



# UNTERSUCHUNGEN ZUR EPIDEMIOLOGIE DER EQUINEN BABESIOSE IN BRASILIEN

**ALEXANDRA HEIM**

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen  
Grades eines Doktors der Veterinärmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Dr. med. vet.)

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

---

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Kurt Pfister

und dem Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade  
Federal de Minas Gerais, Brasilien  
Vorstand: Prof. Dr. Lygia M. Friche-Passos

---

Arbeit unter Leitung von Dr. Jörg Hirzmann

# **Untersuchungen zur Epidemiologie der Equinen Babesiose in Brasilien**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Veterinärmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Dr. med. vet.)

vorgelegt der tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität in München

von

**Alexandra Heim**

geboren in Villingen

München 2007

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. J. Braun  
**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. K. Pfister  
**Korreferentin:** Priv.-Doz. Dr. Wollanke

**Tag der Promotion: 8. Februar 2008**

---

Die vorliegende Arbeit wurde nach § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München als kumulative Dissertation gestaltet.

Der Ergebnisteil 4.1. ist bereits als englischsprachige Publikation im „Parasitology Research“ publiziert.

---

## **Meiner Familie**

Wohin ich auch gehe,  
ich werde nie vergessen,  
wer mir half,  
dort anzukommen! (Anonym)

**Inhaltsverzeichnis:**

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>10</b>
2.1	<b>Taxonomie der Equinen Piroplasmen .....</b>	<b>10</b>
2.2	<b>Entwicklungszyklus .....</b>	<b>11</b>
2.3	<b>Vorkommen der Zecken in Brasilien.....</b>	<b>13</b>
2.3.1	Taxonomische Einteilung der Schildzecken .....	13
2.3.2	Wichtigste Zecken als Vektoren für <i>Theileria equi</i> und <i>Babesia caballi</i> .....	13
2.3.2.1	<i>Amblyomma cajennense</i> .....	13
2.3.2.2	<i>Boophilus microplus</i> .....	14
2.3.2.3	<i>Anocentor nitens</i> .....	15
2.4	<b>Babesien und Theilerien beim Pferd.....</b>	<b>16</b>
2.4.1	Vorkommen.....	16
2.4.2	<i>B. caballi</i> .....	16
2.4.3	<i>T. equi</i> .....	17
2.4.4	<i>B. caballi</i> und <i>T. equi</i> beim Fötus .....	17
2.5	<b>Krankheitssymptome .....</b>	<b>17</b>
2.6	<b>Diagnose.....</b>	<b>18</b>
2.6.1	Direkter Nachweis.....	18
2.6.1.1	Blutausstrich.....	18
2.6.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	19
2.6.1.3	Loop-mediated isothermal amplification“(LAMP).....	19
2.6.2	Indirekter Nachweis .....	19
2.6.2.1	Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT).....	19
2.6.2.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	20
2.6.2.3	Die Komplement-Bindungsreaktion (KBR).....	20
2.7	<b>Therapiemaßnahmen und Prophylaxe .....</b>	<b>20</b>
2.8	<b>Bisherige Untersuchungen zur Babesiose bei Pferden in Brasilien .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
3.1	<b>Herkunftsorte und Probenaufbereitung.....</b>	<b>22</b>
3.2	<b>Verwendete Materialien.....</b>	<b>23</b>
3.3	<b>Molekulare Analyse .....</b>	<b>24</b>
3.3.1	Messung der DNA Konzentration mit Nano-Drop .....	24
3.3.2	Die Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	24
3.3.2.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion.....	24
3.3.2.2	Real-time PCR.....	25
3.3.2.3	Multiplex Real-time PCR zum Nachweis von <i>B. caballi</i> und <i>T. equi</i> beim Pferd .....	26



3.3.3	Klonierung und Aufreinigung von <i>T. equi</i> und <i>B. caballi</i> -spezifischen DNA Sequenzen .....	27
3.3.3.1	Amplifikation .....	27
3.3.3.1.1	Herstellung kompetenter Zellen .....	27
3.3.3.1.2	Transformation durch Hitzeschock .....	28
3.3.3.1.3	Herstellung des Nährbodens .....	28
3.3.3.2	Ligation .....	28
3.3.3.3	Transformation .....	28
3.3.3.4	Selektion .....	29
3.3.3.4.1	Plasmid Aufreinigung .....	30
3.3.4	Sequenzierung der DNA .....	31
3.3.5	Agarosegel-Elektrophorese .....	31
3.3.5.1	Hintergrund .....	31
3.3.5.2	Durchführung .....	31
3.3.6	Optimierung der Auswertungsbedingungen .....	32
3.3.6.1	Real-time PCR zur Bestimmung der Nachweisgrenze über die Molekülanzahl der Klone EMA 1 und BC 48 .....	32
3.3.6.2	Real-time PCR zur Bestimmung der Pferde-DNA .....	34
<b>3.4</b>	<b>Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Publikation .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Prävalenz von <i>T. equi</i> und <i>B. caballi</i> .....</b>	<b>45</b>
4.2.1	Positiver Blutausschlag und Hämatokrit .....	45
4.2.2	Seroprävalenz, PCR-Prävalenz und Hämatokritwert .....	45
4.2.2.1	PCR Prävalenz für <i>T. equi</i> bei einem geringen Hämatokritwert .....	45
4.2.2.2	PCR Prävalenz für <i>B. caballi</i> bei einem geringen Hämatokritwert .....	46
<b>4.3</b>	<b>Molekulare Darstellung von <i>B. caballi</i> und <i>T. equi</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>4.4</b>	<b>Kongenitale Übertragung .....</b>	<b>46</b>
<b>4.5</b>	<b>Zeckenvorkommen .....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1</b>	<b>Problemdarstellung und Zielvorgabe .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
<b>5.3</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>

<b>9</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>61</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>62</b>
10.1	Anhang: Gesamttabelle .....	62
10.2	Anhang: Verwendete Materialien .....	75
10.2.1	Kits, Oligonukleotide, Reagenzien.....	75
10.2.2	Enzym.....	76
10.2.3	Lösungen und Puffer .....	76
10.2.3.1	Lösungen und Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese .....	76
10.2.3.2	Lösungen und Puffer für den Indirekten Immunfluoreszenz-Antikörpertest .....	76
10.2.3.3	Lösungen und Puffer für die Klonierung .....	76
10.2.3.4	Lösung für die Plasmidaufreinigung .....	76
10.3	Anhang: Proben mit unzureichender DNA.....	77
10.4	Anhang: Herkunftsdaten der Schlachtpferde.....	77
10.5	Anhang: Sequenz von <i>T. equi</i> mit den Primern der konventionellen und der Real – time PCR.....	78
10.6	Anhang: Sequenz von <i>B. caballi</i> mit den Primern der konventionellen und der Real – time PCR.....	79
10.7	Anhang: <i>Equus caballus</i> DNA , entnommen der Genom Datenbank DQ297656 mit den Primern der Real – time PCR.....	82
10.8	Anhang: Regionaler Sequenzenvergleich von <i>T. equi</i> :.....	83
10.9	Anhang: Regionaler Sequenzenvergleich von <i>B. caballi</i> .....	87
10.10	Anhang: Reaktionsansatz der Multiplex Real-time PCR für <i>B. caballi</i> und <i>T. equi</i> .....	89
10.11	Anhang: Reaktionsansatz der konventionellen PCR für <i>B.caballi</i> und <i>T. equi</i>	89
10.12	Anhang: Berechnung der Molekülanzahl am Beispiel des „supercoil“ Plasmids von <i>T.equi</i> .....	90
10.13	Anhang: Statistische Tabellen .....	91
10.13.1	Positiver Blutausstrich und Hämatokrit .....	91
10.13.2	PCR Prävalenz <i>T. equi</i> und niedriger Hämatokrit.....	91
10.13.3	PCR Prävalenz für <i>B. caballi</i> bei einem niedrigen Hämatokritwert .....	91
10.13.4	Vorkommen von Doppelinfektionen von <i>B. caballi</i> und <i>T. equi</i> in der Real-time PCR .....	92
10.13.5	Zwei Stichproben T-Test für <i>T. equi</i> .....	92
10.13.6	Zwei Stichproben T-Test für <i>B. caballi</i> .....	93
10.14	Anhang: Prozentuales Aufkommen der Zecken bezogen auf die Region .....	94
10.15	Anhang: Zyklenzahl der über die Real-time PCR positiven Ergebnisse.....	95

---

**11 Danksagung..... 99**

# 1 Einleitung und Problemstellung

*Babesia caballi* und *Theileria equi* (ehemals *Babesia equi*) sind durch Schildzecken übertragene pleomorphe Protozoen (Piroplasmen), welche intraerythrozytär bzw. intralymphozytär in den Vertebraten parasitieren, wodurch die Erkrankung der Equinen Piroplasmose hervorgerufen wird (Eckert et al., 2005).

Im internationalen Pferdehandel und Pferdesport gewinnen die equinen Piroplasmen an Bedeutung. Sowohl die klinische Problematik einer akuten Babesiose, sowie latent infizierte Tiere stellen ein Risikopotential dar, da die Parasiten aus endemischen Gebieten in piroplasmosefreie Länder importiert werden können (Gottstein, 2005).

Brasilien zählt zu den endemischen Gebieten der equinen Babesiose und da von dort nur wenige Studien über die Epidemiologie der Equinen Piroplasmose veröffentlicht wurden (Pfeifer Barbosa et al., 1995; Kerber et al., 1999; Heuchert et al., 1999; Ribeiro et al., 1999) ist es wichtig, die Verbreitung der Babesien und Theilerien intensiv weiterzuverfolgen (Kerber et al., 1999). Die vorliegende Arbeit vergleicht die Sequenzen der Isolate unterschiedlichster Regionen und soll damit zu einer besseren Erfassung über die Verbreitung von *B. caballi* und *T. equi* beitragen. Weiteres Interesse bestand in der Detektion einer möglichen kongenitalen Übertragung.

In Brasilien gehört besonders der südliche Teil mit den Staaten Mato Grosso, Saó Paulo, Parana, Rio Grande do Sul, Minas Gerais zur Hauptlokalisierung der Pferdeindustrie. In diesem tropischen-subtropischen Klimabereich, mit Durchschnittstemperaturen zwischen 15-35 °C und selten Temperaturen um die 0 °C (Kerber et al., 1999), finden die Zecken als Vektoren der Equinen Piroplasmose ideale Lebens- und Fortpflanzungsbedingungen.

Die hier präsentierten „Untersuchungen zur Epidemiologie der equinen Babesiose in Brasilien“ sind Teil eines deutsch-brasilianischen Kooperationsprojekts, welches sich an eine Feldstudie über die Canine Babesiose (Rembeck, 2005) anschließt.

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht aus folgenden Fragestellungen:

1. Wie hoch ist die Prävalenz der Equinen Piroplasmose in Brasilien?
2. Ist eine kongenitale Übertragung von Stute auf Fötus möglich?
3. Gibt es regionale Mutationen der Erreger *Babesia caballi* und *Theileria equi*?
4. Welche Zeckenarten kommen als Überträger der equinen Piroplasmen in Brasilien in Frage?

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Taxonomie der Equinen Piroplasmen

Taxonomisch werden die Equinen Piroplasmen in den Stamm der *Alveolata* und den Unterstamm der *Apikomplexa* eingeordnet. Die Ordnung der Piroplasmen ist der Klasse der *Sporozoa* untergeordnet, zu welcher die Familie der Babesien und Theilerien zählt (siehe Abb. 1).

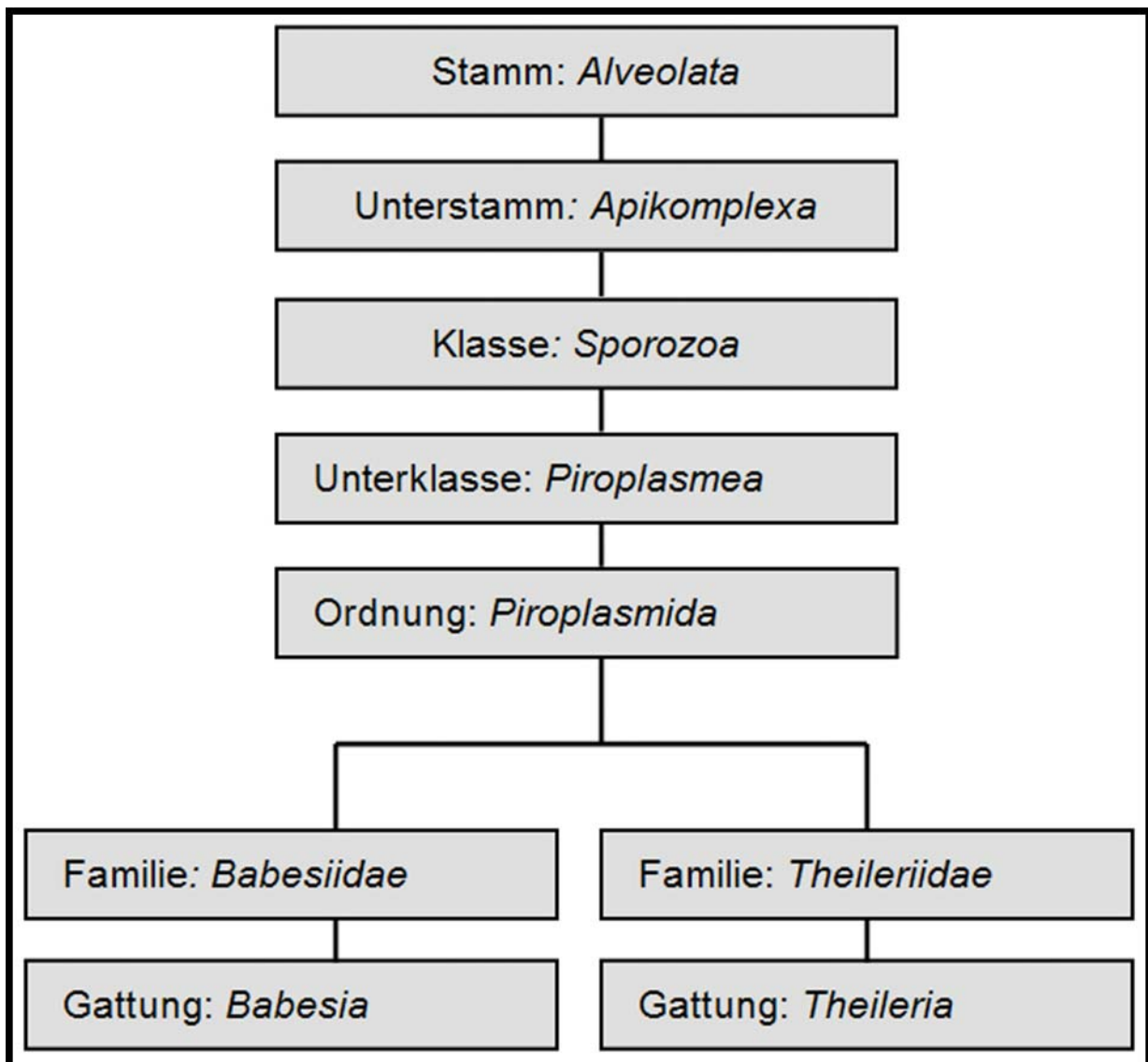


Abb. 1: Taxonomische Stellung der Gattung *Babesia* und *Theileria* (Eckert, et al., 2005)

Die Systematik und die Namensgebung von *B. caballi* und *T. equi* unterliegt ständigen Umstrukturierungen, da durch Analysen von DNA- und Proteinsequenzen immer wieder neue Erkenntnisse über die verwandtschaftlichen Gruppen der Protozoen gewonnen werden (Eckert et al., 2005).

Die derzeit gültige Klassifizierung der beiden Familien Babesien und Theilerien basiert auf dem wesentlichen Unterschied, dass die ungeschlechtliche Vermehrung von *Babesia* nur im Erythrozyten stattfindet, während es bei *Theileria* sowohl Vermehrungsstadien in den Erythrozyten wie auch in den Lymphozyten gibt (Mehlhorn und Schein, 1998).

## 2.2 Entwicklungszyklus

Der Lebenszyklus von *T. equi* (siehe Abb. 2) involviert eine Zecke als Vektor und ein Säugetier als Wirt. Die Infektion der Säugetiere erfolgt über den Biß infizierter Nymphen oder adulter Zecken, dabei werden infektiöse Sporozoiten in den Vertebratenwirt (hier: Pferd) übertragen. Die ungeschlechtliche Vermehrungsphase (Merogonie) findet sowohl in den Erythrozyten, wie auch in den Lymphozyten des Zwischenwirtes statt. In den Erythrozyten entstehen aus amöboiden Trophozoiten durch äußere Knospung (Exodyogenie) meist paarige birnen- oder tropfenförmige Merozoiten. Beim Zusammenlagern zweier Merozoitenpaare bildet sich das für die Theilerien typische „Malteserkreuz“ (siehe Abb. 7). In den Lymphozyten entwickeln sich Makro- und Mikroschizonten, aus welchen zahlreiche Merozoiten entstehen, welche weitere Erythrozyten infizieren und dort erneut eine Merogonie einleiten. Dadurch kann eine jahrelange persistierende Infektion entstehen. Die geschlechtliche Vermehrungsphase von *T. equi* erfolgt im Darm der Zecke. Freie Merogoniestadien werden beim Saugakt aufgenommen und fusionieren im Darm der Zecke zu einer Zygote (Gamogonie). Daraus differenzieren sich wiederum bewegliche Kineten, welche über die Hämolymphe zur Speicheldrüse der Zecke wandern.

Bei den Theilerien gibt es nur eine transstadiale Übertragung der Sporozoiten, d.h. es findet nur eine Übertragung von der Zeckenlarve zur Zeckennympe oder von der Nympe zum Adultus statt. Nach der Übertragung erlischt die Infektion, so dass die nachfolgenden Zeckenstadien nicht mehr infiziert und die Zecken somit nicht als echtes Erregerreservoir anzusehen sind.

Der Entwicklungszyklus von *B. caballi* entspricht weitgehend dem Lebenszyklus von *T. equi* (siehe Abb. 2). Die Merogonie findet nur in den Erythrozyten des Zwischenwirtes statt, woraus tropfenförmige Merozoiten entstehen. Die Zecke nimmt beim Saugakt die freien Merogoniestadien auf. Im Darm der Zecke fusionieren ein weiblicher und ein männlicher Gamont zu einer Zygote. Aus der Zygote entstehen Sporokineten, welche sich über die Hämolymphe der Zecke in der Speicheldrüse und den Ovarien der Zecke ansammeln (transovarielle/vertikale Übertragung) (Mehlhorn und Schein, 1998; Eckert et al., 2005).

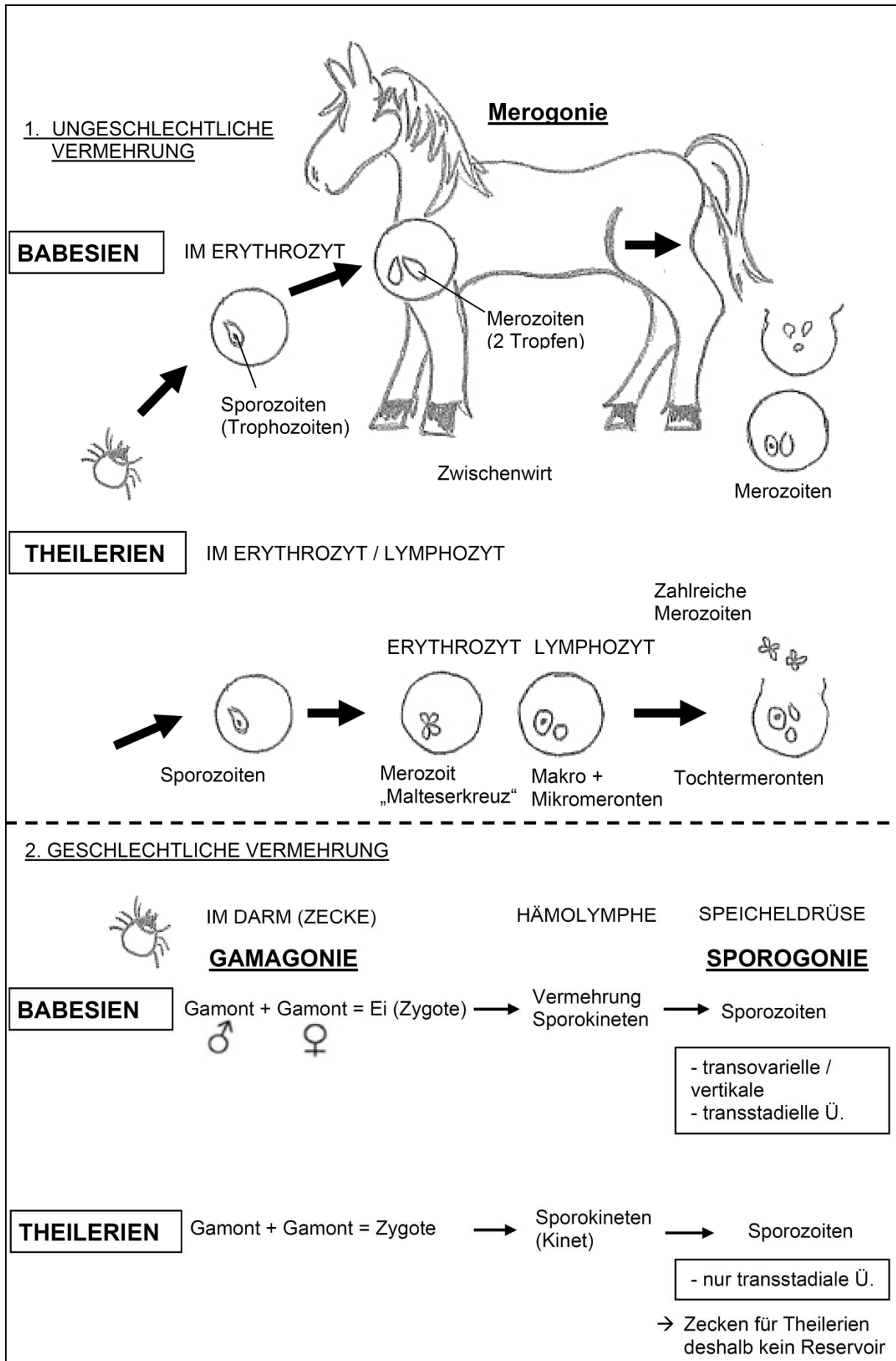


Abb. 2: Entwicklungszyklus der Babesien und Theilerien (A.Heim)

## 2.3 Vorkommen der Zecken in Brasilien

### 2.3.1 Taxonomische Einteilung der Schildzecken

Nachfolgend ist die taxonomische Zuordnung der Schildzecken dargestellt (Eckert et al., 2005).

Einteilung:

Phyllum:	<i>Arthropoda</i>
Klasse:	<i>Arachnida</i>
Subklasse:	<i>Acari</i>
Metastigmata:	<i>Ixodidae</i> (Schildzecken)

### 2.3.2 Wichtigste Zecken als Vektoren für *Theileria equi* und *Babesia caballi*

Insgesamt sind zwischen 12 bis 16 Spezies der Zeckenfamilie *Ixodidae* der Gattungen *Dermacentor*, *Rhipicephalus* und *Hyalomma* als Vektoren zur Übertragung von *T. equi* und *B. caballi* beschrieben (Holbrook, 1969; Friedhoff et al., 1990; De Waal, 1992; Russel et al., 2005). Die bedeutendsten sind nachfolgend hervorgehoben.

#### 2.3.2.1 *Amblyomma cajennense*

Es gibt etwa 100 Zeckenarten der Gattung *Amblyomma*. Die meisten davon kommen in Afrika und Südamerika, also den tropischen oder subtropischen Regionen der Erde vor (Eckert et al., 2005).

*A. cajennense* (siehe Abb. 5) zählt zur Familie der *Ixodidae* und ist eine Buntzecke. Es handelt sich hierbei um eine 3-wirtige Pferdezecke (siehe Abb. 3), jedoch sind die Larven und Nymphen weniger wirtsspezifisch und saugen auch auf Hunden, Vögeln, Amphibien und dem Menschen (Borges et al., 2002).



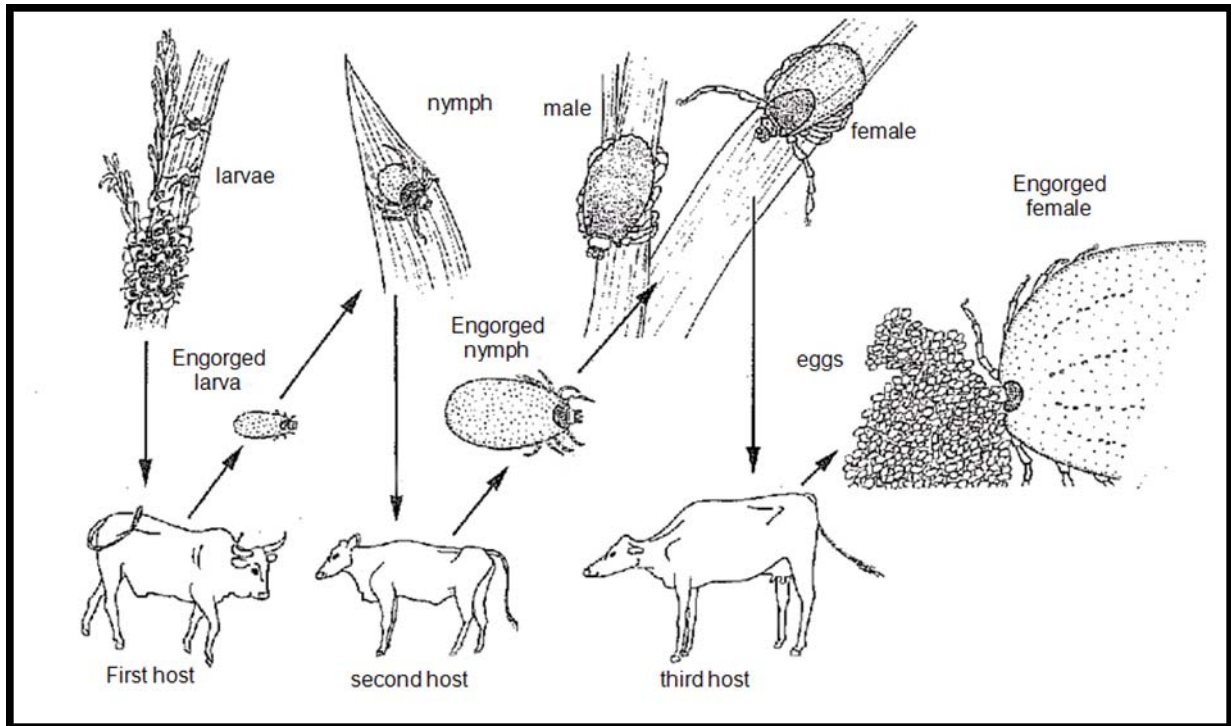


Abb. 3: Dreiwirtiger Entwicklungszyklus (Walker et al., 2003)

### 2.3.2.2 *Boophilus microplus*

*B. microplus* (siehe Abb. 5) gehört zur Familie der *Ixodidae* (Schildzecken) und ist eine einwirtige Zecke. Für die Dauer der Entwicklung verbleibt die Zecke auf demselben Wirt, wo alle Entwicklungsstadien ablaufen (siehe Abb. 4). Danach erfolgt die Eiablage auf dem Boden (Eckert et al., 2005).

Die Gattung *B. microplus* kommt ebenfalls hauptsächlich in den tropischen und subtropischen Regionen vor. Alle fünf vorkommenden Arten dieser Gattung befallen üblicherweise Rinder, eher selten andere große Säugetiere wie Pferde oder Schafe (Eckert et al., 2005). Es wird vermutet, dass das Pferd einen Fehlwirt darstellt aufgrund gleicher Weidenutzung und Stallhaltung von Pferden und Rindern (Moreno, 1984; Stiller und Coan, 1995; Heuchert et al., 1999; Labruna et al., 2002). *T. equi* soll nach Guimaraes et al. (1998) auch tatsächlich in der Lage sein, den Entwicklungszyklus in der Rinderzecke *B. microplus* zu vervollständigen (Kerber et al., 1999). Deshalb ist gerade in Südamerika *B. microplus* zu einem wichtigen Überträger von *T. equi* geworden (Eckert et al., 2005).

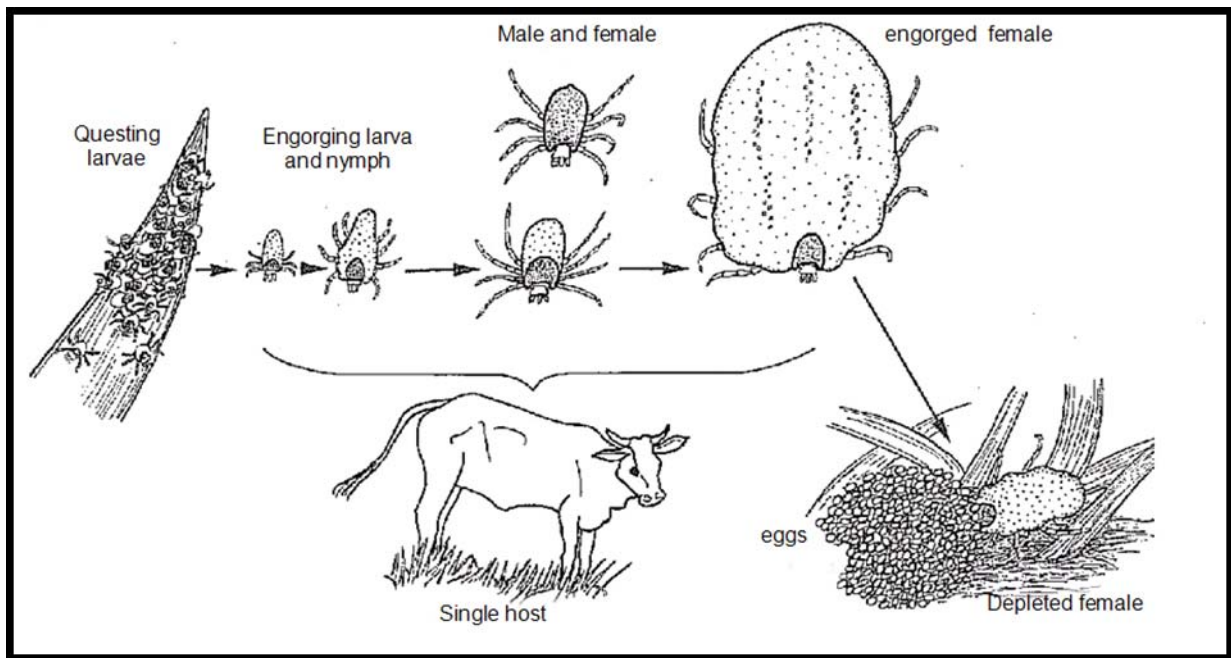


Abb. 4: Einwirtiger Entwicklungszyklus (Walker et al., 2003)

### 2.3.2.3 *Anocentor nitens*

*A. nitens* (siehe Abb. 5), die tropische Pferdezecke gehört zur Gattung *Dermacentor* (Eckert et al., 2005).

*A. nitens* ist eine einwirtige Zecke, die ihre Entwicklung von der Larve bis zum Adultus auf demselben Wirt verbringt. Sie gilt als bedeutendste Pferdezecke in der „Neuen Welt“ und ist im Bundesstaat Sao Paulo auch die am weitesten verbreitete (Kerber et al., 1999; Labruna et al., 2002). Sie ist wichtigster Überträger von *B. caballi* (Evans et al., 2000). Am Zwischenwirt findet man sie hauptsächlich in den Ohren, dem Divertikulum der Nase, an der Mähne und im Zwischenschenkelspalt (Borges et al., 2000).



Abb. 5: Die bedeutendsten Überträgerzecken (A. Heim)

- a) *A. cajennense*
- b) *B. microplus*
- c) *A. nitens*

## 2.4 Babesien und Theilerien beim Pferd

### 2.4.1 Vorkommen

Unter den weltweit vorkommenden Tierspezies sind 70 verschiedene Babesienarten bekannt (Yoshinari et al., 2003). Von der geschätzten Anzahl der Weltpferdepopulation von ungefähr 120 Millionen Pferden sind rund 90 % der Pferde in endemischen Gebieten heimisch (Schein, 1988) und nur etwa 10 % aller Pferde leben in babesienfreien Regionen (De Waal, 1992), wie z.B. Australien, Japan und Teile Europas (Deutschland und Österreich) (Friedhoff et al., 1990) (siehe Abb. 6).

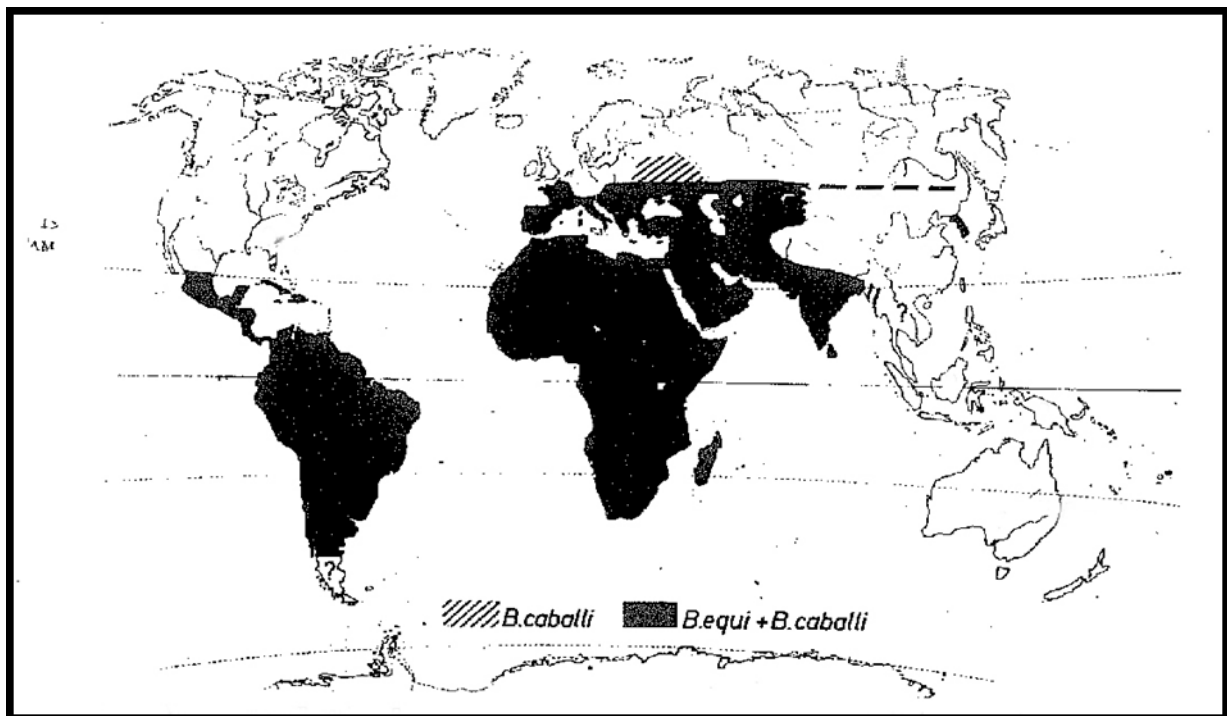


Abb. 6: Weltweites Vorkommen von *B. caballi* und *T. equi*

### 2.4.2 *B. caballi*

In den Erythrozyten des Pferdes besitzt der 4 µm große Trophozoit von *B. caballi* runde bis ovale oder ellipsenförmige Struktur. Die Trophozoiten erscheinen basophil und sind häufig paarig und im rechten Winkel zueinander angeordnet. Die sich daraus entwickelnden Sporozoiten sind sehr gross und so kann es beim Zerfall der Erythrozyten zu einer Verlegung der Blutgefäße und einer damit verbundenen Unterfunktion lebenswichtiger Organe kommen (Holbrook, 1969). Bei Infektionen mit *B. caballi* entstehen meist Parasitämien von nur ca. 10 %. Die Dauer der Infektion beim Tier liegt zwischen 12 und 42 Monaten mit einer Inkubationszeit von zehn Tagen (Holbrook, 1969). Spontane Elimination der Erreger nach wenigen Monaten ist beschrieben (Eckert et al., 2005). In den Tropen und Subtropen kommt die Equine Babesiose endemisch vor und manifestiert sich häufig durch eine latente Verlaufsform.

### **2.4.3 *T. equi***

Der Trophozoit von *T. equi* ist im Vergleich zu *B. caballi* sehr viel kleiner und mißt meist unter 1,5 µm (Boch, 1985). Er ist in den Erythrozyten und Lymphozyten zu finden als basophiles, ovales bis ellipsenförmiges Gebilde. Die Merozoiten ordnen sich charakteristischerweise zu vieren zusammen („Malteserkreuz“) (Russel et al., 2005). Tritt die equine Theileriose perakut auf, kommt es aufgrund eines hohen Parasitenaufkommens zu einer tödlichen Anämie (Holbrook, 1969). Parasitämien bis zu 95 % werden erreicht und die Inkubationszeit beträgt fünf Tage. Die natürliche oder medikamentelle Erregerelimination ist nur schwer zu erreichen (Friedhoff et al., 1990) und die Infektion bleibt deshalb oft lebenslang bestehen. Nur ein effektiver prophylaktischer Zeckenschutz kann der equinen Theileriose in gewissem Maße entgegenwirken (Eckert et al., 2005).

### **2.4.4 *B. caballi* und *T. equi* beim Fötus**

Intrauterine Infektionen mit *T. equi* wurden in der Literatur beschrieben und führen zu wirtschaftlichen Verlusten durch kranke Stuten, unzureichend resistente Nachkommen (Erbslöh, 1975; Phipps und Otter, 2004) oder Verluste durch Aborte (De Waal, 1992; De Waal und Van Heerden, 1994). Eine kongenitale Übertragung von *B. caballi* ist ebenfalls möglich, aber sehr selten (Phipps und Otter, 2004).

Die Thematik der kongenitalen Übertragung ist noch unzureichend erforscht und es besteht weiterer Untersuchungsbedarf.

## **2.5 Krankheitssymptome**

Die Krankheitssymptome der equinen Piroplasmose variieren von asymptomatisch, chronisch bis akut. In der akuten Phase sind Fieber, Anämie, Ödeme, Dyspnoe und plötzlicher Tod dominierend (Russel et al., 2005). Ikterus und Hämoglobinurie sind häufige Begleitsymptome (Gottstein, 2005). Histopathologisch finden sich unregelmäßig blasse Nieren, ödematöse Lungen und Splenomegalie (Hanafusa, 1998). Kongenitale Übertragung von *T. equi* führt zu Abort und neonatalem Tod (Phipps und Otter, 2004).

## 2.6 Diagnose

Um die Equine Piroplasmose diagnostisch erfassen zu können, stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Direkter Erregernachweis gelingt über den Blutausstrich, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die „Loop-mediated isothermal amplification“ (LAMP). Ein indirekter Erregernachweis erfolgt mittels Indirektem Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT), „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) und über die Komplement-Bindungsreaktion (KBR).

### 2.6.1 Direkter Nachweis

#### 2.6.1.1 Blutausstrich

Über einen mit Giemsa angefärbten Blutausstrich lassen sich im Mikroskop die Trophozoiten und Merozoiten von Babesien und Theilerien direkt in den Erythrozyten nachweisen. Die folgende Abbildung zeigt Merozoiten und Trophozoiten von *T. equi* in den roten Blutkörperchen.

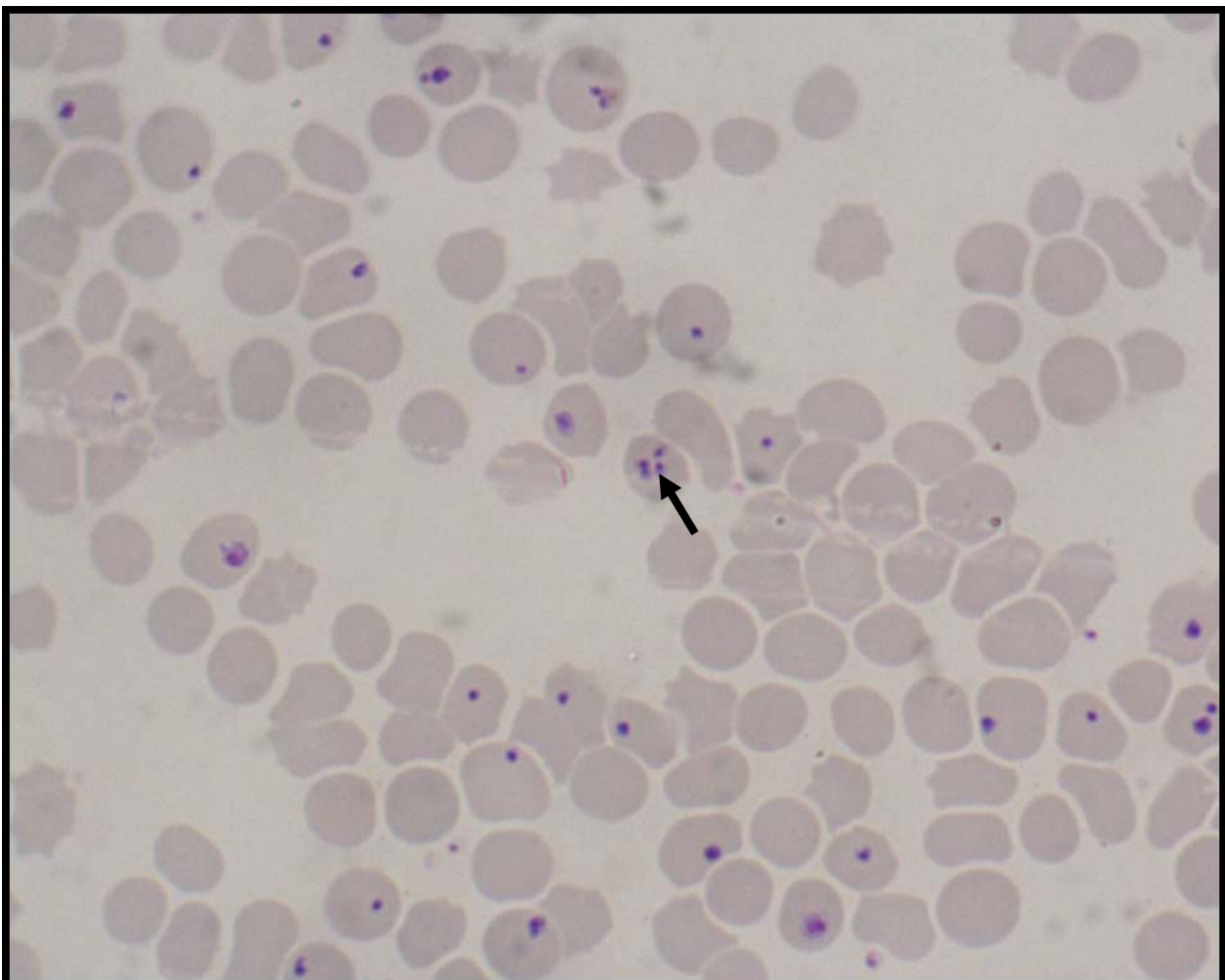


Abb. 7: Positiver Blutausstrich (Giemsafärbung, 1000-fache Vergrößerung); Trophozoiten und Merozoiten von *T. equi* (A.Heim)

Vier einander zugeordnete Merozoiten bilden das für *T. equi* typische „Malteserkreuz“(Pfeil).

### **2.6.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Das Prinzip einer PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die mit Hilfe eines Thermocyclers gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden werden (Knippers, 1995). Dieses Verfahren wurde auch von Posnett und Ambrosio (1991), Rampersad et al., (2003) Bashiruddin et al. (1999), Ueti et al. (2003) und Alhassan et al. (2005) genutzt, um *T. equi* und *B. caballi* nachzuweisen.

Im Vergleich zur konventionellen PCR werden bei der Real-time PCR durch einen Fluoreszenzfarbstoff ausgelöste Signale am Ende jeder Amplifikationsreaktion erfasst und direkt auf den Bildschirm übertragen, so dass ein Sichtbarmachen der Produkte mittels Agarosegelelektrophorese nicht mehr notwendig ist.

Bei einer geschachtelten PCR („nested“ PCR) kommen verschiedene Primer zum Einsatz, die alle an eine bestimmte Sequenz binden und diese amplifizieren. Das Template des ersten PCR-Durchlaufes wird mit einem zweiten Paar Primern in einem zweiten PCR-Durchlauf eingesetzt und die hier eingesetzten Primer binden wieder, allerdings ein kleines Stück weiter innen an die Sequenz des nachzuweisenden DNA-Stranges. Somit kann die Sensitivität weiter gesteigert werden (Nicolaiewsky et al., 2001; Battsetseg et al., 2002).

### **2.6.1.3 Loop-mediated isothermal amplification“ (LAMP)**

“LAMP” ist eine isothermische Amplifikationsmethode, welche ähnlich der PCR eine gewünschte Sequenz der Erreger-DNA amplifiziert, allerdings bei einer gleichbleibenden Temperatur von 65 °C. Somit ist ein Thermocycler nicht notwendig. Vier Primerpaare werden eingesetzt, welche an sechs verschiedene Sequenzen der Ziel DNA binden, sowohl an Strang und Gegenstrang der gewünschten Sequenz. So entstehen „loops“, welche sich mit jedem Amplifikationsschritt mehren, so dass es zu einer „blumenkohlartigen“ Anhäufung der gewünschten DNA kommt (Notomi et al., 2000; Alhassan et al., 2007).

## **2.6.2 Indirekter Nachweis**

### **2.6.2.1 Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT)**

Durch serielle Verdünnungen (Titration) werden in Pferdeseren Antikörper gegen *B. caballi* und *T. equi* nachgewiesen. Hierbei binden die Serumantikörper an das vorher an einem Objektträger fixierte Antigen und werden mit Fluoreszein-Isothiocyanat konjugiertem Sekundäantikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Waren die Tiere einmal in Kontakt mit dem Erreger, so sind die Antikörper in der Regel zeitlebens nachweisbar (Gottstein, 2005).

Beim Import von Pferden nach Neuseeland, die Türkei und Australien ist der IFAT zum Erregernachweis vorgeschrieben. Für alle anderen Länder (Ausnahme: USA) muss der IFAT bei Import in Kombination mit dem KBR eingesetzt werden (persönliche Mitteilung, Böse Labor, Hildesheim, 2007).

### 2.6.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Hierbei liegen die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Antikörper an eine Trägersubstanz gebunden vor. An diese Immunkomplexe lagern sich in einem nachfolgenden Schritt zugeführte Enzym-markierte Anti-Antikörper an (Sandwich-Methode). Durch Zugabe eines Substrats können diese Komplexe sichtbar gemacht werden.

Beim c-ELISA wird kein markierter Antikörper verwendet, sondern markiertes Kompetitor-Antigen. Es kommt zur Competition zwischen Analyt und Kompetitor um einen Bindungsplatz am Antikörper. Der c-ELISA wurde als Nachweismethode der Equinen Piroplasmen zum Import der Pferde in die USA und Kanada festgelegt (seit dem 17.08.2005).

### 2.6.2.3 Die Komplement-Bindungsreaktion (KBR)

Das Prinzip des KBR-Tests liegt im Anlagern von Komplement nach der Reaktion von Antigen mit Antikörper. Das gebundene oder noch freie Komplement wird erfasst und dessen Aktivität im Originalserum gemessen.

Beim Nachweis der Erreger mit der KBR kommt es zu keinen Kreuzreaktionen, so dass eine Artdifferenzierung zwischen *B. caballi* und *T. equi* immer eindeutig ist (Weiland et al., 1984; Gottstein, 2005). Chronisch infizierte Tiere werden mit dem KBR allerdings nicht erfasst. Von vielen Ländern, wird der KBR-Test (oft in Kombination mit dem IFAT) beim Import von Pferden immer noch vorgeschrieben.

## 2.7 Therapiemaßnahmen und Prophylaxe

Imidocarb (Imizol®, Carbesia®; 240 mg/100kg, Schering Plough) oder Diminazene (Berenil®, Intervet) können zur Therapie von *B. caballi* und *T. equi* Infektionen eingesetzt werden. Eine mehrmalige Applikation kann je nach Schwere der Infektion erforderlich sein (Friedhoff et al., 1990; Gottstein, 2005). Die prophylaktische Anwendung gegen Zecken mit Akariziden als Dip oder Spray bleibt unerlässlich, um das Risiko der Erkrankung auf ein Minimum zu reduzieren (Brüning, 1996).

## 2.8 Bisherige Untersuchungen zur Babesiose bei Pferden in Brasilien

Tenter und Friedhoff (1986) untersuchten Serumproben von 25 Pferden aus dem Staat Rio de Janeiro mittels IFAT auf die Equinen Piroplasmen und 72 % waren positiv. Ribeiro und Lima (1989) verwendeten die gleiche Technik, um 306 Pferdeseren aus dem brasilianischen Staat Minas Gerais zu untersuchen und 80 % waren positiv. Cunha (1993) fand bei 133 Pferden aus dem Staat Rio Grande do Sul eine Prävalenz von 58 %.

Von Pfeifer Barbosa et al.(1995) stammt eine wissenschaftliche Arbeit, in der die Prävalenz von *B. caballi* und *T. equi* im Staat Rio de Janeiro vergleichend dargestellt wird. 120 Weidepferde wurden mit dem IFAT auf *T. equi* und mit Western-Blot auf *B. caballi*

untersucht. 100 % der untersuchten Tiere waren positiv für *T. equi* und 70 % für *B. caballi*. In keinem der Fälle kam es zu einem Ausbruch mit klinischem Erscheinungsbild.

Ribeiro et al. (1999) untersuchten Seren von 399 Schlachtpferden mittels IFAT auf *T. equi* und kamen auf eine Seroprävalenz von 59,7 % in Klimabereichen bei Temperaturen >18 °C und auf 61,4 % bei Temperaturen < 18 °C. Das Klima hat somit nur unwesentlichen Einfluss auf die Prävalenz von *T. equi*. Unter Einbeziehung von Tieren unterschiedlichen Alters, wurde herausgefunden, dass alle Tiere altersunabhängig Antikörper gegen *T. equi* besitzen.

140 Pferde inklusive 63 Fohlen wurden in Sao Paulo von Heuchert et al. (1999) ebenfalls mit Hilfe des IFAT untersucht. 17,5 % waren positiv auf *T. equi* und 89,5 % auf *B. caballi*. Wurden die Pferde zusammen mit Rinden gehalten, so entstanden Prävalenzen von 89,5 % für *T. equi* und 80 % für *B. caballi*.

In einer Studie von Kerber et al. (1999) wurden Blutproben von Pferden in Brasilien mit und ohne Zeckenprophylaxe untersucht. Der Antikörpertiter gegen Babesien und Theilerien der behandelten Pferde war deutlich niedriger als der der unbehandelten Tiere. Die Prävalenz von Theilerien und Babesien war in den Subtropen niedriger als in den Tropen und die Prävalenz der Pferde, welche mit Rindern zusammen gehalten wurden, war massiv erhöht.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Herkunftsorte und Probenaufbereitung

Die Herkunftsorte, die Probenentnahme und die Aufbereitung der einzelnen Proben sind in der Publikation, Ergebnisteil S.40ff. dargestellt.

Mit Hilfe des C, T und E Maßes (siehe Abb. 8) wurde über die Körpergröße das Alter des Fötus bestimmt (siehe Abb. 9).

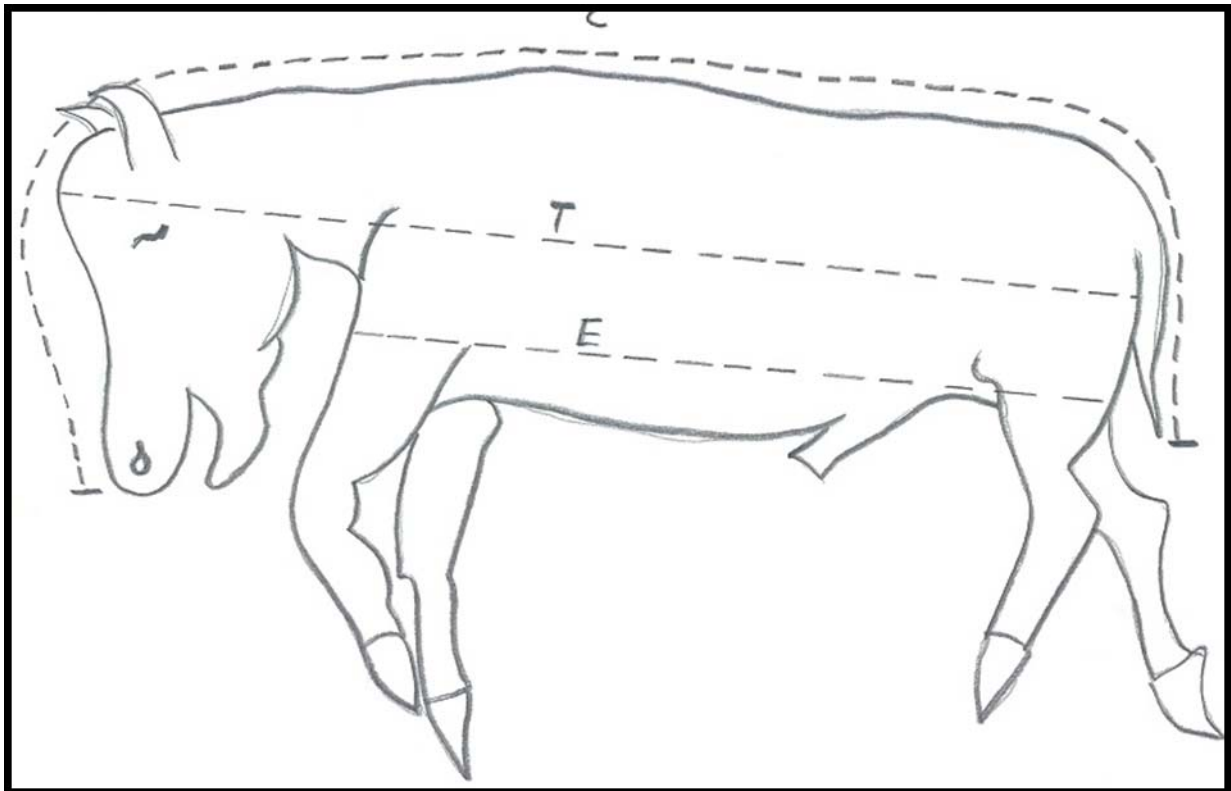


Abb. 8: Abmessungen Fötus (A.Heim)

C-Maß: Länge von der Nase bis zur Schwanzspitze, gemessen über den Rücken

T-Maß: Seitliche Länge des Fötus, inklusive Kopf

E-Maß: Seitliche Körperlänge des Fötus, exklusive Kopf

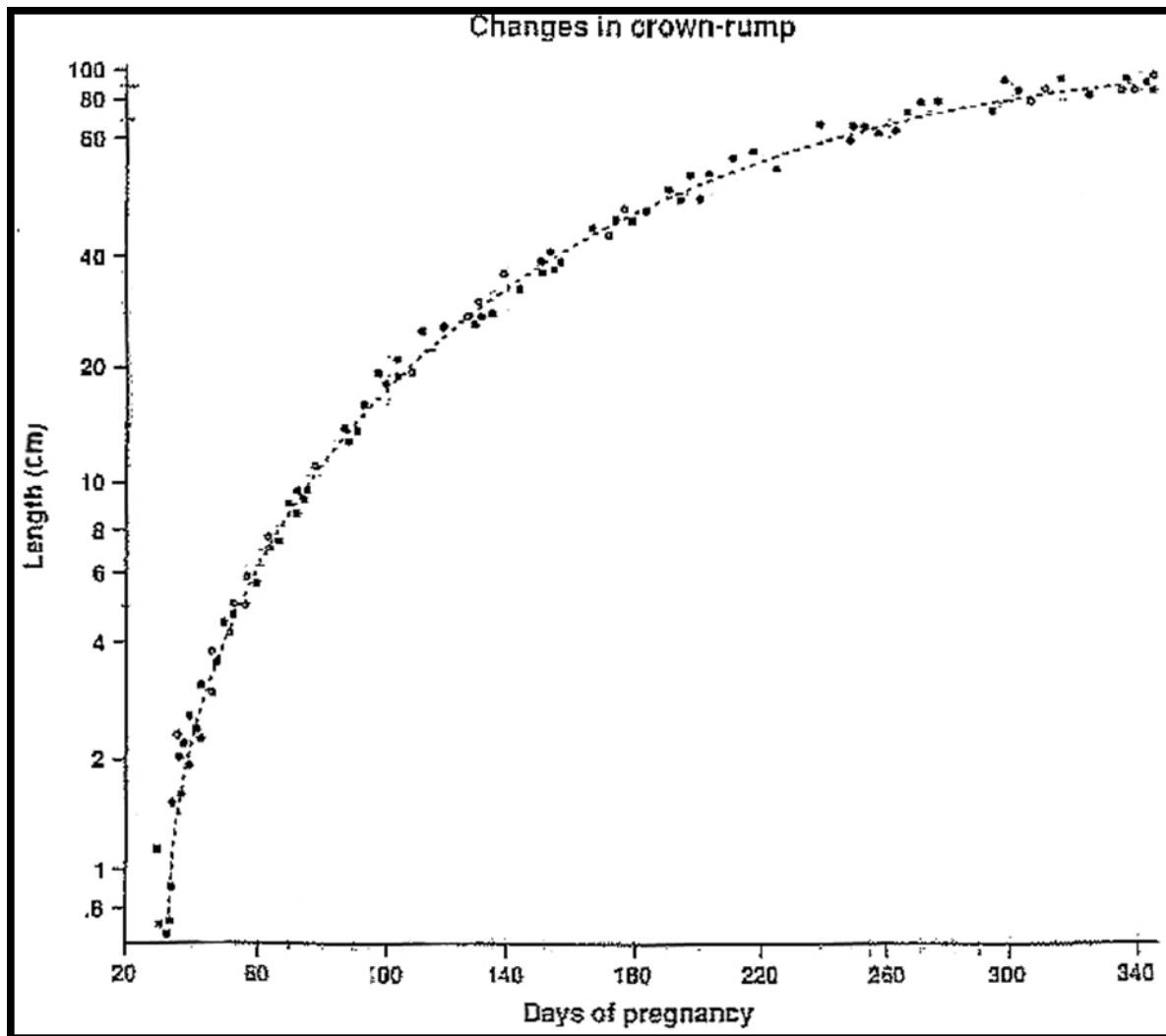


Abb. 9: Trächtigkeitsalter des Fötus bezogen auf die Körpergröße (Ginther, 1967)

Die Herkunft der Pferde konnte Schlachtlisten (Beispiel Anhang 10.4) entnommen werden.

Das Anfertigen von Blutaussstrichen erfolgte gemäß den QM-Unterlagen des Diagnostischen Labors, Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, München. Nach Bestimmung des Hämatokrits wurde die Hälfte des Blutes tiefgefroren, um anschließend daraus die DNA zu extrahieren. Das verbleibende Blut wurde abzentrifugiert, das Serum gewonnen und der IFAT gemäß den Angaben der QM-Unterlagen des Diagnostischen Labors, Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, München (Weiland et al., 1984; Weiland, 1986) durchgeführt. Die von den Ohren gesammelten Zecken wurden in 70 % Alkohol fixiert und mit Hilfe eines Bestimmungsschlüssels identifiziert (Walker et al., 2003).

### 3.2 Verwendete Materialien

Die verwendeten Materialien (Kits, Oligonukleotide, Lösungen, Enzyme, Puffer) sind dem Anhang 10.2 zu entnehmen.

### 3.3 Molekulare Analyse

#### 3.3.1 Messung der DNA Konzentration mit Nano-Drop

Die Messung der DNA Konzentration erfolgte nach den Angaben des Herstellers (NanoDrop, User Manual, 2004).

#### 3.3.2 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

##### 3.3.2.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch „Polymerase Chain Reaction“) ist eine Methode, um einen definierten DNA Abschnitt mittels zweier flankierender Primer-Oligonukleotide und einer hitzestabilen DNA-Polymerase zu vervielfältigen. Der PCR-Prozess besteht aus 30 bis 50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Amplifikationszyklus besteht aus drei verschiedenen Phasen:

*Denaturierung:* die doppelsträngige DNA wird auf 94 bis 95 °C erhitzt, die Stränge dabei getrennt („melting“, „schmelzen“).

*Annealing* (Primerhybridisierung): die Temperatur wird in dieser Phase gesenkt, so dass sich die Primer an die einzelnen komplementären DNA Stränge anlagern können.

*Elongation:* bei 72 °C füllt nun die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden vom 3`Ende der Primer her auf.

Bei jedem Amplifikationszyklus werden diese Phasen durchlaufen und die beiden entstandenen DNA Stränge bilden die Vorlage für den nächsten Durchlauf. Die Menge an DNA verdoppelt sich also mit jedem neuen Zyklus (siehe Abb. 10).

Die PCR Produkte werden anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und über Gelelektrophorese sichtbar gemacht (Ausubel, 2006).

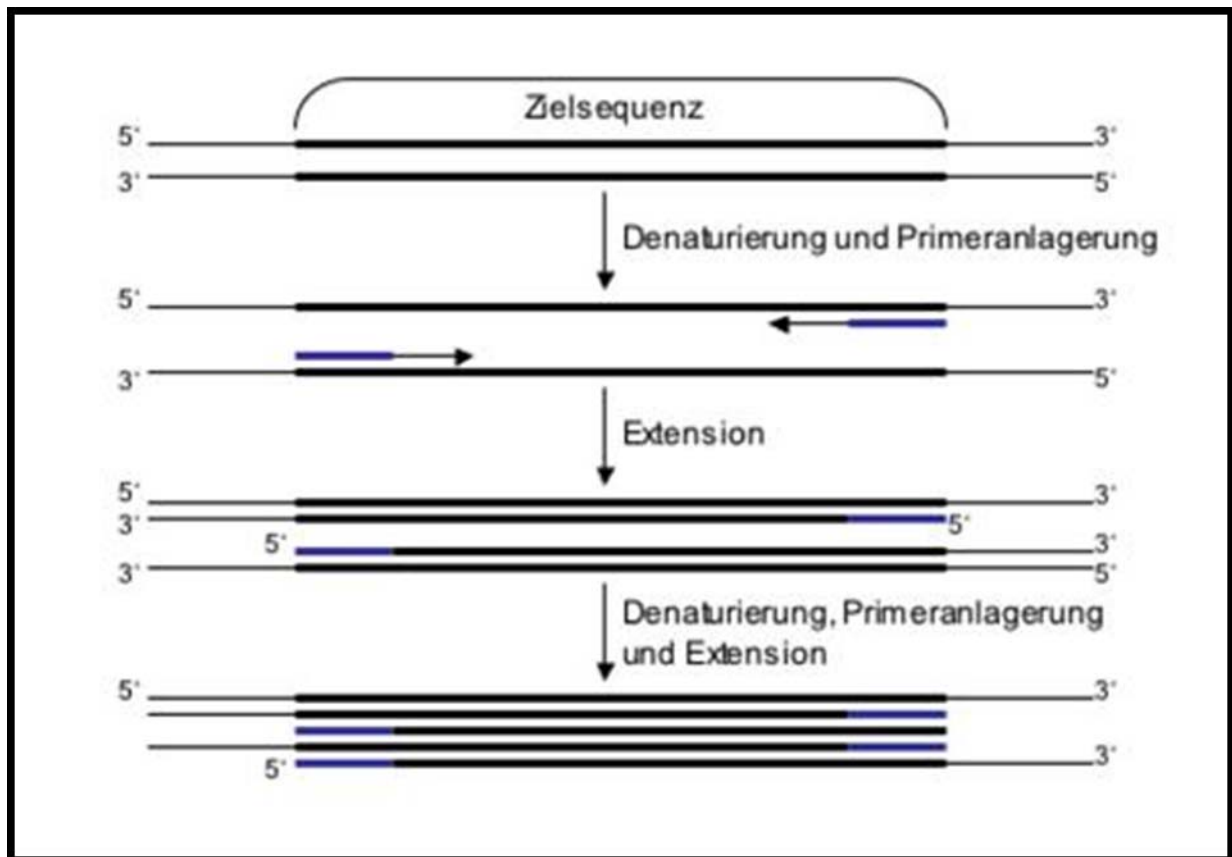


Abb. 10: Prinzip der PCR

### 3.3.2.2 Real-time PCR

Wie bei der konventionellen PCR werden bei der Real-time PCR bestimmte DNA-Produkte vervielfältigt.

Allerdings bietet die Real-time PCR zusätzlich die Möglichkeit zur Quantifizierung der PCR-Produkte schon während oder am Ende der Amplifikationszyklen mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen. Durch Hybridisierung von Fluoreszenz-markierten Sonden oder Anlagerung von DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen wird dieses Signal empfangen (deshalb der Name „real-time“).

Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht, d. h. Fluoreszenz ist direkt proportional zu der Menge des PCR-Produkts. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente am Ende ist nicht mehr nötig, wodurch bei der Real-time PCR Arbeitsschritte eingespart werden. Die Daten sind sofort verfügbar, das Kontaminationsrisiko ist gering.

Mit Hilfe von spezifischen Hybridisierungsonden hat man die Möglichkeit zur Quantifizierung der vorliegenden DNA Produkte. Diese zeichnen sich aus durch ihre hohe Spezifität. Hybridisierungsonden sind markierte Oligonukleotide, welche an Sequenzabschnitten zwischen den „Primern“ binden. Diese Sonden besitzen am 3`Ende ein Quencher-Molekül (Akzeptor-Fluorochrom) und am 5`Ende ein Reporter-Molekül. Das Reporter-Molekül wird durch eine Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil seiner Energie an

ein in ausreichender Nähe befindliches Quencher-molekül ab (FRET= Förster resonance energy transfer). Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt.

Bevorzugte Sondentypen sind Molecular Beacons, TaqMan® Sonden, Scorpion Primer und „Sunrise Primer“. Diese unterscheiden sich in Aufbau und Anlagerung an die DNA (Knippers, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich TaqMan® Sonden verwendet.

#### TaqMan® Sonden:

TaqMan®-Sonden sind halbmondförmige Fluoreszenz-markierte Hybridisierungsonden. An einem 3`Ende besitzen sie ein Quencher-molekül, am 5`Ende ein Reportermolekül (FAM, ROX oder HEX). Die Fluoreszenz des Reportermoleküls bei intakten TaqMan® Sonden wird durch das Quencher-molekül mittels strahlungsfreier Energieübertragung unterdrückt. Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang, die Reporterfluoreszenz wird zunächst unterdrückt. Erst wenn die Taq-Polymerase während des PCR Zyklusses das 5`Ende der Sonde abbaut, hat der abgespaltene Reporter die Fähigkeit zur Fluoreszenz, was bedeutet, dass sich Quencher und Fluorophor zeitgleich voneinander entfernen (Knippers, 1995).

Für die hier durchgeführte Multiplex Real-time PCR (mehrere Erreger werden in einem PCR Lauf mit den verschiedenen für den Erreger spezifischen Primern erfasst) wurde ROX als Reporter für den Nachweis von *B. caballi* und FAM als Reporter für den Nachweis von *T. equi* verwendet. HEX war das Reportermolekül in der Real-time PCR der Pferde-DNA. Dabcyl wurde als Quencher-molekül bei allen Real-time PCRs eingesetzt.

### **3.3.2.3 Multiplex Real-time PCR zum Nachweis von *B. caballi* und *T. equi* beim Pferd**

Zum Nachweis von *T. equi* wurde mit Hilfe der Primer EMA1 r/f ein ca. 800 bp langes Fragment vom 3`Ende der DNA eines Oberflächenproteins amplifiziert. Dabei hybridisiert die Sonde EMA1 p mit einer hochkonservierten Sequenz des Zielgens. Der Primer BC48 r/f für *B. caballi* reagiert mit einem tiefer gelegenen Rhoptrienprotein (ca.700 bp). Die sogenannte „Threshold Line“, der Grenzwert bei dem die Graphen den steilsten Anstieg aufweisen, wurde für *T. equi* bei 25, für *B. caballi* bei 50 und für die Pferde DNA bei 15 gewählt.

Damit die PCR Prävalenz beurteilt werden konnte, wurde aufgrund starker Schwankungen in den DNA Konzentrationsmessungen eine Real-time PCR mit Primern durchgeführt, welche nur an die Pferde-DNA binden. War die Probe positiv, so konnte gegebenenfalls auch Erreger DNA erwartet werden.

Aus den insgesamt 512 Proben wurden 16 (3,1 %) aus der Bewertung herausgelassen, da diese beim Nachweis der Pferde-DNA in der Real-time PCR einen negativen Kurvenverlauf zeigten (siehe Anhang 10.3).

Positivkontrolle war eine Probe, welche im Vorversuch in einer Verdünnung 1:10 000 noch positiv war, Negativkontrolle war destilliertes Wasser. Die Probenmenge lag zwischen 5 µl oder weniger bei Proben mit sehr hoher DNA Konzentration.

Die Primer und Sondenkonstruktion sind der Tabelle 1 der Publikation, S. 41 zu entnehmen. Der Reaktionsansatz ist im Anhang 10.10 wieder gegeben.

### **3.3.3 Klonierung und Aufreinigung von *T. equi* und *B. caballi*-spezifischen DNA Sequenzen**

*B. caballi* und *T. equi* Plasmide wurden erzeugt, um als Positivkontrolle in der Multiplex Real-time PCR eingesetzt zu werden und darüber festzulegen, wie viele Erregermoleküle ( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10, 1 Moleküle) nachweisbar sind.

Beim Klonieren wird eine ausgewählte DNA Sequenz in einen bakteriellen Vektor integriert. Als Vektor werden häufig bakterielle Plasmide eingesetzt, kleine zirkuläre DNA-Moleküle, welche in den Bakterienzellen vorkommen, jedoch nicht zur eigentlichen DNA des Bakterienchromosoms gehören.

Die Plasmide werden aus den Bakterien (hier *E. coli*) isoliert und mit Hilfe von speziellen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Restriktionsenzyme schneiden ebenso den zu klonierenden DNA-Abschnitt, wodurch komplementäre, assymetrische Enden an Vektor (Plasmid) und Ziel-DNA (überstehende Einzelstränge „sticky ends“) entstehen. Die DNA wird als Spenderorganismus mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in die entstandene Lücke des Plasmids „eingeklebt“.

Der Prozess der Klonierung untergliedert sich in die Schritte der a) Amplifikation, b) Ligation, c) Transformation und d) die Selektion.

#### **3.3.3.1 Amplifikation**

Nukleotidabschnitte wurden mittels konventioneller PCR vervielfacht, um ausreichend Ausgangssubstanz für eine Klonierung zu erhalten. Die Amplifikation wurde mit den Primern EMA 1F/R für *T. equi* und BC 48F und BC 48 R1 für *B. caballi* durchgeführt und das PCR Produkt bis zur weiteren Verwertung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Primer und das Reaktionsprotokoll sind der Publikation S.41 zu entnehmen, der Reaktionsansatz ist im Anhang 10.11 wieder gegeben.

##### *3.3.3.1.1 Herstellung kompetenter Zellen*

Kompetente Zellen entstanden manuell über die Kalzium-Phosphat Methode. *E. coli* Bakterien wurden auf einem hergestellten LM-Nährboden (ohne Zusatz von Antibiotika) und in einer LM-Bouillon über Nacht bei 37 °C angezchtet. In 40 ml LM-Medium wurden 600 µl aus der Bakterien-LM-Bouillon zugesetzt und durch erneute Inkubation bei 37 °C

weiter vermehrt (zwei Stunden bis evtl. über Nacht). Eine Bakteriendichte zwischen OD<sub>600</sub> 0,25-0,4 schafft optimale Klonierungsbedingungen.

#### 3.3.3.1.2 Transformation durch Hitzeschock

Die Bakterien wurden zunächst bei 4000 rpm für 10 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde abgegossen und das weiße Pellet zunächst in 5 ml CaCl<sub>2</sub> gelöst, dann mit 15 ml CaCl<sub>2</sub> auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt und sanft geschüttelt. Nach 20 minütiger Lagerung auf Eis wurden die Bakterien erneut sedimentiert bei 4000 rpm für 10 Minuten, in 3 ml CaCl<sub>2</sub> aufgenommen, wieder auf Eis gelagert und über Nacht stehengelassen, wodurch sich die Transformationseffizienz auf das vier bis sechsfache erhöht.

#### 3.3.3.1.3 Herstellung des Nährbodens

LB-Agar wurde mit destilliertem Wasser (35 mg/l) gemischt und die Hälfte davon auf Platten ausgegossen. Die andere Hälfte wurde im Verhältnis 1:1 mit Carbenicillin gemischt, welches das Wachstum nicht klonierter Plasmide auf den Platten verhindert. Die Platten erkalteten bei Zimmertemperatur und wurden bei 4 °C im Kühlschrank bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

#### 3.3.3.2 Ligation

Die Klonierung der cDNA erfolgte mit dem „Gene Jet PCR Kloning Kit“ und erfolgte nach dem „sticky end“ Protokoll des Herstellers (Fermentas, Life Sciences, Leonrot).

Während der PCR entstehen bei der Elongation durch die Taq Polymerase an den 3'-Termini der PCR-Produkte zusätzlich Adenosine. DNA Blunting-Enzyme entfernen diese überstehenden Adenosine, so dass ein Insert (Klon) mit glatten Enden entsteht. Dieses kann mit Hilfe der Ligase in den Vektor (ebenfalls glatte Enden) eingebaut werden. Dabei sollte ein molekulares Verhältnis von 1:3 zwischen Vektor und Insert vorliegen.

Der Ansatz für die „Schneidereaktion“ und Ligationsreaktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Das Ligationsgemisch wurde direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen weiterverwendet.

#### 3.3.3.3 Transformation

50 µl der kompetenten Zellen werden mit 5 µl des Ligationsansatzes zusammengebracht, 20 Minuten auf Eis gekühlt, dann bei 42 °C für zwei Minuten erhitzt. Dieser sogenannte Hitzeschock erleichtert die DNA-Aufnahme während der Transformation. Die Transformationseffizienz erreicht einen Wert von ca. 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>, d.h. pro µg transformierter Plasmid-DNA erhält man 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> Bakterienkolonien. Anschließend erfolgt wieder eine Abkühlung auf Eis für zwei Minuten.

Die transformierten Zellen wurden jeweils in 1 ml SOC Medium (Nährlösung) in einem Eppendorfröhrchen gelöst, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und jeweils 100 µl davon auf die Petrischalen gleichmäßig ausplattiert, welche das Vollmedium mit dem Selektionsantibiotikum enthalten. Nach dem Abzentrifugieren des Röhrchens wurde der

Überstand größtenteils verworfen, danach das entstandene Pellet der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und wiederum 100 µl auf eine zweite Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.3.3.4 Selektion

Die klonierten Bakterienkulturen wurden einzeln vom Nährboden genommen, in 2 ml eines LB Nährmediums (450 ml) mit Carbenicillin (450 µl) übergeführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit den vermehrten klonierten Bakterienkulturen erfolgte eine konventionelle PCR mit anschließender Sichtbarmachung auf Agarosegel (siehe Abb. 12). Die Primer, der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Abb. 11 und nachfolgenden Tabellen dargestellt.

pJET 1 r, reverse primer	5'-GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC -3'
pJET 1 f, forward primer	5'-GCCTGAACACCATATCCATCC -3'

Abb. 11: Sequenzen der Primer zur Amplifikation der Klone

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die konventionelle PCR der Klone

Substanz	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest.	36,75 µl	
PCR 10 x Puffer	5 µl	1 x
pJet 1f, 10 µM	1 µl	2,5 pmol
pJet 1r, 10 µM	1 µl	2,5 pmol
dNTPs, 10 mM	1 µl	0,2 mM
HotStarTaq Polymerase 5 U/µl	0,25 µl	2,5 U/Ansatz
DNA	5 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 2: Reaktionsprotokoll für die konventionelle PCR der Klone

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Inkubation (Aktivierung HotStarTaq-Polymerase)	95°C	15 min	1 x
Denaturierung	94°C	15 sec	30 x
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	45 sec	





Abb. 12: Klon *T. equi*, *B. caballi* in der Agarosegelelektrophorese dargestellt

1. *T. equi* ca.800bp
2. *B. caballi* ca. 700bp
3. Gene Ruler™ Ladder Mix (Standard)

#### 3.3.3.4.1 Plasmid Aufreinigung

Die Durchführung erfolgte mit dem „Qiagen Purification Kit“ nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Das Prinzip basiert auf einem modifizierten alkalischen Lösungsprozess, welchem sich eine Bindungsreaktion anschließt. Die Plasmid-DNA bindet dabei an das Qiagen Anionen-Austausch-Säulchen unter einer angemessenen niedrigen Salz- und pH-Wert Konzentration. Bei einem mittleren Salz-Puffer werden RNA, Proteine, Farbstoffe und leichte molekulare Bestandteile ausgewaschen. Die Plasmid-DNA wird am Ende in einem hochkonzentrierten Salzpuffer eluiert, konzentriert und schließlich mit Isopropanol entsalzen.

20 µl der Plasmid-DNA wurden mit 20 µl 10x Puffer, 158 µl sterilem Wasser mit 2 µl „*Hind III*“, einem Spaltungsenzym angesetzt und über einstündige Inkubation bei 37 °C, durch „*Hind III*“ gespalten und in die linearisierte Form gebracht.

Die aufgereinigten Plasmide wurden als Positivkontrolle in den Molekülanzahlen (Verdünnungen)  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 und 1 eingesetzt, als „supercoil DNA“ (ringförmige Plasmide) und in mit „*Hind III*“ gespaltenen Form. Der Ansatz erfolgte für *T. equi* und für *B. caballi* entsprechend.

### 3.3.4 Sequenzierung der DNA

Vor der Sequenzierung erfolgte eine Aufreinigung der DNA mit dem E.Z.N.A.<sup>®</sup> Cycle-Pure Kit (peqLab, Biotechnologie GmbH, Erlangen) oder dem QIAquick Gel Extraktionskit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

Zunächst musste der PCR-Ansatz durch Agarosegelelektrophorese fraktioniert und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht werden, um den Erfolg und die Qualität der Amplifikationsreaktion zu verifizieren. War nur eine Bande sichtbar (entsprechend der Länge für *B. caballus* oder *T. equus*) erfolgte eine Aufreinigung des PCR-Produkts mit Hilfe des E.Z.N.A.<sup>®</sup> Cycle-Pure Kit. Waren mehrere Banden sichtbar (Amplifikation auch unerwünschter DNA-Sequenzen), so wurde die erwünschte Bande (*T. equus* oder *B. caballus*) aus dem Gel ausgeschnitten und damit die Aufreinigung durchgeführt (QIAquick Gel Extraktionskit, Qiagen, Hilden, Deutschland).

Die aufgereinigte DNA wurde zusammen mit den „forward“ und „reverse“ Primern und gegebenenfalls noch Zugabe von destilliertem Wasser (abhängig von der DNA Konzentration) zu den „Sequence Laboratories“ (Göttingen, Deutschland) geschickt. Dort erfolgte eine Sequenzierung durch das Kettenabbruchverfahren nach Sanger. Mit Hilfe der „Sequence Manipulation Suite“ ([www.bioinformatics.org/sms/](http://www.bioinformatics.org/sms/), BCM Multiple Alignment) wurden die Stränge untereinander und mit Daten aus der Genbank-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) verglichen. (siehe Anhang 10.8 und 10.9).

### 3.3.5 Agarosegel-Elektrophorese

#### 3.3.5.1 Hintergrund

Eine einfache und schnelle Darstellung der PCR Produkte stellt die Auftrennung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese dar. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der elektronegativ geladenen DNA Fragmente in einer Elektrolytlösung unter dem Einfluss eines elektrisch geladenen Feldes.

#### 3.3.5.2 Durchführung

Agarose wurde mit Elektrophoresepuffer (TAE) in einer 1,2 % Lösung angesetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Das flüssige Gel wurde in einen dafür vorbereiteten Gelschlitten gegossen und ein Gelkamm mit einer bestimmten Anzahl an Zähnen, bezogen auf die Anzahl der Proben, eingesetzt. Eine vollständige Aushärtung des Gels war nach etwa 15 min. zu erwarten und das Gel konnte im Anschluss in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Der Gelkamm wurde vorsichtig entfernt und das Gel ca. 4 mm hoch mit TAE Puffer übergossen. Die zu analysierenden Proben wurden mit einem farbigen Laufpuffer vermischt, welcher ein höheres Gewicht als der Laufpuffer aufweist und somit beim Einfüllen der Proben in die Kammaussackungen zu einem Niedersinken der Proben in die jeweilige Tasche führt. Zur Kontrolle und als Größenvergleich für die Proben wurde ein Längenstandard („DNA Gene Ruler Ladder Mix“) in die erste und letzte vom Gelkamm gebildete Tasche und dazwischen die Proben mit Laufpuffer (5 µl Probe mit 1-2 µl Laufpuffer) aufgetragen.

Die DNA wurde bei 120 V für ca. 90 min. aufgetrennt. Danach wurde das Agarosegel für 15 min. in einem Ethidiumbromidbad (1 µg Ethidiumbromid/ml) gefärbt, in destilliertem Wasser gewaschen und durch UV-Licht sichtbar gemacht. Durch die Ringstruktur des Ethidiumbromids lagert sich dieses zwischen die Basenpaare der Doppelhelix. Fluoreszierende Banden werden sichtbar und können beurteilt werden.

### **3.3.6 Optimierung der Auswertungsbedingungen**

#### **3.3.6.1 Real-time PCR zur Bestimmung der Nachweisgrenze über die Molekülanzahl der Klone EMA 1 und BC 48**

Um eine Aussage über die Erregermolekülanzahl in der Probe zu treffen, wurden die Plasmide EMA 1 und BC 48 in unterschiedlichen Konzentrationen in einer Real-time PCR eingesetzt. Proben mit nur noch wenigen nachweisbaren Molekülen zeigten im Kurvenverlauf einen späten oder gar keinen Anstieg (siehe Abb. 13 und Abb. 14).

Die Berechnung der Molekülanzahl erfolgte nach der Gleichung 1 µg von 1000 Basenpaaren DNA entsprechen 1,52 pmol oder  $9,1 \times 10^{11}$  Molekülen (Biolabs Katalog, Frankfurt).

Jede Plasmidprobe wurde zehn Mal mit dem NanoDrop gemessen, um einen Durchschnittswert in der Konzentration in ng/µl festzulegen (siehe Anhang 10.12).

Der Klonierungsvektor hat 3128 Basenpaare, der Klon (Insert) „EMA 1“ bzw. „BC 48“ inklusive Primersequenz besitzt eine Basenpaarlänge von etwa 744, was einer Endlänge von 3872bp entspricht.

Der Referenzwert aus  $9,1 \times 10^{11}$  Molekülen wird durch die Summe der Basenpaare aus Vektor, Insert und Primer dividiert und man erhält die Molekülanzahl, umgerechnet in ng. Die errechnete Molekülanzahl, multipliziert mit dem Durchschnittswert der gemessenen Konzentration der Plasmidprobe ergibt die Molekülanzahl pro µl.

Diese Berechnung wurde sowohl für das Plasmid als „supercoil“ wie auch vorliegend in linearisierter Form (Spaltung mit „*Hind III*“) für EMA 1 und BC 48 durchgeführt (siehe Anhang 10.12).

Der Berechnung zugrunde liegend, wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, mit  $10^5$  Molekülen,  $10^4$  Molekülen,  $10^3$  Molekülen,  $10^2$  Molekülen, 10 Molekülen und einem Molekül in jeweils 5 µl. Jede Verdünnung wurde im vierfachen Ansatz pipettiert, sowohl für die „supercoil“ wie auch die linearisierte Form, also 48 Proben insgesamt.

Für die Durchführung wurden dieselben Primer und Reaktionsprotokoll wie in Tabelle 1 der Publikation S. 41 angewandt. Der Reaktionsansatz ist dem Anhang 10.10 zu entnehmen.

### PCR Amp/Cycle Graph for FAM-490

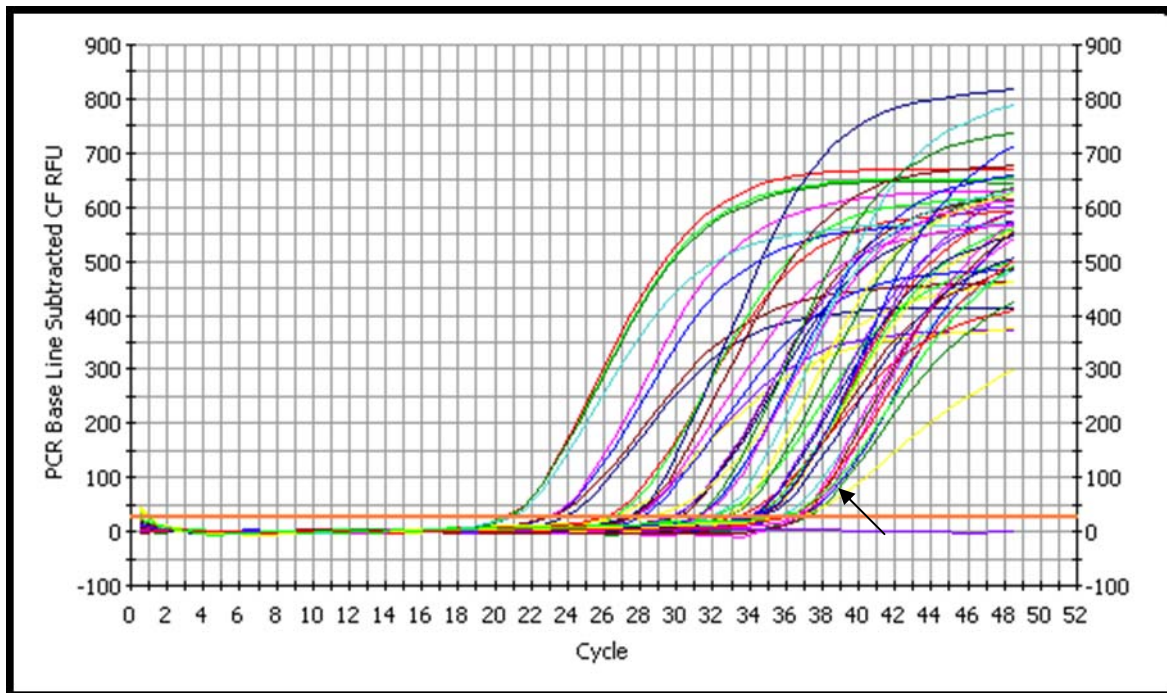


Abb. 13: Real-time PCR zur Festlegung der noch nachweisbaren Molekülanzahl für *T. equi*.  
Positiv bis Zyklus 39, alle Proben mit nur einem Molekül sind noch positiv (Pfeil).

### PCR Amp/Cycle Graph for ROX-575

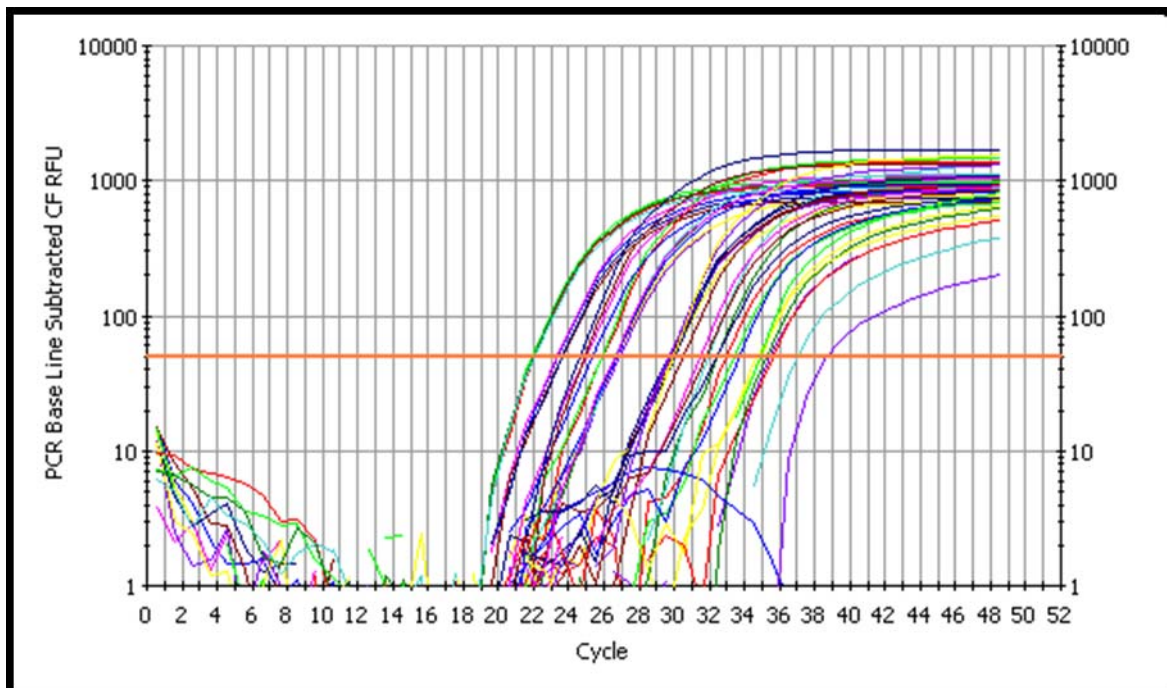


Abb. 14: Real-time PCR zur Festlegung der noch nachweisbaren Molekülanzahl für *B. caballi*.  
Positiv bis Zyklus 37, die Proben mit nur einem Molekül sind nicht mehr alle positiv, deshalb geben nur Proben mit mindestens zehn Erregermolekülen ein positives Ergebnis (exponentieller Kurvenverlauf).

### 3.3.6.2 Real-time PCR zur Bestimmung der Pferde-DNA

Zum Nachweis reiner Pferde-DNA wurde mit Hilfe der Primer HoCytBm-F/R ein ca. 800 bp langes Fragment vom 3' Ende der mitochondrialen DNA amplifiziert. Dabei hybridisiert die Sonde HoCytBmp-HEX mit einer hochkonservierten Sequenz des Zielgens.

Die Amplifikation erfolgte in einem i-Cycler, der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Abb. 15, Tabelle 3 und Tabelle 4, aufgeführt.

HoCytBm-R, reverse primer	5'-AAG AGT CAG AAT ACG CAT TGG C -3'
HoCytBm-F, forward primer	5'-CCT AAT CCT CTC CAT CCT GAT CC -3'
HoCytBm-HEX,Sonde	5'-AGC ACT CAT CCC CAC CCT CCA CAT -3'
Modifikation	5'-HEX 3'-DabcyI

Abb. 15: Sequenzen der Primer und der Sonde der Real-time PCR für Pferde DNA

Tabelle 3: Reaktionsansatz der Real-time PCR für Pferde DNA

Substanz	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest.	11,23 µl	
PCR 10 x Puffer	2,5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	4 µl	4 mM
HoCytBm-F, 100 µM	0,225 µl	0,45 µM
HoCytBm-R, 100 µM	0,225 µl	0,45 µM
HoCytBmp-HEX, 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 4: Reaktionsprotokoll der Real-time PCR für Pferde DNA

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Inkubation (zur Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase)	95°C	15 min	1 x
Denaturierung	94°C	15 sec	50 x
Annealing	60°C	45 sec	
Elongation	72°C	30 sec	

Die Ermittlung einer Standardkurve erfolgte aus einer Probe mit hohem Pferde-DNA Anteil, welche selbst noch in den Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 einen deutlichen Anstieg der Kurve zeigte.

Als „Positivkontrolle“ in den verschiedenen Verdünnungsstufen wurde diese Probe in die nachfolgenden Pferde-Real-time PCRs mit aufgenommen.

Die Abb. 16 und Abb. 17 zeigen die Erstellung der Standardkurve. In Abb. 18 und Abb. 19 ist der Standard zwischen die normalen Proben mit in der 96iger Pipettierplatte aufgenommen.

### PCR Amp/Cycle Graph for HEX-530

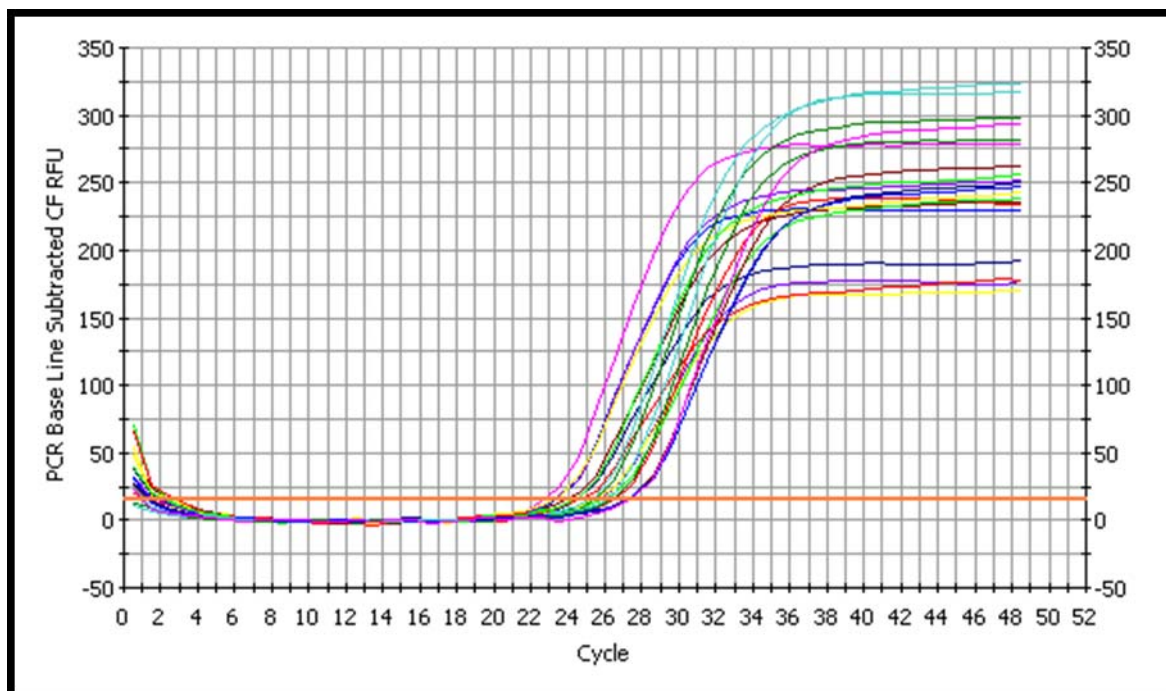


Abb. 16: Real-time PCR mit einer stark positiven Probe in verschiedenen Verdünnungsstufen zur Festlegung eines Standards.

Die Verdünnungen sind alle eindeutig positiv und zeigen einen frühen exponentiellen Anstieg, bezogen auf die Zykluszahl. Positivanstieg aller Proben bis zum Zyklus 30.

### Standard Curve Graph for HEX-530



Abb. 17: Standardkurve der Pferde DNA.

Die blauen Punkte markieren die verschiedenen Verdünnungen der Standardprobe. Entsprechen weitgehendst der Standardkurve (rote Linie).

### PCR Amp/Cycle Graph for HEX-530

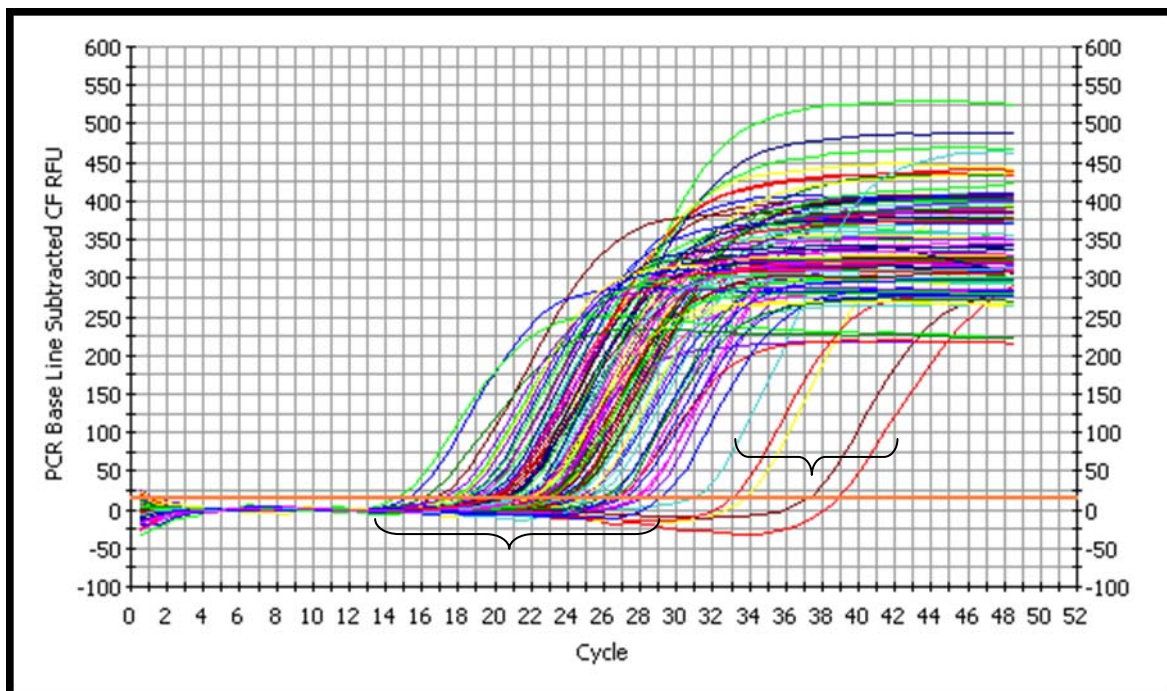


Abb. 18: Real-time PCR einer 96 Platte mit integriertem Standard.

Proben mit einem Anstieg zwischen Zyklus 13 und 28 sind positiv, d.h.es ist ausreichend DNA vorhanden. Proben von Zyklus 30 bis 39 sind negativ.

### Standard Curve Graph for HEX-530

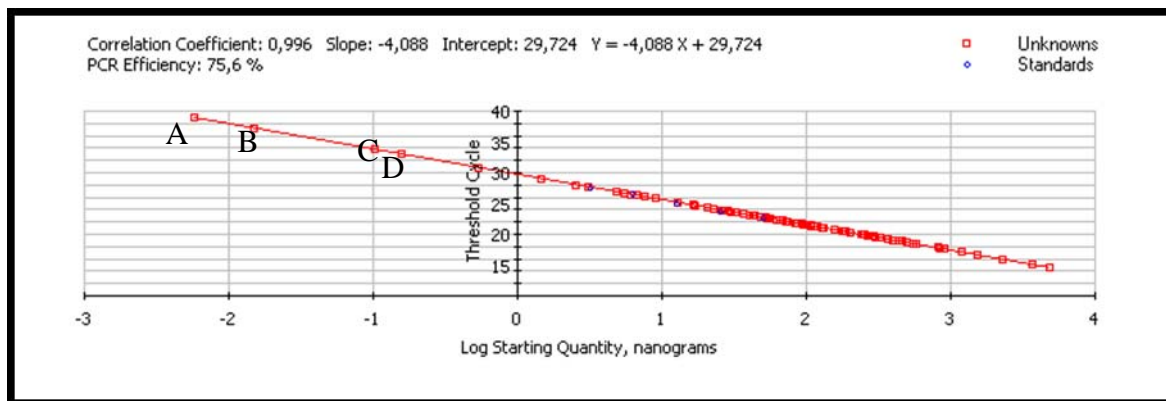


Abb. 19: Standardkurve zur Abb. 18.

Probe A-D sind negativ, sie weichen vom Standard (blau) ab und zeigen erst ab Zyklus > 30 exponentiellen Anstieg.

### 3.4 Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest

Die Durchführung des IFAT erfolgte nach dem QM-Protokoll des Diagnostiklabors, Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, München (Weiland et al., 1984; Weiland, 1986).

### 3.5 Statistik

Die statistische Datenauswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Beratungslabor (STABLAB) des Instituts für Statistik der LMU München unter Verwendung des Programmpakets SPSS. Um die Prävalenzen zu vergleichen wurde der Chi-Quadrat Test verwendet und über Microsoft Excel® der Wahrscheinlichkeitswert (p) berechnet.

Ist der Wahrscheinlichkeitswert p größer oder gleich 5 % ( $p > 0,05$ ), so besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Klassen. Mit einem Wahrscheinlichkeitswert kleiner als 5 % ( $p < 0,05$ ) liegt ein signifikanter Unterschied vor, ein Wert unter 1 % ( $p < 0,01$ ) bezeichnet einen hochsignifikanten Zusammenhang.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Publikation

#### **Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil (S.39-44)**

---

Heim, Alexandra<sup>1</sup>; Passos, Lygia M. F.<sup>1,2</sup>; Ribeiro, Múcio F.B.<sup>3</sup>; Costa-Júnior, Lívio M.; Bastos<sup>3,4</sup>, Camila V.<sup>3</sup>; Cabral, Dagmar D.<sup>5</sup>; Hirzmann, Jörg<sup>1</sup>; Pfister, Kurt<sup>1</sup>

*Publiziert: 9.September 2007, Parasitology Research (online publiziert)*

1. Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig Maximilian University Munich, Leopoldstr. 5, D-80802 Munich, Germany
  2. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária – UFMG, Minas Gerais, Brazil
  3. Departamento de Parasitologia, ICB – UFMG, Minas Gerais, Brazil
  4. Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, CCAA – UFMA, Maranhão, Brazil
  5. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil
-

# Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil.

Alexandra Heim & Lygia M. F. Passos &  
Múcio F. B. Ribeiro & Lívio M. Costa-Júnior &  
Camila V. Bastos & Dagmar D. Cabral &  
Jörg Hirzmann & Kurt Pfister

**Abstract** Blood samples were collected from 487 adult horses, including 83 pregnant mares, at a slaughterhouse located in Araguari, Minas Gerais State, Brazil. For each blood sample, the packed cell volume (PCV) was determined, and Giemsa-stained smears were microscopically examined for the presence of hemoparasites. The plasma was examined by the indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies against *Babesia caballi* and *Theileria equi*. In addition, DNA was extracted and analyzed by a multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR), specific for *Babesia caballi* and *Theileria equi*. Products of PCR were sequenced and compared with each other and with known sequences. The serological results showed a total prevalence of 91.0% for *T. equi* and 83.0% for *B. caballi*, while by PCR, prevalences of 59.7% for

*T. equi* and 12.5% for *B. caballi* were observed. However, no correlations were seen between positivity (neither by serology nor by PCR) and PCV values. As expected, the microscopic examination of blood smears showed low sensitivity in detecting the infections when compared to the PCR. Only 35 out of 570 blood smears were positive, with parasitemias below 0.1%. No congenital transmission was detectable. As far as sequencing is concerned, no differences were seen among the isolates of each species nor among them and known sequences available. These results confirm, by molecular methods, the high prevalence rates of *T. equi* and *B. caballi* infections in carrier horses in Brazil. However, no diversity was observed among the isolates within the studied regions.

**Key words:** equine babesiosis, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, molecular epidemiology, Multiplex Real-time PCR, Brazil

---

A. Heim : L. M. F. Passos : J. Hirzmann : K. Pfister  
Institute for Comparative Tropical Medicine and Parasitology,  
Ludwig Maximilian University Munich,  
Leopoldstr. 5,  
80802 Munich, Germany  
e-mail: lygiapassos@yahoo.com  
L. M. F. Passos  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva,  
Escola de Veterinária-UFMG,  
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

M. F. B. Ribeiro : L. M. Costa-Júnior : C. V. Bastos  
Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG,  
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil  
L. M. Costa-Júnior  
Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, CCAA-UFMA,  
São Luís, Maranhão, Brazil  
D. D. Cabral  
Universidade Federal de Uberlândia,  
Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

## Introduction

Equine babesioses are tick-borne diseases of domestic and wild equines caused by the exclusively intraerythrocytic protozoa *Babesia caballi* or by the intraerythrocytic and intralymphocytic protozoa *Theileria equi* (Friedhoff 1988; Uilenberg 2006). *Anocentor nitens* ticks are the vectors for *B. caballi* (Roby and Anthony 1963) and, in Brazil, it is known that *Boophilus microplus* can transmit *T. equi* (Guimaraes et al. 1998a, b; Heuchert et al. 1999; Battsetseg et al. 2002).

Clinical signs may vary from asymptomatic to acute cases with fever, anemia, edema, dyspnea, and death. Congenital transmission of *T. equi* can lead to abortion or neonatal death (Phipps and Otter 2004). Horses that recover from acute infections may remain reservoirs for ticks, which will transmit the infection to other susceptible horses. Several researchers postulate that *B. caballi* persists from 1 to 4

years in the host, whereas *T. equi* may remain as a lifelong infection (de Waal 1992).

Direct diagnosis can be made by microscopic examination of Giemsa-stained blood smears or by specific PCRs (Böse et al, 1995). However, for epidemiological surveys indirect methods, such as the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT), are more appropriate to evaluate the status of a herd or an area. In tropical endemic countries, like Brazil, foals usually acquire the infections shortly after birth and patent parasitemia are detected prior to 42 days of age (Ribeiro et al., 1995). Under these circumstances, symptomatic babesiosis is not expected to occur with high frequencies in adults, as they usually undergo subclinical or chronic infections.

Although Brazil is considered an endemic area, the epidemiological studies carried out to date are restricted to few areas and considered small numbers of samples for serological surveys. On the other hand, molecular characterization of Brazilian *B. caballi* and *T. equi* isolates is lacking.

Therefore, the aim of the present study was to determine, using direct and indirect methods, the prevalence of both infections in horses and to characterize molecularly Brazilian isolates of *B. caballi* and *T. equi*. In addition, congenital transmission was investigated.

## Materials and Methods

### Location

Collection of material was carried out in a horse slaughterhouse located in Araguari, Minas Gerais State, Brazil, where horse meat is processed for exportation. Horses were originally from the states of Minas Gerais, Goiás, Bahia and São Paulo (Figure 1). The permission for collection of samples was given by the official veterinarians inspecting the slaughterhouse. Blood samples from adult horses were collected before slaughtering, and foetus samples were collected after the slaughtering procedure, in order to avoid any interference with the sanitary requirements of the Brazilian legislation and the international meat market.

### Collection and preparation of samples

Blood samples were collected from 487 adult horses, including 83 were pregnant mares. Blood samples were also collected from the fetuses, which were measured in order to estimate the time of gestation, according to Ginther, 1967.

**Fig. 1** Geographic location of the origin of horses within the states of Bahia (Ba), Goiás (Go), Minas Gerais (MG) and São Paulo (SP), including 3 municipalities in Bahia (Correntina, Caetité, and Itajú do Colônia), 9 in Goiás (São Domingos, Ipameri, Corumbáiba, Cachoeira Dourada, Quirinópolis, Santo Antônio da Barra, Indiara, and Arenópolis), 17 in Minas Gerais (Jaíba, Janaúba, São João da Ponte, Montes Claros, Patos de Minas, Uberlândia, São Sebastião do Paraíso, Guaxupé, Itajubá, Araguari, Ituiutaba, Conceição das Alagoas, Pedro Leopoldo, Caeté, Belo Horizonte, Conselheiro Lafaiete, and Três Pontas), and one in São Paulo (Luiziânia)



Blood samples were collected in EDTA-tubes from the jugular vein of adult horses and from the heart of fetuses. For each blood sample, the packed cell volume (PCV) was determined, and Giemsa-stained blood smears were prepared for microscopic examination. DNA was extracted using a commercial Kit (Wizard Genomic DNA Purification, Promega, Madison, USA). Plasma samples were separated after centrifugation and were tested by IFAT for detection of antibodies against *B. caballi* and *T. equi*.

#### Molecular characterization

DNA was extracted from 300 µl of blood and eluted in 900 µl of buffer, following the manufacturer instructions. DNA concentrations were determined using the Nanodrop® ND-1000 spectrometer (Nanodrop Technologies, DE, USA). Detection of *B. caballi* and *T. equi* DNA was carried out using multiplex real-time PCR (MRT-PCR). Real-time PCR using targeting sequences of horse DNA was also run, as a reference, to guarantee the reliability of results. For detection of *T. equi*, the primers targeted a single-copy *ema-1* gene (*EMA 1 f/r*), as referred by Ueti et al. 2003. For detection of *B. caballi*, primers were designed using the computer program "Beacon Designer 4.0" (BC 48 *f/r*). The two sets of primers were used in a modified MRT-PCR, in a way that they did not interfere with each other. The primer set for the horse DNA real-time PCR was also designed with the "Beacon Designer 4.0" program (*HoCytBm-f/r*). The primer sequences with their TaqMan® probes and the MRT-PCR conditions are summarized in Table 1.

For each batch of samples, a negative control (H<sub>2</sub>O) and positive controls (*B. caballi* and *T. equi* clones) were included.

For sequencing, some samples were randomly selected from different areas of the study, and a single target PCR was run using the primersets *EMA1F* (5'-

TGCGCCATAGACG GAGAAGC-3'/R (5'-GCATCCATTGCCATTTTCGAG-3') and BC 48F (5'-GGCTCCCAGCGACTCTGTGG-3')/R1 (5'-TCTGCACTACCATAAGGGAGAAA-3'). Cycling was performed in a thermal cycler under the following conditions: 15 min/95°C; 15 s/94°C; 30 s/60°C; 45 s/72°C. Amplicons were visualized after electrophoresis of 5 µl of the PCR product on a 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide. The PCR products were purified using commercial kits (E.Z. N.A.® Cycle-Pure Kit, Classic Line, peqLab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany; QIAquick Gel ExtractionKit, QUIAGEN, Hilden, Germany) and were sent directly for sequencing (Sequence Laboratories, Goettingen, Germany). Sequence alignments were performed using the "Sequence Manipulation Suite" <http://www.bioinformatics.org/sms/>, BCM Multiple Alignment). Sequences of Brazilian *B. caballi* and *T. equi* isolates were also compared with sequences available in the GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### Serology

Plasma samples were tested by IFAT, as described by Tenter and Friedhoff (1986) with modifications, at dilutions of 1:80, 1:160, 1:320, and 1:640. The antigen slides containing either *T. equi* or *B. caballi* had been previously produced at the Veterinary School, UFMG, Brazil, with infected blood collected from esplenectomized experimentally infected foals. A commercial antihorse IgG conjugate (Sigma, Germany) was used. For both parasites, the dilution of 1:80 was considered the cut-off point for seropositivity.

#### Statistical analysis

SPSS and Microsoft Excel® programs were used for descriptive statistics, and the chi-square test was used to analyze associations between positivity in blood smears or

**Table 1** Primer sequences and MRT-PCR conditions for detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* DNA in horses

Target organisms	Primer designation	Sequence 5'-3'	Amplicon size	Reference	Cycling conditions
<i>T. equi</i>	Ema 1-f	GAGTCCATTGACCACCTCACC	800 bp	Ueti et al., 2003	15min/95 C°; 15sec/94 C°; 45sec/60 C°; 30sec/72 C°; 50 cycles
	Ema 1-r	GTGCTGACGACAGTCTTTGG			
	Ema 1-p	TCGACAAGCAGTCCGAGCACA			
<i>B. caballi</i>	BC 48-f	ACGTACACGAATGTTGATGAGTTC	700 bp	This publication	15min/95 C°; 15sec/94 C°; 45sec/60 C°; 30sec/72 C°; 50 cycles
	BC 48-r	AGAGCGAATAATCTGCTTAAGTGC			
	BC 48-p	TGATGCCCCAGCCGAACAACCCAG			
Sequence of Horse DNA	HoCytBm-F	CCTAATCCTCTCCATCCTGATCC	800 bp	This publication	15min/95 C°; 15sec/94 C°; 45sec/60 C°; 30sec/72 C°; 50 cycles
	HoCytBm-R	AAGAGTCAGAATACGCATTGGC			
	HoCytBm-HEX	AGCACTCATCCCCACCCTCCACAT			

PCR and a low PCV, as well as the occurrence of concomitant infections, and positivity in the blood smear and early detection by the PCR.

## Results

### Detection of *B. caballi* and *T. equi* infections

Direct examination of blood smears from adult horses showed an overall prevalence rate of 7.8%, with 7.2% due to *T. equi*, with parasitemias always below 0.1%. Only 1.0% of the horses had concurrent infections of *T. equi* and *B. caballi*. On the other hand, the prevalence rates obtained by the MRT-PCR were much higher, 59.7% for *T. equi* and 12.5% for *B. caballi*, with detection of concurrent infections in 8.6% of the horses.

The analysis of PCV values showed that only 5% of the horses had PCV values <25%, 26.4% had PCV values between 25 and 34%, and the great majority (68.6%) had PCV values >34%, within the normality range for horses. Similarly, the great majority of positive horses (70%) had normal PCV values (>34%) and, therefore, no significant correlations were seen between positivity in the MRT-PCR and PCV values. On the other hand, there was a significant correlation ( $p=0.023$ ) between a *T. equi* positive blood smear and detection of infection by the MRT-PCR; however, the same association was not seen for *B. caballi* infections.

### Seroprevalence

The overall seroprevalence was 91.0% for *T. equi* and 83.% for *B. caballi*, with high frequencies of titers of 1:40 and 1:640 for both parasites (Fig. 2). As far as fetus samples are concerned, no infection could be detected, neither by direct

nor indirect methods, and therefore, intrauterine transmissions were not detectable in this study.

### Molecular characterization

For the characterization of *T. equi*, 22 sequences from 11 different locations (Ipameri, GO; Jaíba, MG; Patos de Minas, MG; Ituiutaba, MG; Arenópolis, GO; São Sebastião do Paraíso, MG; Itajubá, MG; Montes Claros, MG; Santo Antônio da Barra, GO; Itajú do Colônia, BA; and Janaúba, MG) were compared within each other and with sequences available in the GenBank (access numbers: AF261824, AB015213). These comparisons showed an alignment score of 99%.

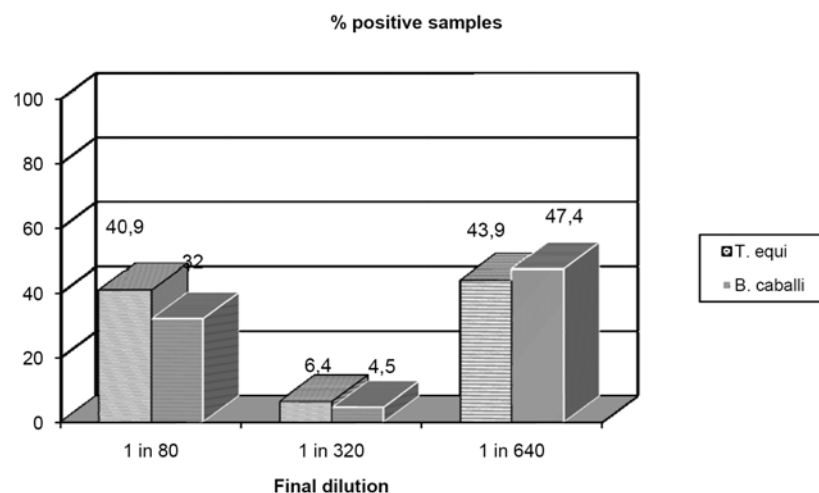
For the characterization of *B. caballi*, six sequences (from Jaíba, MG; Caetité, MG; Guaxupé, MG; Itajú do Colônia, BA; Itajubá, MG; and Quirinópolis, GO) were compared within each other and with sequences available in the GenBank (access numbers: AF092736, AB017700). Again, the alignment score was 97%. Thus, all sequences were identical to sequences available in the GenBank and had 100% identity to each other.

## Discussion

In the present study, the occurrence of piroplasm infections was extensively investigated by blood-smear examination, MRT-PCR, and serology in horses from different locations in Brazil.

The results confirmed that both *B. caballi* and *T. equi* infections are widespread in the studied region, suggesting high levels of transmission, as demonstrated by the high percentages of positive animals and the high titers of specific antibodies in the IFAT. As expected under these circumstances, detection of infections in blood smears was

**Fig. 2** Frequency of IFAT antibody titers against *Babesia caballi* and *Theileria equi* in naturally infected horses in Brazil, 2006



very low, with parasitemias always below 0.1%, for both parasites. As all horses were adult and had probably been exposed to ticks and consequently to the parasites several times, the great majority had developed protective immunity and became chronically infected carriers. On the other hand, and despite the low patent parasitemia, the MRT-PCR developed in the present study proved to be efficient in detecting infected animals, undergoing either an acute or a chronic infection of *B. caballi* or *T. equi*.

The use of PCR or real-time PCR as a reliable tool to detect piroplasm infections has been well reported in the literature. Posnett and Ambrosio (1991) used DNA probes for the detection of *B. caballi*; Bahiruddin et al. 1999 used different sets of primers to determine the 16S-rRNA-gene of *B. caballi* and *T. equi*; nested PCRs were used by Nicolaiewsky et al. 2001 and Rampersad et al. 2003, and more recently a multiplex PCR was developed for simultaneous detection of *B. caballi* and *T. equi* in horses (Alhassan et al. 2005). However, the present study constitutes the first report of a MRT-PCR to detect the two horse parasites in Brazil and also the first molecular comparative characterization of Brazilian isolates. The PCR prevalence rates were high, particularly for *T. equi*, and comparable to those recently reported in a study carried out in Mongolia, also using a MRT-PCR but with different sets of primers (Rüegg et al. 2007).

However, despite the high rates of infections observed in the present study, no congenital transmission was detectable. Transplacental infection of foals with *T. equi* may result in either full-term stillbirths or the birth of live foals that develop clinical disease soon after birth (de Waal and van Heerden 1994), and neonatal deaths and abortions have been recently reported by Phipps and Otter 2004. However, most foals born from immune mares seem to be well protected against infections (Donnelly and Phipps 1982). Nevertheless, a recent study carried out on carrier mares in South Africa has shown, by the use of an oligonucleotide probe, high rates of transplacental transmission of *T. equi* to apparently healthy foals, occurring as early as 4 months of gestation (Allsopp et al. 2007). In that study, however, instead of blood, spleen samples were used to detect infection in fetuses. It is also important to emphasize that in the present study, the great majority of samples were collected from fetuses at a very early stage of pregnancy (less than 3 months), and this profile had possibly limited the detection of infection in fetal blood samples. Therefore, the epidemiological importance of congenital transmission of *T. equi* in horses in Brazil remains to be further investigated.

The high seroprevalence rate for *T. equi* observed in the present study correspond to those reported in previous epidemiological studies carried out with more limited numbers of samples in Brazil, in which prevalence rates ranged from 58 to 100% (Tenter and Friedhoff 1986;

Ribeiro and Lima 1989; Cunha 1993 and Pfeifer Barbosa et al. 1995; Ribeiro et al. 1999; Heuchert et al. 1999). And although fewer reports have been previously published on prevalence of *B. caballi*, the rates were also high, ranging from 70 to 90% (Pfeifer Barbosa et al. 1995; Heuchert et al. 1999).

The dynamics of antibody production against *B. equi* and *B. caballi* in pregnant mares living under natural field conditions, as well as the efficiency of the passive transfer of antibodies via colostrum, have also been studied in the state of Minas Gerais (Passos et al. 1999). And, although the levels of antibodies in pregnant mares had no influence on the passive transfer of antibodies, the passive transfer of *B. caballi* antibodies was less efficient than that of *B. equi* antibodies, indicating that young animals are at higher risk of acquiring this infection.

Although the two piroplasm infections were highly prevalent in horses, no significant correlations were detected between low PCV values and presence of infection (neither by serology nor direct detection). On the other hand, positivity in blood smears was significantly associated with detection of *T. equi* infection by the MRT-PCR ( $p=0.02$ ), indicating that the PCR could replace with advantages the direct detection through blood-smear examination for routine diagnosis of large numbers of samples.

Characterization of piroplasmis isolates from Brazilian horses on a molecular basis was, so far, completely lacking. The present study is the first report in which isolates of *B. caballi* and *T. equi* from different areas of Brazil were compared within each other and with data available in the Genbank.

Diversity or even mutations were expected more in *T. equi* than in *B. caballi* isolates. The PCR for *T. equi* is based on detection of superficial proteins encoded by paralogous single-copy genes (Ueti et al. 2003), while the PCR for *B. caballi* amplifies rhoptries-proteins encoded by a gene containing more than two copies of the *B. caballi* genome. Therefore, sensitivity of the PCR for *B. caballi* is lower than that for *T. equi* (Ikadai et al. 1999).

The comparative analyses of sequences of the two piroplasms showed no differences within each species or among known sequences available and, therefore, no diversity was observed among the isolates present in the studied areas.

Transmission of piroplasms is usually influenced by the dynamics of vector populations, and these are directly influenced by climatic conditions. Thus, for large countries like Brazil, where climatic conditions are ranging from temperate to extremely tropical zones, the absence of diversity amongst isolates may be of great importance, favoring for instance the establishment of control measures, such as the use of vaccines, which would be equally efficient for the whole country.

Thus, the results from the present study confirmed the widespreadness of equine babesioses by *B. caballi* and

*T. equi* in Brazil with homology among the isolates of both parasites. Further studies should be addressed to a better evaluation of congenital transmission under natural field conditions.

**Acknowledgments** The authors thank the personnel and the veterinarians at the slaughterhouse Pomar in Araguari for allowing the collection of samples, Mr. Ricardo Canesso Dalla Rosa and Ms. Ana Paula Ferreira for the technical assistance in the laboratory, Ms. Denise Guethlin for assistance in the statistical analysis, the Brazilian agency CAPES (Project 182/04) and the German agency DAAD for the financial support for exchanging scientists and students, and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for awarding scholarships. The experiments carried out in the present study comply with the current laws of Brazil and Germany.

## References

- Alhassan, A., Pumidonming, W., Okamura, M., Hirata, H., Battsetseg, B., Fujisaki, K., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2005. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Vet. Parasitol.* 129, 43-49.
- Allsopp MTEP, Lewis BD and Penzhorn BL (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet. Parasitol.*, 148: 130-136.
- Bahiruddin, J.B., Camma, C., Rebelo, E., 1999. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet. Parasit.* 84, 75-83.
- Battsetseg, B., Lucero, S., Xuan, X., Claveria, F. G., Inoue, N., Alhassan, A., Kanno, T., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T., Fujisaki, K., 2002. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 107, 351-357.
- Böse, R., Jorgensen, W. K., Dalgliesh, R. J., Friedhoff, K., T., de Vos, A. J., 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.* 57, 61-74.
- Cunha, C. W., 1993. Babesiose equina: Padronização da reação de imunofluorescência para sorodiagnóstico e levantamento epidemiológico em equinos puro sangue inglês (Thesis, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil).
- de Waal, D.T. and van Heerden, J. 1994. In *Infectious Diseases of Livestock* (with special reference to Southern Africa). Vol 1. Eds J. A. W. Coetzer, G. R. Thompson, R. C. Tustin. Cape Town, Oxford University Press. pp 295-304.
- de Waal, D. T., 1992. Equine piroplasmiasis: A review. *Br. Vet. J.* 148, 6-13.
- Donnelly, J., Phipps, L. P., 1982. Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *Babesia caballi* in foals of seropositive mares. *Equine Veterinary J.* 14, 126-128.
- Friedhoff, K. T., 1988. Transmission of *Babesia*, in: *Babesiosis of domestic animals and man*, edited by M. Ristic. Boca Raton, CRC Press, 23-52.
- Ginther, O. S., 1967. Reproductive biology of the mare – basic and applied aspects. *Equiservices*, Cross Plains, WI. 396.
- Guimaraes, A.M., Lima, J.D., Ribeiro, M.F.B. et al. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. *Parasitol. Res.*, v.84, p.69-74, 1998a.
- Guimaraes, A.M., Lima, J.D., Ribeiro, M.F.B. Sporogony and experimental infection of *Babesia equi* by *Boophilus microplus* ticks. *Parasitol. Res.*, v.84, p.323-327, 1998b.
- Heuchert, C. M. S., V. de Giulli Jr. D. F. de Athaide, Böse, R., Friedhoff, K. T., 1999. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Vet. Parasitol.* 85, 1-11.
- Ikadai, H., Xuan, X., Igarashi, I., Tanaka, S., Kanemaru, T., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., 1999. Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3475-3480.
- Nicolaiewsky, T. B., Richter, M. F., Lunge, V. R., Cunha, C. W., Delagostin, O., Ikuta, N., Fonseca, A. S., Da Silva, S. S., Ozaki, L. S., 2001. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 101, 9-21.
- Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., Anderegg, P.I., Böse, R. Serological diagnosis of *Babesia equi* and *B. caballi* in pregnant mares, 1999. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Vol 51(6), 527-530.
- Pfeifer Barbosa, I., Böse, R., Peymann, B., Friedhoff, K. T., 1995. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. *Vet. Parasit.* 58, 1-8.
- Phipps, L. P., Otter, A., 2004. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 154, 406-408.
- Posnett, E. S., Ambrosio, R. E., 1991. DNA Probes for the detection of *Babesia caballi*. *Parasitol.* 102, 357-365.
- Rampersad, J., Cesar, E., Campell, M. D., Samlal, M., Ammons, D., 2003. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet. Parasitol.* 114, 81-87.
- Ribeiro, M. F., Costa, J. O., Guimaraes, A. M., 1999. Epidemiological aspects of *Babesia equi* in horses in Minas Gerais, Brazil. *Vet. Res. Commun.* 23, 385-390.
- Ribeiro, M. F. and Lima, J. D., 1989. Diagnóstico sorológico de babesiose equina por *Babesia equi* em Minas Gerais. *Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária*. IV, Bagé, 111.
- Ribeiro, M.F.B., Saito, J.F., Pimentel, P.V. Babesiose equina. I. Primo-infecção de potros em área endêmica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.47, p.641-647, 1995.
- Rüegg S.R., Torgerson P., Deplazes P., Mathis A., 2007. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. *Parasitology*, 134, 939-47.
- Roby, T.O. and Anthony, D.W. 1963. Transmission of equine piroplasmiasis by the tropical tick *Dermacentor nitens* (Neumann), *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 142, p. 768-769.
- Tenter, A. M. and Friedhoff, K. T., 1986. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Vet. Parasitol.* 20, 49-61.
- Ueti M.W., Palmer, G. H., Kappmeyer, L. S., Scoles, G. A., Knowles, D. P., 2003. Expression of Equi Merozoite Antigen 2 during Development of *Babesia equi* in the Midgut and Salivary Gland of the Vector Tick *Boophilus microplus*. *J. Clin. Microbiol.*, 5803-5809.
- Uilenberg, G. 2006. *Babesia* – a historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3-10.

## 4.2 Prävalenz von *T. equi* und *B. caballi*

In der folgenden Abbildung wurde die Prävalenz von *T. equi* und *B. caballi* direkt im Blutausstrich nachgewiesen.

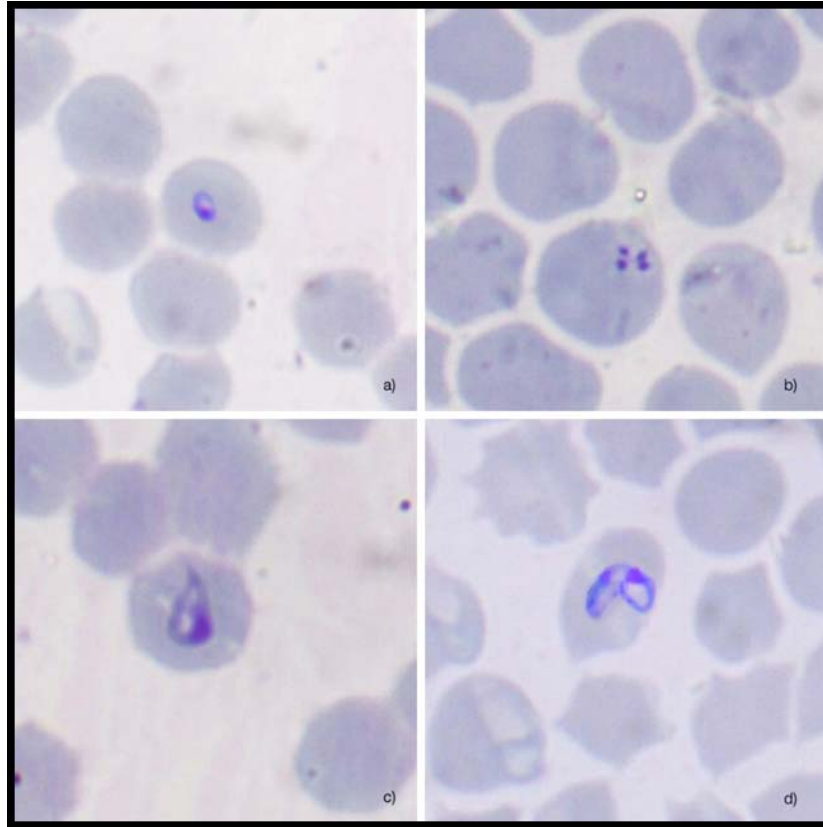


Abb. 20: *B. caballi* (c und d) und *T. equi* (a und b) im Blutausstrich (Giemsafärbung, 1000-fache Vergrößerung) (A.Heim)

### 4.2.1 Positiver Blutausstrich und Hämatokrit

Das Vorkommen im Blutausstrich von *T. equi* und *B. caballi* oder einer Mischinfektion aus den beiden Erregern korreliert nicht mit einem erniedrigten Hämatokrit. (siehe Anhang 10.13.1).

### 4.2.2 Seroprävalenz, PCR-Prävalenz und Hämatokritwert

Von allen 487 Blutproben der adulten Tiere und der 83 fötalen Blutproben wurde der Hämatokrit bestimmt. Der niedrigste gemessene Hämatokrit lag bei 17 %, der höchste bei 49 %. Bei nahezu 100 % der Proben wurde ein Hämatokrit zwischen 20 % und 40 % gemessen, was als physiologisch anzusehen ist. Ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer *T. equi* oder *B. caballi* Infektion (Nachweis über PCR oder IFAT) und dem Vorkommen eines erniedrigten Hämatokrites ist somit auszuschliessen.

#### 4.2.2.1 PCR Prävalenz für *T. equi* bei einem geringen Hämatokritwert

Die Auswertung der PCR Prävalenz von *T. equi* und dem Vorkommen eines erniedrigten Hämatokritwertes ergab keinen signifikanten Zusammenhang (Chi-Quadrat-Test,  $p > 0,05$ ) (siehe Anhang 10.13.2).



#### **4.2.2.2 PCR Prävalenz für *B. caballi* bei einem geringen Hämatokritwert**

Die Auswertung der PCR Prävalenz von *B. caballi* und dem Vorkommen eines niedrigen Hämatokritwertes erfolgte in der gleichen Weise wie in Punkt 4.2.2.1. Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang (Chi-Quadrat-Test,  $p > 0,05$ ) (siehe Anhang 10.13.3).

#### **4.3 Molekulare Darstellung von *B. caballi* und *T. equi***

Die regionalen Sequenzenvergleiche von *B. caballi* und *T. equi* sind in Anhang 10.8 und 10.9 dargestellt. Punktmutationen (Austausch einer Nukleinbase) in der Sequenz sind auf den Einfluss der Taq-Polymerase während der PCR zurückzuführen. Punktmutationen in der Sequenz entstehen häufig durch exogene Einflüsse (hier: Taq-Polymerase) und haben meist keine Auswirkungen auf die Funktion der DNA („stumme Mutation“).

#### **4.4 Kongenitale Übertragung**

83 fötale Blutproben wurden ebenfalls mittels direkten (Blutausstrich und PCR) und indirekten (IFAT) Nachweisverfahren untersucht. Alle fötalen Blutproben waren negativ und wurden somit auch nicht in die statistische Bewertung mit aufgenommen.

#### **4.5 Zeckenvorkommen**

Insgesamt wurden 505 Zecken gesammelt (siehe Abb. 21 und Abb. 22). Davon waren 94,85 % *Anocentor nitens* und 2,57 % jeweils *Amblyomma cajennense* und *Boophilus microplus*. Ein Überblick über das Zeckenaufkommen der einzelnen Herkunftsorte der Pferde ist in Abb. 23 (siehe Anhang 10.14) dargestellt.



Abb. 21: Zeckenbefall Innenseite der Ohrmuschel (A.Heim)



Abb. 22: Beispiel eines massiven Zeckenbefalls (A.Heim)

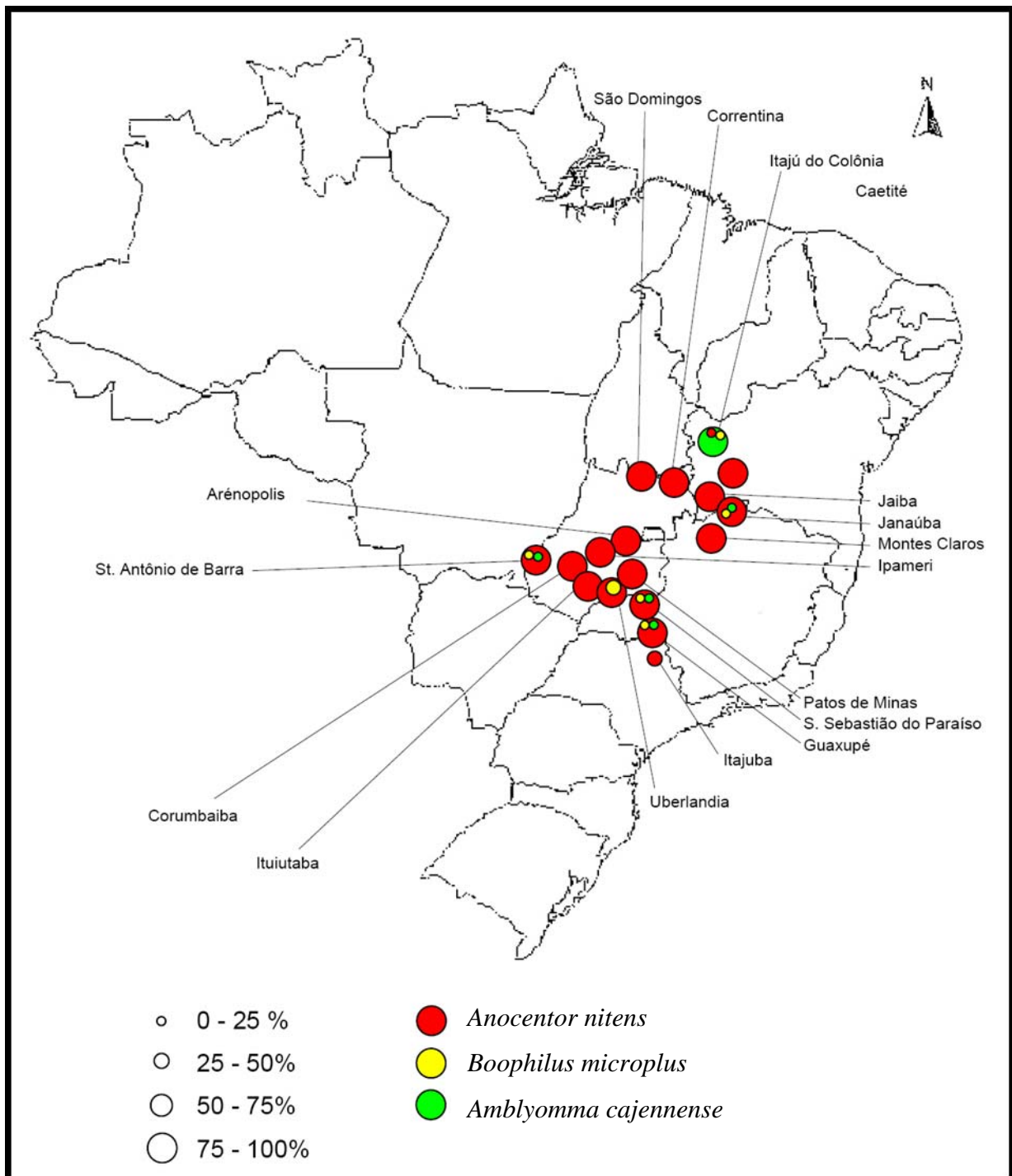


Abb. 23: Zeckenverteilung (A.Heim)

## 5 Zusammenfassende Diskussion

### 5.1 Problemdarstellung und Zielvorgabe

Die equine Piroplasmose stellt ein Problem im internationalen Pferdehandel und Pferdesport dar. Die Tiere können sowohl akut, als auch latent erkranken und darüber hinaus in piroplasmosefreie Länder eingeführt werden (Gottstein, 2005). Obwohl Brasilien zu einem der endemischen Gebiete der Erde gehört, sind nur wenige Studien zur equinen Babesiose in Brasilien veröffentlicht.

In der hier vorliegenden Arbeit wird die Epidemiologie von *B. caballi* und *T. equi* in Teilregionen Brasiliens untersucht. Die gesammelten Blutproben wurden mikroskopisch, serologisch und molekularbiologisch auf *B. caballi* und *T. equi* untersucht. Als molekularbiologisches Nachweisverfahren wurde eine eigens für diese Arbeit entwickelte Multiplex Real-time PCR eingesetzt. Diese Untersuchungen wurden auch mit den fötalen Blutproben durchgeführt, um eine mögliche kongenitale Übertragung abzuklären. Ferner galt es die Sequenzen von *B. caballi* und *T. equi* Isolaten unterschiedlicher Regionen Brasiliens zu erfassen und miteinander zu vergleichen, um ggf. Mutationen untereinander festzustellen.

### 5.2 Diskussion

Die Ergebnisse der Untersuchungen bestätigen eine hohe Seroprävalenz und eine hohe PCR-Prävalenz und decken sich mit den Ergebnissen vorangegangener Studien. Der direkte Nachweis der Erreger im Blutaussstrich gelang nur bei 7,8 % der Blutaussstriche, wovon 7,2 % *T. equi*-positiv waren mit Parasitämien von unter 0,1 %. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem *T. equi* positiven Blutaussstrich und einer PCR Prävalenz ( $p < 0,05$ ), jedoch kein Zusammenhang zwischen einem *B. caballi* positiven Blutaussstrich und der PCR-Prävalenz. Durch eine ständige Exposition der Pferde mit den Erregern durch saugende Zecken, entwickeln die Tiere Immunität gegen *B. caballi* und *T. equi*. Der Nachweis eines chronisch infizierten Tieres über den Blutaussstrich gelingt selten.

*T. equi* ist der pathogenere und häufiger vorkommende Erreger der beiden, somit manifestiert sich eine Parasitämie durch *T. equi* häufiger als eine Parasitämie durch *B. caballi* (Passos, persönliche Mitteilung). Der Infektionsverlauf ist abhängig vom Erreger, dem Grad der Parasitämie, sowie dem Immunstatus des Wirtes. *B. caballi* lässt sich selbst im akuten Fall schwer im Blutaussstrich nachweisen, da dort eine Frequenz der Parasitämie immer relativ gering ist ( $< 0,1$  %). Hingegen liegt die Parasitämie bei akuten *T. equi* Infektionen in der Regel bei 1-5 % (De Waal, 1992). Der Ausbruch der Erkrankung ist dennoch bei beiden Erregern selten, da in einem endemischen Gebiet wie Brasilien ständige Superinfektionen eine endemische Stabilität induzieren (Friedhoff, 1982).

Der Hämatokrit lag bei den meisten Proben im Normalbereich (35-45 %). Fünf % aller Proben lagen unterhalb 25 %, 26,4 % lagen in einem Hämatokritbereich von 25 %-34 % und bei 68,6 % der Proben war der Hämatokrit >34 %. Der Abfall des Hämatokrits ist nur dann ein sensibler Indikator, um erste Parasiten-induzierte Veränderungen zu erkennen und somit lediglich diagnostisches Hilfsmittel bei einer akuten Infektion (Allen et al., 1975, Kuttler et al., 1986; De Waal et al., 1987, Camacho et al., 2005). Bei latenter Infektion liegt der Hämatokrit im physiologischen Bereich. Ein erniedrigter Hämatokrit korreliert nicht mit einem positiven *B. caballi* oder *T. equi* Blutausschlag, ebenso besteht kein Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Hämatokrit und der PCR-Prävalenz oder Seroprävalenz. Daraus läßt sich schliessen, dass die Proben der vorliegenden Arbeit ausschliesslich von chronisch infizierten Tieren stammen.

Die Seroprävalenz ergab 91 % für *T. equi* und 83 % für *B. caballi*. Die hohe Seroprävalenz entsprach den Erwartungen und deckt sich mit Ergebnissen vorangegangener Studien. Diese waren allerdings mit einer kleineren Probenanzahl und in einzelnen Bundesstaaten Brasiliens durchgeführt worden. Auch hier waren Prävalenzen zwischen 60 % und 100 % erreicht (Tenter und Friedhoff, 1986; Ribeiro und Lima, 1989; Cunha, 1993, Pfeifer Barbosa et al., 1995; Ribeiro et al., 1999; Heuchert et al., 1999).

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Multiplex-Real-time PCR gelang ein effizienter Nachweis sowohl akuter wie auch chronisch infizierter Tiere und *B. caballi* und *T. equi* konnten zeitgleich erfasst werden. Die PCR-Prävalenz betrug für *T. equi* 59,7 % und für *B. caballi* 12,5 %. Doppelinfektionen kamen nur bei 8,6 % der Fälle vor.

Die Primer für *T. equi* wurden der Publikation von Ueti et al., (2003) entnommen und Primer für *B. caballi*, welche auch die Struktur einer TaqMan Sonde aufweisen, über das Programm „Beacon Designer 4.0.“ gesucht und so festgelegt, dass diese nicht mit den Primern von *T. equi* interagieren. Somit konnten der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen wie in der Publikation, Tabelle 1, S. 41 aufgeführt für beide Erreger angeglichen werden.

Ein großer Schwachpunkt der PCR lag in den vorbereitenden Schritten der DNA Extraktion mit dem Promega Madison Kit, Madison, USA. Hier wird die DNA nicht an Säulchen gebunden, sondern befindet sich zwischen den Arbeitsschritten durch Zentrifugation am Boden der Eppendorfröhrchen. Beim Dekantieren des Überstandes zwischen den einzelnen Arbeitsschritten ist deshalb große Vorsicht geboten, die DNA nicht durch Unachtsamkeit mit wegzuschütten. Da die Blutproben zwischen den Arbeitsschritten tiefgefroren waren, wird vom Hersteller empfohlen, das Hinzufügen der „Cell-Lysis“Lösung so lange zu wiederholen, bis alle roten Blutbestandteile vollständig ausgewaschen sind und das Pellet weiß erscheint. Dieser Schritt wurde in vorliegender Arbeit aus zeitlichen und materiellen Gründen nur einmal durchgeführt. Rembeck (2005) hatte bei der DNA Extraktion aus Hundebloodproben auf diese Weise hohe DNA Qualität erzielt. Spätere Vergleichsmessungen mit dem NanoDrop Verfahren zeigten, dass die Pferde-DNA Proben minderwertiger Qualität entsprachen als die Hunde-DNA Proben.

Aufgrund wirtschaftlicher Relevanz und der Erhaltung internationaler Wettbewerbsfähigkeit werden zuverlässige diagnostische Tests, wie die PCR zum Nachweis von *B. caballi* und *T. equi* unerlässlich. Zur Diagnostik einer *B. caballi* oder einer *T. equi* Infektion wird beim Import von Pferden von den meisten Ländern (Ausnahme: USA und Kanada) immer noch die KBR vorgeschrieben (persönliche Mitteilung, Böse Labor, Hildesheim, 2007). Allerdings kommt es hier in der initialen, akuten Phase der Infektion nicht selten zu falsch positiven Ergebnissen (Gottstein, 2005). Neben der KBR ist auch der IFAT noch ein weit verbreitetes Verfahren, Antikörper gegen *B. caballi* und *T. equi* zu erfassen. Schwachpunkte liegen in entstehenden Kreuzreaktionen zwischen den Erregern (Weiland et al., 1984), einem hohen Zeitaufwand und der großen Menge an einzusetzendem Antigen (Brüning, 1996). So wurden in vorangegangenen epidemiologischen Studien verschiedene Verfahren zum Nachweis von *B. caballi* und *T. equi* kombiniert, was auf die Schwachstellen der einzelnen Verfahren hinweist (Kuttler et al., 1988). Akut infizierte Tiere können mit den indirekten Nachweisverfahren zu keinem Zeitpunkt der Infektion nachgewiesen werden. Zur Erkennung akuter Infektionen bieten sich daher die direkten Erregernachweise an. Nachweise über die Lichtmikroskopie sind nur auf einen kurzen Zeitraum, die akute Phase, beschränkt. (Boch, 1985). Die Real-time PCR als modernes molekularbiologisches Verfahren zur Detektion von *B. caballi* und *T. equi* bietet sich daher an und bringt einen großen Fortschritt für die Diagnostik mit sich. Dieser liegt in der raschen Durchführbarkeit und der besseren Möglichkeit zur Kontaminationsvermeidung gegenüber einer konventionellen und der „nested“ PCR. Zudem ist durch den Einsatz sequenzspezifischer Sonden eine direkte Verifizierung der Spezifität des Produktes möglich, da diese nur bei Vorliegen eines komplementären Sequenzabschnittes binden und es nur dann zur Generierung von Fluoreszenz kommt.

Eine kongenitale Übertragung konnte trotz hoher Prävalenzen nicht gefunden werden, obwohl in der Literatur Aborte und Krankheitsausbrüche kurz nach der Geburt beschrieben sind (De Waal und Van Heerden, 1994; Phipps und Otter, 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass das Auffinden der Parasiten durch das frühe Trächtigkeitssalter der meisten Föten limitiert wurde. In einer vergleichbaren Studie durchgeführt in Südafrika von Allsopp et al. (2007) wurden infizierte Fohlen detektiert, es wurden allerdings Milzproben statt Blutproben verwendet. Die kongenitale Übertragung ist noch unzureichend erforscht und fordert in dieser Hinsicht unbedingt weiterführende Untersuchungen.

Der Sequenzenvergleich zwischen Isolaten von *B. caballi* und *T. equi* untereinander und mit Sequenzen aus der Gendatenbank ergab keine wesentlichen regionalen Unterschiede. Die Sequenzen stimmten in allen Fällen nahezu zu 100 % überein. Mutationen waren bei *T. equi* eher erwartet worden, als bei *B. caballi*. Das nachgewiesene Protein über die PCR bei *T. equi* ist oberflächlich, es liegt nur eine Kopie dieses Genomes vor (Ueti et al., 2003). Es wäre zu erwarten, dass dieses Oberflächenprotein eher Umweltfaktoren ausgesetzt ist, als das tiefer

gelegene Rhoprienprotein von *B. caballi*, von welchem das Genom mehr als zwei Kopien besitzt (Ikadai et al., 1999; Rüegg et al., 2007).

### **5.3 Schlussfolgerungen**

Die Resultate bestätigen eine weite Verbreitung der equinen Babesiose durch *B. caballi* und *T. equi* und liefern einen Beitrag zur Einschätzung der epidemiologischen Situation in Brasilien. Die hohe Seroprävalenz und die relativ hohe PCR Prävalenz schliessen auf eine intensive Durchseuchung der Pferde in Brasilien und erfordert im Hinblick auf längerfristige Bekämpfungsmaßnahmen weitere epidemiologische Studien.

Über das direkte Nachweisverfahren einer Multiplex Real-time PCR können sowohl akute, wie auch latent infizierte Tiere einfach und sicher detektiert werden.

Eine transplazentare Übertragung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Unter diesem Aspekt sollten ebenfalls weiterführende Studien angeschlossen werden, um die Mechanismen einer kongenitalen Übertragung zu erfassen.

## 6 Zusammenfassung

487 Blutproben, einschliesslich 83 trächtiger Stuten wurden an einem Schlachthof in Araguari, Minas Gerais, Brasilien gesammelt. Von jeder Probe wurde der Hämatokrit bestimmt und die mit Giemsa gefärbten Blutaussstriche wurden mikroskopisch auf das Vorkommen der Blutparasiten *T. equi* und *B. caballi* durchmustert. Mit dem IFAT wurde das Blutserum auf Antikörper gegen *T. equi* und *B. caballi* untersucht. Die Bestimmung der PCR Prävalenz erfolgte nach DNA Extraktion mit einer speziell für *T. equi* und *B. caballi* entwickelten Multiplex Real-time PCR. Die sequenzierten PCR Produkte wurden miteinander und mit bekannten Sequenzen aus der Gendatenbank verglichen. Das serologische Ergebnis ergab eine Prävalenz von 91 % für *T. equi* und 83 % für *B. caballi*. Die PCR Prävalenz betrug lediglich 59,7 % für *T. equi* und 12,5 % für *B. caballi*. Die Untersuchungen ergaben keinen Zusammenhang zwischen einer serologisch positiven Probe oder einer PCR positiven Probe und einem erniedrigten Hämatokrit. Über die mikroskopische Untersuchung wurden nur wenige positive Proben gefunden im Vergleich zum PCR Nachweisverfahren. Nur 35 von 570 Blutaussstrichen waren positiv mit Parasitämien <0,1 %. In keinem Nachweisverfahren konnten positive Föten nachgewiesen werden. Der Vergleich der Sequenzen untereinander und mit Sequenzen aus der Gendatenbank ergab keine regionalen Unterschiede. Von insgesamt 505 gesammelten Zecken waren 479 (94,85 %) *A. nitens*, 13 (2,57 %) *A. cajennense* und 13 (2,57 %) *B. microplus*. Die Ergebnisse bestätigen mit Hilfe der molekularen Nachweismethoden die hohe Prävalenz von *T. equi* und *B. caballi* in brasilianischen Pferden. Es liegen keinerlei Mutationen der Isolate unterschiedlicher Regionen Brasiliens vor.



## 7 Summary

Blood samples were collected from 487 adult horses, including 83 pregnant mares, at a slaughterhouse located in Araguari, Minas Gerais State, Brazil. For each blood sample, the packed cell volume (PCV) was determined, and Giemsa-stained smears were microscopically examined for the presence of hemoparasites. The plasma was examined by the indirect fluorescent antibody test for detection of antibodies against *Babesia caballi* and *Theileria equi*. In addition, DNA was extracted and analyzed by a multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR), specific for *Babesia caballi* and *Theileria equi*. Products of PCR were sequenced and compared with each other and with known sequences. The serological results showed a total prevalence of 91.0% for *T. equi* and 83.0% for *B. caballi*, while by PCR, prevalences of 59.7% for *T. equi* and 12.5% for *B. caballi* were observed. However, no correlations were seen between positivity (neither by serology nor by PCR) and PCV values. As expected, the microscopic examination of blood smears showed low sensitivity in detecting the infections when compared to the PCR. Only 35 out of 570 blood smears were positive, with parasitemias below 0.1%. No congenital transmission was detectable. As far as sequencing is concerned, no differences were seen among the isolates of each species nor among them and known sequences available. From 505 collected ticks were 479 (94.85 %) *A. nitens*, 13 (2.57 %) *A. cajennense* and 13 (2.57 %) *B. microplus*. These results confirm, by molecular methods, the high prevalence rates of *T. equi* and *B. caballi* infections in carrier horses in Brazil. However, no diversity was observed among the isolates within the studied regions.

## 8 Literaturverzeichnis

- ALHASSAN, A., THEKISOE, O. M. M., YOKOYAMA, N., INOUE, N., MOTLOANG, M. Y., MBATI, P. A., YIN, H., KATAYAMA, Y., ANZAI, T., SUGIMOTO, .C., IGARASHI, I., 2007. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. *Vet. Parasitol.*143, 155-160.
- ALHASSAN, A., GOVIND, Y., TAM, N. T., THEKISOE, O. M., YOKOYAMA, N., INOUE, N., IGARASHI, I., 2007. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitol. Res.*,100, 1165-8.
- ALHASSAN, A., PUMIDONMING, W., OKAMURA, M., HIRATA, H., BATTSETSEG, B., FUJISAKI, K.,YOKOYAMA, N., IGARASHI, I., 2005. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Vet. Parasitol.* 129, 43-49.
- ALLEN, P. C., FRERICHS, W. M., HOLBROOK A. A., 1975. Experimental acute *Babesia caballi* infections. I. Red blood cell dynamics. *Exp. Parasitol.* 37: 67-77.
- ALLSOPP, M. T .E .P., LEWIS, B. D. AND PENZHORN, B. L., 2007. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet. Parasitol.*, 148: 130-136.
- AUSUBEL, T. M., 2006. Current protocols in molecular biology, Vol.2. Wiley Verlag, Massachusetts, USA.
- BASHIRUDDIN, J. B., CAMMÁ, C., REBÊLO, E., 1999. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet. Parasitol.* 84, 75-83.
- BATTSETSEG, B., LUCERO, S., XUAN, X., CLAVERIA, F. G., INOUE, N., ALHASSAN, A., KANNO, T., IGARASHI, I., NAGASAWA, H., MIKAMI, T., FUJISAKI, K., 2002. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 107, 351-357.
- BOCH, J., 1985. *Babesia* infections in horses, cattle and dogs in southern Germany. *Tierärztl. Prax. Suppl.* 1, 3-7.

- BORGES, L. M., OLIVEIRA, P. R., LISBOA, C. L., RIBEIRO, M. F., 2002. Horse resistance to natural infestations of *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. 104, 265-273.
- BÖSE, R., JORGENSEN, W. K., DALGLIESH, R. J., FRIEDHOFF, K., T., DE VOS, A. J., 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. Vet. Parasitol. 57, 61-74.
- BÖSE LABOR HILDESHEIM, 2007: Persönliche Mitteilung.
- BRÜNING, A., 1996. Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention. Br. Vet. J. 152, 139-151.
- CAMACHO, A. T., GUITIAN, F. J., PALLAS, E., GESTAL, J. J., OLMEDA, A. S., HABELA, M. A., TELFORD, S. R. 3RD, SPIELMANN, A., 2005. *Theileria* (*Babesia*) *equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. Trop. Animal Health Prod. 37, 293-302.
- CUNHA, C. W., 1993. Babesiose equina: Padronização da reação de imunofluorescência para sorodiagnóstico e levantamento epidemiológico em equinos puro sangue inglês (Thesis, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil).
- DE WAAL, D. T., VAN HEERDEN, J., 1994. Equine babesiosis. In Infectious Diseases of Livestock (With Special Reference to Southern Africa). Vol 1. Eds J. A. W. Coetzer, G. R. Thompson, R. C. Tustin. Cape Town, Oxford University Press, 295-304.
- DE WAAL, D. T., 1992. Equine piroplasmiasis: A review. Br. Vet. J. 148, 6-13.
- DE WAAL D. T., VAN HEERDEN J., POTGIETER F. T., 1987. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. Onderstepoort J. Vet. Res. 54(4), 561-568.
- DONNELLY, J., PHIPPS, L. P., 1982. Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *Babesia caballi* in foals of seropositive mares. Equine Veterinary J. 14, 126-128.
- ECKERT, J., FRIEDHOFF, K. T., ZAHNER, H., DEPLAZES, P., 2005. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag Stuttgart 2005. 26-28, 98-111, 344-365.
- ERBSLÖH, J. K. E., 1975. Babesiosis in the newborn foal. J. Reprod. Fertility. 23, 725-726.
- EVANS, D. E., MARTINS, J. R., GUGLIELMONE, A. A., 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.

- FRIEDHOFF, K. T., TENTER, A. M., MÜLLER, I., 1990. Hämoparasites of equines: impact on international trade of horses. Rev. sci. tech. off int. Epiz. 9, 1187-1194.
- FRIEDHOFF, K. T., 1988. Transmission of *Babesia*, in: Babesiosis of domestic animals and man, edited by M. Ristic. Boca Raton, CRC Press, 23-52.
- FRIEDHOFF, K. T., 1982. Die Piroplasmen der Equiden – Bedeutung für den internationalen Pferdeverkehr. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95, 368-374.
- GINTHER, O. S., 1967. Reproductive biology of the mare – basic and applied aspects. Equiservices, Cross Plains, WI. 396.
- GOTTSTEIN, B., 2005. *Babesia* (Piroplasmose) des Pferdes; Diagnostikinformation. Institut für Parasitologie, Universität Bern.
- GUIMARAES, A.M., LIMA, J.D., RIBEIRO, M.F.B. ET AL., 1998. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. Parasitol. Res., v.84, p.69-74.
- GUIMARAES, A.M., LIMA, J.D., RIBEIRO, M.F.B., 1998. Sporogony and experimental infection of *Babesia equi* by *Boophilus microplus* ticks. Parasitol. Res., v.84, p.323-327.
- HANAFUSA, Y., CHO, K. O., KANEMARU, T., WADA, R., SUGIMOTO, C., ONUMA, M., 1998. Pathogenesis of *Babesia caballi* infection in experimental horses. J. Vet. Med. Sci. 60, 1127-32.
- HEUCHERT, C. M. S., V. DE GIULLI JR. D. F. DE ATHAIDE, BÖSE, R., FRIEDHOFF, K. T., 1999. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. Vet.Parasit. 85, 1-11.
- HOLBROOK, A. A., 1969. Biology of equine piroplasmosis. J. Am. Vet. Med. Assoc.155, 453-454.
- IKADAI, H., XUAN, X., IGARASHI, I., TANAKA, S., KANEMARU, T., NAGASAWA, H., FUJISAKI, K., SUZUKI, N., MIKAMI, T., 1999. Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 37, 3475-3480.
- KERBER, C. E., FERREIRA, F., PEREIRA, M. C., 1999. Control of equine piroplasmosis in Brazil. Onderstepoort J. Vet. Res. 66, 123-7.
- KNIPPERS, R., 1995. Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 428ff.

- KUTTLER, K. L., GOFF W.L., GIPSON C. A., BLACKBURN B. O., 1988. Serologic response of *Babesia equi*-infected horses as measured by complement-fixation and indirect fluorescent antibody tests. *Vet. Parasitol.* 26, 199-205.
- KUTTLER, K. L., GIPSON, C. A., GOFF, W. L., JOHNSON, L. W., 1986. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. *Am. J. Vet. Res.* 47,1668-70.
- LABRUNA, M. B., KASAI, N., FERREIRA, F., FACCINI, J. L. H., GENNARI, S. M., 2002. Seasonal dynamics of ticks (*Acari: Ixodidae*) on horses in the state of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 105, 65-77.
- MEHLHORN, H., SCHEIN, E., 1998. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol. Res.* 84, 467-475.
- MORENO, E. C., 1984. Incidencia de ixodideos em bovinos de leite e prevalencia em animais domésticos da Regiao Mealúrgica de Minas Gerais. Dissertacao de mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 105.
- NICOLAIEWSKY, T. B., RICHTER, M. F., LUNGE, V. R., CUNHA, C. W., DELAGOSTIN, O., IKUTA, N., FONSECA, A. S., DA SILVA, S. S., OZAKI, L. S., 2001. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Vet. Parasitol.* 101, 9-21.
- NOTOMI, T., HIROTO, O., HARUMI, M., TOSHIHIRO, Y., WATANABE, K., NOBUYUKI, A., HASE, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 28, 63.
- ONDERSTEEPOORT VETERINARY INSTITUTE, 2003. Serology Manual for *Babesia (Theileria) equi* and *caballi* IFA test.
- PASSOS, L.M.F., RIBEIRO, M.F.B., ANDEREGG, P.I., BÖSE, R., 1999. Serological diagnosis of *Babesia equi* and *B. caballi* in pregnant mares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Vol 51(6), 527-530.
- PASSOS, L. M. F., 2006. Persönliche Mitteilung, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.
- PFEIFER BARBOSA, I., BÖSE, R., PEYMANN, B., FRIEDHOFF, K. T., 1995. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. *Vet. Parasit.* 58, 1-8.
- PHIPPS, L. P., OTTER, A., 2004. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 154, 406-408.

- POSNETT, E. S., AMBROSIO, R. E., 1991. DNA Probes for the detection of *Babesia caballi*. Parasitol. 102, 357-365.
- RAMPERSAD, J., CESAR, E., CAMPELL, M. D., SAMLAL, M., AMMONS, D., 2003. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. Vet. Parasitol. 114, 81-87.
- REMBECK, K., 2005. Untersuchungen zur Epidemiologie der Caninen Babesiose im Bundesstaat Minas Gerais, Brasilien. Dissertation, tierärztliche Fakultät, Universität München.
- RIBEIRO, M. F., COSTA, J. O., GUIMARAES, A. M., 1999. Epidemiological aspects of *Babesia equi* in horses in Minas Gerais, Brazil. Vet. Res. Commun. 23, 385-390.
- RIBEIRO, M. F., LIMA, J. D., 1989. Diagnóstico sorológico de babesiose equine por *Babesia equi* em Minas Gerais. Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária. IV, Bagé, 111.
- RIBEIRO, M.F.B., SAITO, J.F., PIMENTEL, P.V, 1995. Babesiose equina. I. Primo-infecção de potros em área endêmica. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.47, p.641-647.
- ROBY, T. O., ANTHONY, D. W., 1963. Transmission of equine piroplasmiasis by *D. nitens*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 142, 768-769.
- RÜEGG S.R., TORGERSON P., DEPLAZES P., MATHIS A., 2007. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. Parasitology, 134, 939-47.
- RUSSEL, Z., MOORE, H., LEROY, B., LATIMER, K. S., 2005. Equine Babesiosis – A review. [www.vet.uga.edu/vpp/clerk/edwards](http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/edwards).
- SCHEIN, E., 1988. Equine babesiosis. In: M. Ristic(ed.), Babesiosis of Domestic Animals and Man. CTC Press, Boca Taton, FL.197-208.
- STILLER, D., COAN, M. E., 1995. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. In: Buening, G., Montenegro-James, S. (Eds.), Tick-borne hemoparasitic diseases of livestock. Vet. Parasitol. 97-108.
- TENTER, A. M., FRIEDHOFF, K. T., 1986. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. Vet. Parasitol. 20, 49-61.

- UETI M.W., PALMER, G. H., KAPPEMEYER, L. S., SCOLES, G. A., KNOWLES, D. P., 2003. Expression of Equi Merozoite Antigen 2 during Development of *Babesia equi* in the Midgut and Salivary Gland of the Vector Tick *Boophilus microplus*. J. Clin. Microbiol., 5803-5809.
- UILENBERG, G., 2006. Babesia – A historical overview.  
Vet. Parasitol. 138, 3-10.
- WALKER, A. R., BOUATTOUR, A., CAMICAS, J. L., ESTRADA-PENA, A., HORAK, I. G., LATIF, A. A., PEGRAM, R. G., PRESTON, P. M., 2003. Ticks of Domestic Animals in Africa. A Guide to Identification of Species.  
Bioscience Reports, Edinburgh.
- WEILAND, G., 1986. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).  
Vet. Parasitol. 20, 43-48.
- WEILAND, G., AICHER, B. M., BOCH, J., 1984. Serodiagnostik und Therapiekontrolle der Pferdepiroplasmose mit KBR und IFAT.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 97, 341-349.
- YOSHINARI, N. H., ABRAO, M. G., NAZÁRIO, B., SOARES, C. O., MADRUGA, C. R., SCOFIELD, A., MASSARD, C. L., DA FONSECA, A. H., 2003. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, state of Sao Paulo, Brazil.  
Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98, No 3.

## 9 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>B. caballi</i>	<i>Babesia caballi</i>
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Dabcyl	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
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked-immunosorbent-assay“
Fam	6-Carboxyfluoreszein
g	Gramm
g x	Erdbeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hex	Hexachlorfluoreszein
IFAT	Immunfluoreszenzantikörpertest
K <sub>2</sub> HPO	Kaliumhydrogenphosphat
KBR	Komplement-Bindungsreaktion
LB	Luria Bertani Medium
mg	milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	milliliter
mM	millimolar
NaCl	Natriumchlorid
ng	nanogramm
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
µM	mikromolar
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
<i>T. equi</i>	<i>Theileria equi</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TE	Puffer mit Salzzusätzen zum Aufnehmen der DNA
U	Unit, Einheit
Vol	Volumen



## 10 Anhang

### 10.1 Anhang: Gesamttabelle

Die Legende für die Gesamttabelle (S.63ff.) ist nachstehender Tabelle zu entnehmen.

m (male)	männlich
f (female)	weiblich
y (yes)	Zecken gefunden
<i>A.n./A.nitens</i>	<i>Anocentor nitens</i>
<i>B.m./B.microplus</i>	<i>Boophilus microplus</i>
<i>A.c./A.cajennense</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>
p (positive)	positives Ergebnis
n (negative)	negatives Ergebnis
leere Zelle (blank)	keine Zecken am Ohr des Tieres gefunden Blutprobe nicht vorhanden











216	S. Seb. Do Paraiso	m	brown						1	A. n.				n	p		320	p	80	p	n		
217	S. Seb. Do Paraiso	f	brown	y/63	13	y								n	n	p	640	p	640	p			
218	S. Seb. Do Paraiso	f	brown											n	n	p	640	p	640	p			
219	S. Seb. Do Paraiso	f	brown											n	n	p	640	p	80	p			
220	S. Seb. Do Paraiso	f	white			y	1	A. cajennense						n	p		640	p	80	p			
221	Ituiutaba MG	m	white		40									n	p		640	p	640	p			
222	Ituiutaba MG	f	brown		31	y	2	A. n.						n	p		80	p	640	p			
223	Ituiutaba MG	f	white		34	y	6	A. n.						n	p		640	p	80	p			
224	Ituiutaba MG	m	brown		39									n	p		640	p	640	p			
225	Ituiutaba MG	m	brown		14									n	p		640	p	640	p			
226	Ituiutaba MG	f	brown		34	y	7	A. n.						n	p		80	p			n		
227	Ituiutaba MG	m	brown		31									n	p		320	p			n		
228	Ituiutaba MG	m	brown		38									n	p		80	p	640	p			
229	Ituiutaba MG	f	brown		47	y	1	A. n.						n	p		640	p	640	p			
230	Ituiutaba MG	f	brown		27	y	1	A. n.						n	p		80	p	640	p			
231	Ituiutaba MG	f	white		30									n	p		80	p	80	p			
232	Ituiutaba MG	f	brown	y/94	36	34								n	p		80	p			n		
233	Ituiutaba MG	m	brown		40									n	p		640	p	320	p			
234	Ituiutaba MG	m	white		26									n	p		80	p	80	p			
235	Ituiutaba MG	m	brown											n	p								
236	Ituiutaba MG	m	light brown		40									n	p		640	p					
237	Aréopolis GO	m	brown		44									n	p		640	p	640	p			
238	Aréopolis GO	m	black		29									n	p		640	p	640	p			
239	Aréopolis GO	m	brown		10									n	p		640	p	640	p			
240	Aréopolis GO	m	brown		43									n	p		80	p	320	p			
241	Aréopolis GO	f	brown		42	y	7	A. n.						n	p		640	p	640	p			
242	Aréopolis GO	f	brown		32	y	5	A. n.						n	p		640	p	640	p			
243	Aréopolis GO	f	brown	y/197	39	37	y	4	A. n.					n	p		320	p	640	p	n		
244	Aréopolis GO	m	brown		40		y	4	A. n.					n	p		80	p	640	p			
245	Aréopolis GO	f	brown		41									n	p		80	p	640	p			
246	Aréopolis GO	m	black		44									n	p		640	p	640	p			
247	Aréopolis GO	f	light brown		44									n	p		640	p	640	p			
248	Aréopolis GO	m	black		39									n	p		640	p	80	p			
249	Aréopolis GO	m	brown		37									n	p		640	p	640	p			
250	Aréopolis GO	f	brown		28	y	1	A. n.						n	p		80	p			n		
251	Aréopolis GO	m	brown		35	y	6	A. n.						n	p		640	p	640	p			
252	Aréopolis GO	f	white		27	y	3	A. n.						n	p		80	p	640	p			
253	Aréopolis GO	f	light brown		39	y	1	A. n.						n	p		640	p	640	p			
254	Aréopolis GO	m	white		37	y	3	A. n.						n	p		640	p	640	p			
255	Aréopolis GO	m	white		38	y	1	A. n.						n	p		80	p	80	p			
256	Aréopolis GO	m	brown		39									n	p								
257	Itujubá MG	m	white		39									n	p		640	p	640	p			
258	Itujubá MG	m	brown		36									n	p		80	p	640	p			
259	Itujubá MG	f	white		31	y	3	A. n.						n	p		640	p	640	p			
260	Itujubá MG	f	brown		43	y	1	A. n.						n	p				80	p			











441	Porangatu GO	f	brown	y/139	38	26					n	n		80	p	n	320	p	n
442	Porangatu GO	f	light brown		40						n			80	p		640	p	
443	Porangatu GO	f	brown		47		y				n			80	p		640	p	
444	Porangatu GO	f	white		47						n			640	p		640	p	
445	Porangatu GO	f	brown		46						n			80	p		640	p	
446	Porangatu GO	f	brown		36		y				n			80	p		80	p	
447	Porangatu GO	f	white	y/129	38	33					p	n		640	p		640	p	n
448	Porangatu GO	f	light brown	y/160	48	28					p	n		2Bab./0.025% 1Bab./0.0125%	p		640	p	n
449	Porangatu GO	f	white		33		y				n			640	p		640	p	
450	Porangatu GO	f	brown	y/33	37	32					n	n		320	p		640	p	n
451	Porangatu GO	f	white		35						n			640	p		640	p	
452	Porangatu GO	f	light brown		35		y				n			640	p		640	p	
453	Indiara GO	f	white	y/168	42	36					n	n		640	p		640	p	n
454	Indiara GO	f	light brown	y/169	41	22					n	n		320	p		640	p	n
455	Indiara GO	f	white		42						n			80	p				n
456	Indiara GO	f	grey		41						n			640	p		640	p	
457	Indiara GO	f	brown		54						n			640	p		80	p	
458	Indiara GO	f	brown		34						n			640	p		640	p	
459	Indiara GO	f	grey		39		y				n			640	p		640	p	
460	Indiara GO	f	brown		37						n			80	p	n	80	p	
461	Indiara GO	f	brown		37						n			80	p		640	p	
462	Indiara GO	f	light brown	y/200	45	11	y				n	n		320	p		640	p	n
463	Indiara GO	f	black		40		y				n			80	p		640	p	
464	S.Ant.Da Barra GO	f	brown		38		y				n			640	p				n
465	S.Ant.Da Barra GO	f	brown		38						n			640	p		640	p	
466	S.Ant.Da Barra GO	f	brown		38						n			640	p		80	p	0
467	S.Ant.Da Barra GO	m	white		45						n			80	p		640	p	
468	S.Ant.Da Barra GO	f	brown		50						n			640	p		640	p	
469	S.Ant.Da Barra GO	f	brown	y/160	38	36					n	n		640	p		320	p	n
470	S.Ant.Da Barra GO	f	brown		38						n			80	p		80	p	
471	S.Ant.Da Barra GO	m	white		50						n			320	p		320	p	
472	S.Ant.Da Barra GO	f	white		47						n			320	p		80	p	
473	S.Ant.Da Barra GO	m	brown		36						n			80	p				n
474	S.Ant.Da Barra GO	f	brown	y/120	46	37					n	n		640	p				n
475	S.Ant.Da Barra GO	f	brown		43						n			640	p		80	p	
476	S.Ant.Da Barra GO	f	grey		33						n			320	p				n
477	S.Ant.Da Barra GO	f	brown		28		y				n			80	p		80	p	
478	S.Ant.Da Barra GO	m	white		48						n			640	p		80	p	
479	S.Ant.Da Barra GO	f	white	y/197	42	31					n	n		80	p		80	p	n
480	S.Ant.Da Barra GO	f	black		38						n			80	p		80	p	
481	S.Ant.Da Barra GO	m	grey		45						n			80	p		640	p	
482	S.Ant.Da Barra GO	f	grey		37		y				n			80	p		640	p	
483	S.Ant.Da Barra GO	m	brown		40		y				n			640	p		80	p	
484	S.Ant.Da Barra GO	m	brown		38		y				n			640	p		80	p	
485	S.Ant.Da Barra GO	f	brown		37						n						80	p	



## 10.2 Anhang: Verwendete Materialien

### 10.2.1 Kits, Oligonukleotide, Reagenzien

Wizard® Genomic DNA Purifikation Kit	(Promega Corporation, Madison, USA)
dNTP	(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
Primer: EMA-1r, EMA-1f	(Thermo Electron GmbH, Ulm)
BC48-r, BC48-f	(Thermo Electron GmbH, Ulm)
pJet1-r, pJet1-f	(Fermentas Life Sciences, Leonrot)
HoCytBm-F, HoCytBm-R	(Thermo Electron GmbH, Ulm)
EMA-1R, EMA-1F	(Thermo Electron GmbH, Ulm)
BC48-F, BC48-R1	(Thermo Electron GmbH, Ulm)
Sonden: EMA-1P 50 mM	(Thermo Electron GmbH, Ulm)
BC48-P 50 mM	(Thermo Electron GmbH, Ulm)
HoCytBmp-HEX 50 mM	(Thermo Electron GmbH, Ulm)
Probenauftragspuffer 6xLoading Dye	(Fermentas, Life Sciences, Leonrot)
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	(Fermentas, Life Sciences, Leonrot)
Anti-Pferd-IgG	(Sigma, Taufkirchen)
Ethanol > 99, 8 %	(Roth, Karlsruhe)
Tris 14g/mol	(Roth, Karlsruhe)
(Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan)	
EDTA > 99 %	(Roth, Karlsruhe)
Natriumacetat	(Roth, Karlsruhe)
Natriumchlorid	(Roth, Karlsruhe)
Calciumchlorid	(Roth, Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	(Fluka Chemie AG, Neu Ulm)
Tween® 20	(Roth, Karlsruhe)
Glycerin > 99 %	(Roth, Karlsruhe)
Carbenicillin	(Roth, Karlsruhe)
Roti® garose	(Roth, Karlsruhe)
Ethidiumbromid 10 mg/ml	(Roth, Karlsruhe)
Evans-Blau	(Fluka Chemie AG, Neu Ulm)
LB Agar (Lennox)	(Roth, Karlsruhe)
E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit	(peqLab, Biotechnologie GmbH, Erlangen)
GeneJET PCR Cloning Kit	(Fermentas, Life Sciences, Leonrot)



### 10.3 Anhang: Proben mit unzureichender DNA

48	203	5L
94	270	8L
129	274	17L
132	275f	25L
135	306	
200	327f	


### 10.4 Anhang: Herkunftsdaten der Schlachtpferde

  
 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA  
 SUPERINTENDÊNCIA FEDERAL DE AGRICULTURA EM MINAS GERAIS - SFA/MG  
 SERVIÇO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS AGROPECUÁRIOS - SIPAG/SFA/MG  
 SERVIÇO DE INSPEÇÃO FEDERAL - SIF - 1803

**FICHA DE RASTREABILIDADE DOS ANIMAIS ABATIDOS POR PROPRIETÁRIO E PROCEDÊNCIA**

05 de maio de 2006

ROMANEIO	CURRAL	PROPRIETÁRIO	PROCEDÊNCIA	Nº DAS CARCAÇAS NO ABATE
18732	M 11	JOSÉ MARIA AMORIM	PATOS DE MINAS-MG ✓	05 À 29 (15)
18733	M 12	JOSÉ DE OLIVEIRA SANTOS	IPAMERI-GO ✓	30 À 48 (19)
18737	M 09	ONOR VALÉRIO	S.SEB.DO PARAISO-MG	01,02,49 À 65,157 (17)
18738	M 10	LAURO ANTONIO PRADELA	ITUIUTABA-MG	03-66 À 81-158,159 (16)
18739	M 08	JOSÉ M. VILELA	ARENÓPOLIS-GO ✓	82 À 106
18740	M 07	EMERSON B.SALDANHA	CAMPO-BELO-MG	107 À 133-160
18741	M 05	DANIEL BORGES DORÁZIO	ARAPÓEMA-TO	04-134 À 156

  
 VALMIR TUNALÁ  
 FISCAL FEDERAL AGROPECUÁRIO  
 MÉDICO VETERINÁRIO - CRMV-MG Nº 1054  
 SIF - 1803



## 10.5 Anhang: Sequenz von *T. equi* mit den Primern der konventionellen und der Real – time PCR

AF261824	1	ATGATTTCCAAATCCTTTGCTTTTGTTC-----GCATCCATTGCCATTCGAGCATCC
AB015213	1	ATGATTTCCAAATCCTTTGCTTTTGTTC-----GCATCCATTGCCATTCGAGCATCC
13	1	-----C
108	1	----CATCCGGATGGCTCCGAGTTTTTCAGCAAGATGCATCCATTGCCATTCGAGCATCC
		EMA 1 F
AF261824	56	TGCCTGAGGAGGAGAAACCCAAGGCCTTCTGGAGCTGTCGTCGACTTCCAGTTGGAGTCCA
AB015213	56	TGCCTGAGGAGGAGAAACCCAAGGCCTTCTGGAGCTGTCGTCGACTTCCAGTTGGAGTCCA
13	2	TGCCTGAGGAGGAGAAACCCAAGGCCTTCTGGA-CTGTCGTCGACTTCCAGTTGGAGTCCA
108	57	TGCCTGAGGAGGAGAAACCCAAGGCCTTCTGGAGCTGTCGTCGACTTCCAGTTGGAGTCCA
AF261824	116	TTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTCATGAGG
AB015213	116	TTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTCATGAGG
13	61	TTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTCATGAGG
108	117	TCGACCACATCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTACACTGCTCATGAGG
		EMA 1 f                      EMA 1 p
AF261824	176	GCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACTTGAAGG
AB015213	176	GCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACTTGAAGG
13	121	GCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACTTGAAGG
108	177	GCTTCGCCGTCGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTGACTTGAAGG
AF261824	236	AACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTCGTCATCG
AB015213	236	AACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTCGTCATCG
13	181	AACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTCGTCATC-
108	237	AACATACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATACGTCGTCATCG
		EMA 1 r
AF261824	296	CCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCGAGCTCG
AB015213	296	CCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCGAGCTCG
13	240	CCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCGAGCTCG
108	297	CCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGGGTCGAGCTCG
AF261824	356	AGGTCGCCGAGTTCTACCAGGAGGTCTTGTTC AAGGGCTTCGAGGCCGTCTCCGTTGACT
AB015213	356	AGGTCGCCGAGTTCTACCAGGAGGTCTTGTTC AAGGGCTTCGAGGCCGTCTCCGTTGACT
13	300	AGGTCGCCGAGTTCTACCAGGAGGTCTTGTTC AAGGGCTTCGAGGCCGTCTCCGTTGACT
108	357	AGGTCGCCGAGTTCTACCAGGAGGTCTTGTTC AAGGGCTTCGAGGCCGTCTCCGTTGACT
AF261824	416	TGGCCGCTGCAGTCTCCGACAAGTTACCGAGACCACCTTTGGCTCCGGCAAGAAGCACA
AB015213	416	TGGCCGCTGCAGTCTCCGACAAGTTACCGAGACCACCTTTGGCTCCGGCAAGAAGCACA
13	360	TGGCCGCTGCAGTCTCCGACAAGTTACCGAGACCACCTTTGGCTCCGGCAAGAAGCACA
108	417	TGGCCGCTGCAGTCTCCGACAAGTTACCGAGACCACCTTTGGCTCCGGCAAGAAGCACA
AF261824	476	CCTTCAAGGCTCCAGGCAAGCGCTCCTCAAGGTCGTCGATGGCAAGACTGAGTTGATTG
AB015213	476	CCTTCAAGGCTCCAGGCAAGCGCTCCTCAAGGTCGTCGATGGCAAGACTGAGTTGATTG
13	420	CCTTCAAGGCTCCAGGCAAGCGCTCCTCAAGGTCGTCGATGGCAAGACTGAGTTGATTG
108	477	CCTTCAAGGCTCCAGGCAAGCGCTCCTCAAGGTCGTCGATGGCAAGACTGAGTTGATTG
AF261824	536	ATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGACAACAAGGTTG

AB015213	536	ATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGACAACAAGGTTG
13	480	ATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGACAACAAGGTTG
108	537	ATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGACAACAAGGTTG
AF261824	596	CCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTCTTGAAACTCG
AB015213	596	CCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTCTTGAAACTCG
13	540	CCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTCTTGAAACTCG
108	597	CCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTCTTGAAACTCG
AF261824	656	TTGAAAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTTGCATGGCATCA
AB015213	656	TTGAAAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTTGCATGGCATCA
13	600	TTGAAAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTTGCATGGCATCA
108	657	TTGAAAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTTGCATGGCATCA
AF261824	716	ACAGCACCTTCCCCGCTGACTACAAGGTCGTATACGATGGCTTCTCCGTCTATGGCGCAT
AB015213	716	ACAGCACCTTCCCCGCTGACTACAAGGTCGTATACGATGGCTTCTCCGTCTATGGCGCAT
13	660	ACAGCACCTTCCCCGCTGACTACAAGGTCGTATACGATGGCTTCTCCGTCTATGGCGCAT
108	717	ACAGCACCTTCCCCGCTGACTACAAGGTCGTATACGATGGCTTCTCCGTCTATGGCGCAT
<div style="text-align: right; margin-right: 100px;">EMA 1 R</div>		
AF261824	776	TCTTGGCTGTGCGCCGCAATTGCATTTTCTACTCTATTTTACTAA
AB015213	776	TCTTGGCTGTGCGCCGCAATTGCATTTTCTACTCTATTTTACTAA
13		-----
108	776	GAATA--TGTAGNA-----

## 10.6 Anhang: Sequenz von *B. caballi* mit den Primern der konventionellen und der Real – time PCR

AF092736	1	TATCTTTATACTAATCATATATAGCTGTGCTGTGTATGTTTGTGTCTATACAAGGCACTT
AB017700	1	-----
22a	1	-----
22b	1	-----
AF092736	61	TGTGTAATAGGGTTGTGTCTATTGCCAGATACTGATACTTACAGGCGTGTATCGTACAAT
AB017700	1	-----
22a	1	-----
22b	1	-----
AF092736	121	GAGGTGTTCTGCGAGTTTCGCTTTTCGGCGCCCTCTTGCTTGTAGCAAGGGGTGCCCTGGC
AB017700	1	-----GTGCCCTGGC
22a	1	-----
22b	1	-----
AF092736	181	CGTTTGCCACAACAGCCGTGTTTCCATCATGGCTCCCAGCGACTCTGTGGGCGACGTGAC
AB017700	11	CGTTTGCCACAACAGCCGTGTTTCCATCATGGCTCCCAGCGACTCTGTGGGCGACGTGAC
22a	1	-----ATGGCTCCCAGCGACTCTGTGGGCGACGTGAC
22b	1	-----ATGGCTCCCAGCGACTCTGTGGGCGACGTGAC
<div style="text-align: right; margin-right: 100px;">BC 48F</div>		

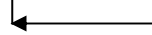
AF092736	241	TAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTATATGATCAA
AB017700	71	TAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTATATGATCAA
22a	33	TAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTATATGATCAA
22b	33	TAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTATATGATCAA
AF092736	301	CAGTGACATGAGCGATTACTTGTCTGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTCAG
AB017700	131	CAGTGACATGAGCGATTACTTGTCTGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTCAG
22a	93	CAGTGACATGAGCGATTACTTGTCTGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTCAG
22b	93	CAGTGACATGAGCGATTACTTGTCTGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTCAG
AF092736	361	TCAGGTCCTAAGGGGAGTAACTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATAACATGAGTCGCTGCCG
AB017700	191	TCAGGTCCTAAGGGGAGTAACTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATAACATGAGTCGCTGCCG
22a	153	TCAGGTCCTAAGGGGAGTAACTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATAACATGAGTCGCTGCCG
22b	153	TCAGGTCCTAAGGGGAGTAACTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATAACATGAGTCGCTGCCG
AF092736	421	TAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAACC
AB017700	251	TAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAACC
22a	213	TAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAACC
22b	213	TAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAACC
AF092736	481	GCTGACCCTTCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGTGA
AB017700	311	GCTGACCCTTCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGTGA
22a	273	GCTGACCCTTCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGTGA
22b	273	GCTGACCCTTCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGTGA
AF092736	541	CGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAGAA
AB017700	371	CGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAGAA
22a	333	CGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAGAA
22b	333	CGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAGAA
AF092736	601	CCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGACGC
AB017700	431	CCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGACGC
22a	393	CCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGACGC
22b	393	CCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGACGC
AF092736	661	GGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGGCCACGCTTTACTA
AB017700	491	GGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGGCCACGCTTTACTA
22a	453	GGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGGCCACGCTTTACTA
22b	453	GGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGGCCACGCTTTACTA
AF092736	721	CAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCCTTTCAC
AB017700	551	CAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCCTTTCAC
22a	513	CAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCCTTTCAC
22b	513	CAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCCTTTCAC
AF092736	781	TACTGGGTTGTTCCGGCTGGGGCATCAAGAGGGCACTTAAGCAGATTATTCGCTCTAACCT
AB017700	611	TACTGGGTTGTTCCGGCTGGGGCATCAAGAGGGCACTTAAGCAGATTATTCGCTCTAACCT
22a	573	TACTGGGTTGTTCCGGCTGGGGCATCAAGAGGGCACTTAAG-----
22b	573	TACTGGGTTGTTCCGGCTGGGGCATCAAGAGGGCACTTAAG-----
AF092736	841	GCCCCTTGACATCGGGACAGAACACAGCGTCAGTCGCTGCAGCACATTACGAGCAGTTA
AB017700	671	GCCCCTTGACATCGGGACAGAACACAGCGTCAGTCGCTGCAGCACATTACGAGCAGTTA
22a		-----
22b		-----

BC 48f

BC 48p

BC 48r

AF092736 901 CAAGGATTACATGGATACGCAGATTCTGCACTGCCCAAGTTTGCGAAGCGTTTCTCCCT  
 AB017700 731 CAAGGATTACATGGATACGCAGATTCTGCACTGCCCAAGTTTGCGAAGCGTTTCTCCCT



22a

22b

AF092736 961 TATGGTAGTGCAGAGGCTGCTGGCCACCGTGGCTGGTTACGTCGACACCCCGTGGTATAA  
 AB017700 791 TATGGTAGTGCAGAGGCTGCTGGCCACCGTGGCTGGTTACGTCGACACCCCGTGGTATAA

BC48-R1

22a

22b

AF092736 1021 GAAGTGGTACATGAAGCTGAAGAAGTTTATGGTGAACAGGGTGTTCATTCTTACAAAGAA  
 AB017700 851 GAAGTGGTACATGAAGCTGAAGAAGTTTATGGTGAACAGGGTGTTCATTCTTACAAAGAA

22a

22b

AF092736 1081 GTTCTTCAATAAGGAAATTCGTGAGCCTAGTAAGGCATTAAAAGAAAAGGTGTCAACCGA  
 AB017700 911 GTTCTTCAATAAGGAAATTCGTGAGCCTAGTAAGGCATTAAAAGAAAAGGTGTCAACCGA

22a

22b

AF092736 1141 CACCAAGGATTTATTTCGAGAACAAAATTGGGCAGGGTACTGTGGACTTCTTCAATAAGGA  
 AB017700 971 CACCAAGGATTTATTTCGAGAACAAAATTGGGCAGGGTACTGTGGACTTCTTCAATAAGGA

22a

22b

AF092736 1201 AATTCGTGACCCTAGTAAGGCATTAAAAGAAAAAGTGTCAAACGACGCCAAGGATTTATT  
 AB017700 1031 AATTCGTGACCCTAGTAAGGCATTAAAAGAAAAAGTGTCAAACGACGCCAAGGATTTATT

22a

22b

AF092736 1261 CGAGAACAAAATTGGGCAGGGTACTGTGGACTTCATCAATAACGAAATTCGTGACCCTAG  
 AB017700 1091 CGAGAACAAAATTGGGCAGGGTACTGTGGACTTCATCAATAACGAAATTCGTGACCCTAG

22a

22b

AF092736 1321 TAAGGCATTAATAAGAAAAGTGTCAACGGGGCCGAGGATTTATTTCGAGAACAAAATTGG  
 AB017700 1151 TAAGGCATTAATAAGAAAAGTGTCAACGGGGCCGAGGATTTATTTCGAGAACAAAATTGG

22a

22b

AF092736 1381 GCAGGGTACTGTGGACTTCATCAATAACGAAATTCGTGACCCTAGTAAGGCATTAATAAG  
 AB017700 1211 GCAGGGTACTGTGGACTTCATCAATAACGAAATTCGTGACCCTAGTAAGGCATTAATAAG

22a

22b

## 10.7 Anhang: *Equus caballus* DNA , entnommen der Genom Datenbank

### DQ297656 mit den Primern der Real – time PCR

```

1      ATGACAAACA TCCGGAAATC TCACCCACTA ATTAAAATCA TCAATCACTC TTTTATTGAC
61     CTACCAGCCC CCTCAAACAT TTCATCATGA TGAAACTTCG GCTCCCTCCT AGGAATCTGC
121    CTAATCCTCC AAATCTTAAC AGGCCTATTC CTAGCCATAC ACTACACATC AGACACGACA
181    ACTGCCTTCT CATCCGTCAC TCACATCTGC CGAGACGTTA ACTACGGATG AATTATTGCG
241    TACCTCCATG CCAACGGAGC ATCAATATTT TTTATCTGCC TCTTCATTCA CGTAGGACGC
301    GGCCCTACT  ACGGCTCTTA CACATTCCTA GAGACATGAA ACATTGGAAT CATCCTACTT
361    TTCACAGTTA TAGCTACAGC ATTCATGGGC TATGTCCTAC CATGAGGCCA AATATCCTTT
421    TGAGGAGCAA CAGTCATCAC AAACCTCCTA TCAGCAATTC CCTACATCGG TACTACCCTC
481    GTCGAGTGAA TCTGAGGTGG ATTCTCAGTA GACAAAGCCA CCCTTACCCG ATTTTTTGCT
541    TTCCACTTCA TCCTACCCTT CATCATCACA GCCCTGGTAG TCGTACATTT ACTATTTCTT
601    CACGAAACAG GATCTAACAA CCCCTCAGGA ATCCCATCCG ATATGGACAA AATCCCATT
661    CACCCATATT ATACAATTAA AGACATCCTA GGACTCCTCC TCCTGATCTT GCTCCTACTA
721    ACTCTAGTAT TATTCTCCCC CGACCTCCTA GGAGACCAG ACAACTACAC CCCAGCTAAC
781    CCTCTCAGCA CTCCCCCTCA TATTAAACCA GAATGGTACT TCCTGTTTGC CTACGCCATC
841    CTACGCTCCA TTCCAACAA ACTAGGCGGC GTATTAGCCC TAATCCTCTC CATCCTGATC

                                     HoCytBm-F
                                     |
901    CTAGCACTCA TCCCACCCT CCACATAATCA AAACAACGAA GCATAATATT CCGGCCTCTC
       |-----|
       HoCytBm-P
961    AGCCAATGCG TATTCTGACT CTTAGTGGCA GACTTACTGA CACTAACATG AATCGGTGGA
       |-----|
       HoCytBm-R
1021   CAGCCAGTGG AACACCCATA CGTAATTATC GGCCAACCTGG CCTCAATCCT CTACTTCTCC
1081   CTAATCTCTA TTTTATAACC ACTCGCAAGC ACCATCGAAA ACAATCTTCT AAAATGAAGA

```

## 10.8 Anhang: Regionaler Sequenzenvergleich von *T. equi*:

201	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
191	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
13	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
23	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
179	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
226	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
182	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
227	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
241	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
218	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
238	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
252	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
266	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
321	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
108a	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
108b	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
113	1	-----AGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
217	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
64	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
325	1	-----	-----	-----	-----
231	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT
301	1	CATCCTCGCCGAGGAGGAGAAACCC	AAGGCCTCTGG	AGCTGTCGTCC	ACTTCCAGTT

201	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
191	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
13	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
23	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
179	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
226	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
182	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
227	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
241	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
218	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
238	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
252	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
266	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
321	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
108a	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
108b	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
113	48	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
217	58	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
64	59	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
325	1	-----	-----AGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
231	60	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG
301	59	GGAGT	CCATTGACCACGTCACCATCGACAAGCAGTCCGAGGAGCACATCGTCTTACACTG

201	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
191	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
13	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
23	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
179	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
226	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
182	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
227	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
241	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
218	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG

238	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
252	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
266	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
321	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
108a	117	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
108b	117	CCCACGAGGGCTTCGCCTGAGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
113	107	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
217	117	CTCATGAGGGCTATGCCTGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
64	118	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
325	31	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
231	119	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
301	119	CTCATGAGGGCTATGCAGTTGAGAAGGTCAAGGAAGGCGACTCCGTCATCAAGACCTTTG
201	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
191	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
13	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
23	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
179	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
226	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
182	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
227	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
241	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
218	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
238	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
252	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
266	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
321	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
108a	177	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
108b	177	ACTTGAA-GGAACAATACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
113	167	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
217	177	ACTTGAA-GGAACAATACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
64	178	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
325	91	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
231	179	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
301	179	ACTTGAA-GGAACAAACCCCAAAGACTGTCGTCAGGCACATCAAGGACAACAAGCCATAC
201	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
191	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
13	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
23	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
179	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
226	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
182	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
227	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
241	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
218	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
238	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
252	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
266	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
321	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
108a	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
108b	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
113	226	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
217	236	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
64	237	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
325	150	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
231	238	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
301	239	GTCGTCATCGCCGTTGAGTCCGCCCTTACCTCGTTCTCAAGAAGGACGGTGATAAGTGG
201	296	GTCGAGCTCGAGGTCGCCGAGTTCTACCAGGAGGTCTTGTTCAAGGGCTTCGAGGCCGTC
191	296	GTCGAGCTCGAGGTCGCCGAGTTCTACCAGGAGGTCTTGTTCAAGGGCTTCGAGGCCGTC
13	296	GTCGAGCTCGAGGTCGCCGAGTTCTACCAGGAGGTCTTGTTCAAGGGCTTCGAGGCCGTC





64 417 AAGAAGCACACCTTCAAGGCTCCAGGCAAGCGCTCCTCAAGGTCGTGATGGCAAGACT  
 325 330 AAGAAGCACACCTTCAAGGCTCCAGGCAAGCGCTCCTCAAGGTCGTGATGGCAAGACT  
 231 418 AAGAAGCACACCTTCAAGGCTCCAGGCAAGCGCTCCTCAAGGTCGTGATGGCAAGACT  
 301 419 AAGAAGCACACCTTCAAGGCTCCAGGCAAGCGCTCCTCAAGGTCGTGATGGCAAGACT

201 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 191 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 13 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 23 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 179 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 226 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 182 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 227 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 241 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 218 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 238 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 252 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 266 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 321 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 108a 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 108b 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 113 466 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 217 476 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 64 477 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 325 390 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 231 478 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC  
 301 479 GAGTTGATTGATGGTGACAACGAAGTTGTTCTCGACCTTGAGCTCTTTGTTTCCGGTGAC

201 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTACTCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 191 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTACTCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 13 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 23 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 179 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 226 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 182 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 227 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 241 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTACTCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 218 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 238 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 252 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 266 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 321 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 108a 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 108b 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTACTCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 113 526 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTACTCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 217 536 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTACTCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 64 537 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 325 450 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 231 538 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC  
 301 539 AACAAAGGTTGCCAGAGTTGTTTATCTCTACAAGGGCGATGGCAGAATCAAGGAAATCTTC

201 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 191 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 13 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 23 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 179 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 226 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 182 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 227 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 241 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT

218 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 238 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 252 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 266 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 321 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 108a 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 108b 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 113 586 TTGAAACTCGTTGAGAAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 217 596 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 64 597 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 325 510 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 231 598 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT  
 301 599 TTGAAACTCGTTGA-AAAGGCCTGGAAGAGAGTTGAGGTCAAGGATGCCGCCGAGACTTT

201 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CA-----  
 191 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 13 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 23 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 179 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 226 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 182 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-----  
 227 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 241 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 218 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 238 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 252 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 266 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 321 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 108a 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 108b 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 113 646 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 217 655 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 64 656 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTATCAGGTCGATACGATG  
 325 569 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 231 657 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG  
 301 658 -GCATGGCATCAACAGCACCTTCCCCGCTGACTA-CAAGGTCGTATACGATG

## 10.9 Anhang: Regionaler Sequenzenvergleich von *B. caballi*

60 1 CTAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTCTATAATC  
 22 1 CTAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTCTATAATC  
 36 1 CTAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTCTATAATC  
 6 1 CTAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTCTATAATC  
 454 1 CTAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTCTATAATC  
 254 1 CTAAGACCTTATTGGCTGCCAGCGAAAAGTGTGGACTCAGCTGCCAATGCCTCTATAATC

60 61 AACAGAGACATGAGCGCTTACTTGTGCGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTGC  
 22 61 AACAGAGACATGAGCGCTTACTTGTGCGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTGC  
 36 61 AACAGAGACATGAGCGCTTACTTGTGCGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTGC  
 6 61 AACAGAGACATGAGCGCTTACTTGTGCGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTGC  
 454 61 AACAGAGACATGAGCGCTTACTTGTGCGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTGC  
 254 61 AACAGAGACATGAGCGCTTACTTGTGCGGCTGTGTCTGACAACTTCGCCGAGCGCATTTGC

60 121 AGTCAGGTCCCTAAGGAGAGTAAGTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATAACATGAGTCGCTGC  
 22 121 AGTCAGGTCCCTAAGGAGAGTAAGTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATAACATGAGTCGCTGC  
 36 121 AGTCAGGTCCCTAAGGAGAGTAAGTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATAACATGAGTCGCTGC  
 6 121 AGTCAGGTCCCTAAGGAGAGTAAGTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATAACATGAGTCGCTGC

454 121 AGTCAGGTCCCTAAGGAGAGTAACTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATACATGAGTCGCTGC  
254 121 AGTCAGGTCCCTAAGGAGAGTAACTGCAGTGCTTCCGTTAGCGCATACATGAGTCGCTGC

60 181 GCTAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAA  
22 181 GCTAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAA  
36 181 GCTAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAA  
6 181 GCTAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAA  
454 181 GCTAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAA  
254 181 GCTAAACAGGACTGCCTGACTCTCCAAAGTCTTAAGTACCCTCTTGAGGCTAAGTACCAA

60 241 CCGCTGACCCTTCCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGT  
22 241 CCGCTGACCCTTCCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGT  
36 241 CCGCTGACCCTTCCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGT  
6 241 CCGCTGACCCTTCCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGT  
454 241 CCGCTGACCCTTCCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGT  
254 241 CCGCTGACCCTTCCTGACCCCTACCAGTTGGAGGCCGCTTTTATACTCTTCAAGGAGAGT

60 301 GACGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAG  
22 301 GACGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAG  
36 301 GACGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAG  
6 301 GACGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAG  
454 301 GACGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAG  
254 301 GACGCTAATCCGGCCAATAGCACTGAGAAGCGCTTCTGGATGCGTTTCAGAAGGGGCAAG

60 361 AACCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGAC  
22 361 AACCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGAC  
36 361 AACCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGAC  
6 361 AACCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGAC  
454 361 AACCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGAC  
254 361 AACCACAGTTACTTCCACGACTTAGTCTTCAATCTGCTGGAGAAGAACGTGACTCGCGAC

60 421 GCGGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGACCACGCTTTAC  
22 421 GCGGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGACCACGCTTTAC  
36 421 GCGGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGACCACGCTTTAC  
6 421 GCGGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGACCACGCTTTAC  
454 421 GCGGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGACCACGCTTTAC  
254 421 GCGGATGCTACTGACATTGAGAACTTTGCGTCCAGGTACCTGTACATGACCACGCTTTAC

60 481 TACAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCTTT  
22 481 TACAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCTTT  
36 481 TACAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCTTT  
6 481 TACAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCTTT  
454 481 TACAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCTTT  
254 481 TACAAGACGTACACGAATGTTGATGAGTTCGGTGCTAGCTTCTTTAACAAGTTGTCTTT

### 10.10 Anhang: Reaktionsansatz der Multiplex Real-time PCR für *B. caballi* und *T. equi*

Substanz	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest.		
PCR 10 x Puffer	2,5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	4,5 µl	4,5 mM
EMA1r, 100 µM	0,225 µl	0,45 µM
EMA1f, 100 µM	0,225 µl	0,45 µM
EMA1p, 50 µM	0,06 µl	0,06 µM
BC 48r, 100µM	0,225 µl	0,45 µM
BC 48f, 100 µM	0,225 µl	0,45 µM
BC 48p, 50µM	0,06 µl	0,06 µM
dNTPs, 10 mM	0,5 µl	0,5 mM
Hot Star Taq Polymerase, 5 U/µl	0,25 µl	1,25 U/Ansatz
DNA	5 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

### 10.11 Anhang: Reaktionsansatz der konventionellen PCR für *B.caballi* und *T. equi*

Substanz	Volumen	Endkonzentration
Aqua dest.	36,5 µl	
PCR 10 x Puffer	5 µl	1 x
Forward Primer, 15 µM	1 µl	3,75 pmol
Reverse Primer, 15 µM	1 µl	3,75 pmol
dNTP's, 10 mM	1 µl	0,2 mM
HotStarTaq Polymerase 5 U/µl	0,5 µl	2,5 U/Ansatz
DNA	5 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

## 10.12 Anhang: Berechnung der Molekülanzahl am Beispiel des „supercoil“ Plasmids von *T.equi*

### Berechnung der Molekülanzahl und Ansatz der Verdünnungsreihe am Beispiel von *Theileria equi*

1  $\mu$ g of 1000 bp DNA = 1,52 pmol =  $9,1 \times 10^{11}$  molecules (Biolab Katalog, Frankfurt)

3128 bp Vektor (Bakterienplasmid)  
+ 744 bp Insert (EMA 1) und Primer = 3872 bp











$9,1 \times 10^{11}$  Mol x 3,872 bp =  $2,35 \times 10^{11}$  Mol in 1  $\mu$ l  
oder  $2,35 \times 10^8$  Mol in 1 ng

Durchschnittswert der „supercoil“ mit  
NanoDrop: 138,77 ng/ $\mu$ l

Durchschnittswert der linearisierten  
Form mit Nano Drop: 14,3 ng/ $\mu$ l

→ 138,77 ng/ $\mu$ l x  $2,35 \times 10^8$  Mol =  $3,25 \times 10^{10}$  Mol/ $\mu$ l  
→ 14,3 ng/ $\mu$ l x  $2,35 \times 10^8$  Mol =  $3,4 \times 10^9$  Mol/ $\mu$ l

### Verdünnungsreihe (Ansatz) am Beispiel des linearisierten Plasmids:

Molekülanzahl:	Pipettierte Menge:		Puffer:
a) $3,4 \times 10^9$ Mol/ $\mu$ l	Gespaltenes Plasmid:		
↓	20 $\mu$ l von a)		13,8 $\mu$ l TE
b) $2 \times 10^9$ Mol/ $\mu$ l	10 $\mu$ l von b)		990 $\mu$ l TE
↓	10 $\mu$ l von c)		990 $\mu$ l TE
c) $2 \times 10^7$ Mol/ $\mu$ l	100 $\mu$ l von d)		900 $\mu$ l TE
↓	100 $\mu$ l von e)		900 $\mu$ l TE
d) $2 \times 10^5$ Mol/ $\mu$ l	100 $\mu$ l von f)		900 $\mu$ l TE
↓	100 $\mu$ l von g)		900 $\mu$ l TE
e) $2 \times 10^4$ Mol/ $\mu$ l	100 $\mu$ l von h)		900 $\mu$ l TE
↓	100 $\mu$ l von i)		900 $\mu$ l TE
f) $2 \times 10^3$ Mol/ $\mu$ l	100 $\mu$ l von j)		900 $\mu$ l TE
↓			
g) $2 \times 10^2$ Mol/ $\mu$ l			
↓			
h) $2 \times 10^1$ Mol/ $\mu$ l			
↓			
i) $2 \times 10^0$ Mol/ $\mu$ l			
↓			
j) $2 \times 10^{-1}$ Mol/ $\mu$ l			

1. Verdünnung: 100 000 Moleküle in 5  $\mu$ l

2. Verdünnung: 10 000 Moleküle in 5  $\mu$ l

3. Verdünnung: 1000 Moleküle in 5  $\mu$ l

4. Verdünnung: 100 Moleküle in 5  $\mu$ l

5. Verdünnung: 10 Moleküle in 5  $\mu$ l

6. Verdünnung: 1 Molekül in 5  $\mu$ l

## 10.13 Anhang: Statistische Tabellen

### 10.13.1 Positiver Blutausstrich und Hämatokrit

Tabelle 5: Statistische Auswertung mittels Qui-Quadrat-Test von Hämatokrit und Blutausstrich

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	.044(a)	2	.978
Likelihood-Quotient	.042	2	.979
Zusammenhang linear-mit-linear	.024	1	.877
Anzahl der gültigen Fälle	468		

### 10.13.2 PCR Prävalenz *T. equi* und niedriger Hämatokrit

Tabelle 6: Statistische Auswertung mittels Qui-Quadrat-Test von *T. equi* PCR Prävalenz und niedrigem Hämatokrit

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1.788(a)	2	.409
Likelihood-Quotient	1.742	2	.419
Zusammenhang linear-mit-linear	.951	1	.330
Anzahl der gültigen Fälle	459		

### 10.13.3 PCR Prävalenz für *B. caballi* bei einem niedrigen Hämatokritwert

Tabelle 7: Statistische Auswertung mittels Qui-Quadrat-Test von *B. caballi* PCR Prävalenz und niedrigem Hämatokrit

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	.278(a)	2	.870
Likelihood-Quotient	.303	2	.859
Zusammenhang linear-mit-linear	.116	1	.734
Anzahl der gültigen Fälle	459		

### 10.13.4 Vorkommen von Doppelinfektionen von *B. caballi* und *T. equi* in der Real-time PCR

Tabelle 8: Statistische Auswertung mittels Qui- Quadrat-Test von PCR Prävalenz und Doppelinfektionen

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2.345(b)	1	.126		
Kontinuitätskorrektur	1.922	1	.166		
Likelihood-Quotient	2.419	1	.120		
Exakter Test nach Fisher				.148	.081
Zusammenhang linear-mit-linear	2.340	1	.126		
Anzahl der gültigen Fälle	463				

### 10.13.5 Zwei Stichproben T-Test für *T. equi*

Tabelle 9: Statistische Auswertung von positivem Blutaussstrich und frühem PCR Zyklus für *T. equi*

	Ausstrich	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Zyklus pos <i>T. equi</i>	1	27	31,370	3,8280	,7367
	0	282	32,767	3,4354	,2046

Tabelle 10: Zwei Stichproben T-Test für positiven Blutaussstrich und frühen PCR Zyklus für *T. equi*

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Zyklus pos. <i>T. equi</i>	Varianzen sind gleich	1,46	0,228	-1,997	307	0,047	-1,3963	0,6991	-2,772	-0,0206
	Varianzen sind nicht gleich			-1,826	30,15	0,078	-1,3963	0,7646	-2,9575	0,1649

### 10.13.6 Zwei Stichproben T-Test für *B. caballi*

Tabelle 11: Statistische Auswertung von positivem Blutausstrich und frühem PCR Zyklus für *B. caballi*

	Ausstrich	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Zyklus pos <i>B. caballi</i>	1	8	30,50	5,197	1,838
	0	57	31,48	3,902	,517

Tabelle 12: Zwei Stichproben T-Test für positiven Blutausstrich und frühen PCR Zyklus für *B. caballi*

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
Zyklus pos <i>B. cab</i>	Varianzen sind gleich	0,127	0,723	-0,636	63	0,527	-0,977	1,535	-4,045	2,091
	Varianzen sind nicht gleich			-0,512	8,145	0,622	-0,977	1,909	-5,365	3,411



### 10.14 Anhang: Prozentuales Aufkommen der Zecken bezogen auf die Region

Region	Ges. Zahl der gesammelten Zecken	<i>Anocentor nitens</i> in [%]	<i>Boophilus microplus</i> in [%]	<i>Amblyomma cajennense</i> in [%]
Uberlandia	8	75	25	-
Janauba	25	88	4	8
Guaxupé	33	90,1	6	3
Montes Claros	25	100	-	-
Jaiba	83	100	-	-
Correntina	4	100	-	-
Caetité	16	100	-	-
Itaju do Colonia	22	59,1	9,0	31,8
Corumbaiba	21	100	-	-
S. Ant. Da Barra	54	87	9,2	3,7
Sao Domingos	5	100	-	-
Patos de Minas	17	100	-	-
Ipameri	55	100	-	-
S. Seb. Do Paraiso	62	96,8	1,6	1,6
Ituitutaba	17	100	-	-
Arénopolis	35	100	-	-
Itujuba	23	100	-	-

### 10.15 Anhang: Zyklenzahl der über die Real-time PCR positiven Ergebnisse

Probe	Ausstrich	Zyklus pos <i>equi</i>	Zyklus pos <i>cab</i>				
13	pos.	36,3	neg.	42	neg.	32,1	neg.
68	pos.	30,1	neg.	44	neg.	32,1	neg.
108	pos.	24,8	32,1	46	neg.	28,5	neg.
138	pos.	27,5	neg.	50	neg.	35,4	neg.
140	pos.	31,6	neg.	53	neg.	32,1	neg.
147	pos.	32,1	neg.	54	neg.	32,4	neg.
201	pos.	27,6	32,3	56	neg.	30,4	neg.
220	pos.	34,4	neg.	58	neg.	35,7	neg.
221	pos.	0	neg.	59	neg.	32	neg.
223	pos.	35,5	neg.	60	neg.	35,8	29,7
257	pos.	0	19,1	62	neg.	36,6	neg.
271	pos.	35	neg.	63	neg.	35,4	neg.
282	pos.	33,7	neg.	68	neg.	34	neg.
284	pos.	0	neg.	69	neg.	39	27,7
286	pos.	37,3	neg.	70	neg.	33	32,3
288	pos.	30,9	neg.	71	neg.	33,8	neg.
297	pos.	27,3	neg.	73	neg.	35,9	neg.
299	pos.	26,3	neg.	74	neg.	39	neg.
303	pos.	0	neg.	75	neg.	34,5	neg.
311	pos.	26,9	neg.	79	neg.	34	neg.
323	pos.	27,9	28,9	80	neg.	35,1	neg.
324	pos.	31,5	neg.	82	neg.	33,7	neg.
348	pos.	0	36	84	neg.	39	neg.
451	pos.	38,3	neg.	86	neg.	28	neg.
376	pos.	27,7	neg.	87	neg.	34,8	neg.
386	pos.	26,6	30	88	neg.	32	neg.
397	pos.	28,9	neg.	90	neg.	31,5	neg.
400	pos.	32,3	neg.	92	neg.	31,5	neg.
413	pos.	0	30,6	95	neg.	32,1	neg.
425	pos.	32,4	35	96	neg.	33,3	neg.
439	pos.	34,9	neg.	98	neg.	31,6	neg.
447	pos.	33,6	neg.	99	neg.	36,2	neg.
448	pos.	35,6	neg.	100	neg.	32,8	neg.
1	neg.	31,5	31,7	101	neg.	39	neg.
6	neg.	28,7	24,9	102	neg.	28,1	neg.
7	neg.	32,6	27,5	104	neg.	29,8	neg.
13	neg.	36,9	neg.	105	neg.	28,1	30
17	neg.	34,1	28,2	106	neg.	31,8	neg.
18	neg.	38,4	neg.	107	neg.	33,2	neg.
20	neg.	36,3	neg.	108	neg.	24,8	32,1
21	neg.	36,1	neg.	109	neg.	34,6	neg.
25	neg.	31,6	neg.	110	neg.	26,5	neg.
26	neg.	36	neg.	111	neg.	30,6	neg.
27	neg.	35,9	neg.	112	neg.	31,1	neg.
29	neg.	31,9	neg.	113	neg.	30,8	neg.
31	neg.	35,1	neg.	114	neg.	31,1	33,6
32	neg.	39	neg.	115	neg.	31,9	neg.
33	neg.	31,6	neg.	117	neg.	30	neg.
39	neg.	33	neg.	118	neg.	25,8	neg.
				120	neg.	34,9	neg.
				121	neg.	36,5	neg.

122	neg.	35,6	neg.	243	neg.	24,9	35,2
123	neg.	35,8	neg.	244	neg.	32	34,7
126	neg.	29,6	neg.	246	neg.	32,2	neg.
128	neg.	29,9	neg.	247	neg.	28,7	30,7
130	neg.	29,2	neg.	250	neg.	35,3	neg.
131	neg.	34,6	33,7	252	neg.	27,2	neg.
133	neg.	34,6	neg.	266	neg.	35,9	neg.
136	neg.	32,7	neg.	269	neg.	35,9	neg.
137	neg.	34	neg.	271	neg.	39	neg.
138	neg.	30	neg.	272	neg.	29,8	neg.
140	neg.	31,7	neg.	277	neg.	39	neg.
141	neg.	32,9	neg.	280	neg.	32,5	neg.
142	neg.	33,5	neg.	281	neg.	32,4	neg.
143	neg.	35,1	neg.	282	neg.	34	neg.
145	neg.	33,3	neg.	283	neg.	39	neg.
146	neg.	33	neg.	285	neg.	39	neg.
150	neg.	31,7	neg.	286	neg.	38	neg.
153	neg.	29,8	neg.	288	neg.	39	neg.
158	neg.	32,3	34,5	289	neg.	34,7	neg.
159	neg.	30,8	neg.	290	neg.	36,1	neg.
160	neg.	30	neg.	291	neg.	28,2	neg.
163	neg.	33,4	33,4	292	neg.	33	neg.
166	neg.	33,1	neg.	296	neg.	38,2	neg.
173	neg.	35,7	neg.	297	neg.	27,2	neg.
179	neg.	30,9	neg.	299	neg.	29,8	neg.
181	neg.	31,1	neg.	300	neg.	29,5	33,4
182	neg.	30,6	neg.	302	neg.	39	neg.
183	neg.	39	neg.	304	neg.	32,1	neg.
185	neg.	27,1	30,9	305	neg.	36,6	neg.
186	neg.	37,3	neg.	308	neg.	26,6	neg.
191	neg.	30,9	neg.	310	neg.	24,8	neg.
195	neg.	31,9	neg.	311	neg.	26,8	neg.
198	neg.	31,4	neg.	315	neg.	32,5	neg.
201	neg.	27	31,8	316	neg.	38,1	neg.
204	neg.	38,7	neg.	317	neg.	29	35,2
205	neg.	35,7	neg.	318	neg.	28,4	neg.
207	neg.	32,9	neg.	319	neg.	34,1	neg.
209	neg.	37,4	neg.	320	neg.	31,9	neg.
211	neg.	35,1	neg.	321	neg.	36,2	neg.
212	neg.	30,6	neg.	322	neg.	32,3	neg.
216	neg.	39	neg.	323	neg.	26,2	28,5
218	neg.	39	neg.	324	neg.	31,5	neg.
219	neg.	34,1	neg.	325	neg.	24,7	26,7
220	neg.	34,1	neg.	326	neg.	29,3	neg.
223	neg.	35,5	neg.	329	neg.	34,4	neg.
224	neg.	32,7	neg.	330	neg.	35,7	37
225	neg.	34,2	neg.	331	neg.	37	32,1
226	neg.	28,1	neg.	332	neg.	32,7	neg.
227	neg.	29,6	neg.	333	neg.	37,3	neg.
230	neg.	39	neg.	334	neg.	35,5	neg.
232	neg.	34,1	neg.	335	neg.	39	33,4
237	neg.	28	neg.	336	neg.	39	neg.
238	neg.	35,3	neg.	337	neg.	33,6	27,5
240	neg.	33,7	neg.	338	neg.	31,3	neg.
241	neg.	35,4	neg.	340	neg.	35,8	neg.
242	neg.	33,2	31,5	341	neg.	34,8	neg.

342	neg.	37	neg.	430	neg.	32,7	neg.
343	neg.	30,8	33,8	432	neg.	32,7	neg.
344	neg.	34	neg.	433	neg.	27	neg.
349	neg.	30,6	neg.	434	neg.	26,7	neg.
350	neg.	33,2	neg.	435	neg.	27,6	neg.
351	neg.	39	neg.	436	neg.	35,1	neg.
353	neg.	35,3	neg.	437	neg.	32,6	neg.
354	neg.	33	neg.	439	neg.	35	neg.
358	neg.	30	neg.	440	neg.	30,9	neg.
360	neg.	37	neg.	441	neg.	32,4	37,1
361	neg.	35,6	neg.	443	neg.	27,8	neg.
362	neg.	37	neg.	444	neg.	32	32,2
363	neg.	35,6	neg.	445	neg.	26,8	37
364	neg.	34,9	neg.	446	neg.	33,8	neg.
365	neg.	36,2	neg.	447	neg.	33,7	neg.
366	neg.	36,2	neg.	447	neg.	36	neg.
367	neg.	35,9	neg.	451	neg.	39	neg.
368	neg.	35,7	neg.	454	neg.	26,3	26,2
369	neg.	35,9	neg.	456	neg.	26,1	neg.
370	neg.	31,8	31,7	457	neg.	31,1	neg.
374	neg.	30,7	neg.	458	neg.	32,3	neg.
375	neg.	30,8	neg.	459	neg.	34,1	neg.
376	neg.	27,7	neg.	460	neg.	29,6	neg.
377	neg.	30,6	neg.	461	neg.	33,4	neg.
379	neg.	32,6	neg.	462	neg.	27,7	neg.
381	neg.	35,1	33,8	463	neg.	31,3	neg.
383	neg.	33,6	neg.	464	neg.	31,7	neg.
386	neg.	26,6	30	465	neg.	36,2	neg.
387	neg.	33,8	neg.	466	neg.	33,3	neg.
388	neg.	30,8	neg.	468	neg.	31,2	neg.
390	neg.	32,9	neg.	469	neg.	28,4	29
391	neg.	30,1	neg.	470	neg.	32	neg.
392	neg.	30,2	neg.	471	neg.	31,8	neg.
395	neg.	27	33,2	472	neg.	28,5	neg.
397	neg.	28,9	neg.	473	neg.	34,4	neg.
398	neg.	34,6	neg.	474	neg.	31,5	neg.
400	neg.	32,3	neg.	475	neg.	31,8	neg.
401	neg.	33,5	neg.	476	neg.	32,2	neg.
402	neg.	30,1	neg.	477	neg.	32,2	neg.
404	neg.	29,9	31,9	478	neg.	31	neg.
408	neg.	34,1	neg.	479	neg.	31,5	neg.
411	neg.	39	neg.	480	neg.	31,4	neg.
414	neg.	26	neg.	481	neg.	28,8	neg.
415	neg.	33,5	neg.	482	neg.	32,1	neg.
417	neg.	36,5	neg.	484	neg.	30,7	neg.
418	neg.	28,2	neg.	486	neg.	34	neg.
419	neg.	39	36,3	146	neg.	26,2	neg.
420	neg.	30,8	neg.	30	neg.	neg.	30,9
421	neg.	34,2	neg.	36	neg.	neg.	23
422	neg.	33,5	neg.	64	neg.	neg.	37
423	neg.	31,8	neg.	77	neg.	neg.	33,4
424	neg.	31	neg.	180	neg.	neg.	30,9
425	neg.	33	35,5	222	neg.	neg.	29,7
427	neg.	29,9	neg.	257	neg.	neg.	19,3
428	neg.	29,2	neg.	258	neg.	neg.	37
429	neg.	27,2	neg.	265	neg.	neg.	35

295	neg.	neg.	25,6
348	neg.	neg.	36
356	neg.	neg.	32,9
373	neg.	neg.	27,9
394	neg.	neg.	33
410	neg.	neg.	34

413	neg.	neg.	30,6
431	neg.	neg.	22,4

## 11 Danksagung

Ich möchte allen danken, die das Zustandekommen und Fertigstellen dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Jörg Hirzmann für die allzeit gewährte, geduldige und hilfreiche Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung der Arbeiten im Labor.

Für die Bereitstellung und Vergabe des Dissertationsthemas, die Bereitstellung der Einrichtungen, die Organisation zum Sammeln der Proben, die Hilfestellung bei der Publikation und die angenehme Zusammenarbeit geht ein besonders herzliches Dankeschön an Frau Prof. Dr. med. vet. Lygia Maria Friche Passos.

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 ein Dank für die Unterstützung der praktischen Durchführung.

Ganz besonders möchte ich hierbei Frau Prof. Dagmar Deniz Cabral aus Überlandia hervorheben, für die Hilfeleistung bei der Sammlung meiner Proben am Schlachthof und für den Transport von Überlandia nach Araquari, Ricardo Caneso Dalla Rosa der mir bei der Durchführung des IFAT mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, Ana-Paula Ferreira für das „Auseinanderklamüsern“ und Bestimmen aller meiner Zecken, Camilla Valgas de Bastos für die Unterstützung bei der DNA Extraktion und Livio Marins Costa Júnior für die Unterbringung und das Management aller organisatorischer Dinge.

Ich wurde auf sehr nette und freundliche Art an Ihren Instituten aufgenommen und habe mich dort sehr wohl gefühlt.

Ich bedanke mich recht herzlich bei Herrn Prof. Kurt Pfister für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in München, für die konstruktive Korrektur und die ständige Diskussionsbereitschaft bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) und dem brasilianischen Partner CAPES ein Dank, ohne deren finanzielle Förderung der Brasilienaufenthalt gar nicht möglich gewesen wäre.

Ein Dankeschön an Denise Güthlin vom „Statistischen Beratungslabor des Instituts für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München“ für die statistische Auswertung meiner Ergebnisse.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Ludwig-Maximilians-Universität München- ein Dank für die „seelische und moralische Unterstützung in guten wie in schlechten Zeiten“, für die gute Laune, die tolle Arbeitsatmosphäre und Kollegialität. Hierbei geht ein besonderes Dankeschön an Frau

Vachenauer, die lange vor Beginn der Arbeit all meine Anrufe entgegennahm und mich motivierte weiterhin an ein Zustandekommen dieses Projektes zu glauben. Danke an Cornelia Silaghi, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und die vielen „Schwätzchen“ die mein Leben hier erheiterten. Danke an Heidrun Schöl, für das Fotografieren der gesammelten Zecken, die somit auch ins Archiv des Institutes eingegangen sind.

Ein besonderer Dank an Gabriele Troll und Christiane Arsulic, die sich als strenge aber sehr hilfreiche „Erstkorrektoren“ durchgesetzt haben.

Ein ganz persönlicher Dank, geht an Sebastian ohne dessen unermüdliche Unterstützung, Geduld und Nachsicht, die vielen Telefonate nach Brasilien, die Behebung all meiner computertechnischen Probleme und der Glaube, dass ich es schaffen werde, diese Arbeit nie fertig geworden wäre.

Ein ebenso großes Dankeschön meiner Familie und Freunden, die immer an mich geglaubt und immer für mich da waren.







édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5251-X



Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

9 783835 195251 5

