

Vorkommen von Antikörpern gegen Babesia caballi und Theileria equi bei Pferden in Mitteldeutschland

Jutta Pikalo¹, Tatjana Sattler^{1,2}, Michaela Eichinger¹, Angelika Loitsch¹, Friedrich Schmoll¹ und Gerald Fritz Schusser²

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES), Institut für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling, Österreich

² Medizinische Tierklinik – Klinik für innere Krankheiten der Pferde, Wiederkäuer und Schweine der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig

Zusammenfassung: Die Babesiose oder Piroplasmose ist eine durch Zecken übertragene Infektionskrankheit, welche im Zuge der globalen Erwärmung und der damit verbundenen Verbreitung der Vektoren immer stärker in den Blickpunkt von Ärzten und Tierärzten rückt und auch in der Pferdemedizin zunehmendes Interesse weckt. Die Erreger Theileria equi (T. equi) und Babesia caballi (B. caballi) sind einzellige Blutparasiten, welche durch die Zeckengattungen Dermacentor, Hyalomma, Rhipicephalus, Haemaphysalis und Boophilus übertragen werden. Der Nachweis von negativen serologischen Ergebnissen wird für den Im- und Export in manche Länder gefordert. Daher sind Kenntnisse über das Vorkommen von B. caballi und T. equi im jeweiligen Exportland wichtig. Ziel der vorliegenden Studie war es, das Vorkommen von Antikörpern gegen beide Erreger bei Pferden im mitteleuropäischen Raum sowie potentielle Risikofaktoren zu ermitteln. Des Weiteren sollten die derzeit am häufigsten genutzten Nachweismethoden, indirekter Immunfluoreszenz Antikörper Test (IFAT) und cELISA miteinander verglichen werden. Seren von 314 Pferden wurden mittels IFAT und cELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern getestet. Weiterhin wurde routinemäßig von jedem der Pferde ein Blutausschuss aus EDTA-Blut angefertigt und mittels Diff-Quik gefärbt. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf eine akute Piroplasmoseinfektion. Im IFAT waren 19 (6,1%) Pferde T. equi-Antikörper-positiv. Zehn (3,2%) davon konnten auch im cELISA bestätigt werden. Bei nur einem Tier wurden Antikörper gegen B. caballi mittels cELISA gefunden. Die Übereinstimmung der beiden Testsysteme beträgt 97% und ist daher mit einem Kappa Koeffizienten von 0,68 als gut zu bewerten. Auf Grund der niedrigen Zahl an Antikörper-positiven Pferden konnten Risikofaktoren nicht statistisch gesichert ermittelt werden. Da die Untersuchungen belegen, dass T. equi und im Einzelfall auch B. caballi im mitteleuropäischen Raum vorkommen können, sollte die Piroplasmose bei entsprechenden klinischen Symptomen als Differentialdiagnose nicht außer Acht gelassen werden.

Schlüsselwörter: Babesia caballi / Theileria equi / Pferd / Serologie / IFAT / cELISA / Mitteldeutschland / Infektiologie / Immunologie

Seroprevalence of Babesia caballi and Theileria equi in horses in Central Germany

Equine piroplasmosis is the most prevalent tick-borne disease found in Equidae, including horses, donkeys, mules and zebras, caused by the hemoprotozoan parasites Theileria equi (T. equi) or Babesia caballi (B. caballi). Both parasites are transmitted by ixodid ticks of the genera Rhipicephalus, Dermacentor, Hyalomma, Haemaphysalis and Boophilus. Since Equine piroplasmosis can occur in any region or environment where horses are exposed to vector ticks, horses in countries with a moderate climate may also be affected. Relocation of carrier horses and infected ticks by international transport is a potential way of spreading an infection. The clinical course of Equine piroplasmosis can be subclinical, acute, subacute or chronic. Both parasites are able to cause severe hemolytic anemia with fever, thrombocytopenia, lymphopenia, hyperbilirubinemia, hemoglobinuria, increased lactate dehydrogenase activity and acute renal failure. In case of intra-uterine infection, abortion and neonatal death can occur. Infections with B. caballi are usually less severe than those with T. equi (which is also more frequently reported). After recovering from an acute episode, a horse remains a carrier of B. caballi for up to four years. In the case of a T. equi infection, the horse is a carrier for life. The aim of the study was to determine the seroprevalence of T. equi and B. caballi infections among horses in Central Germany, analyse potential risk factors for said infections, and compare the two methods of testing: indirect immunofluorescence antibody test: (IFAT) and competitive ELISA (cELISA). A total of 314 serum samples were collected from horses in Central Germany between May 2012 and November 2013. Blood smears from EDTA blood were prepared from each horse, stained with Diff-Quik and observed microscopically to determine the presence of intracellular parasites in erythrocytes. Two methods to detect antibodies against T. equi and B. caballi were used for analysis. The IFAT was conducted using the Testkits MegaScreen® Fluobabesia caballi ad us. vet. and MegaScreen® Fluotheileria equi ad us. vet. (Diagnostik Megacor, Hörbranz, Austria) according to manufacturer's instructions. The cELISA was conducted using the Babesia caballi antibody test kit, cELISA and the Babesia equi antibody test kit, cELISA (Veterinary Medical Research and Development (VMRD), Pullman, Washington, USA) were used following the manufacturer's instructions. Information on gender, age, type of housing, usage, breed and clinical signs were recorded. Chi-Square test was used to compare the overall prevalence for each agent and positivity values regarding gender, age, type of housing, ability, clinical status, breed and time of blood collection. The Kappa-coefficient was used to compare the compliance of the two methods IFAT and cELISA. No intracellular parasites could be detected microscopically in the blood smears. Out of the 314 serum samples, 19 (6.1%) were found to be T. equi antibody positive, as tested by the IFAT, ranging from 1:80 up to 1:160. Ten (3.2%) out of these 19 sera were confirmed using the cELISA. According to the Kappa-coefficient, a substantial agreement (0.68) between the two test systems was found with a concordance of 97%. Only one horse had antibodies against B. caballi, tested with the cELISA. The result could not be confirmed by the IFAT. No horse had antibodies against both, T. equi and B. caballi. Due to the small number of positive horses no significant risk factors could be identified. The horses tested positive for T. equi antibodies were equally distributed in the tested region of Central Germany. It can be concluded that antibodies against T. equi and in some rare cases against B. caballi can be found in serum of horses in Central Germany. Latent infected horses can be a source of infection for seronegative animals. Therefore, a continuous monitoring especially of horses being im- or exported is recommended.

Keywords: Babesia caballi / Theileria equi / horse / serology / IFAT, cELISA / Central Germany / immunology

Zitation: Pikalo J., Sattler T., Eichinger M., Loitsch A., Schmoll F., Schusser G. F. (2016) Vorkommen von Antikörpern gegen Babesia caballi und Theileria equi bei Pferden in Mitteldeutschland. Pferdeheilkunde 32, 254-259

Korrespondenz: Dr. Tatjana Sattler, Universität Leipzig, Medizinische Tierklinik, An den Tierkliniken 11, 04103 Leipzig; Email: tasat@vetmed.uni-leipzig.de

Einleitung

Die equine Piroplasmose ist eine durch Zecken der Gattungen *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* und *Boophilus* übertragene Infektionskrankheit, die im Zuge der globalen Erwärmung zunehmendes Interesse, auch in der Pferdemedizin, erlangt (*Hermann et al. 1987*, *Scheidemann et al. 2003*, *Guidi et al. 2015*). Sie kommt neben Pferden auch bei Eseln, Maultieren und Zebras vor (*Scoles und Ueti 2015*). Bisher sind zwei Familien (*Babesiidae* und *Theileriidae*) der Ordnung *Piroplasmida* als Erreger der equinen Piroplasmose beim Pferd bekannt: Die große Art *Babesia caballi* (*B. caballi*) ($3,0\mu\text{m}$) und die kleine Art *Theileria equi* (*T. equi*) ($1,5\mu\text{m}$) (*Hermann et al. 1987*, *Wise et al. 2013*). *Theileria equi* (früher: *Babesia equi*) wurde erst durch *Mehlhorn und Schein (1998)* auf Grund des Lebens- und Entwicklungszyklus in den Zecken, der Stadien im Wirt und der genetischen Verwandtschaft zu anderen *Theileria*-Arten (*Scoles und Ueti 2015*) neu benannt. *Theileria equi* kann nicht nur, wie *B. caballi*, in Erythrozyten, sondern auch in Lymphozyten persistieren (*Schein et al. 1981*, *Hermann et al. 1987*). *Theileria equi* ist pathogener und kann zu Hämoglobinurie sowie zum Verenden betroffener Pferde führen, während *B. caballi* hauptsächlich persistierendes Fieber und Anämie verursacht (*de Waal 1992*, *Chhabra et al. 2012*). Generell können die Symptome stark variieren, was eine zuverlässige klinische Diagnose erschwert (*de Waal und van Heerden 2004*, *Chhabra et al. 2012*).

Entsprechend der geographischen Verbreitung der Vektoren kommen die Piroplasmen in weiten Gebieten Asiens, Afrikas, Süd- und Mittelamerikas sowie in Teilen der USA endemisch vor. In Europa sind Portugal, Spanien, Frankreich, Italien, Tschechien, Slowakei, Ungarn, die Balkanländer sowie Regionen von Russland als Endemiegebiete bekannt (*Friedhoff 1982*). In einigen Zentraleuropäischen Ländern wie der Schweiz oder Deutschland kam es zu autochthonen Infektionen (*Friedhoff 1982*, *Hermann et al. 1987*, *Scheidemann et al. 2003*). In vielen Regionen, in denen die equine Piroplasmose endemisch ist, treten Infektionen mit *T. equi* häufiger auf als Infektionen mit *B. caballi* (*Wise et al. 2014*). Die Piroplasmose kann perakut, akut oder chronisch verlaufen (OIE 2008). In chronisch-subklinischen Fällen können die infizierten Pferde jahrelange Träger der Piroplasmen sein und so wiederum mögliche Infektionsquellen darstellen (*Wise et al. 2013*, *Bahrami et al. 2014*). Des Weiteren kann es auch zu einer transplazentaren Übertragung kommen (*de Waal 1992*, *Bahrami et al. 2014*). Tragende Stuten können abortieren oder den Erreger auf das Neugeborene übertragen (*Wise et al. 2013*). Somit kann die Piroplasmose ökonomische Verluste nach sich ziehen (*de Waal 1992*, *Bahrami et al. 2014*). Zusätzlich zu diesen Übertragungswegen ist es ebenfalls möglich, die Blutparasiten über Bluttransfusionen, mechanisch über kontaminierte Nadeln oder chirurgisches Besteck zu verschleppen (*de Waal 1992*, *de Waal und van Heerden 2004*, *BVL 2011*, *Bahrami et al. 2014*).

Mehrere Faktoren können Einfluss auf die Verbreitung der Krankheit haben. So spielt zum Beispiel die Verbringung von infizierten Pferden und Zecken durch nationale und internationale Transporte eine wichtige Rolle. Des Weiteren kann es zur geografischen Expansion der Zecken kommen, verursacht durch die Klimaerwärmung und die damit verbundene Schaf-

fung neuer Gebiete, die optimale Bedingungen für diese Vektoren darstellen (*Sigg et al. 2010*).

Zurzeit gibt es keinen zugelassenen Impfstoff für Pferde gegen Piroplasmen. Vorbeugemaßnahmen sind generell nicht effektiv genug, um eine Infektion zu verhindern (*Bahrami et al. 2014*). Daher fordern einige Länder wie die USA, Japan und Australien einen amtlichen Nachweis für das Freisein von einer Piroplasmoseinfektion bei Importtieren (*Hermann et al. 1987*).

Derzeit gibt es drei Methoden für den serologischen Nachweis von Antikörpern, welche international anerkannt sind. Die zwei häufigsten sind der indirekte Immunfluoreszenz Antikörper Test (IFAT) und der kompetitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (cELISA). Die Komplement-Bindungsreaktion (KBR) ist ein Testsystem für frühe, akute Infektionen. Tiere, welche bereits mit Medikamenten behandelt wurden oder Pferde, die Reaktionen gegen das Komplementsystem aufweisen, können damit nicht detektiert werden (OIE 2014).

Ziel dieser Studie war es, das Vorkommen von Antikörpern gegen Piroplasmen bei Pferden in Mitteldeutschland zu ermitteln und eventuelle Risikofaktoren zu identifizieren. Weiterhin sollten die derzeit am häufigsten genutzten Testsysteme IFAT und cELISA miteinander verglichen werden.

Material und Methode

Tiere und Proben

Insgesamt 314 Pferde, welche zwischen Mai 2012 bis November 2013 in der Medizinischen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig wegen verschiedener Grunderkrankungen stationär aufgenommen und behandelt wurden, konnten in die Studie eingeschlossen werden. Die Pferde stammten aus Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen, sowie vereinzelt aus anderen Bundesländern Deutschlands (Abb. 1). Es handelte sich um 164 Stuten, 108 Wallache und 42 Hengste. Das Alter der Tiere lag zwischen einem Monat und 34 Jahren. Die Pferde wurden nach Alter in vier Gruppen wie folgt unterteilt: unter einem Jahr, ein bis drei Jahre, vier bis zehn Jahre und älter als zehn Jahre. Die Haltungsformen wurden in Robusthaltung, konventionelle Haltung mit Koppel/Paddock und reine Boxenhaltung unterteilt. Bei der Verwendung der Pferde wurde die Einteilung in Freizeit, Zucht, Aufzucht und Sport gewählt. Die Pferde wurden nach dem Zeitpunkt der Blutabnahme den Jahreszeiten entsprechend in vier Gruppen unterteilt: Winter: Dezember bis Februar, Frühling: März bis Mai, Sommer: Juni bis August und Herbst: September bis November. Serum von jedem Pferd wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Routinemäßig wurde von jedem Pferd ein Blutausschuss aus EDTA-Blut angefertigt, mittels Diff-Quik (Medion Diagnostics AG, Düringen, Schweiz) gefärbt und mikroskopisch auf das Vorhandensein von intrazellulären Einschlüssen, die für Piroplasmen sprechen untersucht.

Indirekter Immunfluoreszenz Antikörper Test (IFAT)

Der IFAT wurde mit den Testkits MegaScreen® Fluobabesia caballi ad us. vet. und MegaScreen® Fluothileria equi ad us.

vet. (Diagnostik Megacor, Hörbranz, Österreich) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der cut-off beider Kits liegt bei einer Verdünnung von 1:80 ($\geq 1:80$ gilt als positiv, $< 1:80$ gilt als negativ). Positive Screening Proben wurden in einem zweiten Ansatz ausitiert.

Kompetitiver Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Der Babesia caballi antibody test kit, cELISA und der Babesia equi antibody test kit, cELISA (Veterinary Medical Research and Development (VMRD), Pullmann, Washington, USA) wurden für die Detektion der Antikörper nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der cut-off liegt bei 40% Inhibition, wobei $\geq 40\%$ Inhibition als positiv und $< 40\%$ als negativ gelten.



Abb. 1 Karte von Deutschland mit der Herkunft der untersuchten Pferde sowie Verteilung der Pferde mit positiven Antikörperbefunden gegen *T. equi* und *B. caballi*. Kartenerstellung mittels Geographieinformationssystem (GIS) ESRI®ArcGISTM 10.2. Quelle: AGES, Abteilung Datenmanagement.

Map of Germany with the origin of the examined horses as well as the distribution of horses with positive antibody results against *T. equi* and *B. caballi*. Mapping by Geography Information System (GIS) ESRI®ArcGISTM 10.2. Source: AGES, department data management.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel Version 2010. Die Übereinstimmung zwischen IFAT und cELISA wurde mittels Kappa-Koeffizient berechnet und gemäß Landis und Koch (1977) interpretiert. Der Chi-Quadrat Test nach Preacher wurde zur Ermittlung eines Zusammenhanges zwischen seropositiven Tieren und einem potentiellen Risikofaktor herangezogen. Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

Ergebnisse

Mikroskopischer Nachweis von intrazellulären Piroplasmen

Bei keinem der 314 Blutausstriche konnten mikroskopisch intrazelluläre Piroplasmen nachgewiesen werden.

Seroprävalenz

Von 314 getesteten Pferden wiesen 19 (6,1%) Tiere einen positiven *T. equi*-Antikörpertiter, gemessen mit dem IFAT auf (Tab. 1). 14 Pferde hatten einen Titer von 1:80 und fünf Tiere wiesen einen Titer von 1:160 auf. Von den 19 positiv getesteten Pferden konnten nur zehn (3,2%) im cELISA bestätigt werden. Die 9 positiven Tiere aus dem IFAT, die mit dem cELISA nicht bestätigt werden konnten, hatten im IFAT einen Titer von 1:80. Alle Proben, die im IFAT negativ getestet wurden, ergaben auch im cELISA ein negatives Ergebnis. Beide Testsysteme wurden in Tabelle 1 gegenübergestellt. Der ermittelte Kappa Koeffizient von 0,68 lässt laut Landis und Koch (1977) auf eine substantielle Übereinstimmung der beiden Testsysteme schließen. 97% der gemessenen Proben ergaben in beiden Systemen das gleiche Ergebnis.

In dem IFAT konnte kein Tier positiv auf Antikörper gegen *B. caballi* getestet werden, im cELISA wurde nur ein Pferd positiv auf Antikörper gegen diesen Erreger getestet. Es handelt sich dabei um eine 1,5 Jahre alte Friesenstute, welche in der Box mit Koppelgang gehalten und im Herbst wegen eines Megaösophagus in die Klinik überwiesen wurde. Kein Pferd wies Antikörper sowohl gegen *T. equi* als auch gegen *B. caballi* auf.

Risikofaktoren

Auf Grund der geringen Anzahl an Antikörper-positiven Pferden konnten keine signifikanten Risikofaktoren ermittelt werden. Die Zuordnung der Antikörper-positiven Pferde in die einzelnen Risikogruppen ist in Tabelle 2 ersichtlich. Die Standorte der Pferde mit positivem *T. equi*- bzw. *B. caballi*-Antikörper-Befund sind in Abbildung 1 wiedergegeben.

Tab. 1 Vergleich von IFAT und cELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *T. equi* bei Pferden. | Comparison of IFAT and cELISA for detection of antibodies against *T. equi* in horses.

| | T. equi | cELISA | | | Kappa |
|------|---------|---------|---------|--------|-------|
| | | positiv | negativ | gesamt | |
| IFAT | positiv | 10 | 9 | 19 | 0,68 |
| | negativ | 0 | 295 | 295 | |
| | gesamt | 10 | 304 | 314 | |

Diskussion

In dieser Studie wurde retrospektiv das Vorkommen von Antikörpern gegen Piroplasmen bei Pferden im mitteldeutschen Raum erhoben und potentielle Risikofaktoren für einen positiven Befund ermittelt. Zu berücksichtigen ist, dass die Proben nicht nach einem Stichprobenplan genommen wurden und die Studie daher keine repräsentative Seroprävalenzstudie darstellt. Da es keinen zugelassenen Impfstoff für Pferde gegen Piroplasmen gibt, sind keine mit einer Impfung assoziierten Antikörpertiter zu erwarten. Die routinemäßig durchgeführten Blutausstriche ergaben keine Hinweise auf eine akute Piroplasmeninfektion.

In unserer Studie ließen sich im mitteldeutschen Raum keine lokalen Unterschiede im Vorkommen von positiven Antikörpertitern bei Pferden darstellen. Das lässt sich dadurch erklären, dass es sich um eine klimatisch und geographisch ein-

heitliche Region handelt, in der daher auch das Infektionsrisiko und das Vorkommen von Vektoren gleichmäßig verteilt ist.

Laut OIE (2014) ersetzen der IFAT und der cELISA die KBR. Daher wurde die KBR in dieser Studie nicht zum Vergleich herangezogen. Sowohl der IFAT als auch der cELISA sind international als serologische Testsysteme zum Nachweis von Antikörpern beim Im- und Export von Pferden anerkannt. Der IFAT war mit einer Sensitivität und Spezifität von 99,4% und 96,8% (Ribeiro et al. 2013) bis vor kurzem (2014) laut OIE der Goldstandard für den Nachweis von Piroplasmen-Antikörpern. Allerdings weist er einige Schwächen auf: subjektive Interpretation der Ergebnisse vom Untersucher, eine schwierige Unterscheidung zwischen schwach positiven und negativen Proben, eine niedrige Durchsatsrate und die Schwierigkeit, diesen Test zu standardisieren (OIE 2014, Mans et al. 2015). Des Weiteren gibt es Kreuzreaktionen mit anderen Theileria spp. (Mans et al. 2015).

Tab. 2 Vorkommen von *T. equi*-Antikörpern bei 314 Pferden in Mitteldeutschland in Bezug zu potentiellen Risikofaktoren, wobei keine Signifikanzen nachweisbar waren. | Occurrence of *T. equi* antibodies in 314 horses in Central Germany in comparison to potential risk factors, with no significant results.

| | potentielle Risikofaktoren | getestet | IFAT positiv | cELISA positiv |
|------------------------|----------------------------|----------|--------------|----------------|
| Jahreszeit Blutabnahme | Herbst (Sept.-Nov.) | 99 | 5 | 2 |
| | Winter (Dez.-Feb.) | 52 | 1 | 1 |
| | Frühling (März-Mai) | 92 | 8 | 5 |
| | Sommer (Juni-Aug.) | 71 | 5 | 2 |
| Alter | < 1 | 19 | 3 | 3 |
| | 1-3 | 40 | 4 | 3 |
| | 4-10 | 120 | 3 | 0 |
| | > 10 | 128 | 7 | 4 |
| | keine Angabe | 7 | 2 | 0 |
| Geschlecht | Stute | 164 | 9 | 5 |
| | Wallach | 108 | 7 | 3 |
| | Hengst | 42 | 3 | 2 |
| Haltung | konventionell | 189 | 13 | 6 |
| | Box | 26 | 3 | 1 |
| | robust | 71 | 2 | 2 |
| | keine Angabe | 28 | 1 | 1 |
| Verwendung | Freizeit | 179 | 9 | 4 |
| | Sport | 68 | 3 | 0 |
| | Zucht | 23 | 1 | 0 |
| | Aufzucht | 44 | 6 | 6 |
| Rasse | Pony | 59 | 3 | 2 |
| | Warmblut | 169 | 11 | 4 |
| | Vollblut | 32 | 2 | 2 |
| | Kaltblut | 41 | 1 | 0 |
| | Sonstiges | 13 | 2 | 2 |
| Erkrankung | Orthopädisch | 14 | 1 | 1 |
| | Infektion | 43 | 2 | 2 |
| | Gastrointestinal | 175 | 7 | 1 |
| | Begleittier | 5 | 3 | 2 |
| | Sonstiges | 62 | 6 | 4 |
| | Stoffwechsel | 15 | 0 | 0 |

Im Gegensatz zu dem IFAT nutzt der cELISA nicht den gesamten Erreger, sondern spezifische Antigene zum Detektieren von positiven Seren. Dadurch steigen die Spezies-Spezifität und die Durchsatzrate bei den Proben (Mans et al. 2015). Da beim ELISA die Seren nicht verdünnt werden müssen, wird die Sensitivität dieses Testsystems maximiert (Kappmeyer et al. 1999). Mittels eines standardisierten ELISAs ist es auch international möglich, Seroprävalenzstudien durchzuführen und diese zu vergleichen. Der cELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *B. caballi* weist eine Spezifität und Sensitivität von 100% laut Herstellerangaben auf. Für *T. equi* weist der cELISA eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 99,5% laut Herstellerangaben auf. Laut OIE (2008) liegt die Spezifität der beiden cELISAs zwischen 99,2% und 99,5%.

Mittels IFAT wurden bei 19 Pferden Antikörper gegen *T. equi* festgestellt. Allerdings lagen die meisten positiven Titer bei einer Verdünnung von 1:80. Von den positiven Pferden wurden 10 Tiere mit dem cELISA bestätigt. Mittels Kappa-Koeffizient von 0,68 wurde eine substantielle Übereinstimmung der beiden Testsysteme berechnet. Trotz der unterschiedlichen Anzahl der positiven Tiere in den beiden Testsystemen wiesen diese eine 97%-ige Übereinstimmung auf. Shkap et al. (1998) sprechen in ihrer Studie von einer 95,7-%igen Übereinstimmung von cELISA und IFAT. Diese Angaben decken sich auch mit der Studie von Katz et al. (2000). Antikörper gegen *B. caballi* wurden nur bei einem Pferd mittels cELISA festgestellt. Das equine Immunsystem ist nicht in der Lage, *T. equi* vollständig zu eliminieren, daher bleiben die infizierten Pferde lebenslange Träger (Wise et al. 2014). Im Gegensatz dazu sind Infektionen mit *B. caballi* innerhalb von 4 Jahren selbstlimitierend (de Waal und Heerden 2004). Möglicherweise erklärt dies den Unterschied zum Vorkommen von Antikörpern gegen *T. equi* und *B. caballi* (de Waal und Heerden 2004). Es besteht keine Kreuzimmunität zwischen den beiden Arten (Wise et al. 2013).

1985 wurde von Boch eine Studie zur Seroprävalenz von Piroplasmen bei Pferden, Rindern und Hunden in Süddeutschland durchgeführt. Von den 321 getesteten Pferdeseeren wiesen 18 Antikörper gegen *T. equi* auf, vier zeigten Antikörper gegen *B. caballi*. Diese Zahlen decken sich mit den in unserer Studie gefundenen Ergebnissen in Mitteldeutschland. In den Niederlanden (Butler et al. 2012), der Schweiz (Herzmann et al. 1987) und in Deutschland (Scheidemann et al. 2003) gibt es Berichte von akuten klinischen *T. equi* Fällen. Generell kann dadurch gesagt werden, dass Piroplasmen in Europa vorkommen und es wichtig ist, diese in der Diagnostik zu berücksichtigen. Für den Handel mit Pferden und den Transport für Sportveranstaltungen ist es notwendig, die Seroprävalenzen in den Ländern zu kennen.

In den Niederlanden (Butler et al. 2012), der Schweiz (Sigg et al. 2010), Norditalien (Grandi et al. 2011) und Deutschland (Boch et al. 1985) besteht mit unter 10% eine geringe Seroprävalenz sowohl von *T. equi* als auch von *B. caballi*. In Portugal (Ribeiro et al. 2013), Ungarn (Hornok et al. 2007, Farkas et al. 2013) und Griechenland (Koum et al. 2010) sind Antikörper gegen *T. equi* und *B. caballi* weiter verbreitet (zwischen 10% und 30%). In mediterranen Ländern wie Spanien (Camacho et al. 2005), Zentralitalien (Moretti et al. 2010, Sgorbini et al. 2015) und Südfrankreich (Guidi et al. 2015) besteht ein noch höheres Risiko von equiner Piroplasmose (zwischen 30% und 60%) als in den nördlicheren und in kälteren Regionen

Europas. In Ländern wie der Mongolei, Südafrika, Kolumbien, dem Sudan, Brasilien und Israel, in denen die Piroplasmose endemisch ist, liegt die Seroprävalenz zwischen 60% und 94% (Camacho et al. 2005). Studien über die Seroprävalenz sollten jedoch auf Grund von unterschiedlichen Testsystemen und unterschiedlichen Stichprobenplänen mit Vorsicht verglichen werden (Guidi et al. 2015). Durch die klimatischen Veränderungen hat sich nicht nur die Verbreitung der Vektoren sondern auch eine längere Aktivität der Vektoren ergeben (Moretti et al. 2010). Daher kann es möglich sein, dass in Zukunft die Seroprävalenz auch in Mitteleuropa steigen wird.

Auf Grund der geringen Anzahl an Antikörper-positiven Pferden konnten in unserer Studie keine Risikofaktoren ermittelt werden. In anderen Studien wurde festgestellt, dass das Alter der Tiere keinen signifikanten Risikofaktor darstellt (Shkap et al. 1998, Sigg et al. 2010, Grandi et al. 2011). Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Pferde mit steigendem Alter mit Zecken und in weiterer Folge mit Piroplasmen in Kontakt kommen höher (Garcia-Bocanegra et al. 2013).

Die geographische Klimazone, in der die Tiere leben, stellt auf Grund des Vektorvorkommens einen wesentlichen Risikofaktor dar (Abutarbush et al. 2012). Pferde mit Zugang zur Koppel bzw. Graskoppel weisen eine höhere Seroprävalenz auf (Moretti et al. 2010, Ribeiro et al. 2013). Im Sommer wurden höhere Infektionsraten gefunden, diese korrelieren stark mit der Zeckenpopulation. Klimatische Aspekte wie Temperatur und Feuchtigkeit haben einen großen Einfluss auf das Habitat und die Dynamik der Zeckenpopulation (Salem und El-Sherif 2015). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *T. equi* und *B. caballi* in Deutschland, wenn auch selten, vorkommen. Latent infizierte Pferde stellen eine Infektionsquelle für seronegative Tiere dar. Tierärzte und Halter sollten auf die Prävention und den Schutz der Tiere vor einer Übertragung durch Zecken achten und beim Vorkommen einer Thrombo- und/oder Lymphopenie eine serologische Kontrolluntersuchung auf diese Blutparasiten durchführen.

Danksagung

Die Autoren danken den Mitarbeiterinnen der Abteilung Serologie des Institutes für veterinärmedizinische Untersuchungen Mödling, besonders Frau Maria Müller und Frau Judith Lutz für die technische Unterstützung. Für die Erstellung der GIS-Karte bedanken sich die Autoren bei Herrn Mag. FH Michael Schwarz, Abteilung Datenmanagement, Wien Spargelfeld.

Interessenskonflikt

Es bestehen keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder andere persönliche Interessen an einem Produkt und/oder einer Firma, welche die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Literatur

Abutarbush S. M., Alqawasmeh D. M., Mukbel R. M., Al-Majali A. M. (2012) Equine Babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transbound Emerg. Dis.* 59, 72-78

- Bahrami S., Ghadran A. R., Mirabdollahi S. M., Fayed M. R. (2014) Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods. *Trop. Biomed.* 31, 110-117
- Boch J. (1985) *Babesia* infections in horses, cattle and dogs in southern Germany. *Tierärztl. Prax. Suppl.* 1, 3-7
- Butler C. M., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M. M., Stout T. A., van der Kolk J. H., Wollenberg L. V., Nielen M., Jongejan F., Werners A. H., Houwers D. J. (2012) Prevalence of the causative agents of equine piroplasmiasis in the South West of the Netherlands and the identification of two autochthonous clinical *Theileria equi* infections. *Vet. J.* 193, 381-385.
- BVL, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2011) Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verarbeitung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich. S. 8 www.bvl.bund.de zugegriffen im Oktober 2015
- Camacho A. T., Guitian F. J., Pallas E., Gestal J. J., Olmeda A. S., Habela M. A., Telford III S. R., Spielman A. (2005) *Theileria* (*Babesia equi*) and *Babesia caballi* Infections in Horses in Galicia, Spain. *Trop. Anim. Health Prod.* 37, 293-302
- Chhabra S., Ranjan R., Uppal S. K., Singla L. D. (2012) Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria Equi*) from carrier mares to foals. *J. Parasit. Dis.* 36, 31-33
- De Waal D. T. (1992) Equine piroplasmiasis: A review. *Br. Vet. J.* 148, 6-14
- De Waal D. T. und van Heerden J. (2004) Equine Piroplasmiasis. In Coetzer J. A. W., Tustin R. C., editors: *Infectious Diseases of Livestock*, Cape Town, Oxford University Press, S. 425-433
- Farkas T., Tanczos B., Farkas R., Tanczos B., Gyurkovszky M., Földvári G., Solymosi N., Edelhofer R., Hornok S. (2013) Serological and molecular detections of *Theileria equi* infections in horses in Hungary. *Vet. Parasitol.* 192, 143-148
- Friedhoff K. T. (1982) Die Piroplasmose der Equiden – Bedeutung für den internationalen Pferdeverkehr. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 95, 368-374
- Garcia-Bocanegra I., Arenas-Montes A., Hernandez E., Adaszek A., Carbonero A., Almeria S., Jaén-Téllez J. A., Gutiérrez-Palomino P., Arenas A. (2013) Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Vet. J.* 195, 172-178
- Grandi G., Molinari G., Tittarelli M., Sasseria D., Kramer L. H. (2011) Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from Northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 955-956
- Guidi E., Pradier S., Lebert I., Leblond A. (2015) Piroplasmiasis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of theileriosis and babesiosis in horses. *Parasitol. Res.* 114, 71-83
- Hermann M., Baumann D., Weiland G., von Salis B. (1987) Erstmalige Feststellung von equiner Babesiose als Bestandsproblem in der Schweiz. *Pferdeheilkunde* 3, 17-24
- Hornok S., Edelhofer R., Földvári G., Joachim A., Farkas R. (2007) Serological evidence for *Babesia canis* infection of horses and an endemic focus of *B. caballi* in Hungary. *Acta Vet. Hung.* 55, 491-500
- Kappmeyer L. S., Perryman L. E., Hines S. A., Baszler T. V., Katz J. B., Hennager S. G., Knowles D. P. (1999) Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive –inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2285-2290
- Katz J., Dewald R., Nicholson J. (2000) Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 46-50
- Kouam M. K., Kantzoura V., Gajadhar A. A., Theis J. H., Papadopoulos E., Theodoropoulos G. (2010) Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. *Vet. Parasitol.* 11, 273-278
- Landis J. R., Koch G. G. (1977) An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 33, 363-374
- Mans B. J., Pienaar R., Latif A. A. (2015) A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 104-118
- Mehlhorn H., Schein E. (1998) Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol. Res.* 84, 467-475
- Moretti A., Mangili V., Salvatori R., Maresca C., Scoccia E., Torina A., Moretta I., Gabrielli S., Tampieri M. P., Pietrobelli M. (2010) Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: A preliminary study. *Vet. J.* 184, 346-350.
- OIE: World Organization of Animal Health (2008) Equine piroplasmiasis. In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Chapter 2. 5. 8. OIE, Paris, S. 884-893. www.OIE.int zugegriffen im Oktober 2015
- OIE: World Organization of Animal Health (2014) Equine piroplasmiasis. In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Chapter 2. 5. 8. OIE, NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014, Paris, S. 1-10. www.OIE.int zugegriffen im Oktober 2015
- Ribeiro A. J., Cardoso L., Maia J. M., Coutinho T., Cotovio M. (2013) Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. *Parasitol. Res.* 112, 2611-2617
- Salem N. Y., El-Sherif M. A. (2015) Malondialdehyde status, trace minerals and hematologic results of anemic-T. equi infected Egyptian horses. *Inter. J. Vet. Sci.* 4, 118-122
- Scheidemann W., Liebisch G., Liebisch A., Budde K. (2003) Equine Piroplasmose – Fallbericht einer akuten Infektion mit *Theileria equi* (syn. *Babesia equi*) in Deutschland. *Pferdeheilkunde* 19, 16-20
- Schein E., Rehbein G., Voigt W. P., Zweggarth E. (1981) *Babesia equi* (Laveran, 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed. Parasitol.* 32, 223-237
- Scoles G. A., Ueti M. W. (2015) Vector ecology of equine piroplasmiasis. *Ann. Rev. Entomol.* 7, 561-580
- Sgorbini M., Bonelli F., Nardoni S., Rocchigiani G., Corazza M., Mancianti F. (2015) Seroprevalence and molecular analysis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses from central Italy during a 10-year period. *J. Equine Vet. Sci.* 35, 865-868
- Shkap V., Cohen I., Leibovitz B. (1998) Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Vet. Parasitol.* 76, 251-259
- Sigg L., Gerber V., Gottstein B., Doherr M. G., Frey C. F. (2010) Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. *Parasitol. Int.* 59, 313-317
- Wise L. N., Kappmeyer L. S., Mealey R. H., Knowles D. P. (2013) Review of Equine Piroplasmiasis. *J. Vet. Intern. Med.* 27, 1334-1346
- Wise L. N., Pelz-Mc Cluskey A. M., Mealey R. H., Knowles D. P. (2014) Equine Piroplasmiasis. *Vet. Clin. Equine* 30, 677-693