTGAAACTGCGAATGGCT---CATT-ACAACAGTTATAGTT
Bc	38	AAGTATAACTTTTATATGGTGAAATGCGAATGGCT---CATT-AAAACAGTTATAGTT
Hc	18	CATTAAACAGTTAT--GGTTTACTTGATAATATTTTTCATGGATAACCGTGTAAT
Bg	56	-TATTTGGTATTCAGAT---TCAATGGATAACCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACACGT
Bv	116	-TATTTGGTATTCATTT---TCCATGGATAACCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACACGT
Bc	93	-TATTTGAAATTCGTTTC---TACATGGATAACCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACATGA
Hc	76	CTACAGCTAATACATGAGCAAAACATGGATAACCGTGGTAATTCACAGCTAATACATGA
Bg	111	TTGAGGTCT---TTT---GACC---GCGTTTATTAGTTT-GAAACC---C---GCCT
Bv	171	TTGAGGTCT---TTT---GACC---GCGTTTATTAGTTT-GAAACC---C---GCCT
Bc	149	TCGAGGTCC---TTCTG---GACT---GCGTTTATTAGACTCGAAACCTTCC---GCTT
Hc	136	GCAAAATCTCAACTTTTATTAGAAGAGAAACATTTTATTAGATAAAAGCCAATGCATGCTT
Bg	152	TGGCTTT-----CGGTGATTCATAATAAACTGGCGAATCGCAT---TTAGC---G
Bv	212	TGGCTTT-----CGGTGATTCATAATAAACTGGCGAATCGCAT---TTAGC---G
Bc	197	CGCGGTTCC---CGGTGATTCATAATAAACAG-CGAATCGCATGGCTTTTCGCCGCG
Hc	196	TTACAGTATGAAAATTGGTGATTTATAATAACTTAGCAAAATCGTAAAGTGAAAACAGACG
Bg	196	ATGGACCATTCAAGTTTCTGACCATCAGCTT--GACGGTAGGGTATTGGCTACCGAGG
Bv	256	ATGGACCATTCAAGTTTCTGACCATCAGCTT--GACGGTAGGGTATTGGCTACCGAGG
Bc	251	ATAATTCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGACGGTAGGGTATTGGCTACCGGG
Hc	256	ATAAATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGACGGTATGGTATTGGCTACCGTGG
Bg	254	CAGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTA
Bv	314	CAGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTA
Bc	311	CAGCGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTA
Hc	316	CAGTGACGGTTAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTA
Bg	314	CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACAC---AGGGAGGT
Bv	374	CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACAC---AGGGAGGT
Bc	371	CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACAC---CGTGAGGT
Hc	376	CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTAACAGTTTCAGAGAGGT

(455-479F) → 5' -GTCTTGTAAATTGGAATGATGGTGAC-3'

Bg 370 AGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC---TA--ATGTCCTTGTAAATTGGAATGATGGTGAC  
 Bv 430 AGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC---GA--ATGTCCTTGTAAATTGGAATGATGGTGAC  
 Bc 427 AGTGACAAGAAATAACAATACAGGGC---TTT--AAGCTTGTAAATTGGAATGATGGGAAT  
 Hc 436 AGTAAACAAGAAATAACAATACAAGGCAGTTAAAATGCTTGTAAATTGGAATGATAGAAAT

Bg 425 CCACACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATT  
 Bv 485 CCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATT  
 Bc 483 CCAAACCCTTCCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATT  
 Hc 496 TTAAACCCTTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATT

Bg 485 CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTAG  
 Bv 545 CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAACTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTGTG  
 Bc 543 CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAATTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTCTG  
 Hc 556 CCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAAATTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACTTCTG

Bg 545 C----GTGTTCGA----GTTTG----CCATTGCT--TTGGC--TTTTTCG--AGT--  
 Bv 605 C----GTTGACG----GTTTGA----CCATTGG--TTGGT--TATTTTCG--TTT--  
 Bc 603 C----CGCCGGGA----CTTCGTT--CCCTTCGGGGCTTCGT--TTTCTCG--GTGTC  
 Hc 616 CTAAAGTAACCGGTCTGCTTTTAAATAAAAAGTGGTATCTTGGTATGTAATTTACCAATGAT

Bg 582 -TCGCT-----TTTGGG-----T-----TTTCCC--TTTTTACTTTGAG  
 Bv 642 -TCGCT-----TTTGGG-----AA-----TTTCCC--TTTTTACTTTGAG  
 Bc 647 ATCCCTCTGGTTAATTTGGGCCTTCGGCCCTCTT-----TTTCCAG--TTTTTACTTTGAG  
 Hc 676 GTCCTTTGAAGTGTTTTTTACTTTATTTGTAATAAAGCATATTCAGGACTTTTACTTTGAG

Bg 613 AAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGT  
 Bv 674 AAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGT  
 Bc 700 AAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAAGT  
 Hc 736 AAAATTAGAGTGTTC TAGCAGGCCGACGCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAAGAT

← 3' -ATTATCCTTGCCAA

Bg 673 AGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTATTTGAACCTTAGT--AATGGTTAATAGGAACCGTT  
 Bv 734 AGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTATTTGAACCTTAGT--AATGGTTAATAGGAACCGTT  
 Bc 760 AGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTTCAGGACCAAAGT--AATGGTTAATAGGACAGTT  
 Hc 796 AGGATTTTAGTTCTACATTGTTGGTTTAAAGACTAAATTAATGATTGATAGGACAGTT  
 CCCCCGTA-5' ← (793-772R)

Bg 732 GGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTAC  
 Bv 793 GGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTAC  
 Bc 819 GGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTAC  
 Hc 856 GGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACAAACTAC

Bg 792 TGCGAAAGCATTTCGCAAGGACGTTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Bv 853 TGCGAAAGCATTTCGCAAGGACGTTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG  
 Bc 879 TGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGCTCGAAG  
 Hc 916 TGCGAAAGCATTTCGCAAGGATGTTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAG

Bg 852 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACCATGCCGACTAGTGATTGGAGGTCGT  
 Bv 913 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGTGATTGGAGGTCGT  
 Bc 939 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT  
 Hc 976 ACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGT

Bg 912 CGTTTTTC-TGACCCTTCAGGAACTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGA  
 Bv 973 CGTTTTT--TGACCCTTCAGGAACTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGA  
 Bc 999 CTTTTTAAACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGA  
 Hc 1036 CTTTTATAAACGACTCCTTCAGCACCTTACGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGT-CTGGGGGA

Bg 971 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Bv 1031 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Bc 1059 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC  
 Hc 1095 GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGC

Bg 1031 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACAAACGGTAGGATT  
 Bv 1091 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACAAACGGTAGGATT  
 Bc 1119 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACATACTTAGGATT  
 Hc 1155 CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACATACTTAGGATT

Bg 1091 GACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCTTTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGG  
 Bv 1151 GACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCTTTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGG  
 Bc 1178 GACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTAAGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGG  
 Hc 1214 GACAGATTGATAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGCCGTTCTTAGTTGG

Bg 1151 TGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAACTAGCGG  
 Bv 1211 TGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAACTAGTGC  
 Bc 1238 TGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCAG  
 Hc 1274 TGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATAG---

Bg 1211 CGGTTA-----CTGTGGTTTTCCGG--TTGCTTCTTAGAGGGACTTTGGGGCTCTAAGC  
 Bv 1271 CGGTTA-----TTTGAAGTTTTCCGG--TTGCTTCTTAGAGGGACTTTGGGGCTCTAAGC  
 Bc 1298 CTGAGAATAAACTTTGTTGTTTTGAGCATTGCTTCTTAGAGGGACTTTGGGGCTCTAAGC  
 Hc 1331 -GGTCAAAA---GCTTTTGTTTTTAAA-ATTACTTCTTAGAAGGACTTTCCGTGCTAA---

Bg 1262 CCTGAGGAAGTTTAAAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACG  
 Bv 1322 CCTGAGGAAGTTTAAAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACG  
 Bc 1358 CGCAAGGAAGTTTAAAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACG  
 Hc 1384 CGCGAGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACG

Bg 1322 CGCGCTACACTGATGCATTCATCGAGTTG--TTCCTTGGCCGAGAGGTCCTGGTAATCTT  
 Bv 1382 CGCGCTACACTGATGCATTCATCGAGTTA--TTCCTTGGCCGAGAGGTCCTAGGTAATCTT  
 Bc 1418 CGCGCTACACTGATGCATTCATCGAGTTTT-ATCCTTGCCTGAAAGGCTTAGGTAATCTT  
 Hc 1444 CGCGCTACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAACCTTGGCTGGTAAGCTTGGTAATCTT

Bg 1380 TAGTATG--CATCGTGACGGGGATTGATTTTTCGAATTCTAAATCATGAACGAGGAATGC  
 Bv 1441 TAGTATG--CATCGTGACGGGGATTGATTTTTCGAATTCTAAATCATGAACGAGGAATGC  
 Bc 1477 TAGTATG--CATCGTGATGGGGATTGATTTATTCGAATTCTAAATCATGAACGAGGAATGC  
 Hc 1504 TTGAATGTGCATCGTGATGGGAATGATTTATTCGAATTCTAAATCATGAACGAGGAATGC

Bg 1438 CTAGTATGCGCAAGTCATCAGCTTGTGCAGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCC  
 Bv 1499 CTAGTATGCGCAAGTCATCAGCTTGTGCAGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCC  
 Bc 1535 CTAGTAGCGCGAGTCATCAGCTCGTGCAGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCC  
 Hc 1564 CTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTTGCCTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCC

Bg 1498 CGTCCGCTCCTACCGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCGGACTGTGGCTTTTCCGATTCCG  
 Bv 1559 CGTCCGCTCCTACCGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCGGACTGTCCGCTTTTCCGATTCCG  
 Bc 1595 CGTCCGCTCCTACCGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCGGACTGTCCGCTTTTCCGATTCCG  
 Hc 1624 CGTCCGCTCCTACCGATTGAGTGATCCGGTAAATTATTTAGACTGTA-----

Bg 1558 TCGGTTTAGCTTCGGAAAGTTTTGTGAACCTTATCACTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAAC  
 Bv 1619 TCGGTTTAGCTTCGGAAAGTTTTGTGAACCTTATCACTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAAC  
 Bc 1655 TTAGCAACGCTCTAGGAAAGTTTTGTGAACCTTATCACTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAAC  
 Hc -----

Bg 1618 AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC  
 Bv 1679 AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC  
 Bc 1715 AAG-----  
 Hc -----

**Anhang 9. Statistische Tabellen**

**Zu 2.1: Seroprävalenz und Alter**

**Tabelle 18:** Statistische Auswertung der Seroprävalenzen der einzelnen Altersgruppen (IFAT)

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Monte-Carlo-Signifikanz (2-seitig)		
				Signifikanz	99 %-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Chi-Quadrat nach Pearson	23,058	3	0,000	0,000	0,000	0,000
Likelihood-Quotient	25,454	3	0,000	0,000	0,000	0,000
Exakter Test nach Fisher	24,582			0,000	0,000	0,000
Zusammenhang linear-mit-linear	22,159	1	0,000	0,000	0,000	0,000
Anzahl der gültigen Fälle	383					

**Zu 2.2: Prävalenz und Alter**

**Tabelle 19:** Statistische Auswertung der Prävalenzen der einzelnen Altersgruppen (PCR)

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Monte-Carlo-Signifikanz (2-seitig)		
				Signifikanz	99 %-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Chi-Quadrat nach Pearson	9,498	3	0,023	0,022	0,021	0,024
Likelihood-Quotient	9,504	3	0,023	0,027	0,026	0,028
Exakter Test nach Fisher	9,308			0,023	0,022	0,025
Zusammenhang linear-mit-linear	9,214	1	0,002	0,003	0,002	0,003
Anzahl der gültigen Fälle	383					

**Zu 2.3: Prävalenz und Geschlecht**

**Tabelle 20:** Statistische Auswertung der Prävalenzen der Geschlechterverteilung (PCR)

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt- Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	1,313	1	0,252	0,276	0,168	
Kontinuitätskorrektur	,925	1	0,336			
Likelihood-Quotient	1,376	1	0,241	0,276	0,168	
Exakter Test nach Fisher				0,276	0,168	
Zusammenhang linear-mit-linear	1,309	1	0,253	0,276	0,168	0,079
Anzahl der gültigen Fälle	385					

**Tabelle 21:** Statistische Auswertung der Seroprävalenzen der Geschlechterverteilung (IFAT)

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	6,027	1	0,014	0,015	0,009	
Kontinuitätskorrektur	5,442	1	0,020			
Likelihood-Quotient	6,278	1	0,012	0,015	0,009	
Exakter Test nach Fisher				0,015	0,009	
Zusammenhang linear-mit-linear	6,012	1	0,014	0,015	0,009	0,005
Anzahl der gültigen Fälle	385					

**Zu 2.4: Prävalenz und Hämatokritwert**

**Tabelle 22:** Statistische Auswertung der Hämatokritwerte hinsichtlich der Positivität in der *Babesia canis vogeli* Real-Time PCR

Real-Time PCR	Hämatokritwert
Mann-Whitney-U	4301,500
Wilcoxon-W	5004,500
Z	-3,283
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,001
Monte-Carlo-Signifikanz (2-seitig)	Signifikanz
	99 %-Konfidenzintervall
	Untergrenze
	Obergrenze
	0,001
	0,001
	0,001

**Tabelle 23:** Statistische Auswertung der Hämatokritwerte hinsichtlich der Positivität beim Indirekten Immunfluoreszenzantikörpertest

Serologie	Hämatokritwert
Mann-Whitney-U	14358,500
Wilcoxon-W	53418,500
Z	-0,155
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,877
Monte-Carlo-Signifikanz (2-seitig)	Signifikanz
	99 %-Konfidenzintervall
	Untergrenze
	Obergrenze
	0,877
	0,874
	0,879



**Zu 2.5: Prävalenz und Trocken- bzw. Regenzeit**

**Tabelle 24:** Deskriptive Statistik im Bezug auf die Regen-/Trockenzeit für die drei Regionen zusammengefasst

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Serologie.1	167	0,28	0,448	0	1
PCR.1	167	0,09	0,287	0	1
Serologie.2	167	0,26	0,442	0	1
PCR.2	167	0,11	0,311	0	1

**Tabelle 25:** Statistische Auswertung der Prävalenz und Seroprävalenzen im Bezug auf die Regen-/Trockenzeit für die drei Regionen zusammengefasst (McNemar-Test)

	Serologie.1 und Serologie.2	PCR.1 und PCR.2
N	167	167
Chi-Quadrat	0,033	0,138
Asymptotische Signifikanz	0,855	0,710
Exakte Signifikanz (2-seitig)	0,856	0,711
Exakte Signifikanz (1-seitig)	0,428	0,356
Punkt-Wahrscheinlichkeit	0,135	0,126

**Zu 2.6.1: PCR-Prävalenz und Lebensraum (Stadt/Land)**

**Tabelle 26:** Statistische Auswertung der Prävalenzen abhängig vom Lebensraum (Gesamtzahl der Hunde)

	Wert	Df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	3,784	1	0,052	0,078	0,034	
Kontinuitätskorrektur	3,064	1	0,080			
Likelihood-Quotient	4,295	1	0,038	0,053	0,034	
Exakter Test nach Fisher				0,053	0,034	
Zusammenhang linear-mit-linear	3,774	1	0,052	0,078	0,034	0,023
Anzahl der gültigen Fälle	385					

**Zu 2.6.1: Seroprävalenz und Lebensraum (Stadt/Land)**

**Tabelle 27:** Statistische Auswertung der Seroprävalenzen abhängig vom Lebensraum (Gesamtzahl der Hunde)

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	8,223	1	0,004	0,004	0,002	
Kontinuitätskorrektur	7,499	1	0,006			
Likelihood-Quotient	8,814	1	0,003	0,004	0,002	
Exakter Test nach Fisher				0,004	0,002	
Zusammenhang linear-mit-linear	8,202	1	0,004	0,004	0,002	0,001
Anzahl der gültigen Fälle	385					

**Zu 2.6.2: Auswertung getrennt nach Carrancas, Carlos Chagas und Igarapé (PCR und IFAT)**

**Tabelle 28:** Statistische Auswertung der Prävalenzen abhängig vom Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde in der Region Carrancas

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	0,713	1	0,399	0,470	0,304	
Kontinuitätskorrektur	0,231	1	0,631			
Likelihood-Quotient	0,670	1	0,413	0,470	0,304	
Exakter Test nach Fisher				0,470	0,304	
Zusammenhang linear-mit-linear	0,708	1	0,400	0,470	0,304	0,188
Anzahl der gültigen Fälle	148					

**Tabelle 29:** Statistische Auswertung der Seroprävalenzen abhängig vom Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde in der Region Carrancas

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	0,023	1	0,879	1,000	0,681	
Kontinuitätskorrektur	0,000	1	1,000			
Likelihood-Quotient	0,024	1	0,878	1,000	0,681	
Exakter Test nach Fisher				1,000	0,681	
Zusammenhang linear-mit-linear	0,023	1	0,880	1,000	0,681	0,422
Anzahl der gültigen Fälle	148					

**Tabelle 30:** Statistische Auswertung der Prävalenzen abhängig vom Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde in der Region Carlos Chagas

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	5,138	1	0,023	0,028	0,015	0,013
Kontinuitätskorrektur	3,984	1	0,046			
Likelihood-Quotient	6,737	1	0,009	0,018	0,015	
Exakter Test nach Fisher				0,028	0,015	
Zusammenhang linear-mit-linear	5,107	1	0,024	0,028	0,015	
Anzahl der gültigen Fälle	166					

**Tabelle 31:** Statistische Auswertung der Seroprävalenzen abhängig vom Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde in der Region Carlos Chagas

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	12,458	1	0,000	0,001	0,000	0,000
Kontinuitätskorrektur	11,216	1	0,001			
Likelihood-Quotient	13,149	1	0,000	0,001	0,000	
Exakter Test nach Fisher				0,001	0,000	
Zusammenhang linear-mit-linear	12,383	1	0,000	0,001	0,000	
Anzahl der gültigen Fälle	166					

**Tabelle 32:** Statistische Auswertung der Prävalenzen abhängig vom Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde in der Region Igarapé

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	2,753	1	0,097	0,170	0,111	0,111
Kontinuitätskorrektur	1,420	1	0,233			
Likelihood-Quotient	4,437	1	0,035	0,118	0,111	
Exakter Test nach Fisher				0,170	0,111	
Zusammenhang linear-mit-linear	2,714	1	0,099	0,170	0,111	
Anzahl der gültigen Fälle	71					

**Tabelle 33:** Statistische Auswertung der Seroprävalenzen abhängig vom Lebensraum (Stadt/Land) der Hunde in der Region Igarapé

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Chi-Quadrat nach Pearson	0,003	1	0,957	1,000	0,592	
Kontinuitätskorrektur	0,000	1	1,000			
Likelihood-Quotient	0,003	1	0,957	1,000	0,592	
Exakter Test nach Fisher				1,000	0,592	
Zusammenhang linear-mit-linear	0,003	1	0,957	1,000	0,592	0,216
Anzahl der gültigen Fälle	71					

## **XI Danksagung**

Beim Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) bedanke ich mich ganz herzlich für die finanzielle Förderung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. vet. Lygia Maria Friche Passos für die Bereitstellung des Themas und Herrn Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro sowie der gesamten Belegschaft der „Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva“ und dem „Departamento de Parasitologia“ des „Instituto de Ciências Biológicas“ der „Universidade Federal de Minas Gerais“ in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasilien, für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, Unterstützung und Organisation beim Sammeln der Proben der hier aufgeführten Hunde, sowie dem Bereitstellen der Labore, wie dem dazugehörigem Labormaterial zum Be- und Verarbeiten des gesammelten Probenmaterials. Sie haben mich auf ganz besonders nette und freundliche Art in Ihren Instituten aufgenommen und allzeit unterstützt.

Herrn Dr. Stefan Geiger und Frau Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas und die allzeit freundliche Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Ich möchte mich auch bei Herrn Livio Martins Costa Júnior bedanken, für die nette und stets freundliche Zusammenarbeit beim Sammeln der Proben und bei der Bearbeitung des Themas.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Jörg Hirzmann bedanken, für die allzeit gewährte freundliche und sehr hilfreiche Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung der Arbeiten im Labor und der Bearbeitung des Themas, sowie die geduldige Art, konstruktive Korrektur der Dissertation und die ständige Diskussionsbereitschaft, die er mir entgegenbrachte.

Herrn Prof. Dr. Kurt Pfister möchte ich besonders für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die stets freundliche und motivierende Unterstützung und die konstruktive Korrektur meiner Dissertation danken.

Herrn Florian Scheipl vom Statistischem Beratungslabor des Instituts für Statistik der LMU München möchte ich für die statistische Auswertung meiner Ergebnisse danken.

Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Reiner Siebenmorgen, der mir stets bei der Behebung von computertechnischen Problemen beistand.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Ludwig-Maximilian-Universität München bedanken, für ihre stets unterstützende Art, die gute Arbeitsatmosphäre, die Kollegialität und die gute Laune die dort stets vorherrschte.

Ein ganz persönlicher Dank geht an meinem Lebensgefährten, sowie an meine Eltern und Geschwister und meine Freunde, die mich stets motiviert und unterstützt haben und immer für mich da waren.