

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

Vorstand: Prof. Dr. Kurt Pfister

Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Untersuchungen zur Piroplasmose bei Hauskatzen in Südafrika

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Stephanie Würth
aus Balingen

München 2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referentin: Priv.-Doz. Dr. M. Rinder
Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. K. Hartmann

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
A. Allgemeines zu den Piroplasmen	3
B. Babesien bei Feliden	5
1. Allgemeines	5
2. <i>Babesia felis</i>	6
3. <i>Babesia cati</i>	7
4. <i>Babesia pantherae</i>	7
5. <i>Babesia herpailuri</i>	8
6. <i>Babesia leo</i>	9
7. <i>Cytauxzoon felis</i>	9
8. Feline Babesien ohne eindeutige Artenzuordnung	11
8.1 Fälle außerhalb Europas	11
8.2 Feline Babesiose in Europa	12
8.2.1 Zwei Fälle in Frankreich	12
8.2.2 Ein Fall in Deutschland	13
8.2.3 Fälle in Spanien und Portugal	14
9. Babesieninfektionen bei Hauskatzen in Südafrika	16
9.1 Allgemeines	16
9.2 Ätiologie und Epidemiologie	17
9.3 Klinik	18
9.4 Diagnostik	19
9.5 Therapie	19

	Seite
C Real-time PCR als diagnostische Methode	21
1. Prinzip der Real-time PCR	21
2. Real-time PCR – Sonden	22
2.1 TaqMan-Sonden	22
2.2 Molecular Beacons	23
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	25
A Material und Methoden	25
1. Untersuchungsgebiet	25
2. Studientiere und statistische Datenanalyse	25
3. Gewinnung der Blutproben für die molekularbiologische Untersuchung und Serologie	29
4. Herstellung eines Blutausstriches und lichtmikroskopische Untersuchung	29
5. Molekularbiologische Untersuchungen	30
5.1 DNA-Extraktion	30
5.2 Charakterisierung der 18S rDNA-Sequenz der Babesien zur molekularbiologischen Artdiagnose	31
5.2.1 Auswahl der Proben	31
5.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
5.2.3 Agarosegel-Elektrophorese	32
5.2.4 Reinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte	33
5.2.5 Sequenzanalyse	34
5.3 Untersuchung des ITS-Genabschnittes der Babesien zur genotypischen Analyse der Artvariation	35
5.3.1 Auswahl der Proben	35
5.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	35

	Seite
5.3.3	Agarosegel-Elektrophorese 36
5.3.4	Reinigung der PCR-Produkte und Verdau mit Restriktions- endonukleasen 36
5.3.5	Vektorherstellung 38
5.3.6	Ligation 39
5.3.7	Herstellung elektrokompetenter Zellen 39
5.3.8	Elektroporation und Selektion rekombinanter Klone 40
5.3.9	Plasmidpräparation und –analyse 41
5.3.10	Reinigung von Plasmid-DNA durch Silikamembran-Adsorption 42
5.3.11	Sequenzierung der klonierten rekombinanten Plasmide 42
5.3.12	Vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Sequenzierungsprodukte 44
5.3.13	Sequenzanalyse 45
5.4	Real-time PCR 45
5.4.1	Auswahl des Zielgens 45
5.4.2	Primer- und Sondenkonstruktion 45
5.4.3	PCR und Sondenhybridisierung 46
5.4.4	Validierung der Real-time PCR 48
5.4.4.1	Berechnung von Spezifität und Sensitivität 49
5.4.4.2	Berechnung der Nachweisgrenze 50
6.	Serologische Untersuchung – Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest 51
7.	Vergleich der verschiedenen Untersuchungsmethoden 52
B	Ergebnisse 53
1.	Studientiere und Ergebnisse der statistischen Datenanalyse 53
2.	Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung der Blutaussstriche 54
3.	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung 59
3.1	Molekularbiologische Artdiagnose durch 18S-rDNA- Sequenzanalyse 59
3.1.1	Intraspezifische Variation der 18S-rDNA bei <i>B. felis</i> – Isolaten 60
3.1.2	Interspezifische Variationen der 18S-rDNA 61

	Seite
3.2 Genotypische Analyse der Artvariation durch ITS-rDNA-Sequenzanalyse	64
3.2.1 Sequenzvergleich und genetische Variation der rDNA der gesamten ITS-Region	64
3.2.1.1 Intraspezifische Variation der ITS-rDNA bei <i>B. felis</i> – Isolaten	65
3.2.1.2 Interspezifische Variation der ITS-rDNA	67
3.2.2 Sequenzvergleich und genetische Variation der rDNA eines 282 bp großen, klonierten Fragments der ITS-1-Region	69
3.2.2.1 Intra-Isolat Variation des klonierten Fragments	69
3.2.2.2 Intraspezifische Variation des klonierten Fragments	71
3.2.2.3 Interspezifische Variation des klonierten Fragments	72
3.3 Real-time PCR	74
3.3.1 Optimierung der PCR-Parameter	74
3.3.1.1 Annealing-Temperatur und MgCl ₂ -Konzentration	74
3.3.1.2 Sondenkonzentration	74
3.3.2 Untersuchung der Katzenblutproben mit der entwickelten Real-time PCR	75
3.3.3 Validierung des entwickelten Nachweisverfahrens	78
3.3.3.1 Spezifität und Sensitivität der entwickelten Real-time PCR	78
3.3.3.2 Nachweisgrenze der entwickelten Real-time PCR	78
4. Ergebnisse der serologischen Untersuchung – Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT)	81
5. Vergleich der verschiedenen Untersuchungsmethoden	83
D Diskussion	85
1. Artenvorkommen feliner Babesien im Untersuchungsgebiet	85
2. Entwicklung und Validierung einer Real-time PCR zum spezifischen Nachweis von <i>B. felis</i>	94
3. Vergleich der angewandten Untersuchungsmethoden	97
4. Vorkommen feliner Babesiose in Port Elizabeth, Südafrika	98

	Seite
IV. ZUSAMMENFASSUNG	101
V. SUMMARY	104
VI. LITERATURVERZEICHNIS	107
VII. ABKÜRZUNGEN	119
VIII. ANHANG	121
Anhang A - 18S-rDNA-Sequenzen	121
Anhang B - ITS-rDNA-Sequenzen	130
Anhang C - rDNA-Sequenz des klonierten Fragments bei dem Isolat K60	134
rDNA-Sequenz des klonierten Fragments bei verschiedenen Isolaten	136
Anhang D - Tabelle Vergleich der Nachweismethoden	137
Tabelle Pateintendaten	138
IX. DANKSAGUNGEN	143

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Infektionen mit Piroplasmen bei Haus- und Wildfeliden wurden bisher in Afrika, Asien, Amerika und in Europa, auch in Deutschland, beschrieben (Moik und Gothe, 1997, Wagner, 1975, 1976). Derzeit werden 6 Arten unterschieden, und zwar 4 morphologisch „kleine“ Spezies, *Babesia felis*, *Babesia cati*, *Babesia leo* und *Cytauxzoon felis* sowie 2 „große“ Arten, *Babesia pantherae* und *Babesia herpailuri*. Die Taxonomie der Katzenbabesien ist jedoch aufgrund mangelnder Daten noch sehr unklar und umstritten. Kenntnisse über Vorkommen, geographische Verbreitung, Wirtsspektrum und Übertragung der felines Piroplasmen sind, mit Ausnahme von *C. felis*, sehr lückenhaft oder fehlen vollständig.

In der Republik Südafrika besitzt die Babesiose bei Hauskatzen große veterinärmedizinische Bedeutung. Es sind zahlreiche Fälle von Infektionen mit kleinen Babesien belegt, und in den Küstengebieten des Landes, die als endemischen Regionen gelten, stellt die Babesiose eine der Haupttodesursachen bei Katzen dar (Potgieter et al., 1981). Dennoch sind die Kenntnisse über die dort vorkommenden Erreger sehr lückenhaft und beruhen im wesentlichen auf Fallbeschreibungen mit Darstellung klinischer Erscheinungen, auf einer Befragung von Tierärzten und auf einzelnen Studien zur Wirksamkeit einiger Therapeutika (Futter und Belonje, 1980, 1981, Potgieter, 1981, Jacobson et al., 2000, Penzhorn et al., 2000, Schoeman et al., 2001). Die Diagnose einer felines Babesiose basiert derzeit auf dem lichtmikroskopischen Nachweis kleiner intraerythrozytärer Piroplasmen im gefärbten Blutausschlag. Die Erreger bei Hauskatzen in Südafrika werden dabei aufgrund ihrer Morphologie der Art *B. felis* zugeordnet. Gerade bei kleinen Piroplasmen können Arten aber anhand ihrer Morphologie nur unzureichend differenziert werden und das tatsächliche Artenspektrum der Babesien bei Hauskatzen ist unbekannt. Zudem fehlen Kenntnisse über die Häufigkeit der Infektion bei Katzen ebenso wie Informationen über alle wichtigen epidemiologischen Zusammenhänge zwischen Krankheitserreger, Katze und Überträger, so dass hier ein großer Forschungsbedarf besteht.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher Katzen in einem für Babesien als endemisch geltenden Gebiet in Südafrika untersucht werden, um Informationen über das Spektrum beteiligter Arten zu erhalten. Bei Katzen aus dem Patientengut einer Kleintierklinik in Port Elizabeth sollte zudem die Befallsrate mit Babesien ermittelt werden. Daher wurden bei von dort stammenden felines Piroplasmen zwei verschiedene rDNA-Abschnitte, die 18S-rDNA

und die Region der Internen Transkribierten Spacer (ITS) mit molekularbiologischen Methoden charakterisiert und zur Aufklärung des Artenspektrums phylogenetischen Analysen unterzogen. Basierend auf den erhaltenen Sequenzinformationen wurde eine Real-time PCR-Methode zum Nachweis von *B. felis* entwickelt und validiert. Bei einer Untersuchung von 206 Katzen auf Babesieninfektionen, wurden die Ergebnisse der Real-time PCR mit den Ergebnissen der Untersuchung von gefärbten Blutaussstrichen und eines indirekten Immunfluoreszenzantikörpertests (IFAT) verglichen.

II. LITERATURÜBERSICHT

A Allgemeines zu den Piroplasmaen

Piroplasmaen sind pleomorphe, vor allem intraerythrozytär parasitierende Protozoen, die dem Stamm der Apicomplexa angehören und, durch Zecken übertragen, bei einem großen Spektrum an Wirbeltieren oft tödlich verlaufende Krankheiten verursachen (Levine, 1988). Die Parasiten besitzen einen komplexen Entwicklungszyklus mit Vermehrungsstadien im Säugewirt und in der Überträgerzecke (Mehlhorn und Schein, 1984). Außerdem zeigen die Erreger eine ausgeprägte Wirtsspezifität. Derzeit werden die Piroplasmaen in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich in die Familie Babesiidae Poche, 1913, zuerst entdeckt von Babes, 1888 beim Rind und die Familie Theileriidae du Toit, 1918 (Levine, 1988).

Die traditionelle und derzeit akzeptierte systematische Klassifizierung der Piroplasmaen in die beiden Familien basiert primär auf morphologischen Eigenschaften und Unterschieden in der Entwicklung im Säuger- sowie im Zeckenwirt. Im Allgemeinen sind die intraerythrozytären Stadien der Theilerien kleiner als 1 μm und gelegentlich bis zu 2 μm groß, wohingegen die Babesien meist größer als 1–2 μm sind. Während Babesien sich ausschließlich in den Erythrozyten des Säugewirts vermehren, weisen Mitglieder der Familie Theileriidae zusätzlich ein präerythrozytäres Entwicklungsstadium in anderen, somatischen Zellen ihres Säugewirts auf. Bei der Gattung *Theileria* findet diese Vermehrungsphase in lymphatischen Zellen statt. Als weiteres Unterscheidungskriterium wurde die Entwicklung im Zeckenvektor herangezogen (Mehlhorn und Schein, 1998). So erfolgt die Erregerweitergabe in den Zecken bei den Babesien sowohl transstadial als auch transovarial, d. h. nicht nur von einem Entwicklungsstadium der Zecke auf das nächste, sondern auch über die Eier der Zecken auf die nächste Generation. Bei den Theilerien existiert nur die transstadiale Weitergabe des Erregers. Eine Zuordnung der Piroplasmaen zu einer der beiden Gruppen nach den genannten morphologischen und biologischen Merkmalen ist jedoch häufig problematisch, da bei den meisten Arten der Entwicklungszyklus nicht vollständig bekannt ist. Die Zeckenvektoren sind nur für wenige Piroplasmaarten nachgewiesen und Untersuchungen zur Entwicklung in der Zecke fehlen in der Regel. Daher ist bei einigen Arten die taxonomische Stellung innerhalb der Piroplasmaen unsicher und wird kontrovers diskutiert. Dies gilt vor allem für einige Arten mit morphologisch kleinen, unter 3 μm großen Stadien in den Erythrozyten, die bislang zu

den Babesien zählen. So wurde *T. equi* früher zu den Babesien eingeordnet, nach der Entdeckung von präerythrozytären Stadien in Lymphozyten und dem Nachweis einer ausschließlich transstadialen Erregerweitergabe heute aber zu den Theilerien eingruppiert (Mehlhorn und Schein, 1998). Bei *B. microti* wurden ebenfalls Vermehrungsstadien in Lymphozyten beschrieben (Mehlhorn et al., 1986) und eine transovariale Weitergabe der Erreger in der Zecke bisher nicht nachgewiesen, so dass die taxonomische Eingliederung bei den Babesien umstritten ist.

Molekularbiologische Techniken mit genotypischen Charakterisierungen der Arten bieten eine wertvolle Alternative zur Aufdeckung phylogenetischer Beziehungen und taxonomischer Einheiten. Die rDNA erwies sich dabei als geeignetes Zielgen, da sie in sehr kontinuierlicher Weise im Laufe der Zeit Mutationen ansammelt und deshalb auch als „molekulare Uhr“ bezeichnet wird (Zuckerkindl und Pauling, 1965). Zur Untersuchung phylogenetischer Beziehungen innerhalb der Piroplasmen wurden 18S-rDNA-Sequenzanalysen durchgeführt. Dabei formierten sich 3 unterschiedliche Cluster (Ellis et al., 1992, Allsopp et al. 1994, Mackenstedt et al., 1994, Zahler et al., 2000c). Auf der einen Seite gruppieren sich die sogenannten `echten` Babesien, mit Arten wie *B. canis*, *B. bigemina*, *B. caballi* und *B. divergens*. Die zweite Gruppe beinhaltet klassische Theilerien, wie *T. parva*, *T. annulata* und *T. taurotragi* und zusätzlich meist *T. equi* und *Cytauxzoon felis* (Zahler et al., 2000c, Penzhorn et al., 2001). Eine dritte Gruppe, die sich überraschenderweise darstellte, bestand aus *B. microti* und anderen kleinen Babesien wie *B. rodhaini* und *T. annae*. Diese dritte Gruppe beinhaltet auch feline Babesien und zwar *B. felis* und *B. leo* sowie 2 weitere artlich nicht festgelegte Stämme aus einem Karakal (Allsopp et al., 1994, Zahler et al., 2000c, Penzhorn et al., 2001). Die neue dritte Gruppe zeigt eine weniger enge Verwandtschaft zu den `echten` Babesien und den Theilerien als die Babesien und Theilerien untereinander. Gemeinsame phänotypische Merkmale, wie die „Malteserkreuz“-Formation der Teilungsformen in den Erythrozyten, die bei `echten` Babesien nie beschrieben wurde, sind zumindest bei einigen Vertretern der neuen Gruppe, bei *B. microti*, *B. felis* und bei *B. leo*, bekannt. Für diese Gruppe wurde ein den Babesien und Theilerien gleichwertiger taxonomischer Rang gefordert und der Name Nicolliidae vorgeschlagen (Allsopp et al., 1994, Zahler et al., 2000c, Penzhorn et al., 2001).

Die Piroplasmen bei Haus- und Wildfeliden werden derzeit den Babesien zugeordnet, sind jedoch bisher ungenügend untersucht. Über den Entwicklungszyklus, das Arten- und

Wirtsspektrum sowie den Vektor der felines Babesien ist sehr wenig bekannt, so dass eine Entscheidung über die taxonomische Stellung innerhalb der Piroplasmen anhand morphologischer und biologischer Merkmale eigentlich gar nicht getroffen werden kann. Eine genotypische Charakterisierung erfolgte erst für einzelne Isolate, und so liegen bisher nur einige wenige Sequenzdaten für die 18S-rDNA von Piroplasmen vor, die aus einer Hauskatze, aus Löwen und aus einem Karakal isoliert wurden (Penzhorn et al., 2001). Wie schon erwähnt, gruppieren sich diese Erreger, die als *B. felis* und *B. leo* artlich diagnostiziert wurden oder deren Artzuordnung noch unklar ist, zusammen mit *B. microti*, *B. rodhaini* und *T. annae* der dritten Gruppe, neben den Babesien und Theilerien ein (Penzhorn et al., 2001).

B Piroplasmen der Feliden

1. Allgemeines

Im Jahr 1904 wurden erstmals Piroplasmen bei wilden und domestizierten Feliden beschrieben (Lingard et al., 1904). Daraufhin folgte eine Reihe von Veröffentlichungen, meist Fallbeschreibungen, von Babesiosen bei Feliden hauptsächlich aus Afrika und Indien (Davis, 1929, Jackson et al. 1937, Shortt, 1940, Robinson, 1963). Erst Anfang der 90er Jahre wurde auch von Babesien bei Katzen in Europa berichtet (Leger et al. 1992). Über das Artenspektrum der Piroplasmen der Feliden ist wenig bekannt. So basiert die Artabgrenzung im wesentlichen -meist ausschließlich- auf morphologischen Eigenschaften. Dabei wurden die Erreger, mit einer Ausnahme, den Babesien zugeordnet und 6 Arten unterschieden: *B. felis*, *B. cati* und *B. leo*, die morphologisch sehr kleine Erreger darstellen, *B. pantherae* und *B. herpailuri*, zwei große Babesienarten sowie eine Art, die der Gattung *Cytauxzoon* zugeordnet wird, *C. felis* (Tab. 1). Da die derzeitigen Kenntnisse über Katzenbabesien im wesentlichen auf Fallbeispielen beruhen, sind Vorkommen und Verbreitung, Wirtsspezifität sowie Epidemiologie und Bedeutung als Krankheitserreger noch sehr unzureichend untersucht.

2. *Babesia felis*

1929 berichtete Davis über die Infektion einer Wildkatze (*Felis sylvestris ocreata*) aus dem Sudan mit 1 bis 2,25 µm großen intrakorpuskulären Parasiten, die er der Familie Babesiidae zuordnete und als *Babesia felis* bezeichnete (Tab. 1, Abb. 1). Er beschrieb runde bis ringförmige Körper, die sich nach ihrer Teilung gelegentlich in Kreuzform („Malteserkreuz“) anordneten. Es gelang ihm die experimentelle Übertragung auf Hauskatzen, bei denen sich die Parasiten vermehrten, jedoch keine klinischen Symptome auslösten. Infektionsversuche mit Nicht-Feliden (Hund, Schaf, Kalb, Ratten, Mäuse, Gerbil) und Übertragungsversuche mit der Braunen Hundezecke, *Rhipicephalus sanguineus*, waren erfolglos (Davis, 1929). Bei anderen Wildfeliden, und zwar einem Nordamerikanischen Rotluchs (*Lynx rufus*) in einem Londoner Zoo (Wenyon et al., 1930), einer Schleichkatze (*Viverra civetta*) in Westafrika (Leger et al., 1920) sowie zwei aus den USA stammenden Pumas (*Puma concolor*), die in einem Zoo in Ägypten lebten (Carpano, 1934) wurde von Blutparasiten ähnlicher Morphologie berichtet. Dabei wurden kleine, siegelringförmige erythrozytäre Parasiten, wie von Davis (1929) für *B. felis* beschrieben, und immer wieder „Malteserkreuz“-Formationen beobachtet. Eine eindeutige Zuordnung zu *B. felis* seitens der Autoren blieb allerdings aus. Bei einem geschossenen Leopard in Indien wurde ebenfalls eine relative starke Babesieninfektion beschrieben (Shortt, 1940). Rein morphologische ähnelten die sehr kleinen, ringförmigen Haemoprotozoen *B. felis*, obwohl diese Art bisher auf den Kontinent Afrika beschränkt war. Die ersten Berichte über Infektionen mit *B. felis* bei Hauskatzen stammten aus Südafrika. Im Wesentlichen auf Fallbeispielen rund um Kapstadt beruhend, konzentrierten sich die Beschreibungen hauptsächlich auf die klinische Symptomatik. Die Katzen hatten hohes Fieber und zeigten typische Symptome einer Babesieninfektion, wie Anämie, Lethargie, Anorexie und Ikterus. Todesfälle waren häufig (Jackson et al., 1937; McNeil 1937, Robinson 1963, Futter et al., 1980, 1981). In phylogenetischen Untersuchungen, die auf 18S-rDNA-Analysen beruhten, zeigte *B. felis*, aus Hauskatzen in Südafrika isoliert, eine enge Verwandtschaft zu *B. rodhaini* und *B. microti* (Penzhorn et al. 2001). Unklar ist, ob es sich bei allen den erwähnten Piroplasmen tatsächlich um die Art *B. felis* handelte. Die Erreger wurden fast ausschließlich morphologisch charakterisiert. Darin entsprachen sie zwar den von Davis (1929) als *B. felis* beschriebenen Erregern, es hat sich jedoch gezeigt, dass gerade bei kleinen Babesien die Morphologie kein geeignetes Merkmal zur Artabgrenzung darstellt (Zahler et al., 2000a). Das breite Spektrum befallener Wirtstiere wäre für Babesien, denen fast ausschließlich eine strenge Wirtsspezifität zugeschrieben wird (Friedhoff, 1988), außerdem

sehr ungewöhnlich. Neben dem tatsächlichen Wirtsspektrum von *B. felis* ist auch unbekannt, welche Zeckenarten als Vektoren fungieren. Die Verbreitung von *B. felis* ist unklar, scheint sich derzeit jedoch auf den Kontinent Afrika, und zwar v. a. auf das südliche Afrika, zu beschränken. Epidemiologische Studien sind bisher allerdings unzureichend. Die derzeitige Situation der Katzenbabesiose in Südafrika wird in Kap. 9 genauer beschrieben.

3. *Babesia cati*

Möglicherweise kommt in Indien eine andere Art feliner Babesien vor (Abb. 1). So wurden in Blutausstrichen von mehreren Hauskatzen (*Felis sylvestris catus*) kleine, runde und ovale Formen mit einer durchschnittlichen Größe von 1,5 µm, festgestellt, die morphologisch *B. felis* ähnelten, jedoch keine Vierteilungsformen („Malteserkreuz“) aufwiesen (Mangrulkar et al., 1937). Bei einer indischen Wildkatze (*Felis sylvestris ornata*) wurden außerdem Babesien gefunden, die zwischen 0,5 und 2,5 µm groß, rund, oval oder birnenförmig, also ebenfalls *B. felis* ähnlich waren, aber gleichfalls keine Kreuzformen aufwiesen. Die infizierte Katze war klinisch symptomlos. Diese Erreger wurden als *Babesia cati* (Tab.1) bezeichnet (Mundaliar et al., 1950). Weitere Informationen über die geographische Verbreitung, das Wirtsspektrum, Vektorzecken und veterinärmedizinische Bedeutung liegen nicht vor.

4. *Babesia pantherae*

Aus einem Leopard (*Panthera pardus*) aus Kenia wurde eine weitere Art, *Babesia pantherae*, beschrieben (Dennig et al., 1972), deren intraerythrozytäre Einzelformen mit einer durchschnittlichen Größe von 2,2 µm größer *B. felis* und *B. cati* waren (Tab. 1, Abb. 1). Die Form der erythrozytären Parasiten war sehr unterschiedlich und reichte von rund über oval bis zu der typischen Birnenform, die häufig zu beobachten war. Auch Malteserkreuzformen, sowie eine unterschiedliche Anzahl an Teilungsformen in den Erythrozyten wurde beschrieben (Brocklesby et al., 1965, Dennig und Hebel, 1970, Dennig et al., 1969, 1972). Mittels Blutinjektion gelang die experimentelle Übertragung der Infektion auf Hauskatzen, nicht jedoch auf Hunde (Brocklesby et al., 1965, Göbel, 1968). Darüber hinaus gibt es weder Kenntnisse zur Verbreitung noch zum Vorkommen, Überträger oder Wirtsspektrum von *B. pantherae*.

5. *Babesia herpailuri*

Im Jahr 1967 wurde eine weitere Babesienart, *Babesia herpailuri* (Tab. 1, Abb. 1), beschrieben, die aus einem südamerikanischen Jaguarundi (*Herpailuri yaguarundi*) isoliert worden war (Dennig, 1967c). Jaguarundis sind Carnivoren, die zur Familie der Feliden gehören, deren systematische Stellung aber bis heute nicht eindeutig festgelegt ist. Sie kommen wildlebend in Süd- und Mittelamerika vor. Es gibt verschiedene Rassen, die alle die typischen Artmerkmale aufweisen: einen schlanken Körper, kurze Läufe, einen langen Schwanz und einen kleinen Kopf mit kurzen Ohren. Die Pelzfarbe ist grau bis braun, zuweilen mit dunkler Flecken- oder Strichzeichnung versehen (Dennig, 1967a). Der Jaguarundi, aus dem die Haemoprotozoen isoliert werden konnten, stammte ursprünglich aus Venezuela und wurde im Alter von ca. 4 Wochen nach Deutschland gebracht. Im Verlauf einer routinemäßigen klinischen Untersuchung des Tieres wurden in einzelnen Erythrozyten Protozoen festgestellt, die eine große Ähnlichkeit mit *B. bigemina*, einer Babesienart des Rindes, besaßen (Dennig, 1967a). Nach eingehender morphologischer Untersuchung wurde von ringförmigen Einzelformen, ebenso wie von vorwiegend als paarig gelagerten Birnenformen berichtet, auch Knospungsformen wurden gesehen. Die Größe der beschriebenen Parasiten variierte zwischen 1,3 µm und 3,5 µm (Dennig, 1967a, c). Bei Untersuchungen zur Wirtsspezifität gelang die experimentelle Übertragung mittels Blutinjektion auf 8 Katzen (*Felis sylvestris catus*) und überraschenderweise auch auf einen Hund (*Canis canis familiaris*) (Dennig, 1967a). In späteren Studien erwies sich auch der Fuchs (*Vulpes vulpes*) als empfänglich (Dennig, 1967b und c). In den beiden Kanidenarten entwickelte sich nach experimenteller Infektion, insbesondere in splenektomierten Tieren, eine hochgradige Babesiose, die oftmals tödlich verlief. Andere Versuchstiere und zwar Rhesusaffen (*Macaca mulatta*), Frettchen (*Mustela putorius furo* L.), Schweine (*Sus scrofa domesticus*), Schafe (*Ovis ammon aries*) und verschiedene Nagetierarten waren resistent (Dennig, 1967c). Über das natürliche Wirtsspektrum von *B. herpailuri* sowie über Verbreitung, Vektor und andere epidemiologische Aspekte liegen keine weiteren Untersuchungen vor. Auch über eine klinische Ausprägung der Infektion ist nichts bekannt. Zur Therapie von *B. herpailuri* wurde Diminazenacetat eingesetzt. Eine Dosis von 10 mg/kg führt bei experimentell infizierten Tieren zur klinischen Heilung und Prämunition (Dennig, 1967c).

6. *Babesia leo*

Bei einer Untersuchung von 47 Löwen (*Panthera leo*) im Kruger National Park in Südafrika wurden bei allen Tieren im Blutaussstrich kleine Piroplasmen entdeckt, welche zunächst aufgrund ihrer Morphologie (0,6-1,7 µm groß, pleomorph, Malteserkreuzformen gelegentlich vorhanden) als *B. felis* diagnostiziert wurden. Da jedoch die Seren der Löwen im Immunfluoreszenztest bei Verwendung von *B. felis* und *Cytauxzoon felis* als Antigen negativ reagierten, wurde vermutet, dass es sich bei den Parasiten um eine andere, neue Art handelt (López-Rebollar et al., 1999). Phylogenetische Analysen der 18S-rRNA stützten schließlich die Ansicht, dass die Piroplasmen als eigenständige Art anzusehen sind, die jedoch mit *B. felis* sowie *B. rodhaini* und *B. microti* nahe verwandt ist. Sie wurde als *Babesia leo* (Penzhorn et al., 2001) bezeichnet (Tab. 1, Abb. 1). Bei Untersuchungen zum Wirtsspektrum von *B. leo* gelang die experimentelle Infektion einer splenektomierten Hauskatze und eines Leoparden durch Injektion babesienhaltigen Blutes. Dabei entwickelte sich bei den Empfängertieren eine nachweisbare Parasitämie. Löwen scheinen allerdings möglicherweise für *B. felis* als Wirt nicht geeignet zu sein. Bei experimenteller Infektion eines Löwen mit *B. felis* – haltigem Blut waren Babesien im Blut nicht nachweisbar, Antikörper gegen *B. felis* wurden allerdings nachgewiesen (López-Rebollar et al. 1999). Die Verbreitung von *B. leo* in Südafrika ist unbekannt. Auch fehlen Studien über Epidemiologie, Vektor und Klinik der Infektion.

7. *Cytauxzoon felis*

In den USA kommt eine weitere, für gewöhnlich tödlich verlaufende Piroplasmeninfektion bei der Katze vor, die durch *Cytauxzoon felis* (Kier, 1979) verursacht wird (Abb. 1). Taxonomisch wird *Cytauxzoon* in die Familie der Theileriidae eingegliedert. Wie schon erwähnt, unterscheidet sich diese Familie von den Babesiidae dadurch, dass Vermehrungen nicht nur in Erythrozyten, sondern auch in anderen Geweben stattfinden. Beim Genus *Cytauxzoon* wurde diese extraerythrozytäre Schizogonie in mononukleären Zellen des retikuloendothelialen Systems, nachgewiesen (Wagner, 1975).

Die intraerythrozytären Stadien von *C. felis* stellten sich als runde, ovale oder siegelringförmige 0,8 - 1,5 µm große Piroplasmen dar, die einzeln, aber auch in mehreren Teilungsformen im Erythrozyten vorliegen (Tab. 1). Auch die Anordnung der Teilungsformen in die sog. „Malteserkreuz“-Formation wurde gelegentlich beobachtet (Kier et al., 1979, Glenn et al., 1982). Somit waren die Erreger morphologisch kaum von *B. felis* zu unterscheiden (Kier et al., 1998, López-Rebollar et al., 1999). Serologische Kreuzreaktion zwischen *C. felis* und *B. felis* kamen jedoch nicht vor (Uilenberg et al., 1987). rDNA-Sequenzanalysen bestätigten die Artabgrenzung und zeigten eine enge genetische Verwandtschaft von *C. felis* mit *T. equi* und *B. rodhaini* (Allsopp et al., 1994).

C. felis wurde erstmals in den 70er Jahren bei Hauskatzen in stark bewaldeten Gebieten im Südwesten Missouris beschrieben (Wagner et al., 1975, 1976). Als natürlicher Reservoirwirt wurde der Nordamerikanische Rotluchs (*Lynx rufus*) vermutet, bei dem sowohl eine pathogene, tödlich verlaufende Form als auch eine apathogene Form mit Ausbildung einer persistierenden, subklinischen Parasitämie vorkam (Glenn et al., 1982, 1983, 1984; Kier et al., 1982, Nietfeld et al., 2002). *Cytauxzoon*-ähnliche Hämoprotzoen wurden außerdem bei anderen Wildfeliden, und zwar dem (Florida)Puma (*Puma concolor conyri*) (Butt et al., 1991), 2 Geparden (*Acinonyx jubatus*), die allerdings 2 Monate in Namibia verbracht hatten (Zinkle et al., 1981) und einem in Gefangenschaft aufgezogenen weißen Tiger (*Panthera tigris*) in Nordkalifornien (Garner et al., 1996), beschrieben. Die Wildfeliden zeigten keine Anzeichen einer klinischen Cytauxzoonose. Dies erweckt die Frage, ob es sich tatsächlich um den gleichen Erreger handelt, der bei Hauskatzen eine tödlich verlaufende Krankheit hervorruft (Zinkle et al., 1981, Glenn et al., 1982). Insgesamt beschränken sich bisherige *Cytauxzoon*-Nachweise bei Haus- und Wildfeliden damit auf die USA. Als Vektor für *C. felis* wird die Zeckenart *Dermacentor variabilis* vermutet, da eine experimentelle Übertragung von *C. felis* von einem Rotluchs auf Hauskatzen bei transstadialer Erregerweitergabe gelang (Blouin et al., 1984).

Der klinische Verlauf einer Infektion mit *C. felis* bei Hauskatzen wurde meist als perakut bis akut beschrieben. Die Katzen entwickelten zunächst unspezifische Symptome, wie Anorexie, Fieber, Lethargie, Anämie, Ikterus und Dehydratation und starben dann meist innerhalb von weniger als 5 Tagen nach Auftreten der ersten Symptome in einem schock-ähnlichen Zustand. Terminale Symptome waren Hypothermie, Lähmung und Koma. (Wagner et al., 1976, Glenn et al., 1984, Kier et al., 1998). Die Diagnose erfolgt durch Nachweis der intraerythrozytären

Stadien im Giemsa- oder Wright's-gefärbten Blutaussstrich. Allerdings wurde festgestellt, dass sich die Parasitämie oft erst nach Einsetzen der klinischen Symptome entwickelt und häufig niedrig ist (Glenn et al., 1984). Schizontenstadien im Gewebe wurden in Giemsa - oder Wright's - gefärbten Aspiraten oder Ablatschpräparaten von Knochenmark, Lymphknoten oder Milz nachgewiesen (Franks et al., 1988). Es wurden Immunfluoreszenztests zum Nachweis von Gewebestadien (Shindel et al., 1978) sowie zum Nachweis von Antikörpern gegen *C. felis* (Cowell et al., 1987) entwickelt, die aber kommerziell nicht erhältlich und somit für die Routinediagnostik nicht zur Verfügung stehen. Die Mortalität der Cytauxzoonose bei Hauskatzen ist sehr hoch, und es sind nur wenige Fälle bekannt, bei denen Katzen die Infektion überlebten (Meinkoth et al., 2000). Die Therapie ist weitgehend unerforscht. Mit dem größten Erfolg wurden bisher Diminazenaceturat (2,0 mg/kg, i.m.) und Imidocarbdiopropionat (5,0 mg/kg, i.m.) eingesetzt (Greene et al., 1999). Präparate, wie Buparvaquon oder Parvaquon, die erfolgreich zur Therapie von Theileriosen eingesetzt werden, erwiesen sich als wirkungslos (Motzel et al., 1990).

8. Feline Piroplasmen ohne eindeutige Artenuordnung

8.1 Fälle außerhalb Europas

In einigen Fällen blieb eine Artenuordnung der bei Feliden beschriebenen Piroplasmen aus. So wurden bei einer achtjährigen Siamkatze aus Salzburg in Zimbabwe im Blutaussstrich Babesien diagnostiziert, die nicht eindeutig zu identifizieren waren. Mit einer Größe von 1,3-3,5 µm waren die Piroplasmen eindeutig größer als *B. felis* und *B. leo* und zeigten auch nicht die für diese Arten als typisch beschriebene Malteserkreuzformation der Teilungsformen. Auch *B. cati* und *B. pantherae* sind im allgemeinen kleiner als die hier beschriebene Art. Aufgrund der Morphologie waren die Babesien laut Autor am ehesten mit *B. herpailuri* vergleichbar, trotz der Tatsache, dass diese Babesienart bisher nicht in Afrika beschrieben wurde und der Jaguarundi als natürlicher Wirt nicht in Zimbabwe beheimatet ist. Das Tier zeigte klinische Symptome, wie Fieber, Anorexie, blasse Schleimhäute und eine milde Konstipation (Stewart et al., 1980). Desweiteren wurden Piroplasmen bei einem Ozelot (*Felis pardalis*) aus Kolumbien (Ayala et al., 1973) und Löwen in Zaire (Verhaeghe et al., 1996) ohne weitere Zuordnung beschrieben. Im Serengeti National Park und Ngorongoro Krater in Tansania wurden 123 Löwen und 8 Geparden untersucht. Dabei wurden bei allen

Tieren kleine, Theilerien-ähnliche Piroplasmen im Blutaussstrich gefunden (Averbeck et al., 1990). Auch die berühmte Löwin „Elsa“ verstarb angeblich an Babesiose (Barnett and Brocklesby, 1968). Aus Indien stammen Berichte über eine an Babesiose erkrankten Tigerin und einen angeblich an Babesiose verstorbenen Leopard (Sinha et al., 2000, Upadhye et al., 2000). Die Tigerin war anorektisch und zeigte Hämoglobinurie und Fieber. Nach Behandlung mit Diminazeturat besserten sich die Symptome (Sinha et al., 2000). In beiden Fällen wurden die Erreger nicht näher beschrieben (Sinha et al., 2000, Upadhye et al., 2000). In Südafrika wurden Babesien aus einem wildlebenden Karakal isoliert. Das erkrankte Tier wurde in Durban, KwaZulu-Natal mit den Symptomen einer Babesiose gefunden. Durch Charakterisierung der 18S rDNA wurden zwei verschiedene Genotypen des Erregers gefunden und als *Babesia* spp. Caracal Strain A und B bezeichnet. Es wurden Übertragungsversuche mittels Injektion erregerehaltigen Blutes auf eine Hauskatze durchgeführt. Dabei entwickelte sich eine nachweisbare Parasitämie bei der Katze, klinische Symptome traten jedoch nicht auf (Penzhorn et al. 2001). Bei phylogenetischen Analysen gruppieren sich die beiden Karakalstämme zu *B. felis* und *B. leo* und zeigen wie diese eine enge Verwandtschaft zu den beiden nicht-felinen Arten *B. rodhaini* und *B. microti* (Penzhorn et al., 2001).

8.2 Feline Piroplasmose in Europa

8.2.1 Zwei Fälle in Frankreich

Im Jahr 1992 wurde erstmals über das Vorkommen von feline Piroplasmose in Europa berichtet (Leger et al., 1992). Bei einer 8 Jahre alten Katze aus der Gegend Haute-Saône in Frankreich wurden Babesien-ähnliche Parasiten kleiner Größe (1,5 bis 2 µm), von runder oder ovaler Gestalt beschrieben, die meist einzeln in Erythrozyten vorlagen. Malteserkreuzformen wurden nicht gefunden. Die Babesien wurden der Art *B. felis* zugeordnet, trotz der Tatsache, dass diese Art bisher nur in Afrika und Indien beschrieben worden war (Leger et al. 1992). Bei einem zweiten Fall feline Babesiose in Frankreich wurde von einer Katze aus der Gegend um Paris berichtet, bei der Babesien mit einer Größe von 3,5 bis 5,5 µm, von runder oder ovaler Gestalt und mit vielen Zweiteilungsformen, aber keinen Kreuzformen, gefunden wurden. Aufgrund der Größe wären diese Babesien am ehesten der Art *B. herpailuri* zuzuordnen (Leger et al. 1992, Bourdeau, 1996).

8.2.2 Ein Fall in Deutschland

Im Jahr 1997 wurde erstmals ein Fall in Deutschland und somit der dritte Fall in Europa beschrieben (Moik und Gothe, 1997), und zwar bei einer 10 Monate alten, männlichen Norwegischen Waldkatze aus dem Raum Athena in Deutschland. Das Tier stammte ursprünglich aus Nordschweden, wurde im Alter von 3 Monaten per Flugzeug nach Deutschland gebracht und verließ bis zur Erkrankung seinen neuen Heimatort nicht mehr. Zum Zeitpunkt schwerer klinischer Symptome und hochgradiger Anämie wurden in Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen Babesien nachgewiesen. Die Parasiten stellten sich als ringähnliche, rundliche oder amöboide Einzelformen oder aber als Teilungsstadien dar, diese waren ausschließlich als einpaarige Birnenform pro Erythrozyt ausgebildet. Malteserkreuzformen wurden nicht gefunden. Die Einzelformen maßen durchschnittlich $3,6 \times 2,3 \mu\text{m}$, die Teilungsformen waren im Durchschnitt $4,0 \times 2,1 \mu\text{m}$ groß. Einige Erythrozyten enthielten bis zu acht Einzelformen. Eine taxonomische Zuordnung zu einer bisher bekannten felinen Babesienart war nicht eindeutig möglich. Am ähnlichsten waren die Erreger noch mit *B. herpailuri*, mit den aus der bereits beschriebenen Katze aus der Pariser Gegend in Frankreich isolierten $3,5$ bis $5,5 \mu\text{m}$ messenden Erregern (Leger et al. 1992) und mit den bei der Siamkatze aus Simbabwe 1980 beschriebenen Babesien (Stewart et al. 1980). Ebenfalls ungeklärt blieb die Frage wann und wo sich die Katze infiziert hat. Da der Babesienbefund bei einer Katze in Deutschland bis dato erst- und einmalig ist, wurde ein endemischer Herd in diesem Land ausgeschlossen. Weder am Tier selbst, noch im Haus des Besitzers wurden Zecken gefunden, und zudem wurde die Infektion im Winter bei sehr niedrigen Außentemperaturen, also außerhalb der Saison von Freilandzecken nachgewiesen. Da Babesien bei Feliden im Herkunftsland der Katze, in Schweden, bisher nicht dokumentiert sind, wurde auch eine dort erworbene und über sechs Monate persistierende Infektion weitgehend ausgeschlossen, zumindest als sehr unwahrscheinlich erklärt. Der Krankheitsverlauf und Schweregrad der Babesieninfektion, die Katze musste im Verlauf der Therapie mit Imidocarbipropionat schließlich euthanasiert werden, entsprachen den klinischen und labordiagnostischen Befunderhebungen bei experimentell oder natürlich mit *B. felis* infizierten Katzen in Südafrika, sowie bei der mit großen Babesien infizierten Siamkatze in Zimbabwe (Moik und Gothe, 1997).

8.2.3 Fälle in Spanien und Portugal

Im Jahr 2003 wurde von 4 Katzen aus Spanien und Portugal berichtet, bei denen Infektionen mit den Hundebabesien *B. canis canis* und *T. annae* nachgewiesen wurden (Criado-Fornelio et al., 2003). Der Nachweis erfolgte mittels PCR und 18S-rDNA-Sequenzierung zur Artendifferenzierung. In dieser Studie wurden 16 Katzen untersucht. Dabei wurde bei einer Katze, die aus Spanien stammte und für eine Babesieninfektion typische klinische Symptome zeigte, *B. canis canis* diagnostiziert. Bei drei weiteren Katzen, die aus Portugal stammten und FeLV oder FIV positiv waren, wurde im Blut DNA von *B. canis canis* und *T. annae* nachgewiesen. Eine der drei Katzen war sogar mit beiden Arten infiziert. In Blutausstrichen wurden allerdings bei allen Katzen Babesien nicht nachgewiesen (Criado-Fornelio et al., 2003). Die Frage, inwieweit es sich bei diesem Nachweis von DNA kaniner Babesien bei der Hauskatze um echte Infektionen handelt, bleibt kritisch zu betrachten. Die Autoren selbst schlossen eine Kontamination oder ein Vertauschen von Katzenproben mit Hundeproben aus. Sie folgerten, dass gegenwärtig angewandte Diagnostikmethoden zum Nachweis und zur Differenzierung von Piroplasmen bei Hauskatzen inadäquat und wenig sensitiv sind und dass Babesien möglicherweise eine geringere Wirtsspezifität besitzen, als bisher angenommen (Criado-Fornelio et al., 2003).

Tab. 1: Piroplasmen bei Feliden

	<i>B. felis</i> (Davis, 1929)	<i>B. leo</i> (Penzhorn et al., 2001)	<i>B. cati</i> (Mudaliar et al., 1950)	<i>B. pantherae</i> (Dennig et al., 1972)	<i>B. herpailuri</i> (Dennig, 1967)	<i>C. felis</i> (Kier, 1979)
<u>Größe</u>	1,0 - 2,25 µm (Ø 1,25 µm)	0,6 - 1,7 µm (Ø 1,05 µm)	0,5 - 2,5 µm (Ø 1,5 µm)	1,3 - 3,5 µm (Ø 2,2 µm)	1,8 - 3,5 µm (Ø 2,7µm)	0,8 - 1,5 µm (Ø 1,2 µm)
<u>Charakteristische Morphologie</u>	pleomorph, "Malteser-Kreuz"	pleomorph, "Malteser-Kreuz"	pleomorph,	pleomorph, "Malteser-Kreuz"	pleomorph, paarige Birnenformen	pleomorph, "Malteser-Kreuz"
<u>Natürliche Infektion</u>	Hauskatze (Südafrika) ¹ , Wildkatze (Sudan) ² , Leopard (Indien) ³ , Nordamerikan. Luchs ⁴ , Puma ⁵	Löwen (Südafrika) ⁶	Wild- und Hauskatzen (Indien) ⁷	Leopard (Kenia) ⁸	Jaguarundi (Südamerika) ⁹	Hauskatze (USA) ¹⁰ , Rotluchs (USA) ¹¹ , Puma (USA) ¹²
<u>Wirtsspektrum</u>	Feliden	Feliden	Feliden	Feliden	Feliden, Caniden	Feliden

- ¹ Jackson et al., 1937, McNeil, 1937, Futter et al., 1980, 1981, Jacobson et al., 2000, Schoeman et al., 2001
- ² Davis, 1929
- ³ Shortt, 1940
- ⁴ Wenyon et al., 1930
- ⁵ Carpano, 1934
- ⁶ Penzhorn et al., 2001
- ⁷ Mangrulkar, 1937, Mudaliar et al., 1950
- ⁸ Dennig et al., 1972
- ⁹ Dennig, 1967a-c
- ¹⁰ Wagner, 1976, Glenn et al., 1984
- ¹¹ Glenn et al., 1982, 1983
- ¹² Butt et al., 1991

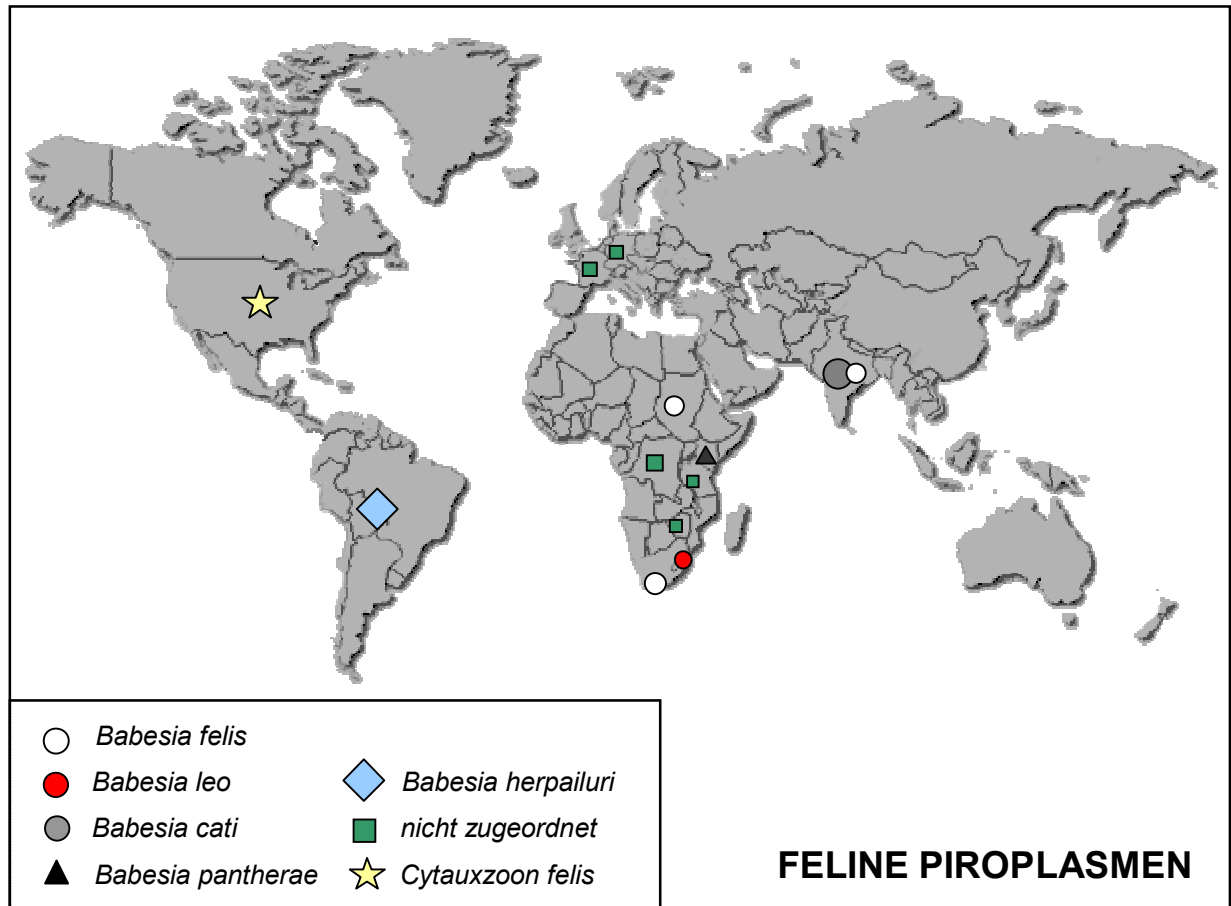


Abb. 1 : Geographische Verteilung des Nachweises von Piroplasmen bei Feliden

9. Piroplasmeninfektionen bei Hauskatzen in Südafrika

9.1 Allgemeines

Piroplasmen besitzen bei Hauskatzen in Südafrika als Krankheitserreger große veterinärmedizinische Bedeutung. Dennoch ist über das vorkommende Artenspektrum und die Epidemiologie der felines Babesien nicht viel bekannt. Die wenigen vorliegenden Studien beziehen sich meist auf Fallberichte klinischer Beobachtungen kleinerer Tiergruppen (Futter und Belonje, 1980, 1981, Schoeman et al., 2001) oder statistischen Erhebungen zur geographischen Verbreitung durch Befragung von Tierärzten (Jacobson et al., 2000). Als endemische Gebiete in Südafrika gelten vor allem die Küstengebiete, die offenbar günstigen Lebensraum für als Vektor fungierende Zecken darstellen.

9.2 Ätiologie und Epidemiologie

Erstmals wurde 1937 in Südafrika von morphologisch *B. felis* ähnlichen Parasiten bei Hauskatzen in der Gegend um Kapstadt berichtet, die z. T. tödlich verlaufende Erkrankungen hervorriefen (McNeil, 1937, Jackson und Dunning, 1937). Dies waren gleichzeitig die ersten Berichte über natürliche Babesieninfektionen bei Hauskatzen. Die Erreger wurden aufgrund ihrer Morphologie als *B. felis* diagnostiziert, eine Auffassung, die bei Babesieninfektionen bei Hauskatzen in Südafrika, trotz einer scheinbar höheren Pathogenität des Erregers bei Hauskatzen als bei Wildfeliden, beibehalten wurde (Futter und Belonje, 1980, Schoeman et al., 2001). Wie für *B. felis* typisch, wurden sehr polymorphe Erreger als einzelne Siegelring- oder Rundformen, gelegentlich auch als Birnenform, die in unterschiedlicher Anzahl im Erythrozyten vorliegen, beobachtet. Auch „Malteserkreuz“-Formationen der Teilungsformen wurden relativ häufig beschrieben (Jacobson et al., 2000).

Das Vorkommen von *B. felis* bei Hauskatzen scheint sich derzeit auf Südafrika zu beschränken. Obwohl der Krankheit bei Katzen, v. a. in den endemischen Gebieten eine recht große Bedeutung zugemessen wurde und eine der Haupttodesursachen bei Katzen darstellte (Potgieter, 1980), sind Studien und hier v.a. Untersuchungen zur Epidemiologie und Prävalenz, unzureichend vorhanden. Bei Untersuchungen von natürlichen Babesieninfektionen bei 56 Hauskatzen wurde eine hohe Prävalenz bei jungen Katzen festgestellt, z. T. waren 80 % der Katzen in einem Alter von weniger als 3 Jahren infiziert (Schoeman et al., 2001). Bei älteren Katzen mit einer Babesieninfektion wurden oft Koinfektionen mit FIV, FeLV und FIV oder Haemobartonellen nachgewiesen (Jacobson et al., 2000, Schoeman et al., 2001). Eine Geschlechts- oder Rasseprädisposition wurde nicht festgestellt (Schoeman et al., 2001). Durch Befragung niedergelassener Tierärzte in Südafrika wurde ermittelt, dass mit Babesien befallene Katzen vor allem in den Küstengebiete Südafrikas, von der Provinz KwaZulu-Natal über die Eastern Cape bis zur Südwestküste der Kapregion vorkommen (s. Abb. 4). Diese Gebiete wurden daher als endemisch angesehen (Jacobson et al., 2000). Allerdings wurde auch über sporadische Fälle im Inland (Mpumalanga, Gauteng, Orange Free State) berichtet (Penzhorn et al., 1999, Jacobson et al., 2000).

Die Übertragung von *B. felis* ist noch unbekannt. In Anlehnung an andere Babesienarten wurde vermutet, dass Zecken als Vektor fungieren (McNeil, 1937, Robinsin, 1963, Penzhorn

et al., 1999, Jacobson et al., 2000). Tierärzte berichteten, dass trotz jahreszeitlichen Schwankungen, mit einem „Peak“ in den Sommermonaten (Nov.-Febr.), Infektionen das ganze Jahr über nachgewiesen wurden. Die jahreszeitliche Verteilung schien mit dem Regenfall in den einzelnen Gegenden zu korrelieren, was die Wahrscheinlichkeit eines Vektors untermauerte (Jacobson et al., 2000). Die Zeckenfauna bei Hauskatzen in Südafrika ist bisher aber nur wenig untersucht. Bei Karakalen aus der Eastern Province (Cradock, Graaff-Reinet, Southwell) sowie bei Leoparden, Löwen und einem Serval aus dem Kruger National Park wurden 19 verschiedene Zeckenarten der Gattungen *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Amblyomma*, *Hylomma*, *Boophilus* und *Margaropus* gefunden, wobei *I. rubicundus* und *I. pilosus*, sowie *A. marmoreum* und *H. silacea* in der Eastern Province und *A. hebraeum*, *R. apendiculatus*, *R. zambeziensi*, *R. simus* und *H. leachi* im Kruger National Park vorherrschten (Horak et al., 2000). Übertragungsversuche von *B. felis* auf Hauskatzen mit *R. sanguineus* (Davis, 1929) und *H. leachii* (McNeil, 1937) scheiterten.

8.3 Klinik

Kenntnisse über klinische Erscheinungen einer Babesieninfektionen bei Hauskatzen in Südafrika stützen sich auf Erfahrungen mit natürlich infizierten Katzen, die in Form von Fallberichten oder Befragungen von Tierärzten oder Tierbesitzern vorliegen (Jackson und Dunning, 1937, McNeil, 1937, Robinson, 1963, Futter und Belonje, 1980, Jacobson et al., 2000). Häufigst beschriebene Symptomen waren Depression, Lethargie und Anorexie der Katzen. Als weitere typische Symptome wurden Anämie, Gewichtsverlust und Schwäche sowie ein stumpfes, glanzloses Fell angesehen (Futter und Belonje, 1980, Jacobson et al., 2000, Schoeman et al. 2001). Weniger häufig beobachtet wurden Ikterus, Fieber und Tachykardie (Futter und Belonje, 1980, Jacobson et al., 2000). Der Verlauf der Babesiose ist oft eher chronisch. Zum Zeitpunkt der tierärztlichen Untersuchung war die Krankheit oft schon fortgeschritten und von hochgradiger Anämie (Hkt < 15 %) gekennzeichnet (Schoeman et al., 2001). Der Anteil befallener Erythrozyten ist oft sehr hoch, so wurden in Untersuchungen bei 55 natürlich infizierten Katzen Parasitämien von 0,3 % bis 42,3 % nachgewiesen (Schoeman et al., 2001), aber auch ein Befall der Erythrozyten von 50 % und mehr wurde beschrieben (Futter und Belonje, 1980).

8.4 Diagnostik

Die Diagnose einer Babesieninfektion bei Katzen in Südafrika basiert auf dem Nachweis kleiner, intraerythrozytärer Piroplasmen in gefärbten Blutausstrichen. Dabei wurden routinemäßig Giemsa- oder von Tierärzten aus Zeitgründen oft ähnliche kommerzielle Schnellfärbungen (DiffQuick oder Stévenel's Blue) eingesetzt (Futter und Belonje, 1980). Dieser direkte Erregernachweis erlaubte jedoch keine Rückschlüsse auf die beteiligte Babesienart. Gerade bei kleinen Babesien wurde nachgewiesen, dass morphologische Kriterien für eine Artdifferenzierung nicht ausreichen. So waren *B. microti*, *B. gibsoni* und *T. equi* in Blutausstrichen nicht eindeutig voneinander abgrenzbar (Purnell, 1981, Conrad et al., 1992). Zum Nachweis spezifischer Antikörper von *B. felis* sowie *B. leo* wurde von der Protozoology Section des Onderstepoort Veterinary Institute, Südafrika, ein indirekter Immunfluoreszenztest (IFAT) entwickelt, der für den Einsatz in der Routinediagnostik allerdings nicht zur Verfügung steht (Penzhorn et al., 1999, López-Rebollar et al., 1999). Molekularbiologische Tests zur Diagnose feliner Babesien sind nicht bekannt. Erste genotypische Analysen mit Charakterisierung der 18S rDNA von kleinen Piroplasmen, isoliert aus einer Hauskatze, aus einem Karakal und aus Löwen vom Kruger National Park, lieferten jedoch erste Sequenzdaten für diesen Genabschnitt. Die Isolate wurden als *B. felis*, als *B. leo* und als *Babesia sp.* Caracal Strain A und B diagnostiziert (Penzhorn et al., 2001), und die Sequenzen stehen in der Sequenzdaten-Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) zur Verfügung. Für weiterführende Studien, v.a. auch für Untersuchungen zum vorhandenen Artenspektrum feliner Babesien in Südafrika, ist die Entwicklung spezifischer Nachweisverfahren unumgänglich und dringend notwendig.

8.5 Therapie

Die Therapie der felinen Babesiose ist nach wie vor unbefriedigend. Es ist kein Mittel bekannt, das zu einer vollständigen Erregereliminierung führt. Diese Problematik ist auch bei vielen anderen kleinen Babesien bekannt (Yamane et al., 1993). Bis 1980 wurden Tetrazykline, manchmal in Kombination mit Trypanblau, und Cephaloridine zur Behandlung feliner Babesiose eingesetzt (Brownlie, 1954, Robinson, 1963, Dorrington et al., 1966). Im Jahr 1981 wurde dann die Wirksamkeit von 10 Medikamenten an 41 experimentell infizierten

Katzen getestet (Potgieter, 1981). Das einzige effektive Präparat zur Bekämpfung von *B. felis* war Primaquinphosphat aus der Gruppe der 8-Aminoquinoline, das auch zur Therapie von Malaria eingesetzt wird. Eine Sterilisation der Infektion wurde, wie z. T. auch bei anderen Babesiziden bekannt, zwar nicht erreicht, Primaquinphosphat senkte jedoch die Parasitämie signifikant ab (Potgieter, 1981). Andere Anti-Babesien-Präparate, wie Diminazenaceturat, Imidocarbdiopropionat und Trypanblau oder Buparvaquon, das zur Behandlung von Theilerien eingesetzt wird sowie Fluoroquinolone (Enrofloxazin, Danofloxazin) erwiesen sich als unwirksam oder aufgrund z. T. sehr starker Nebenwirkungen als ungeeignet (Potgieter, 1981, Penzhorn et al., 2000). Trotz unerwünschten Nebenwirkungen, wie Erbrechen bei oraler Verabreichung, und relativ enger therapeutischer Breite (falls über 1 mg/kg dosiert wird) ist Primaquinphosphat derzeit Mittel der Wahl (Penzhorn et al., 2000). Als Behandlungsschema werden 0,5 mg/kg p.o. (Primaquine[®], Centaur), dreimal im Intervall von 72 Stunden, gefolgt von dreimal 0,5 mg/kg p.o. im wöchentlichen Intervall empfohlen (Penzhorn et al., 2000).

C Real-time PCR als diagnostische Methode

1. Prinzip der Real-time PCR

Bei der Real-time PCR werden wie bei konventionellen PCR-Methoden, DNA-Abschnitte vervielfältigt. Zusätzlich werden jedoch schon während des Laufs PCR-Produkte durch Messung entstehender Fluoreszenz nachgewiesen. Post-PCR-Prozesse, die bei der konventionellen PCR zum Nachweis des PCR-Produkts notwendig sind, entfallen daher. So kann auf eine Gelelektrophorese, bei der das Öffnen der Reaktionsgefäße und ein offenes Arbeiten mit den Ansätzen unumgänglich ist, verzichtet werden. Die Gefahr einer Kontamination, die bei herkömmlichen PCR-Verfahren ein großes Problem darstellt, wird durch dieses geschlossene System wesentlich reduziert. Darüber hinaus ist das Verfahren schneller („Echtzeit“) und liefert sowohl qualitative als auch quantitative Ergebnisse.

PCR-Produkte werden bei der Real-time PCR durch Messung von Fluoreszenz nachgewiesen. Die Messung erfolgt dabei während jedes PCR-Zyklus des Laufs, so dass Fluoreszenzanstiege, die sich parallel zum Anstieg der Menge der PCR-Produkte verhalten, detektiert werden können. Grundsätzlich lassen sich spezifische und unspezifische DNA-Nachweisverfahren unterscheiden. Bei spezifischen Detektionssystemen werden Sonden, also Oligonukleotide verwendet, die nur an DNA-Stücke mit komplementärer Basensequenz binden. Es entsteht also nur ein Signal, wenn diese spezifische Basensequenz vorkommt, aber nicht bei unspezifischen PCR-Produkten oder Primer-Dimeren. Nachteile dieses Systems sind der derzeitige hohe Preis der Sonden und die Notwendigkeit genauer Kenntnisse über die zu amplifizierende Sequenz, denn nur dann können geeignete Sonden konstruiert werden. In unspezifischen Detektionssystemen werden Farbstoffe, wie SYBR Green, eingesetzt, die zwischen die Basen von Doppelstrang-DNA interkalieren und dann fluoreszieren. Dies ist einfach und relativ billig. Da Fluoreszenzsignale jedoch nicht nur bei Entstehung des spezifischen PCR-Produkts, sondern auch bei unspezifischen Produkten und Primer-Dimere entstehen, muss das spezifische Produkt beispielsweise mit Hilfe von Schmelzkurvenanalysen identifiziert werden, was nicht immer eindeutig möglich ist.

2. Real-time PCR - Sonden

Hybridisierungssonden sind Oligonukleotide, die an Nukleotidstücke mit komplementärer Basensequenz binden. Bei der Real-time PCR werden Sonden verwendet, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Fluorophore sind sensibel auf ihre Umgebung. Sie können durch benachbarte Moleküle, besonders durch andere Chromophore „gequencht“ werden, das heißt in ihrer Fluoreszenz gemindert oder gar gelöscht werden. Umgekehrt können benachbarte Fluorophore ihre Energie aufeinander übertragen, ein Phänomen, das als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet wird. Ein Fluorophor stellt das sog. Reportermolekül, das andere das sog. Quencher-molekül dar. Solange beide Moleküle in der Hybridisierungssonde benachbart zueinander liegen, wird das Reportermolekül „gequencht“, das heißt, die Fluoreszenz wird unterdrückt. Bei Vorliegen spezifischer Amplifikate hybridisieren die Sonden mit der Target-DNA, was eine räumliche Trennung der beiden Moleküle mit sich bringt. Dadurch wird die „Unterdrückungsfunktion“ aufgehoben und die Fluoreszenz des Reportermoleküls kann gemessen werden. Während des PCR-Laufs steigt die Anzahl der verfügbaren Target-Moleküle, so dass immer mehr Sondenmoleküle binden können. Die messbare Fluoreszenzzunahme korreliert direkt mit der in der Reaktion gebildeten PCR-Produktmenge. Es gibt verschiedene SONDENSYSTEME, die im Aufbau der Sonde variieren. Zwei der meist verwendeten Sonden, und zwar TaqMan-Sonden und Molecular Beacon, sollen im Nachfolgenden kurz dargestellt werden.

2.1 TaqMan-Sonden

Beim TaqMan-Prinzip binden die Fluoreszenz-markierten Sonden zunächst am komplementären Zielstrang zwischen den Primerbindungsstellen. Bei der Synthese des zweiten Strangs während der Kettenverlängerungsphase der PCR wird die Hybridisierungssonde durch die 3'- Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten, und diese Bruchstücke werden aus dem Zielstrang freigesetzt. Dadurch werden Reporter- und Quencher-molekül räumlich getrennt und die Unterdrückungsfunktion des 'Quenchers' aufgehoben. Die Zunahme der Fluoreszenz des Reportermoleküls wird gemessen. Die Taq-Polymerase entfaltet ihre 3'- Exonukleaseaktivität nur am DNA-Doppelstrang. Daher bleiben die nichthybridisierten Sondenmoleküle (DNA-

Einzelstränge) unbeschadet und zeigen demzufolge auch keine messbare Fluoreszenz (Abb. 2).

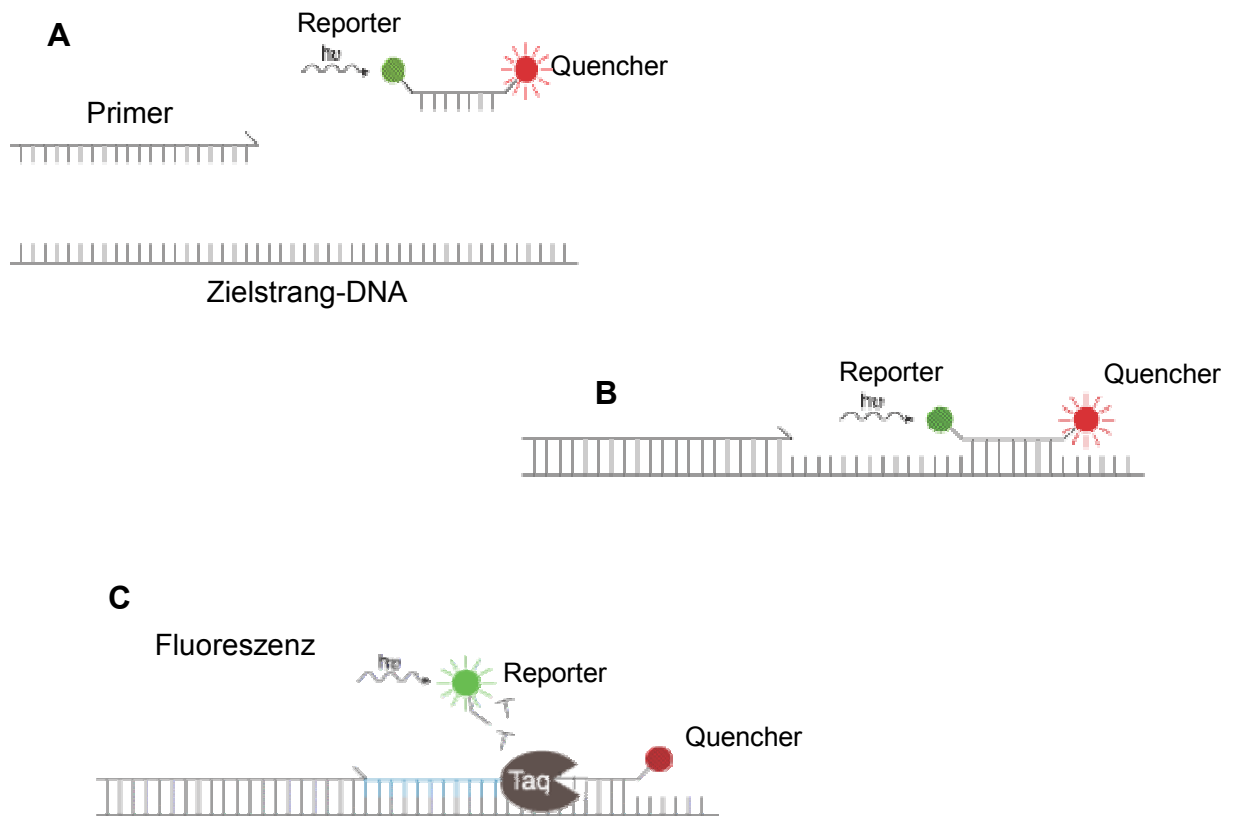


Abb. 2: Aufbau und Funktionsprinzip einer TaqMan-Sonde (modifiziert nach www.probes.com), **A** Primer, TaqMan-Sonde und Zielstrang-DNA liegen ungebunden vor, **B** Primer und TaqMan-Sonde binden an Zielstrang-DNA, **C** Taq-Polymerase trennt mittels 3'-Exonukleaseaktivität Reporter- von Quencher-Molekül, messbare Fluoreszenz entsteht

2.2 Molecular Beacons

Molecular Beacons (Tyagi et al., 1996) sind ebenfalls Fluoreszenz-markierte Hybridisierungssonden, besitzen jedoch eine andere Struktur. Sie sind so konstruiert, dass die zum Zielstrang komplementäre Sequenz („Loop“) am 5'- und am 3'-Ende um einen selbstkomplementären Sequenzabschnitt („Stem“) mit einer Basenlänge von ungefähr 6

Nukleotiden erweitert ist und das Molekül dadurch eine Haarnadelstruktur erhält. Reporter- und Quencher-molekül befinden sich am 3'- und am 5'-Ende, so dass die Konformation des Moleküls in seinem Grundzustand, der Haarnadelstruktur, eine räumliche Nähe von Reporter und Quencher und damit die Unterdrückung einer messbaren Fluoreszenz durch den 'Quencher' bedingt. Durch den Hybridisierungsvorgang am spezifischen Produkt wird diese Haarnadel-Konformation aufgelöst, und die Reporterfluoreszenz wird durch die räumlichen Trennung der beiden Fluorophore messbar (Abb. 3). Molecular Beacons gelten als extrem spezifisch. Bereits bei Fehlpaarung von nur einer Base bleibt eine Hybridisierung mit dem Zielgen aus (Tyagi et al., 1996).

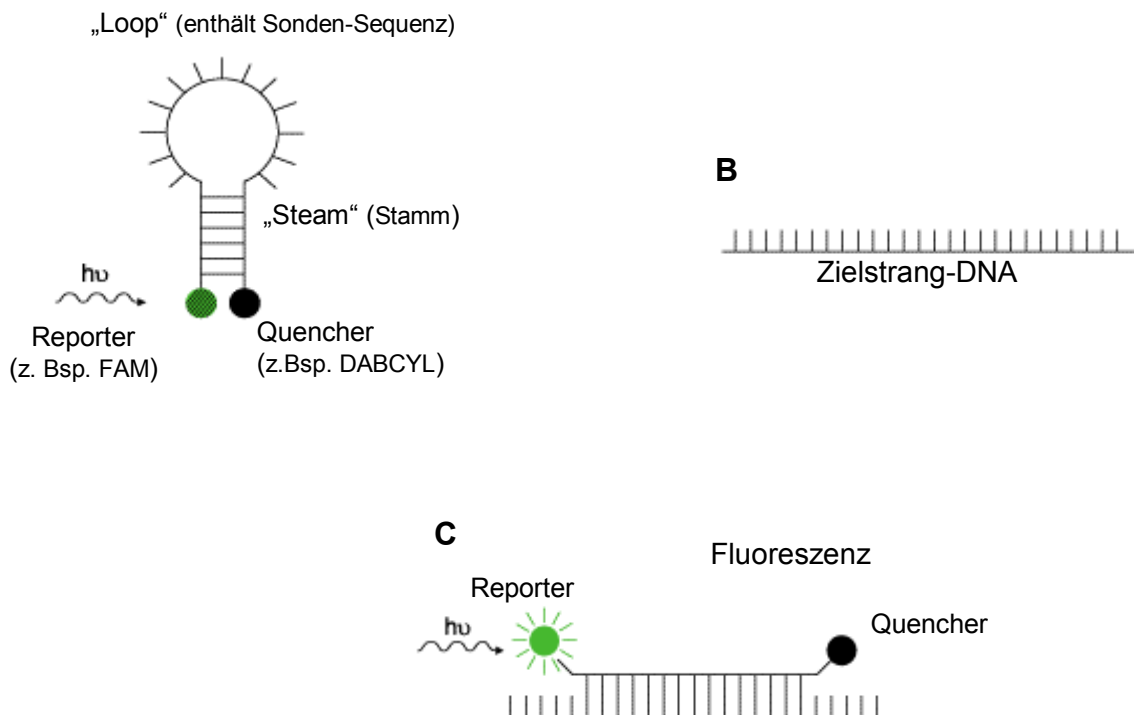


Abb. 3: Aufbau und Funktionsprinzip eines Molecular Beacon (modifiziert nach www.probes.com), **A** ungebundener Molecular Beacon in Haarnadelstruktur, **B** Zielstrang-DNA (Einzelstrang), **C** an den Zielstrang gebundener Molecular Beacon; Haarnadelstruktur aufgehoben, messbare Fluoreszenz

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A Material und Methoden

1. Untersuchungsgebiet

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Blutproben stammen alle, mit Ausnahme der Negativkontrollen, von Katzen aus Südafrika. Als südlichstes Land des afrikanischen Kontinents, mit einer Fläche von mehr als 1,22 km², liegt Südafrika zwischen dem 22. und 34. Grad südlicher Breite und fällt somit in den Bereich der Subtropen. Im Vergleich zu anderen subtropischen Gebieten ist das Klima in Südafrika jedoch eher gemäßigt, was nicht zuletzt durch den kalten, von Westen nordwärts ziehenden Benguela-Strom und die Höhenlage im zentralen Hochland, v. a. um Johannesburg („Highvelds“) bedingt ist. Politisch ist das Land in 9 Provinzen eingeteilt. Das Untersuchungsgebiet Port Elizabeth ist mit mehr als 1 Mio. Einwohnern die Hauptstadt der Provinz „Eastern Cape“ und liegt an der Südküste des Landes am Indischen Ozean (Abb. 4).

2. Studientiere und statistische Datenanalyse

In die Studie aufgenommen wurden Katzen aus dem Patientengut der „Kragga Kamma Veterinary Clinic“ in Port Elizabeth. Dabei wurden von den Katzen, die im Zeitraum von Ende Oktober 2001 bis Anfang April 2002 die Klinik aufsuchten, 206 Tiere zufällig ausgesucht und mit K 1 bis K 206 bezeichnet. Wie in Abb. 5 dargestellt, wurden in einem Dokumentationsbogen für jede Katze die Parameter Alter, Rasse, Geschlecht, Haltung und Herkunft sowie einzelne Patientencharakteristika in Bezug auf die Babesieninfektion erfasst. Bei der Haltung der Katzen wurde zwischen reinen Hauskatzen, als „indoor“- Katzen bezeichnet, Katzen, die sich ausschließlich im Freien aufhalten (sogenannte „outdoor“-Katzen) und Freiläuferkatzen, die sich sowohl im Haus, als auch draußen aufhalten („indoor/outdoor“) unterschieden. Als Herkunft der Katzen wurde der Stadtteil erfasst, in dem die Wohnung des Besitzers lag. Tiere, die nicht aus Port Elizabeth stammten, aber trotzdem in die Untersuchung miteinbezogen wurden, wurden unter dem Punkt „außerhalb Port

Elizabeths“ zusammengefasst. Festgestellte Krankheitssymptome wurden unter dem Punkt „Grund der Vorstellung“, „Habitus“ oder „sonstige Bemerkungen“ erfasst (Abb. 5).



Abb. 4: Untersuchungsgebiet Port Elizabeth, Südafrika

Dokumentationsbogen zur Katzenbabesiose

Katzen Nr.:

Tag der Vorstellung:

Grund der Vorstellung:

Name des Tieres:

Besitzer:

Herkunft: Port Elizabeth, Stadtteil _____
 außerhalb

Rasse:

Alter:

Geschlecht: weiblich männlich kastriert

Haltung: indoor indoor/outdoor outdoor

Habitus: ungestört gestört

Ausstrich: positiv negativ

Vorbehandlung: nein
 ja, _____

Therapie:

Weiterer Verlauf:

Sonstige Bemerkungen:

Abb. 5: Dokumentationsbogen

Zur statistischen Auswertung der Patientendaten wurde der Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) eingesetzt. Der χ^2 -Test ist eine statistische Methode zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen. Es werden zwei qualitative Merkmale X und Y simultan betrachtet, um herauszufinden, ob sie zueinander in Beziehung stehen und, falls ja, um was für eine Beziehung es sich handelt und wie stark sie ist (Signifikanzprüfung). Als signifikant gilt das Ergebnis, wenn die Annahme berechtigt ist, dass ein theoretisch angenommener und in den Daten vorgefundener Zusammenhang zwischen Merkmalen nicht alleine durch die Unschärfe erklärt werden kann, die mit der Stichprobenbeziehung verbunden ist. Die Berechtigung dieser Annahme kann nie mit Sicherheit erwiesen werden, sondern nur mit einer gewissen, vorab festzulegenden Wahrscheinlichkeit. Diese bezeichnet man als Signifikanzniveau. Hier wurde, wie allgemein üblich, ein Signifikanzniveau (α) von 0,05 festgelegt, was bedeutet, dass man ein Ergebnis als signifikant akzeptiert, welches rein zufällig nur in 5 Prozent aller Stichprobenziehungen auftreten würde. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die dokumentierten Patientencharakteristika Alter, Rasse, Geschlecht, Haltung, Herkunft Krankheitssymptome mit einer Babesieninfektion in Zusammenhang stehen. Die beobachteten Häufigkeiten zweier zu analysierenden Merkmale wurden in eine Vier-Felder-Tafel eingetragen.

Babesien- infektion (X)	Geschlecht (Y)		Summe
	w	m	
positiv	a	b	a + b
negativ	c	d	c + d
Summe	a + c	b + d	n = a+b+c+d

Tab. 2: Beispiel einer Vier-Felder-Tafel für die beiden qualitative Merkmale Babesieninfektion (X) und Geschlecht (Y) zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen

a, b, c, d = Anzahl der Tiere mit dem entsprechenden Merkmal
w = weiblich
m = männlich

Für jedes der vier Felder (a, b, c und d) wurde die Differenz aus beobachteter und erwarteter Häufigkeit gebildet, quadriert und durch die erwartete Häufigkeit geteilt. Der χ^2 - Wert entsprach der Summe der entsprechenden Werte für alle vier Felder.

Zur Ermittlung des χ^2 -Wertes wurde folgende vereinfachte Formel verwendet:

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 \cdot n}{(a+c)(b+d)(a+b)(c+d)}$$

Bei völliger Übereinstimmung von beobachteter und erwarteter Häufigkeit ergibt sich ein χ^2 - Wert von 0. Mit einem Computerprogramm (<http://medweb.uni-muenster.de/institute/imib/lehre/skripte/biomathe/bio/chi.html>) wurde für alle zu untersuchenden Merkmale der χ^2 - Wert und zusätzlich die entsprechende Signifikanz p berechnet. Bei einem vorher festgelegten Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ gilt $\chi^2 > 3,84$ und $p < 0,05$ als „signifikant“.

3. Gewinnung der Blutproben für die molekularbiologische Untersuchung und Serologie

Blut wurde aus der *V. cephalica antibrachii* entnommen, in einem Serumröhrchen (BD Vacutainer SST, Preanalytic Solutions, UK) aufgefangen und sofort zentrifugiert (Tischzentrifuge Heraeus Christ GmbH, Typ 00702, VA max.60, höchste Stufe für ca. 5 min). Anschließend wurde das Serum von der zellhaltigen Fraktion abpipettiert und beide Anteile separat bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

4. Herstellung eines Blutausstriches und lichtmikroskopische Untersuchung

Zusätzlich wurde von jeder Katze ein Blutausstrich angefertigt. Dazu wurde ein Tropfen Blut durch Punktion der Ohrtrandvene gewonnen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Der luftgetrocknete Ausstrich wurde mit der DiffQuick-Färbemethode (KYRO-Quick Stain, Kyron Laboratories (PTY) LTD, Benrose 2094) nach Anleitung des Herstellers gefärbt. Alle Blutausstriche wurden anschließend lichtmikroskopisch auf Babesien untersucht. Dabei wurden sie für mind. 10 min im Fahnenbereich mäanderförmig durchmustert und das Ergebnis im Dokumentationsbogen vermerkt. Außerdem wurden morphologische

Besonderheiten, wie überdurchschnittliche Größe, „Malteserkreuz“- Formation oder vermehrtes Auftreten von Formen, die für *Babesia felis* als eher untypisch gelten (z. B. Birnenformen), festgehalten. Positive Ausstriche wurden aufbewahrt und negative Ausstriche nach der Untersuchung verworfen.

5. Molekularbiologische Untersuchungen

5.1 DNA-Extraktion

Zur Extraktion der Babesien-DNA wurde ein Silikageladsorptions-Verfahren mit vorausgehender Proteinase K-Verdauung unter Verwendung des „QIAamp DNA Blood Mini Kits“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Es wurden immer 11 Blutproben gleichzeitig bearbeitet und eine Negativkontrolle, bestehend aus PBS parallel mitgeführt. Nach Anleitung des Herstellers wurde zunächst 200 µl aus der zellhaltigen Fraktion der Blutproben (Kap. 3) entnommen und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 20 µl Protease (25 mg mit 1,2 ml Proteinase-Lösungsmittel verdünnt, nach Angaben des Herstellers) versetzt. Falls das Probenvolumen weniger als 200 µl betrug, wurde mit entsprechender Menge PBS (8,5 g/l NaCl, 0,85 g/l Na₂HPO₄·2H₂O, 0,25 g/l KH₂PO₄; pH 7,2) auf 200 µl aufgefüllt. Dann wurden 200 µl des mitgelieferten Puffers „AL“ zum Proben-Protease-Gemisch hinzugefügt, gut gemischt, anschließend 10 min bei 56 °C inkubiert und 200 µl Ethanol absolut (Roth, Karlsruhe) zugegeben. Der gesamte Inhalt des Eppendorfgefäßes wurde jetzt in ein mit einer Silikagelmembran versehenes „QIAamp spin“ - Säulchen überführt und 1 min (Tischzentrifuge, Standardgeschwindigkeit 10900 rpm [10500xg]; Abbott Diagnostics Division, Wiesbaden) zentrifugiert. Die DNA wurde dabei an die sich in den Säulen befindliche Membran gebunden. Im nächsten Schritt wurde die DNA mit nach Anleitung des Herstellers hergestellten Gebrauchslösungen der Waschpuffer „AW1“ und „AW2“ gewaschen. Zur anschließenden Elution der gewonnenen DNA wurden die QIAamp Säulen in 1,5 ml Eppendorfgefäße gesteckt, 200 µl mitgelieferter Elutionspuffer „AE“ dazugegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach 1 min (10900 rpm) zentrifugiert. Die sich nun im Eppendorfgefäß befindende DNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Zusammensetzung der Puffer „AL“, „AW1“, „AW2“ und „AE“ wurden vom Hersteller nicht angegeben.

5.1 Charakterisierung der 18S-rDNA-Sequenz der Babesien zur molekularbiologischen Artdiagnose

5.2.1 Auswahl der Proben

Für die Untersuchung wurde die DNA-Lösung (Kap. 5.1) aus Blutproben von 13 Katzen ausgewählt, bei denen im Ausstrich Babesien diagnostiziert worden waren. Darin waren Proben enthalten, die morphologische Besonderheiten im Blutausstrich gezeigt hatten (Kap. 4) oder die trotz im Ausstrich nachgewiesenen Babesien im IFAT negativ reagierten (Patienten K 8, K 68), um eines möglichst breiten Spektrums an Genotypen zu erfassen. Zusätzlich wurde auf eine großflächige Verteilung bei der Herkunft der Katzen im Untersuchungsgebiet und auf eine gleichmäßige zeitliche Verteilung innerhalb des Untersuchungszeitraumes geachtet.

5.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode dient der Amplifizierung, d.h. der Vervielfältigung, von bestimmten Genabschnitten. Für die Amplifizierung der 18S-rDNA-Sequenz wurden Primer eingesetzt, die bereits bei anderen kleinen Babesienarten, *Babesia microti* (Zahler et al., 2000c) und *Babesia gibsoni* (Zahler et al., 2000a und b) für diesen Genabschnitt erfolgreich eingesetzt wurden. Der „upstream“ Primer RIB-19 (Tab. 3), ein modifizierter Universalprimer, bindet an einen Bereich am 5'-Ende der 18S, der innerhalb Eukaryonten konserviert ist. Der „downstream“ Primer RIB-20 (Tab. 2) zielt auf einen Abschnitt am 3'-Ende der bei Babesien und Theilerien konserviert ist (Zahler et al., 2000a, b und c). Dabei wurde darauf geachtet, dass das 3'-Ende, das wichtig für die Spezifität des Primers ist, nicht auf Zecken-, Pilz- oder Säuger-DNA passt. Die PCR erfolgte unter Anwendung der sogenannten „hot-start“-Technik. Dafür wurden 5 µl DNA-Lösung, je 1 µl (50 µM) der jeweiligen beiden Primer, 1,8 µl (25 mM) MgCl₂ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), sowie 35,3 µl H₂O in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 2 Tropfen Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) überschichtet und in einem PCR-Gerät (UNO II-Thermoblock, Biometra, Göttingen) für 2 min bei 96 °C denaturiert. Nach der Abkühlung auf 85 °C wurde eine Mischung („Master-Mix“), bestehend aus 5 µl 10x

PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl [pH 8,3], 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 0,4 µl dNTP-Mix (je 25 mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP; United States Biochemicals, Bad Homburg) und 0,5 µl (5 units/µl) Taq-DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) hinzugefügt. Dieser initiale Denaturierungsschritt bei 96 °C, sowie die Zugabe des „Master-Mixes“ bei 85 °C (sog. „hot-start“) dienen der Vermeidung einer unspezifischen Bindung der Primer und einer möglichst vollständigen Denaturierung der genomischen Doppelstrang-DNA. Daraufhin folgten 30 Amplifikationszyklen in der Abfolge Denaturierung bei 92 °C für 1 min, Primer-Hybridisierung („Annealing“) bei 54 °C für ebenfalls 1 min und Primer-Extension bei 72 °C für 90 s.

Tab. 3: Sequenzen der PCR-Primer für die 18S rDNA (Zahler et al., 2000a, b und c)

RIB-19: 5´-CGG GAT CCA ACC TGG TTG ACT CTG C-3´

RIB-20: 5´-CCG AAT TCC TTG TTA CGA CTT CTC-3´

5.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Sichtbarmachung der amplifizierten PCR-Produkte wurde eine Agarosegel-Elektrophorese („Bioplex“ Gelelektrophoresekammer; Strehlau und Kruse, Freiburg) bei maximal 35 V und 40 mA durchgeführt. Zur Herstellung eines 1,3%-igen Agarosegels wurden 0,57 g Agarose („molecular biology quality“; Appligene, Heidelberg) in 44 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 7,8) aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C und Zugabe von 1 µl 1 %-iger Ethidiumbromid-Lösung (Sigma, Deisenhofen) zur Anfärbung der Nukleinsäuren wurde das noch flüssige Gel in die Gelelektrophoresekammer gegossen und nach Aushärten ca. 5 mm hoch mit TAE-Puffer überschichtet. Jeweils 9 µl der PCR-Ansätze wurden mit 1µl 10x Agaroseblaupuffer (1% SDS, 0,25 % Bromphenolblau, 15 % Ficoll 400, 0,1 M EDTA) zur Laufkontrolle versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur genauen Bestimmung der Bandengröße wurden in jedem Gel zusätzlich 10 µl eines 1 kb-Leiter (1 µg/µl, GibcoBRL[®], Eggenstein) als Größenstandard verwendet. Durch die Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid zwischen die

Basen des DNA-Doppelstranges wurden Banden von PCR-Produkten im UV-Licht (UV-Leuchttisch Typ B IL-350-M, 312 nm, Bachhofer GmbH, Reutlingen) sichtbar gemacht und fotografiert (Polaroidfilm Typ „667“, Sigma). Falls bei einzelnen Isolaten der erste PCR-Durchgang nur sehr schwache oder gar keine Banden der erwarteten Größe hervorbrachte, wurde in einer erneuten PCR die DNA-Menge der jeweiligen Proben (je 1 µl, 5 µl, sowie 20 µl DNA-Lösung) variiert. Wenn auch dann kein PCR-Produkt in der Größe von ca. 1,6 kb entstand, wurde mit der entsprechenden Blutprobe erneut eine DNA-Extraktion wie schon beschrieben (Kap. 5.1) durchgeführt.

5.2.4 Reinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Entfernung von die Sequenzierungsreaktion möglicherweise störenden Komponenten wurde die DNA mit dem „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (Quiagen, Hilden) gereinigt. Hierfür wurde der gesamte Inhalt des PCR-Tubes in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit dem 5-fachen Volumen Puffer „PB“ (keine weiteren Angaben vom Hersteller) versetzt. Dieses Gemisch wurde nun in ein Zentrifugensäulchen mit Silikagelmembran gegeben und 60 s zentrifugiert (Biofuge 13, Standardgeschwindigkeit 13000 rpm [13793xg]; Heraeus Instrumente, Osterode). Im nächsten Schritt wurde die an die Membran adsorbierte DNA mit 750 µl Waschpuffer „PE“ (6 ml Pufferkonzentrat, versetzt mit 24 ml Ethanol abs. [Roth, Karlsruhe]) gewaschen und dann in 100 µl Elutionspuffer „EB“ (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) eluiert. Die anschließende Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 25 µl 10 M Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt) und 200 µl 100%-igem Ethanol (Roth, Karlsruhe) zum Eluat bei -20 °C für 1 Stunde. Nach anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C (12000 rpm [15300xg]; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand abdekantiert, 200 µl 70%-igem Ethanol (Roth, Karlsruhe) zugegeben und nochmals 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach vollständigem Abpipettieren der Flüssigkeit bei Raumtemperatur getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg.

5.2.5 Sequenzanalyse

Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Computer-Programmes „DNAMAN“ (Lynnon Bio Soft, Quebec, Kanada). Zur Ausrichtung („Alignment“) von 2 Nukleotidsequenzen wurde das Programm „Two Sequence Alignment“ mit der „Dynamic Alignment“-Methode (abgeleitet von Smith und Waterman, 1981, Feng und Doolittle, 1987 und Thompson et al., 1994) und den Parametern „Gap open penalty“ von 10, „Gap extension penalty“ von 5 und „DNA transition weight“ von 0,5 angewandt. Zur Analyse von mehreren Sequenzen wurde das Programm „Multiple Alignment“, mit dem „Full Alignment“, ebenfalls einer „Dynamic Alignment“-Methode, und den Parametern „Gap open penalty“ von 10, „Gap extension penalty“ von 5 und „Delay divergent sequences“ von 30 % gewählt. Die Sequenzen wurden Position für Position miteinander verglichen. Mutationen, die unter Einbeziehung aller verfügbarer Sequenzen an einer bestimmten Position nur einmal festgestellt wurden, wurden als Polymerasefehler bzw. davon nicht unterscheidbar als seltener Genotyp bewertet und entsprechend den anderen Sequenzen korrigiert. Mehrfach vorkommende Mutationen wurden als „echte Polymorphismen“ angesehen und als Einbuchstabencode der entsprechenden Nukleotide angegeben (R=A/G, Y=C/T, K=G/T, M=A/C, S=G/C, W=A/T, D=A/G/T, V=A/GC). Zur Berechnung der prozentualen Polymerasefehlerrate wurden alle nur einmal in den analysierten Sequenzen vorkommenden Basensubstitutionen und Insertionen/Deletionen addiert und dieser Wert durch die Gesamtanzahl der Basen aller analysierten Sequenzen geteilt und mit 100 multipliziert. Die Polymorphismusrate (%) wurde bestimmt, indem die Anzahl der „echten Polymorphismen“ durch die durchschnittliche Basenlänge geteilt und mit 100 multipliziert wurde. Die Sequenzidentitäten ergaben sich aus der Differenz zwischen 100 % und der entsprechenden Polymorphismusrate.

Aus den Alignments wurden phylogenetische Beziehungen und deren graphische Darstellung als Dendrogramme mit einem Distance-Matrix-Programm und der „Neighbour-Joining-Methode (Saitou und Nei, 1987) unter Verwendung des Programms „Phylogenetic tree“ („DNAMAN“) erstellt.

5.3 Untersuchung des ITS-Genabschnittes der Babesien zur genotypischen Analyse der Artvariation

5.3.1 Auswahl der Proben

Für die Untersuchung diente die DNA-Lösung aus den Blutproben der 13 Katzen, die bereits zur Charakterisierung der 18S-rDNA-Sequenz herangezogen wurden (Kap. 5.2.1).

5.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Erfassung einer potentiellen innerartlichen Variabilität wurde die Region des internen transkribierten Spacer (ITS) der rDNA ausgewählt, die aus den Internen transkribierten Spacern 1 und 2 sowie der dazwischen liegenden 5,8S-Region besteht. Diese Region ist weniger stark konserviert als die 18S-Region und daher zur Erfassung von genotypischen Unterschieden zwischen nahe verwandten Individuen besser geeignet als die 18S-rDNA. Zur Amplifizierung wurden Primer verwendet, die bereits bei *Babesia canis* (Zahler et al., 1998) eingesetzt worden waren. Der „upstream“ Primer RIB-13 (Tab. 4) wurde homolog zu einem Bereich nahe des 3'-Endes der 18S rRNA codierenden Region konstruiert, welche bei verschiedenen Babesienarten konserviert ist (Zahler et al., 1998). Außerdem wurde darauf geachtet, dass das kritische 3'-Ende des Primers nicht auf Zecken-, Pilz- oder Säugetier-DNA passt. Als „downstream“ Primer wurde ein auf die 28S-Region gerichteter Universalprimer RIB-3 (Tab. 4) verwendet (Zahler et al., 1995). Der Primer bindet an einen Genabschnitt, der im Tier- sowie Pflanzenreich hochgradig konserviert ist. Zur Erleichterung der nachfolgenden Klonierung wurden Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Eco*RI am 5'-Ende von RIB-3 bzw. RIB-13 eingefügt. Die PCR erfolgte wieder unter Anwendung der sogenannten „hot-start“-Technik (vgl. 5.2.2). Hierfür wurden 5 µl DNA-Lösung, je 1 µl (50µM) der Primer RIB-3 und RIB-13, 1,8 µl (25 µM) MgCl₂ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und je 2 µl 100x BSA (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und DMSO (Roth, Karlsruhe) in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert, mit 2 Tropfen Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) überschichtet und im einem PCR-Gerät (UNO II-Thermoblock, Biometra, Göttingen) für 2 min bei 96 °C denaturiert. Nach der Abkühlung auf 85 °C wurde ein „Master-Mix“, bestehend aus 5 µl 10x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl [pH 8,3], 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂;

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 0,4 µl dNTP-Mix (je 25 mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP; United States Biochemicals, Bad Homburg) und 0,5 µl (5 Units/µl) Taq-DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) hinzugefügt. Es erfolgten 30 Zyklen mit der Abfolge Denaturierung bei 92 °C für 1 min, Primer-Hybridisierung („Annealing“) bei 52 °C für ebenfalls 1 min und Primer-Extension bei 72 °C für 90 s.

Tab. 4: Sequenzen der PCR-Primer für den ITS-Genabschnitt mit eingefügten Schnittstellen (fettgedruckt) der Restriktionsendonukleasen (Zahler et al., 1995, 1998)

RIB-13: 5'-CC **G AAT TC*** T TTG TGA ACC TTA TCA-3'

RIB-3: 5'-CG **G GAT CC****T TC(A,G) CTA GCC G(C,T)T ACT-3'

* *Eco*RI-Schnittstelle

** *Bam*HI-Schnittstelle

5.3.3 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Sichtbarmachung der amplifizierten PCR-Produkte und Überprüfung ihrer Größe wurde nach der PCR eine Agarosegel-Elektrophorese, wie bereits in Kap. 5.2.3 ausführlich beschrieben, durchgeführt.

5.3.4 Reinigung der PCR-Produkte und Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Zur weiteren Verarbeitung wurden die DNA-Banden im Agarosegel knapp entlang ihrer Grenzen mit einem abgeflammt und ausgekühlten Skalpel ausgeschnitten und in 1,5 ml Eppendorfgläser verbracht. Anschließend wurde ein sog. „GeneClean“ („GeneClean[®] III-Kit“, Q-Bio Gene, Bio 101[®] Systems, USA), basierend auf einer Silikageladsorption, durchgeführt. Zunächst wurden die Gelbanden einzeln gewogen (Tischwage Sartorius, BP210D, Sartorius Werke, Göttingen) und anschließend zum Lösen der Agarose mit der 2,5fachen Menge einer 6M NaJ-Lösung versetzt und ca. 5 min bei 50 °C inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst

war, d.h. keine Schlieren mehr zu sehen waren. Bei Gelstücken mit einem Gewicht unter 50 mg erfolgte zunächst eine Ergänzung mit H₂O bis zu dieser Gewichtsmarke. Durch Zugabe von 5 µl „Glasmilch“, einer Silikagelsuspension, und anschließender Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde die DNA gebunden. Die Silikapartikel wurden während des Inkubierens durch mehrfaches Vortexen (Vortex Genie 2, Bender und Hobein AG, Zürich) in Suspension gehalten. Nach 13 s Zentrifugieren (Biofuge 13, Standardgeschwindigkeit 13000 rpm [13793xg]; Heraeus Instrumente, Osterode) wurde der Überstand abdekantiert und das Sediment („Pellet“) anschließend dreimal mit 250 µl einer alkoholischen Waschlösung („New Wash“; 14 ml Konzentrat wurden gemäß der Anleitung des Herstellers mit 280 ml Aqua dest. und 310 ml 100%igem Ethanol verdünnt) gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurde das Pellet in dieser Waschlösung resuspendiert, das Gemisch anschließend für 11 s zentrifugiert und der Überstand wieder abdekantiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der restliche Überstand nach weiterem kurzen Anzentrifugieren vollends vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde dann für ca. 20 min bei Raumtemperatur getrocknet, in 18 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0) resuspendiert und 3 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 2-minütigem Zentrifugieren wurden 16 µl des Überstandes abpipettiert und für den anschließenden Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI in ein neues Eppendorfgefäß verbracht. Zu den 16 µl DNA-Lösung wurden jeweils zunächst 2 µl (20 U/µl) *Bam*HI (New England BioLabs, Schwalbach) und 2 µl NEBuffer für *Bam*HI (1,5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT [pH 7,9]; New England BioLabs, Schwalbach) sowie 0,2 µl (100 µl/ml) BSA (New England BioLabs, Schwalbach) hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 1 h wurden dem Gemisch 2 µl (15 U/µl) *Eco*RI (Amersham Biosciences, Freiburg) und 3 µl (100 µl/ml) des dazugehörigen Puffer „H“ (500 mM Tris-HCl [pH 7,5], 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1000 mM NaCl; Amersham Biosciences, Freiburg) hinzugefügt, mit 24,8 µl Aqua dest. auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte erneut eine Reinigung der DNA („GeneClean[®]III-Kit“, Q-Bio gene, Bio 101[®] Systems, USA) und Elution der DNA in 8 µl TE-Puffer.

5.3.5 Vektorherstellung

Für die Klonierung der PCR-Produkte wurde zunächst ein mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI geschnittener Vektor hergestellt. Hierzu wurden 13,6 µl (0,25 µg/µl) des Plasmids „pBlueskript II SK(-)“ (Abb. 6; Stratagene, Heidelberg) mit 2,4 µl H₂O, 2 µl NEBuffer für *Bam*HI (1,5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT [pH 7,9]; New England BioLabs, Schwalbach), 2 µl (20 U/µl) *Bam*HI (New England BioLabs, Schwalbach) und 0,2 µl 100x BSA (New England BioLabs, Schwalbach) in ein Eppendorfgefäß pipettiert und 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 24,5 µl H₂O, 3 µl 10x Puffer „H“ (500 mM Tris-HCl [pH 7,5], 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1000 mM NaCl; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 2 µl (15 U/µl) *Eco*RI (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 0,5 µl 100x BSA (New England BioLabs, Schwalbach) wurde weitere 60 min bei 37 °C inkubiert. Die geschnittene Vektor-DNA wurde dann mittels Silikagel-Adsorption („GeneClean® III-Kit“, Q-Bio gene, Bio 101® Systems, USA) wie in Kap. 5.3.4 ausführlich dargelegt, gereinigt. Unter Annahme einer Ausbeute von 75 % wurde die DNA durch Elution in 50 µl TE-Puffer auf eine Konzentration von 50 ng/µl gebracht.

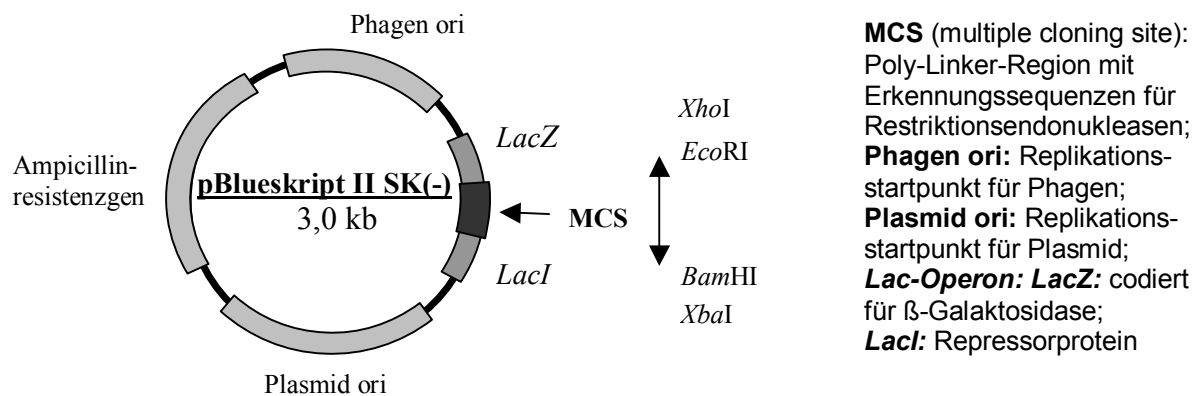


Abb. 6: Plasmidkarte des Vektors „pBlueskript II SK(-)“; (modifiziert nach Stratagene, Heidelberg)

5.3.6 Ligation

Nach erfolgtem Restriktionsendonukleasen-Verdau der PCR-Produkte wurden diese im nächsten Schritt in den gleichermaßen geschnittenen Vektor einligiert. Dazu wurden pro Ligationsansatz 6 µl der DNA-Lösung zu 2 µl (50 ng/µl) der Vektorlösung gegeben und für 5 min bei 50 °C zur Trennung der kohäsiven Enden inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer (United States Biochemical, Bad Homburg) und 1 µl (1 U/µl) T4-DNA-Ligase (United States Biochemical, Bad Homburg) wurde 90 min bei 16 °C inkubiert.

5.3.7 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Dieser Schritt diente der Herstellung elektrokompetenter Bakterien für die Klonierung. Als Bakterienstamm wurde ausnahmslos *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Hierfür wurde eine Kolonie des auf einer „LB-Tet“- Platte (Luria Bertani-Medium: 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt [jeweils Roth, Karlsruhe], 5 g/l NaCl, 1 ml/l 1N NaOH; Zusatz für „LB-Tet“-Platte: 15 g/l Agar [Roth, Karlsruhe], 12,5 mg/l Tetrazyklin [United States Biochemical, Bad Homburg]) ausgestrichenen *E. coli*- Stammes XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) zur Herstellung einer Flüssigkultur in 15 ml „LB-Tet“-Medium (LB-Medium, mit 12,5 mg/l Tetrazyklin) über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde diese Übernachtskultur dazu verwendet, 1,5 l LB-Tet-Medium zu beimpfen. Nach ca. 3 h Inkubationszeit bei einer Temperatur von 37 °C und Erreichen einer optischen Dichte von 0,3 bei 600 nm (Photometer PCP 6121, Eppendorf Gerätebau, Hamburg) wurde die Zellsuspension für 20 min auf Eis gelagert und anschließend in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC2-B, Du Pont, Bad Homburg) für 15 min bei 4500 rpm (3300xg) und 4 °C zentrifugiert (GSA-Rotor, Du Pont, Bad Homburg). Nach Abdekantieren der Flüssigkeit wurde das Bakterienpellet zweimal in HEPES-Lösung (1 mM HEPES-HCl, pH 7,0) resuspendiert und jeweils für 15 min bei 5500 rpm (4920xg) zentrifugiert. Danach wurde das Bakterienpellet in ca. 30 ml 10-%iger Glycerinlösung aufsuspendiert und 15 min bei 6500 rpm (5090xg) zentrifugiert (SS34-Rotor, Du Pont, Bad Homburg). Abschließend wurden die Zellen in 1,5 ml 10-%iger Glycerinlösung resuspendiert, zu jeweils 40 µl aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

5.3.8 Elektroporation und Selektion rekombinanter Klone

Elektroporation ist die Transformation von Plasmid-DNA in lebenden Bakterien, d.h. das Einbringen eines Plasmids in elektrokompetente Zellen mittels eines elektrischen Pulses. Hierfür wurden die zuvor hergestellten, eingefrorenen XL1-Blue-Portionen (Kap. 5.3.7) bei Raumtemperatur aufgetaut und zusammen mit den Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand, Bio-Rad, München) und der erforderlichen Menge SOC-Medium (0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose; 1 ml pro Ansatz) auf Eis vorgekühlt. 2 µl des Ligationsansatzes wurden mit einem 40 µl-Aliquot der *E. coli*- Zellen zusammengebracht und nach 1-minütiger Inkubation auf Eis in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Dann wurde die Elektroporation bei 1,5 kV und 150 Ohm (50 µF) im Elektroporationsgerät („The Porator“, Invitrogen Corporation, Vertrieb ITC, Heidelberg) durchgeführt. Um ein Absterben der geschwächten Zellen zu minimieren, wurde unmittelbar nach der Transformation 1 ml SOC-Medium auf die Suspension gegeben und die Zellen dann in einem Glasröhrchen für 1 h bei 37 °C im Drehrad (M&B Stricker, Oberschleißheim) inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm (700xg) wurde der Überstand abdekantiert, das Bakterienpellet in der Restflüssigkeit aufsuspensiert und auf LB-Ampicillin-Blaumarker-Agarplatten (LB-Medium s.o., Zusatz: 100 mg/l Ampicillin [Sigma, Deisenhofen], 80 mg/l X-Gal [5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid], 58 mg/l IPTG [Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid], 15 g/l Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf diesen Platten wachsen nur transformierte Bakterien, die ein über das Plasmid erhaltene Ampicillinresistenz besitzen.

Die Auswahl rekombinanter Keime für nachfolgende Reaktionen erfolgte anhand einer sogenannten „Blau-Weiß-Selektion“. So zeigen Klone mit einligierter Fremd-DNA eine weiße Koloniefärbung, da die in das Plasmid „pBlueskript II SK(-)“ (Abb. 6) eingebaute Fremd-DNA den kodierenden Bereich eines Teils des *lacZ*-Gens unterbricht und deshalb keine β-Galaktosidase gebildet werden kann. Somit bleiben die Kolonien weiß. Blaufärbung tritt bei den Kolonien mit Plasmiden ohne eingebaute Fremd-DNA auf, da das *lacZ*-Gen funktionstüchtig bleibt, β-Galaktosidase gebildet wird und somit das in den Agarplatten enthaltene Milchzuckerderivat X-Gal (s. oben) gespalten wird. Das Spaltprodukt färbt die entsprechenden Kolonien durch den im X-Gal enthaltenen Indolyl-Rest blau.

5.3.9 Plasmidpräparation und -analyse

Diese Methode dient dem Nachweis, ob fremde DNA der gesuchten Größe („Insert“) in das Plasmid einligiert wurde. Hierzu wurden weiße Bakterienkolonien in jeweils 5 ml LB-Ampicillin-Medium (LB-Medium, als Zusatz 100 mg/l Ampicillin) überimpft und bei 37 °C über Nacht in einem Reagenzschüttler (HS 250 basic; Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 300 µl der Übernachtskultur in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und für 60 s zentrifugiert (Biofuge 13, Standardgeschwindigkeit 13000 rpm [13793xg]; Heraeus Instrumente, Osterode), der Überstand abdekantiert und das Bakterienpellet in 250 µl RNase A enthaltenem Puffer P1 (6,06 g/l Tris [Base], 3,72 g/l Na₂EDTA·2H₂O mit HCL eingestellt auf pH 8,0, 100 mg/l RNase A) resuspendiert. Anschließend wurden je 250 µl des Puffers P2 (8,0 g/l NaOH, 1 % Natriumdodecylsulfat [SDS]) und P3 (294,5 g/l Kaliumacetat, mit Eisessig auf pH 5,5 eingestellt) nacheinander hinzupipettiert und der Ansatz für 15 min wie oben zentrifugiert. Jeweils 700 µl des plasmidhaltigen Überstandes wurden vorsichtig abpipettiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, zur Fällung der Plasmid-DNA mit 700 µl Isopropanol (Roth, Karlsruhe) versetzt und für mind. 15 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min zentrifugiert, der Überstand abdekantiert, das Pellet vorsichtig mit 500 µl 70 %igem Ethanol (Roth, Karlsruhe) überschichtet, wiederum für 5 min zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und schließlich die restliche Flüssigkeit vollständig abpipettiert. Das Pellet wurde für mindestens 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und das DNA-Sediment dann in 15 µl 10 mM Tris·HCl (pH 8-8,5) 5 min bei 50 °C gelöst.

Für das Herausschneiden des DNA-Inserts aus dem Vektor zur anschließenden Überprüfung seiner Größe wurden die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Xho*I verwendet. Dazu wurde pro Ansatz ein „Master-Mix“ aus folgenden Komponenten hergestellt: 1,2 µl 10x NEBuffer 2 (100 mM Tris-HCl [pH 7,9], 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, New England BioLabs, Schwalbach), je 0,5 µl der Restriktionsenzyme *Xba*I (15 U/µl, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und *Xho*I (8 U/µl, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und 0,12 µl 100x BSA (New England BioLabs, Schwalbach). Zu jeweils 2,2 µl dieses „Master-Mixes“ wurden je 9,8 µl der DNA-Lösung hinzupipettiert, gemischt und bei 37 °C für 90 min inkubiert. Für die anschließende Auftrennung mittels Gelelektrophorese wurden nach Zugabe von 1 µl 10x Agarosepuffer, 11 µl der DNA-Lösung auf ein 1,3 %-iges Agarosegel (Kap. 5.2.3) aufgetragen und die Größe des DNA-Inserts überprüft. Von den Klonen, die neben der

Vektor-DNA auch Insertbanden in der gesuchten Größe zeigten, wurde zunächst eine Glycerinkultur mit 500 µl 99 %igem Glycerin (Sigma, Deisenhofen) und 500 µl Kulturlösung angefertigt und bei -70°C aufbewahrt. Die restliche Kulturlösung wurde für eine spätere Sequenzierung für 10 min bei 3500 rpm (1225xg) zentrifugiert (Hettich, Tuttlingen), der Überstand abdekantiert und das Bakterienpellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die restliche Plasmid-DNA-Lösung wurde ebenfalls bei -20 °C aufbewahrt.

5.3.10 Reinigung von Plasmid-DNA durch Silikamembran-Adsorption

Da zur Sequenzierung eine möglichst reine Plasmid-DNA benötigt wird, erfolgte als nächster Schritt eine Ionenaustauschchromatographie mit vorausgehender alkalischer Lyse unter Verwendung des „E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I“ (Peqlab, Erlangen). Das Bakterien-Pellet aus der Übernachtskultur (Kap. 5.3.9) wurde zunächst in 250 µl der RNase-haltigen Lösung I (400µl RNase in 60 ml Lösung I) resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend mit ebenfalls 250 µl der Lösung II versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren und Zugabe von 350 µl Lösung III erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation (Biofuge 13, Standardgeschwindigkeit 13000 rpm [13793xg]; Heraeus Instruments, Osterode). Von dem plasmidhaltigen Überstand wurden 850 µl abpipettiert und in ein Zentrifugensäulchen mit einer Silikamembran gegeben (vom Hersteller mitgeliefert), 60 s zentrifugiert und dann mit 750 µl DNA-Waschpuffer (nach Angaben des Herstellers mit 60 ml absolutem Ethanol pro 40 ml Konzentrat komplettiert) gewaschen. Zuletzt wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1mM EDTA) eluiert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen I, II, III und des „DNA-Waschpuffers“ wurden vom Hersteller nicht angegeben.

5.3.11 Sequenzierung der klonierten rekombinanten Plasmide

In Anschluss an die Reinigung erfolgte eine alkalische Denaturierung der DNA durch Zugabe von 11 µl 2 M NaOH und 30minütige Inkubation bei 37 °C. Um eine bessere Fällung der DNA zu erreichen, wurde zunächst eine Neutralisation mit 11 µl 3 M Natriumacetat-Lösung [pH 4,5-5,5] vorgenommen. Danach erfolgte die Zugabe von 110 µl bei -20 °C gelagertem Isopropanol (absolut; Roth, Karlsruhe) und eine Fällung der DNA bei -20 °C über Nacht. Am

nächsten Morgen wurde nach 15minütiger Zentrifugation der Überstand entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur gründlich (mind. 10 min) getrocknet.

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach dem „Kettenabbruch-Verfahren“ (Sanger et al., 1977) unter Verwendung eines „Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit“ (United States Biochemicals, Bad Homburg). Dazu wurde das DNA-Pellet in 15 µl TE-Puffer gelöst und 7 µl dieser Lösung mit 2 µl 5x Sequenase-Reaktionspuffer (200 mM Tris·HCl, [pH 7,5], 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) und mit 1 µl (0,5 µM) des jeweiligen Sequenzierprimers (Tab. 5; Stratagene, Heidelberg, synthetisiert durch MWG Biotech, Ebersberg) versetzt. Um eine Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize zu erreichen, wurde der Ansatz bei 37 °C für 30 min inkubiert. Währenddessen wurde für die radioaktive Markierung und den Kettenabbruch eine Mischung („Master-Mix“) aus 2,6 µl demineralisiertem Wasser, 1,75 µl Enzym-Verdünnungspuffer (10 mM Tris·HCl [pH 7,5], 5 mM DTT), 1 µl 0,1 M DTT, 0,4 µl 5x dNTP-Mischung (Labelling Mix: je 7,5 µM dGTP, dTTP, dCTP), 0,5 µl radioaktives dATP (α -³⁵S-Deoxyadenosin-Triphosphat, [1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml]; ICN Biomedicals, Eschwege) und 0,25 µl (13 U/µl) Sequenase (Version 2.0 DNA-Polymerase, in 20 mM KPO₄ [pH 7,4], 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50 % Glycerol) aus dem Kit hergestellt. Jeweils 6,5 µl dieses „Master-Mixes“ wurden nun zu den auf Eis gelagerten Hybridisierungsansätzen pipettiert. 3,5 µl jedes Probengemisches wurde in 4 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte („Terasaki Trays“, Robbins Scientific, Vertrieb Bibby Dunn, Asbach) zugegeben, in die schon je 2,5 µl (80 µM) der 4 Dideoxynukleotide auf Eis vorgelegt worden waren und für 1 min auf einem Mikrotiterplattenheizer bei 37 °C erwärmt wurden. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde durch Zugabe von 4 µl „Stop-Solution“ (95 % Formamide, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol FF) aus dem Kit die Sequenzierungsreaktion beendet. Die Mikrotiterplatten wurden bis zum Auftragen auf das Gel bei -20 °C gelagert.

Tab. 5: Sequenzierprimer (Sequenzen nach Statagene, Heidelberg)

KS	5'-CGA GGT CGA CGG TAT C-3'
T3	5'-ATT AAC CCT CAC TAA AG-3'

5.3.12 Vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Sequenzierungs-Produkte

Die vertikale Gelelektrophorese wurde mit einem 6 %igen Polyacrylamidgel, dessen Dicke am oberen Rand 0,25 mm und am unteren Ende 0,75 mm betrug, in einer 38 cm x 50 cm großen „Sequi-Gen“-Sequenzierkammer (Biorad, München) durchgeführt. Nach sorgfältigem Reinigen der Kammer- sowie der Glasplatte mit demineralisiertem Wasser und 96 %-igem Ethanol (Spicker, Baierbrunn) wurde die Kammerplatte mit 2 ml „Sigmacote“ (Sigma, Deisenhofen) beschichtet, um das spätere Ablösen des Gels von der Platte mit Hilfe des feinen Silikonfilms zu erleichtern. Anschließend wurde die Kammer zusammengebaut und zum Gießen positioniert. Für das 6 %-ige Trenngel wurde zunächst eine Monomerlösung aus 30 ml „Sequagel“-Konzentrat (25 %-iges Acrylamid [Acrylamid:Methylen-Bis-Acrylamid = 19:1], 8,3 M Harnstoff), 82,5 ml „Sequagel“-Verdüner (8,3 M Harnstoff) und 12,5 ml „Sequagel“-Puffer (10x TBE-Puffer; 8,3 M Harnstoff in 1 M Tris-Borat + 20 mM EDTA-Puffer, jeweils „Rotiphorese“; Roth, Karlsruhe) hergestellt, diese mit 42 µl TEMED (Tetramethylethyldiamin; United States Biochemicals, Bad Homburg) und 700 µl 10-%iges APS (Ammoniumpersulfat; United States Biochemicals, Bad Homburg) versetzt und in die Gelkammer eingefüllt, wo sie polymerisierte. Als Laufpuffer wurde vorgewärmter TBE-Puffer (50 mM Tris [Base], 50 mM Borsäure und 2 mM EDTA [pH 8,0]) eingesetzt. Um eine gewünschte Geltemperatur von 45-50°C zu erreichen, erfolgte ein Vorlauf des Gels bei 2500 V und 80 mA für etwa 30-40 min. Vor dem Auftragen von je 1,2 µl jeder Sequenzieransätze auf das Gel musste die Terasaki-Mikrotiterplatte für 2 min oder, falls vorher eingefroren, für 3 min auf 92 °C erhitzt werden (Heizblock für Mikrotiterplatte, ME 12801; Bachofer GmbH, Reutlingen). Zur Vermeidung einer gelschädigenden Temperatur von über 60 °C wurde der Hauptlauf nach Auftragen der Sequenzieransätze bei 2500 V und 60 mA gestartet. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel für 1 h in einer Lösung aus 10 % Methanol und 10 % Eisessig (Roth, Karlsruhe) gewässert, um den Harnstoff herauszulösen, der bei der folgenden Exposition ansonsten radioaktive Strahlung absorbiert hätte. Anschließend wurde das Gel auf GB002-Blottingpapier (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert, mit Plastikfolie (Saran, Dow Chemical Company) abgedeckt und auf einem Gelrockner (G1200, Fröbel, Labortechnik, Lindau) bei 90 °C über Nacht getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Plastikfolie entfernt und dem auf das Blottingpapier aufgetrocknete Gel ein Autoradiographie-Film aufgelegt („X-OMAT AR“, Kodak, Vertrieb Karl Weisser GmbH, München) und 3-5 Tage bei Raumtemperatur exponiert.

5.3.12 Sequenzanalyse

Das Ablesen der Basen erfolgte auf einem Leuchttisch. Anschließend wurden die Sequenzen mit Hilfe des Computerprogrammes „DNAMAN“ (Lymnon BioSoft, Quebec, Kanada), wie bereits in Kap.5.2.5 beschrieben, analysiert.

5.4 Real-time PCR

5.4.1 Auswahl des Zielgens

Nach Sequenzanalyse des ITS-Genabschnittes der rDNA der Babesien wurde zur Auswahl des Zielgens zunächst ein Bereich mit größtmöglicher Übereinstimmung innerhalb der Katzenbabesien, aber deutlichen Unterschieden zu anderen Babesien und Theilerien ausgesucht, indem wie bereits in Kapitel 5.2.5 beschrieben, alle Sequenzen miteinander verglichen wurde. Als Zielgen für die Real-time PCR wurde ein Bereich der ITS-1-Region in der Nähe des 5'-Endes gewählt.

5.4.2 Primer- und Sondenkonstruktion

Die Sonden- und Primerkonstruktion erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes „Beacon Designer 2.1“ aus der entsprechenden Konsensussequenz der ITS-1-Region. Folgende Oligonukleotide wurden ausgewählt: BF-1 als „forward“ Primer (sense), BF-3 als „reverse“ Primer (anti-sense) und BF-S1 als Sonde in Form eines „Molecular Beacon“ (Konstruktion unter Anleitung von PD Dr. M. Rinder; Tab. 6). Die Sonde ist am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff *6-FAM* (6-Carboxyfluoreszein, Reporter) und am 3'-Ende mit *Dabcyl* (4-Dimethylaminophenylbenzoesäure, Quencher) markiert. Zusätzlich wurde das 3'-Ende phosphoryliert, um eine Sondenextension zu vermeiden. Die ausgewählten Primer amplifizieren einen Bereich von 106 bp (Abb. 7). Mit dem „Blast Search“ Programm der NCBI GenBank Database (www.ncbi.nlm.nih.gov) wurde die Spezifität der Primer sowie der Sonde gegenüber allen erhältlichen Nukleotidsequenzen untersucht. Vor allem wurde darauf geachtet, dass das 3'-Ende der Primer nicht auf Zecken-, Säuger- und Pilz-DNA passt. Die Oligonukleotide wurden von der Firma ThermoHybaid, Ulm synthetisiert.

Tab. 6: Sequenzen der Primer und der Sonde für die Real-time PCR (Die unterstrichenen Basen der Sonde BF-S1 stellen den Stammbereich dar)

	Sequenz (5'→3')	T_m (°C)	Position (ITS-1)
BF-1	5'-TTGGTAGTACTTCGGTCTGTC-3'	46,0	157
BF-3	5'-ACGGCAACAGCACAAGC-3'	49,9	263*
BF-S1	<i>Fam</i> -5'- <u>CGCGATTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAATCGCG</u> -3'- <i>Dabcyl</i>	76,9	195

* anti-sense Primer

BF-1
BF-S1
 . . . GTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTCATTTTCAGGGGCGTTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTG
BF-3
 CCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAATGCTCGGCGCTTGTGCTGTTGCCGTTGGCGTCC . . .

Abb. 7: Lage der Primer und der Sonde in der ITS-1-Konsensussequenz

5.4.3 PCR und Sondenhybridisierung

Zur PCR wurden DNA-Lösungen, die entsprechend Kap. 5.1 hergestellt wurden, eingesetzt. Zunächst wurden Annealingtemperatur, MgCl₂- und Sondenkonzentration optimiert und das in Tab. 7 dargestellte PCR-Pipettierschema festgelegt. Alle Komponenten mit Ausnahme der genomischen DNA wurden unter einem Laminar Flow mit einem separaten Pipettenset und Filterspitzen in 0,2 ml PCR Plates (96 wells, Bio-Rad, München) vorgelegt. Anschließend erfolgte an einem anderen Arbeitsplatz die Zugabe der genomischen DNA. Pro PCR-Lauf wurden die DNA von 4 Aufarbeitungsreihen mit je 11 Ansätzen plus die jeweilige Negativkontrolle der DNA-Extraktion (Kap. 5.1) sowie eine Positivkontrolle (*Babesia felis*-positiv im Ausstrich) und zwei Negativkontrollen aus Blut von Babesien-freien Hauskatzen („indoor“) aus Deutschland eingesetzt. Falls die Negativkontrollen der DNA-Extraktion in der PCR positiv reagierten, wurde die DNA der entsprechenden Proben erneut extrahiert. Die

PCR erfolgte in einem iCycler iQTM (Bio-Rad, München) unter folgenden Reaktionsbedingungen: initiales Aufheizen auf 95 °C für 13 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 54 °C für 1 min und Extension bei 72 °C für 30 s. Die Fluoreszenz wurde bei jedem Annealingsschritt gemessen. Nach jedem Lauf wurden die Daten mit der Software Version 3.0A analysiert (iCycler iQTM Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, München). Eine Reaktion wurde dann als positiv gewertet, wenn ihre Fluoreszenz einen Schwellenwert (=Basisemission und das 10fache ihrer Standardabweichung) überschritt und einen sigmoiden Kurvenverlauf zeigte.

Tab. 7: Pipettierschema für die Real-time PCR

Komponenten	Konzentration	Hersteller
Eluat mit genomischer DNA	5 µl	
10x PCR-Puffer*	5 µl	Qiagen, Hilden
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl	Qiagen, Hilden
Primer BF-1 (50µM)	1 µl	ThermoHybaid, Ulm
Primer BF-3 (50 µM)	1 µl	ThermoHybaid, Ulm
Sonde BF-S1 (50 µM)	0,1 µl	ThermoHybaid, Ulm
HotStartTaq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	Qiagen, Hilden
dNTPs (25 mM each)	0,5 µl	Amersham Biosciences, Freiburg
Aqua dest.	ad 50 µ	

*enthält 15 mM MgCl₂

5.4.4 Validierung der Real-time PCR

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Real-time PCR und der Zuverlässigkeit des entwickelten Nachweisverfahrens wurde eine geblindete, extern kontrollierte Validierung, modifiziert nach Rinder et al. (1998), durchgeführt. Von einer Person wurden zunächst Proben aus dem eigenen Untersuchungsmaterial (Anmerkung: das Blutprobenmaterial war zum Zeitpunkt der Validierung ca. 2 Jahre alt und mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren) und aus am Institut vorhandenen Sammlungen nach folgenden Kriterien ausgesucht:

1. Es sollen **insgesamt 50 Proben** analysiert werden.
2. Es werden **ausschließlich Blutproben** verwendet.
3. Mindestens **10**, maximal **30 Proben** sollen aus **Negativkontrollen** bestehen. Negativkontrollen sind Blutproben von gesunden (Babesien-freien) Katzen aus Deutschland (ausschließlich „indoor“) und Blutproben mit anderen bestätigten Parasiten. Zur Auswahl standen hier Blutproben mit *Babesia microti*, *Babesia rodhaini*, *Babesia canis*, *Haemobartonella felis* und *Hepatozoon canis*.
4. Mindestens **20**, maximal **40 Proben** sollen aus **Positivkontrollen** bestehen. Positivkontrollen sind im Ausstrich Babesien-positive Katzenpatientenproben sowie eine 10fach-Verdünnungsreihe von einer Probe mit bekannter Parasitämie (verdünnt wurde mit Blut von „indoor“- Katzen aus Deutschland).
5. Mindestens **ein Drittel** der Blutproben soll als **Duplikate** oder **Triplikate** vorliegen.
6. Alle Proben müssen **geblindet** sein.

Von jeder ausgewählten Probe wurden 200 µl in ein Eppendorf-Gefäß verbracht und dieses beschriftet. Zur eindeutigen Identifizierung der einzelnen Proben wurde für jede Probe ein Probenblatt ausgefüllt, in welches zunächst die Art der Probe sowie die Beschriftung auf dem Eppendorfgefäß eingetragen wurde. Nach Auswahl und Beschriftung der Proben wurden diese zusammen mit den jeweiligen Probenblättern zur Blindung an eine weitere unabhängige, d. h. nicht dem Institut zugehörige Person übergeben, die jede Probe, nach Entfernung der ursprünglichen Beschriftung, in beliebiger Reihenfolge mit einer Code-Nummer von 1 bis 50 beschriftete. Diese Code-Nummern wurden ebenfalls in die entsprechenden Probenblätter eingetragen. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Bearbeitung an mich übergeben. Die Probenblätter blieben bei der zweiten Person, die die

Proben verschlüsselt hatte. Das weitere Vorgehen entspricht den Kap. 5.1 und 5.4.3. Nach Abschluss der PCR wurden die Proben 1 bis 50 als positiv oder negativ bewertet, erst anschließend der Schlüssel geöffnet und Sensitivität und Spezifität berechnet.

5.4.4.1 Berechnung von Spezifität und Sensitivität

Die Spezifität und die Sensitivität der entwickelten Real-time PCR wurden im Rahmen der geblindeten, extern kontrollierten Validierung untersucht. Die Spezifität wurde als prozentualer Anteil der richtig-negativen Ergebnisse innerhalb der Gruppe der tatsächlich Babesien-negativen Blutproben (Blutproben von gesunden Katzen, Blutproben mit anderen bestätigten Parasiten) berechnet. Die Sensitivität des entwickelten Nachweisverfahrens entsprach der Anzahl der richtig-positiven Ergebnisse innerhalb der Gruppe der tatsächlich Babesien-positiven Katzenblutproben (exklusive der Verdünnungsreihe) in Prozent (Tab. 8). Von diesen Größen abgeleitet wurden der positive und negative Vorhersagewert errechnet. Der positive Vorhersagewert wurde dabei als Quotient aus der Zahl der richtig-positiven Ergebnisse der Anzahl aller positiven Testergebnisse ermittelt. Der positive Vorhersagewert gibt somit die Wahrscheinlichkeit an, mit der das Tier bei einem positiven Testergebnis tatsächlich Babesien-positiv ist. Der negative Vorhersagewert wurde als der Anteil der richtig-negativen Ergebnisse an der Gesamtanzahl der negativen Testergebnisse errechnet und gibt somit die Wahrscheinlichkeit an, mit der das Tier bei einem negativen Testergebnis tatsächlich Babesien-negativ ist (Tab. 9).

Tab. 8: Spezifität und Sensitivität als Maßzahlen für die Güte eines diagnostischen Tests (modifiziert nach www.medizin.uni-koeln.de)

	Tatsächlicher Sachverhalt		
	Babesien-positiv	Babesien-negativ	
Positiver Befund	A	B	Sensitivität (%) = $A / (A + C)$
Negativer Befund	C	D	Spezifität (%) = $D / (B + D)$
Insgesamt	A + C	B + D	

Tab. 9: Berechnung des positiven und negativen Vorhersagewerts. Der positive (negative) Vorhersagewert gibt die Wahrscheinlichkeit an, bei der die Katze bei einem positiven (negativen) Testergebnis tatsächlich (nicht) mit Babesien infiziert ist (modifiziert nach www.medizin.uni-koeln.de).

	Tatsächlicher Sachverhalt		Insgesamt
	Babesien-positiv	Babesien-negativ	
Positiver Befund	A	B	A + B
Negativer Befund	C	D	C + D

Positiver Vorhersagewert = $A / (A + B)$

Negativer Vorhersagewert = $D / (C + D)$

5.4.4.2 Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der entwickelten Real-time PCR wurde zunächst bei einer im Ausstrich Babesien-positiven Katzenblutprobe die Parasitämie bestimmt, indem durch lichtmikroskopisches Auszählen von insgesamt 10×250 Erythrozyten in verschiedenen Blutausrichen der entsprechenden Blutprobe der prozentuale Anteil der parasitierten Erythrozyten berechnet wurde. Anschließend wurde eine 10fach-Verdünnungsreihe mit Babesien-freiem Katzenblut, das von „indoor“-Katzen aus Deutschland stammte, hergestellt. Die Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-6} wurden im Rahmen der geblindete, extern kontrollierten Validierung untersucht. Die Verdünnungsstufe, bei der der entsprechende PCR-Ansatz noch Babesien-positiv reagierte, wurde zur Berechnung der Nachweisgrenze herangezogen. Mit Hilfe der vorher bestimmten Parasitämie wurde die Anzahl der Babesien pro μl in der entsprechenden Verdünnungsstufe berechnet, dabei wurde von einer durchschnittlichen Erythrozytenzahl von ca. $7 \times 10^6/\mu\text{l}$ ausgegangen.

6. Serologische Untersuchung - Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest

Zum Nachweis von spezifischen Antikörpern wurden die Katzenblutproben mittels indirektem Immunfluoreszenzantikörpertest untersucht. Dabei binden Serumantikörper an das auf einem Objektträger fixierte Antigen und werden mit Fluoreszein-Isothiocyant konjugierten Ziege-Anti-Katze-Antikörpern (Sekundär-Antikörper) mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht. In dieser Studie wurde ein am Onderstepoort Veterinary Institute, Parasitology Division (Onderstepoort, Republic of South Africa) entwickelter Test mit *B. felis* als Antigen verwendet (López-Rebollar et al., 1999). Bereits mit dem homologen Antigen beschichtete Objektträger sowie Positiv- und Negativkontrollseren wurden uns freundlicherweise von Frau L. M. López-Rebollar (Onderstepoort Veterinary Institute, Parasitology Division) zur Verfügung gestellt. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die bei -20 °C eingefrorenen Objektträger wurden zunächst in kaltem Aceton für 1 min fixiert. Nach Auftauen der Patienten- und Kontrollseren (Kap. 3) wurde von allen Seren eine Verdünnungsreihe in 2-fach-Verdünnungsstufen mit PBS (8 g/l NaCl, 1,85 g/l Na₂HPO₄·2H₂O, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH₂PO₄; pH 7,3), beginnend bei 1/80, hergestellt. Je 10 µl der Verdünnungen 1/80, 1/160 und 1/320 wurden auf das Antigen aufgetragen und für 1 Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Pro Objektträger wurden 6 Patientenseren aufgetragen und je eine Negativ- sowie eine Positivkontrolle in den entsprechenden drei Verdünnungsstufen mitgeführt. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Objektträger nach der Inkubation in 200 ml PBS getaucht, dann für 10 min in 1 l frischem PBS und anschließend für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörperkomplexe wurde der mit Fluoreszein-Isothiocyant konjugierte Ziege-Anti-Katze IgG- Sekundärantikörper (Sigma, Deisenhofen) zunächst 1/80 mit PBS verdünnt, mit 1%-igem Evans-Blue (Sigma, Deisenhofen) versetzt und dann jeweils 15 µl pro Vertiefung auf die Objektträger aufgetragen. Nach einer weiteren Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C in der feuchten Kammer wurde das Konjugat in frischem PBS für 10 min abgewaschen, die Objektträger anschließend luftgetrocknet und dann mit verdünntem Glycerin (50 % Glycerin in PBS) eingedeckelt und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar) mit dem 40er Objektiv untersucht. Proben, die eine spezifische Fluoreszenz bei der ersten Verdünnungsstufe (1/80) zeigten, wurden entsprechend den Angaben des Herstellers als positiv gewertet.

7. Vergleich der verschiedenen Untersuchungsmethoden

Abschließend wurden die Testergebnisse der verschiedenen angewandten Untersuchungsmethoden paarweise (Blutausstrich - Real-time PCR, Blutausstrich - indirekte Immunfluoreszenzantikörpertest (IFAT) und PCR – IFAT) miteinander verglichen. Dabei wurde der prozentuale Anteil der übereinstimmenden Ergebnisse berechnet.

B Ergebnisse

1. Studientiere und Ergebnisse der statistischen Datenanalyse

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 206 Katzen einbezogen. 49,5 % (102/206) dieser Tiere waren weiblich und 50,5 % (104/206) männlich.

Bei 154 Katzen lagen Informationen zum Alter vor. Dabei variierten die Angaben zwischen 2 Monaten und 19 Jahren. Bei Einteilung der Studientiere in 5 verschiedene Altersgruppen (≤ 6 Monate, über 6 Monate - 2 Jahre, über 2 – 7 Jahre, über 7 – 15 Jahre, > 15 Jahre) zeigte sich, dass 19,5 % (30/154) der Katzen bis zu 6 Monate alt, 39,6 % (61/154) der Katzen im Alter zwischen über 6 Monaten und 2 Jahren, 22,1 % (34/154) der Katzen 2 bis 7 Jahre, 14,9 % (23/154) der Tiere 7 bis 15 Jahre und 3,9 % (6/154) der Katzen über 15 Jahre alt waren. Bei den restlichen 52 Katzen war das Alter nicht ermittelbar.

Bei Betrachtung der Rassen wurde festgestellt, dass es sich bei einem Großteil der Katzen, und zwar bei 88,3 % (182/206) um Hauskatzen („domestic shorthair“ und „domestic longhair“) handelte. Die restlichen 11,7 % (24/206) der Katzen verteilten sich auf 6 Rassen, dabei waren 1 Abyssiner, 1 Birma, 3 Karthäuser, 3 Perser, 15 Siam und 1 Maincoon-Katze vertreten.

92,7 % (191/206) der untersuchten Tiere waren Freiläuferkatzen, die sich sowohl im Haus, als auch draußen aufhielten („indoor/outdoor“). 5,4 % (11/206) der Katzen wurden als reine Hauskatzen („indoor“) gehalten und 1,9 % (4/206) der Katzen verbrachten ihr Leben ausschließlich im Freien („outdoor“).

Zur Auswertung der Herkunft der untersuchten Katzen wurden mehrere Ortsteile von Port Elizabeth, in denen die Patientenbesitzer wohnten, in Gebiete zusammengefasst: „Kragga Kamma“ im Nordwesten von Port Elizabeth, „Walmer“ im Süden, „Algoa“ im Norden und „Newton Park/Mill Park“ im Nordosten der Stadt. Die „Kragga Kamma Veterinary Clinic“ liegt dabei im Gebiet „Kragga Kamma“. Die Zugehörigkeit der einzelnen Stadtteile zu den jeweiligen Gebieten ist in Tab. 25 im Anhang D enthalten. Insgesamt stammten 53,9 % (111/206) der Katzen aus dem Gebiet „Kragga Kamma“, 30,1 % (62/206) der Katzen aus dem

Gebiet „Walmer“, 4,9 % (10/206) der Katzen aus „Algoa“ und 2 Katzen aus dem Gebiet „Newton Park/Mill Park“. 3 Katzen, die in die Untersuchung miteinbezogen wurden, lebten außerhalb Port Elizabeths (Seaview, Uitenhage, Woodridge). Bei 18 Katzen war die Herkunft unbekannt.

Bei einem Teil der Katzen wurden Krankheitssymptome, die auf eine Babesieninfektion hindeuten, festgestellt. Dies ist in Kapitel 2 und Kapitel 3.3.2 näher dargestellt. Alle Patientendaten der Katzen K 1 bis K 206 können dem Anhang D, Tab. 25 entnommen werden

2. Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchung der Blutausstriche

Mittels lichtmikroskopischer Untersuchung der Blutausstriche wurde bei 32,2 % (66/205) der Katzenblutproben Babesien nachgewiesen (Abb. 8, 9). Ein Ausstrich (K 128) war nicht auswertbar. Morphologisch stellten sich die nachgewiesenen Babesien hauptsächlich als kleine, rundlich bis ovale Piroplasmen in der für *B. felis* typisch beschriebenen Siegelringform dar, aber auch birnenförmige Trophozoiten wurden vereinzelt nachgewiesen. Die Teilungsformen lagen in unterschiedlicher Anzahl in den Erythrozyten vor; in manchen Erythrozyten wurden bis zu 8 Teilungsformen gezählt. Sogenannte „Malteserkreuz“-Formationen wurden häufig beobachtet. Die Babesien stellten sich insgesamt sehr pleomorph dar, eine Aussage über eine etwaige Artenvielfalt konnte aber aufgrund rein morphologischer Merkmale nicht getroffen werden.

Bei 28,4 % (29/102) der weiblichen Tiere und bei 35,9 % (37/103) der männlichen Tiere wurden Babesien im Ausstrich nachgewiesen. Der Unterschied war nicht signifikant.

Bei Betrachtung der Altersverteilung ergab sich, dass bei den bis zu 6 Monate alten Katzen 16,7 % (5/30) der Tiere und bei den 6 Monate bis 2 Jahre alten Katzen 31,7 % (19/60) der Tiere Babesien im Blutausstrich aufwiesen. In der Gruppe der 2- bis 7-Jährigen betrug dieser Anteil 32,4 % (11/34), bei den 7 bis 15 Jahre alten Katzen 34,8 % (8/23) und in der Gruppe der über 15 Jahre alten Katzen 33,4 % (2/6). Bei den Katzen mit unbekanntem Alter waren 40,4 % (21/52) der Tiere im Ausstrich Babesien-positiv. Der Unterschied zwischen den Altersgruppen war statistisch nicht signifikant.

Bezüglich der Rasse wurden bei 32,6 % (59/181) der Hauskatzen und 29,2 % (7/24) der Rassekatzen Babesien im Ausstrich nachgewiesen. Der Unterschied war nicht signifikant.

Unter den Freiläuferkatzen, die sich sowohl drinnen als auch draußen aufhalten („indoor/outdoor“), waren 33,7 % (64/190) der Tiere im Ausstrich Babesien-positiv. Bei den Katzen, die sich ausschließlich im Freien aufhalten („outdoor“) wurden bei 2 von 4 Tieren Babesien im Ausstrich nachgewiesen. In der Gruppe der reinen Hauskatzen („indoor“) waren alle Ausstriche Babesien-negativ. Die unterschiedlichen Haltungsformen zeigten statistische Signifikanz ($\chi^2 = 5,99$, $p = 0,05$).

Hinsichtlich der Herkunft, ergab sich, dass bei 31,8 % (35/110) der Katzen aus dem Gebiet „Kragga Kamma“, bei 35,5 % (22/62) der Katzen im Gebiet „Walmer“, bei 2 von 2 untersuchten Katzen in „Newton/Mill Park“ und bei keiner (0/10) aus dem Gebiet „Algoa“ stammenden Katze Babesien im Ausstrich nachgewiesen wurden. Einer der 3 Katzen von außerhalb und 33,4 % (6/18) der Tiere mit unbekannter Herkunft waren Babesien-positiv. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Herkünften waren nicht signifikant.

Von den insgesamt 66 Katzen, bei denen im Blutausstrich Babesien nachgewiesen wurden, waren 28,8 % (19/66) Tiere klinisch erkrankt. Typische Symptome der Babesiose waren Depression, Anorexie und Anämie sowie Ikterus, Lethargie und Dehydratation. Der Schweregrad der Symptome variierte stark und korrelierte oftmals nicht mit der im Blutausstrich vorgefundenen Parasitämie. Die restlichen 71,2 % (47/66) der Katzen, bei denen im Blutausstrich Babesien nachgewiesen wurden, waren klinisch gesund. Hier wurde die Klinik aus anderen Gründen, meist für operative Eingriffe, aufgesucht. Unter den infizierten weiblichen Katzen waren 20,7 % (6/29) der Tiere klinisch erkrankt, bei den männlichen Babesien-positiven Katzen zeigten 35,1 % (13/37) der Tiere klinische Symptome. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Bei Betrachtung der Altersgruppen wiesen in der Gruppe der bis zu 6 Monate alten Katzen 20 % (1/5), in der Gruppe von über 6 Monaten bis 2 Jahren 68,4 % (13/19) und bei den 2- bis 7-Jährigen 18,2 % (2/11) der infizierten Katzen klinische Symptome auf. In der Gruppe der Katzen mit unbekanntem Alter waren 14,3 % (3/21) der Babesien-positiven Tiere klinisch erkrankt. Bei den 7- bis 15-jährigen und den über 15-jährigen Katzen war keine der infizierten Katzen klinisch erkrankt. Die Unterschiede zwischen den Altersgruppen waren statistisch signifikant ($\chi^2 = 21,55$, $p = 0,0006$). Bezüglich der Rasse zeigten 30,5 % (18/59) der infizierten Hauskatzen und 14,3 % (1/7) der infizierten

Rassekatzen klinische Symptome. Der Unterschied war nicht signifikant. Alle 19 Katzen mit klinischer Babesiose waren Freiläuferkatzen, die sich sowohl drinnen als auch draußen aufhielten. Hinsichtlich der Herkunft zeigten 45,7 % (16/35) der Babesien-positiven Katzen aus dem Gebiet „Kragga Kamma“, 9,1 % (2/22) der infizierten Katzen aus „Walmer“ und 16,6 % (1/6) der positiven Katzen mit unbekannter Herkunft klinische Symptomatik. Keines der Tiere aus den Gebieten „Newton/Mill Park“ (0/2), sowie der Tiere von außerhalb Port Elizabeth (0/1), bei denen Babesien im Ausstrich nachgewiesen wurden waren klinisch erkrankt. Die unterschiedliche Herkunft der erkrankten Katzen war statistisch signifikant ($\chi^2 = 10,7$, $p = 0,03$)

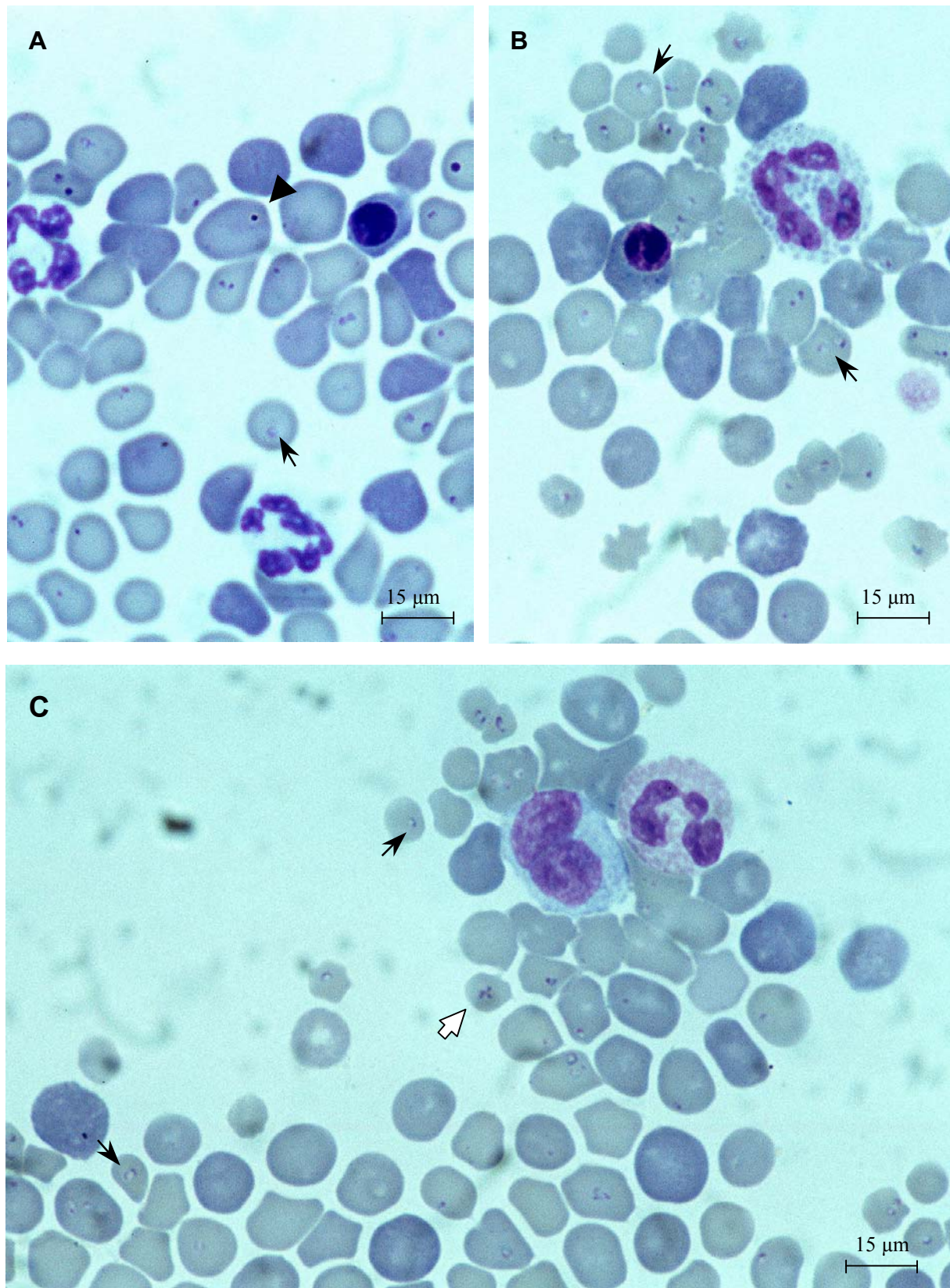


Abb. 8: DiffQuick-gefärbte Blutausstriche von natürlich infizierten Katzen mit *B. felis* (A: K 91, B und C: K 97). Dargestellt sind einzelne Siegelringformen (↗), mehrere Parasiten pro Erythrozyt, „Malteserkreuz“-Formation (◇) und Howell-Jolly-Körper (▲)

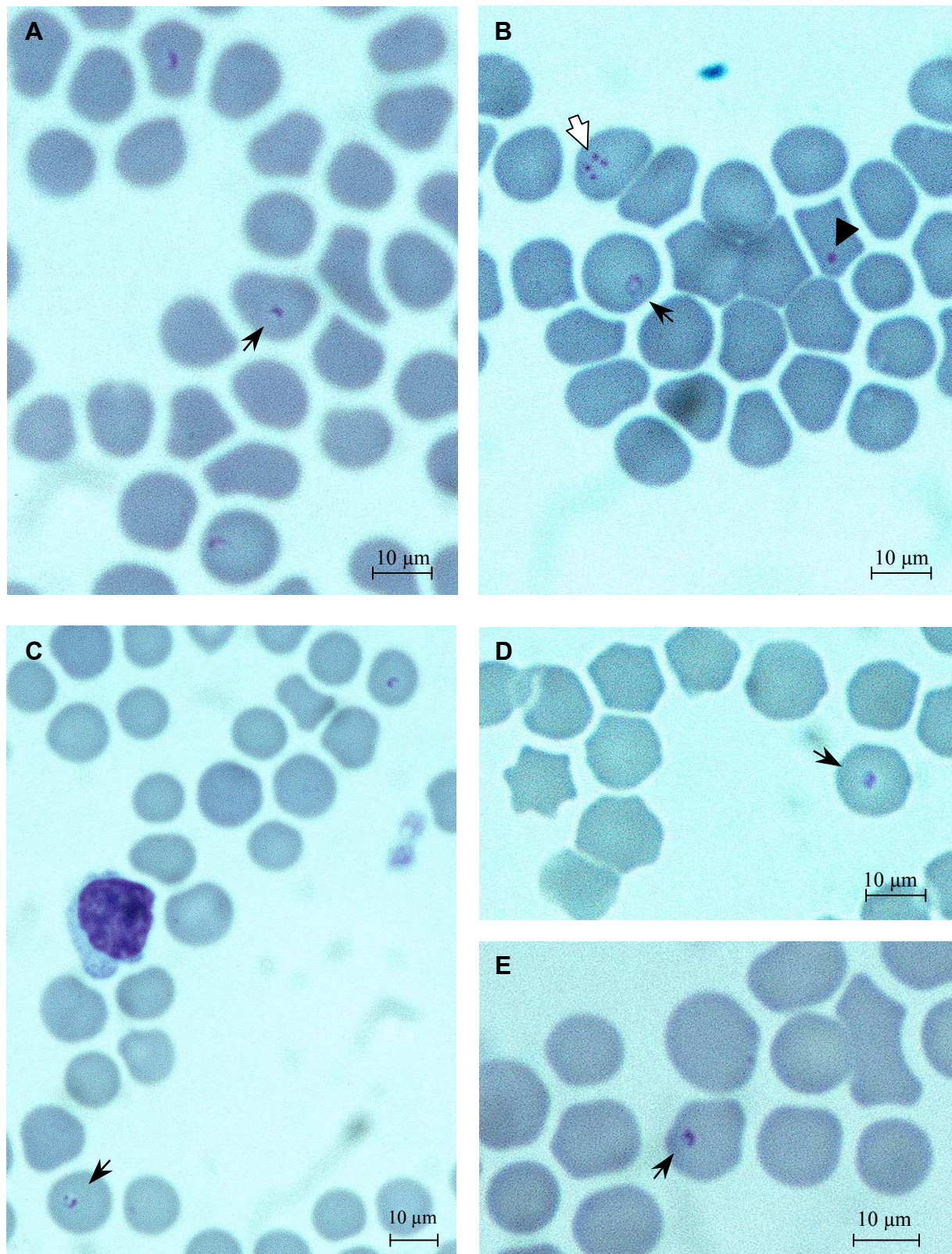


Abb. 9: DiffQuick-gefärbte Blutausstriche von Katzen mit natürlichen Babesieninfektionen. Bei K 1 (A), K 19 (B) und K 60 (C) handelt es sich um Infektionen mit *B. felis*, bei K 8 (D) mit *B. leo* und bei K 68 (E) um eine unbekannte Babesienart. Dargestellt sind einzelne Siegelringformen (↗), „Malteserkreuz“-Formation (↖) und Howell-Jolly-Körper (▲)

3. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

3.1 Molekularbiologische Artdiagnose durch 18S-rDNA-Sequenzanalyse

Mit Hilfe der PCR-Primer RIB-19 und RIB-20 wurde die 18S-rDNA der Babesien bei allen 13 zur molekularbiologischen Untersuchung ausgewählten Isolaten (K 1, K 8, K 19, K 54, K 60, K 68, K 79, K 96, K 97, K 120, K 172, K 176, K 197) amplifiziert. Wie in Abb. 10 für 6 Katzenblutproben exemplarisch dargestellt ist, besaßen die PCR-Produkte eine Größe von etwa 1,7 kb.

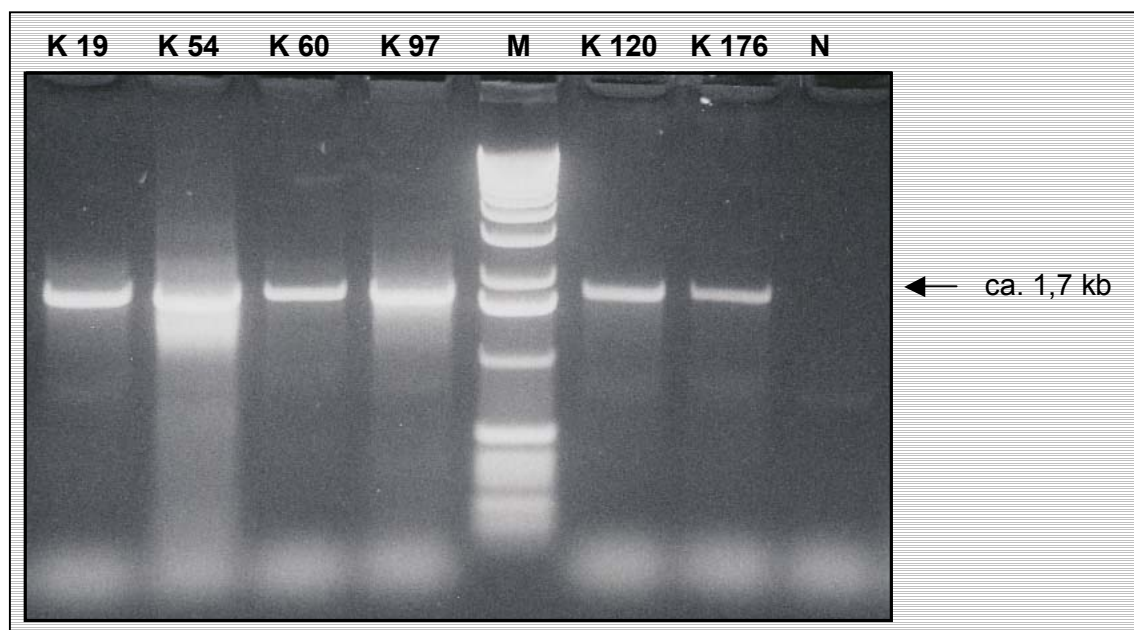


Abb. 10: Gelelektrophoretische Auftrennung von 18S-rDNA-PCR-Produkten erhalten von Babesien aus Katzenblutproben

K 19, K 54, K 60, K 97, K 120, K 176 Isolatbezeichnung

M DNA-Größenmarker (1 kb – Leiter)

N Negativkontrolle

Bei Sequenzvergleich, auch unter Einbeziehung von Sequenzen aus der Genbank-Sequenzdatenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov), ergab sich, dass die Sequenzen von 11 Isolaten (K 1, K 19, K 54, K 60, K 79, K 96, K 97, K 120, K 172, K 176, K197) untereinander und zu einer *B. felis* - Sequenz der Genbank (Zugangsnummer AF244912) nahezu identisch waren (Anhang A). Die Babesien der 11 Isolate wurden daher als *Babesia felis* diagnostiziert.

Die Sequenz von K 8 war bis auf eine Deletion mit einer Sequenz von *B. leo* (Zugangsnummer AF244911) identisch (Anhang A) Die Babesien von K 8 wurden daher der Art *Babesia leo* zugeschrieben. Es handelt sich hierbei um den Erstdnachweis von *B. leo* bei natürlich infizierten Hauskatzen. Für K 68 wurden vom ca. 1,7 kb großen PCR-Produkt lediglich Sequenzinformationen über einen Abschnitt von 1297 bp erhalten. Diese Sequenz war keiner bekannten Art eindeutig zuzuordnen. Die größte Ähnlichkeit bestand jedoch mit *B. leo* (Anhang A). In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen ausführlich dargestellt.

3.1.1 Intraspezifische Variation der 18S-rDNA bei *B. felis*-Isolaten

Da für einzelne Isolate Sequenzdaten für primernahe Bereiche nicht vorlagen, wurden zur Vereinheitlichung 51 bp am 5'-Ende des PCR-Produktes und 52 bp an seinem 3'-Ende nicht in die Untersuchung miteinbezogen. Die Angaben zur Variation beziehen sich somit auf den dazwischen liegenden Bereich von 1600 bp. Zur Untersuchung der intraspezifischen Variation wurden die 11 untersuchten, als *B. felis* diagnostizierten Isolate untereinander und mit einer Sequenz für *B. felis* aus der Genbank (AF244912) verglichen. Dabei wurden 14 polymorphe Positionen identifiziert (Anhang A). Es handelte sich hierbei um 4 Insertionen/Deletionen und 10 Substitutionen. Die Isolatsequenzen unterschieden sich untereinander in maximal 6 Positionen, nämlich 2 Deletionen/Insertionen und 4 Substitutionen, so dass paarweise Identitäten zwischen 99,62 % (K 97 und K 172) und 100 % (K 54 und K 176) ermittelt wurden. Die Sequenzen von K 54 und K 176 entsprachen zu 100 % der *B. felis* – Sequenz aus der Genbank, die der übrigen Isolate unterschieden sich in mindestens 1 Deletion/Insertion (K 1) oder Substitution (K 60, K 79) und maximal in 1 Deletion/Insertion und 2 Substitutionen (K 97, K 172) von der Genbanksequenz (Tab. 10).

Tab. 10: 18S-rDNA-Sequenzidentitäten der 11 *B. felis* - Isolate zu einer *B. felis* - Sequenz aus der Genbank (AF244912)

	K 1	K 19	K 54	K 60	K 79	K 96
<i>B. felis</i> (Genbank)	99,94 % (1D)	99,88 % (2S)	100 % (-)	99,94 % (1S)	99,94 % (1S)	99,88 % (2S)

	K 97	K 120	K 172	K 176	K 197
<i>B. felis</i> (Genbank)	99,81% (1D+2S)	99,88 % (1D+1S)	99,81 % (1D+2S)	100 % (-)	99,88 % (1D+1S)

D = Deletion/Insertion, S = Substitution

3.1.2 Interspezifische Variationen der 18S-rDNA

In zwischenartliche Sequenzvergleiche wurde eine Konsensussequenz von *B. felis*, die aus den 11 Sequenzen der analysierten Isolate aus Katzen gebildet worden war, einbezogen. Die 18S-rDNA-Sequenz von Babesien des Isolats K 8, als *B. leo* diagnostiziert und mit der entsprechenden Genbank-Sequenz von *B. leo* (AF244911) bis auf 1 Deletion identisch (99,94 %), wies beim Vergleich mit dieser Konsensussequenz der *B. felis*-Isolate 67 Unterschiede auf, was einer Sequenzidentität von 95,81 % entspricht (Tab. 11). Der Sequenzvergleich der 18S-Region von K 8 mit der Sequenz von *B. felis* (AF244912) aus der Genbank ergab 54 Unterschiede. Dies entspricht einer Sequenzidentität von 96,62 %. Für Sequenzen aus der Genbank von weiteren, bisher nicht artlich festgelegten Babesien bei Wildfeliden (*Babesia sp.* Caracal Strain A [AF224913], *Babesia sp.* Caracal Strain B [AF244914]) ergaben sich beim Vergleich mit der Sequenz von K 8 Identitäten von 97,37 % und 96,12 % (Tab. 11).

Für das Isolat K 68, für das nur ein Bereich von 1297 bp charakterisiert wurde, ergab der Vergleich mit der gebildeten *B. felis*-Konsensussequenz in der entsprechenden Region 38 Unterschiede und damit eine Identität von 97,07 %. Zur *B. felis* – Genbanksequenz wurde mit 29 Unterschieden eine geringfügig höhere Identität von 97,76 % errechnet. Mit der Sequenz von Isolat K 8 und der *B. leo*-Genbanksequenz war die Sequenz des Isolats K 68 mit 23 bzw. 22 unterschiedlichen Positionen zu 98,22 % und 98,3 % identisch. Zu den 2 verschiedenen aus einem Karakal isolierten *Babesia sp.* Stämmen A und B ergab der Vergleich 41 und 43 Unterschiede in der Sequenz und somit eine Identität von 96,84 % und 96,69 % (Tab. 11). Die

Sequenzen der 11 charakterisierten *B. felis* – Isolate, sowie der beiden Isolate K 8 und K 68 und die Genbanksequenzen von *B. felis* (AF244912) und *B. leo* (AF244911) sind dem Alignment im Anhang A der vorliegenden Arbeit zu entnehmen.

In die Analyse der interspezifischen Variation mit anderen nicht-felinen Babesienarten wurde *B. rodhaini* (M87565) und *B. microti* (U09833) einbezogen, da diese kleinen Babesienarten in früheren Untersuchungen eine relativ enge Verwandtschaftsbeziehung zu den felinen Babesien aufwiesen. Der Sequenzvergleich ergab eine Identität von 94,08 % der *B. felis* – Isolate zu *B. rodhaini* und eine Identität von 94,2 % zu *B. microti*. Die Sequenz des Isolats K 8 war zu 95,4 % mit *B. rodhaini* und zu 95,63 % mit *B. microti* identisch. Beim Vergleich von K 68 mit *B. rodhaini* und *B. microti* wurde eine Sequenzidentität von 95,89 % und 95,3 % im entsprechenden Bereich errechnet (Tab. 11).

Tab. 11: Interspezifische Sequenzidentitäten der 18S-rDNA in Prozent, Anzahl der unterschiedlichen Positionen in Klammern angegeben

	<i>B. felis</i> ¹	<i>B. leo</i> ²	<i>B. felis</i> - Isolate*	K 8
<i>B. felis</i> - Isolate*	99,13 % (14)	95,86 % (66)	-	95,81 % (67)
K 8	96,62 % (54)	99,94 % (1)	95,81 % (67)	-
K 68	97,76 % (29)	98,3 % (22)	97,07 % (38)	98,22 % (23)

	<i>Babesia sp.</i> Caracal A ³	<i>Babesia sp.</i> Caracal B ⁴	<i>B. rodhaini</i> ⁵	<i>B. microti</i> ⁶
<i>B. felis</i> - Isolate*	98,06 % (31)	97,38 % (42)	94,08 % (94)	94,2 % (93)
K 8	97,37 % (42)	96,12 % (62)	95,4 % (73)	95,63 % (70)
K 68	96,84 % (41)	96,69 % (43)	95,89 % (53)	95,3 % (61)

¹ *B. felis* (AF244912), ² *B. leo* (AF244911), ³ *Babesia sp.* Caracal Strain A (AF244913), ⁴ *Babesia sp.* Caracal Strain B (AF244914), ⁵ *B. rodhaini* (M87565), ⁶ *B. microti* (U09833), * Konsensussequenz aus 11 analysierten *B. felis* – Isolaten

Phylogenetische Analysen, bei denen 18S-rDNA-Sequenzen der 13 charakterisierten Isolate und Genbanksequenzen von *B. felis*, *B. leo*, *Babesia* spp. Caracal Strain A und Strain B sowie *B. rodhaini* und *B. microti* einbezogen wurden, ergaben eine Aufteilung der feline Babesien in 2 Hauptgruppen (Abb. 11). *B. leo* und das unmittelbar benachbart positionierte Isolat K 8 sowie K 68 formten eine Hauptgruppe. In der zweiten Hauptgruppe bildete sich ein Cluster aus *B. felis* (AF244911) und den 11 als *B. felis* diagnostizierten Isolaten dieser Untersuchung, das sich deutlich von den artlich noch nicht festgelegten Wildfeliden-Babesien *Babesia* sp. Caracal Strain A (AF244913) und *Babesia* sp. Caracal Strain B (AF244914) abgrenzten. Die beiden Nagerbabesien *B. rodhaini* und *B. microti* setzten sich von den beiden Hauptgruppen der feline Babesien deutlich ab (Abb. 11).

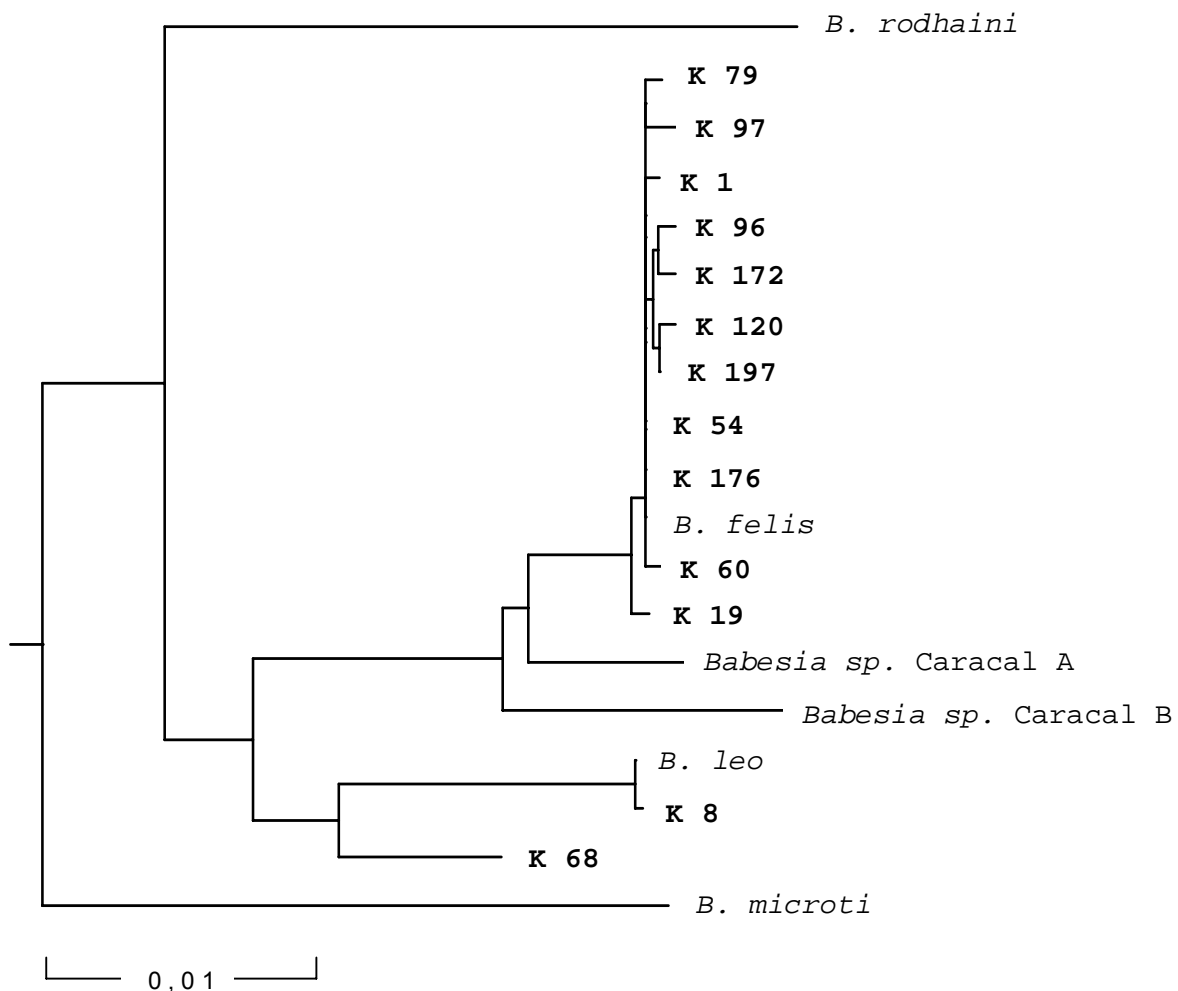


Abb. 11: „Observed divergency“ – Dendrogramm, basierend auf Vergleiche der 18S-rDNA von 13 charakterisierten Isolaten und Genbanksequenzen von *B. felis* (AF244912), *B. leo* (AF244911), *Babesia* sp. Caracal Strain A (AF244913) und Strain B (AF244914), *B. rodhaini* (M87565) und *B. microti* (U09833)

3.2 Genotypische Analyse der Artvariation durch ITS-rDNA-Sequenzanalyse

3.2.1 Sequenzanalyse und genetische Variation der rDNA der gesamten ITS-Region

Zur Analyse der Artvariation der felines Babesien wurde die rDNA-Sequenz des Internen transkribierten Spacers 1 und 2 (ITS-1 und 2), sowie des dazwischen liegenden, für die 5,8S-Einheit kodierenden Bereiches bei den 13, bereits zur molekularbiologischen Artdiagnose herangezogenen Isolaten (Kap. 3.1), mit Hilfe der PCR-Primern RIB-3 und RIB-13, amplifiziert. Die PCR-Produkte besaßen eine Größe von ca. 700 bp (Abb. 12).

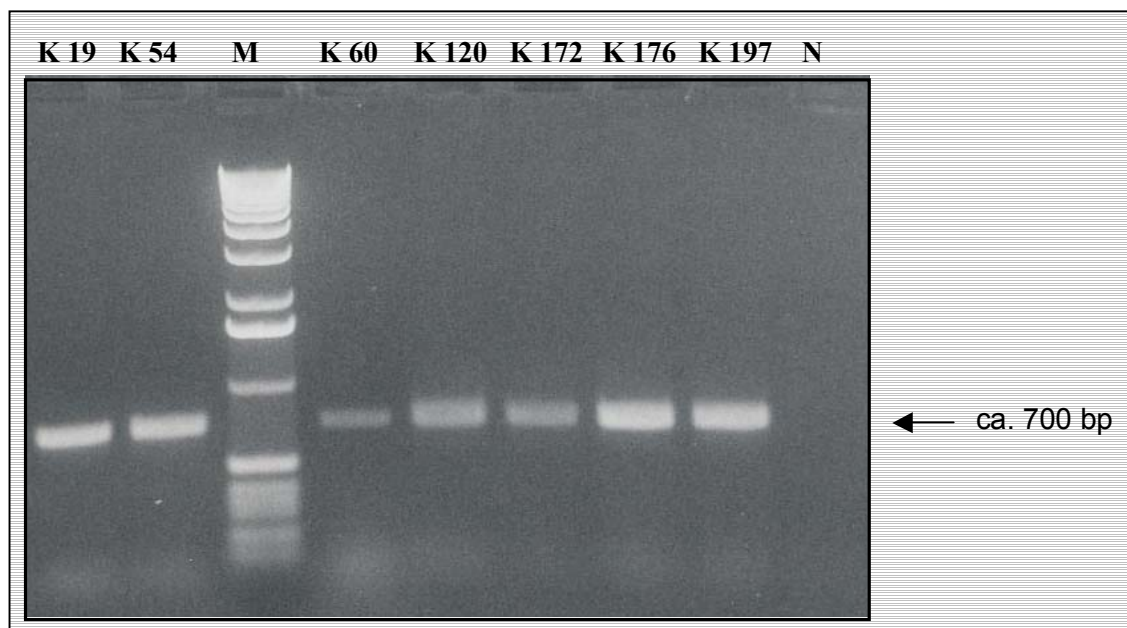


Abb. 12: Gelelektrophoretische Auftrennung von ITS-rDNA-PCR-Produkten von Babesien aus Katzenblutproben, exemplarisch dargestellt für 7 der insgesamt 13 charakterisierten Isolate

K 19, K 54, K 60, K 120, K 172, K 176, K 197 ausgewählte Isolate

M DNA-Größenmarker (1 kb-Leiter)

N Negativkontrolle

Bei Sequenzvergleichen ergab sich, dass die Sequenzen von 11 Isolaten (K 1, K 19, K 54, K 60, K 79, K 96, K 97, K 120, K 172, K 176 und K 197) nahezu identisch waren. Bei den Isolaten handelte es sich um dieselben 11 Isolate, die bei der molekularbiologischen Artdiagnose durch Sequenzanalyse der 18S-rDNA als *B. felis* diagnostiziert worden waren. Die ITS-rDNA-Sequenzen der beiden Isolate K 8, mit Hilfe der 18S-rDNA-Sequenzanalyse als *B. leo* diagnostiziert, und K 68 wiesen untereinander und zu den 11 *B. felis* – Isolaten große Unterschiede auf, die in Abschnitt 3.2.1.1 näher erläutert werden. Die Sequenzen können dem Alignment im Anhang B entnommen werden.

3.2.1.1 Intraspezifische Variation der ITS-rDNA bei *B. felis* - Isolaten

Zur Vereinheitlichung der Sequenzdaten wurden 42 bp am 3'-Ende im Bereich der flankierenden 28S-Einheit nicht in die Sequenzvergleiche miteinbezogen, da dieser primernahe Bereich für einzelne Isolate nicht vollständig vorlag. Die Angaben zur Variation beziehen sich somit auf einen Bereich von 662 bp. Nach Korrektur der Polymerasefehler wurden beim Vergleich der 11 *B. felis* – Isolate (K 1, K 19, K 54, K 60, K 96, K 97, K 120, K 172, K 176, K 197) 17 polymorphe Positionen (Tab. 12 und Anhang B) festgestellt, dies entspricht einer Polymorphismusrate von 2,6 %. Dabei wurden insgesamt 9 Genotypen, mit A bis I bezeichnet, ermittelt. Die Genotypen A und C wurden jeweils bei 2 Isolaten festgestellt (K 97 und K 176 bzw. K 19 und K 172), während die restlichen Isolate jeweils eigenen Genotypen zugeordnet wurden (Tab. 13). Die Genotypen unterschieden sich dabei in mindestens 1 Deletion/Insertion oder Substitution und maximal in 9 Substitutionen. Die Sequenzidentitäten der einzelnen Genotypen untereinander lagen somit zwischen 98,64 % und 99,85 %. Die Genotypen G und H unterschieden sich mit 9 Substitutionen am stärksten. Genotyp A und B sowie Genotyp C, D und E waren sich mit jeweils nur 1 Deletion/Insertion am ähnlichsten (Tab. 13).

Tab. 12: Polymorphe Loci der ITS-rDNA von 11 *B. felis* - Isolaten und entsprechende Einordnung in Genotypen A bis I (Basennummerierung nach Sequenz von K 19)

Isolat	Position der Nukleotide in der ITS-rDNA																Genotyp	
	87	107	115	134	140	141	143	223	227	251	268	521	651	658	660	661		662
K97	G	G	T	G	-	C	A/G	C	G	A	G	C	C	-	A	G	C	A
K176	G	G	T	G	-	C	G	C	G	A	G	C	C	-	A	G	C	A
K120	G	G	T	G	-	C	G	C	A/G	A	G	C	C	T	A	G	C	B
K19	G	G	T	G	T	T	G	C	G	G	G	G	C	T	A	G	C	C
K172	G	G	T	G	T	T	G	C	G	G	G	G	C	T	A	G	C	C
K197	G	G	T	G	T	T	G	C	A/G	G	G	G	C	-	A	G	C	D
K79	G	G	T	G	T	T	G	C	G	G	G	C	C	T	A	G	C	E
K96	G	G	T	G	T	C/T	G	A	G	G	G	G	G	-	A	G	C	F
K54	G	G	T	G	T	T	A/G	A	A/G	G	A	G	G	-	A	G	C	G
K1	C	C	G/T	C	T	T	G	C	G	A	G	C	C	-	A	G	C	H
K60	C	C	G/T	G	T	C	G	C	G	A	G	G	C	-	A	G	C	I

A/G, C/T, G/T: variable Positionen entstanden durch Sequenzinformationen von mehr als einem PCR-Produkt pro Isolat

Tab. 13: Sequenzidentitäten der Genotypen A bis I untereinander; Anzahl der polymorphen Positionen über der Diagonalen und Prozentsatz der Identitäten unter der Diagonalen dargestellt

Genotyp	A	B	C	D	E	F	G	H	I
A	-	1(1D/I)	5(2D+3S)	4(1D+3S)	4(2D+2S)	5(1D+4)	8(1D+7S)	5(1D+4S)	4(1D+3S)
B	99,85%	-	4(1D+3S)	5(2D+3S)	3(1D+2S)	6(2D+4S)	8(2D+6S)	6(2D+4S)	5(2D+3S)
C	99,24%	99,40%	-	1(1D)	1(1S)	3(1D+2S)	5(1D+4S)	6(1D+5S)	5(1D+4S)
D	99,39%	99,24%	99,85%	-	2(1D+1S)	2(2S)	3(3S)	5(5S)	4(4S)
E	99,39%	99,55%	99,85%	99,70%	-	4(1D+3S)	6(1D+5S)	5(1D+4S)	6(1+5S)
F	99,24%	99,10%	99,55%	99,70%	99,40%	-	2(2S)	7(7S)	5(5S)
G	98,79%	98,79%	99,24%	99,55%	99,10%	99,70%	-	9(9S)	8(8S)
H	99,24%	99,10%	99,10%	99,24%	99,24%	99,24%	98,64%	-	3(3S)
I	99,39%	99,24%	99,24%	99,39%	99,10%	99,24%	98,79%	99,55%	-

D = Deletion/Insertion, S = Substitution

3.2.1.2 Interspezifische Variationen der ITS-rDNA

Zur Untersuchung der interspezifischen genetischen Variation wurde aus den 11 *B. felis* - Sequenzen der analysierten Isolate eine Konsensussequenzen gebildet und diese für die zwischenartlichen Sequenzvergleiche herangezogen. Beim Vergleich der gebildeten *B. felis* – Konsensussequenz mit der ITS-rDNA-Sequenz des Isolats K 8 (687 bp) ergaben sich 155 differierende Positionen. Dies entspricht einer Sequenzidentität von 77,0 %. Mit der ITS-rDNA-Sequenz von K 68 (705 bp) war die *B. felis* – Konsensussequenz mit 164 unterschiedlichen Positionen zu 76,0 % identisch. Die beiden Isolate K 8 und K 68 unterschieden sich untereinander in 85 Positionen, dies entspricht einer Sequenzidentität von 87,79 % (Tab. 14).

Der Sequenzvergleich der *B. felis* - Konsensussequenz mit den nahe verwandten, nicht-felinen Babesienarten *B. rodhaini* (AF510201) und *B. microti* (AF510195) ergab Sequenzidentitäten von 75,98 % bzw. 78,54 %. Das Isolat K 8 wies eine Identität von 78,91 % zu *B. rodhaini* und 78,38 % zu *B. microti* auf. Der Vergleich des Isolats K 68 mit *B. rodhaini* ergab eine Identität von 76,6 %, mit *B. microti* eine Identität von 76,81 % (Tab. 14).

Tab. 14: Sequenzidentitäten (%) zwischen der *B. felis*–ITS–Konsensussequenz, K 8, K 68 *B. rodhaini* (AF510201) und *B. microti* (AF510195), Anzahl der unterschiedlichen Positionen in Klammern

	K 8	K 68	<i>B. rodhaini</i>	<i>B. microti</i>
<i>B. felis</i> - Isolate*	77,0 % (155)	76,0 % (164)	75,98 % (162)	78,54 % (160)
K 8	-	87,79 % (85)	78,91 % (145)	78,38 % (164)
K 68	87,79 % (85)	-	76,6 % (163)	76,81 % (178)

* Konsensussequenz

Wie in Abb. 13 dargestellt, zeigten phylogenetische Analysen, die die ITS-rDNA-Sequenzen der 13 charakterisierten Isolate und die beiden nicht-felinen Arten *B. rodhaini* und *B. microti* einbezogen, eine deutliche Trennung der beiden Isolate K 8 und K 68 von den übrigen 11, als *B. felis* diagnostizierten Isolaten (K 1, K 19, K 54, K 60, K 79, K 96, K 97, K 120, K 172, K 176, K 197), die sich als eine einheitliche Gruppe darstellten. Die Isolate K 8 und K 68 bildeten eine eigenständige Gruppe und waren enger miteinander verwandt, als mit den *B. felis* – Isolaten. *B. rodhaini* und noch deutlicher *B. microti* grenzten sich klar von den Katzenbabesien ab.

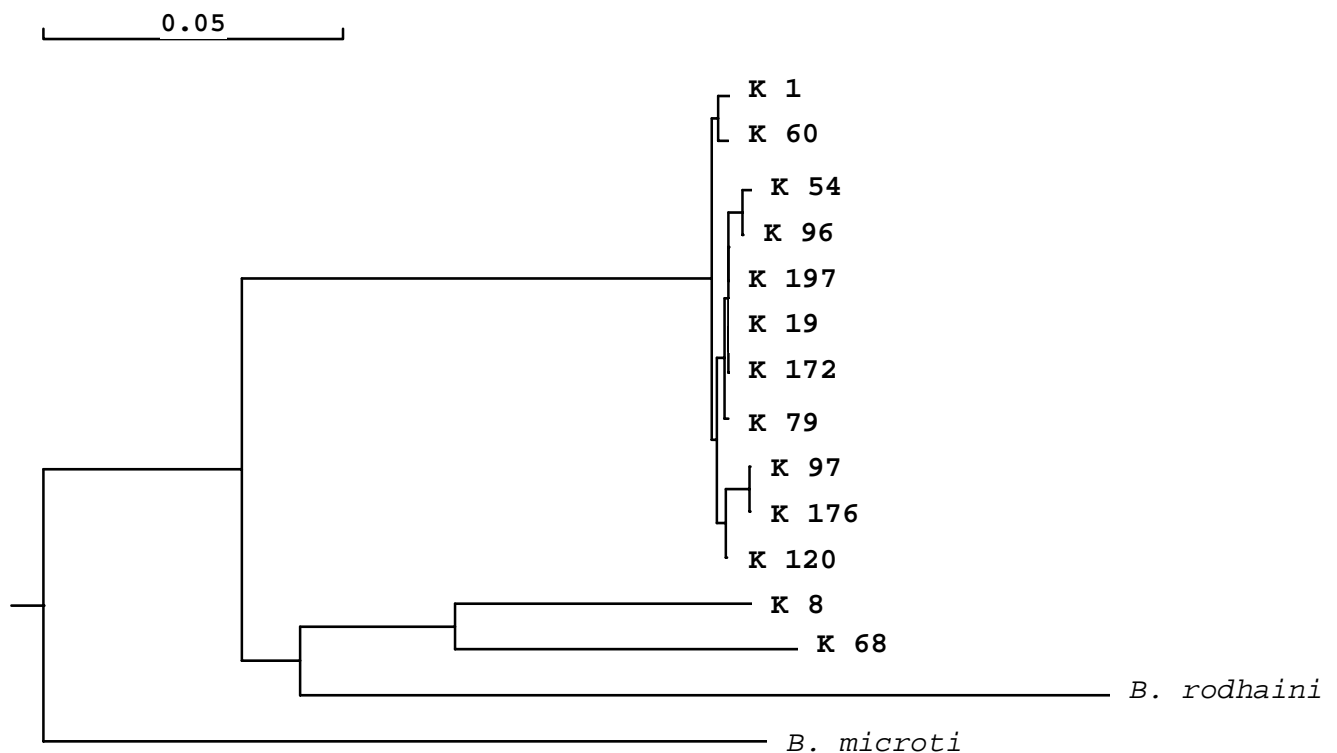


Abb. 13: „Observed divergency“ – Dendrogramm, basierend auf Vergleichen der ITS-rDNA-Sequenz von 13 charakterisierten Isolaten aus Katzen, *B. rodhaini* (AF510201) und *B. microti* (AF510195)

3.2.2 Sequenzvergleich und genetische Variation eines 282 bp großen, klonierten Fragments der ITS-1-Region

3.2.2.1 Intra-Isolat Variation des klonierten Fragments

Zur Analyse der genetischen Variation innerhalb eines einzelnen Isolates, K 60, wurde ein 282 bp großes Fragment der ITS-rDNA-Produkte aus 4 PCR-Reaktionsansätzen kloniert und die Sequenz von 10 resultierenden Klonen analysiert. Es handelte sich hierbei um ein Fragment innerhalb des ITS-1-Bereiches. Der Vergleich der Sequenzen ergab eine Gruppe von 9 untereinander sehr ähnlichen Sequenzen; die Sequenz des 10. Klons, K 60 E.2, unterschied sich aber deutlich von den anderen (Anhang C). Beim Ausrichten der Sequenzen der 9 Klone wurden 8 individuelle Mutationen gefunden, die in keiner anderen Sequenz vorkamen und daher als Polymerasefehler oder davon nicht unterscheidbare seltene Genotypen gewertet wurden. Somit lag die Polymerasefehlerrate bei 0,32 %. „Echte“ Polymorphismen wurden an 9 Positionen festgestellt. Dies entspricht einer Polymorphismusrate von 3,2 %. Innerhalb der 9 Sequenzen wurden 6 verschiedene Genotypen ermittelt, die sich mindestens durch 1 Deletion/Insertion und maximal durch 7 Substitutionen und 1 Deletion/Insertion unterschieden. Die Genotypen 1, 2 und 3 waren jeweils mit nur einem Klon, die Genotypen 4, 5 und 6 mit je 2 Klonen vertreten (Tab. 15). Die Sequenzidentität der 6 Genotypen lag zwischen 97,16 % und 99,64 % (Tab. 16). Genotyp 2 und 3 unterschieden sich dabei in 1 Deletion/Insertion und 7 Substitutionen (97,16 %) und waren somit am wenigsten identisch, während Genotyp 3 und 4 sowie Genotyp 5 und 6, jeweils mit nur 1 Deletion/Insertion (99,64 %) die größte Ähnlichkeit untereinander aufwiesen. Der 10. Klon, K 60 E.2, unterschied sich von den anderen Klonen in 63 Positionen. Dies entspricht einer Sequenzidentität von 76,92 %. Die Sequenz des Klones war auch keiner der bei der Direktsequenzierung der gesamten ITS-rDNA (Kap. 3.2.1) erhaltenen Sequenzen oder einer anderen in der NCBI Genbank verfügbarer Sequenz zuzuordnen. Er wurde als eigenständiger Genotyp 7 eingruppiert. Die Sequenzen der 10 Klone, dargestellt als Alignment, sind dem Anhang C zu entnehmen.

Tab. 15: Polymorphe Loci der rDNA-ITS-1-Region (282bp) bei 9 Klonen des Isolates K 60 und entsprechende Einteilung in Genotypen 1 bis 6; Basennummerierung entsprechend K 60 A.18

9 Klone des Isolats K60	Position der Nukleotide in der Sequenz									Genotyp
	83	106	141	142	224	244	247	252	269	
K 60 C.9	-	A	T	T	A	T	T	A	A	1
K 60 A.18	T	G	T	C	A	T	T	A	A	2
K 60 BE.4	-	A	T	T	C	C	C	G	G	3
K 60 C.8	T	A	T	T	C	C	C	G	G	4
K 60 C.12	T	A	T	T	C	C	C	G	G	4
K 60 C.13	-	A	-	C	C	C	C	A	G	5
K 60 A.21	-	A	-	C	C	C	C	A	G	5
K 60 E.4	-	A	T	C	C	C	C	A	G	6
K 60 C.11	-	A	T	C	C	C	C	A	G	6

Tab. 16: Sequenzidentitäten der Genotypen 1 bis 6, Anzahl der polymorphen Positionen über der Diagonalen, Prozentsatz der Identitäten unter der Diagonalen angegeben

Genotyp	1	2	3	4	5	6
1	-	3 (1 D+2 S)	5 (5S)	6 (1D+5S)	6 (1D+5S)	5 (5S)
2	98,93 %	-	8 (1D+7S)	7 (7S)	7 (2D+5S)	6 (1D+5S)
3	98,22 %	97,16 %	-	1 (1D)	3 (1D+2S)	2 (2S)
4	97,87 %	97,52 %	99,64 %	-	4 (2D+2S)	3 (1D+2S)
5	97,86 %	97,51 %	98,93 %	98,58 %	-	1 (1D)
6	98,22 %	97,87 %	99,29 %	98,93 %	99,64 %	-

D = Deletion/Insertion, S = Substitution

3.2.2.2 Intraspezifische Variation des klonierten Fragments

Bei der Untersuchung der intraspezifischen Variation in diesem klonierten Fragment aus dem Bereich der ITS-1 wurden die Sequenzen von 13 Klonen aus insgesamt 8 Isolaten, die alle als *B. felis* diagnostiziert worden waren, miteinander verglichen. Nach Korrektur von Polymerasefehlern wurden 8 polymorphe Positionen identifiziert (Abb. 17). Dies entspricht einer Polymorphismusrate von 2,85 %. Es wurden 4 verschiedene Genotypen ermittelt. Die Sequenzen von 5 Isolaten (K 1, K 19, K 54, K 79 und K 197) waren identisch und entsprachen dem bereits für K 60 (Kap.3.2.4.1) definierten Genotyp 3. Bei Isolat K 97 wurde Genotyp 5, der ebenfalls schon bei K 60 nachgewiesen worden war, festgestellt. Die Isolate K 120 und K 90 ergaben davon abweichende Sequenzen, die als Genotypen 8 und 9 definiert wurden (Tab. 17). Die Identitäten innerhalb der Genotypen 3, 5, 8 und 9 lagen zwischen 97,86 % und 99,64 %, wobei die Genotypen 5 und 8 (99,64 %) mit 1 Substitution am ähnlichsten und die Genotypen 3 und 9 und Genotypen 8 und 9 (97,86 %) am wenigsten identisch waren (Tab. 18). Beim Vergleich der Isolate mit dem Genotyp 7 (K 60 E.2) wurde eine Identität von 76,88 % festgestellt. Die Sequenzen sind im Anhang C dargestellt.

Tab. 17: Polymorphe Loci der rDNA-ITS1-Region verschiedener Isolate und Zuordnung zu den einzelnen Genotypen; Basennummerierung entsprechend K 1

Isolat	Position der Nukleotide in der Sequenz								Genotyp
	107	134	140	141	223	242	245	250	
K 1	G	G	T	T	C	C	C	G	3
K 19	G	G	T	T	C	C	C	G	3
K 54	G	G	T	T	C	C	C	G	3
K 79	G	G	T	T	C	C	C	G	3
K 197	G	G	T	T	C	C	C	G	3
K 97	G	G	-	C	C	C	C	A	5
K 120	C	G	-	C	C	C	C	A	8
K 90	G	C	T	C	A	T	T	A	9

Tab. 18: Sequenzidentitäten der Genotypen 3,4,8 und 9. Anzahl der polymorphen Positionen über der Diagonalen, Prozentsatz der Identitäten unterhalb der Diagonalen dargestellt

Genotyp	3	5	8	9
3	-	3 (1D+2S)	4 (1D+3S)	6 (6S)
5	98,93%	-	1 (1S)	5 (1D+4S)
8	98,58%	99,64%	-	6 (1D+5S)
9	97,86%	98,22%	97,86%	-

(D = Deletion/Insertion, S = Substitution)

3.2.2.3 Interspezifische Variationen des klonierten Fragments

Bei der Analyse der interspezifischen Variation wurde neben den Genotypen 1 bis 9 der Katzenbabesien auch ein entsprechender ITS-Sequenzabschnitt der beiden eng verwandten Babesienarten *B. rodhaini* (AF510201) und *B. microti* (AF510195) der ebenfalls aus klonierten PCR-Produkten stammte, einbezogen. Die Sequenzidentität einer Konsensussequenz aus den Genotypen 1 bis 6, 8 und 9 mit *B. rodhaini* lag bei 65,92 %, mit *B. microti* bei 67,32 %. Für Genotyp 7 ergab sich eine Identität von 71,7 % mit *B. rodhaini* und 57,06 % mit *B. microti* (Tab. 19).

Tab. 19: Interspezifische Sequenzidentitäten der charakterisierten Klone und *B. rodhaini* und *B. microti*, Angabe in Prozent, Anzahl der unterschiedlichen Positionen in Klammer

	<i>B. rodhaini</i> ¹	<i>B. microti</i> ²	K 60 E.2
<i>B. felis</i> – Konsensussequenz*	65,92 % (91)	67,32 % (92)	76,92 % (63)
K 60 E.2	71,7 % (71)	57,06 % (117)	-

* alle charakterisierten Klone ausgenommen K 60 E. 2, ¹ *B. rodhaini* (AF510201), ² *B. microti* (AF510195)

In der phylographischen Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen der einzelnen Genotypen gruppierten sich die Genotypen 1 bis 6, 8 und 9 zu einer Einheit, wobei sich innerhalb der Gruppe die errechneten Sequenzidentitäten in der Anordnung der Genotypen zueinander widerspiegelten. Genotyp 7 separierte sich klar von den übrigen Genotypen. Die beiden nicht-felinen Arten *B. rodhaini* und *B. microti* waren deutlich von den Genotypen der *B. felis* - Isolate abgegrenzt (Abb. 14).

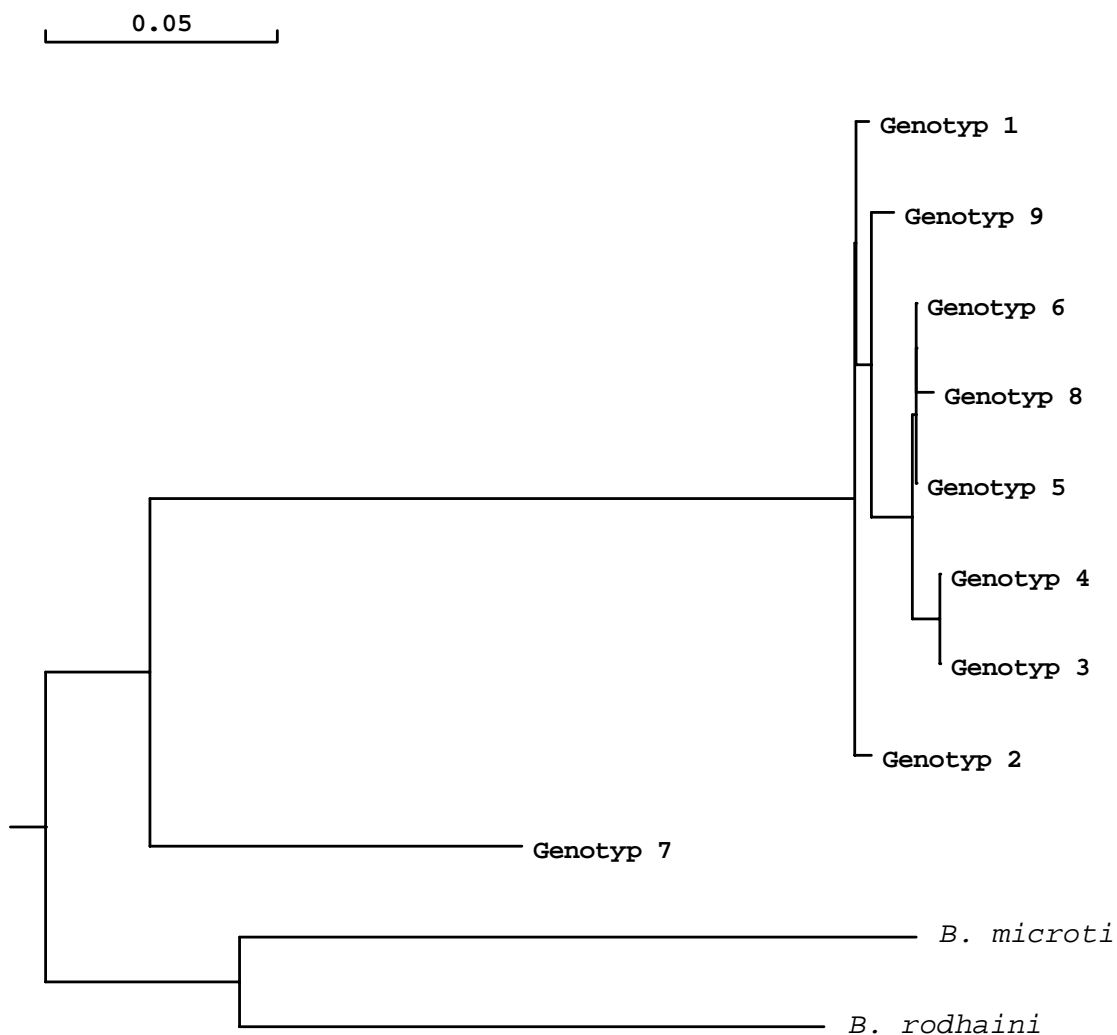


Abb. 14: „Observed divergency“-Dendrogramm, basierend auf Vergleiche eines Bereiches der ITS-1 (282 bp) der analysierten Klone von Katzenbabesien unter Einbeziehung von *B. rodhaini* und *B. microti* (Zahler-Rinder, unveröffentlicht)

3.3 Real-time PCR

3.3.1 Optimierung der PCR-Parameter

Um eine möglichst starke und spezifische Produktamplifikation zu erhalten, wurden die Parameter Annealing-Temperatur, Magnesiumionen-Konzentration und Sondenkonzentration variiert und optimiert. Konstant blieb der Einsatz von je 1 μl (50 μM) Primer BF-1 und BF-3 sowie von 5 μl 10x PCR-Puffer (enthält 15 mM MgCl_2), 0,5 μl dNTP-Mix (je 25 mM) und 0,5 μl (5 U/ μl) Taq-Polymerase in Ansätzen mit dem Endvolumen 50 μl .

3.3.1.1 Annealing-Temperatur und MgCl_2 -Konzentration

Unter Verwendung von 5 μl DNA-Lösung von einer im Ausstrich als Babesien-positiv diagnostizierten Blutprobe und bei Durchführung von 50 Zyklen mit den Temperaturen von 40,0 °C, 45,0 °C, 50,5 °C, 54,4 °C und 60 °C und bei gleichzeitigem Einsatz unterschiedlicher MgCl_2 -Konzentrationen (2 mM, 3 mM, 4 mM, 4,5 mM, 5 mM, 6 mM und 7 mM) ergab sich eine optimale Annealing-Temperatur von 54 °C und eine optimale MgCl_2 -Konzentration von 4 mM. Bei Kombination dieser Temperatur und MgCl_2 -Konzentration zeigten die Fluoreszenzkurven den frühesten und stärksten Anstieg sowie einen sigmoiden Verlauf.

3.3.1.2 Sondenkonzentration

Bei Einsatz von 0,1 μl , 0,25 μl und 0,5 μl der Sonde BF-S1 (50 μM) in Kombination mit unterschiedlichen Mengen Template (5 μl , 0,5 μl , 0,05 μl , 0,005 μl usw., insgesamt 7 Verdünnungsstufen) wurde kein Einfluss der Sondenkonzentration auf den Schwellenwertzyklus oder die Form der Fluoreszenzkurven festgestellt. Daher wurde im Folgenden aus Kostengründen die geringste Konzentration von 0,1 μl (50 μM) der Sonde BF-S1 pro Reaktionsansatz eingesetzt.

3.3.2 Untersuchung der Katzenblutproben mit der entwickelten Real-time PCR

Mittels Real-time PCR, die unter optimierten Bedingungen (Pipettierschema siehe Tab. 7) durchgeführt wurde, wurde DNA von *B. felis* bei 35,3 % (72/204) der untersuchten Katzenblutproben nachgewiesen. Die restlichen 132 Proben waren negativ. Von zwei Katzen des Patientenguts (K 2 und K 3) war kein entsprechendes Blutmaterial vorhanden, deshalb konnten die beiden Katzen nicht in die Untersuchung mit einbezogen werden. Abb. 15 zeigt den Fluoreszenzanstieg (Fluoreszenz gemessen bei 490 nm) bei *B. felis* – positiven Proben mit zunehmender Zyklenzahl in Form einer typisch sigmoiden Fluoreszenzkurve. Bei als negativ bewerteten Proben steigt die Kurve nicht über den Schwellenwert (orangefarbene Linie) an.

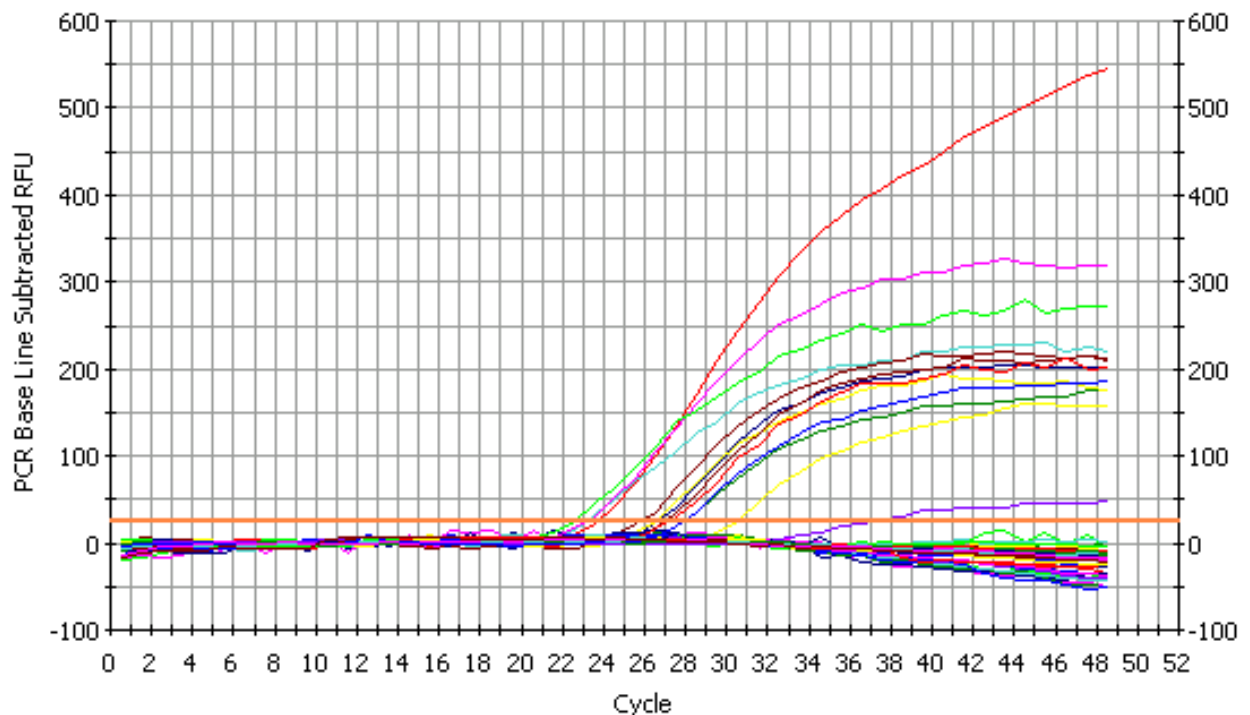


Abb. 15: Beispielhafte Darstellung von Fluoreszenzkurven während eines Real-time PCR-Laufes. Amplifizierung eines 106 bp großen rDNA-Stücks der ITS1-Region von *Babesia felis* unter Verwendung eines Molecular Beacons.

B. felis wurde in der Real-time PCR bei 41,2 % (42/102) der männlichen Tiere und 29,4 % (30/102) der weiblichen Tiere des Patientenguts nachgewiesen. Der Unterschied war nicht signifikant.

Bei Betrachtung der Altersgruppen wurde bei 16,7 % (5/30) der Katzen in der Altersgruppe unter 6 Monaten, bei 31,7 % (19/60) der Katzen im Alter zwischen 6 Monaten und 2 Jahren, bei 39,4 % (13/33) Katzen in der Altersgruppe über 2 bis 7 Jahre, bei 39,1 % (9/23) der Katzen der Altersgruppe über 7 bis 15 Jahre und bei 50 % (3/6) der Katzen über 15 Jahren DNA von *B. felis* nachgewiesen. In der Gruppe der Katzen mit unbekanntem Alter reagierten 44,2 % (23/52) der Katzen positiv in der PCR. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied bei den einzelnen Altersgruppen festgestellt.

Hinsichtlich der Rassen wurde bei 35,9 % (65/181) der Hauskatzen („domestic shorthair“ und „domestic longhair“) und bei 30,4 % (7/23) der Rassekatzen DNA von *B. felis* nachgewiesen. Der Unterschied war nicht signifikant.

Bezüglich der Haltungsform der Katzen wurde bei 37,0 % (70/189) der Freiläuferkatzen, die sich sowohl drinnen, als auch draußen aufhalten („indoor/outdoor“) DNA von *B. felis* nachgewiesen. Bei den Katzen, die sich ausschließlich im Freien aufhalten („outdoor“), reagierten 2 von 4 Tieren in der PCR positiv. Alle reinen Hauskatzen („indoor“) waren *B. felis*-negativ. Die Unterschiede waren statistisch signifikant ($\chi^2 = 6,63$, $p = 0,04$).

Bei Betrachtung der Herkunft der Katzen ergab sich, dass 34,2 % (38/110) der Tiere aus dem Gebiet „Kragga Kamma“, 41,93 % (26/62) der Katzen aus „Walmer“, beide der 2 Katzen aus „Newton Park/Mill Park“, 2 der 3 Katzen von außerhalb und 26,32 % (4/17) der Katzen mit unbekannter Herkunft in der PCR positiv reagierten. Alle Katzen aus „Algoa“ waren *B. felis* – negativ. Die Unterschiede waren signifikant ($\chi^2 = 11,43$, $p = 0,04$).

Bei 25 % (18/72) der Katzen, bei denen in der PCR DNA von *B. felis* nachgewiesen worden war, wurden die für Babesiose beschriebenen typischen Symptome, wie Anorexie, Anämie und Ikterus, festgestellt. Die übrigen 75 % (54/72) der positiv reagierenden Katzen waren symptomlos. Klinisch erkrankt waren 20 % (6/30) der weiblichen Katzen und 28,6 % (12/42) der männlichen Katzen. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant. Hinsichtlich der Altersgruppen zeigten 20 % (1/5) der positiven Katzen im Alter bis 6 Monaten, 63,2 %

(12/19) der positiven Katzen zwischen 6 Monaten und 2 Jahren, 15,4 % (2/13) der positiven Katzen über 2 und bis zu 7 Jahren und keine der Katzen in den Gruppen über 7 bis 15 Jahren und über 15 Jahren klinische Symptomatik. In der Gruppe mit unbekanntem Alter waren 13,0 % (3/23) der *B. felis*-positiven Katzen klinisch erkrankt. Der Unterschied zwischen den Altersgruppen war signifikant ($\chi^2 = 21,22$, $p = 0,007$). Hinsichtlich der Rasse erkrankten 26,2 % (17/65) der infizierten Hauskatzen („domestic shorthair“ und „domestic longhair“) und 14,3 % (1/7) der infizierten Rassekatzen klinisch. Der Unterschied war nicht signifikant. Bei allen klinisch erkrankten Katzen handelte es sich um Freiläuferkatzen, so dass der Anteil der Katzen mit klinischer Symptomatik unter den Freiläuferkatzen bei 25 % (18/70) lag. Hinsichtlich der Herkunft der Katzen ergab sich, dass 39,5 % (15/38) der infizierten Katzen des Gebiets „Kragga Kamma“, 7,7 % (2/26) aller positiven Katzen aus „Walmer“ und 1 von 4 der infizierten Katzen mit unbekannter Herkunft klinisch erkrankt waren. Der Unterschied bei den infizierten Katzen aus den einzelnen Gebieten war statistisch signifikant ($\chi^2 = 9,73$, $p = 0,05$).

3.3.3 Validierung des entwickelten Nachweisverfahrens

Für die geblindete, extern kontrollierte Validierung der entwickelten Real-time PCR wurden die zu untersuchenden Proben, wie in Kap. III, A, 5.4.4 ausführlich dargestellt, ausgesucht, geblindet und mit der Real-time PCR untersucht. Die Zusammensetzung und das Ergebnis der Untersuchung der 50 geblindeten Proben ist in Tab.20 dargestellt.

3.3.3.1 Spezifität und Sensitivität der entwickelten Real-time PCR

Bei allen Negativkontrollen und zwar sowohl bei denen von gesunden „indoor“-Katzen stammenden Proben (Nr. 1-16) als auch bei den Proben mit anderen Parasiten (Nr. 17-23), lieferte die Real-time PCR ein negatives Ergebnis (Tab. 20). Die Spezifität der entwickelten Nachweismethode lag somit bei 100 %. Bei den Babesien-positiven Patientenproben (Nr. 31-50) reagierten 5 von insgesamt 20 falsch-negativ, d. h. die Sensitivität der Real-time PCR lag bei 75 %. Die daraus abgeleiteten positiven und negativen Vorhersagewerte betragen 100 % (15/15) bzw. 82,1 % (23/28).

3.3.3.2 Nachweisgrenze der entwickelten Real-time PCR

Zur Überprüfung der Nachweisgrenze wurde eine 10fach-Verdünnungsreihe von einer im Ausstrich Babesien-positiven Katzenblutprobe hergestellt. Die Parasitämie lag bei ca. 11 %. Bei der geblindeten Validierung, bei der sechs Stufen der 10fach Verdünnungsreihe der Probe (unverdünnt bis 1:1 000 000) eingesetzt wurden, reagierten Ansätze bis zu einer Verdünnung von 1:10 000 positiv (Tab. 17). Die Nachweisgrenze lag somit zwischen 77 und 7 Babesien/ μ l Blut, wenn man von einer durchschnittlichen Erythrozytenzahl von ca. 7×10^6 / μ l Blut ausgeht. Bei Verwendung von 200 μ l Blut zur DNA-Extraktion, Elution der DNA in 200 μ l und Verwendung von 5 μ l DNA-Lösung als Template für die PCR ergab sich eine Nachweisgrenze von 385 Babesien pro Reaktion.

Tab. 20: Geblindete Proben für die extern kontrollierte Validierung der Real-time PCR

Nr.	Code	Bezeichnung	Inhalt	PCR-Befund	Ergebnis
1	10	N1-1	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
2	27	N1-2	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
3	23	N1-3	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
4	29	N2-1	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
5	30	N2-2	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
6	28	N2-3	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
7	34	N3-1	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
8	48	N3-2	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
9	32	N3-3	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
10	38	N4-1	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
11	11	N4-2	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
12	19	N4-3	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
13	5	N5-1	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
14	21	N5-2	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
15	2	N6	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
16	47	N7	Negativkontrolle (gesund, „indoor“)	negativ	korrekt
17	4	HF-1	Negativkontrolle/ <i>Haemobartonella felis</i>	negativ	korrekt
18	33	HF-2	Negativkontrolle/ <i>Haemobartonella felis</i>	negativ	korrekt
19	13	HC-1	Negativkontrolle/ <i>Hepatozoon canis</i>	negativ	korrekt
20	22	HC-2	Negativkontrolle/ <i>Hepatozoon canis</i>	negativ	korrekt
21	43	BM	Negativkontrolle/ <i>Babesia microti</i>	negativ	korrekt
22	49	BR	Negativkontrolle/ <i>Babesia rodhaini</i>	negativ	korrekt
23	15	BC	Negativkontrolle/ <i>Babesia canis</i>	negativ	korrekt
24	40	1	Verdünnungsreihe: unverdünnt	positiv	
25	9	-1	Verdünnungsreihe: 1:10	positiv	
26	37	-2	Verdünnungsreihe: 1:100	positiv	
27	45	-3	Verdünnungsreihe: 1:1000	positiv	
28	46	-4	Verdünnungsreihe: 1:10 000	positiv	
29	44	-5	Verdünnungsreihe: 1:100 000	negativ	
30	36	-6	Verdünnungsreihe: 1:1 000 000	negativ	

Tab. 20: Fortsetzung

Nr.	Code	Bezeichnung	Inhalt	PCR-Befund	Ergebnis
31	17	K10-1	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
32	7	K10-2	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
33	42	K10-3	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
34	41	K53-1	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
35	39	K53-2	Patient (Babesien-positiv)	negativ	falsch
36	18	K58-1	Patient (Babesien-positiv)	negativ	falsch
37	3	K58-2	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
38	50	K81-1	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
39	1	K81-2	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
40	6	K140-1	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
41	35	K140-2	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
42	31	K143-1	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
43	14	K143-2	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
44	8	K22	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
45	26	K190	Patient (Babesien-positiv)	negativ	falsch
46	12	K80	Patient (Babesien-positiv)	negativ	falsch
47	16	K91	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
48	24	K124	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
49	20	K156	Patient (Babesien-positiv)	positiv	korrekt
50	25	K161	Patient (Babesien-positiv)	negativ	falsch

4. Ergebnisse der serologischen Untersuchung – Indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest

Wie in Abb. 16 für K 91 bzw. K 96 dargestellt ist, reagierten bei der Untersuchung der Seren auf *B. felis* - spezifische Antikörper im IFAT 39,3 % (81/206) der untersuchten Seren positiv und die restlichen 60,7 % (125/206) Seren negativ. Dabei zeigten 2 Seren ein positives Ergebnis bis zur Verdünnungsstufe 1/80, 7 Seren bis 1/160 und 72 Seren bis 1/320.

Bei den weiblichen Tieren reagierten 31,4 % (32/102) und bei den männlichen Tieren 47,1 % (49/104) der Tiere im IFAT positiv. Der Unterschied war signifikant ($\chi^2 = 5,35$, $p = 0,02$).

Bei Betrachtung der Altersgruppen wiesen 16,7 % (5/30) der Tiere in der Gruppe der bis zu 6 Monate alten Katzen, 34,4 % (21/61) der Tiere in der Gruppe der über 6 Monate bis 2 Jahre alten Katzen, 50 % (17/34) der Tiere der Altersklasse über 2 bis 7 Jahre, 47,8 % (11/23) der Tiere im Alter von über 7 bis 15 Jahre und 66,7 % (4/6) der Katzen in der Gruppe der über 15-jährigen Katzen *B. felis* – spezifische Antikörper auf. Von den Katzen mit unbekanntem Alter reagierten 44,2 % (23/52) im IFAT positiv. Der Unterschied in den verschiedenen Altersgruppen war statistisch signifikant ($\chi^2 = 11,27$, $p = 0,02$).

Hinsichtlich der Rassen zeigten 37,5 % (9/24) der Rassekatzen und 39,6 % (72/182) der Hauskatzen („domestic shorthair“ und „domestic longhair“) im IFAT ein positives Ergebnis. Der Unterschied war nicht signifikant.

Unter den Freiläuferkatzen, die sich sowohl drinnen, als auch draußen aufhielten („indoor/outdoor“), reagierten 41,4 % (79/191) im IFAT positiv, bei den ausschließlich draußen gehaltenen Katzen 2 von 4 Tieren. Die 11 „indoor“- Katzen zeigten alle ein negatives Ergebnis. Der Unterschied war statistisch signifikant ($\chi^2 = 7,65$, $p = 0,02$).

Bei Betrachtung der Herkunft der untersuchten Katzen reagierten 37,8 % (42/111) der aus dem Gebiet „Kragga Kamma“ stammenden Katzen serologisch positiv. 46,8 % (29/62) der Katzen aus dem Gebiet „Walmer“, beide Katzen aus „Newton Park/Mill Park“, zwei der drei Katzen von außerhalb und 33,3 % (6/18) der Katzen mit unbekannter Herkunft zeigten *B. felis* – spezifische Antikörper. Alle 10 Tiere aus dem Gebiet „Algoa“ reagierten negativ im

IFAT. Bei 8 dieser Katzen handelte es sich um reine „indoor“-Katzen. Der Unterschied in den verschiedenen Untersuchungsgebieten war signifikant ($\chi^2 = 11,87$, $p = 0,04$).

Von den insgesamt 81 serologisch positiv reagierenden Katzen zeigten 22,2 % (18/81) klinische Symptome. Es handelte sich hierbei um dieselben 18 Katzen, die bereits bei den in der PCR positiv reagierenden Katzen mit klinischer Symptomatik (Kap 3.3.2) ausführlich beschrieben wurden.

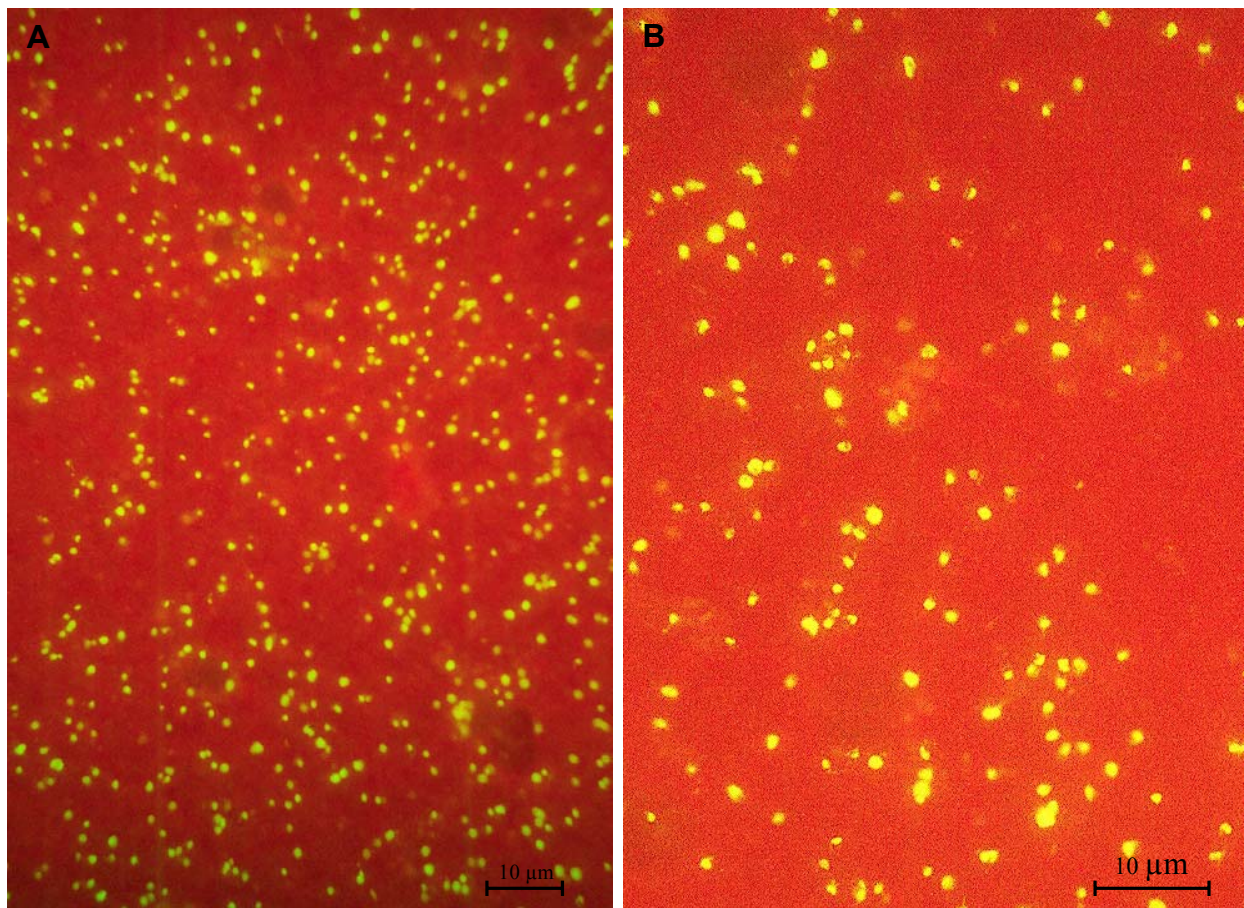


Abb. 16: Indirekte Immunfluoreszenz (IFAT) bei K 91 (**A**) und K 96 (**B**; Ausschnitt vergrößert) zum Nachweis von *B. felis* – spezifischen Antikörpern. Verdünnungsstufe 1:320

5. Vergleich der verschiedenen Untersuchungsmethoden

Die in der Studie angewandten Nachweisverfahren Blutausstrich, Real-time PCR und IFAT zum Nachweis von felinen Babesien wurden im Folgenden miteinander verglichen (Anhang D sowie Tab. 21, 22, 23). Insgesamt war der Anteil an Babesien-positiven Katzen im Blutausstrich mit 32 % (66/205) am niedrigsten, lag in der Real-time PCR bei 35,3 % (72/204) und war im IFAT mit 39,3 % (81/206) am höchsten. Beim Vergleich der Real-time PCR mit dem Blutausstrich (Tab. 21) zeigten sich übereinstimmende Ergebnisse bei 192 von 203 Untersuchungen (94,6 %). Bei 2 Isolaten, K 8 und K 68, wurden im Ausstrich Babesien nachgewiesen, die PCR reagierte jedoch negativ. Für diese Isolate war mittels Sequenzanalyse der 18S-rDNA nicht *B. felis*, sondern *B. leo* und eine verwandte Art diagnostiziert worden (Kap. 3.1). Für 9 im Ausstrich negative Isolate wurde ein positives PCR-Ergebnis ermittelt. Alle 9 Isolate waren auch im IFAT positiv. Beim Vergleich IFAT – Blutausstrich (Tab. 22) ergaben sich in 187 Fällen (91,2 %) übereinstimmende Resultate. 2 Isolate waren im Ausstrich positiv, reagierten aber im IFAT negativ. Dabei handelte es sich um K 8 und K 68, also diejenigen Isolate, für die nicht *B. felis* als Art diagnostiziert worden war und die auch in der PCR als negativ befunden worden waren. Von den 19 im Ausstrich negativen und im IFAT positiven Proben waren 9 auch in der PCR positiv. Bei Betrachtung der IFAT– und PCR– Testergebnisse (Tab. 23) zeigten sich übereinstimmende Befunde bei 196 Untersuchungen (96,1 %). Alle in der PCR positiv beurteilten Proben waren auch im IFAT positiv. Bei den 8 zwar im IFAT positiven, aber in der PCR negativen Ansätzen wurden in 7 Fällen auch im Blutausstrich Babesien nicht nachgewiesen, für 1 Katze wurde der Blutausstrich nicht untersucht.

Tab. 21: Vergleich der Ergebnisse der Nachweismethoden Blutausstrich und Real-time PCR. Es wurden insgesamt 203 Proben miteinander verglichen.

	Real-time PCR <i>positiv</i>	Real-time PCR <i>negativ</i>
Ausstrich <i>positiv</i>	63	2
Ausstrich <i>negativ</i>	9	129

Tab. 22: Vergleich der Methoden Blutausstrich und IFAT. Es wurden insgesamt 205 Proben miteinander verglichen

	IFAT <i>positiv</i>	IFAT <i>negativ</i>
Ausstrich <i>positiv</i>	64	2
Ausstrich <i>negativ</i>	16	123

Tab. 23: Vergleich der Methoden Real-time PCR und IFAT. Es wurden insgesamt 204 Proben miteinander verglichen

	IFAT <i>positiv</i>	IFAT <i>negativ</i>
Real-time PCR <i>positiv</i>	72	0
Real-time PCR <i>negativ</i>	8	124

C Diskussion

1. Artenvorkommen feliner Babesien im Untersuchungsgebiet

Über das Artenspektrum der Piroplasmen bei Feliden ist wenig bekannt. Derzeit werden 6 Arten unterschieden. *B. felis*, *B. cati* und *B. leo* sind morphologisch kleine, unter 3 µm große Arten, *B. pantherae* und *B. herpailuri* stellen mit bis zu 3,5 µm große Babesienarten dar. *C. felis*, die 6. Art, ist mit bis zu 1,5 µm Länge ebenfalls klein, wird aufgrund von Unterschieden im Entwicklungszyklus aber zu einer anderen Gattung, *Cytauxzoon*, gezählt. In Südafrika werden derzeit alle Infektionen mit kleinen Babesien bei Hauskatzen der Art *B. felis* zugeschrieben. Diese taxonomische Zuordnung begründet sich rein auf phänotypischen Merkmalen und einer vermuteten Wirtsspezifität. Der lichtmikroskopische Nachweis kleiner, pleomorpher Piroplasmen lässt eine Artdiagnose allerdings nicht zu, da besonders die „kleinen“ Babesien alle sehr ähnlich sind und sich morphologisch nicht eindeutig voneinander abgrenzen (Purnell, 1981, Conrad et al. 1992). So wurden aus Löwen in Südafrika Piroplasmen isoliert, die morphologisch nicht von den kleinen Babesien bei Hauskatzen zu unterscheiden waren. Da in den Seren der Löwen Antikörper gegen *B. felis* mittels IFAT nicht nachgewiesen wurden (López-Rebollar et al., 1999) und 18S-rDNA-Sequenzanalysen deutliche genotypische Unterschiede ergaben, wurde gefolgert, dass es sich bei den in den Löwen nachgewiesenen Erregern um eine zwar mit *B. felis* sehr eng verwandte, aber eigene Spezies, *B. leo*, handelt (Penzhorn et al., 2001).

Epidemiologische Untersuchungen zur Katzenbabesiose setzen Kenntnisse über die beteiligten Erreger voraus. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher darin, mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, das Artenvorkommen und die Artenvielfalt der Katzenbabesien im Untersuchungsgebiet Port Elizabeth in Südafrika zu beschreiben. Ein großer Vorteil dieser Methoden ist, dass sie genotypische Merkmale erfassen, die von Umwelteinflüssen weitgehend unabhängig und quantifizierbar sind. Durch Vergleiche von DNA-Sequenzen sind zudem Rückschlüsse auf phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen möglich. Die rDNA, also das Gen, das für die ribosomale RNA kodiert, erwies sich zur Untersuchung von Verwandtschaftsbeziehungen vieler Organismen als geeignetes Zielgen, da sich hier im Laufe der Evolution kontinuierlich Mutationen ansammelten. Die rDNA ist zudem aus unterschiedlich stark konservierten Bereichen zusammengesetzt. Je nach

Fragestellung können so mehr oder weniger polymorphe Genabschnitte zur Analyse nah oder entfernt verwandter Organismen herangezogen werden. Zur Ermittlung von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Arten einer Gattung oder Familie, hat sich die 18S-rDNA wiederholt, auch schon bei Babesien, als besonders geeignet erwiesen (Ellis et al., 1992, Allsopp et al. 1994, Zahler et al. 2000a, b und c). Für diesen rDNA-Abschnitt, der für die kleine Untereinheit der Ribosomen kodiert, liegen Sequenzinformationen für eine ganze Reihe von Babesien- und Theilerienarten in der Sequenzdatenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) vor. Bei Betrachtung der felines Piroplasmen waren 18S-rDNA-Sequenzen zum Zeitpunkt der Untersuchung aber nur für *B. felis* (AF244912), *B. leo* (AF244911) und für 2 aus Wildfeliden, und zwar aus einem Karakal, isolierte Erreger *Babesia sp.* Caracal Strain A (AF244913) und Caracal Strain B (AF244914) vorhanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die 18S-rDNA von 13 Isolaten aus Blutproben natürlich infizierter Katzen charakterisiert und miteinander verglichen. Die Katzen wurden dabei nicht zufällig aus dem Patientengut ausgewählt. Mit dem Ziel, ein möglichst breites Spektrum an Genotypen zu erfassen, wurde ein möglichst breites Spektrum an Phänotypen einbezogen. So wurden, neben im Blutaussstrich „typischen“ Isolaten, auch Isolate mit morphologischen Besonderheiten ausgewählt, wie größer erscheinende Merozoiten oder vermehrtes Auftreten von Birnenformen. Zudem wurden 2 Isolate (K 8 und K 68) einbezogen, weil hier trotz im Blutaussstrich nachgewiesener Parasiten der IFAT negativ blieb. Die verwendeten PCR-Primer, RIB-19 und RIB-20, waren bereits bei anderen Babesienarten erfolgreich eingesetzt worden. Sie konnten übernommen werden, da sie gegen stark konservierte Bereiche gerichtet sind und somit zur Amplifikation der 18S-rDNA einer Vielzahl von Babesien- und Theilerienarten geeignet sind (Zahler et al., 2000a, b und c). Die Sequenzanalyse der 1,7 kb großen PCR-Produkte der 13 Isolate und der Vergleich mit Genbanksequenzen zeigte deutlich, dass mindestens 2 oder 3 Arten für Babesieninfektionen bei den untersuchten Katzen in Port Elizabeth verantwortlich waren. Bei den meisten, und zwar bei 11 der 13 Isolate wurde *B. felis* diagnostiziert. Die charakterisierten 18S-rDNA-Sequenzen waren untereinander und mit der Sequenz von *B. felis* (AF244912) aus der Genbank nahezu identisch. Bei einer Katze, K 8, wurde eine Infektion mit *B. leo* nachgewiesen. Der Vergleich der Sequenz des Isolats K 8 mit der verfügbaren Genbanksequenz für *B. leo* (AF244911) ergab nämlich mit nur einer Deletion eine Sequenzidentität von 99,9 %. Es konnte somit erstmals eine natürliche Infektion mit *B. leo* bei Hauskatzen nachgewiesen werden.

Die Sequenz des letzten der 13 Isolate, K 68, unterschied sich auffällig von den übrigen Sequenzen und konnte keiner bisher in der Genbank bekannten Art eindeutig zugeordnet werden. Die Erreger waren zwar mit den übrigen feline Babesien am engsten verwandt, unterschieden sich jedoch deutlich. Der Vergleich des 1297 bp großen, charakterisierten Bereiches mit der entsprechenden Region der anderen Arten ergab eine Sequenzidentität von 98,3 % mit *B. leo*, 97,8 % mit *B. felis*, 96,8 % mit *Babesia* sp. Caracal Strain A und von 96,7 % mit *Babesia* sp. Caracal Strain B. Es stellte sich nun die Frage, ob dieses Isolat K 68 als eigenständige Art anzusehen ist. Die Speziesdifferenzierung und somit die Beantwortung der Frage nach dem Artstatus sollte im Allgemeinen nicht nur auf molekularbiologischen Ergebnissen, sondern auf verschiedenen diagnostischen Ansätzen basieren. So sollten phänotypische, also z. B. morphologische, serologische und biologische Merkmale zusammen mit Ergebnissen molekularer Untersuchungen betrachtet werden. Molekularbiologische Analysen können nicht direkt den Artstatus von Organismen nach dem biologischen Artkonzept (Mayr, 1975) aufklären, in dem Spezies als „Gruppen von sich untereinander fortpflanzender Lebewesen, die reproduktiv von anderen solchen Gruppen isoliert sind“ definiert sind. Dennoch können Sequenzanalysen wertvolle Hinweise dazu liefern, ob Organismen zu einer Art gehören oder nicht. So sollten sich in dendrographischen Darstellungen Arten als Gruppen von Genotypen überlappungsfrei voneinander abgrenzen und die intraspezifischen Identitäten deutlich höher liegen als die interspezifische Identität zwischen den abgegrenzten Gruppen. Wenn in der gleichen Gattung im selben Zielgen Sequenzunterschiede zwischen zwei nahe verwandten Spezies, deren getrennter Artstatus allgemein akzeptiert ist, in der gleichen Größenordnung liegen, wie zwischen zwei zu untersuchenden Taxa, kann dies ebenfalls als Kriterium auf einen getrennten Artstatus der untersuchten Taxa gewertet werden (Zahler et al., 1995). In der vorliegenden Studie war nur eine Sequenz von K 68 verfügbar, genotypische Variationen innerhalb dieses Taxon konnten also nicht ermittelt werden. Für *B. felis* jedoch wurde anhand von 11 Isolaten eine intraspezifische Variation erfasst. Das Isolat K 68 grenzte sich im Dendrogramm (Abb. 11) überlappungsfrei von den 11 *B. felis* – Isolaten und dem Isolat K 8 (*B. leo*) ab.

Bei Betrachtung der interspezifischen Sequenzunterschiede zeigte sich, dass die paarweisen Identitäten von *B. felis* und *B. leo*, also 2 Taxa, für die ein getrennter Artstatus derzeit akzeptiert ist, mit 96,7 % in der gleichen Größenordnung lagen, wie die Identität von 98,3 % zwischen K 68 und der diesem Isolat am nächsten verwandten Art *B. leo* (Tab. 11). Auch die Größenordnung der Sequenzidentitäten aller 4 feline Babesien-Taxa (*B. felis*, *B. leo*,

Babesia sp. Caracal Strain A und Strain B) untereinander und zu dem Isolat K 68 (Tab. 11) war gleich. Dies würde die Auffassung unterstützen, dass es sich bei dem Isolat K 68 um eine weitere, eigenständige Art handelt. Um eine Aussage für oder gegen den Artstatus auf molekularbiologischer Ebene stärker abzusichern, sollten jedoch weitere Isolate charakterisiert werden, um eine eventuell vorhandene intraspezifische Variation zu beleuchten. Eine Artabgrenzung des Isolats K 68 zumindest von *B. felis* wird durch die Ergebnisse im IFAT unterstützt. Das Isolat K 68 zeigte keine serologische Kreuzreaktionen mit *B. felis* - Antigen und somit deutlich antigenetische Unterschiede. Eine serologische Untersuchung mit *B. leo* – Antigen wäre wünschenswert und wichtig, konnte aber leider nicht durchgeführt werden, da Antigen von *B. leo* nicht verfügbar war. Im vorliegenden Fall erwies sich die Morphologie der Erreger in den Erythrozyten, wie bei anderen kleinen Babesien auch schon beschrieben (Purnell, 1981, Conrad et al., 1992, Penzhorn et al., 2001), als wenig aussagekräftig. So waren im gefärbten Blutaussstrich Unterschiede zu *B. felis* oder *B. leo* nicht feststellbar. Die Parasitämie war relativ gering. Bezüglich der klinischen Symptomatik der Katze, aus der diese Erreger isoliert wurden, liegen nur wenige Informationen vor. Bei dem Patienten K 68 handelte es sich um eine streunende, herrenlose Katze, die Mitte November 2001 in die „Kragga Kamma Veterinary Clinic“ gebracht wurde. Das Tier war stark abgemagert und verwahrlost. Über das Alter oder den FIV- oder FeLV-Status der Katze ist nichts bekannt. Informationen über das weitere Schicksal des Tieres liegen ebenfalls nicht vor (Anhang D, Tab. 25).

Bei der Erstbeschreibung von *B. leo* wurde der Status der eigenen Art primär mit der sich von anderen Babesien abgrenzenden 18S-rDNA-Sequenz und einer fehlenden serologischen Kreuzreaktion mit *B. felis* begründet (Penzhorn et al., 2001). Das Isolat K 8 wurde, wie bereits erwähnt, aufgrund seiner 18S-rDNA-Sequenz eindeutig als *B. leo* identifiziert, und diese Art damit erstmals als natürliche Infektion bei Hauskatzen beschrieben. Bekräftigt wird diese Diagnose dadurch, dass das Isolat K 8 serologisch nicht mit *B. felis* – Antigen im IFAT reagierte und fehlende Kreuzreaktivitäten zwischen *B. felis* und *B. leo* bereits beschrieben wurden (López-Rebollar et al., 1999). In wieweit die Hauskatze als natürlicher Wirt von *B. leo* epidemiologische Bedeutung besitzt, bleibt unklar und spekulativ. Bei dem infizierten Tier handelte es sich um einen, FeLV-positiven, kastrierten Kater, ca. 2,5 Jahre alt, der Anfang November 2001 mit dem Vorbericht „apathisch und frisst nicht“ zur Untersuchung in die „Kragga Kamma Veterinary Clinic“ gebracht wurde (Anhang D, Tab. 25). Das Tier war sehr apathisch, abgemagert, hatte 41,0 °C Fieber und zeigte ein hochgradig gestörtes

Allgemeinbefinden. Im Blutausstrich wurden vereinzelt Babesien in Siegelringform nachgewiesen, die morphologisch nicht von *B. felis* zu unterscheiden waren. Die Parasitämie war somit relativ gering, zudem wurden meist nur Einzelformen in den Erythrozyten beobachtet. Das Tier wurde mit Primaquine® (Primaquinphosphat), 4 x 1 mg (2 Tbl.) alle 36 h, dann 4 x 1 mg (2 Tbl.) wöchentlich, behandelt. Nach 10 Tagen wurde der Kater jedoch mit weiter verschlechtertem Allgemeinzustand in der Praxis wieder vorgestellt. Zu diesem Zeitpunkt wurden Babesien im Blutausstrich nicht mehr nachgewiesen, das Tier aber im Hinblick auf seine FeLV – Infektion euthanasiert. Bereits in einer früheren Untersuchung zur Katzenbabesiose in Südafrika wurde festgestellt, dass ein Teil der mit Babesien infizierte Katzen gleichzeitig Infektionen mit FIV (14 % der untersuchten Katzen mit nachgewiesener Babesieninfektion) oder FeLV (34 % der Babesien-positiven Katzen) aufwies (Schoeman et al., 2001). Es bleibt unklar, ob eine natürliche Infektion mit *B. leo* bei Hauskatzen nur durch eine erhöhte Empfänglichkeit der Katzen aufgrund immunsuppressiver Koinfektionen, wie Infektionen mit FeLV oder FIV, erfolgen kann, oder ob Hauskatzen tatsächlich zum natürlichen Wirtsspektrum von *B. leo* gehören. Bei einer Studie aus Spanien wiesen 3 der insgesamt 4 Katzen, bei denen in der PCR DNA von Hundebabesien (*B. canis*, *T. annae*) nachgewiesen wurde, gleichzeitig Infektionen mit FIV oder FeLV auf (Criado-Fornelio et al., 2003). Ob die Wirtsspezifität einiger Babesienarten doch geringer ist, als bisher angenommen, oder ob Babesien anderer Wirtsspezifität sich nur dann vermehren können, wenn eine starke Immunsuppression des Säugers vorliegt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Mit Ausnahme von *C. felis* stellen die bisher molekularbiologisch charakterisierten felines Piroplasmen innerhalb der Babesien und Theilerien eine eng verwandte Erregergruppe dar, wie in Abb. 17 deutlich wird. In einer dendrographischen Darstellung phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen, unter Einbeziehung zahlreicher Babesien- und Theilerienarten, bildeten sich nämlich drei Hauptgruppen. Während sich in der erste Gruppe die sogenannten 'typischen' Babesien (Mehlhorn und Schein, 1984) darstellten, gliederte sich in der zweiten Gruppe die klassischen Theilerien und *C. felis* ein. Die felines Piroplasmen waren in der dritten Gruppe enthalten und bildeten dort ein gemeinsames Cluster. Dabei gruppieren sich alle *B. felis* – Isolate zusammen und benachbart zu den beiden artlich nicht festgelegten *Babesia* spp. Caracal Strain A und B, während sich *B. leo* zusammen mit dem Isolat K 8 darstellt. Das Isolat K 68 trennte sich von all diesen felines Erregern deutlich ab. In dieser dritten Hauptgruppe waren außerdem noch die morphologisch kleinen, nicht-felinen Arten *B. rodhaini*, *B. microti* und *T. annae* enthalten. Diese Formation einer dritten Erregergruppe

neben den Babesien und Theilerien wurde auch in anderen Untersuchungen nachgewiesen (Ellis et al., 1992, Allsopp et al., 1994, Zahler et al., 2000c, Penzhorn et al., 2001). Über die Bedeutung der Ergebnisse dieser molekular-phylogenetischen Untersuchungen wird derzeit noch kontrovers diskutiert. So wurde gefolgert, dass der erwähnten dritten Gruppe ein den Babesien und Theilerien gleichwertiger taxonomischer Rang zugeschrieben werden sollte (Allsopp et al., 1994, Zahler et al., 2000c). Zumindest für *B. microti* wurden jedoch auch biologische Eigenschaften beschrieben, die diese Art von den 'typischen' Babesien unterscheidet. So wurden Vermehrungsstadien nicht nur in Erythrozyten sondern auch in Lymphozyten festgestellt (Mehlhorn et al., 1986) und eine transovariale Weitergabe der Erreger in Zecken wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Ob diese biologischen Eigenheiten auch für die kleinen felines Piroplasmen dieser dritten taxonomischen Gruppe zutreffen, ist jedoch noch unbekannt. Bei *B. leo* wurden exoerythrozytäre Vermehrungsstadien bisher nicht nachgewiesen (Penzhorn et al., 2001).

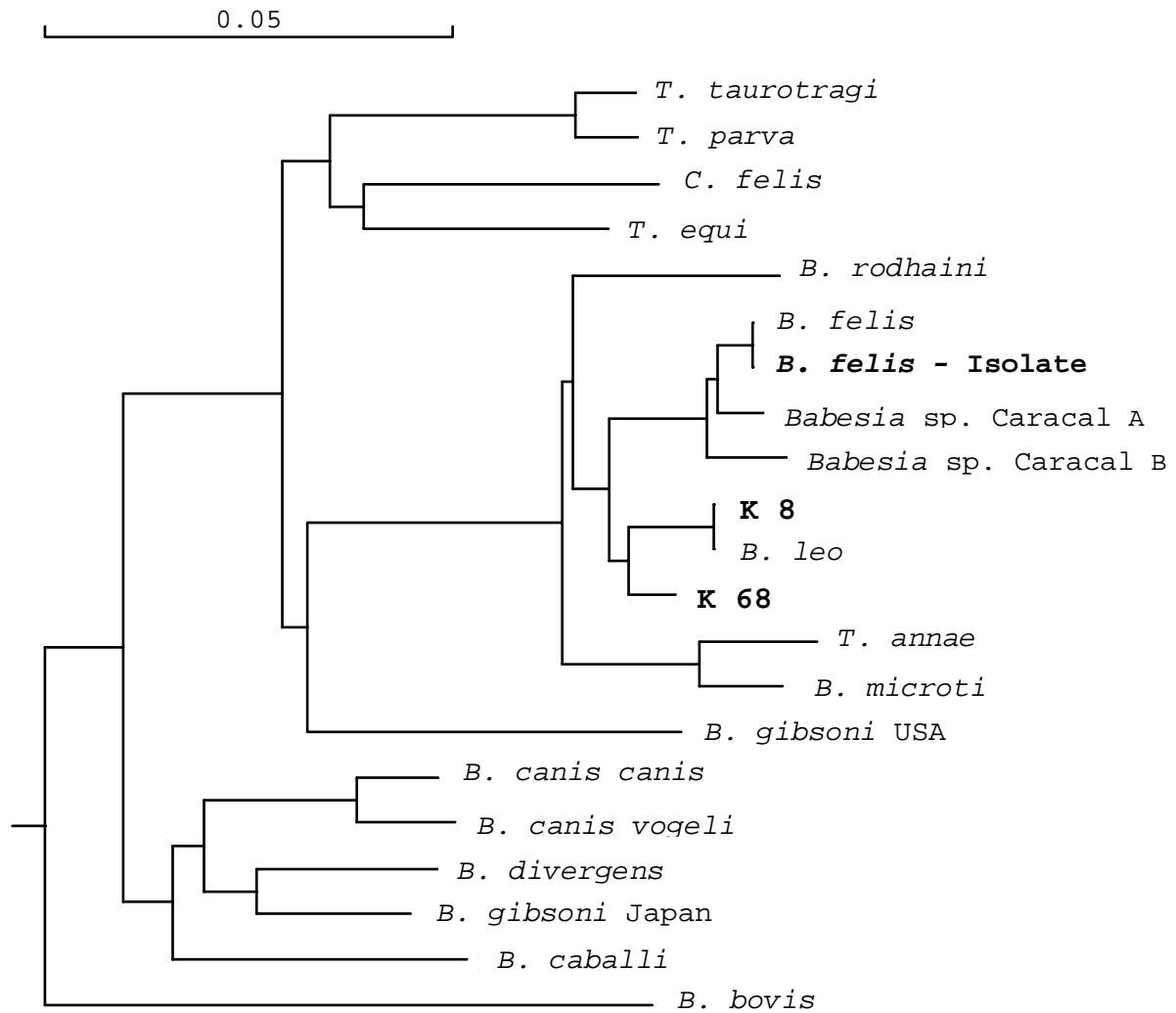


Abb. 17: „Observed divergency“ – Dendrogramm basierend auf Vergleich der 18S-rDNA verschiedener Babesien und Theilerien. Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Isolate sind fettgedruckt. *B. felis* (AF244912), *B. leo* (AF24411), *Babesia* sp. Caracal Strain A (AF244913), *Babesia* sp. Caracal Strain B (AF244914), *B. microti* (U09833), *B. rodhaini* (M87565), *B. caballi* (Z15104), *B. canis canis* (AY072926), *B. canis vogeli* (AY072925), *B. gibsoni* USA (AF231350), *B. gibsoni* Japan (AF175300), *B. divergens* (U07885), *B. bovis* (L19077), *T. annae* (AF188001), *T. equi* (Z15105), *T. parva* (L02366), *T. taurotragi* (L19082), *C. felis* (L19080).

In der vorliegenden Studie sollten auch genotypische Variationen unterhalb des Artneiveaus analysiert werden. Für solche Untersuchungen haben sich in der rDNA die nicht-kodierenden Regionen der internen transkribierten Spacer 1 und 2 (ITS 1 und 2) als besonders geeignet erwiesen, da sie eine höhere Variabilität als die 18S-rDNA besitzen (Zahler et al., 1998). Daher wurde dieser Genabschnitt ausgewählt und bei den 13 Isolaten, für die schon die 18S-rDNA untersucht worden war, charakterisiert. Die PCR-Primer, RIB-3 und RIB-13, die auf bei Babesien konservierte, die ITS-Region flankierende Bereiche gerichtet sind, wurden bereits bei anderen Babesienarten zur Analyse der ITS-rDNA erfolgreich eingesetzt (Zahler et al., 1998) und hier übernommen. Bei Vergleich der Sequenzen der 11 Isolate, die anhand der 18S-rDNA als *B. felis* diagnostiziert worden waren, ergab sich eine Polymorphismusrate von 2,6 % und paarweise Sequenzidentitäten zwischen 98,6 % und 99,9 %. Dieser intraspezifische Polymorphismus lag damit in der gleichen Größenordnung, wie der bei *B. canis canis* und *B. canis vogeli*, wo Identitäten von 99% bzw. 97,9 % festgestellt wurden (Zahler et al., 1998). Bei den 11 *B. felis* – Isolaten wurden 9 Genotypen ermittelt, die sich gleichmäßig über die Isolate verteilten. Korrelationen mit phänotypischen Merkmalen, wie z. B. der Herkunft, wurden nicht festgestellt. Das anhand der 18S-rDNA als *B. leo* diagnostizierte Isolat K 8 und das Isolat K 68 zeigten im Vergleich mit *B. felis* viel geringere Identitäten von 77,0 % bzw. 76 % (Tab. 14) und grenzten sich damit deutlich von *B. felis* ab. Auch mit diesem Zielgen wurde also die artliche Trennung der beiden Isolate K 8 und K 68 von *B. felis* gestützt. Die Hypothese, dass das Isolat K 68 eine von K 8 abgegrenzte taxonomische Einheit mit Artstatus darstellt, wird durch die ITS-Ergebnisse ebenfalls bestätigt. So wiesen die Sequenzen der Isolate K 8 und K 68 untereinander eine Identität von 87,8 % auf, die ähnlich war, wie die Identitäten mit *B. felis*, während im Gegensatz dazu die intraspezifischen Polymorphismen bei *B. felis* mit 2,6 % in einer niedrigeren Größenordnung lagen. Bei zusätzlicher Einbindung weiterer Babesienarten, die nicht bei Feliden vorkommen, *B. microti* und *B. rodhaini*, wird die Auffassung eines getrennten Artstatus von K 68 gestützt. Die Identitäten zwischen diesen Arten lagen zwischen 76,0 % und 78,9 % (Tab. 14) und damit im gleichen Größenbereich.

Die intraspezifischen Variation der *B. felis* –Isolate innerhalb der ITS-Region der rDNA erwies sich somit als relativ gering. Daher wurde dieser Bereich zur Entwicklung einer diagnostischen Real-time PCR, die sehr spezifisch sein sollte, ausgewählt. Um einen Einblick in die Intra-Isolat-Variabilität zu erhalten, die die Sensitivität eines diagnostischen Tests beeinflussen kann, wurde ein Isolat, und zwar K 60, exemplarisch detailliert untersucht. Bei der Analyse von Intra-Isolat-Polymorphismen ist es wünschenswert, auch zahlenmäßig

seltener auftretende Varianten der rDNA, die ein multi copy – Gen ist, zu ermitteln. Zudem soll jede einzelne Base möglichst genau erfasst werden. Daher kann auf Klonierung nicht verzichtet werden. Bei der Analyse eines 282 bp großen, klonierten Fragments aus dem Bereich der ITS-1 bei dem Isolat K 60 wurden 7 verschiedene Genotypen festgestellt. Für 6 Genotypen wurde eine Polymorphismusrate von 3,2 % und Sequenzidentitäten zwischen 97,2 % und 99,6 % ermittelt (Tab. 16). Dies repräsentiert eine relativ große Homogenität innerhalb dieses Isolats. Die Sequenz des Genotyps 7 (Klon K 60 E.2) war jedoch nur zu 76,9 % mit einer Konsensussequenz aus den weiteren 6 Genotypen von K 60 und den Genotypen der anderen *B. felis* - Isolate identisch. Die Sequenz ließ sich keiner anderen bisher bekannten Art zuordnen, auch nicht beim Durchsuchen der Genbank des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). In einer dendrographischen Darstellung (Abb. 18), die auf Vergleichen des entsprechenden 282 bp großen Bereiches innerhalb der ITS-1 des Klons K 60 E.2 mit den Isolaten K 8, K 68 und den *B. felis* – Isolaten basierte, gruppierte sich der Klon K 60 E.2 eher zu dem Isolat K 8 und damit zu *B. leo* und zu K 68, als zu den *B. felis* – Isolaten. Die taxonomische Eingruppierung bleibt jedoch unklar und spekulativ, da nur ein einziger Klon mit dieser Sequenz gefunden wurde. Bei der Analyse der 18S-rDNA und der rDNA der gesamten ITS-Region der Katzenblutprobe K 60 wurde nur *B. felis* als Erreger diagnostiziert. Es ist dennoch denkbar, dass hier eine Mischinfektion mit mehreren Erregern vorliegt, die bei direkter Sequenzierung von PCR-Produkten dieses Isolates unentdeckt blieb.

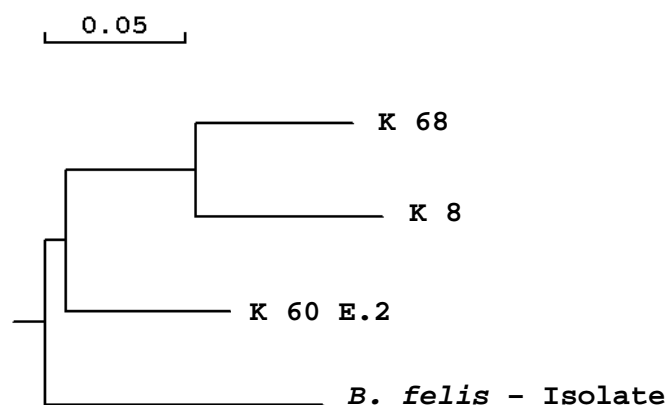


Abb. 18: „Observed divergency“ – Dendrogramm, basierend auf Vergleichen eines 282 bp großen Bereiches der ITS-1-Region. Bei K 8 und K 68 wurde direkt sequenziert, bei K 60 E.2 und den *B. felis* – Isolaten wurden die PCR-Produkte vor der Sequenzierung kloniert.

2. Entwicklung und Validierung einer Real-time PCR zum Nachweis von *B. felis*

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Diagnostikmethode, die einen spezifischen und sensitiven Nachweis von *B. felis* ermöglicht. Derzeit ist neben dem direkten Erregernachweis mittels gefärbtem Blutaussstrich nur der serologische Nachweis *B. felis* – spezifischer Antikörper im IFAT beschrieben, der allerdings nicht kommerziell erhältlich ist und somit der Routinediagnostik nicht zur Verfügung steht (López-Rebollar et al., 1999). Der routinemäßig in südafrikanischen Tierarztpraxen eingesetzte gefärbte Blutaussstrich ermöglicht einen schnellen und preiswerten Nachweis feliner Piroplasmen. Eine Artendiagnose ist hiermit allerdings nicht möglich. Außerdem ist der Nachweis der Erreger bei sehr geringen Parasitämien sehr schwierig und oft nicht möglich. Mit dem am Onderstepoort Veterinary Institute in Südafrika entwickelten IFAT werden *B. felis* - spezifische Antikörper nachgewiesen. Kreuzreaktionen mit *B. leo* bleiben aus (López-Rebollar et al., 1999). Der serologische Nachweis von Antikörpern lässt eine Aussage über das gegenwärtige Stadium der Infektion jedoch nicht zu. So können bei älteren oder zurückliegenden Infektionen persistierende Antikörper vorhanden, der Erreger ist eventuell aber nicht mehr vorhanden. In frühen Phasen der Infektionen sind zudem spezifische Antikörper noch nicht gebildet, so dass falsch-negative Ergebnisse entstehen. Zudem ist die Verfügbarkeit von Antigen häufig problematisch und erschwert den Einsatz in der Routinediagnostik. In der vorliegenden Studie wurde die Real-time PCR als Methode ausgewählt, da sie das Potential für hohe Sensitivität und Spezifität besitzt. Die Amplifikation und Verifikation der spezifischen PCR-Produkte kann bei der Real-time PCR in „Echtzeit“ bereits während des Laufs beobachtet werden, und es entfallen zeitaufwendige post-PCR-Prozesse, wie die Gelelektrophorese und Restriktionsverdau zur Identifikation der Amplifikate. Bei der Real-time PCR wird durch dieses geschlossene System die Gefahr einer Kontamination stark reduziert. Ein großer Nachteil dieser Methode liegt jedoch in den hohen Kosten, auch im Vergleich mit der konventionellen PCR. Es ist jedoch zu erwarten, dass in der Zukunft mit wachsender Verbreitung dieser Technologie die Geräteanschaffungskosten und die Preise für fluoreszenzmarkierte Sonden sinken werden.

Ein wichtiges Ziel der geplanten Real-time PCR war eine hohe Spezifität für *B. felis*. Daher wurde als Zielgen ein Bereich aus der ITS-1-Region gewählt, der nicht-kodierend und zwischen Arten wenig konserviert ist. Basierend auf den Sequenzinformationen, die im

Rahmen der genotypischen Charakterisierung der *B. felis* – Isolate gewonnen worden waren, war es möglich, einen Bereich zu identifizieren, der innerhalb der *B. felis* – Isolate konserviert war, sich jedoch von anderen Babesien und Theilerien durch Mutationen unterscheidet. Die Sondenstruktur des Molecular Beacons wurde gewählt, da diese Fluoreszenz-markierten Hybridisierungs sonden über eine außerordentlich große Spezifität verfügen und eine Fluoreszenz bei nur einer Fehlpaarung ausbleibt (Tyagi et al., 1996). Bei der Konstruktion der Sonde und der Primer wurde insbesondere darauf geachtet, dass die jeweiligen Basenabfolgen weder in Sequenzen anderer Piroplasmen, noch in Zecken-, Pilz- oder Säuger-DNA vorkam. Zur Überprüfung der Spezifität von Sonde und Primern für *B. felis* wurden sie mit der BLAST-Funktion der NCBI Genbank gegen alle verfügbaren Sequenzen geprüft.

Nach Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen wurde die Leistungsfähigkeit des Tests durch eine geblindete, extern kontrollierte Validierung überprüft. Dabei erwies sich das Nachweisverfahren mit einer Spezifität von 100 %, wie erhofft, als extrem spezifisch. Alle Negativkontrollen, die aus Blut von gesunden „indoor“ – Katzen aus Deutschland stammten sowie die Blutproben, die andere Erreger beinhalteten, wurden in der PCR korrekt als negativ erkannt. Bei den zugegebenen Erregern handelte es sich um *Haemobartonella felis* und *Hepatozoon canis* sowie drei Babesienarten *B. rodhaini*, *B. microti* und *B. canis*. *Haemobartonella felis* kommt oft als Koinfektion bei Katzen mit einer Babesieninfektion vor (Jacobson et al., 2000, Schoeman et al., 2001). *Hepatozoon* sp. ist auch als Infektionserreger bei der Katze bekannt (Baneth et al., 1998). *B. rodhaini* und *B. microti* wurden gewählt, da die beiden Arten mit *B. felis* am engsten verwandten sind. Als ein Vertreter der „großen“ Babesien wurde *B. canis* in die Untersuchung miteinbezogen. Alle diese Proben wurden richtig als negativ diagnostiziert. Kreuzreaktionen mit diesen, z. T. auch nahe verwandten Erregern konnten somit ausgeschlossen werden. Diese außerordentlich hohe Spezifität der entwickelten Real-time PCR wurde durch das Zusammenspiel einer extrem spezifischen Sonde und *B. felis* - spezifischen Primern erreicht. Eine weitere Verifizierung der amplifizierten Produkte ist bei diesem Test nicht notwendig.

Die bei der Validierung ermittelte Sensitivität von 75 % und die errechnete Nachweisgrenze von 7 bis 77 Babesien/ μ l Blut blieben hinter den Erwartungen zurück. Die verwendeten Proben waren zum Zeitpunkt der Validierung allerdings schon etwa zwei Jahre alt und mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren, so dass die Qualität der im Blut vorhandenen

DNA wahrscheinlich beeinträchtigt war. Frisches Blutmaterial, das leider nicht zur Verfügung stand, hätte möglicherweise eine viel höhere Sensitivität der Real-time PCR ergeben. Die hier errechnete Sensitivität der PCR lag damit in einer ähnlichen Größenordnung wie beim Babesiennachweis im Blutaussstrich, für den eine Sensitivität von 10 bis 100 Erreger/ μ l angegeben wurde (Böse et al., 1995). Bei Bedarf könnte die entwickelte Real-time PCR jedoch zu einer Nested-PCR mit einem zusätzlichen äußeren Primerpaar umkonstruiert und dadurch eine höhere Sensitivität erreichen werden.

Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Real-time PCR handelt es sich um den ersten molekularbiologischen diagnostischen Test zum Nachweis von *B. felis*. Mit einer Spezifität und einem positiven Vorhersagewert von jeweils 100 %, einer Sensitivität von 75 % und einem negativen Vorhersagewert von 82,1 % sowie einer Nachweisgrenze von 7 bis 77 Babesien pro μ l Blut bewies der Test seine Eignung für den spezifischen und sensitiven Nachweis von *B. felis*. Im Vergleich zum direkten Erregernachweis im Blutaussstrich, bei dem eine Abgrenzung morphologisch ähnlicher Erreger von *B. felis* nicht möglich ist, erlaubt die Real-time PCR eine Artdiagnose. Außerdem kann insbesondere bei Katzen mit sehr geringen Parasitämien bei chronischen und subklinischen Infektionen ein Babesienbefall aufgedeckt werden, der im Blutaussstrich eventuell unentdeckt bleibt. Für einen Einsatz und die direkte Durchführung in Tierarztpraxen, ist die entwickelte Real-time PCR wahrscheinlich nicht geeignet, da der apparative Aufwand zu kostenintensiv wäre. Der Einsatz des Nachweisverfahrens in diagnostischen Labors ist allerdings durchaus denkbar. Das größte Potential besitzt der Test aber sicherlich in der Forschung. So sind mit der entwickelten Real-time PCR die Voraussetzungen für weitere, dringend notwendige epidemiologische Studien geschaffen. Als Beispiel sei hier nur die Suche nach der Vektorzeckenart genannt, die für *B. felis* noch unbekannt ist. Bisher stand kein Verfahren zum eindeutigen Nachweis von *B. felis* in Zecken zur Verfügung, da morphologische Merkmale der Entwicklungsstadien in den Zecken unbekannt sind. Durch seine hohe Spezifität bietet sich der hier vorgestellte Test für solche Studien an und erlaubt auch die Untersuchung großer Probenzahlen ohne erheblichen Arbeitsaufwand.

3. Vergleich der angewandten Untersuchungsmethoden

Der Vergleich der Ergebnisse der in der Studie angewandten Nachweisverfahren Blutausstrich, Real-time PCR und IFAT, ergab eine große Übereinstimmung der Testergebnisse. 91 % der mehr als 200 Proben wurde in allen drei Tests gleich beurteilt. Die paarweisen Übereinstimmungen zwischen den Tests variierten dabei zwischen 91 % und 96 %. Der tatsächliche Zustand bezüglich einer Babesieninfektion war bei den Katzen, die aus den Patienten einer Tierklinik in Port Elizabeth rekrutiert waren, jedoch unbekannt. Die Diagnose des Anteils Babesien-positiver Katzen war im Blutausstrich am niedrigsten, in der PCR dazwischen liegend und im IFAT am höchsten. Bei 94,6 % der in der PCR als *B. felis* - positiv befunden Katzenblutproben und bei 91,2 % der Proben, die im IFAT *B. felis* - spezifische Antikörper aufwiesen, konnten auch im Blutausstrich Babesien nachgewiesen werden. Die herkömmliche und in Tierarztpraxen in Südafrika gängige Methode, Babesien mittels gefärbtem Blutausstrich schnell und kostengünstig nachzuweisen, stellte sich somit durchaus als geeignet dar. Die Diagnosestellung anhand eines Blutausstriches erfordert allerdings v. a. bei geringer Parasitämie ein sorgfältiges Durchmustern der Ausstriche und Erfahrung in Bezug auf die Morphologie der Parasiten, die von anderen Erregern, von Färbeartfakten und Howell-Jolly-Bodies abgegrenzt werden müssen. Bei der Entscheidung für oder gegen eine Therapie werden daher immer auch typische Symptome (hauptsächlich Anämie und Depression), sowie das hämatologische Gesamtbild (Anämie, meist regenerativ) v. a. in den endemischen Regionen, miteinbezogen. Wie schon erwähnt, erlaubt der Blutausstrich keine Artdiagnose, dies stellt in der tierärztlichen Routinepraxis jedoch nicht unbedingt einen Nachteil dar. Infektionen mit *B. leo* und dem artlich noch nicht festgelegten Isolat K 68 wurden nur im Blutausstrich erkannt. Die entwickelte Real-time PCR stellt sich im Vergleich zum Blutausstrich als eine sensitivere Methode zum Nachweis von *B. felis* dar. Es konnten nämlich zusätzlich 9 Katzen als mit *B. felis* infiziert ermittelt werden, alle 9 Isolate waren auch im IFAT positiv. Bei sehr geringen Parasitämien, die oft bei chronischen oder subklinischen Infektionen vorkommen, werden die Parasiten im Ausstrich eventuell übersehen, sind in der PCR jedoch noch nachweisbar. Der Vergleich der Real-time PCR mit der serologischen Nachweismethode, dem IFAT, der Antikörper gegen *B. felis*, aber nicht gegen *B. leo* nachweist (López-Rebollar et al., 1999, Penzhorn et al., 2001), ergab eine Übereinstimmung der Testergebnisse von 96,1 %. Zusätzlich zu den Ergebnissen in der Real-time PCR konnten 8 weitere Katzen mit *B. felis* - spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Da in 7 Fällen Babesien im Blutausstrich nicht nachgewiesen wurden

(ein Ausstrich wurde nicht untersucht), ist hier eine sehr niedrige Parasitämie bei diesen Tieren anzunehmen. Es kann sogar möglich sein, dass eine Infektion mit dem Erreger zum Zeitpunkt der Untersuchung gar nicht mehr bestand und die nachgewiesenen Antikörper nur beweisen, dass das untersuchte Tier irgendwann mit dem Erreger in Kontakt getreten ist. Frische Infektionen, bei denen der IFAT negativ ausfiel, da noch keine spezifischen Antikörper gebildet wurden, die Erreger dann aber direkt im Blutausstrich oder in der PCR nachgewiesen wurden, wurden in der vorliegenden Studie nicht festgestellt.

4. Vorkommen feliner Babesiose in Port Elizabeth, Südafrika

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Häufigkeit feliner Babesieninfektionen in einer Region, die als Endemiegebiet in Südafrika gilt, anhand zufällig aus dem Patientengut einer Kleintierklinik ausgewählter Katzen zu untersuchen. Die, durch den Nachweis von Babesien im Blutausstrich, ermittelte Prävalenz betrug 32,2 %. Die Ergebnisse in der PCR lagen mit 35,3 % sogar noch höher. Die Untersuchungen auf spezifische Antikörper im IFAT ergaben eine Seroprävalenz von 39,3 % der untersuchten Katzen im Untersuchungsgebiet. Babesieninfektionen waren bei Hauskatzen also sehr häufig und stellten durchaus ein nicht zu unterschätzendes Problem im Küstengebiet Port Elizabeth dar.

Eine Geschlechts- oder Rasseprädisposition für eine nachweisbare Parasitämie ließ sich bei den untersuchten Katzen anhand der Ergebnisse der Blutausstriche sowie der PCR nicht erkennen. Dies stimmt mit Ergebnissen früherer Untersuchungen überein (Jacobson et al., 2000, Schoeman et al., 2001). Allerdings wiesen die Ergebnisse im IFAT einen signifikant höheren Anteil an männlichen Tieren (41,4 %) mit nachgewiesenen *B. felis* – spezifischen Antikörpern auf, als der Anteil bei den untersuchten weiblichen Tieren (37,1 %). Inwieweit diese Ergebnisse bezüglich einer Geschlechtsprädisposition bei der Katzenbabesiose zu werten ist, bleibt unklar. Das Alter der Katzen war mit dem direkten Nachweis von Babesien im Blutausstrich oder in der PCR nicht korreliert. Beim Nachweis *B. felis* - spezifischer Antikörper im IFAT dagegen reagierten überdurchschnittlich mehr Katzen im Alter von über 2 Jahren serologisch positiv, als die Katzen mit 2 Jahren und jünger. Dies könnte so interpretiert werden, dass Katzen in endemischen Gebieten meist irgendwann, oft in jungen Jahren, mit dem Erreger in Kontakt treten und lange persistierende Antikörper ausbilden, so

dass bei einem sehr hohen Prozentsatz der älteren Katzen in einem Endemiegebiet *B. felis* – spezifische Antikörper sich in höheren Altersgruppen kumulieren. Die fehlende Altersabhängigkeit bei direktem Nachweis der Erreger könnte folglich bedeuten, dass sich bei Tieren aller Altersgruppen eine im Blutaussstrich oder mit der PCR nachweisbare Parasitämie neu ausbilden kann. Zumindest spricht sie gegen die Ausbildung lang andauernder steriler Immunitäten und auch gegen das Vorkommen von lang persistierenden Parasitämien, zumindest bei überlebensfähigen Katzen. Die Ergebnisse hinsichtlich der Haltungform der Katzen zeigten in allen drei Untersuchungsmethoden, dass Freiläuferkatzen, d.h. Katzen die sich auch draußen aufhalten, signifikant häufiger infiziert sind. Bei keiner der reinen Hauskatzen („indoor“) wurden Babesien im Ausstrich oder DNA von *B. felis* in der PCR bzw. *B. felis* – spezifische Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass die Übertragung feliner Babesien, ebenso wie bei anderen Babesien, durch eine Zecke und dabei eine Freilandart, erfolgt (Penzhorn et al., 1999). Der statistisch signifikant gehäufte Nachweis von *B. felis* - DNA bzw. *B. felis* – spezifischer Antikörper bei den untersuchten Katzen, die aus dem Gebiet „Walmer“ stammten, lässt sich eventuell durch die eher buschige Vegetation des Gebiets erklären, die für potentiellen Zeckenvektoren günstigere Biotope darstellt. Der Anteil an Wohnsiedlungen und Straßen im Gebiet „Walmer“ ist geringer als in den übrigen, in die Untersuchung miteinbezogenen Gebieten.

Sehr auffallend war, dass von der hohen Zahl an mit Babesien infizierten Katzen nur ein geringer Teil auch klinisch erkrankt war. Bei den meisten Tieren stellte die Diagnose der Babesiose einen Zufallsbefund dar. So zeigten nur 28,8 % (19/66) der im Blutaussstrich, nur 25 % (18/72) der in der Real-time PCR als eindeutig Babesien-positiv diagnostizierten Katzen und nur 22,2 % (18/81) der Katzen, bei denen *B. felis* – spezifische Antikörper nachgewiesen worden waren, klinische Symptome, die mit der Babesiose in Verbindung gebracht werden können. Der Anteil an subklinisch mit Babesien infizierten Katzen war so mit 71,2 % im Blutaussstrich bzw. 75 % in der PCR und 77,8 % im IFAT außerordentlich hoch. Die Ausprägungen des klinischen Bildes der Babesieninfektion deckten sich weitgehend mit früheren Beobachtungen, so stellten Anorexie, Lethargie, Depression und eine meist regenerative Anämie die vorherrschenden Symptome dar. Fieber war nur in einzelnen Fällen zu beobachten (Futter und Belonje, 1980, Jacobson et al., 2000, Schoeman et al., 2001). Geschlecht und Rasse der infizierten Tiere waren nicht mit dem Auftreten klinischer Erscheinungen korreliert, jedoch wurde eine signifikante Korrelation mit dem Alter der Tiere ermittelt. Dabei wurde eine vermehrte Beobachtung klinischer Symptomatik bei Babesien-

positiven Katzen der Altersgruppe von über 0,5 bis 2 Jahren festgestellt. Das Vorkommen klinischer Babesiose bei v.a. jungen Katzen deckt sich mit früheren Ergebnissen (Schoeman et al., 2001) und unterstützt die Vermutung, dass Katzen in endemischen Gebieten in frühem Alter mit dem Infektionserreger in Kontakt treten, mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit erkranken und dann eine Immunität gegen die Parasiten ausbilden. Spätere erneute Infektionen sollten dann mehrheitlich durch einem subklinischem Verlauf geprägt sein (Jacobson et al., 2000, Schoeman et al., 2001). Diese Vermutung würde auch den bei älteren Katzen niedrigeren Anteil an klinisch erkrankten Tieren und den gleichzeitig höheren Anteil an Katzen mit *B. felis* – spezifischen Antikörpern erklären. In den Altersgruppen über 7 bis 15 Jahre und über 15 Jahre wiesen alle Katzen der vorliegenden Studie subklinische Infektionen auf. Gelegentlich wurde jedoch auch über das Auftreten von Krankheitserscheinungen bei älteren Katzen, die in Endemiegebieten lebten, berichtet. Dies wurde damit erklärt, dass die frühe Immunitätsentwicklung nie stattgefunden hat oder bestimmte Umstände, wie beispielsweise andere Infektionen oder Erkrankungen zu einer Immunsuppression führten, so dass es zur Ausbildung einer klinischen Babesiose kam (Jacobson et al., 2000, Schoeman et al., 2001). Das in der vorliegenden Studie gehäufte Auftreten der Katzen mit klinischer Symptomatik bei den Tieren, die aus dem Gebiet „Kragga Kamma“ stammen, lässt sich wahrscheinlich damit erklären, dass die Kleintierklinik in diesem Gebiet liegt und so eine Anhäufung der klinischen Fälle bedingt, und nicht die tatsächliche Situation repräsentiert.

Zusammenfassend zeigte die vorliegende Studie, dass Babesieninfektionen bei Hauskatzen im untersuchten Gebiet Port Elizabeth in Südafrika sehr häufig sind und die klinische Babesiose v. a. bei jungen Katzen eine große Bedeutung besitzt. Der Großteil der nachgewiesenen Infektionen war durch einen subklinischen Verlauf geprägt. Die Babesiose bei Hauskatzen stellte somit insgesamt eine subakut bis chronisch verlaufende Erkrankung dar, bei der eine Rasse- oder Geschlechtspräposition nicht festgestellt wurde, wohl aber eine Häufung des Auftretens einer klinisch manifesten Babesiose bei Katzen zwischen 0,5 und 2 Jahren erkennbar war.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur Piroplasmose bei Hauskatzen in Südafrika

In der vorliegenden Arbeit wurden Katzen in einem für Piroplasmen als endemisch geltenden Gebiet in Südafrika untersucht, um Informationen über das Spektrum beteiligter Arten zu erhalten. Dort nachgewiesene Erreger wurden mit Hilfe molekularbiologischer Methoden genotypisch charakterisiert. Dazu wurden zwei rDNA-Genabschnitte, die 18S-rDNA und die Region der Internen Transkribierten Spacer (ITS) sequenziert und phylogenetischen Analysen unterzogen. Basierend auf erhaltenen Sequenzinformationen wurde dann ein modernes und sensitives Nachweisverfahren, eine Real-time PCR-Methode, zum spezifischen Nachweis von *B. felis* entwickelt und validiert. 206 Blutproben von Katzen, die aus dem Endemiegebiet und zwar aus dem Patientengut einer Kleintierklinik in Port Elizabeth stammten, wurden mit der entwickelten Real-time PCR auf Infektionen mit *B. felis* untersucht und die Testergebnisse mit Ergebnissen von Untersuchungen gefärbter Blutausstriche sowie eines indirekten Fluoreszenzantikörpertests (IFAT) verglichen.

Die 18S-rDNA-Sequenzanalysen von 13 ausgewählten Isolaten und Vergleiche mit verfügbaren Genbanksequenzendaten zeigten, dass mindestens zwei, möglicherweise sogar drei Arten für Piroplasmeninfektionen bei den untersuchten Hauskatzen in Port Elizabeth verantwortlich waren. Bei 11 der 13 Isolate wurde *B. felis* diagnostiziert. Bei einem Isolat, K 8, wurde *B. leo* identifiziert, eine Piroplasmenart, die bereits bei Löwen beschrieben wurde. Es handelte sich hier somit um den Erstnachweis einer natürlichen Infektion mit *B. leo* bei einer Hauskatze. Die Sequenz des 13. Isolats, K 68, konnte keiner bisher bekannten Art zugeordnet werden, zeigte jedoch große phylogenetische Verwandtschaft zu den anderen feline Piroplasmen. Mit einer Identität von 98,3 % war sie der Sequenz von *B. leo* am ähnlichsten und mit einer Sequenzidentität von 97,8 % mit der Art *B. felis* etwas entfernter verwandt. Im Vergleich mit 2 weiteren feline Piroplasmen, den beiden artlich nicht festgelegten *Babesia* sp. Caracal Strain A und B, wurden Identitäten von 96,8 % bzw. 96,7 % ermittelt. In phylographischen Darstellungen trennte sich das Isolat K 68 deutlich von den übrigen feline Piroplasmen ab. Diese Ergebnisse sprechen für einen eigenen Artstatus des Isolats K 68. Eine artliche Abgrenzung zumindest von *B. felis* wird auch durch Ergebnisse eines IFATs gestützt. Dabei zeigte das Isolat K 68 keine serologische Kreuzreaktivität mit

B. felis – Antigen. Im Blutaussstrich waren keine morphologischen Unterschiede zu *B. felis* oder *B. leo* feststellbar. In dendrographischen Darstellungen phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen ordneten sich alle in dieser Studie untersuchten feline Piroplasmen mit *B. rodhaini*, *B. microti* und *T. annae* in einer gemeinsamen Gruppe ein und nicht in die Gruppe der 'typischen' Babesien oder Theilerien.

Die ITS-rDNA-Sequenzanalyse der 13 ausgewählten Isolate ergab bei den 11 als *B. felis* diagnostizierten Erregern eine Polymorphismusrate von 2,6 % und hohe paarweise Identitäten zwischen 98,6 % und 99,9 %. Das als *B. leo* diagnostizierte Isolat K 8 und das Isolat K 68 zeigten im Vergleich mit *B. felis*, Identitäten von lediglich 77,0 % bzw. 76,0 %. Untereinander wiesen die Isolate K 8 und K 68 eine Identität von 87,8 % auf. In einer dendrographischen Darstellung grenzten sich die beiden Isolate K 8 und K 68 deutlich voneinander und von den 11 *B. felis* – Isolaten ab. Dies stützt die Auffassung von 3 getrennten Arten. Für ein Isolat, K 60, wurde außerdem die Intra-Isolat-Variabilität genauer untersucht. Dabei wurden 7 verschiedene Genotypen festgestellt, wobei für 6 Genotypen eine hohe Ähnlichkeit mit *B. felis* und Sequenzidentitäten zwischen 97,2 % und 99,6 % ermittelt wurden. Die Sequenz des Genotyps 7, Klon K 60 E.2, unterschied sich jedoch deutlich von den anderen Genotypen. Sie war nur zu 76,9 % mit *B. felis* identisch und ließ sich keiner bisher bekannten Art zuordnen. Im Dendrogramm gruppierte sich der Klon K 60 E.2 eher zu *B. leo* und zu K 68 als zu den *B. felis* – Isolaten.

Basierend auf den Sequenzdaten der ITS-rDNA, wurde eine Real-time-PCR – Methode, zum Nachweis von *B. felis* entwickelt. Sie erwies sich als sensitiv und sehr spezifisch. Eine geblindete, extern kontrollierte Validierung ergab eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 75 %. Der positive Vorhersagewert lag bei 100 % und der negative Vorhersagewert bei 82,1 %. Es wurde eine Nachweisgrenze zwischen 7 und 77 Babesien/ μ l Blut ermittelt. Mit dieser Real-time PCR steht somit ein modernes, sensitives und sehr spezifisches Nachweisverfahren zur Detektion von *B. felis* zur Verfügung.

Bei der Untersuchung von 206 Katzenblutproben aus dem Patientengut einer Kleintierklinik in Port Elizabeth wurden die Ergebnisse von Real-time PCR, Untersuchung gefärbter Blutaussstrichen und IFAT verglichen. Dabei ergab sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse des Blutaussstriches und der Real-time PCR von 94,6 % (192/203). Beim Vergleich Blutaussstrich und IFAT wurden in 91,2 % (187/205) der Fälle übereinstimmende Ergebnisse

ermittelt. Bei Betrachtung der PCR- und IFAT-Testergebnissen stimmten 96,1 % (196/204) der Befunde überein. Die beiden Isolate, K 8 und K 68, bei denen im Ausstrich Babesien nachgewiesen worden waren und bei denen in der 18S-rDNA-Sequenzanalyse zur Artdiagnose nicht *B. felis*, sondern *B. leo* und eine verwandte Art diagnostiziert worden war, reagierten sowohl in der PCR, als auch im IFAT negativ. Für 9 im Ausstrich negative Isolate wurde in der PCR ein positives Ergebnis ermittelt. Die 9 Isolate reagierten auch im IFAT positiv. Alle in der PCR positiv beurteilten Proben waren auch im IFAT positiv. Bei den 8 zwar im IFAT positiv, aber in der PCR negativ bewerteten Ansätze wurden in 7 Fällen im Blutausstrich Babesien nicht nachgewiesen, für eine Katze wurde der Blutausstrich nicht untersucht.

Bei einem hohen Anteil der untersuchten Katzen wurden Infektionen mit Piroplasmen diagnostiziert. Die Befallsrate mit Babesien lag nach Ergebnissen des gefärbten Blutausstriches bei 32,2 % (66/205). In der Real-time PCR wurde bei 35,3 % (72/204) der Katzen DNA von *B. felis* nachgewiesen. Der Nachweis *B. felis* –spezifischer Antikörper im IFAT gelang bei 39,3 % (81/206) der untersuchten Katzen. Eine Rasseprädisposition wurde nicht festgestellt. Aus den Ergebnissen von Blutausstrich und PCR ließ sich ein Einfluss von Geschlecht oder Alter auf das Vorliegen einer Babesieninfektion nicht ableiten. *B. felis* –spezifische Antikörper im IFAT wurden jedoch häufiger bei männlichen als bei weiblichen Tieren und bei einem höheren Anteil der Katzen in allen Altersgruppen über 2 Jahren nachgewiesen. Katzen mit Freilauf waren signifikant häufiger infiziert. In der PCR und im IFAT wurden bei einem überdurchschnittlich großen Anteil der Katzen, die aus dem Gebiet „Walmer“ stammten, DNA bzw. Antikörper von *B. felis* nachgewiesen.

Eine klinisch manifeste Babesiose wurde bei 28,8 % (19/66) der Katzen mit positivem Blutausstrich, bei 25 % (18/72) der Katzen, bei denen in der PCR DNA von *B. felis* nachgewiesen worden war und bei 22,2 % (18/81) der Tiere mit positivem IFAT diagnostiziert. Der Anteil an latent infizierten Katzen war somit mit 71,2 %, 75 % bzw. 77,8 % sehr hoch. Eine Rasse- oder Geschlechtsprädisposition ließ sich bei den klinisch erkrankten Tieren nicht erkennen. Jedoch ist anzunehmen, dass ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Katze und der Ausprägung klinischer Erscheinungen besteht. So war der Anteil an klinisch erkrankten Katzen in der Altersgruppe über 0,5 bis 2 Jahren überdurchschnittlich hoch.

V. SUMMARY

Investigations on piroplasmosis in domestic cats in South Africa

Domestic cats originating from an area in South Africa known to be endemic for babesiosis were included in an investigation on feline piroplasmosis. In order to receive some information about the range of species involved, molecular biological methods were used to characterize the causal agents genotypically. Two segments of the rDNA gene, the regions of the 18S and of the first and second internal transcribed spacers (ITS) were sequenced and phylogenetic analyses were performed. Based on these sequence data a modern and sensitive diagnostic test for a specific detection of *B. felis*, a real-time PCR, was developed and validated. Using this test, 206 blood samples of cats belonging to the patients of a small animal surgery in Port Elizabeth were screened for infections with *B. felis* and the test results were compared with results of examinations of stained blood smears and an indirect immunofluorescent antibody test (IFAT).

Sequence analysis of the 18S rDNA and comparison with available sequence data from the Genbank NCBI demonstrated that at least 2, possibly 3 species are responsible for piroplasm infections in domestic cats in Port Elizabeth. The species *B. felis* was diagnosed in 11 of the 13 isolates. In one isolate, K 8, the parasites were identified as *B. leo*, a piroplasm species which had been documented to occur in lions before. This represents the first detection of *B. leo* in a naturally infected domestic cat. The sequence of the isolate K 68 could not be assigned to any known species, but it was closely related to the other feline piroplasms. The genetic relationship was slightly closer to *B. leo* with an identity of 98,3 % than to *B. felis* where an identity of 97,8 % was found. Compared to two other feline piroplasms isolated from a caracal, *Babesia* sp. Caracal Strain A and B, the isolate K 68 shared identities of 96,8 % and 96,7 % respectively. Phylogenetic trees clearly separated the isolate K 68 from the other feline piroplasms indicating a separate species status. Furthermore the results of the IFAT support a separation at least from *B. felis*. The isolate did not show any cross reactions with *B. felis* antigen. However, the parasites could not be differentiated from *B. felis* or *B. leo* in stained blood smears. In phylogenetic analyses including several *Babesia* and *Theileria* species all the feline piroplasm species of the present study were grouped together with

B. rodhaini, *B. microti* and *T. annae* and separated from the group of the 'typical' babesia and the classical theileria.

When sequence analyses of the ITS rDNA of the 13 selected isolates were performed, the 11 isolates diagnosed as *B. felis* showed a polymorphism rate of 2,6 % and high pairwise identities between 98,6 % and 99,9 %. The sequences of the isolate K 8, already identified as *B. leo*, and of the isolate K 68 were less homologous with identities of 77,0 % and 76,0 % respectively compared with *B. felis*. In the phylogenetic tree the isolates K 8 and K 68 were clearly separated from each other and from the *B. felis* – isolates. This supports the existence of three distinct species. For one isolate, the isolate K 60, the intraisolate variation was determined in more detail. 7 different genotypes were found. 6 of them were very similar to *B. felis* and showed sequence identities between 97,2 % and 99,6 %. The sequence of the genotype 7, clone K 60 E.2, clearly differed from the other genotypes. With an identity of 76,9 % to *B. felis* the sequence could not be assigned to any hitherto described species. In phylogenetic analyses this clone K 60 E.2 was more closely related to *B. leo* and K 68 than to the *B. felis* isolates.

Based on the sequence data of the ITS rDNA, a real-time PCR method was developed for the specific detection of *B. felis*. This test was proven to be sensitive and very specific in a blinded, externally controlled evaluation. The specificity was shown to be 100 %. The sensitivity of the test was 75 %. The positive prediction value reached 100 % and the negative prediction value was 82,1 %. A detection limit of 7 to 77 parasites/ μ l blood was determined. With this real-time PCR a modern, sensitive and highly specific method for the detection of *B. felis* is now available.

The performance of the real-time PCR were compared with those of stained blood smears and the IFAT by investigating 206 blood samples of domestic cats of a small animal surgery in Port Elizabeth. When the results of the blood smears were compared with the results of the real-time PCR an agreement was found in 94,6 % (192/203) of the results. Identical results of the blood smears and IFAT were demonstrated in 91,2 % (187/205) of the cases. The results of the PCR and the IFAT corresponded in 96,1 % (196/204) of the investigations. The isolates K 8 and K 68, which had been diagnosed as *B. leo* and a closely related species by 18S rDNA sequence analyses and which had revealed babesia in stained blood smears, showed a negative test result in the PCR as well as in the IFAT. 9 isolates that were found to be babesia

negative in blood smears gave positive results in the PCR as well as in the IFAT. 8 isolates were positive in the IFAT but negative in the PCR. 7 out of these isolates were also proven negative in the blood smears whereas in the remaining one case the blood smear was not examined.

Infections with piroplasms were diagnosed in a high portion of the cats examined. The prevalence of babesia determined by stained blood smear was 32,2 % (66/205). DNA of *B. felis* was detected in 35,3 % (72/204) of the cats by real-time PCR. *B. felis* specific antibodies were found in 39,3 % (81/206) of the examined cats in the IFAT. No specific breed predilection was evident. The results of blood smears and PCR did not correlate with the sex or age of the cats. However *B. felis* specific antibodies were detected more frequently in male than in female animals and in a higher portion of the cats older than 2 years. Concerning the housing conditions, significantly more “indoor/outdoor” cats were affected. DNA of *B. felis* and specific antibodies were found in a portion above average of the cats coming from the “Walmer” area.

Typical clinical signs attributed to feline babesiosis were observed in 28,8 % (19/66) of the cats showing babesia in the blood smear, in 25 % (18/72) of the cats with DNA of *B. felis* detected by PCR and in 22,2 % (18/81) of the cats that showed a positive test result in the IFAT. The part of latently infected was thus very high. No specific breed or sex predilection for clinical affection was evident. However a correlation of the age of the cats with the manifestation of a clinical babesiosis is assumed. In the age group between 0,5 and 2 years the percentage of infected cats showing clinical signs was above average.

VI. Literaturverzeichnis

ALLSOPP, M. T. E. P., CAVALIER-SMITH, T., DE WAAL, D. T., ALLSOPP, B.A. (1994): Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology* **108**: 147-152

AVERBECK, G. A., BJORK, K. E., PACKER, C. HERBST, L. (1990): Prevalence of hematozoans in lions (*Panthera leo*) and cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Serengeti National Park and Ngorongoro Crater, Tanzania. *J Wildl Dis* **26**: 392-394

AYALA, S. C., D'ALESSANDRO, A., MACKENZIE, R., ANGEL, D. (1973): Hemoparasite infections in 830 wild animals from the eastern Llanos of Columbia. *J Parasitol* **59**: 52-59

BANETH, G., AROCH, I., TAL, N., HARRUS, S. (1998): Hepatozoon species infection in domestic cats: a retrospective study. *Vet Parasitol* **79**: 132-133

BARNETT, S. F., BROCKLESBY, D. W. (1968): Some piroplasms of wild animals. *Symp Zool Soc London* **24**: 159-176

BLOUIN, E. F., KOCAN, A. A., GLENN, B. L., KOCAN, K. M., HAIR, J. A. (1984): Transmission of *Cytauxzoon felis* Kier, 1979 from bobcats, *Felis rufus* (Schreber), to domestic cats by *Dermacentor variabilis*. *J Wildl Dis* **20**: 241-242

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

BOURDEAU, P. (1996): Les babésiosis félines.

Point Vet **27**: 947-953

BROCKLESBY, D. W., DENNIG, H. K., VIDLER, B. O. (1965): A Babesia species of the leopard (*Panthera pardus*) and its transmission to the domestic cat (*Felis catus*).

Progr Protozoology, 177-178

2nd Int Conf Protozool, London; Exc Med Int Congr Ser No 91

BROWNLIE, J. F. (1954): Aureomycin in the treatment of piroplasmosis in the cat.

J S Afr Vet Med Assoc **25**: 65

BUTT, M. T., BOWMAN, D. BARR, M. C., ROELKE, M. E (1991): Iatrogenic transmission of *Cytauxzoon felis* from a Florida panther (*Felis concolor coryi*) to a domestic cat.

J Wildl Dis **27**: 342-347

CARPANO, M. (1934): Sur les piroplasmoses des carnassiers et sur un nouveau piroplasma des félins (*Babesiella felis*) chez le puma : *Felis concolor*.

Bull Minist Agric Egypt Tech Sci Serv **136**: 22

CONRAD, P.A., THOMFORD, J. W.; MARSH, A., TELFORD, S. R., ANDERSON, J. F., SPIELMAN, A., SABIN, E. A., YAMANE, I., PERSING, D. H. (1992):

Ribosomal DNA probe for differentiation of *Babesia microti* und *Babesia gibsoni* isolates.

J Clin Microbiol **30**: 1210-1215

COWELL, R. L., FOX, R. L., ROGER, J. P., TYLER, R. D. (1988): Detection of Anticytauxzoon antibodies in cats infected with a *Cytauxcoon* organism from bobcats.

Vet Parasitol **28**: 43-52

CRIADO - FORNELIO, A., MERTINEZ - MARCOS, A., BULING - SARANA, A., BARBA-CORRETERO, J. C. (2003): Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study.

Vet Microbiol **93**: 307-317

DAVIS, L. J. (1929): On a piroplasm of the Sudanese wild cat (*Felis ocreata*).

Trans R Soc Trop Med Hyg **22**: 523-534

DENNIG, H. K. (1967a): Eine unbekannte Babesienart beim Jaguarundi (*Herpailurus yaguarundi*).

Kleintierpraxis **12**: 146-152

DENNIG, H. K. (1967b): Vergleichende Untersuchungen über die Babesien tropischer Feliden unter besonderer Berücksichtigung einer neuen Spezies.

Habilitationsschrift, Vet Med Fak, Univ München, 1967

DENNIG, H. K. (1967c): Untersuchungen zu einer neuen Babesienart der Feliden.

Kongressber III. Tag Dtsch Tropenmed, Hamburg, 79-85

DENNIG, H. K. (1969): Babesieninfektionen bei exotischen Katzen und die Bedeutung dieser Blutparasiten für die tierärztliche Forschung.

Acta Zool Pathol Antverp **48**: 361-367

DENNIG, H. K., BROCKLESBY, D. W. (1972): *Babesia pantherae* sp nov. a piroplasm of the leopard (*Panthera pardus*).

Parasitology **64**: 525-532

DENNIG, H. K., HEBEL, R. (1969): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an zwei Babesia-Arten der Feliden.

Z Parasitenkd **32**: 95-111

DENNIG, H. K., HEBEL, R. (1970): Fine structure of *Babesia* spp. from Felidae.

J Parasitol **56**: 63

DORRINGTON, J. E., DU BUY, W. J. C. (1966): Ceperan : efficacy against *Babesia felis*.

J S Afr Vet Med Assoc **37**: 93

ELLIS, J., HEFFORD, C., BAVERSTOCK, P. R., DALRYMPLE, B. P., JOHNSON, A. M. (1992): Ribosomal DNA sequence comparison of *Babesia* and *Theileria*.

Mol Biochem Parasitol **54**: 87-96

FENG, D. F., DOOLITTLE, R. F. (1987): Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees.

J Mol Evol **25**: 351-60

FRANKS, P. T., HARVEY, J. W., SHIELDS, R. P., et al. (1988): Hematological findings in experimental feline cytauxzoonosis.

J Am Anim Hosp Assoc **24**: 394-401

FRIEDHOFF, K. T. (1988): Transmission of *Babesia*.

In: Ristic, M. "Babesiosis of domestic animals and man" CRC Press, Boca Raton, 23-52

FUTTER, G. J., BELONJE, P. C. (1980): Studies on feline babesiosis. 1. Historical review.

J S Afr Vet Assoc **51**: 105-106

FUTTER, G. J., BELONJE, P. C. (1980): Studies on feline babesiosis. 2. Clinical observations.

J S Afr Vet Assoc **51**: 143-146

FUTTER, G. J., BELONJE, P. C., VAN DEN BERG, A. (1980): Studies on feline babesiosis.

3. Haematological findings.

J S Afr Vet Assoc **51**: 271-280

FUTTER, G. J., BELONJE, P. C., VAN DEN BERG, A., VAN RIJSWIJK A. W. (1981):

Studies on feline babesiosis. 4. Chemical pathology; macroscopic and microscopic post mortem findings.

J S Afr Vet Assoc **52**: 5-14

GARNER, M. M., LUNG, N. P., CITINO, S., GREINER, E. C., HARVEY, J. W., HOMER, B. L. (1996): Fatal cytauxzoonosis in a captive-reared white tiger (*Panthera tigris*).

Vet Pathol **33**: 82-86

GLENN, B. L., ROLLEY, R. E., KOCAN, A., A. (1982): *Cytauxzoon*-like piroplasms in erythrocytes of wild trapped bobcats in Oklahoma.

J Am Vet Med Assoc **181**: 1251-1253

GLENN, B. L., KOCAN, A., A., BLOUIN, E. F. (1983): Cytauxzoonosis in bobcats.

J Am Vet Med Assoc **183**: 1155-1158

GLENN, B. L., STAIR, E. L. (1984): Cytauxzoonosis in domestic cats: Report of two cases in Oklahoma with a review and discussion of the disease.

J Am Vet Med Assoc **184**: 822-825

GÖBEL, E. (1968): Experimentelle Infektion der Hauskatze und verschiedene Laboratoriumstiere mit einer Leopardbabesie.

Ingaug-Diss, Vet Med Fak, Univ München

GREENE, C. E., LARIMER, K., HOPPER, E., SHOEFLER, G., LOWER, K., CULLENS, F. (1999): Administration of diminazene aceturate or imidocarb dipropionate for treatment of cytauxzoonosis in cats.

J Am Vet Med Assoc **215**: 497-500, 482

HORAK, I. G., GUILLARMOD, A. J., MOOLMAN, L. C., DE VOS, V. (1987) :

Parasites of domestic and wild animals in South Africa. XXII. Ixodid ticks on domestic dogs and wild carnivores.

Onderstepoort J Vet Res **54**: 573-580

JACKSON, C., DUNNING F. J. (1937): Biliary fever (Nuttalliosis) of the cats; a case in the Stellenbosch district.

J S Afr Vet Assoc **8**: 83-88

JACOBSON L. S., SCHOEMAN T., LOBETTI, R. G. (2000): A survey of feline babesiosis in South Africa.

J S Afr Vet Assoc **71**: 222-228

KAKOMA, I., MEHLHORN, H. (1994): Babesia of domestic animals.

In: Kreier, J.P. "Parasitic Protozoa", Academic Press, San Diego, 141-216

KIER, A. B. (1979): The etiology and pathogenesis of feline cytauxzoonosis.

PhD Dissertation, University of Missouri, Columbia, 1979

KIER, A. B., GREENE, C. E., (1998): Cytauxzoonosis.

In Greene, C. E. „Infectious disease of the dog and cat“, Second Edition, 1998, 470-473

KIER, A. B., WAGNER, J. E., KINDEN, D. A. (1987): The pathology of experimental cytauxzoonosis.

J Comp Pathol **97**: 415-432

KIER, A. B., WAGNER, J. E., MOREHOUSE, L. G. (1982): Experimental transmission of *Cytauxzoon felis* from bobcats (*Lynx rufus*) to domestic cats (*Felis domesticus*).

Am J Vet Res **43**: 97-101

KIER, A. B., WIGHTMAN, S. R., WAGNER, J. E. (1982): Interspecies transmission of *Cytauxzoon felis*.

Am J Vet Res **43**: 102-105

LEGER, N., FERTE, H., BERTHELOT, P., NOURRY, D., BROCVIELLE, P. (1992): Un cas de babesiose féline en Haute-Saône, France.

Sci Vét Méd Comp **94**: 249-252

LEVINE, N. D. (1988): The protozoan phylum Apicomplexa, Vol 2.

CRC, Boca Raton

LINGARD, A., JENNINGS, E. A. (1904): A preliminary note on a piroplasmosis found in man and in some of the lower animals.

Ind Med Gaz **39**: 161-165

LOPEZ-REBOLLAR, L. M., PENZHORN, B. L., DE WAAL, D. T., LEWIS, B. D. (1999): A possible new piroplasm in lions from the Republic of South Africa.

J Wildl Dis **35**: 82-85

MACKENSTEDT, U., LUTON, K., BAVERSTOCK, P. R., JOHNSON, A. M. (1994): Phylogenetic relationship of *Babesia divergens* as determined from comparison of small subunit ribosomal RNA gene sequences.

Mol Biochem Parasitol **68**: 161-165

MANGRULKAR, M. Y. (1937): On a piroplasm of the Indian cat (*Felis domesticus*).

Indian J Vet Sci Anim Husb **7**: 243-246

MAYR, E. (1975): Grundlagen der zoologischen Systematik.

Paul Parey Verlag, Hamburg

McNEIL, J. (1937): Piroplasmosis of the domestic cat.

J S Afr Vet Assoc **8**: 88-90

MEHLHORN, H., RAETHER, W., SCHEIN, E., WEBER, M., UPHOFF, M. (1986): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Entwicklungszyklus und Einfluß von Pentamidin auf die Morphologie der intraerythrozytären Stadien von *Babesia microti*.

Dtsch Tierärztl Wochenschr **93**: 400-405

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

Adv Parasitol **23**: 37-103

MEHLHORN, H., SCHEIN, E. (1998): Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1991 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998

Parasitol Res **84**: 467-475

MEINKOTH, J., KOCAN, A. A., WHITWORTH, L., MURPHY, G., FOX, J. C., WOODS, J. P. (2000): Cats surviving natural infection with *Cytauxzoon felis*: 18 cases (1997-1998).

J Vet Intern Med **14**: 521-525

MOIK, K., GOTHE, R. (1997): Babesien-Infektionen der Feliden und Fallbeschreibung bei einer Katze in Deutschland.

Tierärztl Prax **25**: 534-535

MOTZEL, S. L., WAGNER, J. E. (1990): Treatment of experimentally induced cytauxzoonosis in cats with Parvaquone and Buparvaquone.

Vet Parasitol. **35**: 131-138

MUNDALIAR, S. V., ACHARY, G. R., ALWAR, V. S. (1950): On a species of *Babesia* in an Indian wild cat (*Felis catus*).

Ind Vet J **26**: 391-395

NIETFELD, J. C., OPLLOCK, C. (2002): Fatal cytauxzoonosis in a free-ranging bobcat (*Lynx rufus*).

J Wildl Dis **38**: 607-610

PENZHORN, B. L., KJEMTRUP, A. M., LOPEZ-REBOLLAR, L. M., CONRAD, P. A. (2001): *Babesia leo* n. sp. from lions on the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms.

J Parasitol **87**: 681-685

PENZHORN, B. L., LEWIS, B. D., LOPEZ-REBOLLAR, L. M., SWAN, G. E. (2000): Screening of five drugs for efficacy against *Babesia felis* in experimentally infected cats.

J S Afr Vet Assoc **71**: 53-57

PENZHORN, B. L., STYLIANIDES, E., COETZEE, M. A., VILJOEN, J. M. LEWIS, B. D. (1999): A focus of feline babesiosis at Kaapschehoop on the Mpumalanga escarpment.

J S Afr Vet Assoc **70**: 60

POTGIETER, F. T. (1981): Chemotherapy of *Babesia felis* infection: efficacy of certain drugs.

J S Afr Vet Assoc **52**: 289-293

PURNELL, R. E. (1981): Babesiosis in various hosts.

In: Ristic, M., Kreier, J. P. „Babesiosis“, Academic Press, New York, 25-63.

RINDER, H., JANITSCHKE, K., ASPOCK, H., DA SILVA, A. J., DEPLAZES, P., FEDORKO, D. P., FRANZEN, C., FUTH, U., HUNGER, F., LEHMACHER, A., MEYER, C. G., MOLINA, J. M., SANDFORT, J., WEBER, R., LÖSCHER, T. (1998): Blinded, externally controlled multicenter evaluation of light microscopy and PCR for detection of microsporidia in stool specimens. The Diagnostic Multicenter Study Group on Microsporidia.

J Clin Microbiol **36**:1814-1818

ROBINSON, E. M. (1963): Biliary fever (Nuttalliosis) in the cat.

J S Afr Vet Assoc **34**: 45-47

SAITOU, N., NEI, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.

Mol Biol Evol **4**: 406-425

SCHOEMAN, T., LOBETTI, R. G., JACOBSON, L. S., PENZHORN, B. L. (2001): Feline babesiosis: signalment, clinical pathology and concurrent infections.

J S Afr Vet Assoc **71**: 4-11

SHINDEL, N., DARDIRI, A. H., FERRIS, D. H. (1978): An indirect fluorescent antibody test for the detection of Cytauxzoon-like organisms in experimentally infected cats.

Can J Comp Med **42**: 460-465

SHORTT, H. E. (1940): *Babesia* sp. In the Indian leopard, *Panthera pardus fusca* (Meyer).

Ind Med Res **28**: 277-278

SINHA, K. P., MUKTI SINHA, PANKAJ, N. K., SINGH, V. K. (2000): Babesiosis in a tigress.

Zoos'Print **15**: 327

SMITH, T. F., WATERMAN, M. S. (1981): Comparison of biosequences

Adv Appl Math **2**: 482-489

STEWART, C. G., HACKETT, K.J., COLLETT, M. G. (1980): An unidentified *Babesia* of the domestic cat (*Felis domesticus*).

J S Afr Vet Assoc **51**: 219-221

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.

Nucleic Acids Res **22**: 4673-4680

TYAGI, S., KRAMER, F. R. (1996): Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridisation.

Nature Biotechnol **14**: 303-308

UILENBERG, G., FRANSSSEN, F. F. J., PERIE, N. M. (1987): Relationships between Cytauxzoon felis and African piroplasmids.

Vet Parasitol **26**: 21-28

UPADHYE, S. V., DHOOT, V. M. (2000) : Sudden death of a leopard (*Panthera pardus*) due to babesiosis.

Zoos'Print **15**:327

VERHAEGHE, P. A. (1996): A propos des babésioses félines.

Point Vet **28** : 7

WAGNER, J. E. (1975): Cytauxzoonosis in domestic cats (*Felis domesticus*) in Missouri.

J Am Vet Med Assoc **167**: 874

WAGNER, J. E. (1976): A fatal cytauxzoonosis-like disease in cats.

J Am Vet Med Assoc **168**: 585-588

WENYON, C. M., HAMERTON, E. A. (1930): Piroplasms of the West African civet cat (*Viverra civetta*) and the bay lynx (*Felis rufa*) of North America.

Trans R Soc Trop Med Hyg **24**: 7-8

YAMANE, I., CONRAD, P. A., GARDENER, I. A. (1993): *Babesia gibsoni* infections in dogs.

J Protozool Res **3**: 111-125

ZAHLER, M., GOTHE, R., RINDER, H. (1995): Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus* (Acari: Ixodidae).

Int J Parasitol **25**: 1413-1419

ZAHLER, M., RINDER, H., ZWEYGARTH, E., FUKATA, T., MAEDE, Y., SCHEIN, E., GOTHE, R. (2000a): '*Babesia gibsoni*' of dogs from North America and Asia belong to different species.

Parasitology **120**: 365-369

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

Vet Parasitol **89**: 241-248

ZAHLER, M., RINDER, H., GOTHE, R. (2000c): Genotypic status of *Babesia microti* within the piroplasms.

Parasitol Res **86**: 642-646

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

Parasitol Res **84**: 544-548

ZINKLE, J. G., McDONALD, S. E., KIER, A.B. (1981): *Cytauxzoon*-like organisms in erythrocytes of two cheetahs.

J Am Vet Med Assoc **179**: 1261-1262

ZUCKERKANDL, E., PAULING, L. (1965): Molecules as documents of evolutionary history.

J Theor Biol **8**: 357-366

VII. ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
bp	Nukleinsäurebasenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ci	Curie
Dabcyl	Dimethylaminophenylbenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	Carboxyfluoreszein
FeLV	Felines Leukämievirus (feline leukemia virus)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FIV	Felines Immunschwächevirus (feline immunodeficiency virus)
G	Guanin
IFAT	indirekter Immunfluoreszenzantikörpertest
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
ITS	Interner transkribierter Spacer
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
LB	Luria Bertani
mA	Milliampere
M	molar
mM	millimolar
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
μF	Mikrofarad
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen/min
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
T	Thymin
T _m	Schmelzpunkt
Tabl.	Tablette
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tis/Borsäure/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
χ	Chi
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
<i>Xho</i> I	<i>Xanthomonas holcicola</i>

VIII. Anhang A

Multiple Alignment der 18S rDNA (ca. 1,6 kb) von 13 *B. felis* – Isolaten, *B. leo* (K 8) und K 68 sowie den Genbanksequenzen von *B. felis* (AF244912) und *B. leo* (AF244911);

(* konservierte Positionen, - Ausrichtungslücke, N Leselücke, polymorphe Bereiche grau unterlegt)

K 1 B	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K 19 B	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K 54 B	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K 60 B	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K 79 B	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K 96 B	NNNTT	2
K 97 B	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K120 B	GCTTTTATACAGCGC-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K172 B	GCTTTTATACAGCGT-TACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K176 B	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K197 B	GCTTTTATACAGCGCAACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	60
<i>B. felis</i> ¹	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K 8 B	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
<i>B. leo</i> ²	GCTTTTATACAGCGA-AACTGCGAATGGCTCATTAAAAACAGTTATAGCTTATTTGATGTT	59
K 68 B	NN	
K 1 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K 19 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K 54 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K 60 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K 79 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K 96 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	62
K 97 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K120 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K172 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K176 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K197 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	120
<i>B. felis</i>	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCTTCGAAGCGCTTCGGC	119
K 8 B	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCT- CGAGGCGCTTCGGC	118
<i>B. leo</i>	CGTTTTACATGGATAACCGTGGTAATTCTAGGGCTAATACATGCT- CGAGGCGCTTCGGC	118
K 68 B	NN	
K 1 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K 19 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K 54 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K 60 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K 79 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K 96 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	122
K 97 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K120 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K172 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K176 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K197 B	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	180
<i>B. felis</i>	GTTGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTACCTTGGTGATTCATAATAAATTAG	179
K 8 B	GCGGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTAAACCGGTGATTCATAATAAATCAG	178
<i>B. leo</i>	GCGGCGTTTATTAGACTTAAACCAACCCTTCGGGTAAACCGGTGATTCATAATAAATCAG	178
K 68 B	NN	

K 1 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K 19 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K 54 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K 60 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K 79 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K 96 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	182
K 97 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K120 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K172 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K176 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K197 B	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	240
<i>B. felis</i>	CGAATCGCATGGCATTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	239
K 8 B	CGAATCGCATGGCTTTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	238
<i>B. leo</i>	CGAATCGCATGGCTTTGCCGGCGATGTATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTGGAC	238
K 68 B	NN	
K 1 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	299
K 19 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	299
K 54 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	299
K 60 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACAACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	299
K 79 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	299
K 96 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	242
K 97 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	298
K120 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	299
K172 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	299
K176 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	299
K197 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	300
<i>B. felis</i>	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	299
K 8 B	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	298
<i>B. leo</i>	GGTAGGGTATTGGCCTACCGGGGCGACGACGGGTGACGGGGAATTGGGGTTCGATTCCGG	298
K 68 B	NN	
K 1 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	359
K 19 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	359
K 54 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	359
K 60 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	359
K 79 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	359
K 96 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	302
K 97 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	358
K120 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	359
K172 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	359
K176 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	359
K197 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	360
<i>B. felis</i>	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	359
K 8 B	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	358
<i>B. leo</i>	AGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	358
K 68 B	NNNGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCC	57

K 1 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	419
K 19 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	419
K 54 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	419
K 60 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	419
K 79 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	419
K 96 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	362
K 97 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	418
K120 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	419
K172 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	419
K176 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	419
K197 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	420
<i>B. felis</i>	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	419
K 8 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	418
<i>B. leo</i>	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTTATAGTCTTGTAAT	418
K 68 B	AATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCTCATAGTCTTGTAAT	117

K 1 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	479
K 19 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	479
K 54 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	479
K 60 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	479
K 79 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	479
K 96 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	422
K 97 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	478
K120 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	479
K172 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	479
K176 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	479
K197 B	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	480
<i>B. felis</i>	TGGAATGATGGGGACCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	479
K 8 B	TGGAATGATGGGAATCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	478
<i>B. leo</i>	TGGAATGATGGGAATCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	478
K 68 B	TGGAATGATGGGAATCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA	177
	***** * *****	
K 1 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	539
K 19 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	539
K 54 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	539
K 60 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	539
K 79 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	539
K 96 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	482
K 97 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAACGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	538
K120 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	539
K172 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	539
K176 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	539
K197 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	540
<i>B. felis</i>	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	539
K 8 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	538
<i>B. leo</i>	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	538
K 68 B	GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTC	237

K 1 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	599
K 19 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	599
K 54 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	599
K 60 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	599
K 79 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	599
K 96 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	542
K 97 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	598
K120 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	599
K172 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	599
K176 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	599
K197 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	600
<i>B. felis</i>	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGCCTTTGGTTTTCGCTTTTATGCGTTTTCCGACTGGCTTGGC	599
K 8 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTTGTCTTTGGACTCGCTTCCAAGCGTTTTCCATTTCGACTTGGC	598
<i>B. leo</i>	GTAGTTGAATTTCTGCCTTGTCTTTGGACTCGCTTCCAAGCGTTTTCCATTTCGACTTGGC	598
K 68 B	GTAGTTGAATTTCTGCCTCGTCTTTGGACTCGCTTCCAAGCGTTTTCCATTTCGACTTGGC	297
	***** * ***** * ***** * ***** * *****	
K 1 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	659
K 19 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	659
K 54 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	659
K 60 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	659
K 79 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	659
K 96 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	602
K 97 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	658
K120 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	659
K172 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	659
K176 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	659
K197 B	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	660
<i>B. felis</i>	ATATTTCTGGATTTGTGTTGCTTCGGCTTCTCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	659
K 8 B	ATCTTTCTGGATCT-TGTTGCTT--GCAGCTTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	655
<i>B. leo</i>	ATCTTTCTGGATCT-TGTTGCTT--GCAGCTTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	655
K 68 B	ATTTTTCTGGATTT-TGTTGCTTCGGCAGCCTTTTCCAGTTTTTACTTTGAGAAAATA	356
	** ***** * ***** ** * *** * *****	
K 1 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	719
K 19 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	719
K 54 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	719
K 60 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	719
K 79 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	719
K 96 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	662
K 97 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	718
K120 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	719
K172 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	719
K176 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	719
K197 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	720
<i>B. felis</i>	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTTGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	719
K 8 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCATTCGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	715
<i>B. leo</i>	GAGTGTTTTCAAACAGGCCATTCGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	715
K 68 B	GAGTGTTTTCAAACAGGCCTTTCGCCTTGAATACTACAGCATGGAATAATAAAGTAGGACT	416
	***** ** *****	

K 1 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	779
K 19 B	TTGGTTCTATTTTGTTCGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	779
K 54 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	779
K 60 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	779
K 79 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	779
K 96 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	722
K 97 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	778
K120 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	779
K172 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	779
K176 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	779
K197 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	780
<i>B. felis</i>	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	779
K 8 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	775
<i>B. leo</i>	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	775
K 68 B	TTGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGAACCATAGTAATGGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCA	476

K 1 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	839
K 19 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	839
K 54 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	839
K 60 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	839
K 79 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	839
K 96 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	782
K 97 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	838
K120 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	839
K172 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAA - TTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	838
K176 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	839
K197 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	840
<i>B. felis</i>	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	839
K 8 B	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	835
<i>B. leo</i>	TTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	835
K 68 B	TTCGTATTTAACTGTCACAGGTGAAATTCCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAA	536

K 1 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	899
K 19 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	899
K 54 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	899
K 60 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	899
K 79 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	899
K 96 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	842
K 97 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	898
K120 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	899
K172 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	898
K176 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	899
K197 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	900
<i>B. felis</i>	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	899
K 8 B	GCATTTGCCAAGGATGTTT - CATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	894
<i>B. leo</i>	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCA	895
K 68 B	GCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCNAAGAACGAAAAGTNAGGGGATCGAAGACGATCA	596

K 1 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	959
K 19 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	959
K 54 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	959
K 60 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	959
K 79 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	959
K 96 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	902
K 97 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	958
K120 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	959
K172 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	958
K176 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	959
K197 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	960
<i>B. felis</i>	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	959
K 8 B	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	954
<i>B. leo</i>	GATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	955
K 68 B	GATACCGTNNNNNNCTAACCATAAAATTATGCCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCAGTTTA	656

K 1 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGG	1019
K 19 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1018
K 54 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1018
K 60 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1018
K 79 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1018
K 96 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	961
K 97 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1017
K120 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1018
K172 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1017
K176 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1018
K197 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1019
<i>B. felis</i>	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1018
K 8 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1013
<i>B. leo</i>	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	1014
K 68 B	TACGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGG-AGTATGG	715

K 1 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1079
K 19 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1078
K 54 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1078
K 60 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1078
K 79 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1078
K 96 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1021
K 97 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1077
K120 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1078
K172 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1077
K176 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1078
K197 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1079
<i>B. felis</i>	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1078
K 8 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1073
<i>B. leo</i>	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	1074
K 68 B	TCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG	775

K 1 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1139
K 19 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1138
K 54 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1138
K 60 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1138
K 79 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1138
K 96 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1081
K 97 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1137
K120 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1138
K172 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1137
K176 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1138
K197 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1139
<i>B. felis</i>	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1138
K 8 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1133
<i>B. leo</i>	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	1134
K 68 B	CTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGATGATTGACAGAT	835

K 1 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1199
K 19 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1198
K 54 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1198
K 60 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1198
K 79 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1198
K 96 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1141
K 97 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1197
K120 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1198
K172 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1197
K176 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1198
K197 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1199
<i>B. felis</i>	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1198
K 8 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1193
<i>B. leo</i>	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	1194
K 68 B	TGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG	895

K 1 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1259
K 19 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1258
K 54 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1258
K 60 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1258
K 79 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1258
K 96 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1201
K 97 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1257
K120 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1258
K172 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1257
K176 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1258
K197 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1259
<i>B. felis</i>	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	1258
K 8 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATACGAGA	1253
<i>B. leo</i>	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATACGAGA	1254
K 68 B	ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAAATTAGGATATGTGA	955
	***** * * *	

K 1 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1319
 K 19 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1318
 K 54 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1318
 K 60 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1318
 K 79 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1318
 K 96 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1261
 K 97 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1317
 K120 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1318
 K172 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1317
 K176 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1318
 K197 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1319
B. felis CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1318

 K 8 B TAAGCCCTGCTGTCTCGTTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1313
B. leo TAAGCCCTGCTGTCTCGTTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1314
 K 68 B CACGCTTTGCTGTCTCATTATCGCTTCTTAGAGGGACTTTGCGTTCATAAAAACGCAAGGA 1015
 * * * * *

K 1 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1379
 K 19 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1378
 K 54 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1378
 K 60 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1378
 K 79 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1378
 K 96 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1321
 K 97 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1377
 K120 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1378
 K172 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1377
 K176 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1378
 K197 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1379
B. felis AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1378

 K 8 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1373
B. leo AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1374
 K 68 B AGTGTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTAC 1075
 * * * * *

K 1 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1439
 K 19 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1438
 K 54 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1438
 K 60 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1438
 K 79 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1438
 K 96 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1381
 K 97 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1437
 K120 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1438
 K172 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1437
 K176 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1438
 K197 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1439
B. felis ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1438

 K 8 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1433
B. leo ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1434
 K 68 B ACTGATGCATTCAACGAGTTTTTCCTTGGCCGGAAGGTCCGGGTAATCTTACAGTATGCAT 1135
 * * * * *

K 1 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1499
 K 19 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1498
 K 54 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1498
 K 60 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1498
 K 79 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1498
 K 96 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1441
 K 97 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1497
 K120 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1498
 K172 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1497
 K176 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1498
 K197 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1499
B. felis CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1498

 K 8 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1493
B. leo CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1494
 K 68 B CGTGATGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACG 1195
 ***** **

K 1 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1559
 K 19 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1558
 K 54 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1558
 K 60 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1558
 K 79 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1558
 K 96 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1501
 K 97 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1557
 K120 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1558
 K172 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1557
 K176 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1558
 K197 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1559
B. felis AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1558

 K 8 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1553
B. leo AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1554
 K 68 B AGTCATCAGCTCGTGCCGACTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTCGCTCCTAC 1255

K 1 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1601
 K 19 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1600
 K 54 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1600
 K 60 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1600
 K 79 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1600
 K 96 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGGATGAGAACTTAG 1543
 K 97 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1699
 K120 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGAGTGAGAACTTAG 1600
 K172 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1599
 K176 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1600
 K197 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1601
B. felis CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1600

 K 8 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACCGGAAAACTTAG 1595
B. leo CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACCGGAAAACTTAG 1596
 K 68 B CGATCGAGTGATCCGGTGAATTATTCCGACTGAGAACTTAG 1297
 ***** * *****

Anhang B

Multiple Alignment der ITS-rDNA von 13 *B. felis* – Isolaten, von 1 *B. leo* – Isolat (K 8) und von K 68; (* konservierte Bereiche, - Ausrichtungslücken, N =Leselücke, K=G/T, R=A/G, W=A/T, Y=C/T, polymorphe Positionen grau unterlegt)

```

K   1 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K  19 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K  54 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K  60 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K  79 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K  96 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K  97 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K 120 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K 172 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K 176 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K 197 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60

K   8 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
K  68 A   CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC   60
*****

K   1 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACCCACCTGGKAA--C   118
K  19 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAA--C   118
K  54 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAA--C   118
K  60 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGNNNNNNNGCGGAAACCCACCTGGKAA--C   118
K  79 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAA--C   118
K  96 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAA--C   118
K  97 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAA--C   118
K 120 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAA--C   118
K 172 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAA--C   118
K 176 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAA--C   118
K 197 A   AAATACATTACCACGGGTTATTACTCCGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAA--C   118

K   8 A   AAATATAAT--CCCACGTTAGTGGT--GGCCGTGCGCTCGT-----CGCACCTGGTAA--C   111
K  68 A   AAATATATT--TACCATTAGTGGTTGGCCGTGCGCTTGT-----CGCACCTGCTAAAC   113
*****

K   1 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTTTTT--AGT-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   175
K  19 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTTTTT--AGT-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   175
K  54 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTTTTT--ART-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   175
K  60 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTTTC--AGT-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   175
K  79 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTTTTT--AGT-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   175
K  96 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTTTY--AGT-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   175
K  97 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTT-C--ART-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   174
K 120 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTT-C--AGT-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   174
K 172 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTTTTT--AGT-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   175
K 176 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTT-C--AGT-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   174
K 197 A   AGTTGGCCTGAACGCGAACTTTTT--AGT-TCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTG   175

K   8 A   AGTCGGCCTGAACGCGAACACTATATGTGTTTCATCCCTGTTT-AGTCGTACTTA-GTATG   169
K  68 A   AGATGGCCTGAACGCGAACTTTA-ATGT-TCAATACCTGTTT-AGTAGTACGAAAGTCTG   170
** ***** ** * * ** ***** ** ***** ** **

```

K	1	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGCTTAGATTATT	233
K	19	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGCTTAGATTATT	233
K	54	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGATTAAATTATT	233
K	60	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGCTTAGATTATT	233
K	79	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGCTTAGATTATT	233
K	96	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGATTAGATTATT	233
K	97	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGCTTAGATTATT	232
K	120	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGCTTARATTATT	232
K	172	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGCTTAGATTATT	233
K	176	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGCTTAGATTATT	232
K	197	A	TCATTTTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCT--GGCTTARATTATT	233
K	8	A	CTACTC--AGGGCGTTCTTACTACCAAGGCATCGCTT--AGGGCTATGCATTAGATTATT	225
K	68	A	CTACTC--AGGGCGTTCTTACTCCTAAGGCATTATATTGGGGGCTATACATTAGATTATT	228
			* * ***** * * * * * * *	
K	1	A	CTAAATGCTCGGCGCTTATGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	288
K	19	A	CTAAATGCTCGGCGCTTGTGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	288
K	54	A	CTAAATGCTCGGCGCTTGTGCTGTT--GCCGT-TGGCATCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	288
K	60	A	CTAAATGCTCGGCGCTTATGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	288
K	79	A	CTAAATGCTCGGCGCTTGTGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	288
K	96	A	CTAAATGCTCGGCGCTTGTGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	288
K	97	A	CTAAATGCTCGGCGCTTATGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	287
K	120	A	CTAAATGCTCGGCGCTTATGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	287
K	172	A	CTAAATGCTCGGCGCTTGTGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	288
K	176	A	CTAAATGCTCGGCGCTTATGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	287
K	197	A	CTAAATGCTCGGCGCTTGTGCTGTT--GCCGT-TGGCGTCCCAGGTGGATCCATCGGCT--	288
K	8	A	CTAAATGCCTG-CGCC-ATGCCGTT--GCCGTGTAGAATCCCCGTGGATCTCTCGGCTGT	281
K	68	A	CTAAATGCTCA-CGCTAATGCTGTTTGGCCGTGTAGAATCCCCGTGGATCTCTCGGCTCG	287
			***** *** *** *** ***** * * ***** *****	
K	1	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	323
K	19	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	323
K	54	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	323
K	60	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	323
K	79	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	323
K	96	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	323
K	97	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	322
K	120	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	322
K	172	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	323
K	176	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	322
K	197	A	--AGGTTGT-----A-----CCACTAC--TTTGTATCTTCAA--AATCCAA	323
K	8	A	CAAGGTTTC---CTGAC-TCTGGTTAATACCACTAC--TTTGTATATCTAGTTAAACCAA	335
K	68	A	TAAGGATTTCCTAACGTATGGTTAACAATAACTACATTTTGTATATCAACTTAAATCAA	347
			*** * ***** ***** * * ** ***	
K	1	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	383
K	19	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	383
K	54	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	383
K	60	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	383
K	79	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	383
K	96	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	383
K	97	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	382
K	120	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	382
K	172	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	383
K	176	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	382
K	197	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	383
K	8	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	395
K	68	A	ATTTTCAGCGGTGGATGTCTCGGCTCACACAACGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAA	407

K	1	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTAAGC-	661
K	19	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTTAAGC	662
K	54	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGGTGAATTAAGC-	661
K	60	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTAAGC-	661
K	79	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTTAAGC	662
K	96	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGGTGAATTAAGC-	661
K	97	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTAAGC-	660
K	120	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTTAAGC	661
K	172	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTTAAGC	662
K	176	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTAAGC-	660
K	197	A	CAGCCGTCTTA-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTAAGC-	661
K	8	A	TAGCTCTCTCT-TTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTWARGC	687
K	68	A	TAGTCCTTCTTATTTTTTTTATGGCCTGAAATTGGATGTGACGATCCGCTGAATTAAGC-	705
			** * ***** * * *	

Anhang C

Multiple Alignment der rDNA eines ca. 282 bp großen, geklonten Fragments der ITS-1-Region von 10 Klonen des Isolats K 60 (* konservierte Positionen, - Ausrichtungslücke, polymorphe Positionen grau unterlegt)

```

K60 C.9      CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
K60 A.18     CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
K60 BE.4     CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
K60 C.8      CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
K60 C.12     CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
K60 C.13     CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
K60 A.21     CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
K60 E.4      CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
K60 C.11     CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
K60 E.2      CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTC 60
*****

K60 C.9      AAATACATTACCACGGGTTATT-ACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACA 119
K60 A.18     AAATACATTACCACGGGTTATTTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACA 120
K60 BE.4     AAATACATTACCACGGGTTATT-ACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACA 119
K60 C.8      AAATACATTACCACGGGTTATTTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACA 120
K60 C.12     AAATACATTACCACGGGTTATTTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACA 120
K60 C.13     AAATACATTACCACGGGTTATT-ACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACA 119
K60 A.21     AAATACATTACCACGGGTTATT-ACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACA 119
K60 E.4      AAATACATTACCACGGGTTATT-ACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACA 119
K60 C.11     AAATACATTACCACGGGTTATT-ACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACA 119
K60 E.2      AAATGTATT-----TAAATGGCCGTGCGTTTAAGGCGCACCTGGTAACA 104
****  ***                *   ***  *                *   *****

K60 C.9      GTTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTTCAT 179
K60 A.18     GTTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTTCAT 180
K60 BE.4     GTTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTTCAT 179
K60 C.8      GTTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTTCAT 179
K60 C.12     GTTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTTCAT 179
K60 C.13     GTTGGCCTGAACGCGAACTT-CAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTTCAT 178
K60 A.21     GTTGGCCTGAACGCGAACTT-CAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTTCAT 178
K60 E.4      GTTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTTCAT 179
K60 C.11     GTTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTTCAT 179
K60 E.2      GTCGGCCTGAACGCGAACGGAAGTGTTCATTACCTGGATGGCAGTACTTAGGTCTGTTAT 164
** *****                *  **  *                *** ***** **

K60 C.9      TTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGATTAGATTATTCTAAAT 239
K60 A.18     TTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGATTAGATTATTCTAAAT 240
K60 BE.4     TTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAAT 239
K60 C.8      TTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAAT 239
K60 C.12     TTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAAT 239
K60 C.13     TTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAAT 238
K60 A.21     TTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAAT 238
K60 E.4      TTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAAT 239
K60 C.11     TTCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAAT 239
K60 E.2      AC--AGGGCGTTCTTACTACTGAGGCATAGTGTAGGGCTGTTGATTAGATTATTCTAAAT 222
*****                * * *****

```

K60 C.9 GCTTGGTGCTTATGCTGTTGCCGTTGGCATCCCAGGTGGATCC 281
K60 A.18 GCTTGGTGCTTATGCTGTTGCCGTTGGCATCCCAGGTGGATCC 282
K60 BE.4 GCTCGGCGCTTGTGCTGTTGCCGTTGGCGTCCCAGGTGGATCC 281
K60 C.8 GCTCGGCGCTTGTGCTGTTGCCGTTGGCGTCCCAGGTGGATCC 281
K60 C.12 GCTCGGCGCTTGTGCTGTTGCCGTTGGCGTCCCAGGTGGATCC 281
K60 C.13 GCTCGGCGCTTATGCTGTTGCCGTTGGCGTCCCAGGTGGATCC 280
K60 A.21 GCTCGGCGCTTATGCTGTTGCCGTTGGCGTCCCAGGTGGATCC 280
K60 E.4 GCTCGGCGCTTATGCTGTTGCCGTTGGCGTCCCAGGTGGATCC 281
K60 C.11 GCTCGGCGCTTATGCTGTTGCCGTTGGCGTCCCAGGTGGATCC 281
K60 E.2 GCCTTTATGTTATGCTGTTGCCGTTGGTATCCCAGGTGGATCC 264
** ** ***** **

Multiple Alignment der rDNA eines 282 bp großen, geklonten Fragments der ITS-1-Region der Isolate K 1, K 19, K 54, K 79, K 90, K97, K 120 und K 197
 (* konservierte Positionen, - Ausrichtungslücke, N Leselücken, polymorphe Loci grau unterlegt)

```

K1 A.1/4 CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGNTGAACCTGCGGAAGGATCATT 60
K19 A.1 CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGNTGAACCTGCGGAAGGATCATT
K54 A.4/7 CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGNTGAACCTGCGGAAGGATCATT
K79 J.3/6 CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGNTGAACCTGCGGAAGGATCATT
K90 E.3/4 CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGNTGAACCTGCGGAAGGATCATT
K97 C.1 CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGNTGAACCTGCGGAAGGATCATT
K120 C.2/3 CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGNTGAACCTGCGGAAGGATCATT
K197 C.6 CTTAAAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGNTGAACCTGCGGAAGGATCATT
*****

```

```

K1 A.1/4 AAATACATTACCACGGGTTATTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACAG 120
K19 A.1 AAATACATTACCACGGGTTATTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACAG
K54 A.4/7 AAATACATTACCACGGGTTATTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACAG
K79 J.3/6 AAATACATTACCACGGGTTATTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACAG
K90 E.3/4 AAATACATTACCACGGGTTATTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACAG
K97 C.1 AAATACATTACCACGGGTTATTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACAG
K120 C.2/3 AAATACATTACCACGGGTTATTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACCCACCTGGTAACAG
K197 C.6 AAATACATTACCACGGGTTATTACTCGGTGGTGGCCGTGCGGAAACGCACCTGGTAACAG
***** ** *****

```

```

K1 A.1/4 TTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTCATT 180
K19 A.1 TTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTCATT
K54 A.4/7 TTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTCATT
K79 J.3/6 TTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTCATT
K90 E.3/4 TTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTCATT
K97 C.1 TTGGCCTGAACGCGAACTT-CAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTCATT
K120 C.2/3 TTGGCCTGAACGCGAACTT-CAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTCATT
K197 C.6 TTGGCCTGAACGCGAACTTTTAGTTCAATCCCTGTTTTGGTAGTACTTCGGTCTGTCATT
***** ***** *****

```

```

K1 A.1/4 TCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAATG 240
K19 A.1 TCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAATG
K54 A.4/7 TCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAATG
K79 J.3/6 TCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAATG
K90 E.3/4 TCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGATTAGATTATTCTAAATG
K97 C.1 TCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAATG
K120 C.2/3 TCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAATG
K197 C.6 TCAGGGGCGTTCTTACTCCTGAGGCGTAAGTGCCAAAGCTGGCTTAGATTATTCTAAATG
***** ***** *****

```

```

K1 A.1/4 CTCGGCGCTTGTGCTGTTGNNGTTGGCGTCCCGGTGGATCC 281
K19 A.1 CTCGGCGCTTGTGCTGTTGNNGTTGGCGTCCCGGTGGATCC
K54 A.4/7 CTCGGCGCTTGTGCTGTTGNNGTTGGCGTCCCGGTGGATCC
K79 J.3/6 CTCGGCGCTTGTGCTGTTGNCGTTGGCGTCCCGGTGGATCC
K90 E.3/4 CTTGGTGCTTATGCTGTTGNCGTTGGCGTCCCGGTGGATCC
K97 C.1 CTCGGCGCTTATGCTGTTGNCGTTGGCGTCCCGGTGGATCC
K120 C.2/3 CTCGGCGCTTATGCTGTTGNCGTTGGCGTCCCGGTGGATCC
K197 C.6 CTCGGCGCTTGTGCTGTTGNNGTTGGCGTCCCGGTGGATCC
** ** ***** ***** *****

```


Anhang D

Tab. 24: Nachweis feliner Babesien mit unterschiedlichen diagnostischen Methoden im Vergleich

Katzen-Nr.	Blut-ausstrich	Real-time PCR	IFAT	Katzen-Nr.	Blut-ausstrich	Real-time PCR	IFAT
K 1	+	+	+	K 141	+	+	+
K 3	+	n. u.	+	K 143	+	+	+
K 4	+	+	+	K 146	+	+	+
K 6	+	+	+	K 147	+	+	+
K 7	+	+	+	K 150	+	+	+
K 8	+	-	-	K 152	+	+	+
K 9	+	+	+	K 153	+	+	+
K 10	+	+	+	K 156	+	+	+
K 11	+	+	+	K 161	+	+	+
K 13	+	+	+	K 166	+	+	+
K 17	+	+	+	K 172	+	+	+
K 19	+	+	+	K 176	+	+	+
K 22	+	+	+	K 180	+	+	+
K 23	+	+	+	K 185	+	+	+
K 53	+	+	+	K 190	+	+	+
K 54	+	+	+	K 191	+	+	+
K 56	+	+	+	K 197	+	+	+
K 57	+	+	+	K 21	-	+	+
K 58	+	+	+	K 44	-	+	+
K 59	+	+	+	K 62	-	+	+
K 60	+	+	+	K 64	-	+	+
K 61	+	+	+	K 99	-	+	+
K 63	+	+	+	K 179	-	+	+
K 65	+	+	+	K 186	-	+	+
K 66	+	+	+	K 187	-	+	+
K 68	+	-	-	K 193	-	+	+
K 69	+	+	+	K 5	-	-	+
K 71	+	+	+	K 38	-	-	+
K 74	+	+	+	K 40	-	-	+
K 79	+	+	+	K 49	-	-	+
K 80	+	+	+	K 82	-	-	+
K 81	+	+	+	K 93	-	-	+
K 90	+	+	+	K 128	n. u.	-	+
K 91	+	+	+	K 174	-	-	+
K 94	+	+	+				
K 96	+	+	+				
K 97	+	+	+				
K 102	+	+	+				
K 103	+	+	+				
K 110	+	+	+				
K 120	+	+	+				
K 121	+	+	+				
K 124	+	+	+				
K 131	+	+	+				
K 132	+	+	+				
K 137	+	+	+				
K 138	+	+	+				
K 139	+	+	+				
K 140	+	+	+				

n. u. : nicht untersucht
+ : Babesien-positiv
- : negativ

Insgesamt waren 66 Proben im Blutausstrich, 72 in der Real-time PCR und 81 im IFAT Babesien-positiv. Bei den Proben 8 und 68 wurden Babesien nur im Blutausstrich nachgewiesen.

Tab. 25: Patientendaten der 206 untersuchten Katzen

Katzen-Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Haltung	Herkunft (Stadtteil)	typische Symptomatik	DIAGNOSTIK		
							Ausstrich	PCR	IFAT
K 1*	KH	1,5 J.	mk	in/out	Greenbushes	nein	pos.++	28,8	1/320
K 2	KH	1 J.	mk	in/out	Lorraine	nein	neg.	n. u.	neg.
K 3	Siam	5 J.	mk	in/out	Brackenfell	nein	pos.	n. u.	1/320
K 4	KH	2 J.	wk	in/out	Kragga Kamma	ja	pos.+++	23,7	1/320
K 5	KH	7 J.	mk	in/out	Broadwood	nein	neg.	neg.	1/320
K 6	KH	6 J.	mk	in/out	Lorraine	ja	pos.++	27,9	1/320
K 7	KH	1 J.	wk	in/out	Lorraine	ja	pos.++	23,1	1/320
K 8*	KH	2 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	ja	pos.+	neg.	neg.
K 9	KH	2 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	ja	pos.++	23,1	1/320
K 10	KH	0,5 J.	mk	in/out	Lorraine	nein	pos.+	25,8	1/320
K 11	KH	0,5 J.	mk	in/out	Lorraine	nein	pos.+	26,6	1/320
K 12	KH	8 J.	wk	in/out	Kabega Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 13	KH	2 J.	m	in/out	Lorraine	ja	pos.++	26,2	1/320
K 14	LH	1 J.	mk	in/out	Westering	nein	neg.	neg.	neg.
K 15	Siam	0,5 J.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 16	KH	1 J.	mk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 17	LH	13 J.	mk	in/out	Kabega	nein	pos.+	27	1/320
K 18	LH	7 J.	wk	in/out	Bridgemead	nein	neg.	neg.	neg.
K 19*	KH	10 Mo.	m	in/out	Bridgemead	ja	pos.+	28,1	1/320
K 20	KH	3 J.	m	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 21	KH	7 J.	mk	in/out	Kabega Park	nein	neg.	30,5	1/320
K 22	KH	2 J.	m	in/out	Rowallan Park	ja	pos.++	27,2	1/320
K 23	KH	3 J.	mk	in/out	Theescombe	ja	pos.+++	22,6	1/320
K 24	KH	unbek.	wk	in/out	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 25	KH	5 J.	wk	in	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 26	KH	unbek.	wk	in	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 27	LH	unbek.	wk	in	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 28	KH	10 J.	wk	in/out	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 29	KH	unbek.	wk	in	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 30	KH	unbek.	wk	in	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 31	KH	unbek.	wk	in	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 32	KH	unbek.	mk	in	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 33	KH	2 J.	mk	in	Algoa	nein	neg.	neg.	neg.
K 34	KH	0,5 J.	wk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 35	KH	0,5 J.	wk	in	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 36	KH	2 Mo.	m	in	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 37	KH	2 Mo.	w	in	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 38	KH	4 J.	mk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	1/80
K 39	KH	5 J.	w	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 40	KH	5 J.	mk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	1/80
K 41	KH	2 J.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 42	KH	unbek.	mk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 43	Siam	unbek.	mk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 44	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	36,8	1/320
K 45	Siam	10 Mo.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.

Tab. 25: Fortsetzung

Katzen-Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Haltung	Herkunft (Stadtteil)	typische Symptomatik	DIAGNOSTIK		
							Ausstrich	PCR	IFAT
K 46	LH	unbek.	w	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 47	KH	0,5 J.	w	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 48	KH	0,5 J.	w	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 49	KH	2 J.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	1/160
K 50	LH	unbek.	w	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 51	KH	0,5 J.	m	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 52	KH	0,5 J.	m	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 53	LH	unbek.	mk	in/out	Walmer	nein	pos. +	34	1/320
K 54*	LH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +	28,4	1/320
K 55	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 56	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +/-	26,8	1/320
K 57	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +	27,6	1/320
K 58	LH	15 J.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +/-	30,4	1/320
K 59	LH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +/-	24	1/320
K 60*	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +/++	33,6	1/320
K 61	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +	25,9	1/320
K 62	KH	4 J.	mk	in/out	Walmer	nein	neg.	30,9	1/320
K 63	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +/-	25,3	1/320
K 64	KH	unbek.	mk	in/out	Walmer	nein	neg.	28,2	1/320
K 65	KH	4 J.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +	26,3	1/320
K 66	KH	6 J.	wk	in/out	Walmer	nein	pos. +	26,8	1/320
K 67	KH	2 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 68*	KH	unbek.	wk	out	unbekannt	nein	pos. +	neg.	neg.
K 69	Birma	5 J.	wk	in/out	Fairview	nein	pos. +/-	27,7	1/320
K 70	KH	0,5 J.	wk	in/out	Framesby Garden	nein	neg.	neg.	neg.
K 71	KH	1 J.	m	in/out	Seaview	nein	pos. +	25,2	1/320
K 72	KH	0,5 J.	wk	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 73	KH	0,5 J.	wk	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 74	KH	2 J.	mk	in/out	Gleanroy Park	ja	pos. ++	25	1/320
K 75	KH	1 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 76	KH	1 J.	wk	in/out	Charlo	nein	neg.	neg.	neg.
K 77	KH	1 J.	wk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 78	KH	3 J.	w	in/out	Francis Evatt Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 79*	KH	unbek.	mk	out	unbekannt	nein	pos. ++	29,8	1/320
K 80	KH	2 J.	wk	in/out	Sherwood	ja	pos. +++	23,9	1/320
K 81	KH	2,5 J.	wk	in/out	Sherwood	nein	pos. +/++	20,5	1/320
K 82	KH	11 J.	mk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	1/160
K 83	KH	1 J.	wk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 84	LH	10 J.	wk	in/out	Sunridge Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 85	KH	1 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 86	KH	13 J.	mk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 87	KH	12 J.	wk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 88	Perser	unbek.	mk	in/out	Westering	nein	neg.	neg.	neg.
K 89	KH	9 Mo.	w	in/out	Linton Grange	nein	neg.	neg.	neg.
K 90	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	ja	pos. ++	37,3	1/320

Tab. 25: Fortsetzung

Katzen-Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Haltung	Herkunft (Stadtteil)	typische Symptomatik	DIAGNOSTIK		
							Ausstrich	PCR	IFAT
K 91	KH	unbek.	mk	in/out	Walmer	ja	pos. IV	20	1/320
K 92	KH	1 J.	wk	in/out	Rowallen Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 93	Abyssiner	8 J.	mk	in/out	Chelsea	nein	neg.	neg.	1/320
K 94	KH	4 J.	wk	in/out	Newton Park	nein	pos. +	32,1	1/320
K 95	KH	1 J.	wk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 96*	KH	1 J.	wk	in/out	Lorraine	ja	pos. +++	32,4	1/320
K 97*	KH	unbek.	mk	in/out	Vikingvale	ja	pos. V	21,4	1/320
K 98	KH	5 J.	mk	in/out	Francis Evatt Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 99	KH	unbek.	mk	out	Woodridge	nein	neg.	31,2	1/320
K 100	KH	1 J.	wk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 101	KH	1 J.	mk	in/out	Sherwood	nein	neg.	neg.	neg.
K 102	KH	7 J.	wk	in/out	Mill Park	nein	pos. +	29,7	1/320
K 103	KH	10 J.	mk	in/out	Kabega	nein	pos. +	30	1/160
K 104	KH	1 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 105	KH	9 Mo.	m	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 106	Perser	unbek.	m	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 107	KH	1 J.	mk	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 108	KH	1 J.	wk	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 109	Siam	1 J.	wk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 110	KH	5 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	pos. +/+++	32,9	1/320
K 111	KH	1 J.	mk	in/out	Collen Glen	nein	neg.	neg.	neg.
K 112	KH	1 J.	mk	in/out	Charlo	nein	neg.	neg.	neg.
K 113	KH	10 J.	wk	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 114	LH	4 J.	mk	in/out	Westering	nein	neg.	neg.	neg.
K 115	KH	3 J.	wk	in/out	Westering	nein	neg.	neg.	neg.
K 116	KH	1,5 J.	mk	in/out	Westering	nein	neg.	neg.	neg.
K 117	LH	1,5 J.	mk	in/out	Westering	nein	neg.	neg.	neg.
K 118	KH	7,5 J.	wk	in/out	Westering	nein	neg.	neg.	neg.
K 119	Siam	6,5 J.	wk	in/out	Linton Grange	nein	neg.	neg.	neg.
K 120*	KH	1 J.	m	in/out	Willow Glen	ja	pos.+++	28,5	1/320
K 121	Siam	18 J.	w	in/out	Lorraine	nein	pos. +/-	25,9	1/160
K 122	KH	8 J.	wk	in/out	Framesby Garden	nein	neg.	neg.	neg.
K 123	KH	4 J.	w	in/out	Sherwood	nein	neg.	neg.	neg.
K 124	KH	1 J.	m	in/out	Theescombe	nein	pos. ++	24,9	1/160
K 125	Perser	7 J.	wk	in/out	Sherwood	nein	neg.	neg.	neg.
K 126	KH	3 J.	mk	in/out	Fernglen	nein	neg.	neg.	neg.
K 127	KH	unbek.	wk	out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 128	KH	1 J.	mk	in/out	Theescombe	nein	n. a.	neg.	1/160
K 129	Mainecoon	8 Mo.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 130	KH	3 Mo.	w	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 131	KH	1 J.	wk	in/out	Beverley Grove	nein	pos. +/+++	28,2	1/320
K 132	KH	1 J.	wk	in/out	Beverley Grove	nein	pos. +/+++	23,7	1/320
K 133	KH	12 J.	wk	in/out	Sherwood	nein	neg.	neg.	neg.
K 134	KH	6 J.	wk	in/out	Sherwood	nein	neg.	neg.	neg.
K 135	KH	6 J.	mk	in/out	Sherwood	nein	neg.	neg.	neg.

Tab. 25: Fortsetzung

Katzen-Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Haltung	Herkunft (Stadtteil)	typische Symptomatik	DIAGNOSTIK		
							Ausstrich	PCR	IFAT
K 136	KH	10 J.	wk	in/out	Sunridge Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 137	KH	2,5 J.	mk	in/out	Beverley Grove	nein	pos.+/-	28,5	1/320
K 138	Siam	16 J.	mk	in/out	Beverley Grove	nein	pos.+/-	30,3	1/320
K 139	Siam	12 J.	wk	in/out	Beverley Grove	nein	pos.+/-	27,3	1/320
K 140	Siam	11 J.	mk	in/out	Beverley Grove	nein	pos.+/-	31,5	1/320
K 141	KH	12 J.	mk	in/out	Beverley Grove	nein	pos.+/-	29,3	1/320
K 142	KH	1,5 J.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 143	KH	unbek.	mk	in/out	Walmer	nein	pos.++	26,2	1/320
K 144	KH	unbek.	mk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 145	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 146	KH	unbek.	mk	in/out	Walmer	nein	pos.+	32,2	1/320
K 147	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	pos.+++	27,8	1/320
K 148	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 149	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 150	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	pos.+++	28,5	1/320
K 151	KH	unbek.	wk	in/out	Walmer	nein	neg.	44,2	neg.
K 152	KH	unbek.	mk	in/out	Walmer	nein	pos.+///	30,1	1/320
K 153	KH	unbek.	mk	in/out	Walmer	nein	pos.+///	29,1	1/320
K 154	Karhäuser	unbek.	m	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 155	KH	unbek.	m	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 156	KH	unbek.	m	in/out	Walmer	nein	pos.++	27,1	1/320
K 157	KH	unbek.	m	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 158	KH	unbek.	m	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 159	KH	unbek.	m	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 160	KH	unbek.	m	in/out	Walmer	nein	neg.	neg.	neg.
K 161	KH	8 J.	mk	in/out	Lorraine	nein	pos.+	31,1	1/320
K 162	KH	1 J.	mk	in/out	Kabega Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 163	KH	unbek.	wk	in/out	Vikingvale	nein	neg.	neg.	neg.
K 164	KH	3 Mo.	m	in/out	Rowallan Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 165	Siam	2 J.	wk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 166	KH	0,5 J.	mk	in/out	Lovemore Park	nein	pos.+	26,7	1/320
K 167	KH	0,5 J.	wk	in/out	Lovemore Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 168	KH	1 J.	wk	in/out	Emerald Hill	nein	neg.	neg.	neg.
K 169	KH	5 J.	wk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 170	KH	3 Mo.	w	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 171	KH	10 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	ja	neg.	neg.	neg.
K 172*	Siam	4 Mo.	m	in/out	Kragga Kamma	ja	pos.+++	27,8	1/320
K 173	KH	5 J.	mk	in/out	Uitenhage	nein	neg.	neg.	neg.
K 174	KH	19 J.	wk	in/out	Theescombe	nein	neg.	neg.	1/160
K 175	KH	0,5 J.	mk	in/out	Lovemore Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 176*	KH	1 J.	m	in/out	Lorraine	ja	pos.+++	28,1	1/320
K 177	LH	1 J.	wk	in/out	Kabega Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 178	Siam	1 J.	mk	in/out	Sherwood	nein	neg.	neg.	neg.
K 179	KH	4 J.	mk	in/out	Lorraine	nein	neg.	28,1	1/320
K 180	KH	8 J.	wk	in/out	Sherwood	nein	pos.+///	26,3	1/320

Tab. 25: Fortsetzung

Katzen-Nr.	Rasse	Alter	Geschlecht	Haltung	Herkunft (Stadtteil)	typische Symptomatik	DIAGNOSTIK		
							Ausstrich	PCR	IFAT
K 181	KH	2 J.	w	in/out	Sunridge Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 182	KH	18 J.	wk	in/out	Woodlands	nein	neg.	neg.	neg.
K 183	KH	9 Mo.	mk	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 184	KH	1 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 185	KH	unbek.	mk	in/out	Crestview	nein	pos.+/>++	22,8	1/320
K 186	KH	11 J.	mk	in/out	Colleen Glen	nein	neg.	29,7	1/320
K 187	Karhäuser	16 J.	wk	in/out	Beverley Grove	nein	neg.	30,8	1/320
K 188	Karhäuser	1 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 189	LH	0,5 J.	wk	in/out	Theescombe	nein	neg.	neg.	neg.
K 190	KH	0,5 J.	wk	in/out	Lorraine	nein	pos.++	26,7	1/320
K 191	KH	1 J.	m	in/out	Sherwood	nein	pos.+/>++	27,6	1/320
K 192	KH	0,5 J.	mk	in/out	Kabega Park	nein	neg.	neg.	neg.
K 193	KH	1 J.	mk	in/out	Brymore	nein	neg.	29,9	1/320
K 194	KH	0,5 J.	mk	in/out	Framesby Garden	nein	neg.	neg.	neg.
K 195	Siam	0,5 J.	wk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 196	KH	18 J.	w	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 197*	KH	1 J.	w	in/out	Chelsea	ja	pos.IV	25,5	1/320
K 198	KH	3 J.	mk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 199	KH	0,5 J.	mk	in/out	Sherwood	nein	neg.	neg.	neg.
K 200	KH	1 J.	wk	in/out	unbekannt	nein	neg.	neg.	neg.
K 201	Siam	1 J.	mk	in/out	Framesby Garden	nein	neg.	neg.	neg.
K 202	KH	unbek.	mk	in/out	Lorraine	nein	neg.	neg.	neg.
K 203	KH	15 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 204	KH	0,5 J.	mk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 205	KH	0,5 J.	wk	in/out	Kragga Kamma	nein	neg.	neg.	neg.
K 206	KH	0,5 J.	wk	in/out	Fernglen	nein	neg.	neg.	neg.

KH = Kurzhaar, LH = Langhaar, J. = Jahre, Mo. = Monate, wk = weiblich kastriert, mk = männlich kastriert, neg = negativ, pos = positiv, n. u. = nicht untersucht, n.a. = nicht auswertbar,

* Artenbestimmung vorgenommen

Angaben zum Ausstrich: subjektive Einschätzung der Parasitämie [von +/- (sehr niedrig), + (niedrig), ++ (mittel), +++ (hoch), IV (sehr hoch) bis V (extrem hoch) und Zwischenstufen]

PCR: angegebener Wert = T_c (Threshold cycle),

IFAT: Titerstufe

Das Gebiet „Kragga Kamma“ umfasst folgende Stadtteile:

Beverley Grove, Bridgemeade, Brymore, Collen Glenn, Fernglen, Framesby Garden, Francis Evatt Park, Glen Roy, Kabega Park, Kragga Kamma, Linton Grange, Lorraine, Rowallan Park, Sherwood, Sunridge Park, Theesecomb, Vikingvale, Westering, Willowglen, Woodlands

Das Gebiet „Walmer“ umfasst folgende Stadtteile:

Broadwood, Charlo, Emerald Hill, Fairview, Lovemore Park, Walmer

Das Gebiet „Algoa“ umfasst den Stadtteil:

Algoa Park

Das Gebiet „Newton Park/Mill Park“ umfasst folgende Stadtteile:

Newton Park, Mill Park

IX. DANKSAGUNGEN

Für die Überlassung des Themas, die allzeit gewährte freundliche Unterstützung und hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit sowie für die geduldige und konstruktive Korrektur und ständige Diskussionsbereitschaft möchte ich mich ganz besonders bei PD Dr. Monika Rinder bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Kurt Pfister bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seine stets freundliche und motivierende Unterstützung.

Meinem besonderen Dank gilt der gesamten Belegschaft der „Kragga Kamma Veterinary Clinic“ in Port Elizabeth, Südafrika, allen voran Dr. David Evezard und Dr. Tim Reed, die mir die Sammlung des Probenmaterials aus dem Patientengut der Klinik ermöglichten und mir dort einen Arbeitsplatz und Materialien zur Verfügung stellten. Sie haben mich auf eine ganz besonders freundliche und selbstverständliche Art und Weise in ihren Klinikalltag aufgenommen und mich jederzeit hilfreich unterstützt.

Beim Ondestepoort Veterinary Institute, Parasitology Division, in Südafrika, und hier ganz besonders Dr. L. M. López-Rebollar, möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung des IFATs bedanken.

Herrn PD Dr. Dr. H. Rinder danke ich für die Unterstützung bei der Validierung der entwickelten Real-time PCR.

Bei Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn bedanke ich mich für die hilfreiche Unterstützung bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials.

Bei der Stiftung zur Förderung des künstlerischen und wissenschaftlichen Nachwuchses der Ludwig-Maximilians-Universität bedanke ich mich für die Gewährung des Stipendiums.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie bedanken für ihre stets freundschaftliche und unterstützende Art sowie für die herzliche Arbeitsatmosphäre.

Sigrid Vogl danke ich ganz besonders für die nette Zusammenarbeit und für ihre immer geduldige und freundschaftliche Unterstützung.

Bei Angelika Thomschke aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München möchte ich mich ganz herzlich für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei jeglichen Arbeiten im Labor bedanken.

Zuletzt bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Gothe für die Anregung zu diesem Thema.