

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Kurt Pfister

Das Vorkommen von Giardien und weiteren Durchfallerregern
in Kälbern in Süddeutschland

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

von Julia Gillhuber
(geb. Hausberger)
aus Vilsbiburg

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kurt Pfister

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer
Univ.-Prof. Dr. Rolf Mansfeld
Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

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

IN ERINNERUNG AN MEINEN PAPA

(1954 - 2006)

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
PRÄSENTATIONEN.....	X
I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT.....	2
1. <i>Giardia</i> spp.....	2
1.1. Taxonomie.....	2
1.2. Biologie.....	4
1.3. Pathogenese und Klinik.....	5
1.4. Diagnostik.....	6
1.5. Epidemiologie.....	6
1.6. Zoonotisches Potential.....	8
1.7. Therapie und Kontrolle.....	10
2. <i>Cryptosporidium</i> spp.	11
2.1. Taxonomie.....	11
2.2. Biologie.....	12
2.3. Pathogenese und Klinik.....	13
2.4. Diagnostik.....	13
2.5. Epidemiologie.....	14
2.6. Zoonotisches Potential.....	14
2.7. Therapie und Kontrolle.....	15
3. <i>Eimeria</i> spp.....	16
3.1. Taxonomie.....	16
3.2. Biologie.....	17
3.3. Pathogenese und Klinik.....	17
3.4. Diagnostik.....	18
3.5. Epidemiologie.....	18
3.6. Therapie und Kontrolle.....	19
4. Bakteriologische und virale Durchfallerreger	20

III.	MATERIAL UND METHODEN.....	21
1.	Material	21
1.1.	Probensammlung, -verarbeitung und -lagerung	21
1.2.	Probenauswahl	21
1.2.1.	Verlaufsstudie	21
1.2.2.	Genotypisierungsstudie.....	22
1.2.3.	Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg	22
2.	Untersuchungsmethoden.....	23
2.1.	Koproskopische Methoden	23
2.2.	Untersuchung mittels ELISA.....	24
2.3.	Genotypisierung.....	25
2.3.1.	DNA-Extraktion	25
2.3.2.	Polymerase Kettenreaktion.....	25
2.3.3.	DNA-Sequenzierung.....	25
2.3.4.	Identifizierung der Arten	25
3.	Statistik	29
IV.	ERGEBNISSE.....	30
1.	Publikation 1	31
2.	Publikation 2	50
3.	Ergebnisse der Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg.....	62
3.1.	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung.....	62
3.2.	Ergebnisse der Bio-X Easy-Digest-ELISA-Untersuchung.....	62
3.3.	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung älterer Tiere	62
V.	DISKUSSION.....	63
VI.	SCHLUSSFOLGERUNG	71
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	72
VIII.	SUMMARY	73
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	74
X.	ABBILDUNGEN	87

XI.	TABELLEN	88
XII.	ANHANG.....	89
XIII.	DANKSAGUNG	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Cryptosporidium</i>
° C	Grad Celsius
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DIF	Direkte Immunfluoreszenz
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
E.	<i>Eimeria</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	Gramm
G.	<i>Giardia</i>
GDH	Glutamatdehydrogenase
ggf.	gegebenfalls
h	Stunde
i.d.R.	in der Regel
internat.	international
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LMU München	Ludwig-Maximilians-Universität München
mg	Milligramm
MIF	Merthiolate-Iodine-Formalin
MIFC	Merthiolate-Iodine-Formalin-Konzentration
min	Minute
ml	Milliliter
MLG	multilocus genotyping
mM	Millimolar
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

μM	Mikromolar
n	Anzahl
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.o.	per os
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
sek	Sekunde
spp.	species pluralis
Tab.	Tabelle
tpi	Triosephosphatisomerase
U/min	Umdrehungen pro Minute
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Präsentationen

Gillhuber J., Pfister K., Scheuerle M.: „Koproskopische Untersuchung von Kälbern auf Durchfallerreger.“ 21. Jahrestagung der Fachgruppe „Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik“ der DVG, München 01./02.02.2013; Poster.

Gillhuber J., Schrödl C., Pfister K., Scheuerle M.: „Vergleich verschiedener Untersuchungsmethoden zum Nachweis von *Giardia* spp. und *Cryptosporidium* spp. in Kotproben von Kälbern.“ Tagung der DVG-Fachgruppe „Parasitologie und Parasitäre Krankheiten“, Gießen 08.-10.07.2013, Vortrag.

(erweiterter Abstrakt erschienen im Kongress-Magazin KompaktVET 05/2013 (Gillhuber et al., 2013))

Scheuerle M., Gillhuber J., Ash A., Pallant L., Thompson RCA., Pfister K.: „Detection and characterization of *Giardia* spp. in calves in Southern Germany.“ 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Perth, Australien 25.-29.08.2013, Vortrag.

I. EINLEITUNG

Durchfallerkrankungen, oft ausgelöst durch virale, bakterielle und parasitäre Erreger, stellen ein großes Problem in der Kälberaufzucht dar. Die finanziellen Auswirkungen auf die Betriebe beschränken sich dabei nicht auf Behandlungskosten und Todesfälle, denn langfristig können sich klinische, aber auch subklinische Infektionen negativ auf die Entwicklung betroffener Kälber auswirken. Reduzierte Gewichtszunahme und erniedrigtes Schlachtkörpergewicht sind mögliche Folgen. Nicht zu unterschätzen ist auch der zusätzliche Arbeits- und Zeitaufwand der Landwirte, der für die Versorgung durchfallkranker Tiere nötig ist. Aus Sicht des Tierschutzes dürfen neben diesen ökonomischen Aspekten aber auch die negativen Auswirkungen auf das Wohlbefinden der Tiere nicht vergessen werden.

Es ist allgemein bekannt, dass *Cryptosporidium* spp. ein häufiger Durchfallerreger bei sehr jungen und *Eimeria* spp. bei älteren Kälbern ist. Die Bedeutung von *Giardia* spp. im Durchfallgeschehen von Kälbern hingegen wird kontrovers diskutiert. Auch hinsichtlich seines zoonotischen Potentials ist dieser Parasit von Interesse, da Rinder auch mit für den Menschen potentiell pathogenen Arten infiziert sein können und somit als mögliche Infektionsquelle in der Diskussion stehen.

Um eine adäquate Risikoabschätzung dieser Erkrankungen, insbesondere der Giardiose, für Kälber und davon ausgehend auch für den Menschen vornehmen zu können, ist es wichtig, Daten über das Auftreten der Erreger in Kälbern zu erheben.

Ziele der Studie waren daher:

- aktuelle Daten zum Vorkommen sowie zum altersabhängigen und saisonalen Verlauf von Giardien, Kryptosporidien und Eimerien bei durchfallkranken Kälbern in Süddeutschland zu erhalten, wobei die Rolle von *Giardia* spp. als ursächlicher Erreger im Mittelpunkt der Untersuchungen stand (Verlaufsstudie),
- das Vorkommen verschiedener *Giardia*-Arten und Sub-Genotypen in klinisch gesunden und in durchfallkranken Kälbern in Süddeutschland zu untersuchen (Genotypisierungsstudie) und
- aktuelle Daten zum Vorkommen von Giardien, Kryptosporidien und Eimerien in klinisch gesunden Kälbern in einem Zukauf-Betrieb zu erheben (Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg).

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Giardia* spp.

1.1. Taxonomie

Die Gattung *Giardia* wird dem Stamm der Metamonada, der Klasse der Trepanonadea und der Ordnung der Giardiida zugeordnet (Cavalier-Smith, 2003; Thompson und Monis, 2012). Anhand der Trophozoiten-Morphologie, nicht aber der Zysten-Morphologie, lassen sich innerhalb dieser Gattung sechs Arten unterscheiden, die verschiedenen Wirten zuzuordnen sind (Tab. 1).

Tab. 1: Morphologisch differenzierbare *Giardia*-Arten (modifiziert nach Monis et al., 2009)

Art	Wirte	Morphologische Merkmale	Trophozoiten	
			Länge [µm]	Breite [µm]
<i>G. duodenalis</i> (morphological group)	Viele Säugetiere (Haussäugetiere, wild lebende Säugetiere, Mensch)	Birnenförmige Trophozoiten mit krallenförmigen Mediankörpern	12-15	6-8
<i>G. ardeae</i>	Vögel	Rundliche Trophozoiten mit auffälliger Einkerbung in der Haftscheibe und rudimentärem hinteren Geißelpaar, Mediankörper rund-oval bis krallenförmig	10	6,5
<i>G. psittaci</i>	Vögel	Birnenförmige Trophozoiten mit krallenförmigen Mediankörpern, ohne ventro-laterales Geißelpaar	14	6
<i>G. agilis</i>	Amphibien	Lange, schmale Trophozoiten mit keulenförmigen Mediankörpern	20-30	4-5
<i>G. microti</i>	Nagetiere	<i>G. duodenalis</i> ähnliche Trophozoiten, vollentwickelte Zysten enthalten vollständig differenzierte Trophozoiten	12-15	6-8
<i>G. muris</i>	Nagetiere	Rundliche Trophozoiten mit kleinen, runden Mediankörpern	9-12	5-7

Unter der morphologisch einheitlichen Art *G. duodenalis* (*G. duodenalis* morphological group) wurden bislang die Genotypen Assemblage A-G, die genetisch unterscheidbar sind und wiederum verschiedenen Wirten zugeordnet werden können, zusammengefasst (Olson et al., 2004; Monis et al., 2009). Mit dem Ziel einer einheitlichen Bezeichnung, die auch die Unterschiede innerhalb dieser Art widerspiegelt, wird eine überarbeitete Taxonomie vorgeschlagen, wonach der Gattung *Giardia* elf Arten zugeordnet werden (Monis et al., 2009) (Tab. 2). Weitere neue Arten wurden in Flossenfüßlern und Beuteltieren gefunden, sind aber bis jetzt nicht offiziell beschrieben. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird diese überarbeitete Nomenklatur verwendet, nach der Rinder somit mit den beiden zoonotischen Arten *G. duodenalis* und *G. enterica* sowie mit der Rinder-spezifischen Art *G. bovis* infiziert sein können. Diese 3 Arten können wiederum in verschiedene Sub-Genotypen eingeteilt werden, die genetisch z.B. anhand des β -giardin oder GDH-Gens identifiziert werden. Diese Sub-Genotypen werden mit A, B bzw. E (Buchstabe der früheren Assemblage-Nomenklatur) und einer arabischen Zahl gekennzeichnet. Tabelle 3 zeigt die Zuordnung der Sub-Genotypen von *G. duodenalis* zu MLG Typen und Subassemblages.

Tab. 2: *Giardia*-Arten (modifiziert nach Monis et al., 2009; Thompson und Monis, 2012)

Art	Assemblage	Wirte
<i>G. duodenalis</i>	A	Mensch, viele Haussäugetiere und wild lebende Säugetiere
<i>G. enterica</i>	B	Mensch, viele Haussäugetiere und wild lebende Säugetiere
<i>G. canis</i>	C/D	Hunde und andere Caniden
<i>G. bovis</i>	E	Rinder und andere Nutztiere (Huftiere)
<i>G. cati</i>	F	Katzen
<i>G. simondi</i>	G	Ratten
<i>G. ?</i>	H	Flossenfüßler
<i>G. ?</i>	?	Beuteltier (Quenda, Beuteldachs)
<i>G. ardeae</i>		Vögel
<i>G. psittaci</i>		Vögel
<i>G. agilis</i>		Amphibien
<i>G. microti</i>		Nagetiere
<i>G. muris</i>		Nagetiere

Tab. 3: Zuordnung der Sub-Genotypen von *G. duodenalis* zu MLG Typen und Subassemblages (modifiziert nach Feng und Xiao, 2011)

Subassemblage	MLG Typ	Sub-Genotyp		
		GDH	β -giardin	TPI
AI	AI-1	A1	A1	A1
	AI-2	A5	A5	A5
AII	AII-1	A2	A2	A2
	AII-2	A3	A3	A2
	AII-3	A3	A2	A2
	AII-4	A4	A3	A2
	AII-5	A3	A3	A1
	AII-6	A3	A3	A3
	AII-7	A3	A3	A4
AIII	AIII-1	A6	A6	A6

MLG - multilocus genotyping

1.2. Biologie

Der Lebenszyklus von Giardien ist homoxen und beinhaltet die Stadien Zyste und Trophozoit (Abb. 1).

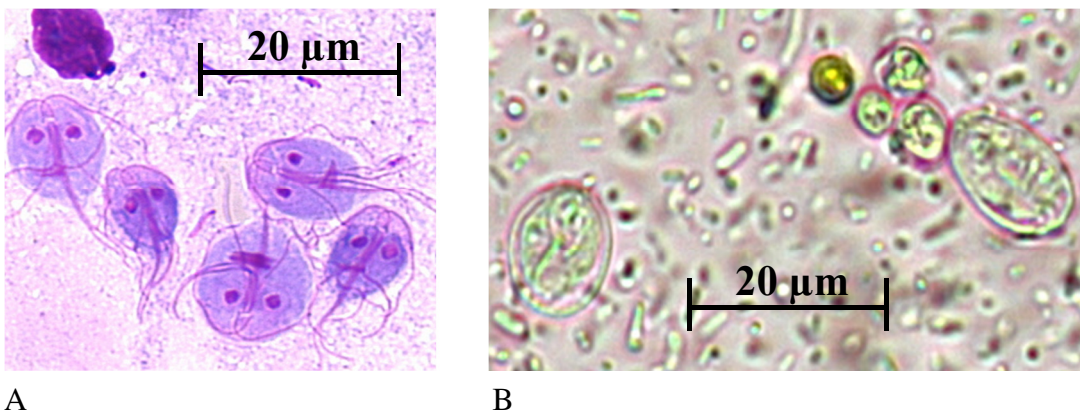


Abb. 1: *G. duodenalis* morphological group: Trophozoiten (A) und Zysten (B)

(Quelle: Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, LMU München)

Die Infektion erfolgt durch orale Aufnahme infektiöser Zysten, wobei von einer minimalen infektiösen Dosis von 10–25, bzw. 10-100 Zysten ausgegangen wird (Rendtorff, 1954; Caccio und Sprong, 2011). Der niedrige pH-Wert im Magen und die Galle im Duodenum lösen die Exzystierung aus, wobei aus jeder Zyste 2 Trophozoiten hervorgehen (Eckert et al., 2008). Diese besiedeln Duodenum und Jejunum, indem sie sich mit Hilfe ihrer ventralen

Haftscheibe an die Schleimhaut binden, und vermehren sich dort rasch durch asexuelle Zweiteilung (Eckert et al., 2008; Thompson und Monis, 2012). Vermutlich ausgelöst durch den Einfluss von Gallensalzen und Cholesterin kommt es zur Enzystierung (Thompson und Monis, 2012), wobei sich die Kerne teilen, nicht aber das Zytoplasma. Nach einer Präpatenz von 4-7 Tagen beim Kalb werden die so entstandenen 4-kernigen Zysten (oval bis rundlich, 8-15 x 7-10 µm groß) mit dem Kot ausgeschieden (Eckert et al., 2008). Sie bleiben in kühler und feuchter Umgebung Monate infektiös und können auch im Wasser eine beträchtliche Zeit überleben (Meyer und Jarroll, 1980; Thompson et al., 2008). Infizierte Kälber können über einen sehr langen Zeitraum (Patenz: Wochen bis Monate (Eckert et al., 2008)) und in hohen Mengen (10^5 bis 10^6 Zysten pro Gramm Kot (Xiao und Herd, 1994; O'Handley et al., 1999)) Zysten ausscheiden und dadurch die Umgebung stark kontaminieren. Die fäkal-orale Übertragung findet bei Kälbern meist direkt statt, ist aber auch indirekt über eine kontaminierte Umgebung sowie kontaminiertes Futter und Wasser möglich (Geurden et al., 2010c).

1.3. Pathogenese und Klinik

Der Pathomechanismus, der zu Symptomen bei einer Giardien-Infektion führt, ist nicht vollständig geklärt. Eine Giardiose kann durch Enterozyten-Apoptose, Störung der epithelialen Barrierefunktion und Verkürzung der Mikrovilli zu Maldigestion und Malabsorption führen. Zusätzlich kann es zu einer erhöhten Chlorid-Sekretion sowie einer beschleunigten Darmassage kommen, was ebenfalls zur Entstehung von Durchfall beiträgt (zusammengefasst in Cotton et al., 2011). Ob es zum Auftreten von Symptomen kommt wird von vielen Faktoren wie der Wirts- und *Giardia*-Art, dem Alter, dem Immun- und Ernährungsstatus des Wirtes sowie von Koinfektionen beeinflusst (Thompson und Monis, 2012).

Inwieweit Giardien als Durchfallerreger bei Wiederkäuern eine Rolle spielen, ist unklar (O'Handley und Olson, 2006; Thompson et al., 2008). In manchen Studien wird die Giardiose bei Kälbern als krankheitsauslösend beschrieben (Xiao et al., 1993; O'Handley et al., 1999), während in anderen kein Zusammenhang zwischen Infektion und Symptomen gefunden wurde (Quilez et al., 1996; Huetink et al., 2001; Bjorkman et al., 2003). Auch die Bedeutung einer asymptomatischen Giardien-Infektion ist noch nicht ausreichend erforscht. In einer Studie an experimentell infizierten Lämmern konnte ein Zusammenhang zwischen einer Giardien-Infektion und einer reduzierten Gewichtszunahme, einer schlechteren

Futtermitteln sowie einem niedrigeren Schlachtkörpergewicht gezeigt werden (Olson et al., 1995), nicht jedoch in einer Studie an Stieren (Ralston et al., 2003a). Somit sollte eine Giardien-Infektion, auch wenn sie oft asymptomatisch oder subklinisch verläuft, als Differentialdiagnose bei Kälbern mit akutem oder chronischem Durchfall, reduzierter Gewichtszunahme und schlechtem Allgemeinbefinden in Betracht gezogen werden (Olson et al., 1997; 2004; Geurden et al., 2006b, 2010c).

1.4. Diagnostik

Die Diagnose einer Giardien-Infektion ist mittels mikroskopischen Direktnachweises, mittels Ag-Nachweis und mittels PCR möglich. Ein Ak-Nachweis hingegen ist nicht sinnvoll, da kein signifikanter Ak-Anstieg bei Kälbern nach Infektion zu verzeichnen ist (O'Handley et al., 2003).

Der mikroskopische Direktnachweis kann mittels Flotationsverfahren (mit ZnSO₄, ZnCl₂) (Zajac et al., 2002; Eckert et al., 2008) und mittels MIFC-Methode (Thornton et al., 1983) durchgeführt werden. Aufgrund intermittierender Zystenausscheidung wird empfohlen mehrmalig Kot von aufeinanderfolgenden Tagen zu untersuchen (O'Handley et al., 1999; Thompson et al., 2008). Wird nur einmalig untersucht, ist es möglich, dass die erhaltene Infektionsrate etwas unterhalb des tatsächlichen Wertes liegt.

Beim Ag-Nachweis besteht die Möglichkeit, eine direkte Immunfluoreszenz (DIF) (Xiao und Herd, 1993), einen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Boone et al., 1999) oder einen Schnelltest durchzuführen. Manche im Handel erhältliche Tests wurden mit Kälberkotproben getestet. Dabei erzielten IFA und ELISA gute Sensitivitäten und Spezifitäten, wohingegen die Sensitivitäten zweier Schnelltests unter 30% lagen (Geurden et al., 2004; 2010a).

Für die Durchführung der PCR gibt es verschiedene Protokolle (Hopkins et al., 1997; Caccio et al., 2002; Read et al., 2004; Lalle et al., 2005). Hierbei ist, im Gegensatz zu den bislang erwähnten Methoden, eine Unterscheidung aller Arten und je nach untersuchtem Gen auch eine Unterscheidung der Sub-Genotypen möglich.

1.5. Epidemiologie

Daten zur Prävalenz von *Giardia* spp. in Kälbern und Rindern wurden weltweit erhoben. Teils wurden dabei auch die vorkommenden Arten differenziert, wobei *G. bovis* am häufigsten gefunden wurde (Tab. a im Anhang). Die Prävalenzen in den verschiedenen

Studien variieren sehr stark, was z.T. durch Faktoren wie Betriebsmanagement, geografische und klimatische Parameter, Anzahl und Alter der untersuchten Tiere und die verwendete Testmethode erklärt werden kann (Geurden et al., 2010c). Langzeitstudien hingegen haben übereinstimmend eine kumulative Infektionsrate von 100% gezeigt (Xiao und Herd, 1994; O'Handley et al., 1999; Ralston et al., 2003b). In wenigen Studien wurde auch eine Bestimmung der Sub-Genotypen vorgenommen, wobei die Sub-Genotypen A1-4, B3-6 und E1-3 bei Rindern/Kälbern gefunden wurden (Tab. b im Anhang).

Verschiedene Faktoren wie Alter, Haltung und Jahreszeit können das Risiko einer Giardien-Infektion beeinflussen. Von großer Bedeutung ist das Alter, wobei der Zeitraum mit der höchsten Prävalenz zwischen 4 Wochen und 4-5 Monaten schwankt (Olson et al., 1997; Huetink et al., 2001; Becher et al., 2004; Jäger et al., 2005; Hamnes et al., 2006). In der Studie von Geurden et al. (2012) wurde ein erhöhtes Infektionsrisiko für Kälber bis zu einem Alter von 8 Wochen im Vergleich zu älteren Kälbern festgestellt. Zusätzlich erhöhte der Kontakt zum Muttertier und zu anderen Tieren das Infektionsrisiko für Kälber. Eine mögliche Erklärung für das höhere Risiko einer Giardien-Infektion bei Kontakt zum Muttertier ist ein Anstieg der Zysten-Ausscheidung bei Kühen um den Zeitpunkt der Geburt (Schnieder, 2006; Geurden et al., 2010c). Ein geringeres Infektionsrisiko wurde hingegen bei häufiger Reinigung der Mutterkuhställe und bei Desinfektion der Kälberställe festgestellt (Geurden et al., 2012). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer älteren Studie, in der noch zahlreiche weitere Einflussfaktoren untersucht wurden, gefunden (Wade et al., 2000a). Ob es einen saisonalen Einfluss gibt, wird widersprüchlich diskutiert. In einer Studie, durchgeführt im Bundesstaat New York, konnte kein Zusammenhang zwischen Saison und Prävalenz festgestellt werden (Wade et al., 2000b). In einer anderen Studie, ebenfalls durchgeführt im Bundesstaat New York, wurde hingegen im Sommer (Wade et al., 2000a) und in Studien aus den Niederlanden und aus Norwegen wurden im Winter (Huetink et al., 2001; Hamnes et al., 2006) signifikant höhere Prävalenzen gefunden. Eine Abkalbperiode im Herbst, während der in der untersuchten Gegend vermehrt Kälber geboren wurden, und die ausschließliche Stallhaltung im Winter, weswegen durch engen Kontakt zwischen den Tieren und durch erschwerte Reinigung und Desinfektion der Ställe die Möglichkeit der direkten Zystenübertragung steigt, sind laut Hamnes et al. (2006) möglich Gründe für die, in ihrer Studie gefundenen höheren Prävalenzen im Winter.

1.6. Zoonotisches Potential

Die Giardiose, 2004 aufgenommen in die „Neglected disease initiative“ der WHO (Savioli et al., 2006), ist eine der häufigsten Darminfektionen des Menschen (Feng und Xiao, 2011; Thompson und Monis, 2012) und wird auch oft bei Hunden und Katzen diagnostiziert. Außerdem wird dieser Erreger neben dem Rind auch bei anderen Nutztieren, wie Schaf, Ziege und Schwein, und bei wild lebenden Säugetieren gefunden (Thompson und Monis, 2012). Auch wenn die meisten *Giardia*-Arten ein enges Wirtsspektrum haben, sind es die beiden für den Menschen infektiösen Arten *G. duodenalis* und *G. enterica*, die für eine Vielzahl von Wirten, u.a. auch für Rinder, infektiös sind. Die fäkal-orale Übertragung erfolgt meist durch direkten Kontakt, ist jedoch auch indirekt über verunreinigtes Wasser und verunreinigte Nahrung möglich. In Abbildung 2 sind die 4 wichtigsten Übertragungszyklen sowie ihr Zusammenspiel dargestellt. In verschiedenen Studien wurden bei Menschen die gleichen Sub-Genotypen gefunden wie bei Kälbern (Tab. b im Anhang), was auf eine Interaktion der beiden Übertragungszyklen hindeutet (Monis et al., 2009). Deshalb wurde lange Zeit angenommen, dass Kälber im Zusammenhang mit Giardiose-Ausbrüchen, bedingt durch verunreinigtes Wasser, von Bedeutung für die öffentliche Gesundheit sind. Denn durch die hohe Zystenausscheidung infizierter Kälber wurde eine Kontamination von Grund- und Oberflächenwasser vermutet. Jedoch wurde bei keinem der 132 dokumentierten, durch Wasser übertragenen Giardiose-Ausbrüche ein Beweis dafür gefunden, dass infizierte Kälber die Quelle waren (Thompson und Monis, 2012). Wird jedoch, wie in der Studie von Khan et al. (2011), der gleiche Sub-Genotyp von *G. duodenalis* bei Rindern und Menschen eines Betriebs gefunden, so besteht bei direktem Kontakt zwischen Mensch und Tier die Gefahr einer zoonotischen Übertragung. Umgekehrt ist es in solchen Fällen jedoch genauso möglich, dass der Mensch die Infektionsquelle für die Rinder darstellt und somit womöglich eine anthroozoonotische Übertragung vom Mensch auf das Tier stattfindet (Dixon et al., 2011), wie es in einer Studie über Giardien-Infektionen bei Kälbern und Gorillas in einem abgelegenen Nationalpark in Uganda vermutet wurde (Graczyk et al., 2002).

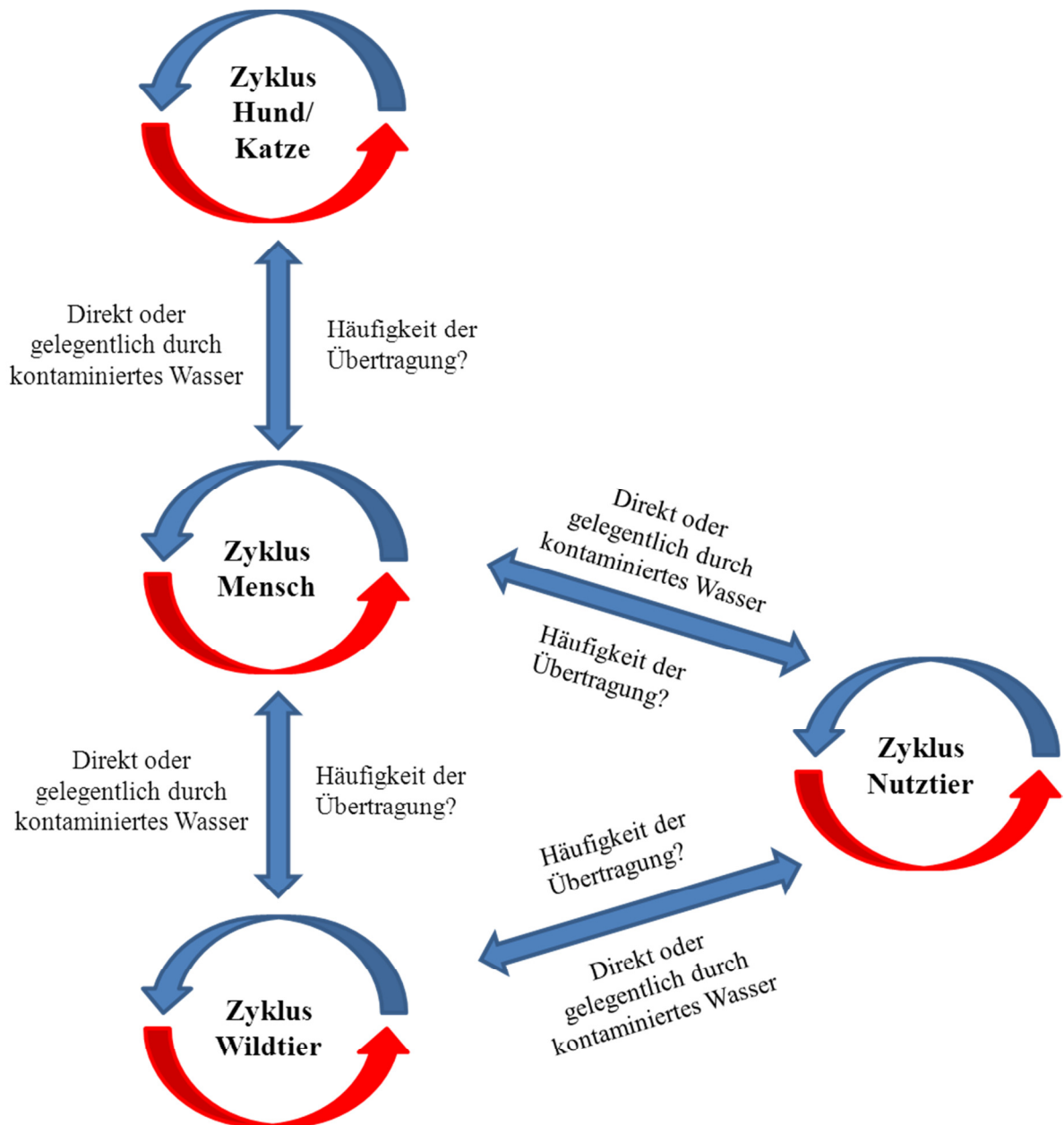


Abb. 2: Die 4 wichtigsten Übertragungszyklen von *G. duodenalis* morphological group

Rote Pfeile: Übertragung der wirtsspezifischen Arten innerhalb der entsprechenden Wirtsgruppe

Blaue Pfeile: Übertragung der Arten mit breitem Wirtsspektrum (*G. duodenalis* und *G. enterica*) innerhalb der Wirtsgruppen und übergreifend zwischen anderen Wirtsgruppen

➔ *G. duodenalis* und *G. enterica* haben eine niedrige Wirtsspezifität und können in allen dargestellten Wirtsgruppen vorkommen

(modifiziert nach Monis et al., 2009; Thompson und Monis, 2012)

1.7. Therapie und Kontrolle

Inwieweit die Behandlung einer Giardien-Infektion bei Rindern notwendig ist, steht in der Diskussion (O'Handley und Olson, 2006). Bereits in früheren Studien wurde erfolgreich die Wirkung von Fenbendazol, einem Breitband-Anthelminthikum aus der Gruppe der Benzimidazole, an natürlich (Xiao et al., 1996; O'Handley et al., 1997; Geurden et al., 2006b) und experimentell (O'Handley et al., 2000) mit Giardien infizierten Kälbern getestet. In einer aktuellen Studie wurde bei der Behandlung von experimentell infizierten Kälbern mit 15mg/kg KG Fenbendazol an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, neben einer signifikanten Reduktion der kumulativen Zystenausscheidung und einer festeren Kotkonsistenz, zum ersten Mal auch eine signifikant höhere Gewichtszunahme im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe beobachtet (Geurden et al., 2010b). Ebenfalls wurde die Wirkung von Albendazol (Xiao et al., 1996) und Paromomycin (Geurden et al., 2006a) an natürlich bzw. experimentell Giardien-infizierten Kälbern erfolgreich getestet.

Neben einer Behandlung ist es aber mindestens genauso wichtig, durch entsprechende Maßnahmen wie häufigem Ausmisten, regelmäßiger Reinigung und Desinfektion und guter Kolostrumversorgung (O'Handley und Olson, 2006), eine Neu- bzw. Reinfektion, wie sie in allen eben genannten Studien gefunden wurde (Xiao et al., 1996; O'Handley et al., 1997; 2000; Geurden et al., 2006a; 2006b; 2010b), bestmöglich zu verhindern, sowie die Auswirkungen einer Giardiose auf Kälber möglichst gering zu halten.

Ein Impfstoff gegen die Giardiose ist in Nordamerika für Hunde und Katzen erhältlich (Olson et al., 2000). In Versuchen an Kälbern konnte damit jedoch weder die Zystenausscheidung reduziert, noch die Ausbildung von Symptomen verhindert werden (Uehlinger et al., 2007).

2. *Cryptosporidium* spp.

2.1. Taxonomie

Die Gattung *Cryptosporidium* wird dem Stamm der Alveolata und dem Unterstamm der Apicomplexa (Synonym Sporozoa) zugeordnet. Ursprünglich wurde sie aufgrund von Ähnlichkeiten im Lebenszyklus der Klasse der Coccidea zugeteilt. Derzeit hat sie eine sogenannte incertae sedis, eine unklare Stellung in der Taxonomie. Die Kryptosporidien ähneln phänotypisch den Coccidea, in einigen Besonderheiten jedoch unterscheiden sie sich von diesen und scheinen phylogenetisch enger mit den Gregarinea verwandt zu sein. Weitere Forschungsarbeit in diesem Bereich ist somit nötig, um die Taxonomie von *Cryptosporidium* zu klären (Thompson et al., 2005; Eckert et al., 2008).

Der Gattung *Cryptosporidium* werden zahlreiche Arten zugeordnet, die meist nur genetisch, nicht aber morphologisch unterschieden werden können (Tab. 4).

Tab. 4: *Cryptosporidium*-Arten (modifiziert nach Eckert et al., 2008; Lendner et al., 2011)

Art	Wirte	Hauptlokalisation
<i>C. hominis</i> *	Mensch, Affen	Dünndarm
<i>C. parvum</i> *	Rind, Schaf, Ziege, Wildwiederkäuer, u.a., Mensch	Dünndarm
<i>C. bovis</i>	Rind, Schaf	Dünndarm
<i>C. andersoni</i>	Rind, Bison, Kamel, Schaf	Labmagen
<i>C. ryanae</i>	Rind	n.b.
<i>C. xiaoi</i>	Schaf	n.b.
<i>C. suis</i> *	Schwein, Mensch	Dünndarm
<i>C. canis</i> *	Hund, Fuchs, Kojote, Mensch	Dünndarm
<i>C. felis</i> *	Katze, Rind, Mensch	Dünndarm
<i>C. wrairi</i>	Meerschweinchen	Dünndarm
<i>C. muris</i>	Nagetiere	Magen
<i>C. fayeri</i>	Rotes Riesenkänguru	n.b.
<i>C. macropodum</i>	Östliches Graues Riesenkänguru	Darm
<i>C. baileyi</i>	Huhn, Truthuhn, Fasan, Enten, u.a.	Trachea u.a. Luftwege, Bursa, Kloake
<i>C. galli</i>	Huhn, Finken u.a. Wildvögel	Magen
<i>C. meleagridis</i> *	Truthuhn, andere Vögel, Mensch	Darm, auch Bursa und Kloake
<i>C. sepentis</i>	Schlangen, Eidechsen	Magen
<i>C. saurophilum</i>	Eidechsen, Schlangen	Darm
<i>C. molnari</i>	Meeresfische	Magen
<i>C. scophthalmi</i>	Steinbutt	n.b.

* zoonotische Arten

n.b. = nicht bekannt

Rinder können mit *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* und *C. ryanae* infiziert sein. *C. parvum*-Oozysten (5,0 x 4,5 µm, kugelförmig) können morphologisch von den größeren *C. andersoni*-Oozysten (7,4 x 5,6 µm, ellipsoid) und den kleineren *C. ryanae*-Oozysten (3,2 x 3,7 µm) unterschieden werden, nicht jedoch von *C. bovis*-Oozysten (Eckert et al., 2008; Fayer et al., 2008; Thompson et al., 2008). *C. parvum* kann wiederum verschiedenen Genotypen zugeordnet werden, die vermutlich an ihren jeweiligen Wirt angepasst sind und eventuell eigenständige Arten darstellen (Xiao et al., 2004; Thompson et al., 2005).

2.2. Biologie

Der Lebenszyklus von Kryptosporidien ist homoxen, läuft vollständig im Wirt ab und umfasst geschlechtliche und ungeschlechtliche Entwicklungsphasen (Merogonie, Gamogonie, Sporogonie). Die Infektion erfolgt durch die perorale Aufnahme dickwandiger, sporulierter Oozysten, wobei der Übertragungsweg i.d.R. fäkal-oral ist und die minimale infektiöse Dosis bei 30 Oozysten liegt (DuPont et al., 1995). Die Präpatenz beträgt beim Kalb 3-6 Tage und die Patenz meist 1-2 Wochen (Eckert et al., 2008). Kälber können über 10^7 Oozysten/g Kot ausscheiden (Fayer et al., 1998), die sofort infektiös sind und dies wegen ihrer hohen Widerstandsfähigkeit bei entsprechenden Bedingungen auch lange bleiben (Eckert et al., 2008).

Bislang galt *Cryptosporidium* spp. als ein obligat intrazellulärer Parasit, wobei sich die einzelnen Entwicklungsstadien innerhalb einer parasitophoren Vakuole, intrazellulär aber extrazytoplasmatisch, in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes (Hauptlokalisation siehe Tab. 4) befinden (Eckert et al., 2008). Hijjawi et al. (2002; 2004) gelang es jedoch neue, extrazelluläre, Gamonten-ähnliche Stadien nachzuweisen. Außerdem konnten sie zeigen, dass *Cryptosporidium* spp. seinen vollständigen Lebenszyklus in einer wirtszell-freien Kultur durchlaufen kann (Hijjawi et al., 2004). Erfolglos versuchten Girouard et al. (2006) dies in einer ähnlichen Kultur zu wiederholen. Woods und Upton (2007) zweifelten die Studie von Hijjawi et al. (2004) an und forderten Kryptosporidien solange als obligat intrazelluläre Parasiten zu betrachten, bis ein unabhängiges Labor die neuen Befunde bestätigt.

2.3. Pathogenese und Klinik

Durch die Einnistung in die Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes wird der Mikrovillisaum verdrängt. Es kommt zu entzündlicher Infiltration, Zottenatrophie, Zottenverschmelzung und Kryptenhyperplasie (Angus et al., 1982; Heine et al., 1984; Koudela und Jiri, 1997), in deren Folge es zu Malabsorption bedingt durch Verringerung der resorptiven Darmoberfläche und membrangebundener Verdauungsenzyme kommen kann (Thompson et al., 2005). Eine sekretorische Diarrhö infolge einer Chlorid-Sekretion, bedingt durch ein Enterotoxin, wird ebenfalls als Teil der Pathogenese vermutet (Guarino et al., 1994).

Das Leitsymptom einer Kryptosporidiose bei jungen Kälbern, meist ausgelöst durch *C. parvum*, ist profuser Durchfall mit flüssigem, oft hellgelbem Kot (Fayer et al., 1998; Eckert et al., 2008). Weiter können Symptome wie Dehydrierung, Fieber, Anorexie, Gewichtsverlust, Schwäche und zunehmende Verschlechterung des Allgemeinzustandes auftreten. Nicht selten verläuft die Infektion tödlich (O'Donoghue, 1995; Eckert et al., 2008). Das Auftreten von Symptomen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Einer davon ist die Lokalisation der Infektion im Darm: während eine Infektion des proximalen Dünndarms häufig zu wässrigem Durchfall führt, verläuft eine Infektion des distalen Ileums, des Dickdarms oder des Pylorus des (Lab-)Magens oft asymptomatisch (Thompson et al., 2005). Somit kommt es bei der Labmagen-Kryptosporidiose, die durch *C. andersoni* v.a. bei älteren Kälbern ausgelöst wird und bei der Epithelzellen der Fundusdrüsen befallen werden, mit den Folgen einer Drüsendilatation und Hypertrophie der Magenschleimhaut, nicht zum Auftreten von Durchfall (Eckert et al., 2008).

2.4. Diagnostik

Mikroskopisch ist ein Direktnachweis der Oozysten im Kot möglich, wobei sich die Durchführung einer Karbol-fuchsin-Färbung eines Kotasstriches als praktikable Methode erwiesen hat (Heine, 1982). Morphologisch sind nur die Oozysten weniger Kryptosporidien-Arten, wie z.B. von *C. andersoni*, von anderen Arten unterscheidbar (Thompson et al., 2008).

Weiter ist ein Ag-Nachweis mittels DIF, ELISA und Schnelltest möglich, während ein Ak-Nachweis nicht geeignet ist. Auch die Durchführung einer PCR, bei der eine genaue Artenbestimmung vorgenommen werden kann, ist möglich (Eckert et al., 2008).

2.5. Epidemiologie

Die Kryptosporidiose ist eine der wichtigsten Ursachen akuten Durchfalls junger Kälber (Göbel, 1991; de Graaf et al., 1999; de la Fuente et al., 1999; Lefay et al., 2001). Die Infektionsrate von Rindern verschiedenen Alters weltweit mit *Cryptosporidium* spp. und teils auch das Verhältnis der einzelnen Arten wurden in zahlreichen Studien erforscht (Tab. c im Anhang). Die Schwankungen in den Werten können, wie auch bei Giardien, teils durch Faktoren wie z.B. dem Alter der untersuchten Tiere und der Untersuchungsmethoden zustande kommen (Hannes et al., 2006). Langzeitstudien wiederum haben eine kumulative Infektionsrate von 100% gezeigt (Xiao und Herd, 1994; O'Handley et al., 1999).

Ein wichtiger Faktor, der das Risiko einer Kryptosporidiose beeinflusst, ist das Alter. Eine Infektion mit *C. parvum*, die meist zu Durchfall führt, tritt normalerweise in den ersten 4 Lebenswochen auf, wobei die Infektionsrate bei Tieren zwischen 8 und 14 Tagen am höchsten ist (Xiao und Herd, 1994; de la Fuente et al., 1999; Santin et al., 2004). *C. andersoni*, *C. bovis* und *C. ryanae* werden hingegen häufiger bei älteren Tieren gefunden (Santin et al., 2004; Fayer et al., 2006; 2007; Santin et al., 2008). Zum Einfluss der Saisonalität auf die Infektionsrate mit Kryptosporidien gibt es widersprüchliche Ergebnisse: in Studien aus Frankreich und Norwegen war die Infektionsrate im Winter, (Lefay et al., 2000; Hannes et al., 2006), in einer Studie aus den USA im Sommer (Garber et al., 1994) und in einer Studie aus dem UK im Herbst (Sturdee et al., 2003) am höchsten, wohingegen in Studien aus Spanien und dem Bundesstaat New York kein saisonaler Einfluss festgestellt wurde (Castro-Hermida et al., 2002; Starkey et al., 2005). Entsprechend der höheren Nachweisrate für Giardien im Winter werden in der Studie von Hannes et al. (2006) auch für die höhere Nachweisrate von Kryptosporidien im Winter die Abkalbeperiode im Herbst und die ausschließliche Stallhaltung im Winter als mögliche Gründe aufgeführt.

2.6. Zoonotisches Potential

Die Kryptosporidiose, ebenfalls 2004 aufgenommen in die „Neglected disease initiative“ der WHO (Savioli et al., 2006), ist ein wichtiger Durchfallerreger beim Menschen, v.a. in Entwicklungsländern und bei Personen mit Immunschwäche (Thompson et al., 2005; Eckert et al., 2008). Neben *C. hominis* sind beim Menschen weitere, potentiell zoonotische Kryptosporidien-Arten gefunden worden (Tab. 4). Während die meisten davon nur sehr selten und auch nur bei Personen mit Immunschwäche zu finden sind, ist der bovine Genotyp von *C. parvum* als Zoonose-Erreger auch bei immunkompetenten Menschen von

Bedeutung (Eckert et al., 2008). Die Übertragung erfolgt dabei entweder direkt durch Kontakt zu infizierten Kälbern oder indirekt durch kontaminiertes Wasser oder kontaminierte Nahrung (Monis und Thompson, 2003; Stantic-Pavlinic et al., 2003; Goh et al., 2004; Olson et al., 2004; Eckert et al., 2008; Khan et al., 2010).

2.7. Therapie und Kontrolle

Bislang gibt es kein Medikament, das zu einer sicheren Heilung der Kryptosporidiose führt (Armson et al., 2003). Halofuginon, ein Antiprotozoikum aus der Gruppe der Quinazolinon-Derivate mit kryptosporidiostatischer Wirkung auf Sporozoiten und Merozoiten, ist in Europa zum pro-/metaphylaktischen Einsatz bei diagnostiziertem Befall mit *C. parvum* zugelassen (0,1 mg/kg KG p.o. täglich ab dem 1. oder 2. Lebenstag, bzw. innerhalb von 24 h nach Durchfallbeginn an 7 aufeinanderfolgenden Tagen) (Schnieder, 2006; Eckert et al., 2008). In verschiedenen Studien wurde eine Verminderung der Oozystenausscheidung sowie der Durchfallsymptomatik bei Behandlung von Kälbern mit Halofuginon gezeigt (Lefay et al., 2001; Joachim et al., 2003; Trotz-Williams et al., 2011).

Für eine weitere Reduktion des Infektionsdrucks sind natürlich Hygiene und Desinfektion von großer Bedeutung (Eckert et al., 2008).

In verschiedenen Versuchen wirkte sich eine Impfung (Impfversuche mit Oozysten-Präparaten, Subunit- und DNA-Vakzinen) bzw. die Gabe von Hyperimmun-Kolostrum teils positiv auf den Gesundheitszustand aus und/oder führte zu einer Reduktion der Oozystenausscheidung (zusammengefasst in Thompson et al., 2008).

3. *Eimeria* spp.

3.1. Taxonomie

Die Gattung *Eimeria* wird dem Stamm der Alveolata, dem Unterstamm der Apicomplexa (Synonym Sporozoa), der Klasse der Coccidea und der Ordnung der Eimeriida zugeordnet. Die Eimeriose kommt bei zahlreichen Tierarten vor und wird stets von wirtsspezifischen Arten verursacht. Insgesamt 21 verschiedene Arten wurden weltweit beim Rind gefunden. In Mitteleuropa kommen davon 13 Arten vor und können anhand der Morphologie der sporulierten Oozysten unterschieden werden (Eckert et al., 2008) (Tab. 5).

Tab. 5: *Eimeria*-Arten des Rindes in Mitteleuropa (modifiziert nach Dauschies und Najdrowski, 2005; Schnieder, 2006; Mengel, 2012)

Art	Oozysten		Form	Wand	Mikropyle
	Länge [µm]	Breite [µm]			
<i>E. bovis</i>	23-34	17-23	eiförmig, asymmetrisch oder subellipsoidal	2-schichtig	+
<i>E. zuernii</i>	15-22	13-18	kugelig, eiförmig oder elliptisch	1-schichtig	-
<i>E. alabamensis</i>	13-24	11-16	ei- oder birnenförmig, manchmal asymmetrisch	dick	-
<i>E. auburnensis</i>	32-46	20-25	länglich eiförmig, manchmal ellipsoid oder zugespitzt	2-schichtig	+
<i>E. ellipsoidalis</i>	20-26	13-17	ellipsoid, leicht eiförmig oder zylindrisch	dünn	+
<i>E. wyomingensis</i>	37-45	26-31	ei- oder birnenförmig	1-schichtig	+
<i>E. brasiliensis</i>	34-43	24-30	ellipsoid	2-schichtig, rau	+
<i>E. bukidnonensis</i>	47-50	33-38	birnenförmig	2-schichtig, rau, radiär gestreift	+
<i>E. canadensis</i>	28-37	20-27	eiförmig oder ellipsoid	2-schichtig	+
<i>E. cylindrica</i>	16-27	12-15	länglich ellipsoid oder subzylindrisch	1-schichtig, dünn	-
<i>E. illinoisensis</i>	24-29	19-22	ellipsoid oder eiförmig	1-schichtig, glatt	-
<i>E. pellita</i>	36-41	26-30	eiförmig	dick, rau	+
<i>E. subspherica</i>	9-14	8-13	rund oder kugelig (subspherical)	1-schichtig	-

3.2. Biologie

Der Lebenszyklus von Eimerien ist homoxen und besteht aus einer endogenen und einer exogenen Phase, die geschlechtliche und ungeschlechtliche Entwicklungsphasen (Merogonie, Gamogonie, Sporogonie) beinhalten. Die Infektion erfolgt durch die perorale Aufnahme sporulierter Oozysten, wobei der Übertragungsweg i.d.R. fäkal-oral ist. In den Epithelzellen des Darms finden 2 Zyklen der Merogonie und die Gamogonie statt, wobei die Hauptlokalisation der Entwicklungsstadien in Dünn- und Dickdarm je nach Art verschieden ist. Nach einer artspezifischen Präpatenz von 1-3 Wochen werden die unsporulierten Oozysten freigesetzt und sporulieren unter Einfluss des Sauerstoffs in der Luft innerhalb weniger Tage. Es entstehen die infektiösen Oozysten, die 4 Sporozysten mit je 2 Sporozoiten beinhalten und bei entsprechenden Bedingungen über Monate infektiös bleiben. Da die Zahl der Merogonien artspezifisch begrenzt ist, handelt es sich bei der Eimeriose um eine selbstlimitierende Krankheit mit einer Patenz von wenigen Tagen bis zu 2 Wochen, sofern es nicht zu einer Reinfektion kommt (Daugshies und Najdrowski, 2005; Eckert et al., 2008).

3.3. Pathogenese und Klinik

E. bovis und *E. zuernii* sind hochpathogen, *E. alabamensis* und *E. auburnensis* mittelgradig pathogen und die übrigen Arten werden als kaum pathogen bis apathogen eingestuft. Während die Auswirkungen der Meronten I von *E. bovis* und *E. zuernii* auf die Endothelzellen bzw. Lamina propria des Ileums, ihrer Hauptlokalisation, gering sind, können die Meronten II und die Gamonten durch ihre Entwicklung im Epithel von Zäkum und Kolon beträchtliche Schäden verursachen, wie Epithelverluste und Nekrosen der Mukosa, Erweiterung der Lymph- und Blutgefäße, zelluläre Infiltration und Ödembildung. Folglich kommt es zum Verlust von Flüssigkeit, Mineralstoffen, Proteinen und Blut sowie zur Bildung diphteroider Membranen (Friend und Stockdale, 1980; Eckert et al., 2008).

Eine subklinische Eimeriose oder leichter Durchfall treten bei Infektionen mit weniger pathogenen Arten und bei niedrigem Infektionsdruck von *E. bovis* und *E. zuernii* auf. Bei hohem Infektionsdruck dieser beiden hochpathogenen Arten haben die Kälber starken Durchfall mit Blut, Fibrin und Schleimhautfetzen im Kot. Als weitere Symptome können Fieber, abdominale Schmerzen, Tenesmus, Anämie, Dehydration, Schwäche, Anorexie, Gewichtsverlust und selten ZNS-Störungen auftreten. Außerdem kann es zu Todesfällen kommen (Bürger, 1983; Daugshies und Najdrowski, 2005; Eckert et al., 2008). Eine

Infektion mit *E. alabamensis* tritt bei Weiderindern auf, führt zu einer hochgradigen katarrhalischen Enteritis, in deren Folge die Tiere schaumig-wässrigen Kot ohne Blut ausscheiden und wodurch es nur selten zu Todesfällen kommt (Daugshies und Najdrowski, 2005; Eckert et al., 2008).

3.4. Diagnostik

Neben Anamnese und Symptomatik wird die Diagnose durch den Direktnachweis von Oozysten aus dem Kot gestellt. Dies ist mittels Flotationsverfahren, Nativ-Ausstrich und MIFC-Methode möglich (Methoden Mk 1.01, 1.06 und 2.02 aus dem Qualitätsmanagement-Methodenhandbuch, 2012). Dabei ist auch die morphologische Differenzierung der Oozysten und somit die Artbestimmung der Eimerien möglich (Eckert et al., 2008).

3.5. Epidemiologie

In aktuellen Studien wurden die Prävalenzen und teils auch die vorkommenden Arten von Eimerien-Infektionen bei Rindern untersucht (Tab. d im Anhang). Bei einigen Untersuchungen sind alle oder zumindest fast alle beprobten Betriebe infiziert, was darauf schließen lässt, dass alle Kälber irgendwann einmal mit Eimerien infiziert werden (Bürger, 1983; Daugshies und Najdrowski, 2005). Meist sind die Tiere einem kontinuierlichen, niedrigen Infektionsdruck ausgesetzt, weswegen die Infektion in den meisten Fällen inapparent verläuft und somit nicht mit Durchfall assoziiert ist (Cornelissen et al., 1995; Daugshies und Najdrowski, 2005; Eckert et al., 2008).

In zahlreichen Studien wurde der Einfluss des Alters auf das Auftreten einer Eimeriose untersucht: ein signifikant ansteigendes Risiko einer Eimerien-Infektion wurde von Lentze et al. (1999) bis zu einem Alter von 3 Monaten gefunden. Faber et al. (2002) zeigten bei der wiederholten Untersuchung von Kälbern von Geburt bis zu einem Alter von 63 Tagen eine kontinuierlich ansteigende Eimerien-Prävalenz. In weiteren Studien wurden die höchsten Infektionsraten bei Altersgruppen von 26–30 Tagen (Sanchez et al., 2008), 1-12 Monaten (Stewart et al., 2008) bzw. 3-12 Monaten (Lassen et al., 2009) gefunden. Auch der mögliche Einfluss der Saison auf das Auftreten einer Eimeriose wurde untersucht, wobei verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen kamen: einerseits wurden in Studien aus Deutschland und England höchste Prävalenzen im Spätsommer und Herbst gefunden (Wacker et al., 1999; Stewart et al., 2008), wohingegen Daugshies und Najdrowski (2005)

in ihrer Übersichtsarbeit auf einen Anstieg der Prävalenz im Frühling bei Kälbern, die erstmals auf der Weide sind, hinwiesen. In den Untersuchungen von Kemper und Henze (2009), durchgeführt in Deutschland, blieb die Prävalenz in den untersuchten Zeiträumen (Frühling, Sommer, Herbst) relativ konstant, wobei der niedrigsten Wert im Sommer gefunden wurde.

3.6. Therapie und Kontrolle

Zur Behandlung der Eimeriose bei Kälbern stehen Toltrazuril (15 mg/kg KGW p.o.) und Diclazuril (1 mg/kg KGW p.o.) zur Verfügung, wobei es wichtig ist, pro-/metaphylaktisch immer auch die klinisch gesunden Tiere mit zu behandeln (Eckert et al., 2008). Eine Reduktion von Dauer und Höhe der Oozysten-Ausscheidung, Grad des Durchfalls, Anzahl der Tage und der Tiere mit Durchfall, Anzahl der Tiere mit Oozysten-Ausscheidung sowie ein höheres Körpergewicht im Vergleich zur Placebo-Gruppe konnte beim metaphylaktischen bzw. therapeutischen Einsatz von Toltrazuril bzw. Diclazuril gegen *E. bovis*, *E. zuernii* bzw. *E. alabamensis* gezeigt werden (Epe et al., 2005; Mundt et al., 2005; Dauschies et al., 2007).

Zur Verminderung des Infektionsdrucks sind Hygiene und Weidemanagement unerlässlich (Eckert et al., 2008).

An Impfstoffen gegen die Eimeriose wird gearbeitet (Jolley und Bardsley, 2006).

4. Bakteriologische und virale Durchfallerreger

Die Bearbeitung der nicht-parasitären Erreger, *E. coli*, Rota- und Coronaviren, erfolgte lediglich summarisch, da es sich in der vorliegenden Studie um eine parasitologische Arbeit handelt.

E. coli F5 (K99), Rota- und Coronaviren sind wichtige bakteriologische bzw. virale Durchfallerreger beim Kalb (Tab. e im Anhang).

Bovine enterotoxische *E. coli* F5 (K99) sind wirtsspezifische, gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien und v.a. bei neonatalen Kälbern ein Auslöser der Colidiarrhö, einer sekretorischen Diarrhö bedingt durch hitzestabile Enterotoxine (Selbitz et al., 2011).

Rotaviren sind Doppelstrang-RNA-Viren, die zur Familie der Reoviridae gehören und bei Kälbern bis zu einem Alter von 6 Wochen zu Durchfall, bedingt durch eine Zottenatrophie, in deren Folge sich ein Malabsorptionssyndrom mit Hypersekretion und Osmosestörungen im Darm entwickelt, führen kann (Selbitz et al., 2011).

Coronaviren sind Einzelstrang-RNA-Viren, die zur Familie der Coronaviridae gehören und Durchfallerreger bei Kälbern bis zu einem Alter von 3 Wochen, selten auch bis zu einem Alter von 3 Monaten sind. Durch die Infektion der Epithelzellen der Zotten und Krypten von Ileum, Jejunum und Kolon wird eine malabsorptive Diarrhö ausgelöst (Selbitz et al., 2011).

Zur Prophylaxe gegen diese 3 Pathogene werden Muttertierschutzimpfungen, mit dem Ziel einer Erhöhung der Antikörper im Kolostrum, durchgeführt. Dazu werden meist Kombinationspräparate gegen diese 3 Erreger verwendet (Selbitz et al., 2011).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Probensammlung, -verarbeitung und -lagerung

Tierärzte aus Süddeutschland wurden aufgerufen, Kälberkotproben zusammen mit einem ausgefüllten Untersuchungsantrag an das Diagnostiklabor der Vergleichenden Tropenmedizin und Parasitologie, LMU München, zu schicken (Abb. a + b im Anhang). Dort wurden diese Proben im Rahmen der Routinediagnostik unmittelbar auf *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. und *Eimeria* spp. untersucht.

Um das diagnostische Spektrum möglicher Durchfallerreger zu erweitern und dadurch neben den parasitologischen auch virale und bakterielle Erreger abzuklären, wurde als zusätzlich anforderbare Leistung für die einsendenden Tierärzte eine Untersuchung auf *E. coli*, Rotaviren und Coronaviren angeboten. Diese Untersuchung wurde je nach Probenaufkommen mindestens einmal pro Woche im Diagnostiklabor durchgeführt, wobei die Proben in der Zwischenzeit kühl gelagert wurden.

Giardia-positive Proben, von denen nach den Routineuntersuchungen noch Material vorhanden war, wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt und bei -20° C gelagert. Im Februar 2013 wurden die gesammelten Proben aufgetaut, mit 70%igem Ethanol versetzt und zur „School of Veterinary and Biomedical Sciences“ der Murdoch Universität in Australien geschickt, wo die Genotypisierung durchgeführt wurde.

1.2. Probenauswahl

Für die jeweilige Studie wurden die eingesandten Proben wie folgt ausgewählt:

1.2.1. Verlaufsstudie

In die Verlaufsstudie wurden alle, zwischen 1. Januar und 31. Dezember 2012 eingesandten Proben durchfallerkrankter Kälber mit einbezogen. Dies waren insgesamt 1564 Stück, die auf Giardien, Kryptosporidien und Eimerien untersucht wurden. Das Durchschnittsalter der Kälber betrug 22,4 Tage (Bereich: 1-369 Tage, Median = 11 Tage, n=1423, keine Angabe: 141). 55,5% der untersuchten Tiere waren weiblich, 44,5% männlich (n=1307, keine Angabe: 257). 94,5% der Proben stammten aus Milchviehbetrieben, die restlichen aus Muttertier-, Kälberaufzucht- oder Mastbetrieben (n=1434, keine Angabe: 130). Für die

Betriebe von 88,4% der Proben wurde angegeben, dass Durchfallprobleme im Bestand bestehen (n=1322, keine Angabe: 242).

1282 dieser Proben wurden zusätzlich auf *E. coli*, Rotaviren und Coronaviren getestet.

1.2.2. Genotypisierungsstudie

In die Genotypisierungsstudie wurden alle, zwischen 1. Juni 2011 und 31. Januar 2013 eingesandten, *Giardia*-positiven Proben, von denen nach Durchführung den routinemäßigen Untersuchungen noch genügend Material vorhanden war, mit einbezogen. Diese insgesamt 152 Proben stammten von gesunden und durchfallkranken Kälbern im Alter zwischen 3 und 130 Tagen (Mittelwert: 50,7 Tage, Median: 51 Tage, n=138, keine Angabe: 14).

1.2.3. Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg

Etwa alle 3 Wochen erhält die einsendende Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg zugekaufte Kälber aus Betrieben in Bayern und Baden-Württemberg. Neben den routinemäßigen Quarantäneuntersuchungen wurden auf unseren Aufruf zur Probeneinsendung hin je am Tag nach der Ankunft in der Aufzuchtstation Kotproben gesammelt und ins Diagnostiklabor eingeschickt.

Zwischen April und November 2012 wurden so insgesamt 185 Proben von 30 bis 164 Tage alten männlichen, klinisch gesunden Kälbern (Mittelwert: 59,3 Tage, Median: 57 Tage, n=183, keine Angabe: 2) auf Giardien, Kryptosporidien und Eimerien untersucht.

Zur Abklärung der weiteren Erreger im Bestand wurden 84 dieser Proben zusätzlich auf *E. coli*, Rota- und Coronaviren untersucht. Aus Kostengründen konnte diese Untersuchung nicht bei allen 185 Proben durchgeführt werden.

Um zum Vergleich auch Untersuchungsergebnisse älterer, klinisch gesunder Tiere des Betriebs verfügbar zu haben, wurden im Juni 2013 10 Proben von Tieren zwischen 186 und 355 Tagen und 5 Proben von Tieren zwischen 15 Monaten und 8 Jahren auf Giardien, Kryptosporidien und Eimerien untersucht.

2. **Untersuchungsmethoden**

2.1. **Koproskopische Methoden**

Zum Nachweis von *Cryptosporidium*- und *Eimeria*-Oozysten wurde ein **Karbolfuchsin-gefärbter Direktausstrich** gemacht. Hierfür wurde als erstes der Kot im Probengefäß gut durchmischt, anschließend eine pfefferkorngroße Menge Kot zusammen mit einem Tropfen Karbolfuchsin-Lösung auf einen Objektträger gegeben und mit einem zweiten Objektträger dünn ausgestrichen. Sobald der Ausstrich an der Luft getrocknet war, wurde ein Tropfen Immersionsöl darauf gegeben, ein Deckglas aufgelegt und unter dem Mikroskop bei 200-400-facher Vergrößerung untersucht (Heine, 1982; Methode Mk 2.02 aus dem Qualitätsmanagement-Methodenhandbuch, 2012).

Außerdem wurde die **Merthiolate-Iodine-Formalin-Konzentrations-Methode** (MIFC-Methode) durchgeführt, mit der ein Nachweis von *Giardia*-Zysten, *Cryptosporidium*- und *Eimeria*-Oozysten möglich ist. Dazu wurden 1-2 g Kot (erbsengroße Menge) und 2,35 ml MIF-Lösung in ein Becherglas gegeben, verrührt und mit Hilfe von Sieb (300 µm Maschenweite) und Trichter in ein Zentrifugenröhrchen geseiht. Zum so erhaltenen Filtrat wurden 1,5 ml Diethylether gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, kräftig geschüttelt und anschließend ohne Gummistopfen 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert, wobei sich 4 Schichten bildeten (Abb. 3).

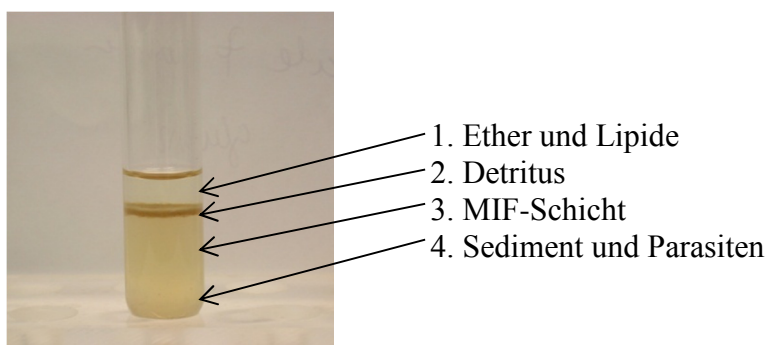


Abb. 3: MIFC-Methode: Trennung der Schichten nach der Zentrifugation

(Quelle: Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, LMU München)

Nachdem der Detrituspfropf, wenn nötig, mit einer Präpariernadel vorsichtig von der Wand gelöst wurde, wurde der Überstand dekantiert, zum übrig gebliebenen Sediment ein Tropfen Lugol'sche Lösung gegeben und durchmischt. 1-2 Tropfen des gefärbten Sediments wurden anschließend auf einen Objektträger überführt und mit Deckglas unter dem Mikroskop bei 200-400-facher Vergrößerung untersucht (Thornton et al., 1983; Methode Mk 1.06 aus dem Qualitätsmanagement-Methodenhandbuch, 2012).

Die Auswertung der Methoden für die Verlaufsstudie erfolgte rein qualitativ. Eine Probe wurde als *Cryptosporidium*- bzw. *Eimeria*-positiv gewertet, wenn sie in einer der beiden Methoden positiv war.

2.2. Untersuchung mittels ELISA

Der **Bio-X Easy-Digest-ELISA** (Bio-X Diagnostics S.P.R.L.) wurde für die Untersuchung auf *E. coli*, Rota- und Coronaviren verwendet, wobei mit diesem 4fach ELISA zusätzlich nochmal ein Nachweis von Kryptosporidien erfolgte. Dieser Antigen-nachweisende Sandwich-ELISA wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt, wobei das abgebildete Pipettierschema (Abb. 4) verwendet wurde. Die Auswertung erfolgte mit dem ELISA-Reader (Deelux Labortechnik) bei 450 nm (Methode Mk 2.3 aus dem Qualitätsmanagement-Methodenhandbuch, 2012).

Konjugat	Reihe/Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>E.coli</i>	A	p	i	x ₂
Rotavirus	B	p	i	x ₂
Coronavirus	C	p	i	x ₂
<i>Cryptosporidium</i>	D	p	i	x ₂
<i>E.coli</i>	E	n	x ₁	x ₃
Rotavirus	F	n	x ₁	x ₃
Coronavirus	G	n	x ₁	x ₃
<i>Cryptosporidium</i>	H	n	x ₁	x ₃

Abb. 4: verwendetes Pipettierschema bei der ELISA-Untersuchung

p: Positivkontrolle, n: Negativkontrolle, i: interne Kontrolle, x₁: Probe Nr. 1, x₂: Probe Nr. 2, x₃: Probe Nr. 3, ...

2.3. Genotypisierung

2.3.1. DNA-Extraktion

Mit dem Maxwell[®] 16 Gewebe DNA Aufreinigungskit (Promega, Madison, USA) und dem Maxwell[®] 16 System (Promega) wurde die DNA aus den in Ethanol konservierten Kotproben extrahiert. Zusätzlich zum vorgegebenen Protokoll wurde 1 µl der finalen Elution mit 4 µl Reinstwasser (Fisher Biotech Perth, Australien) weiter verdünnt. Sowohl unverdünnte als auch verdünnte Templates wurden für die PCR verwendet.

2.3.2. Polymerase Kettenreaktion

Für die Amplifizierung des 18S rRNA Gens und des β -giardin Gens wurde eine Nested PCR durchgeführt und für die Amplifizierung des GDH Gens eine Semಿನested PCR. Einzelheiten dazu sind in Tabelle 6 dargestellt.

2.3.3. DNA-Sequenzierung

Mithilfe des Agencourt AMPure XP Kits mit magnetischen Beads (Beckmann Coulter, Beverly, USA) wurden die PCR-Produkte entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Sequenzierungsreaktionen wurden ebenfalls entsprechend der Herstellerangaben mit dem Big Dye Terminator Version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit den Primern der zweiten PCR-Runde (1 µl [2,5 µM]) unter folgenden Bedingungen sequenziert: 1 Zyklus bei 96° C für 2 min und 25 Zyklen bei 96° C für 10 sek, bei 50° C für 5 sek und bei 60° C für 4 min. Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe einer ABI 3730 48 capillary machine elektrophoretisch aufgetrennt.

2.3.4. Identifizierung der Arten

Die Sequenzen wurden mit dem Sequencer 4.8 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA) analysiert und durch Vergleich mit veröffentlichten Sequenzen (Tab. 7) wurden Arten und Sub-Genotypen identifiziert. Wurden in einer Probe verschiedene Arten oder Sub-Genotypen gefunden, entweder an einem Locus oder an verschiedenen Loci, wurde angenommen, dass diese Probe mehrere Arten oder Sub-Genotypen enthielt.

Tab. 6/1: PCR-Bedingungen und verwendete Primer

Zielgen	Reaktionsnummer	Amplifikationslänge (bp)	Primer	PCR-Bedingungen	Reaktionsvolumen	Reference
18S rRNA	1. Reaktion	292	Vorwärtsprimer: RH11	a	Gesamtvolumen: 25µl 0.15µl Taq-Ti hot start DNA Polymerase ^e 5% Dimethylsulfoxide (DMSO) ^f	Hopkins et al., 1997
			5'-CATCCGGTGCATCCTGCC-3'	96° C, 45 sek		
			Rückwärtsprimer: RH4 5'-AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG-3'	50° C, 30 sek 72° C, 45 sek → 35 Zyklen		
	2. Reaktion	130	Vorwärtsprimer: GiarF 5'-GACGCTCTCCCAAGGAC-3	a	2µl der ersten Amplifikation	Read et al., 2004
			Rückwärtsprimer: GiarR 5'-GACGCTCTCCCAAGGAC-3'	96° C, 45 sek 55° C, 30 sek 72° C, 45 sek → 35 Zyklen		
				b		
β-giardin	1. Reaktion	753	Vorwärtsprimer: G7 5'-GACGCTCTCCCAAGGAC-3'	a	Gesamtvolumen: 25µl 0.15µl Tth Plus DNA Polymerase ^e	Caccio et al., 2002
			Rückwärtsprimer: G759 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'	95° C, 30 sek 50° C, 30 sek 72° C, 60 sek → 40 Zyklen		
				b		
	2. Reaktion	511	Vorwärtsprimer: B-F 5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3'	a	2µl der ersten Amplifikation	Lalle et al., 2005
			Rückwärtsprimer: B-R 5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'	96° C, 45 sek 55° C, 30 sek 72° C, 45 sek → 35 Zyklen		
				b		

Tab. 6/2: PCR-Bedingungen und verwendete Primer

Zielgen	Reaktionsnummer	Amplifikonlänge (bp)	Primer	PCR-Bedingungen	Reaktionsvolumen	Reference
GDH	1. Reaktion	nicht bekannt	Vorwärtsprimer: GDHeF 5'-TCAACGTYAAAYCGYTTCCGT-3'	c 94° C, 30 sek 50° C, 30 sek 72° C, 60 sek → 40 Zyklen b	Gesamtvolumen: 25µl d 0.2µl Tth Plus DNA Polymerase ^e	Read et al., 2004
			Rückwärtsprimer: GDHiR 5'-GTTTRTCCTTGCACATCTCC-3'			
	2. Reaktion	432	Vorwärtsprimer: GDHiF 5'-CAGTACAACACTCYGCTCTCCGG-3'	c 94° C, 30 sek 60° C, 30 sek 72° C, 60 sek → 40 Zyklen b	2µl der ersten Amplifikation	Read et al., 2004
			Rückwärtsprimer: GDHiR 5'-GTTTRTCCTTGCACATCTCC-3'			

a: Initiale Aktivierung: 96°, C 5min

b: Finale Elongation: 72° C, 7 min

c: Initiale Aktivierung: 94° C, 5min

d: Verwendete Substanzen: 2 µl verdünntes DNA Template, 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 2,5µl MgCl₂ (25 mM), 1µl dNTPs (5 mM) (Promega), 1 µl von jedem Primer (10 µM), Reinstwasser (Fisher Biotech Perth, Australien)

e: Fisher Biotech Perth, Australien

f: Sigma–Aldrich St. Louis, Missouri

Tab. 7: GenBank Nummern, verwendet für den Abgleich mit den *Giardia*-Sequenzen

18S rRNA		β -giardin		GDH	
AI	AF199445	A1	X14185	A	DQ100288
AI	M54878	A2	AY545645	A	M84604
AII	AF199446	A2	FN386482	A1	DQ414242
AIII	AF199447	A5	AY545643	A2	L40510
B	U09491	A8	AY545649	B	AY826193
B	U09492	B	AY072728	B3	AF069059
C	AF199449	B	AY647266	B4	AY178750
D	AF199443	C	AY545646	C	U60982
E	AF199448	C	FJ009206	D	U60986
E	DQ157272	D	AY545648	E	AY178741
F	AF199444	E	EU189375	F	AF069057
G	AF199450	E1	AY072729	G	AF069060
		E2	AY545650		
		E3	AY653159		

3. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Microsoft-Excel-2010 Software, PASW Statistics 18 (Predictive Analysis Software – SPSS Inc.) und der Statistik-Software R (R Core Team, 2013), teils in Kooperation mit dem Stablab (Institut für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München), durchgeführt.

Um Unterschiede hinsichtlich des Durchschnittsalters der beprobten Tiere in den verschiedenen Monaten zu untersuchen, wurde sowohl ein t-Test für unabhängige Stichproben als auch eine Varianzanalyse (ANOVA – analysis of variance) durchgeführt.

Für jede der 3 parasitären Infektionen (binäre Antwort: ja/nein) wurde mit dem Statistikprogramm R und dem Paket mgcv ein generalisiertes additives logistisches Regressionsmodell angepasst (Wood, 2006, 2011). Die Modelle versuchen das relative Risiko einer Infektion durch das Alter der Kälber und die Jahreszeit zu erklären. Beide Kovariablen fließen dabei als glatte Funktion in das Modell mit ein, die im Fall des Alters durch einen Thin-Plate Regressionsspline und Quantil-basierte Knoten, im Fall der Jahreszeit durch einen zyklischen penalisierten B-Spline und zwölf äquidistante Knoten modelliert wurde. Da nur wenige Proben von Kälbern > 80 Tagen eingesendet worden waren, wurden diese Modelle nur mit den Ergebnissen der Proben von Kälbern ≤ 80 Tage berechnet. Um die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern und eine Darstellungsweise auf Ebene der Infektionshäufigkeit zu ermöglichen, wurden die geschätzten glatten Kurven nachträglich transformiert. Die sich auf diese Weise ergebenden Grafiken zeigen den multiplikativen Effekt des Alters bzw. der Jahreszeit auf das relative Risiko einer Infektion für gegebenen Wert der jeweils anderen Kovariable.

Für alle Analysen wurde ein P-Wert < 0,01 als signifikant betrachtet.

IV. ERGEBNISSE

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in zwei internationalen Publikationen zusammengefasst.

1: Infektionsraten der verschiedenen enteropathogenen Erreger bei durchfallkranken Kälbern (Verlaufsstudie), sowie der Einfluss des Alters und der Saison auf die Nachweishäufigkeiten von *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. und *Eimeria* spp..

2. Resultate der Genotypisierung (Genotypisierungsstudie) mit einer Einschätzung des zoonotischen Potentials und der Art-spezifischen Pathogenität von Giardien bei Kälbern.

Die zusätzlichen Ergebnisse der Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg werden im Anschluss an die beiden Veröffentlichungen dargestellt.

1. Publikation 1

Giardiosis and other enteropathogenic infections: a study on diarrhoeic calves in Southern Germany

Julia Gillhuber¹, David Rügamer², Kurt Pfister¹ and Miriam C. Scheuerle¹

BMC Research Notes 2014 7:112

Received: 1st November 2013

Accepted: 18th February 2014

Published: 26th February 2014

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine,
Ludwig-Maximilians-Universität München, Leopoldstr. 5, 80802 Munich, Germany

²Statistical Consulting Unit, Department of Statistics, Ludwig-Maximilians-Universität
München, Akademiestr. 1, 80799 Munich, Germany

Corresponding author:

Julia Gillhuber

Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität,
Leopoldstr. 5, 80802 Munich, Germany

julia.gillhuber@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

Telephone 0049 (0)89 2180 – 3622

Fax 0049 (0)89 2180 -3623

Abstract

Background

Diarrhoea induces massive problems in the rearing of calves. The aim of the study was to obtain current data about the frequency of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. in diarrhoeic calves in Southern Germany with the particular focus on giardiasis.

Results

1564 samples were analysed for the three pathogens using microscopical methods. *Giardia* spp. was detectable in 112/1564 samples (7.2%). The mean age was 46.5 days and the odds of being infected with *Giardia* spp. increased slowly up to 8 times from about 12 days to 30 days of age. There appeared to be no seasonal influence on the frequency of *Giardia* spp. A mono-infection with *Giardia* spp. was diagnosed in 46 calves (2.9%) whereas 15 calves (1.0%) had a mixed-infection with *Cryptosporidium* spp. and 51 calves (3.3%) with *Eimeria* spp. *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. could be detected in 646/1564 samples (41.3%) and 208/1564 samples (13.3%), respectively, with a mean age of 11.3 and 55.0 days, respectively. The odds of being infected with *Cryptosporidium* spp. increased up to 4.5 times until an age of 10 days. After that the odds decreased continuously and was approaching zero at about 30 days. The odds of being infected with *Eimeria* spp. increased continuously up to 30 times from about 20 days to 60 days of age. There appeared to be no significant seasonal influence on the frequency of *Cryptosporidium* spp.; but there was one for *Eimeria* spp.: the odds of being infected with *Eimeria* spp. in March and April decreased by about half and increased up to 2.3 times between July and September.

Additionally, as requested by the veterinarians, 1282 of those samples were analysed for *E. coli*, Rota-, Coronavirus and *Cryptosporidium* spp. using an ELISA. Obtained frequencies for these pathogens were 0.9%, 37.8%, 3.4% and 45.3% with a mean age of 24.8 days, 12.1 days, 9.0 days and 12.1 days, respectively.

Conclusions

The results indicate that in Southern Germany in addition to *Eimeria* spp., *Giardia* spp. seems to play a contributing role in diarrhoea in older calves, whereas *Cryptosporidium* spp. and Rotavirus are mostly relevant in young calves.

Keywords: *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *E. coli*, Rotavirus, Coronaviurs, Calf, Diarrhoea, Epidemiology, Prevalence

Background

Diarrhoea induces massive problems in the rearing of calves and is often caused by viral, bacterial and parasitic pathogens.

Giardia spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. are the most important protozoan parasites causing gastrointestinal problems including diarrhoea in calves.

Giardia spp. is commonly found in cattle [1] and although this infection is often subclinical or even asymptomatic, it should be considered as a differential diagnosis in younger calves with acute or chronic diarrhoea, reduced weight gain and ill thrift [1,2]. In this article the taxonomy according to Monis et al. [3] is used. In order to eliminate a taxonomic uncertainty it classifies the Assemblages A-G of the *Giardia duodenalis* morphological group, the causative agents of giardiasis in humans and mammals, as separate species. According to this, there are eleven species within the genus *Giardia*, which can either be distinguished morphologically or genetically. Three of them, the zoonotic species *G. duodenalis* (Assemblages A) and *G. enterica* (Assemblage B) and the livestock-specific species *G. bovis* (Assemblage E) can infect cattle. They are morphologically indistinguishable. *G. duodenalis* and *G. enterica* are also able to infect humans [4] and are therefore of public health significance [5].

Cryptosporidiosis, one of the most important aetiologies of acute diarrhoea, especially in young calves [6], is caused by the intracellular protozoan parasite *Cryptosporidium* spp. Symptoms of this infection can include dehydration, fever, anorexia, weight loss, weakness and progressive loss of condition [7]. Many of the different species and genotypes of the genus *Cryptosporidium*, partly with zoonotic potential, are morphologically indistinguishable [8-10]. One of them is *C. parvum*, a zoonotic genotype often found in young calves and also able to infect humans, hence making the former a source of infection for humans and Cryptosporidiosis a public health issue [2,11]. *C. bovis*, which has the same morphology as *C. parvum*, and *C. andersoni* and *C. ryanae*, which are of another morphological appearance [8,12] are also common causes of infections in cattle [13] but generally they are found in older calves [14-16].

In contrast to these two protozoans with zoonotic potential, *Eimeria* spp. are strictly host specific [17,18]. *E. bovis* and *E. zuernii*, commonly found in calves, are highly pathogenic and often associated with diarrhea with faeces containing blood, fibrin and intestinal tissue [17,19].

Several studies investigating the impact of the season on a protozoan's prevalence, had contrasting results with some finding an influence and others not [17,20,21].

Escherichia coli F5, Rotavirus and Coronavirus are other important enteropathogens associated with diarrhea in calves. These three together with *Cryptosporidium* spp. are known to occur in the majority of intestinal infections in calves younger than one month [22].

Differentiation between these viral, bacterial and parasitic agents is only possible by a diagnostic test but not by clinical examination [23]. Since testing under field conditions is not always possible in cases of calf diarrhea for financial and logistic reasons, it is important for practitioners to know the frequency of the various pathogens in a certain area, the more so as there are no recent data available for Southern Germany.

It is important to emphasize, that management, geographical and climatological parameters and differences in study design, such as the number and age of animals included in the study and the used detection methods can influence the obtained prevalences of pathogens, e.g. *Giardia* spp. [1]. For *Cryptosporidium* spp. it has been shown in a study conducted over 6 years that the prevalences varied markedly between the different years and seasons, although the study design did not change [24]. So when studies differ in one or more of the factors mentioned, the results may vary accordingly.

Thus, the aim of the study was to update the current knowledge of enteropathogenic protozoa in Southern Germany with the focus on the role of *Giardia* spp. as a cause of diarrhoea in calves compared to the other neonatal and post-neonatal pathogens.

Methods

Sample collection

Large animal veterinarians in Southern Germany were asked to collect faecal samples from ill patients (diarrhoeic calves; age: < one year) and to send them to our laboratory together with a completed questionnaire. All samples were immediately processed after arrival in the laboratory. Subsequently, the results were sent to the veterinarians and the animals were treated if necessary. Thus, an ethical approval was not necessary, as the samples were gained from patients in order to make a diagnosis.

Sample analysis

All samples were analysed for *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. using microscopic methods at 200-400x magnifications.

For the detection of *Cryptosporidium* spp. a direct faecal smear of each sample was carbol-fuchsin-stained [25], which also allowed to detect *Eimeria*-oocysts. A *Giardia*-

infection was diagnosed by using merthiolate iodine formaldehyde concentration (MIFC) method with the addition of Lugol's solution [26]. Using the MIFC-method also *Cryptosporidium*- and *Eimeria*-oocysts were detectable.

On request of the veterinarians the majority of the samples (1282/1564) were also analysed for *E. coli*, Rota-, Coronavirus and *Cryptosporidium* spp. using the Bio-X Easy-Digest-ELISA (Bio-X Diagnostics S.P.R.L.) in order to increase the diagnostic spectrum of pathogens. This commercial ELISA kit was performed according to the manufacturer's instructions.

As all samples were processed within the scope of the routine diagnostic in our Quality management certified laboratory, they were initially only analysed by the methods, routinely used there. In order to obtain current data about the frequency of the different *Giardia* species in calves in Southern Germany most of the *Giardia*-positive samples of the present study were genotyped within the scope of another investigation along with further *Giardia*-positive samples of diarrhoeic and healthy calves [27]. Further investigations like quantifying the number of cysts and oocysts, respectively, differentiating *Eimeria*-oocysts and genotyping *Cryptosporidium* spp. by PCR were not performed because of logistic, personnel and financial reasons.

Statistical analysis

Statistical analysis was run using Microsoft-Excel-2010 software, PASW Statistics 18 (Predictive Analysis Soft-Ware – SPSS Inc.) and R [28].

The t-test for independent samples and an ANOVA (analysis of variance) were performed to investigate the differences in the mean age of the sampled animals in the single months.

For each disease (binary response: yes/no) a generalized additive logistic model was fitted using the statistical program R and the package mgcv [29,30]. The models try to explain the relative risk of infection depending on the age of the calves and the time of the year. Therefore the age of the calves is fitted by using thin plate regression splines with quantile-based knots and the time of the year by using cyclic penalized B-splines [31] and twelve equidistant knots for each month. Because of limited samples of calves > 80 days these models were calculated just using the dates of calves ≤ 80 days. For easier interpretation and visualization on the proportion-scale of infection the smooth curves were transformed. The obtained figures show the multiplicative effect of age respectively the season on the relative risk of infection for a given value of the other covariate.

For all analysis, a P-value of < 0.01 was considered to be significant.

Results

Samples

From January 1st – December 31st 2012 1564 faecal samples from calves (1–369 days old) were processed. The mean age of the sampled calves was 22.4 days (median = 11 d, n = 1423). The result of the ANOVA shows, that there was a significant difference in the mean age of the sampled animals, sent in in the single months. Furthermore the boxplots, presenting the age composition in the single months, and the results of the t-test show in detail, in which months the calves were on average (significantly) younger or older compared with the remaining months (Figure 1).

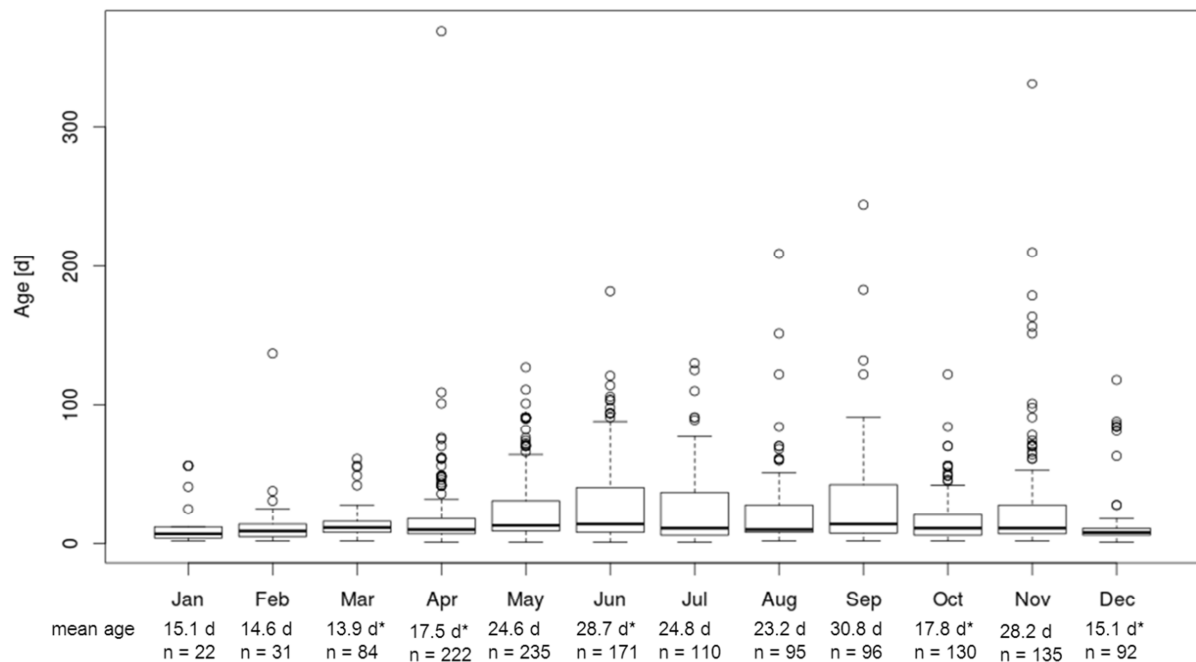


Figure 1: Age composition and mean age of the sampled animals in the single months (n = 1423).

A significant difference of the mean age of one month in relation to the mean age of the other eleven months (calculated with a t-test for independent samples) is marked with *.

Results of the direct detection methods

In 896/1564 examined samples (57.3%) at least one parasite was detectable by microscopical methods.

Giardia-cysts were detected in 112/1564 examined samples (7.2%). The *Giardia*-positive calves were between 3 and 130 days old (mean = 46.5 d, median = 42 d, n = 101) with the highest rate of cyst excretion (28.4%) in 61–90 days old animals (Figure 2). It is significant, that the age had a nonlinear influence on the probability of being infected with *Giardia* spp. and the odds of being infected with *Giardia* spp. increased slowly up to 8 times from about 12 days to 30 days (Figure 3). There was no seasonal influence on the odds of being infected with *Giardia* spp. (Figure 4). A mono-infection with *Giardia* spp. was diagnosed in 46 calves (2.9%) whereas a mixed-infection was found in 15 samples (1.0%) for *Cryptosporidium* spp. and in 51 samples (3.3%) for *Eimeria* spp. (Table 1).

Cryptosporidium-oocysts were detected in 646/1564 examined samples (41.3%). They had the size and morphology of *C. parvum*. The *Cryptosporidium*-positive calves were between 2 and 77 days old (mean = 11.3 d, median = 10 d, n = 580) with the highest rate of oocysts excretion (66.7%) in 8–14 days old calves (Figure 2). It is significant, that the age had a nonlinear influence on the probability of being infected with *Cryptosporidium* spp. and the odds of being infected with *Cryptosporidium* spp. increased up to 4.5 times until an age of 10 days. After that the odds decreased continuously and was approaching zero at about 30 days (Figure 3). There was no significant seasonal influence on the frequency of *Cryptosporidium* spp. (Figure 4).

Eimeria-oocysts were detected in 208/1564 examined samples (13.3%). The *Eimeria*-positive calves were between 5 and 331 days old (mean = 55.0 d, median = 49 d, n = 192) with the highest rate of oocysts excretion (52.6%) in 61–90 days old calves (Figure 2). It is significant, that the age had a nonlinear influence on the probability of being infected with *Eimeria* spp. and the odds of being infected with *Eimeria* spp. increased continuously up to 30 times from about 20 days to 60 days (Figure 3). There was a significant seasonal influence on the frequency of *Eimeria* spp. (Figure 4): the odds of being infected with *Eimeria* spp. in March and April decreased by about half and increased up to 2.3 times between July and September.

The distribution of mono- and mixed-infections is presented in Table 1.

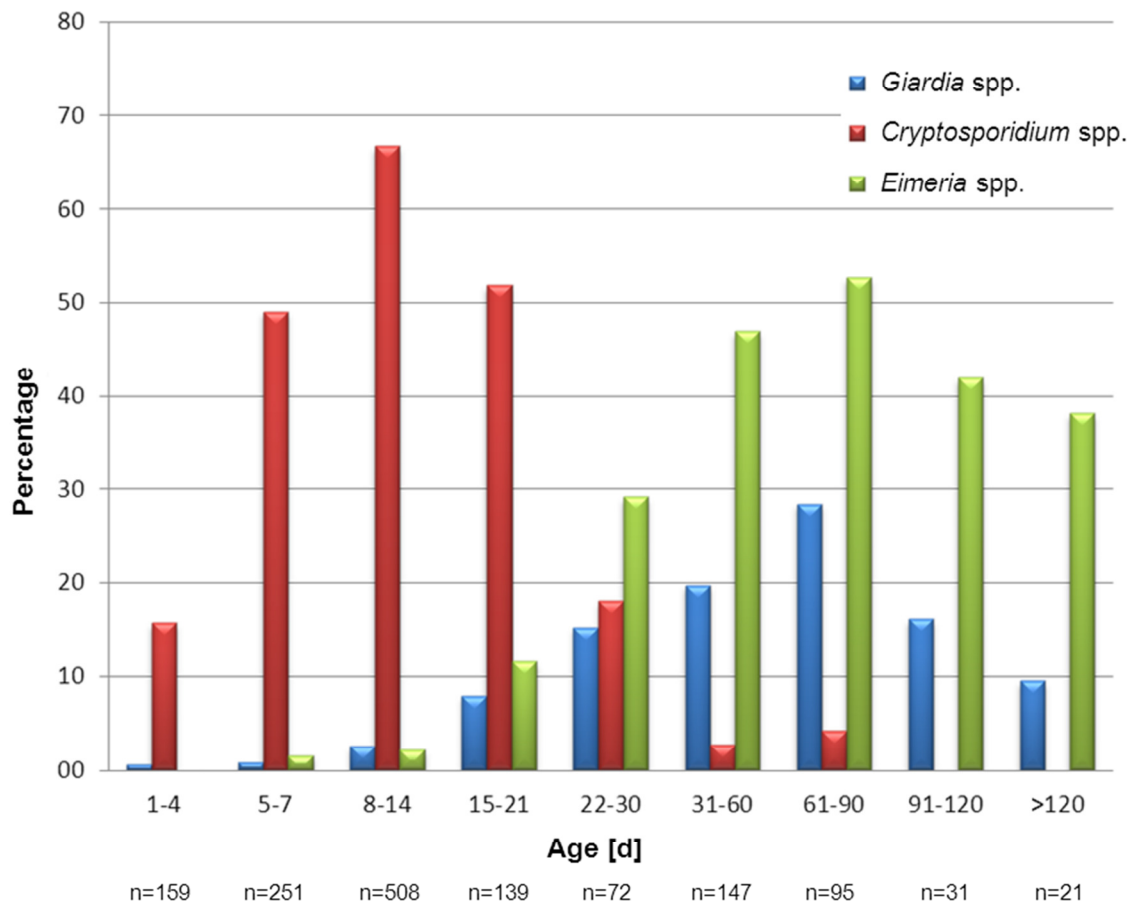


Figure 2: Age dependent frequencies of cyst/oocysts from *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. (n = 1423).

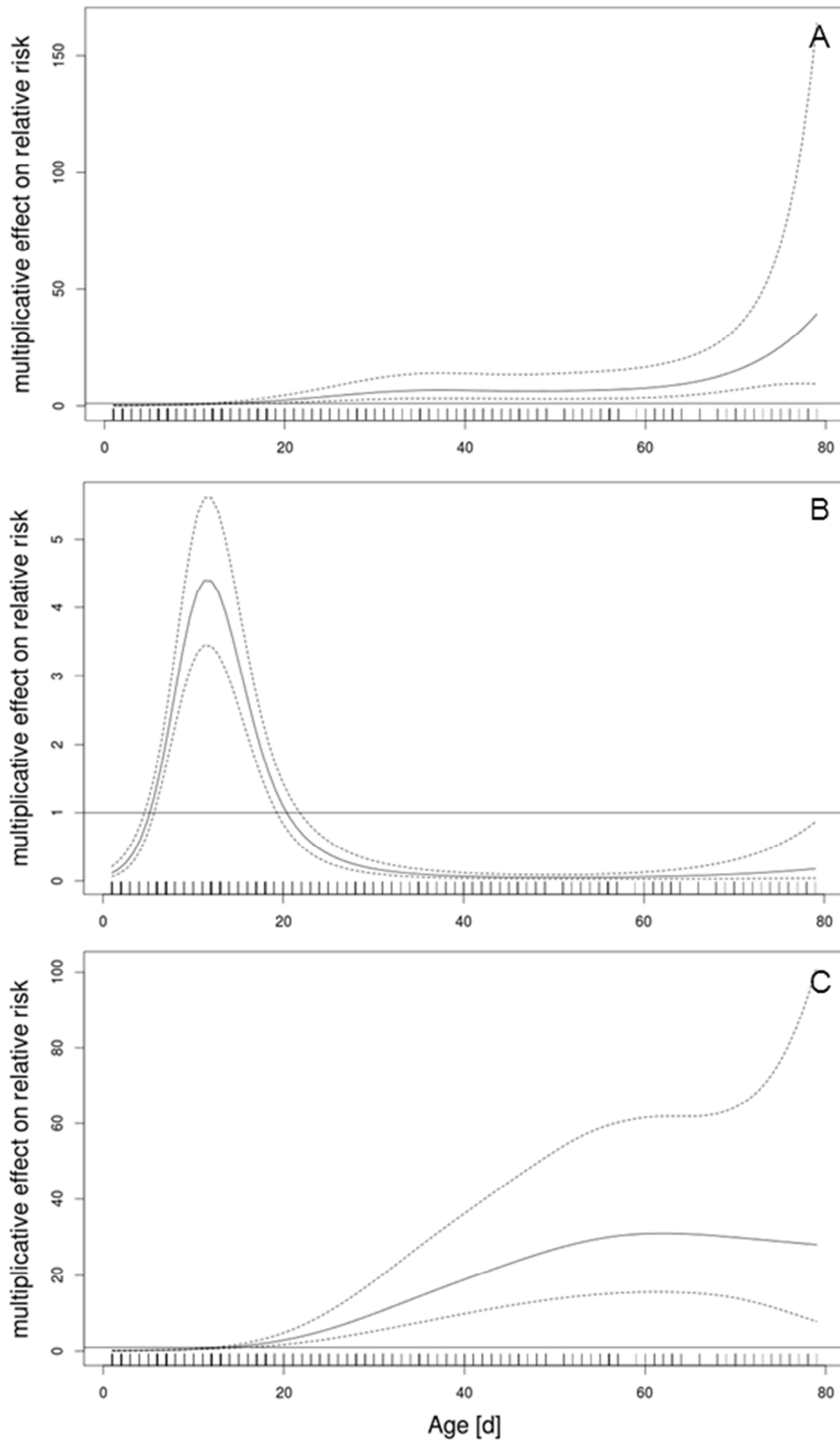


Figure 3: Odds of infection at different age (n = 1350).

Straight line: level with no influence; ---: 99% confidence interval.

A: *Giardia* spp.; B: *Cryptosporidium* spp.; C: *Eimeria* spp.

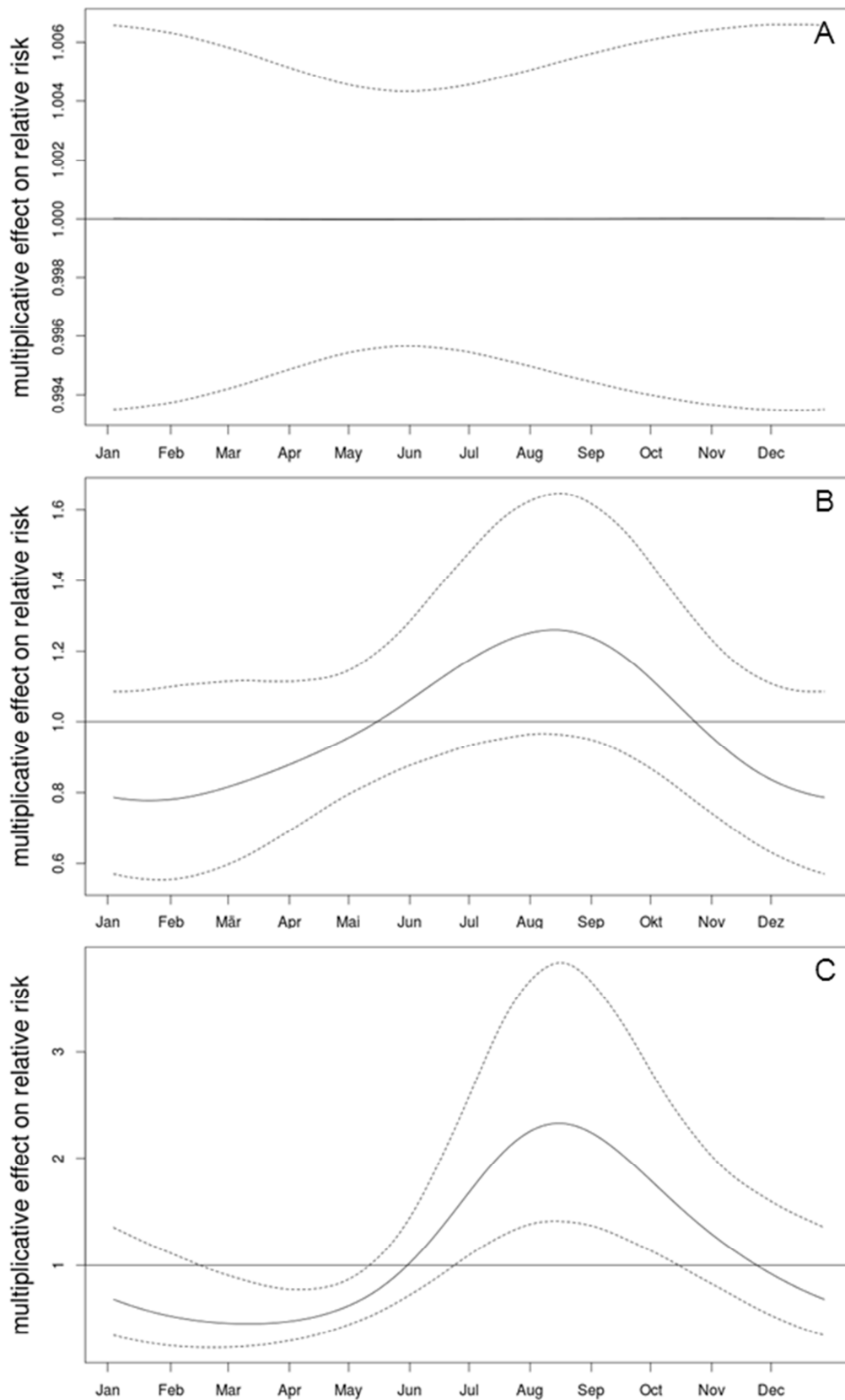


Figure 4: Odds of infection in the different months (n = 1350).

Straight line: level with no influence; ---: 99% confidence interval.

A: *Giardia* spp.; B: *Cryptosporidium* spp.; C: *Eimeria* spp.

Table 1: Number and percentage of calves with a mono-/mixed-infection with *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp.

Parasite(s) detected	Calves (n=1564)	
	Number	%
<i>Giardia</i> spp. only	46	2.94
<i>Cryptosporidium</i> spp. only	627	40.09
<i>Eimeria</i> spp. only	153	9.78
<i>Giardia</i> spp. + <i>Eimeria</i> spp.	51	3.26
<i>Giardia</i> spp. + <i>Cryptosporidium</i> spp.	15	0.96
<i>Cryptosporidium</i> spp. + <i>Eimeria</i> spp.	4	0.26
None	668	42.71

(Results of the microscopic examination)

Results of the ELISA

E. coli was detected in 12 (0.9%), Rotavirus in 485 (37.8%), Coronavirus in 43 (3.4%) and *Cryptosporidium* spp. in 581 (45.3%) faecal samples of the part analysed using ELISA (n = 1282). The mean age of the positive tested calves was 24.8 days (n = 12), 12.1 days (n = 443), 9.0 days (n = 39) and 12.1 days (n = 532), respectively. In 612/1282 samples only one pathogen was found (47.7%). Two and three pathogens were found in 250/1282 (19.5%) and 3/1282 (0.2%) calves respectively (Table 2).

In the 1282 samples, examined with the microscope and the ELISA, 522 were positive for *Cryptosporidium* spp. in both methods, 59 only in the ELISA and 29 only in the microscopical examination. Thus, of the 610/1282 samples positive for *Cryptosporidium* spp. in the ELISA or the microscopical examination, 95.3% (581/610) could be detected by the ELISA and 90.3% (551/610) by the microscopical examination.

Table 2: Number and percentage of calves with a mono-/mixed-infection with *E. coli*, Rota-, Coronavirus and *Cryptosporidium* spp.

Enteropathogen(s) detected	Calves (n=1282)	
	Number	%
<i>E. coli</i> only	9	0.70
Rotavirus only	245	19.11
Coronavirus only	11	0.86
<i>Cryptosporidium</i> spp. only	347	27.07
<i>E. coli</i> + Rotavirus	1	0.08
<i>E. coli</i> + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0.08
Rotavirus + Coronavirus	18	1.40
Rotavirus + <i>Cryptosporidium</i> spp.	218	17.00
Coronavirus + <i>Cryptosporidium</i> spp.	12	0.94
<i>E. coli</i> + Rotavirus + <i>Cryptosporidium</i> spp.	1	0.08
Rotavirus + Coronavirus + <i>Cryptosporidium</i> spp.	2	0.16
None	417	32.53

(Results of ELISA-screening)

Discussion

The study reveals that *Cryptosporidium* spp. and Rotavirus are the most prevalent pathogens in diarrhoeic calves up to one year old in Southern Germany, followed by *Eimeria* spp. and *Giardia* spp. Coronavirus and *E. coli* were diagnosed comparatively infrequently.

The detection rate of 7.2% of *Giardia* spp. is much lower compared to the obtained prevalences in many former studies; although prevalences of this pathogen in general are differing markedly as shown previously [1,20,32]. In a recent European study using a commercially available monoclonal antibody-based ELISA, 51.2% of 2–16 weeks old calves in the area of Berlin/Germany were infected with *Giardia* spp. [33]. In the present study the highest detection rate of *Giardia* spp. was in calves between 61 and 90 days of age with 28.4%. This is in line with other studies, which also revealed highest prevalence in about 3 months old calves [20,34]. By contrast other authors reported highest prevalence in 4–7 and 4 week old calves, respectively [35,36], whereas in Huetink et al. [37] it was highest in 4–5 month old animals. An impact of season on the probability of a giardiasis could not be shown. As discussed by Hammes et al. [20], there are studies, showing seasonal variations in the prevalence of *Giardia* spp., and also other studies, not having found a seasonal impact on the prevalence. The role of giardiasis as a cause of diarrhoea in ruminants is still unclear [8,13]. In former studies *Giardia* spp. is thought to be the reason for diarrhoea and ill thrift in calves [38,39] whereas in others no association between diarrhoea and *Giardia*-infection could be demonstrated [37,40,41]. Giardiasis in ruminants

is often asymptomatic. It is unclear, when clinical symptoms appear [8], as this is influenced by many factors like species/breed of host, species of *Giardia*, age, immune competence, frequency of infection, nutrition and concurrent infections [4]. However, also the role of an asymptomatic infection as a cause of production loss in calves is not yet appropriately investigated. Olson et al. [42] showed an association between a *Giardia*-infection and a reduced rate of weight gain, an impaired feed efficiency and a decreased carcass weight in experimentally infected lambs. On the contrary no significant difference in the average weight gain, the feed efficiency and the dry matter intake between *Giardia* spp. infected and non-infected steers could be found by Ralston et al. [43]. The present results indicate that *Giardia* spp., being the only pathogen found in some samples, may contribute to diarrhoea in older calves. In a former study, having examined 20 calves regularly from birth until 4 month of age, an association of giardiasis with diarrhoea was shown, since in a few cases no additional pathogen could be found at the time of a diarrhoea episode [38]. However, these calves had also been diagnosed *Cryptosporidium*-positive at some time during the study, with having found *Cryptosporidium*-oocysts on average earlier than *Giardia*-cysts. So it is possible that a former infection, in this case with *Cryptosporidium* spp., may favour the pathogenic potential of *Giardia* spp. Hence, further investigations are necessary with regard to *Giardia* spp. as cause of diarrhoea in calves and to production loss in asymptomatic calves [8]. In order to obtain current data about the frequency of the different *Giardia*-species in calves in Southern Germany and to evaluate a species-specific pathogenicity, a further study was undertaken, including among others most of the *Giardia*-positive samples of the present study [27]: *G. bovis* has been identified in 91.8%, *G. duodenalis* in 7.3% and a mixed template of *G. duodenalis* and *G. bovis* in 0.9% of the PCR-positive samples. This showed that although the livestock-specific species *G. bovis* has been diagnosed most frequently, the potential zoonotic species *G. duodenalis* is also present in calves in Southern Germany and thus might be a risk for animal handlers. Regarding a species-specific pathogenicity the results indicated that the livestock-specific species *G. bovis* might contribute to diarrhea in calves, as it was the only pathogen found in a proportion of the samples from diarrhoeic calves, whereas *G. duodenalis* was only found in mixed infections with *Cryptosporidium* spp. or *Eimeria* spp.

The highest detection rate was found for *Cryptosporidium* spp. regardless of the examination method. Because of the low age of nearly all calves with a *Cryptosporidium*-infection in this study it is assumed, that almost all of them were infected with *C. parvum*, the species most often found in young calves, although *C. bovis* cannot be completely excluded. In previous studies in Germany the frequencies for *C. parvum* varied between 21.5% and 44.0% and

were thus lower than in the present study [44,45]. As reviewed by Hammes et al. [20] the prevalence of *Cryptosporidium* spp. in studies around the world varies from 6.2 to close to 100%. The age related frequencies in the present study, with the highest detection rate (66.7%) in calves between 8 and 14 days coincide with the results of former studies [14,46]. Not finding a seasonal influence on the risk of being infected with *Cryptosporidium* spp. is in line with the results of some former studies, whereas others have found such an influence [discussed by 20].

Eimeria-oocysts were detected in 13.3% of the samples. Compared with other studies in Germany and Austria with prevalences of 59.4% and 83.7%, respectively, this frequency is quite low [19,47]. In these two studies *E. bovis* and *E. zuernii* were the most frequent species found. As the species-differentiation was not performed in this study, we can only assume, that the majority of the *Eimeria*-oocysts of the diarrhoeic animals here probably also belong to these two high pathogenic species [17,19]. In this study the age dependent frequency was highest in calves between 61–90 days of age. This is similar to the results of Lentze et al. [48], who found a significantly increasing risk of an *Eimeria*-infection until 3 months of age. In another investigation the highest prevalence was in animals between 3 and 12 months [49]. An association between season and frequency of *Eimeria* spp. was found in this study, with the highest odds of an Eimeriosis between July and September and the lowest between March and April. These results are similar to that of another study [21], whereas Dauschies and Najdrowski [17] indicated an increase in spring in pastured calves in their first grazing season.

Rotavirus is the second most common pathogen detected in this study and a mixed infection with *Cryptosporidium* spp. was found to be in about half of the Rotavirus-positive samples. Also in former studies these two pathogens were the infectious agents, most often found in diarrhoeic young calves [50-52]. Bartels et al. [53] found a high rate of mixed infections of *Cryptosporidium* and Rotavirus in his study on young Dutch dairy calves. The investigation of different risk factors showed that one risk factor for *C. parvum* was the presence of one or more calves of the same age shedding Rotavirus. In that study the prevalence of both parasites was highest in 2-week old calves. In the study of Uhde et al. [52] Rotavirus was the infectious agent that was most often found in diarrhoeic calves, either alone or in mixed-infections with mostly *Cryptosporidium*. As discussed there, much indicates that Rotavirus is a primary pathogen causing diarrhoea in neonatal calves. That is why Rotavirus is thought to have a predominant role in the pathogenesis of neonatal calf diarrhoea in that study [52]. Which pathogen of the two most frequent – *Cryptosporidium* spp. or Rotavirus – has the predominant role in the present study remains unclear. In contrary to the high detection rates

of Rotavirus and *Cryptosporidium* spp. low ones were found for *E. coli* and Coronavirus, what goes in line with the results of other European studies [51-53].

Conclusions

This study shows that, in addition to *Eimeria* spp., *Giardia* spp. seems to play a contributing role of notable importance in diarrhoea in older calves, whereas *Cryptosporidium* spp. and Rotavirus are mostly relevant in young calves in Southern Germany.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JG carried out the examination by microscope and ELISA, analysed and interpreted the data and drafted the manuscript, DR performed the statistical analysis, KP and MS conceived of the study, participated in its design and conception and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the veterinarians, the Bayerische Tierseuchenkasse and our colleagues in the lab, especially Elisabeth Kiess, Kathrin Simon and Tim Tiedemann for their respective contributions to the study.

References

1. Geurden T, Vercruyssen J, Claerebout E: Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp Parasitol* 2010, 124:98–106.
2. Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RC: Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol* 2004, 20:185–191.
3. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC: Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 2009, 25:93–100.
4. Thompson RC, Monis P: *Giardia*-from genome to proteome. In *Advances in Parasitology*. Volume 78. Edited by Rollinson D, Hay SI. London: Elsevier; 2012:57–95.

5. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM: Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 2005, 35:207–213.
6. de Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE: A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol* 1999, 29:1269–1287.
7. O'Donoghue PJ: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol* 1995, 25:139–195.
8. Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R: The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J* 2008, 177:18–25.
9. Fall A, Thompson RC, Hobbs RP, Morgan-Ryan U: Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *J Parasitol* 2003, 89:399–402.
10. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ: *Cryptosporidium* Taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev* 2004, 17:72–97.
11. Stantic-Pavlinic M, Xiao L, Glaberman S, Lal AA, Orazen T, Rataj-Verglez A, Logar J, Berce I: Cryptosporidiosis associated with animal contacts. *Wien Klin Wochenschr* 2003, 115:125–127.
12. Fayer R, Santin M, Trout JM: *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol* 2008, 156:191–198.
13. O'Handley RM, Olson ME: Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2006, 22:623–643.
14. Santin M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R: Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol* 2004, 122:103–117.
15. Fayer R, Santin M, Xiao L: *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J Parasitol* 2005, 91:624–629.
16. Lendner M, Etzold M, Dauschies A: Kryptosporidiose - ein Update. *Berl Muench Tieraerztl Wochenschr* 2011, 124:473–484.
17. Dauschies A, Najdrowski M: Eimeriosis in cattle: current understanding. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005, 52:417–427.
18. Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke Verlag; 2008.
19. Bangoura B, Mundt HC, Schmäschke R, Westphal B, Dauschies A: Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *Parasitol Res* 2012, 110:875–881.

20. Hamnes IS, Gjerde B, Robertson L: Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet Parasitol* 2006, 140:204–216.
21. Stewart ID, Smith RP, Ellis-Iversen J: *Eimeria* species in cattle on farms in England and Wales. *Vet Rec* 2008, 162:482–483.
22. Tzipori S: The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 1985, 29:103–206.
23. Nussbaum DJ, Salord JR, Rimmel DD: Evaluation of quantitative latex agglutination for detection of *Cryptosporidium parvum*, *E. coli* K99, and rotavirus in calf feces. *J Vet Diagn Invest* 1999, 11:31431–31438.
24. Sturdee AP, Bodley-Tickell AT, Archer A, Chalmers RM: Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet Parasitol* 2003, 116:97–113.
25. Heine J: Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zentralbl Veterinaarmed Reihe B* 1982, 29:324–327.
26. Thornton SA, West AH, DuPont HL, Pickering LK: Comparison of methods for identification of *Giardia lamblia*. *Am J Clin Pathol* 1983, 80:858–860.
27. Gillhuber J, Pallant L, Ash A, Thompson RC, Pfister K, Scheuerle MC: Molecular identification of zoonotic and livestock-specific *Giardia*-species in faecal samples of calves in Southern Germany. *Parasit Vectors* 2013, 6:346.
28. R Core Team: R: a language and environment for statistical computing. 2013. <http://www.R-project.org/>.
29. Wood SN: *Generalized Additive Models: an introduction with R*. Boca Raton: Chapman and Hall/CRC; 2006.
30. Wood SN: Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *J Roy Statist Soc Ser B* 2011, 73:3–36.
31. Eilers PHC, Marx BD: Flexible Smoothing with B-splines and Penalties. *Stat Sci* 1996, 11:89–121.
32. Xiao L: *Giardia* infection in farm animals. *Parasitol Today* 1994, 10:436–438.
33. Geurden T, Vanderstichel R, Pohle H, Ehsan A, von Samson-Himmelstjerna G, Morgan ER, Camuset P, Capelli G, Vercruyse J, Claerebout E: A multicenter prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Vet Parasitol* 2012, 190:383–390.
34. Trout JM, Santin M, Greiner E, Fayer R: Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Vet Parasitol* 2005, 130:177–183.

35. Becher KA, Robertson ID, Fraser DM, Palmer DG, Thompson RC: Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet Parasitol* 2004, 123:1–9.
36. Jäger M, Gauly M, Bauer C, Failing K, Erhardt G, Zahner H: Endoparasites in calves of beef cattle herds: management systems dependent and genetic influences. *Vet Parasitol* 2005, 131:173–191.
37. Huetink RE, van der Giessen JW, Noordhuizen JP, Ploeger HW: Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol* 2001, 102:53–67.
38. O’Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME: Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 1999, 214:391–396.
39. Xiao L, Herd RP, Rings DM: Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. *Vet Parasitol* 1993, 51:41–48.
40. Bjorkman C, Svensson C, Christensson B, de Verdier K: *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Vet Scand* 2003, 44:145–152.
41. Quilez J, Sanchez-Acedo C, del Cacho E, Clavel A, Causape AC: Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). *Vet Parasitol* 1996, 66:139–146.
42. Olson ME, McAllister TA, Deselliers L, Morck DW, Cheng KJ, Buret AG, Ceri H: Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am J Vet Res* 1995, 56:1470–1474.
43. Ralston BJ, Cockwill CL, Guselle NJ, Van Herk FH, McAllister TA, Olson ME: Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium andersoni* and their effects on performance in feedlot beef cattle. *Can J Anim Sci* 2003, 83:153–159.
44. Joachim A, Krull T, Schwarzkopf J, Dauschies A: Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Vet Parasitol* 2003, 112:277–288.
45. Fiedler vH-H: Zur Verbreitung von Kryptosporidien unter norddeutschen Rinderbeständen. *Tierärztl Umschau* 1985, 40:526–528.
46. Xiao L, Herd RP: Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet Parasitol* 1994, 55:257–262.
47. Koutny H, Joachim A, Tichy A, Baumgartner W: Bovine *Eimeria* species in Austria. *Parasitol Res* 2012, 110:1893–1901.

48. Lentze T, Hofer D, Gottstein B, Gaillard C, Busato A: Häufigkeiten und Bedeutung von Endoparasiten bei Kälbern aus Schweizer Mutterkuhbetrieben. Dtsch Tierärztl Wschr 1999, 106:275–281.
49. Lassen B, Viltrop A, Raaperi K, Jarvis T: *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species, and diarrhoea. Vet Parasitol 2009, 166:212–219.
50. Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD, Syngé BA: Aetiology of diarrhoea in young calves. Vet Rec 1986, 119:31–34.
51. de la Fuente R, Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Luzon M, Cid D, Garcia S, Orden JA, Gomez-Bautista M: Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. Prev Vet Med 1998, 36:145–152.
52. Uhde FL, Kaufmann T, Sager H, Albini S, Zanoni R, Schelling E, Meylan M: Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. Vet Rec 2008, 163:362–366.
53. Bartels CJ, Holzhauser M, Jorritsma R, Swart WA, Lam TJ: Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. Prev Vet Med 2010, 93:162–169.

2. Publikation 2

Molecular identification of zoonotic and livestock-specific *Giardia*-species in faecal samples of calves in Southern Germany

Julia Gillhuber¹, Louise Pallant², Amanda Ash², RC Andrew Thompson², Kurt Pfister¹ and
Miriam C. Scheuerle¹

Parasites & Vectors 2013 6:346

Received: 21st October 2013

Accepted: 4th December 2013

Published: 10th December 2013

¹Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine,
Ludwig-Maximilians-Universität München, Leopoldstr. 5, 80802 Munich, Germany

²School of Veterinary and Biomedical Sciences, Murdoch University, Perth, Western
Australia, Australia.

Corresponding author:

Julia Gillhuber

Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-Universität,
Leopoldstr. 5, 80802 Munich, Germany

julia.gillhuber@tropa.vetmed.uni-muenchen.de

Telephone 0049 (0)89 2180 – 3622

Fax 0049 (0)89 2180 -3623

Abstract

Background

Giardia-infection in cattle is often subclinical or asymptomatic, but it can also cause diarrhoea. The livestock-specific species *Giardia bovis* is the most frequently observed in cattle, however, the two zoonotic species *Giardia duodenalis* and *Giardia enterica* have also been found. Therefore calves are thought to be of public health significance. The aim of this study was to obtain current data about the frequency of the different *Giardia*-species in calves in Southern Germany.

Findings

Faecal samples of calves (diarrhoeic and healthy) in Southern Germany, diagnosed *Giardia*-positive by microscopy, were characterised by multi-locus PCR and sequencing.

Of 152 microscopically *Giardia*-positive samples 110 (72.4%) were positive by PCR and successfully sequenced. *G. bovis* (Assemblage E) was detected in 101/110 (91.8%) PCR-positive samples, whilst *G. duodenalis* (Assemblage A) was detected in 8/110 (7.3%) samples and a mixed infection with *G. duodenalis* and *G. bovis* (Assemblage A+E) was identified in 1/110 (0.9%) samples. The sub-genotypes A1, E2 and E3 were identified with the β -giardin and the glutamate dehydrogenase genes. In the majority of diarrhoeic faecal samples a co-infection with *Cryptosporidium* spp. or *Eimeria* spp. was present, however, there were some in which *G. bovis* was the only protozoan pathogen found.

Conclusions

The results suggest that there is potentially a risk for animal handlers as calves in Southern Germany are, at a low percentage, infected with the zoonotic species *G. duodenalis*. In addition, it was found that *G. bovis* was the only pathogen identified in some samples of diarrhoeic calves, indicating that this parasite may be a contributing factor to diarrhoea in calves.

Keywords: PCR, Diarrhoea, Protozoan, *Giardia* assemblages, Cattle, *Giardia duodenalis* morphological group

Findings

Background

Worldwide the protozoan *Giardia* spp. is one of the most common intestinal parasites in humans (reviewed in [1,2]) and also a frequent enteric parasite in animals including companion animals, livestock and wildlife [2]. According to Monis et al. [3] there are eleven species within the genus *Giardia*. Six of them, formally known as Assemblages A-G of the *Giardia duodenalis* morphological group, are genetically but not morphologically distinguishable. They can infect humans and mammals, with some being host specific and others having low host specificity.

Giardia-infection in cattle is often subclinical or asymptomatic, but this infection can also cause symptoms including acute or chronic diarrhoea, reduced weight gain and ill thrift in young calves [4,5]. Although the prevalence of *Giardia* in cattle around the world varies considerably (reviewed in [5,6]), longitudinal studies have shown cumulative infection rates in calves of 100% [7,8]. The two zoonotic species *G. duodenalis* (Assemblage A) and *G. enterica* (Assemblage B) and the livestock-specific species *G. bovis* (Assemblage E) are able to infect cattle with *G. bovis* being found most frequently followed by *G. duodenalis* [9-13]. Therefore, calves are thought to be of public health significance both as a source of waterborne outbreaks of giardiasis in humans and as a risk to in-contact animal handlers [2,14].

Current data on the occurrence of the different *Giardia*-species in German calves is only available for 2–16 week old calves from farms around Berlin. In that study (15) a commercially available monoclonal antibody-based ELISA was used and *Giardia* was detected in 100% of the farms and 51.2% of the animals sampled. Subsequent molecular characterisation ascertained *G. bovis* (Assemblage E) was the most common species present, but infections with *G. duodenalis* (Assemblage A) and mixed infections of *G. duodenalis* and *G. bovis* (Assemblage A+E) were also found [15].

Thus, the aim of this study was to obtain current data about the frequency of the different *Giardia*-species in calves of a wider range of age in Southern Germany.

Methods

Samples

Faecal samples of calves from the southern federal states of Germany, Bavaria and Baden-Württemberg, were sent to the Diagnostic Laboratory of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, LMU Munich, Germany for microscopy analysis. *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. were detected using the carbol-fuchsin-stained direct

faecal smear [16] and the merthiolate iodine formaldehyde concentration (MIFC) with the addition of Lugol's solution [17]. Samples from 152 calves between 3 and 130 days of age (mean age: 50.7 days, n = 138) were diagnosed *Giardia*-positive by the MIFC-method between June 2011 and January 2013 and stored at -20° C. In February 2013 these samples were preserved in 70% ethanol and sent to the School of Veterinary and Life Sciences, Murdoch University, Australia, for molecular characterisation.

DNA extraction

DNA was extracted from faecal samples using the Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) with the Maxwell® 16 Instrument (Promega). In addition to the recommended protocol, 1 μ l of the final elution was further diluted by adding 4 μ l of Water-ultra pure grade (Fisher Biotech Perth, Australia). Both neat and dilute templates were used in PCRs.

PCR amplification

For the amplification of the 18S rRNA gene and the β -giardin gene a nested PCR was carried out and for the amplification of the glutamate dehydrogenase (GDH) gene a semi-nested PCR was performed. Details of primers and cycling conditions are listed in Table 1.

DNA sequencing

PCR products were purified using Agencourt AMPure XP magnetic beads (Beckman coulter, Beverly, USA) as per the manufacturer's instructions. Sequence reactions were performed using the Big Dye Terminator Version 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. PCR products were sequenced with the second round primers (1 μ l [2.5 μ M]). The cycling conditions for nucleotide sequencing are: 1 cycle of 96° C for 2 min and 25 cycles at 96° C for 10 s, 50° C for 5 s and 60° C for 4 min. Reactions were electrophoresed on an ABI 3730 48 capillary machine.

Species identification

Sequences were analysed using Sequencher 4.8 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA) and compared to published sequences (Table 2) to identify species and sub-genotype information.

Table 1/1: PCR conditions and primers

Target gene	Number of reaction	Length of amplification (bp)	Primer	Cycle condition	Reaction volume	Reference
18S rRNA	primary reaction	292	forward primer: RH11 5'-CATCCGGTCGATCCTGCC-3'	a 96° C, 45 s	Total volume 25 µl d 0.15 µl Taq-Ti hot start DNA polymerase ^e 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) ^f	[18]
			reverse primer: RH4 5'-AGTCGAACCCCTGATTCTCCGCCAGG-3'	b 50° C, 30 s 72° C, 45 s → 35 cycles		
	secondary reaction	130	forward primer: GiarF 5'-GAGGCTCTCCCCAAGGAC-3'	a 96° C, 45 s	2 µl from the 1st-round PCR reaction	[19]
			reverse primer: GiarR 5'-CTGGGTCACGGCTGCTCG-3'	b 55° C, 30 s 72° C, 45 s → 35 cycles		
β-giardin	primary reaction	753	forward primer: G7 5'-AAGCCCGAGACCTCACCCCGCAGTGC-3'	a 95° C, 30 s	Total volume 25 µl d 0.15 µl Tth Plus DNA polymerase ^e	[20]
			reverse primer: G759 5'-GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'	b 50° C, 30 s 72° C, 60 s → 40 cycles		
	secondary reaction	511	forward primer: B-F 5'-GAACGAACGAGATCGAGGTCCG-3'	a 96° C, 45 s	2 µl from the 1st-round PCR reaction	[21]
			reverse primer: B-R 5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'	b 55° C, 30 s 72° C, 45 s → 35 cycles		

Table 1/2: PCR conditions and primers

Target gene	Number of reaction	Length of amplification (bp)	Primer	Cycle condition	Reaction volume	Reference
GDH	primary reaction	not given	forward primer: GDHeF 5'-TCAACGTYAAYCGYGGYTTCCGT-3' reverse primer: GDHiR 5'-GTTRTCCTTGCACATCTCC-3'	c 94° C, 30 s 50° C, 30 s 72° C, 60 s → 40 cycles b	Total volume 25µl d 0.2 µl Tth Plus DNA polymerase ^e	[19]
	secondary reaction	432	forward primer: GDHiF 5'-CAGTACAACCTCYGCTCTCGG-3' reverse primer: GDHiR 5'-GTTRTCCTTGCACATCTCC-3'	c 94° C, 30 s 60° C, 30 s 72° C, 60 s → 40 cycles b	2 µl from the 1st-round PCR reaction	[19]

a: Initial activation step: 96° C, 5 min

b: Final extension: 72° C, 7 min

c: Initial activation step: 94° C, 5 min

d: used substances: 2 µl diluted DNA template, 2.5 µl 10x Reaction Buffer, 2.5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTPs (5 mM) (Promega),

1 µl of each primer (10 µM), Water-ultra pure grade (Fisher Biotech Perth, Australia)

e: Fisher Biotech Perth, Australia

f: Sigma–Aldrich St. Louis, Missouri

Table 2: GenBank accession numbers used for alignment with *Giardia* sequences

18S rRNA		β-giardin		GDH	
AI	AF199445	A1	X14185	A	DQ100288
AI	M54878	A2	AY545645	A	M84604
AII	AF199446	A2	FN386482	A1	DQ414242
AIII	AF199447	A5	AY545643	A2	L40510
B	U09491	A8	AY545649	B	AY826193
B	U09492	B	AY072728	B3	AF069059
C	AF199449	B	AY647266	B4	AY178750
D	AF199443	C	AY545646	C	U60982
E	AF199448	C	FJ009206	D	U60986
E	DQ157272	D	AY545648	E	AY178741
F	AF199444	E	EU189375	F	AF069057
G	AF199450	E1	AY072729	G	AF069060
		E2	AY545650		
		E3	AY653159		

Results

Of the 152 samples, diagnosed *Giardia*-positive by microscopy, 110 (72.4%) were positive by PCR and successfully sequenced.

Sequence analysis identified the presence of *G. bovis* (Assemblage E) in 101/110 (91.8%) PCR-positive samples, *G. duodenalis* (Assemblage A) in 8/110 (7.3%) samples and a mixed template of *G. duodenalis* and *G. bovis* (Assemblage A+E) in 1/110 (0.9%) samples. Using the β-giardin and GDH genes it was possible to identify sub-genotypes within the species *G. bovis* (E2 and E3) and *G. duodenalis* (A1) (Table 3).

Of the 110 PCR-positive samples 94 (85.5%) samples amplified at one locus, whereas 12/110 (10.9%) and 4/110 (3.6%) samples amplified at 2 and 3 loci, respectively. 18S amplified most frequently (106/152 samples, 69.7%), whereas β-giardin and GDH amplified comparatively rarely (16/152, 10.5%; 8/152, 5.3%) (Table 3).

Table 4 shows that in the majority of the calves with diarrhoea a co-infection with *Cryptosporidium* spp. or *Eimeria* spp. was present.

Table 3: Genotypic characterisation of *Giardia* spp. isolates at different loci

18S rRNA	β-giardin	GDH	18S rRNA and β-giardin	18 S and GDH	18SrRNA, β-giardin and GDH
A (5)	A1 (1)	A1(1)	E, E (1)	E, A1 (1)	A, A1, A (1)
E (85)	E3 (1)	E (1)	E, E2 (1)	E, E (1)	E, E3, E (3)
			E, E3 (8)		

Table 4: Distribution of mono- and mixed infections of *Giardia*-positive calves in relation to faecal consistency

		Total	Monoinfection with <i>Giardia</i> spp.	Coinfection with <i>Cryptosporidium</i> spp.	Coinfection with <i>Eimeria</i> spp.
MIFC positive	Total	152	66	15	71
	With diarrhoea	62	25	10	27
	Without diarrhoea	90	41	5	44
PCR: <i>G. duodenalis</i>	Total	8	-	3	5
	With diarrhoea	4	-	2	2
	Without diarrhoea	4	-	1	3
PCR: <i>G. bovis</i>	Total	101	48	8	45
	With diarrhoea	38	17	6	15
	Without diarrhoea	63	31	2	30
PCR: <i>G. duodenalis</i> + <i>G. bovis</i>	Total	1	1	-	-
	With diarrhoea	-	-	-	-
	Without diarrhoea	1	1	-	-

Discussion

The results of this study reveal that the livestock-specific species *G. bovis* (Assemblage E) is the most frequent species (91.8%) in calves in Southern Germany. The zoonotic species *G. duodenalis* (Assemblage A) was found in a low number of samples (7.3%), while a mixed infection of *G. duodenalis* and *G. bovis* was identified in only one sample (0.9%). *G. enterica* (Assemblage B), the second zoonotic species, was not detected in this study.

Similarly in another study on German calves, the same species were detected and *G. bovis* was also found most frequently; however, there was a higher proportion of infection with *G. duodenalis* as well as with mixed infections than observed in this study [15].

Finding *G. bovis* in the majority of *Giardia*-infections in calves and *G. duodenalis* in only some cases also concurs with the results of former studies on cattle [10-12,22-24]. In some studies *G. bovis* was the only species identified in calves [9,25]. *G. enterica* was not detected in this study, which is in accordance with the results of many previous studies although several did find this genotype in cattle [10,12,13,21]. One study diagnosed *G. enterica* more frequently than *G. bovis* [26] whereas studies in New Zealand found only infections with *G. duodenalis* and *G. enterica*, but not with *G. bovis* [27-29].

The finding of sub-genotypes E2 and E3 within the species *G. bovis* (Assemblage E) is similar to former studies [11,14,21]. According to Xiao and Fayer [30] and Feng and Xiao [1] A1 and A2 are the most common sub-genotypes of *G. duodenalis* (Assemblage A), with

humans being mostly infected with A2 and animals with A1. This agrees with former results [14,22,23] and with the results of this study, as A1 was the only sub-genotype of *G. duodenalis* diagnosed. However, others have found one or more of the sub-genotypes A1-A4 in cattle [10-12,21,24]. Therefore it is possible that calves can be infected with a variety of sub-genotypes of *G. duodenalis*, all of which have also been identified in humans [21]. This suggests that there may be an interaction between the human and livestock transmission cycle [3]. Cattle have long been assumed to be of public health significance as a source of waterborne outbreaks of giardiasis in humans due to contamination of ground and surface water, although, there is no evidence incriminating infected cattle in any of the 132 documented waterborne outbreaks [2]. However, it has been shown, that animal handlers can be in danger of zoonotic transmission of *G. duodenalis* from infected cattle [14], and in reverse anthrozoönotic transmission of *G. duodenalis* from animal handlers to cattle is also possible [13]. Thus, transmission of the zoonotic species, which was detected in this study, could in principle be possible between animal handlers and cattle.

The role of *Giardia* as a cause of diarrhoea in calves is still unclear, as there are conflicting results from a number of studies, some demonstrating an association and others not. Furthermore, the presence of species-specific pathogenicity in calves poses further difficulties in the evaluation and has not been determined in another bovine study [11]. The role of the particular *Giardia*-species in mixed-infections in diarrhoeic calves could not be clarified either. However, the identification of some diarrhoeic samples, where *G. bovis* was the only pathogen detected, may suggest that this species does contribute to diarrhoea in calves. Whether these results are indicative or not remains unclear. Further studies will show whether differences in the clinical outcomes can occur due to the various sub-genotypes as has been established in human medicine [2].

Conclusions

The results of this study show that although the livestock specific species *G. bovis* has been diagnosed most frequently, the potential zoonotic species *G. duodenalis* is also present in calves in Southern Germany and thus might be a risk for animal handlers. Furthermore the results indicate that *G. bovis* might contribute to diarrhoea, as it was the only pathogen found in a proportion of the samples from diarrhoeic calves.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JG prepared the samples, analysed and interpreted the data and drafted the manuscript, AA and LP carried out the PCR and the sequence analysis, AT participated in the design and conception of the study and reviewed the draft, KP and MS conceived of the study, participated in its design and conception and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank our colleagues in the lab, especially Elisabeth Kiess, Kathrin Simon and Tim Tiedemann for their contribution to the study.

References

1. Feng Y, Xiao L: Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 2011, 24:110–140.
2. Thompson RC, Monis P: *Giardia*-from genome to proteome. In *Advances in Parasitology*. Volume 78. Edited by Rollinson D, Hay SI. London: Elsevier; 2012:57–95.
3. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC: Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 2009, 25:93–100.
4. Geurden T, Vercruyse J, Claerebout E: Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural *Giardia* infection in calves. *Vet Parasitol* 2006, 142:367–371.
5. Geurden T, Vercruyse J, Claerebout E: Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp Parasitol* 2010, 124:98–106.
6. Xiao L: *Giardia* infection in farm animals. *Parasitol Today* 1994, 10:436–438.
7. O'Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME: Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 1999, 214:391–396.
8. Ralston BJ, McAllister TA, Olson ME: Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet Parasitol* 2003, 114:113–122.

9. Becher KA, Robertson ID, Fraser DM, Palmer DG, Thompson RC: Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet Parasitol* 2004, 123:1–9.
10. Mendonca C, Almeida A, Castro A, de Lurdes DM, Soares S, da Costa JM, Canada N: Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet Parasitol* 2007, 147:47–50.
11. Geurden T, Geldhof P, Levecke B, Martens C, Berkvens D, Casaert S, Vercruysse J, Claerebout E: Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int J Parasitol* 2008, 38:259–264.
12. Ng J, Yang R, McCarthy S, Gordon C, Hijjawi N, Ryan U: Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. *Vet Parasitol* 2011, 176:145–150.
13. Dixon B, Parrington L, Cook A, Pintar K, Pollari F, Kelton D, Farber J: The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 2011, 175:20–26.
14. Khan SM, Debnath C, Pramanik AK, Xiao L, Nozaki T, Ganguly S: Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol* 2011, 178:342–345.
15. Geurden T, Vanderstichel R, Pohle H, Ehsan A, von Samson-Himmelstjerna G, Morgan ER, Camuset P, Capelli G, Vercruysse J, Claerebout E: A multicenter prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Vet Parasitol* 2012, 190:383–390.
16. Heine J: Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zentralbl Veterinaermed Reihe B* 1982, 29:324–327.
17. Thornton SA, West AH, DuPont HL, Pickering LK: Comparison of methods for identification of *Giardia lamblia*. *Am J Clin Pathol* 1983, 80:858–860.
18. Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC: Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 1997, 83:44–51.
19. Read CM, Monis PT, Thompson RC: Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 2004, 4:125–130.
20. Caccio SM, De Giacomo M, Pozio E: Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

- assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol* 2002, 32:1023–1030.
21. Lalle M, Pozio E, Capelli G, Bruschi F, Crotti D, Caccio SM: Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol* 2005, 35:207–213.
 22. Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C: Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology* 2007, 134:339–350.
 23. Souza SL, Gennari SM, Richtzenhain LJ, Pena HF, Funada MR, Cortez A, Gregori F, Soares RM: Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol* 2007, 149:258–264.
 24. Feng Y, Ortega Y, Cama V, Terrel J, Xiao L: High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms. *Parasitol Res* 2008, 103:87–92.
 25. Berrilli F, Di Cave D, De Liberato C, Franco A, Scaramozzino P, Orecchia P: Genotype characterisation of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. *Vet Parasitol* 2004, 122:193–199.
 26. Coklin T, Farber J, Parrington L, Dixon B: Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol* 2007, 150:297–305.
 27. Winkworth CL, Learmonth JJ, Matthaei CD, Townsend CR: Molecular characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a region in which dairy farming has recently intensified. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:5100–5105.
 28. Learmonth JJ, Ionas G, Pita AB, Cowie RS: Identification and genetic characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand. *Water Sci Technol* 2003, 47:21–26.
 29. Hunt CL, Ionas G, Brown TJ: Prevalence and strain differentiation of *Giardia intestinalis* in calves in the Manawatu and Waikato regions of North Island, New Zealand. *Vet Parasitol* 2000, 91:7–13.
 30. Xiao L, Fayer R: Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol* 2008, 38:1239–1255.

3. Ergebnisse der Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg

3.1. Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung

In der mikroskopischen Untersuchung der 185 Proben einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg waren 43 (23,2%) *Giardia*-positiv, 85 (45,9%) *Eimeria*-positiv und 5 (2,7%) *Cryptosporidium*-positiv. Bei 24 Proben (13,0%) wurde eine Mischinfektion von *Giardia* spp. und *Eimeria* spp. gefunden, bei 2 Proben (1,1%) eine Mischinfektion von *Giardia* spp. und *Cryptosporidium* spp. und bei einer Probe (0,5%) eine Mischinfektion von *Eimeria* spp. und *Cryptosporidium* spp.

3.2. Ergebnisse der Bio-X Easy-Digest-ELISA-Untersuchung

Von den 84 ELISA-untersuchten Proben war eine (1,2%) Rotavirus-positiv und 12 (14,3%) waren *Cryptosporidium*-positiv.

3.3. Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung älterer Tiere

Die 10 Proben der Tiere zwischen 186 und 355 Tagen waren alle *Eimeria*-positiv und die 5 Proben der Tiere zwischen 15 Monaten und 8 Jahren waren komplett negativ.

V. DISKUSSION

Die vorliegende Studie gibt einen aktuellen Überblick über das Vorkommen von *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. und *Eimeria* spp. in durchfallkranken Kälbern in Süddeutschland, sowie in gesunden Kälbern in einem Betrieb in Baden-Württemberg. Darüber hinaus liefert sie erstmals Informationen über die vorhandenen *Giardia*-Arten in gesunden und durchfallkranken Kälbern in diesem Gebiet. Nur wenige aktuelle Zahlen über Kälber aus Deutschland gibt es diesbezüglich in der zugänglichen Literatur: abgesehen von einer aktuellen deutschlandweiten Studie über Eimerien, in die auch Betriebe aus Bayern und Baden-Württemberg miteinbezogen waren (Bangoura et al., 2012), gibt es eine aktuelle europaweite Studie über Giardien, in der aus Deutschland Kälber aus der Gegend um Berlin untersucht wurden (Geurden et al., 2012). Hinsichtlich Kryptosporidien bietet eine Studie aus dem Jahr 2003 die neuesten Daten, in der Untersuchungsergebnisse aus 5 Diagnostiklaboren, eines davon aus Baden-Württemberg, ausgewertet wurden (Joachim et al., 2003).

In den 2012 untersuchten durchfallkranken Kälbern wurde eine Infektionsrate mit *Giardia* spp. von 7,2% ermittelt. Dieser Wert ist deutlich niedriger, verglichen mit zahlreichen vorangegangenen Studien weltweit (Tab. a im Anhang). Die Gründe dafür können in den unterschiedlichen untersuchten Populationen, in Unterschieden in der Haltung, in den geographischen und klimatischen Gegebenheiten und in den verwendeten Untersuchungsmethoden liegen (Geurden et al., 2010c). Geurden et al. (2012) verwendeten beispielsweise bei ihrer Studie einen auf monoklonalen Antikörpern basierenden ELISA und erhielten damit eine Prävalenz von 51,2% in 2-16 Wochen alten Kälbern aus der Gegend um Berlin. Während in der mikroskopischen Untersuchung nur intakte Oozysten nachgewiesen werden können, reagiert ein ELISA schon beim Vorhandensein von Oberflächenantigenen positiv. In zahlreichen Studien wurden diese Untersuchungsmethoden verglichen und deren Vor- und Nachteile diskutiert. Für den bei Geurden et al. (2012) verwendete ELISA wurde in einer früheren Studie eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 90% berechnet (Geurden et al., 2004), wohingegen die mikroskopische Untersuchung mittels Flotation mit einer Sensitivität von 56% und einer Spezifität von 87% bei diesem Vergleich deutlich schlechter abschnitt. In weiteren Untersuchungen wurden für den Giardien-Nachweis mittels ELISA Sensitivitäten zwischen 36,4% und 100% und Spezifitäten zwischen 78% und 98,9% berechnet (Cirak und Bauer, 2004; Weitzel et al., 2006; Wilson und Hankenson, 2010; Gillhuber et al., 2013). Als Fazit dieser Studien kann gesagt werden, dass ein Antigen-

Nachweis mittels ELISA die mikroskopische Untersuchung nicht ersetzen kann, da beispielsweise eine Therapiekontrolle mittels ELISA schwierig ist. Denn ein verlängerter Nachweis von Oberflächenantigenen bereits abgeklungener Giardien-Infektionen könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen. Der ELISA ist jedoch als wichtige Ergänzung in der Diagnostik zu sehen, falls kein geübtes Personal für die mikroskopische Untersuchung zur Verfügung steht, da er schnell und einfach durchzuführen ist (Cirak und Bauer, 2004; Weitzel et al., 2006; Wilson und Hankenson, 2010; Gillhuber et al., 2013). Die Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden ist somit vielleicht ein Grund für den großen Unterschied in den nachgewiesenen Infektionsraten der vorliegenden Studie und bei Geurden et al. (2012). Von großer Bedeutung dürfte dafür aber auch der Altersunterschied der beprobten Tiere sein, was durch die statistische Auswertung der Verlaufsstudie bestätigt wird: während in dieser Studie das Durchschnittsalter untersuchter Kälber bei 22,4 Tagen und der Median bei 11 Tagen lag, waren die beprobten Tiere bei Geurden et al. (2012) mit einem Durchschnittsalter von 5,4 Wochen (37,8 d) deutlich älter, was das Risiko einer Giardien-Infektion erhöht. Auch bei den Proben der Rinderunion Baden-Württemberg lag das Durchschnittsalter der Kälber mit 59,3 Tagen deutlich über dem der Verlaufsstudie. Eine entsprechend höhere Infektionsrate von 23,2% ist somit nur eine logische Folge. Die altersabhängige Nachweishäufigkeit in der Verlaufsstudie war am höchsten bei Kälbern zwischen 61 und 90 Tagen (28,4%). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Hammes et al. (2006) und Trout et al. (2005), in deren Studien die Prävalenzen für Giardien in etwa 3 Monate alten Kälbern am höchsten waren. In anderen Studien schwankte das Alter mit der höchsten Nachweisrate für Giardien zwischen 4 Wochen und 4-5 Monaten (Huetink et al., 2001; Becher et al., 2004; Olson et al., 2004; Jäger et al., 2005). Diese große Spanne weist darauf hin, dass Giardien über einen langen Zeitraum eine nicht zu unterschätzende, potentielle Gefahr für Kälber darstellen können. In höherem Alter hingegen nimmt die Nachweishäufigkeit einer Giardien-Infektion bei Rindern ab, wie auch das negative Ergebnis der Untersuchung älterer Tiere der Rinderunion Baden-Württemberg belegt. Möglicher Grund hierfür ist die Entwicklung einer erworbenen Immunität (O'Handley et al., 2003; Geurden et al., 2010c).

Neben dem Alter wird auch die Jahreszeit häufig als Einflussfaktor auf die Nachweishäufigkeit von Giardien diskutiert, wobei die Ergebnisse diesbezüglich widersprüchlich sind. In dieser, wie auch in manch früheren Studien wurde kein saisonaler Einfluss festgestellt (Wade et al., 2000b), während in anderen Studien je zu verschiedenen Jahreszeiten ein erhöhtes Risiko einer Giardien-Infektion für Kälber bestand (Wade et al.,

2000a; Huetink et al., 2001; Hamnes et al., 2006). Hamnes et al. (2006) vermuteten als einen Grund für die höhere Nachweisrate im Winter die Abkalbperiode im Herbst, während der in der untersuchten Gegend vermehrt Kälber geboren wurden. Außerdem konnten die Tiere im Winter nicht auf die Weide. Durch die höhere Dichte der Stallbelegung hatten die Tiere engen Kontakt zueinander und die Reinigung und Desinfektion der Ställe wurde erschwert. Somit stieg die Möglichkeit der direkten Übertragung der Zysten. Möglicherweise ist in der vorliegenden Studie kein saisonaler Einfluss festgestellt worden, da bei dessen statistischer Berechnung das Alter der Tiere berücksichtigt wurde, wodurch der Einfluss eventuell vorhandener saisonaler Abkalbperioden wegfällt. Leider liegen keine Angaben bezüglich der Haltung der hier untersuchten Tiere vor, weswegen weitere Aussagen diesbezüglich nicht möglich sind.

Inwieweit sich eine Giardien-Infektion auf den Gesundheitszustand von Kälbern auswirkt, unter welchen Bedingungen sie zu Durchfall führt und welche Folgen eine subklinische Infektion auf die Entwicklung der Tiere hat, ist bislang nicht vollständig geklärt. In manchen Studien wurden Giardien als Ursache für Durchfall und schlechtes Allgemeinbefinden gesehen (Xiao et al., 1993; O'Handley et al., 1999), in anderen jedoch nicht (Quilez et al., 1996; Huetink et al., 2001; Bjorkman et al., 2003). In der vorliegenden Studie konnten Giardien in durchfallkranken und in gesunden Kälbern nachgewiesen werden. Wann es nun bei einer Giardien-Infektion, die bei Kälbern oft asymptomatisch verläuft, zum Auftreten von Symptomen kommt, ist unklar und wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst (Thompson et al., 2008; 2012). Ein Punkt, der in diesem Zusammenhang diskutiert wird, ist der Einfluss der *Giardia*-Art auf das Krankheitsgeschehen: gibt es eine Art-spezifische Pathogenität oder nicht? Thompson und Monis (2012) sind dieser Frage im Rahmen einer Übersichtsarbeit nachgegangen: die Daten einiger Studien der Humanmedizin lassen vermuten, dass akute und chronische Giardiose womöglich durch unterschiedliche *Giardia*-Arten ausgelöst werden, wobei die Ergebnisse nicht immer übereinstimmen. Während beispielsweise bei Homan und Mank (2001) eine Infektion mit *G. duodenalis* mit einer milden, intermittierenden Form von Durchfall assoziiert wurde und eine mit *G. enterica* mit einer schweren, akuten, persistierenden Form, so wurde bei Read et al. (2002) festgestellt, dass Kinder, die mit *G. duodenalis* infiziert sind, eine um den Faktor 26 erhöhte Wahrscheinlichkeit für Durchfall haben als solche, die mit *G. enterica* infiziert sind. Bei entsprechenden Untersuchungen in einer Kälber-Studie konnte eine Art-spezifische Pathogenität nicht nachgewiesen werden (Geurden et al., 2008). In der vorliegenden Studie wurde in der Mehrheit der Proben, in denen eine Art-Differenzierung mittels PCR gelang,

G. bovis identifiziert, in einigen wenigen wurde *G. duodenalis* gefunden und der Nachweis von *G. enterica* blieb aus. Diese Verteilung des Arten-Spektrums ähnelt den neuesten Ergebnissen von Geurden et al. (2012) und auch denen zahlreicher früherer Studien. In manch anderen konnte jedoch auch eine Infektion mit *G. enterica* nachgewiesen werden (Tab. a im Anhang). Hinsichtlich des Vorhandenseins einer Art-spezifischen Pathogenität ist in den vorliegenden Ergebnissen festzustellen, dass bei allen Proben, die als *G. duodenalis*-positiv identifiziert wurden, und bei der Mehrheit der *G. bovis*-positiven Proben eine Co-Infektion mit *Cryptosporidium* spp. oder *Eimeria* spp. vorhanden war. Eine Co-Infektion ist ebenfalls ein Faktor, der das Auftreten von Symptomen bei *Giardia*-positiven Kälbern beeinflussen kann (Thompson und Monis, 2012). Somit kann hier keine definitive Aussage darüber getroffen werden, welcher der nachgewiesenen Pathogene im Falle von Mischinfektionen die Ursache des Durchfalls ist und welche Rolle die einzelnen *Giardia*-Arten in diesem Geschehen spielen. Festzuhalten ist, dass in einigen Proben durchfallkranker Tiere lediglich *G. bovis* nachgewiesen werden konnte. Dies lässt vermuten, dass diese Rinder-spezifische Art zumindest mitbeteiligt ist am Durchfallgeschehen von Kälbern. Neben einer symptomatischen Giardiose ist aber auch die asymptomatische Infektion mit *Giardia* spp., wie sie bei der Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg nicht selten gefunden wurde, nur wenig erforscht: in einer Lämmer-Studie wurden negative Auswirkungen einer Giardien-Infektion auf Gewichtszunahme, Futtermittelverwertung und Schlachtkörpergewicht festgestellt, nicht jedoch in einer Studie an Stieren (Olson et al., 1995; Ralston et al., 2003a). Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie erste neue Erkenntnisse hinsichtlich Vorkommen und Pathogenität der verschiedenen *Giardia*-Arten bei gesunden und durchfallkranken Kälbern in Süddeutschland gewonnen werden konnten. Weitere interessante und wichtige Fragen in Bezug auf Giardien-Infektionen bei Kälbern können jedoch mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht beantwortet werden: ist *Giardia* spp. ein primärer Auslöser von Durchfall bei Kälbern? Unter welchen Bedingungen kommt es zum Auftreten von Symptomen bei einer Giardien-Infektion? Gibt es eine Art-spezifische Pathogenität? Welche Rolle spielen Giardien bei Mischinfektionen mit anderen Durchfallerregern wie Kryptosporidien oder Kokzidien? Welche Auswirkungen hat eine asymptomatische Giardien-Infektion auf die Entwicklung der Tiere? Diese offenen Fragen gilt es in zukünftigen Studien zu bearbeiten und hoffentlich auch zu beantworten, um die Bedeutung einer Giardien-Infektion bei Kälbern besser beurteilen und Betriebsmanagement sowie Bestandsbetreuung entsprechend anpassen zu können. Hierfür ist die Durchführung klinischer Studien mit Infektionsversuchen mit *Giardia* spp., bzw. den einzelnen *Giardia*-

Arten unter verschiedenen Bedingungen (z.B. als Monoinfektion oder Mischinfektion mit Kryptosporidien oder Eimerien) nötig. Durch eine Auswertung hinsichtlich klinischer und subklinischer Auswirkungen sowie durch pathologische Analysen können neue Erkenntnisse gewonnen werden, um Antworten auf die oben stehenden Fragen zu finden.

Ein weiterer Punkt, der im Zusammenhang mit Giardien-Infektionen beim Tier von Bedeutung ist, ist das zoonotische Potential dieses Erregers: besteht Gefahr für Personen, die in direktem Kontakt mit infizierten Tieren sind? Und wie groß ist das Risiko einer indirekten Übertragung über Wasser und Nahrung? Diesbezüglich ist neben der Art-Differenzierung auch eine Bestimmung der Sub-Genotypen von Bedeutung. Dies war bei einigen Proben möglich: innerhalb der Art *G. bovis* wurden die Sub-Genotypen E2 und E3 gefunden, was mit den Ergebnissen früherer Studien vergleichbar ist (Tab. b im Anhang). Innerhalb der Art *G. duodenalis* gelang der Nachweis des Sub-Genotyps A1, der in früheren Studien in Rindern und auch in Menschen nachgewiesen wurde (Tab. b im Anhang). Somit ist in den hier untersuchten Betrieben theoretisch eine direkte Übertragung zwischen Mensch und Kalb möglich, sowohl anthroozoonotisch als auch zooanthroponotisch (Dixon et al., 2011; Khan et al., 2011). Ob nun jedoch Kälber die Infektionsquelle für den Menschen darstellen oder umgekehrt oder aber auch beides, kann hier nicht beantwortet werden. Auch ist keine Aussage darüber möglich, ob hier die Gefahr einer indirekten Übertragung besteht, da entsprechende Untersuchungen im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt werden konnten.

***Cryptosporidium* spp.** ist ein sehr häufig zu findender Erreger bei durchfallkranken Kälbern in Süddeutschland: mit gut übereinstimmenden Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung und des ELISAs liegt die Nachweisrate in der Verlaufsstudie bei 41,3% bzw. 45,3%. Die erhaltenen Werte sind vergleichbar mit denen früherer Untersuchungen an 6-28 Tage alten durchfallkranken Kälbern in Deutschland (39,6%, 44%) (Heine und Boch, 1981; Fiedler, 1985). Neuere Daten diesbezüglich sind in der Studie von Joachim et al. (2003) zu finden, in der eine Auswertung von Untersuchungen aus 5 Laboren in den Jahren 1993 bis 1997 durchgeführt wurde: in Proben durchfallkranker Kälber bis zu einem Alter von 4 Wochen wurde dabei eine deutlich niedrigere Infektionsrate mit Kryptosporidien von 21,5% ermittelt. Vielfältig sind wieder die Gründe, welche diesen großen Unterschied bewirken können. Von großer Bedeutung ist sicherlich auch hier das Alter der beprobten Tiere, wie auch wieder die statistische Auswertung der Verlaufsstudie zeigt. Die höchste Infektionsrate in dieser (66,7%), wie auch in früheren Studien (Xiao und Herd, 1994; de la Fuente et al., 1999; Santin et al., 2004) wurde bei Kälbern zwischen 8 und 14 Tagen gefunden und der

Median der hier untersuchten Proben fällt mit 11 Tagen mitten in diesen Zeitraum. Somit ist eine entsprechend hohe Nachweisrate zu erwarten. In den 3 zuvor erwähnten deutschen Studien wurden keine Angaben zum Durchschnittsalter und Median der untersuchten Kälber gemacht, weswegen eine weitere Auswertung diesbezüglich nicht möglich ist. Bei der Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg waren die beprobten Kälber mit einem Durchschnittsalter von 59,3 Tagen und einem Median von 57 Tagen deutlich älter als die Tiere in der Verlaufsstudie. Eine entsprechend niedrigere Nachweisrate von nur 2,7% im Vergleich zur Verlaufsstudie ist somit nicht verwunderlich. Auch der fehlende Nachweis von *Cryptosporidium* spp. in den Proben der älteren Tiere der Rinderunion Baden-Württemberg ist nur logisch. Neben dem Alter ist bei den vorliegenden Ergebnissen womöglich auch der Gesundheitszustand ein ausschlaggebender Faktor für den großen Unterschied, da ja bei der Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg Proben gesunder Tiere und bei der Verlaufsstudie Proben durchfallkranker Tiere untersucht wurden. Auch bei der Studie von Heine und Boch (1981) lag die Nachweishäufigkeit bei gesunden Tieren (13,7%) deutlich unter der durchfallkranker Kälber (39,6%).

Entsprechend der Ergebnisse für *Giardia* spp. wurde in der Verlaufsstudie auch bei dem Auftreten einer Kryptosporidien-Infektion kein saisonaler Einfluss festgestellt, was manchen früheren Studien entspricht, anderen jedoch widerspricht (Garber et al., 1994; Lefay et al., 2000; Castro-Hermida et al., 2002; Sturdee et al., 2003; Starkey et al., 2005; Hammes et al., 2006). Die möglichen Gründe, warum in der Studie von Hammes et al. (2006) ein saisonaler Anstieg der Nachweisrate von *Cryptosporidium* spp. im Winter gefunden wurde und in der vorliegenden Studie kein saisonaler Einfluss festgestellt werden konnte, sind die gleichen, wie sie schon für *Giardia* spp. beschrieben wurden.

Auch wenn keine molekulare Arten-Differenzierung der Kryptosporidien durchgeführt wurde, lassen Morphologie der Oozysten und Alter der infizierten Tiere darauf schließen, dass es sich in den meisten Fällen um eine Infektion mit der häufig bei jungen Kälbern nachgewiesenen zoonotischen Art *C. parvum* handeln müsste. Somit besteht auch hier wieder die Gefahr der zoonotischen Übertragung zwischen Mensch und Tier.

Die Nachweisrate von ***Eimeria* spp.** liegt mit 13,3% deutlich unter kürzlich veröffentlichten Prävalenzen aus Deutschland (59,4%) und Österreich (83,7%) (Bangoura et al., 2012; Koutny et al., 2012). Neben einer anderen Untersuchungsmethode (Flotation, bzw. kombinierte Sedimentation-Flotation) dürfte wieder das Alter der beprobten Tiere ein Grund für den Unterschied sein, was auch die statistische Auswertung sowie die altersabhängigen

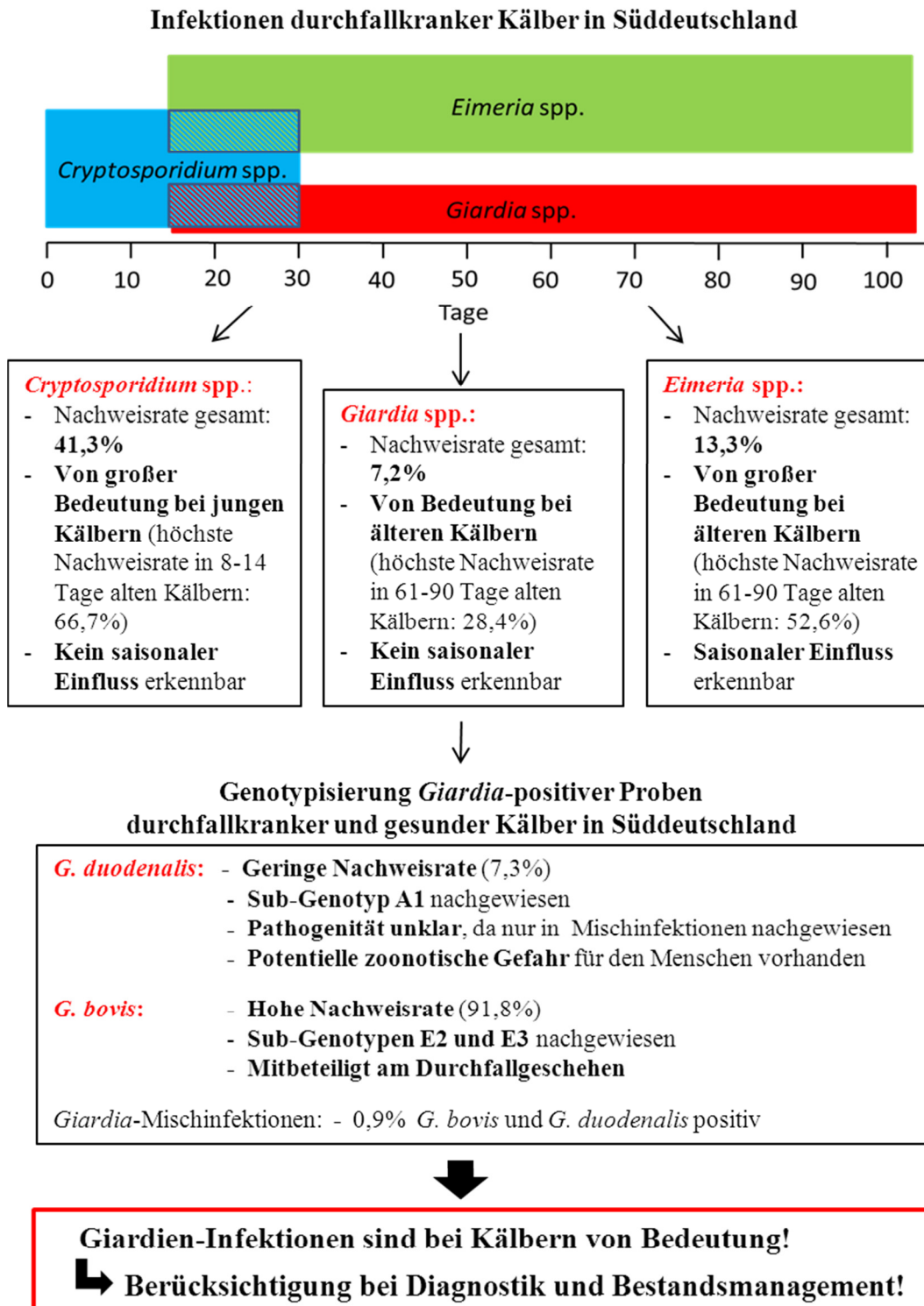
Nachweisraten der Verlaufsstudie nahelegt. Das Alter in den eben erwähnten Studien lag mit einem Median von 105 Tagen in Milchbetrieben und 90 Tagen in Mastbetrieben bei Bangoura et al. (2012) und mit einem Alter ≥ 3 Wochen bei Koutny et al. (2012) deutlich über den Werten der hier untersuchten Proben, was höhere Infektionsraten erwarten lässt. Die Nachweisrate für *Eimeria* spp. bei der Vergleichsanalyse einer Aufzuchtstation der Rinderunion Baden-Württemberg lag somit, entsprechend dem höheren Alter der dort untersuchten Tiere, mit 45,9% erwartungsgemäß über dem Wert der Verlaufsstudie. Das Maximum der altersabhängigen Nachweisrate in der Verlaufsstudie lag bei Kälbern im Alter von 61-90 Tagen (52,6%). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Lentze et al. (1999), in deren Studie ein signifikant ansteigendes Risiko einer Eimerien-Infektion bis zu einem Alter von 3 Monaten gefunden wurde. Faber et al. (2002) zeigten eine kontinuierlich ansteigende Eimerien-Prävalenz bei der wiederholten Untersuchung von Kälbern von Geburt bis zu einem Alter von 63 Tagen. In weiteren Studien war die Nachweisrate am höchsten bei Tieren zwischen 1-12 Monaten (Stewart et al., 2008) bzw. 3-12 Monaten (Lassen et al., 2009). Die Untersuchung der älteren Tiere der Rinderunion Baden-Württemberg zeigt, dass eine Eimerien-Infektion nicht selten auch bei Tieren bis zum Alter von einem Jahr nachgewiesen werden kann.

Saisonal bedingte Schwankungen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für eine Eimeriose zwischen Juli und September und der niedrigsten im März und April zeigt die statistische Auswertung der Verlaufsstudie. Ähnliche Ergebnisse erhielten Stewart et al. (2008) bei der Untersuchung gesunder Rinder bis zu einem Alter von 2 Jahren, in der die Nachweisrate im Juni am höchsten und im Februar am niedrigsten war. Dauschies und Najdrowski (2005) wiesen auf einen Anstieg der Prävalenz für Eimerien im Frühjahr bei Kälbern, die erstmals auf der Weide sind, hin. Mögliche weitere haltungsbedingte Einflussfaktoren auf die Nachweishäufigkeit sind Art und Häufigkeit von Reinigung und Desinfektion der Ställe, Besatzdichte und Kontakt zu anderen Tieren. Da keine Daten über die Haltung der hier untersuchten Tiere erhoben wurden, kann über die Gründe für die saisonal bedingten Schwankungen der Nachweisraten für Eimerien nur spekuliert werden.

Neben der mikroskopischen Untersuchung auf die genannten Parasiten wurde ein Großteil der Proben der Verlaufsstudie mittels ELISA auf *E.coli*, **Rota-**, **Coroanviren** und **Kryptosporidien** untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine hohe Nachweisrate für Rotaviren sowie für Mischinfektionen von Rotaviren und Kryptosporidien und niedrige Nachweisraten für *E. coli* und Coronaviren. Auch in früheren Studien waren Rotaviren und Kryptosporidien die am häufigsten nachgewiesenen Erreger in jungen durchfallkranken Kälbern und *E. coli*

und Coronaviren wurden vergleichsweise selten gefunden (Tab. e im Anhang; Snodgrass et al., 1986; de la Fuente et al., 1998). In einer österreichischen Studie hingegen wurden Coronaviren (25,7%) am häufigsten gefunden, gefolgt von *E. coli* (17,0%), Kryptosporidien (11,7%) und Rotaviren (9,1%) (Haschek et al., 2006).

VI. SCHLUSSFOLGERUNG



Trotz neuer Erkenntnisse bleiben viele Fragen bezüglich der Giardiose bei Kälbern offen:

- Ist *Giardia* spp. ein primärer Auslöser von Durchfall bei Kälbern?
- Unter welchen Bedingungen kommt es zum Auftreten von Symptomen?
- Gibt es eine Art-spezifische Pathogenität?
- Welche Rolle spielen Giardien bei Mischinfektionen?
- Welche Auswirkungen hat eine asymptomatische Infektion?
- Wie ist die zoonotische Bedeutung dieses Erregers zu beurteilen?

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Durchfallerkrankungen, oft ausgelöst durch virale, bakterielle und parasitäre Erreger, stellen ein großes Problem in der Kälberaufzucht dar.

Ziel der Studie war zum einen, aktuelle Daten zum Vorkommen von Giardien, Kryptosporidien und Eimerien bei durchfallkranken sowie gesunden Kälbern in Süddeutschland zu erhalten, wobei die Rolle von *Giardia* spp. im Mittelpunkt der Untersuchungen stand. Von Januar bis Dezember 2012 wurden dazu 1564 Kotproben durchfallkranker Tiere und 185 Kotproben gesunder Kälber mikroskopisch untersucht. Die Infektionsraten in den Proben durchfallkranker Kälber lagen bei 7,2% für *Giardia* spp., 41,3% für *Cryptosporidium* spp. und 13,3% für *Eimeria* spp. Die Mehrheit dieser Proben (n=1282) wurde mittels ELISA zusätzlich auf *E.coli*, Rota-, Coronaviren und Kryptosporidien untersucht, wobei Nachweisraten von 0,9%, 37,8%, 3,4% und 45,3% erzielt wurden. In 23,2% der Proben gesunder Kälber wurde *Giardia* spp. diagnostiziert, in 2,7% *Cryptosporidium* spp. und in 45,9% *Eimeria* spp. Bei Betrachtung der altersabhängigen Infektionsraten wird deutlich, dass Giardien bei durchfallkranken, älteren Kälbern von Bedeutung sind. Die Auswirkungen einer subklinischen Giardiose auf die Entwicklung der Tiere bleiben, ebenso wie die Bedingungen, unter denen es zum Auftreten von Symptomen kommt, weiter unklar.

Weiteres Ziel der Studie war, das Vorkommen verschiedener *Giardia*-Arten bei gesunden und durchfallkranken Kälbern in Süddeutschland zu untersuchen. Dafür wurden 152 mikroskopisch *Giardia*-positive Proben genotypisiert. In 91,8% der PCR positiven Proben wurde *G. bovis* identifiziert, in 7,3% *G. duodenalis* und in 0,9% eine Mischinfektion von *G. bovis* und *G. duodenalis*. Weiter gelang eine Identifizierung der Sub-Genotypen A1, E2 und E3 innerhalb dieser Proben. Während ein Nachweis von *G. duodenalis* nur in Mischinfektion mit Kryptosporidien oder Eimerien gelang, wurde *G. bovis* in einigen Proben durchfallkranker Kälber als Monoinfektion nachgewiesen. Dies lässt einen möglichen Beitrag der Rinder-spezifischen Art *G. bovis* zum Durchfallgeschehen vermuten. Das Vorkommen der zoonotischen Art *G. duodenalis* in Kälbern birgt ein potentielles Risiko für den Menschen, wobei auch die Übertragung vom Mensch auf das Tier denkbar ist.

VIII. SUMMARY

Diarrhoea, often caused by viral, bacterial and parasitic pathogens, represents a massive problem in the rearing of calves.

One aim of the study was to obtain current data about the occurrence of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. in diarrhoeic and healthy calves in Southern Germany with the focus on the role of *Giardia* spp. For this reason 1564 faecal samples of diarrhoeic animals and 185 faecal samples of healthy calves were analysed using microscopic methods between January and December 2012. In the samples of diarrhoeic calves the infection rate of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. was 7.2%, 41.3% and 13.3%, respectively. The majority of these samples (n=1282) were additionally analysed for *E.coli*, Rota-, Coronavirus and *Cryptosporidium* spp. using an ELISA. The detection rates were 0.9%, 37.8%, 3.4% and 45.3%, respectively. The samples of healthy calves were diagnosed positive for *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Eimeria* spp. in 23.3%, 2.7% and 45.9%, respectively. Considering the age dependent infection rates, the results show that *Giardia* spp. is of importance for diarrhoeic older calves. The impact of a subclinical giardiasis on the animals' development and the conditions, under which symptoms appear, remain unclear.

A further aim of the study was to investigate the occurrence of the different *Giardia*-species in healthy and diarrhoeic calves in Southern Germany. For this reason 152 faecal samples, diagnosed *Giardia*-positive by microscopy, were characterised by PCR and sequencing. *G. bovis* was identified in 91.8% of the PCR-positive samples, whilst *G. duodenalis* was detected in 7.3% and a mixed infection of *G. bovis* and *G. duodenalis* was detected in 0.9%. In addition, the sub-genotypes A1, E2 and E3 could be identified. Whilst the detection of *G. duodenalis* was only possible in mixed-infections with *Cryptosporidium* spp. or *Eimeria* spp., *G. bovis* was identified as a mono-infection in some samples of diarrhoeic calves. This suggests that the livestock-specific species *G. bovis* might contribute to diarrhoea. The occurrence of the zoonotic species *G. duodenalis* in calves poses a potential risk for humans, whereby also the transmission from humans to animals is possible.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

- Angus, K.W., Tzipori, S., Gray, E.W., 1982. Intestinal lesions in specific-pathogen-free lambs associated with a *cryptosporidium* from calves with diarrhea. *Vet Pathol.* 19, 67-78.
- Appelbee, A.J., Frederick, L.M., Heitman, T.L., Olson, M.E., 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Vet Parasitol.* 112, 289-294.
- Armson, A., Thompson, R.C., Reynoldson, J.A., 2003. A review of chemotherapeutic approaches to the treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev of Anti Inf Ther.* 1, 297-305.
- Bangoura, B., Mundt, H.C., Schmäschke, R., Westphal, B., Dauschies, A., 2012. Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *Parasitol Res.* 110, 875-881.
- Bartels, C.J., Holzhauser, M., Jorritsma, R., Swart, W.A., Lam, T.J., 2010. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev Vet Med.* 93, 162-169.
- Becher, K.A., Robertson, I.D., Fraser, D.M., Palmer, D.G., Thompson, R.C., 2004. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Vet Parasitol.* 123, 1-9.
- Bjorkman, C., Svensson, C., Christensson, B., de Verdier, K., 2003. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Vet Scand.* 44, 145-152.
- Boone, J.H., Wilkins, T.D., Nash, T.E., Brandon, J.E., Macias, E.A., Jerris, R.C., Lysterly, D.M., 1999. TechLab and alexon *Giardia* enzyme-linked immunosorbent assay kits detect cyst wall protein 1. *J Clin Microbiol.* 37, 611-614.
- Bürger, H.-J., 1983. *Eimeria*-Infektionen beim Rind. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 96, 350-357.
- Caccio, S.M., De Giacomo, M., Pozio, E., 2002. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol.* 32, 1023-1030.

- Caccio, S.M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., Pozio, E., 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol.* 38, 1523-1531.
- Caccio, S.M., Sprong, H., 2011. Epidemiology of giardiasis in humans. In: Lujan, H.D., Svard, S.G. (Eds.), *Giardia A Model Organism*. Springer Wien, New York, pp. 16-28.
- Castro-Hermida, J.A., Gonzalez-Losada, Y.A., Ares-Mazas, E., 2002. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (NW Spain). *Vet Parasitol.* 106, 1-10.
- Castro-Hermida, J.A., Carro-Corral, C., Gonzalez-Warleta, M., Mezo, M., 2006. Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 53, 244-246.
- Castro-Hermida, J.A., Almeida, A., Gonzalez-Warleta, M., Correia da Costa, J.M., Rumbo-Lorenzo, C., Mezo, M., 2007. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol Res.* 101, 1443-1448.
- Cavalier-Smith, T., 2003. The excavate protozoan phyla Metamonada Grasse emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozooa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53, 1741-1758.
- Cirak, V.Y., Bauer, C., 2004. Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for the detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dogs and cats. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 117, 410-413.
- Coklin, T., Farber, J., Parrington, L., Dixon, B., 2007. Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol.* 150, 297-305.
- Cornelissen, A.W., Verstegen, R., van den Brand, H., Perie, N.M., Eysker, M., Lam, T.J., Pijpers, A., 1995. An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms. *Vet Parasitol.* 56, 7-16.
- Cotton, J.A., Beatty, J.K., Buret, A.G., 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int J Parasitol.* 41, 925-933.
- Dauguschies, A., Najdrowski, M., 2005. Eimeriosis in cattle: current understanding. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 52, 417-427.

- Dauguschies, A., Agneessens, J., Goossens, L., Mengel, H., Veys, P., 2007. The effect of a metaphylactic treatment with diclazuril (Vecoxan) on the oocyst excretion and growth performance of calves exposed to a natural *Eimeria* infection. *Vet Parasitol.* 149, 199-206.
- de Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E., 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol.* 29, 1269-1287.
- de la Fuente, R., Garcia, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Luzon, M., Cid, D., Garcia, S., Orden, J.A., Gomez-Bautista, M., 1998. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev Vet Med.* 36, 145-152.
- de la Fuente, R., Luzon, M., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Garcia, A., Cid, D., Orden, J.A., Garcia, S., Sanz, R., Gomez-Bautista, M., 1999. *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet Parasitol.* 80, 179-185.
- Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pintar, K., Pollari, F., Kelton, D., Farber, J., 2011. The potential for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from beef and dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet Parasitol.* 175, 20-26.
- DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med.* 332, 855-859.
- Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P., 2008. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, Vol 2.* Enke Verlag, Stuttgart.
- Enemark, H.L., Dahl, J., Enemark, J.M., 2013. Eimeriosis in Danish dairy calves - correlation between species, oocyst excretion and diarrhoea. *Parasitol Res.* 112 Suppl 1, 169-176.
- Epe, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Wirtherle, N., von der Heyden, V., Welz, C., Beening, J., Radeloff, I., Hellmann, K., Schnieder, T., Krieger, K., 2005. Efficacy of toltrazuril as a metaphylactic and therapeutic treatment of coccidiosis in first-year grazing calves. *Parasitol Res.* 97, S127-133.
- Faber, J.E., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Burger, H.J., Zahner, H., 2002. *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. *Vet Parasitol.* 104, 1-17.

- Fayer, R., Gasbarre, L., Pasquali, P., Canals, A., Almeria, S., Zarlenga, D., 1998. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *Int J Parasitol.* 28, 49-56.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., Greiner, E., 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet Parasitol.* 135, 105-112.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., 2007. Prevalence of *Cryptosporidium* species and genotypes in mature dairy cattle on farms in eastern United States compared with younger cattle from the same locations. *Vet Parasitol.* 145, 260-266.
- Fayer, R., Santin, M., Trout, J.M., 2008. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet Parasitol.* 156, 191-198.
- Feng, Y., Ortega, Y., Cama, V., Terrel, J., Xiao, L., 2008. High intragenotypic diversity of *Giardia duodenalis* in dairy cattle on three farms. *Parasitol Res.* 103, 87-92.
- Feng, Y., Xiao, L., 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 24, 110-140.
- Fiedler, v.H.-H., 1985. Zur Verbreitung von Kryptosporidien unter norddeutschen Rinderbeständen. *Tierärztl Umschau.* 40, 526-528.
- Friend, S.C., Stockdale, P.H., 1980. Experimental *Eimeria bovis* infection in calves: a histopathological study. *Can J Comp Med.* 44, 129-140.
- Garber, L.P., Salman, M.D., Hurd, H.S., Keefe, T., Schlater, J.L., 1994. Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *J Am Vet Med Assoc.* 205, 86-91.
- Garcia, A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Orden, J.A., Cid, D., Sanz, R., Gomez-Bautista, M., de la Fuente, R., 2000. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 23, 175-183.
- Geurden, T., Claerebout, E., Vercruyse, J., Berkvens, D., 2004. Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a Bayesian approach. *Int J Parasitol.* 34, 1121-1127.
- Geurden, T., Claerebout, E., Dursin, L., Deflandre, A., Bernay, F., Kaltsatos, V., Vercruyse, J., 2006a. The efficacy of an oral treatment with paromomycin against an experimental infection with *Giardia* in calves. *Vet Parasitol.* 135, 241-247.
- Geurden, T., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2006b. Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural *Giardia* infection in calves. *Vet Parasitol.* 142, 367-371.

- Geurden, T., Geldhof, P., Levecke, B., Martens, C., Berkvens, D., Casaert, S., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2008. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int J Parasitol.* 38, 259-264.
- Geurden, T., Levecke, B., Pohle, H., De Wilde, N., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2010a. A Bayesian evaluation of two dip-stick assays for the on-site diagnosis of infection in calves suspected of clinical giardiasis. *Vet Parasitol.* 172, 337-340.
- Geurden, T., Vandenhoute, E., Pohle, H., Casaert, S., De Wilde, N., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2010b. The effect of a fenbendazole treatment on cyst excretion and weight gain in calves experimentally infected with *Giardia duodenalis*. *Vet Parasitol.* 169, 18-23.
- Geurden, T., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2010c. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp Parasitol.* 124, 98-106.
- Geurden, T., Vanderstichel, R., Pohle, H., Ehsan, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Morgan, E.R., Camuset, P., Capelli, G., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2012. A multicentre prevalence study in Europe on *Giardia duodenalis* in calves, with molecular identification and risk factor analysis. *Vet Parasitol.* 190, 383-390.
- Gillhuber, J., Schrödl, C., Pfister, K., Scheuerle, M., 2013. Nachweis von *Cryptosporidium* spp. und *Giardia* spp. in Kotproben von Kälbern. *Kompakt Vet.* 5, 6.
- Girouard, D., Gallant, J., Akiyoshi, D.E., Nunnari, J., Tzipori, S., 2006. Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *J Parasitol.* 92, 399-400.
- Göbel, E., 1991. Die Kryptosporidiose des neugeborenen Kalbes: Erreger, Krankheitsgeschehen und Bekämpfung. *Prakt Tierarzt. Colleg Vet XXI (1990)*, 14-16.
- Goh, S., Reacher, M., Casemore, D.P., Verlander, N.Q., Chalmers, R., Knowles, M., Williams, J., Osborn, K., Richards, S., 2004. Sporadic cryptosporidiosis, North Cumbria, England, 1996-2000. *Emerg Infect Dis.* 10, 1007-1015.
- Gow, S., Waldner, C., 2006. An examination of the prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves from western Canadian cow-calf herds. *Vet Parasitol.* 137, 50-61.
- Graczyk, T.K., Bosco-Nizeyi, J., Ssebide, B., Thompson, R.C., Read, C., Cranfield, M.R., 2002. Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (assemblage) A infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. *J Parasitol.* 88, 905-909.
- Guarino, A., Canani, R.B., Pozio, E., Terracciano, L., Albano, F., Mazzeo, M., 1994. Enterotoxic effect of stool supernatant of *Cryptosporidium*-infected calves on human jejunum. *Gastroenterology.* 106, 28-34.

- Gül, A., Cicek, M., Kilinc, O., 2008. Prevalence of *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in calves in the Van province. *Turkiye Parazitol Derg.* 32, 202-204.
- Hannes, I.S., Gjerde, B., Robertson, L., 2006. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet Parasitol.* 140, 204-216.
- Haschek, B., Klein, D., Benetka, V., Herrera, C., Sommerfeld-Stur, I., Vilcek, S., Moestl, K., Baumgartner, W., 2006. Detection of bovine torovirus in neonatal calf diarrhoea in Lower Austria and Styria (Austria). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 53, 160-165.
- Heine, J., Boch, J., 1981. Kryptosporidien-Infektionen beim Kalb. Nachweis, Vorkommen und experimentelle Übertragung. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 94, 289-292.
- Heine, J., 1982. Eine einfache Nachweismethode für Kryptosporidien im Kot. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B.* 29, 324-327.
- Heine, J., Pohlenz, J.F., Moon, H.W., Woode, G.N., 1984. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *J Infect Dis.* 150, 768-775.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ryan, U.M., Olson, M.E., Thompson, R.C., 2002. Successful in vitro cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol.* 32, 1719-1726.
- Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Ng'anzo, M., Ryan, U.M., Olson, M.E., Cox, P.T., Monis, P.T., Thompson, R.C., 2004. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol.* 34, 769-777.
- Homan, W.L., Gilsing, M., Bentala, H., Limper, L., van Knapen, F., 1998. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. *Parasitol Res.* 84, 707-714.
- Homan, W.L., Mank, T.G., 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 31, 822-826.
- Hopkins, R.M., Meloni, B.P., Groth, D.M., Wetherall, J.D., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C., 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol.* 83, 44-51.
- Huetink, R.E., van der Giessen, J.W., Noordhuizen, J.P., Ploeger, H.W., 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol.* 102, 53-67.

- Hunt, C.L., Ionas, G., Brown, T.J., 2000. Prevalence and strain differentiation of *Giardia intestinalis* in calves in the Manawatu and Waikato regions of North Island, New Zealand. *Vet Parasitol.* 91, 7-13.
- Jäger, M., Gauly, M., Bauer, C., Failing, K., Erhardt, G., Zahner, H., 2005. Endoparasites in calves of beef cattle herds: management systems dependent and genetic influences. *Vet Parasitol.* 131, 173-191.
- Joachim, A., Krull, T., Schwarzkopf, J., Dauschies, A., 2003. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Vet Parasitol.* 112, 277-288.
- Jolley, W.R., Bardsley, K.D., 2006. Ruminant coccidiosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 22, 613-621.
- Kemper, N., Henze, C., 2009. Effects of pastures' re-wetting on endoparasites in cattle in northern Germany. *Vet Parasitol.* 161, 302-306.
- Khan, S.M., Debnath, C., Pramanik, A.K., Xiao, L., Nozaki, T., Ganguly, S., 2010. Molecular characterization and assessment of zoonotic transmission of *Cryptosporidium* from dairy cattle in West Bengal, India. *Vet Parasitol.* 171, 41-47.
- Khan, S.M., Debnath, C., Pramanik, A.K., Xiao, L., Nozaki, T., Ganguly, S., 2011. Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol.* 178, 342-345.
- Koudela, B., Jiri, V., 1997. Experimental cryptosporidiosis in kids. *Vet Parasitol.* 71, 273-281.
- Koutny, H., Joachim, A., Tichy, A., Baumgartner, W., 2012. Bovine *Eimeria* species in Austria. *Parasitol Res.* 110, 1893-1901.
- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., Caccio, S.M., 2005. Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int J Parasitol.* 35, 207-213.
- Lassen, B., Viltrop, A., Raaperi, K., Jarvis, T., 2009. *Eimeria* and *Cryptosporidium* in Estonian dairy farms in regard to age, species, and diarrhoea. *Vet Parasitol.* 166, 212-219.
- Learmonth, J.J., Ionas, G., Pita, A.B., Cowie, R.S., 2003. Identification and genetic characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato Region of New Zealand. *Water Sci and Technol.* 47, 21-26.
- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet Parasitol.* 89, 1-9.

- Lefay, D., Naciri, M., Poirier, P., Chermette, R., 2001. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in suckling calves. *Vet Rec.* 148, 108-112.
- Lendner, M., Etzold, M., Dauschies, A., 2011. Kryptosporidiose - ein Update. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 124, 473-484.
- Lentze, T., Hofer, D., Gottstein, B., Gaillard, C., Busato, A., 1999. Häufigkeiten und Bedeutung von Endoparasiten bei Kälbern aus Schweizer Mutterkuhbetrieben. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 106, 275-281.
- Luginbühl, A., Reitt, K., Metzler, A., Kollbrunner, M., Corboz, L., Deplazes, P., 2005. Feldstudie zu Prävalenz und Diagnostik von Durchfallerregern beim neonaten Kalb im Einzugsgebiet einer schweizerischen Nutztierpraxis. *Schweizer Arch Tierheilkd.* 147, 245-252.
- Mendonca, C., Almeida, A., Castro, A., de Lurdes Delgado, M., Soares, S., da Costa, J.M., Canada, N., 2007. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal. *Vet Parasitol.* 147, 47-50.
- Mengel, H., 2012. Epidemiologische Untersuchungen zum Auftreten und Verlauf von bovinen *Eimeria* spp. Infektionen in Deutschland, Belgien, Frankreich und der Tschechischen Republik. Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig.
- Meyer, E.A., Jarroll, E.J., 1980. Giardiasis. *American J Epidemiol.* 111, 1-12.
- Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L., 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol.* 16, 1135-1144.
- Monis, P.T., Thompson, R.C., 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect Genet Evol.* 3, 233-244.
- Monis, P.T., Caccio, S.M., Thompson, R.C., 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol.* 25, 93-100.
- Mundt, H.C., Bangoura, B., Mengel, H., Keidel, J., Dauschies, A., 2005. Control of clinical coccidiosis of calves due to *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* with toltrazuril under field conditions. *Parasitol Res.* 97 Suppl 1, S134-142.
- Ng, J., Yang, R., McCarthy, S., Gordon, C., Hijjawi, N., Ryan, U., 2011. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in pre-weaned calves in Western Australia and New South Wales. *Vet Parasitol.* 176, 145-150.
- O'Donoghue, P.J., 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int J Parasitol.* 25, 139-195.

- O'Handley, R.M., Olson, M.E., McAllister, T.A., Morck, D.W., Jelinski, M., Royan, G., Cheng, K.J., 1997. Efficacy of fenbendazole for treatment of giardiasis in calves. *Am J Vet Res.* 58, 384-388.
- O'Handley, R.M., Cockwill, C., McAllister, T.A., Jelinski, M., Morck, D.W., Olson, M.E., 1999. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc.* 214, 391-396.
- O'Handley, R.M., Cockwill, C., Jelinski, M., McAllister, T.A., Olson, M.E., 2000. Effects of repeat fenbendazole treatment in dairy calves with giardiasis on cyst excretion, clinical signs and production. *Vet Parasitol.* 89, 209-218.
- O'Handley, R.M., Ceri, H., Anette, C., Olson, M.E., 2003. Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. *Vet Parasitol.* 113, 89-98.
- O'Handley, R.M., Olson, M.E., 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 22, 623-643.
- Olson, M.E., McAllister, T.A., Deselliers, L., Morck, D.W., Cheng, K.J., Buret, A.G., Ceri, H., 1995. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am J Vet Res.* 56, 1470-1474.
- Olson, M.E., Guselle, N.J., O'Handley, R.M., Swift, M.L., McAllister, T.A., Jelinski, M.D., Morck, D.W., 1997. *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. *Can Vet J.* 38, 703-706.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., 2000. *Giardia* vaccination. *Parasitol Today.* 16, 213-217.
- Olson, M.E., O'Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C., 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol.* 20, 185-191.
- Qualitätsmanagement-Methodenhandbuch, 2012. Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, Tierärztliche Fakultät, LMU München.
- Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., del Cacho, E., Clavel, A., Causape, A.C., 1996. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle in Aragon (northeastern Spain). *Vet Parasitol.* 66, 139-146.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>
- Ralston, B.J., Cockwill, C.L., Guselle, N.J., Van Herk, F.H., McAllister, T.A., Olson, M.E., 2003a. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium andersoni* and their effects on performance in feedlot beef cattle. *Can J ANim Sci.* 83, 153-159.

- Ralston, B.J., McAllister, T.A., Olson, M.E., 2003b. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. *Vet Parasitol.* 114, 113-122.
- Read, C., Walters, J., Robertson, I.D., Thompson, R.C., 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol.* 32, 229-231.
- Read, C.M., Monis, P.T., Thompson, R.C., 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 4, 125-130.
- Rehman, T.U., Khan, M.N., Sajid, M.S., Abbas, R.Z., Arshad, M., Iqbal, Z., Iqbal, A., 2011. Epidemiology of *Eimeria* and associated risk factors in cattle of district Toba Tek Singh, Pakistan. *Parasitol Res.* 108, 1171-1177.
- Rendtorff, R.C., 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg.* 59, 209-220.
- Sanchez, R.O., Romero, J.R., Founroge, R.D., 2008. Dynamics of *Eimeria* oocyst excretion in dairy calves in the Province of Buenos Aires (Argentina), during their first 2 months of age. *Vet Parasitol.* 151, 133-138.
- Santin, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol.* 122, 103-117.
- Santin, M., Trout, J.M., Fayer, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol.* 155, 15-23.
- Santin, M., Dargatz, D., Fayer, R., 2012. Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblages in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. *Vet Parasitol.* 183, 231-236.
- Savioli, L., Smith, H., Thompson, A., 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol.* 22, 203-208.
- Schnieder, T., 2006. *Veterinärmedizinische Parasitologie*, Vol 6. Parey Verlag, Stuttgart.
- Selbitz, H.J., Truyen, U., Valentin-Weigand, P., 2011. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektins- und Seuchenlehre*, Vol 9. Enke Verlag, Stuttgart.
- Snodgrass, D.R., Terzolo, H.R., Sherwood, D., Campbell, I., Menzies, J.D., Syngé, B.A., 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet Rec.* 119, 31-34.
- Souza, S.L., Gennari, S.M., Richtzenhain, L.J., Pena, H.F., Funada, M.R., Cortez, A., Gregori, F., Soares, R.M., 2007. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by

- sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (gdh) coding gene. *Vet Parasitol.* 149, 258-264.
- Sprong, H., Caccio, S.M., van der Giessen, J.W., 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 3, e558.
- Stantic-Pavlinic, M., Xiao, L., Glaberman, S., Lal, A.A., Orazen, T., Rataj-Verglez, A., Logar, J., Berce, I., 2003. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. *Wien Klin Wochenschr.* 115, 125-127.
- Starkey, S.R., Wade, S.E., Schaaf, S., Mohammed, H.O., 2005. Incidence of *Cryptosporidium parvum* in the dairy cattle population in a New York City Watershed. *Vet Parasitol.* 131, 197-205.
- Stewart, I.D., Smith, R.P., Ellis-Iversen, J., 2008. *Eimeria* species in cattle on farms in England and Wales. *Vet Rec.* 162, 482-483.
- Sturdee, A.P., Bodley-Tickell, A.T., Archer, A., Chalmers, R.M., 2003. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet Parasitol.* 116, 97-113.
- Thompson, R.C., Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S., Hijjawi, N.S., 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In: Baker, R.J., Muller, R., Rollinson, D. (Eds.), *Advances in Parasitology*. Elsevier, London, pp. 77-158.
- Thompson, R.C., Palmer, C.S., O'Handley, R., 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J.* 177, 18-25.
- Thompson, R.C., Monis, P., 2012. *Giardia*-from genome to proteome. In: Rollinson, D., Hay, S.I. (Eds.), *Advances in Parasitology*. Elsevier, London, pp. 57-95.
- Thornton, S.A., West, A.H., DuPont, H.L., Pickering, L.K., 1983. Comparison of methods for identification of *Giardia lamblia*. *Am J Clin Pathol.* 80, 858-860.
- Trotz-Williams, L.A., Jarvie, B.D., Peregrine, A.S., Duffield, T.F., Leslie, K.E., 2011. Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of cryptosporidiosis in dairy calves. *Vet Rec.* 168, 509.
- Trout, J.M., Santin, M., Greiner, E., Fayer, R., 2004. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. *Vet Parasitol.* 124, 179-186.
- Trout, J.M., Santin, M., Greiner, E., Fayer, R., 2005. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in post-weaned dairy calves. *Vet Parasitol.* 130, 177-183.
- Trout, J.M., Santin, M., Greiner, E.C., Fayer, R., 2006. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in 1-2 year old dairy cattle. *Vet Parasitol.* 140, 217-222.
- Trout, J.M., Santin, M., Fayer, R., 2007. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in adult dairy cows. *Vet Parasitol.* 147, 205-209.

- Uehlinger, F.D., O'Handley, R.M., Greenwood, S.J., Guselle, N.J., Gabor, L.J., Van Velsen, C.M., Steuart, R.F., Barkema, H.W., 2007. Efficacy of vaccination in preventing giardiasis in calves. *Vet Parasitol.* 146, 18218-18218.
- Uhde, F.L., Kaufmann, T., Sager, H., Albini, S., Zanoni, R., Schelling, E., Meylan, M., 2008. Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. *Vet Rec.* 163, 362-366.
- Wacker, K., Roffeis, M., Conraths, F.J., 1999. Cow-calf herds in eastern Germany: status quo of some parasite species and a comparison of chemoprophylaxis and pasture management in the control of gastrointestinal nematodes. *Zentralbl Veterinärmed B.* 46, 475-483.
- Wade, S.E., Mohammed, H.O., Schaaf, S.L., 2000a. Epidemiologic study of *Giardia* sp. infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Vet Parasitol.* 89, 11-21.
- Wade, S.E., Mohammed, H.O., Schaaf, S.L., 2000b. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* (*C. muris*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Vet Parasitol.* 93, 1-11.
- Weitzel, T., Dittrich, S., Möhl, I., Adusu, E., Jelinek, T., 2006. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect.* 12, 656-659.
- Wilson, J.M., Hankenson, F.C., 2010. Evaluation of an inhouse rapid ELISA test for detection of giardia in domestic sheep (*Ovis aries*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 49, 809-813.
- Winkworth, C.L., Learmonth, J.J., Matthaei, C.D., Townsend, C.R., 2008a. Molecular characterization of *Giardia* isolates from calves and humans in a region in which dairy farming has recently intensified. *Appl Environ Microbiol.* 74, 5100-5105.
- Winkworth, C.L., Matthaei, C.D., Townsend, C.R., 2008b. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp in calves from a region in New Zealand experiencing intensification of dairying. *N Z Vet J.* 56, 15-20.
- Wood, S.N., 2006. *Generalized Additive Models: An Introduction* with R. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton.
- Wood, S.N., 2011. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. *J Roy Statist Soc Ser B.* 73, 3-36.
- Woods, K.M., Upton, S.J., 2007. In vitro development of *Cryptosporidium parvum* in serum-free media. *Lett Appl Microbiol.* 44, 520-523.

- Xiao, L., Herd, R.P., 1993. Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. J Clin Microbiol. 31, 2944-2946.
- Xiao, L., Herd, R.P., Rings, D.M., 1993. Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. Vet Parasitol. 51, 41-48.
- Xiao, L., Herd, R.P., 1994. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. Vet Parasitol. 55, 257-262.
- Xiao, L., Saeed, K., Herd, R.P., 1996. Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. Vet Parasitol. 61, 165-170.
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J., 2004. *Cryptosporidium* Taxonomy: recent advances and implications for public health. Clin Microbiol Rev. 17, 72-97.
- Zajac, A.M., Johnson, J., King, S.E., 2002. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. J Am Anim Hosp Assoc. 38, 221-224.

X. ABBILDUNGEN

Abb. 1: <i>G. duodenalis</i> morphological group: Trophozoiten (A) und Zysten (B).....	4
Abb. 2: Die 4 wichtigsten Übertragungszyklen von <i>G. duodenalis</i> morphological group.....	9
Abb. 3: MIFC-Methode: Trennung der Schichten nach der Zentrifugation.....	23
Abb. 4: verwendetes Pipettierschema bei der ELISA-Untersuchung.....	24
Abb. a: Aufruf zur Probeneinsendung.....	89
Abb. b: Untersuchungsantrag.....	90

XI. TABELLEN

Tab. 1: Morphologisch differenzierbare <i>Giardia</i> -Arten.....	2
Tab. 2: <i>Giardia</i> -Arten.....	3
Tab. 3: Zuordnung der Sub-Genotypen von <i>G. duodenalis</i> zu MLG Typen und Subassemblages	4
Tab. 4: <i>Cryptosporidium</i> -Arten	11
Tab. 5: <i>Eimeria</i> -Arten des Rindes in Mitteleuropa	16
Tab. 6: PCR-Bedingungen und verwendete Primer	26
Tab. 7: GenBank Nummern, verwendet für den Abgleich mit den <i>Giardia</i> -Sequenzen	28
Tab. a: Prävalenzen von <i>Giardia</i> spp. bei Rindern, teilweise mit Art-Bestimmung.....	91
Tab. b: Sub-Genotypen/Subassemblages von <i>G. duodenalis</i> , <i>G. enterica</i> und <i>G. bovis</i> bei Rindern und teils auch bei Menschen.....	93
Tab. c: Prävalenzen von <i>Cryptosporidium</i> spp. bei Rindern, teils mit Art-Bestimmung.....	94
Tab. d: Prävalenzen von <i>Eimeria</i> spp. bei Rindern, teils mit Art-Bestimmung.....	96
Tab. e: Prävalenzen von <i>E. coli</i> , Rotavirus und Coronavirus bei Rindern	97

XII. ANHANG

Bitte um Unterstützung

München, den 30. März 2012

Sehr geehrte Kollegin, sehr geehrter Kollege,

Durchfall gehört zu den häufigsten Erkrankungen bei jungen Kälbern und gilt als wichtige Todesursache der betroffenen Tiere in den ersten Lebenswochen. Als wichtige parasitäre Erreger gelten hierbei *Cryptosporidium* und in gewissen Regionen auch *Giardia*. Über die tatsächliche Verbreitung und klinische Relevanz dieser beiden Parasiten liegen im süddeutschen Raum kaum Untersuchungen vor.

Im Rahmen einer Dissertation untersuchen wir das Vorkommen dieser Parasiten in Rinderbetrieben.

Für diese Untersuchungen bitten wir Sie um die Einsendung von

KÄLBERKOTPROBEN

(Alter: 0 – 12 Wochen)

mit vollständig ausgefülltem **Untersuchungsantrag***.

Und das bekommen Sie dafür:

- **Kostenfreie Untersuchung** (MIFC, Nativausstrich)
- **Schriftlicher Untersuchungsbericht** (per Email, Fax oder Post)
- **Auf Wunsch können Rota- und Coronaviren sowie *E. coli* zusätzlich abgeklärt werden** (in Bayern erfolgt hierfür eine Kostentübernahme nach § 4(20), Nr.1 der Leistungssatzung der TSK).

Diese Regelungen sind befristet bis 31.12.2012

Vielen Dank für Ihre Unterstützung, wir freuen uns auf die Zusammenarbeit mit Ihnen!

Dres. D. Hamel und M. Scheuerle

*) Ein Untersuchungsantrag liegt bei, bei Mehrbedarf bitte selbst kopieren. Gerne senden wir Ihnen dieses Formular auch per E-Mail zu.

Postanschrift für den Probenversand
Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie, LMU München
Leopoldstr. 5

80802 München

Bei Rückfragen:
Telefon / Fax
Tel. +49 (0)89 2180 - 3621
Fax +49 (0)89 2180 - 3623

E-Mail-Adresse
labor@trpa.vetmed.uni-muenchen.de

Hinweis: Dieses Schreiben samt Anlage wurde freundlicherweise von der Firma Albrecht, Aulendorf, zusammen mit einer Aussendung an ausgewählte Tierarztpraxen versandt.

Abb. a: Aufruf zur Probeneinsendung



Untersuchungsantrag Kälberstudie

Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, LMU München
Diagnostikzentrum



Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. med. vet. Kurt Pfister
Laborleitung: Dr. M. Scheuerle
Leopoldstr. 5 80802 München
Tel.: 089/2180-3622 Fax: 089/2180-3623

Tierarzt (Bitte Blockschrift oder Stempel)		Tierbesitzer	
Name:		Name:	
Vorname:		Vorname:	
Straße:		Straße:	
PLZ, Ort:		PLZ, Ort:	
Tel.:		Tel.:	
E-Mail / Fax:		E-Mail / Fax:	
		TSK-Nr./BALIS:	
Angaben zum Tier/Bestand			
Bestand:	<input type="checkbox"/> Muttertier	<input type="checkbox"/> Kalberaufzucht	<input type="checkbox"/> Milchvieh <input type="checkbox"/>
Durchfallprobleme im Bestand?		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Nachgewiesene Erreger:	<input type="checkbox"/> <i>Giardia</i> spp.	<input type="checkbox"/> Virale Erreger:	
	<input type="checkbox"/> <i>Cryptosporidium</i> spp.	<input type="checkbox"/> Bakterielle Erreger:	
Wird Prophylaxe grundsätzlich durchgeführt?		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Prophylaxe:	<input type="checkbox"/> Halofuginon <input type="checkbox"/> Toltrazuril	<input type="checkbox"/> Kolostrum*	<input type="checkbox"/> Kolostrumersatz*
	<input type="checkbox"/> Antibiotika*, Präparat:	<input type="checkbox"/> Muttertiervakzine*; welche:	
	<input type="checkbox"/> passive Immunisierung* welche:	<input type="checkbox"/> Sonstiges:	
* falls bekannt			
Untersuchung			
<input type="checkbox"/> Kryptosporidien/Giardien (MIFC und Nativausstrich)		<input type="checkbox"/> Rota-, Coronaviren, E. coli F99 **	
** eine Kostenübernahme ist nur in Bayern möglich (nach § 4(20), Nr.1 Leistungssatzung der TSK)			
Tier-ID/Ohrmarke	Alter / Geburtsdatum	Geschlecht	
		<input type="checkbox"/> m	<input type="checkbox"/> w
		<input type="checkbox"/> m	<input type="checkbox"/> w
		<input type="checkbox"/> m	<input type="checkbox"/> w
		<input type="checkbox"/> m	<input type="checkbox"/> w
		<input type="checkbox"/> m	<input type="checkbox"/> w
		<input type="checkbox"/> m	<input type="checkbox"/> w
		<input type="checkbox"/> m	<input type="checkbox"/> w
		<input type="checkbox"/> m	<input type="checkbox"/> w

Bitte beim Probenversand die „Versandvorschriften und Hinweise für Einzelerer“ der Deutschen Post vom 01.01.2007 beachten!

Ort, Datum _____

Unterschrift des Einsenders _____

Wird vom Laborpersonal ausgefüllt:			
Sichtkontrolle:	FB 02 bzw. FB 13 angelegt:	Med. Validation:	Befundversand:

Abb. b: Untersuchungsantrag

Tab. a/1: Prävalenzen von *Giardia* spp. bei Rindern, teilweise mit Art-Bestimmung

(aus Publikationen ab 2000 – nicht erschöpfend)

Land	Nutzung	n - Tiere/ Betriebe	Alter	Kot- konsistenz	Test	Präv. (%)	Herden- prävalenz (%)	n - PCR	Loci	Arten (%)				Referenz
										<i>G. bovis</i>	<i>G. duo.</i>	<i>G. ent.</i>	<i>G. bovis</i> + <i>G. duo.</i>	
Deutschland	M	536/31	2-16 Wo	k.A.	ELISA	51,2	100	27	c	59	41		Geurden et al., 2012	
	k.A.	230/100 90/k.A. 140/k.A.	1-42 d	a+b b a	Flot	6,1 4,4 7,1	k.A.	n.d.	e	38	33		Haschek et al., 2006	
Frankreich	M	477/101	2-16 Wo	k.A.	ELISA	39,8	84,2	26	c	39	61		Geurden et al., 2012	
	M	503/44	2-16 Wo	k.A.	ELISA	32,2	88,6	18	c	20	40		Geurden et al., 2012	
Spanien	M	734/60	0-13 J	a+b	DIF	30,1	93,3	n.d.	e	72	28		Castro-Hermida et al., 2006	
	M	379/60	3-13 J	a	DIF	26,6	96,6	4	c,f	50	29		Castro-Hermida et al., 2007	
Portugal	M + F	291/96 176/96	Kälber Adulte	k.A.	Mikr	14,1 0,6	k.A.	14	c,f	79	14	7	Mendonca et al., 2007	
	M	556/31	2-16 Wo	k.A.	ELISA	54,9	100	14	c	71	29		Geurden et al., 2012	
Belgien	M	294/100 205/100	< 4 Wo 4-10 Wo		DIF	9 41	48	49/45	c/e	41/38	59/24		Geurden et al., 2008	
	F	157/50 176/50	< 4 Wo 4-10 Wo	k.A.	DIF	34 55	64	44/31	c/e	84/71	16/6			
Norwegen	M	1386/136	3-183 d	k.A.	DIF	49,0	93,4	n.d.					Hannes et al., 2006	
Schweden	M	124/75 146/75	≤ 90 Tage	a b	Mikr	24,0 28,5	k.A.	n.d.					Bjorkman et al., 2003	
	M	182/k.A.	< 6 Mon	k.A.	Mikr	9,3	k.A.	n.d.					Gül et al., 2008	
USA	M	513/14 407/14	≤ 7 Wo	k.A.	DIF PCR	44 40	100 100	164	c,e,g	85	15		Trout et al., 2004	

Tab. a/2: Prävalenzen von *Giardia* spp. bei Rindern, teils mit Art-Bestimmung

(aus Publikationen ab 2000 – nicht erschöpfend)

Land	Nutzung	n - Tiere/ Betriebe	Alter	Kot- konsistenz	Test	Präv. (%)	Herden- prävalenz (%)	n - PCR	Loci	Arten (%)			Referenz	
										<i>G. bovis</i> <i>duo.</i>	<i>G. ent.</i>	<i>G. bovis</i> + <i>G. duo.</i>		
USA	M	464/14 456/14	3-11 Mon	k.A.	DIF PCR	31 52	100 100	237	g	87	13		Trout et al., 2005	
USA	M	571/14	12-24 Mon	k.A.	PCR	36	100	204	g	91	9		Trout et al., 2006	
USA	M	541/14	> 2 J	k.A.	PCR	27	100	144	g	94	6		Trout et al., 2007	
USA	F	819/49	6-18 Mon	k.A.	PCR	33,5	85,7	274	g	94,2	3,6	1,6	m	Santin et al., 2012
Kanada	M	97/2	≤ 24 Mon	k.A.	PCR	48,5	100	47	h	46,8	53,2	76,9		Coklin et al., 2007
		46/2	> 24 Mon	k.A.	PCR	28,3	100	13						
Kanada	F	495/9	2-10 Wo	k.A.	DIF	34	100	42	h	97,6	2,4		Appelbee et al., 2003	
Kanada	F	499/k.A.	Kälber	a	DIF	23,2	k.A.	n.d.						Gow et al., 2006
		99/k.A.		b		21,2								
Kanada	F	346/k.A.	Adulte	a	DIF	17,1	k.A.							
		204/k.A.		b		17,2								
Australien	M + F	364/6	≤ 4 Mon	k.A.	PCR	26,9	100	75	i	94,7	1,3	1,3	n,0	Ng et al., 2011
Neuseeland	k.A.	715/13	≤ 8 Wo	a+b	DIF	40,6	k.A.	15	k	73,3	26,7			Hunt et al., 2000
Neuseeland	M	304/36	Kälber	k.A.	DIF	10,5	k.A.	32	k	72	28			Learmonth et al., 2003
		354/36				Adulte				4,5	k.A.	13	15	85
Neuseeland	M	1190/10	≤ 7 Wo	k.A.	DIF	31	100	40	c	88	12			Winkworth et al., 2008 a, b
Indien	M	40/2	< 3 Mon	a+b	Mikr + ELISA	27,5	100	11	c	63,6	27,3	9,1		Khan et al., 2011
		72/2	3-12 Mon			12,5				55,6	22,2	22,2		
		68/2	> 12 Mon			2,9		2		100				
<i>G. duo.</i> - <i>G. duodenalis</i> <i>G. ent.</i> - <i>G. enterica</i> k.A. - keine Angabe Wo - Wochen d - d Mon - Mon J - Jahr														
a - kein Durchfall b - Durchfall c - β-giardin e - tpi f - GDH g - small subunit-rRNA h - 16S rRNA i - 18S rDNA k - rDNA m - <i>G. bovis</i> -ähnlicher Genotyp: 0,7% n - <i>G. duodenalis</i> + <i>G. enterica</i> + <i>G. bovis</i> : 1,3% o - Quenda-Genotyp: 1,3%														

Tab. b: Sub-Genotypen/Subassemblages von *G. duodenalis*, *G. enterica* und *G. bovis* bei Rindern und teils auch bei Menschen (aus Publikationen ab 2000 – nicht erschöpfend)

Land	Loci	Spezies	n	<i>G. duodenalis</i>							<i>G. enterica</i>							<i>G. bovis</i>					Ref.				
				A ^e	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	AI	AII	AIII	B ^e	B1	B3	B4	B5	B6	BIII ^f	BIV ^f		E ^g	E1	E2	E3
Europa	a,b,c	Rind	113							70	39	4															[1]
		Mensch	k.A.							148	446																
Italien	a,b	Rind	24 ^d	4	8	1	2	1																			[2]
		Mensch	37 ^d	5	2	8	3	2	1	1	1																
Italien	a,b,c	Rind	4							4																	[3]
Portugal	a,c	Rind	14																								[4]
Belgien	a,b	Rind	k.A.																								[5]
USA	b	Rind	10																								[6]
		Rind	39																								[7]
Indien	a,b	Rind	22 ^d	3	5																					[8]	
		Mensch	14																								
Brasilien	c	Rind	5																								[9]
		Mensch	37																								

a - β-giardin

b - tpi

c - GDH

d - Anzahl ungleich Summe der gefundenen Sub-Genotypen wegen Mischinfektionen

e - Bestimmung von Sub-Genotypen teilweise nicht durchgeführt oder nicht möglich

f - Definition siehe Homan et al., 1998, Monis et al., 1999

g - neue Sub-Genotypen, bzw. nicht zuordbar

h - Fehlende Übereinstimmung mit Sequenzen von E1,E2 oder E3 bei je 2 bp

x - Nachweis positiv, Anzahl nicht angegeben

E_n - neue Sub-Genotypen von *G. bovis*

Ref. Referenz

[1] Sprong et al., 2009

[2] Lalle et al., 2005

[3] Caccio et al., 2008

[4] Mendonca et al., 2007

[5] Geurden et al., 2008

[6] Feng et al., 2008

[7] Ng et al., 2011

[8] Khan et al., 2011

[9] Souza et al., 2007

Tab. c/1: Prävalenzen von *Cryptosporidium* spp. bei Rindern, teils mit Art-Bestimmung

(aus intern. Publikationen ab 2000, deutschen Publikationen ab 1980 – nicht erschöpfend)

Land	Nutzung	n-Tiere/ Betriebe	Alter	Kot- konsistenz	Test	Präv. (%)	Herden- präval. (%)	n - PCR	Loci	Arten (%)				Referenz
										<i>C. parvum</i>	<i>C. andersoni</i>	<i>C. bovis</i>	<i>C. ryanae</i> weitere	
Deutschland	k.A.	4060/k.A.	0-4 Wo	b	k.A.	21,5%	k.A.	n.d.					Joachim et al., 2003	
Deutschland	k.A.	322/k.A. 222/k.A.	6-28 d	a b	Mikr	13,7 39,6	k.A. k.A.	n.d. n.d.					Heine und Boch, 1981	
Deutschland	k.A.	284/155	6-28 d	b	Mikr	44	45,2	n.d.					Fiedler, 1985	
Österreich	k.A.	230/100 90/k.A. 140/k.A.	1-42 d	a+b b a	Flot	11,7 25,6 2,9	k.A.	n.d. n.d. n.d.					Haschek et al., 2006	
Schweiz	M	147/71	1-21 d	b	Mikr	55,0	41,7	n.d.					Uhde et al., 2008	
Schweiz	k.A.	46/26 14/5	2-21 d	b a	Mikr	43 21	k.A.	n.d. n.d.					Luginbühl et al., 2005	
Spanien	M	734/60	0-13 J	a+b	DIF	14,2	66,7	n.d.					Castro-Hermida et al., 2006	
Spanien	M	379/60	3-13 J	a	DIF	8,4	48,3	10	c,e	100			Castro-Hermida et al., 2007	
Spanien	M	218/65	1-30 d	b	Mikr + ELISA	52,3	k.A.	n.d.					Garcia et al., 2000	
Portugal	M+F	291/96 176/96	Kälber Adulte	k.A.	Mikr	25,4 4,5	k.A.	70	c,e	98			Mendonca et al., 2007	
Norwegen	M	1386/136	3-183 d	k.A.	DIF	12,0	59,9	n.d.					Hannes et al., 2006	
Estland	M	928/45	Kälber + Adulte	a+b	Mikr	30	84						Lassen et al., 2009	
		306/45	< 3 Mon			24	68	1		100				
		277/45	3-12 Mon			29	63	1	c,e	100				
		345/45	> 12 Mon			37	65	1		100				

Tab. c/2: Prävalenzen von *Cryptosporidium* spp. bei Rindern, teils mit Art-Bestimmung

(aus internat. Publikationen ab 2000, deutschen Publikationen ab 1980 – nicht erschöpfend)

Land	Nutzung	n-Tiere/ Betriebe	Alter	Kot- konsistenz	Test	Präv. (%)	Herden- prävalenz (%)	n- PCR	Loci	Arten (%)				Referenz	
										<i>C. parvum</i>	<i>C. andersoni</i>	<i>C. bovis</i>	<i>C. ryanae</i>		weitere
Niederlande	M	424/108	1-21 d			27,8	57							Bartels et al., 2010	
		173/k.A.	1-7 d	a+b	Schnell	15,6	k.A.	n.d.							
		153/k.A.	8-14 d			49,7	k.A.								
		98/k.A.	15-21 d			15,3	k.A.								
Schweden	M	124/75	≤ 90 d	a	Mikr	5,0	k.A.	n.d.					Bjorkman et al., 2003		
		146/75		b		11,0	k.A.								
Türkei	M	182/k.A.	< 6 Mon	k.A.	Mikr	13,2	k.A.	n.d.					Gül et al., 2008		
		503/15	5 d - 2 Mon	k.A.	DIF	50,3	100	161	c	85	1	i		Santini et al., 2004	
USA	M	468/15	3-11 Mon	k.A.		19,7	100	117		1	13	k			
		97/2	≤ 24 Mon	k.A.	PCR	40,2	100	33	e	94		6		Coklin et al., 2007	
Kanada	M	46/2	> 24 Mon	k.A.		0	0								
		499/k.A.	Kälber	a		2,8									
Kanada	F	99/k.A.		b	DIF	4,0	k.A.	n.d.					Gow et al., 2006		
		346/k.A.	Adulte	a		1,4									
Australien	M+F	204/k.A.		b		0,5									
		364/6	≤ 4 Mon	k.A.	PCR	22,3	100	59	c	24	47	25	l,m	Ng et al., 2011	
Neuseeland	M	304/36	Kälber	k.A.	DIF	10,9	k.A.	33	f	100			Learmonth et al., 2003		
		354/36	Adulte	k.A.		0,6	k.A.	2		100					
Indien	M	112/2	Kälber	k.A.	Mikr +	16,1	k.A.	18	c	33	7	39	17	Khan et al., 2010	
		68/2	Adulte	k.A.	ELISA	4,4	k.A.	3		33	33				n

f - rDNA
g - Mischinfektion von *C. parvum* und *C. andersoni*: 1%
h - Mischinfektion von *C. parvum* und *C. meleagridis*: 1%
i - Boviner Genotyp: 9%, Deer-like Genotyp: 5%
k - Boviner Genotyp: 55%, Deer-like Genotyp: 31%
l - Mischinfektion von *C. parvum* und *C. ryanae*: 2%
m - Schweine-Genotyp II: 2%
n - Schweine-Genotyp II: 6%

Flot - Flotation
Schnell - Schnelltest
Präv - Prävalenz
Herdenprävalenz - Herdenprävalenz
a - kein Durchfall
b - Durchfall
c - 18S rRNA
e - Hitzeschockprotein-70

k.A. - keine Angabe
M - Milchrinder
F - Fleischrinder
d - Tage
Wo - Wochen
Mon - Monate
J - Jahr
Mikr - Mikroskopisch

Tab. d: Prävalenzen von *Eimeria* spp. bei Rindern, teils mit Art-Bestimmung

(aus Publikationen ab 2000 – nicht erschöpfend)

Land	Nutzung	n - Tiere/ Betriebe	Alter	Kot- konsistenz	Test	Präv (%)	Herden- prävalenz (%)	Arten (%)*					Referenz
								<i>E. bovis</i>	<i>E. zuernii</i>	<i>E. aub.</i>	<i>E. ellip.</i>	<i>E. alab.</i>	
Deutschland	M+F	633/65	4 Wo - 9 Mon	a+b	Flot	59,4	95,4	28,8	29,1				Bangoura et al., 2012
Österreich	v.a. M	868/296	Kälber ≥ 3 Wo	a+b	Komb	83,7	98,0	65,5	63,9	56,8	54,1	45,6	Koutny et al., 2012
				b	Flot	10,4 14,4 7,8	k.A. k.A. k.A.						Haschek et al., 2006
Estland	M	230/100 90/k.A. 140/k.A.	1-42 d	a		37	100	30	23	6	14	4	Lassen et al., 2009
				a+b	Q- Flot	35 63 17	77 97 53						
					Mc	60,9	96,2	28	32	23	37	7	Enemark et al., 2013
Dänemark	M	453/52	3 Wo - 6 Mon	k.A.	Flot	22,53	k.A.					Gül et al., 2008	
Türkei	M	182/k.A.	< 6 Mon	k.A.	Flot	47,1	k.A.	24,7	22,7	0	13,8	11,4	Rehman et al., 2011
Pakistan	k.A.	584/45	3-10 J	k.A.	Flot								

E. aub. - *E. auburnensis*
E. ellip. - *E. ellipsoidalis*
E. alab. - *E. alabamensis*
M - Milchrinder
F - Fleischrinder
d - Tage
Wo - Wochen
Mon - Monate
J - Jahre
Flot - Flotation
Komb - Kombinierte Flotation Sedimentation
Q-Flot - Quantitative Flotation (Mc Master)
Mc - modifiziertes Mc-Master Verfahren
Präv - Prävalenz
Herdenprävalenz - Herdenprävalenz
a - kein Durchfall
b - Durchfall
* - Prävalenzen von 5 *Eimeria*-Arten

Tab. e: Prävalenzen von *E. coli*, Rotavirus und Coronavirus bei Rindern

(aus Publikationen ab 2000 – nicht erschöpfend)

Land	Nutzung	n-Tiere/ Betriebe	Alter	Kot- Konsistenz	Test			Prävalenz (%)			Referenz
					<i>E.coli</i> F5	Rotavirus	Coronavirus	<i>E. coli</i> F5	Rotavirus	Coronavirus	
Österreich	k.A.	230/100	1-42 d	a+b	Anzucht	RT-PCR	RT-PCR	17,0	9,1	25,7	Haschek et al., 2006
		90/k.A. 140/k.A.		b a	ELISA + Anzucht	ELISA + PAGE	18,9 15,7	18,9 2,9	40,0 16,4		
Spanien	M	218/65	1-30 d	b	ELISA + Anzucht	ELISA	ELISA	11,9	42,7	7,3	Garcia et al., 2000
Schweiz	k.A.	46*/26	2-21 d	b	Anzucht	ELISA	ELISA	3	46	0	Luginbühl et al., 2005
		14/5		a	0	7	7				
Schweiz	M	147/71	1-21 d	b	Anzucht	ELISA	ELISA	5,5	58,7	7,8	Uhde et al., 2008
Niederlande	M	424/108	1-21 d					2,6	17,7	3,1	Bartels et al., 2010
		173/k.A.	1-7 d		Schnelltest	Schnelltest	Schnelltest	4,6	14,5	2,9	
		153/k.A.	8-14 d	a+b				0,7	25,5	4,7	
		98/k.A.	15-21 d					2,0	11,2	1,0	

k.A. - keine Angabe

M - Milchrinder

d - Tag

RT-PCR - Reverse Transkriptase PCR

PAGE - Polyacrylamid Gelelektrophorese

a - kein Durchfall

b - Durchfall

* - n=33 bei Untersuchung auf *E. coli*

XIII. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Kurt Pfister bedanken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, diese Dissertation am Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie anzufertigen und hat mir dabei geholfen, wann und wie es auch immer nötig war.

Vielen Dank für Ihre Unterstützung und Ihr entgegengebrachtes Vertrauen!

Mein besonderer Dank gilt ebenso meiner Betreuerin Frau Dr. Miriam Scheuerle. Sie hat mich in allen Phasen dieser Arbeit unterstützt und hat stets ein offenes Ohr für meine „wenigen“ Fragen gehabt.

Danke für einfach alles!

Außerdem danke ich Prof. Andrew Thompson, Dr. Amanda Ash und Louise Pallant für die Zusammenarbeit in der Genotypisierungsstudie.

Thank you very much for the great cooperation and your support!

Als nächstes möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Diagnostiklabors, Elisabeth Kieß, Kathrin Simon, Tim Tiedemann, Ute Maurer und Andrea Mihalkov bedanken. Sie alle haben mich in ihrem Team willkommen geheißen, haben mir mit viel Geduld die nötigen Untersuchungsmethoden beigebracht und mich bei der Bearbeitung meiner Proben unterstützt.

Vielen Dank für eure Hilfe und die schöne Zeit bei euch im Labor!

Ute, danke für die vielen Pflanzen und die Garten-Tipps!

Ebenfalls bedanke ich mich bei meiner Mit-Doktorandin Alexandra Kasper. Durch die stundenlangen Gespräche mit ihr in unserem „Kämmerchen“ oder am Telefon war sie mir in jeglicher Hinsicht eine tolle Unterstützung.

Danke dafür!

Weiter möchte ich mich bei meinen Mit-Doktorandinnen Stephanie Schneider und Cornelia Plötz bedanken. Sie haben sich stets Zeit für meine Fragen genommen und gemeinsam haben wir alle aufgetretenen Computer-Probleme bewältigen können.

Vielen Dank!

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn David Rügamer vom Statistischen Beratungslabor der Ludwig-Maximilians-Universität München für die statistische Analyse meiner Daten.

Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit!

Der Bayerischen Tierseuchenkasse danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Verlaufsstudie.

Vielen Dank!

Großer Dank gilt auch den Tierärzten, den Landwirten und der Rinderunion Baden-Württemberg für die Einsendung der Proben.

Vielen Dank für ihre Mithilfe!

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann und meiner Familie bedanken. Sie haben es mir ermöglicht, diese Doktorarbeit zu schreiben und waren mir in der gesamten Zeit eine enorme Unterstützung.

DANKE!