

# Bedeutung der PCR in der Diagnostik der caninen Babesiose

D. Schaarschmidt<sup>1</sup>, M. Trächsel<sup>2</sup>, R. Achermann<sup>2</sup>, K. Hartelt<sup>3</sup>, R. Oehme<sup>3</sup>, W. Müller<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Labor ALOMED, Radolfzell, <sup>2</sup>Kleintier-Klinik Rhenus, Flurlingen, <sup>3</sup>Regierungspräsidium Stuttgart, Landesgesundheitsamt

## Zusammenfassung

Bei klinischem Verdacht einer Babesiose beim Hund wird heute neben dem direkten Erregernachweis im gefärbten Blutaussstrich vorwiegend der serologische Nachweis von *Babesia canis*-spezifischen Antikörpern durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit kann anhand von sieben Fällen (mit Daten über Anamnese, Klinik, Labordiagnostik und Therapieverlauf) gezeigt werden, dass eine neue labordiagnostische Strategie zum Nachweis einer Infektion mit *Babesia canis* erforderlich ist. Der molekulargenetische Babesien-Nachweis mittels Real-Time-PCR spielt dabei die zentrale Rolle für eine sichere Diagnosestellung. Obwohl die vorgestellten PCR-positiven Hunde eine ausgeprägte Symptomatik aufwiesen, wurden nur bei je zwei Patienten Babesien im Blutaussstrich gefunden oder waren spezifische Antikörper nachweisbar. Sechs typischen Reiseinfektionen steht dabei ein autochthoner Fall von caniner Babesiose im Kanton Schaffhausen gegenüber.

Schlüsselwörter: *Babesia canis*, Diagnostik, Real-Time-PCR, Mikroskopischer Direktnachweis

## Importance of PCR for the diagnostics of canine babesiosis

Clinical standards to confirm babesiosis in dogs include the direct identification of the infectious agent in blood smears and serological assays for *Babesia canis*-specific antibodies. Here, we demonstrate in seven cases (with data on anamnesis, clinics, laboratory diagnostics, and therapeutic outcomes) that a new diagnostic procedure is required. This is the molecular-genetic identification of babesia by real time PCR allowing an unequivocal identification of the infectious agents. Indeed, all seven patients presenting severe clinical symptoms were PCR-positive, but only two of them had specific antibodies and showed babesia in their bloodstream. Six of the dogs appeared to have acquired babesiosis while travelling abroad, and one in the Swiss canton of Schaffhausen.

Keywords: *Babesia canis*, diagnosis, real time PCR, microscopic examination

## Einleitung

Babesien sind einzellige Blutparasiten, die sich in den Erythrozyten diverser Wirtstiere vermehren können und zu entsprechenden Krankheitssymptomen führen (Schuster, 2002). Im europäischen Raum ist die Babesiose beim Hund (*Babesia canis*), beim Rind (*B. divergens*, *B. major*) und beim Pferd (*B. equi*, *B. caballi*) von Bedeutung. Die canine Babesiose galt lange als klassische Reisekrankheit, in den letzten Jahren häufen sich jedoch die Berichte von autochthonen Infektionen in der Schweiz und in Deutschland (Pfister et al., 1993; Sager et al., 2005; Zahler und Gothe, 1997), was mit einer zunehmenden Ausbreitung der Überträger (Zecken der Gattung *Dermacentor* (Buntzecke) und *Rhipicephalus* [braune Hundezecke]) zusammenhängt (Bernasconi et al., 1997; Zahler et al., 2000). An *B. canis* erkrankte Hunde werden meist auf-

grund einer Störung des Allgemeinbefindens (Fieber, Apathie, Anorexie und Hämoglobinurie) vorgestellt. Typische Laborbefunde sind hämolytische regenerative Anämien mit Thrombozytopenie. Zudem findet man häufig eine Bilirubinämie, Bilirubinurie und Hämoglobinurie. Zur Diagnosesicherung wird heute eine Kombination aus direktem Nachweis der intraerythrozytären, birnenförmigen Parasiten im gefärbten Blutaussstrich und dem serologischen Nachweis von spezifischen Antikörpern mittels IFAT oder ELISA empfohlen (Sager et al., 2005). Die beiden folgenden ausführlichen Fallberichte und unsere Erfahrungen mit anderen Babesiose-Fällen im Jahr 2005 zeigen aber, dass diese Kombination zur Erkennung akuter Fälle nicht ausreicht, und dass der direkte, molekulargenetische Nachweis («Genetischer Fingerabdruck»

des Erregers mittels PCR) immer mehr an Bedeutung gewinnt.

## Tiere, Material und Methoden

### Tiere

Im Zeitraum von April bis Dezember 2005 wurden bei ALOMED sieben Fälle von caniner Babesiose diagnostiziert. Die zur Analyse eingeschickten Blutproben stammten von Hunden aus der Schweiz und Deutschland, die bei verschiedenen kooperierenden Tierärzten vorgestellt wurden. Anamnestische und klinische Daten wurden von den behandelnden Ärzten in Zusammenarbeit mit den Besitzern zusammengetragen.

### Laboranalysen

Blutproben wurden in den jeweiligen Tierkliniken oder Tierarztpraxen entnommen. EDTA-Blut, Serum und frisch angefertigte Blutaussstriche wurden zur Analyse an das Labor ALOMED geschickt. Die klinisch-chemischen Profile wurden mit dem Wako-20R-Biochemical-Analyser (Wako, D-Neuss) bestimmt, die hämatologische Untersuchung des kleinen Blutbildes erfolgte mit dem Technicon H\*1E Vet. Med. (Bayer, D-Fernwald). Für die Erstellung von Differentialblutbildern und den Nachweis von Blutparasiten wurden nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa-Färbung) gefärbte Blutaussstriche mikroskopisch untersucht.

Als Nachweis eines möglichen Babesien-Kontaktes wurde ein indirekter Fluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) durchgeführt. Als Antigen wurden mit *B. canis*-infizierte Erythrozyten verwendet (Objektträger des Labors Böse GmbH, D-Hildesheim) und die Patientenserum nach Herstellerangaben inkubiert. Zur Detektion der gebundenen Hunde-Antikörper wurden Fluoresceinisothiocyanat-gekoppelte anti-Hund-IgG-Antikörper (Anti Dog IgG(H+L)-FITC, KPL, USA-Gaithersburg) eingesetzt. Ab einem Titer von 1:40 wurde das Ergebnis als positiv gewertet.

Die Aufreinigung von DNA für einen molekulargenetischen Babesien-Nachweis wurde mit dem «NucleoSpin-Blood»-Kit (Macherey-Nagel, D-Düren) durchgeführt. Dazu wurden 200 µl EDTA-Blut extrahiert und die DNA am Ende der Reinigung in 50 µl Elutionspuffer gelöst. 5 µl der gereinigten DNA wurden in einer Real-Time-PCR mittels LightCycler® (Roche Diagnostics, D-Penzberg) amplifiziert. Der Reaktionsmix enthielt neben der Polymerase alle benötigten Zusatzkomponenten (Mix Fast start DNA Master SYBR GreenI, Roche Diagnostics), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, sowie je 0,3 µM der universellen Babesien-Primer Bab-For (5'-TAG RGA TTG GAG GTC GTC D-3') und Bab-Rev

(5'-AAC GGA ATT AAC CAG ACA AA-3'). Zu Beginn wurde die Polymerase für 10 Minuten bei 95°C aktiviert. Es folgten 45 Zyklen von je 1 Sekunde Denaturierung bei 95°C, 5 Sekunden Annealing bei 55°C und 20 Sekunden Elongation bei 72°C. Im Anschluss wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, anhand derer die Fragmentlängen und dadurch die Spezifität der amplifizierten Produkte bestimmt werden konnte. Durch die PCR wurde ein 340 bp grosses Fragment aus dem Bereich des 18S rRNA-Genes generiert, das zur Spezies-Typisierung sequenziert wurde. Die PCR-Produkte aller positiven Proben wurden dafür über den «Quaquick Gel Extraction»-Kit (Qiagen, D-Hilden) gereinigt, mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA-Foster City) sequenziert und in einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA-Foster City) analysiert. Der nachfolgende Vergleich mit publizierten Daten in GenBank wurde mittels BLAST-Analyse durchgeführt.

## Ergebnisse

### «Fall Dayna» – eine typische Reiseinfektion

Am 1. September 2005 wird die knapp 2-jährige Border-Collie-Hündin Dayna in der Kleintier-Klinik Rhenus in Flurlingen vorgestellt. Der Besitzer berichtet von Apathie und Anorexie seit dem Morgen. Die klinische Untersuchung ergibt einen massiven Parasitenbefall mit Zecken der Art *Dermacentor reticulatus* (Kuhzecke) am ganzen Körper. Die Schleimhaut ist rosa, die kapilläre Füllungszeit (KFZ) liegt unter zwei Sekunden, Auskultation von Herz und Lunge ist ohne besonderen Befund bis auf eine Tachypneu, Körpertemperatur (KT) 40,1°C, Herzfrequenz 96 Schläge pro Minute. Das Abdomen ist verspannt bis dolent. Da ein infektiöses Problem mit möglicher Differenzialdiagnose Ehrlichiose vermutet wird, erfolgt eine Antibiose mit Doxycyclin. Für weitere Laboranalysen wird Blut entnommen. Die Befragung der Besitzerin ergab, dass sie mit ihrem Hund zwei Tage vor dem Auftreten der beschriebenen Symptomatik von einem vierwöchigen Ungarn-Urlaub zurückgekommen war. In der Klinik können keine Babesien im Blutaussstrich gesehen werden. Am folgenden Tag ist Dayna's Allgemeinbefinden deutlich schlechter. Die Hündin musste mehrfach Erbrechen, ist apathisch, anorektisch und sehr schwach. Die Schleimhäute sind blass-rosa, KT 40°C, KFZ über drei Sekunden und der in der Klinik gemessene Hämatokrit liegt bei 32% (Normalbereich (NB): 42–57%). In Tabelle 1 sind ausgewählte Parameter der klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchung zusammengestellt. Im Labor ALOMED können im Blutaussstrich zwei Babesien-verdächtige Zellen gefunden werden.

Tabelle 1: «Fall Dayna» – Laboruntersuchungen (Fall 1).

Untersuchungsparameter (Referenzbereich)	Untersuchungsdatum			
	1. 9. 2005	16. 9. 2005	28. 9. 2005	25. 10. 2005
Körpertemperatur (38–39 °C)	40.1	38.2	38.5	38.7
Albumin (30–37 g/l)	30	28	34	37
Alkalische Phosphatase (bis 240 U/l)	604	561	309	168
Bilirubin (bis 6.8 µmol/l)	8.2	nicht untersucht	nicht untersucht	4.1
Gesamteiweiss (54–68 g/l)	52	53	60	61
GOT (bis 40 U/l)	121	102	16	19
GPT (bis 75 U/l)	108	101	42	35
Eisen (16–43 µmol/l)	5	7	34	31
Erythrozyten (5.5–8.5×10 <sup>12</sup> /l)	4.9	5.1	6.2	7.3
Hämatokrit (42–57%)	37	39	43	52
Hämoglobin (14.0–20.0 g/dl)	11.8	12.0	14.3	17.2
Leukozyten (5.7–12.4×10 <sup>9</sup> /l)	2.0	3.7	4.5	4.8
Thrombozyten (200–400×10 <sup>9</sup> /l)	19	23	201	268
<b>Parasiten im Blutausstrich</b>	fraglich	<b>positiv</b>	fraglich	negativ
<b>Babesien-PCR</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>schwach positiv</b>	negativ
<b>B. canis-IFAT</b> (Titer)	negativ	negativ	<b>positiv</b> (1:160)	<b>positiv</b> (1:640)

Dieser Verdacht wird mittels PCR bestätigt. Zu diesem Zeitpunkt können keine *B. canis*-spezifischen Antikörper detektiert werden. Die ebenfalls durchgeführte PCR zum Ausschluss einer Infektion mit Ehrlichien ist negativ.

Als Sofortmassnahme erhält der Patient eine Mischinfusion (40 ml/kg; intravenös) mit Vitamin B-Komplex (B-Neuron®). Nach Rehydrierung erfolgt die Verabreichung (subcutan) von Imidocarb (Carbesia®, 6 mg/kg) und anschliessender Dauertropftherapie mit Ringer-Lactat (10 ml/kg/h). Die Hündin wird stationär bis zum nächsten Tag therapiert. Am 3.9.2005 ist Dayna munter und frisst wieder. Die Schleimhaut ist rosa, KT 38.4 °C, KFZ unter 2 Sekunden und die Atmung ist normal. Am Abend kann die Hündin nach Hause entlassen werden.

Die erste Kontrolluntersuchung folgt am 16.9.: Dayna ist munter und es geht ihr gut. Die Besitzerin berichtet von einem weiteren einmaligen Erbrechen

am 5.9.2005. Die Schleimhaut ist rosa, KT 38.2 °C, KFZ unter zwei Sekunden, die Atmung ist normal und das Abdomen ist weich. Die Laborwerte sind in Tabelle 1 aufgelistet. Im Blutausstrich können im Vergleich zur ersten Untersuchung einige Babesienverdächtige Zellen gefunden werden und der molekulargenetische Nachweis mittels PCR ist wieder positiv. Auch 19 Tage nach Auftreten der beschriebenen Symptome können keine *B. canis*-spezifischen Antikörper detektiert werden. Es erfolgt die zweite Verabreichung (subcutan) von Imidocarb (Carbesia®, 6 mg/kg).

Die zweite Kontrolluntersuchung ist am 28.9.: Der Hündin geht es gut und die klinische Untersuchung ist ohne besonderen Befund. Die klinisch chemischen und hämatologischen Werte haben sich deutlich verbessert (Tab. 1). Im Blutausstrich kann nur eine Babesienverdächtige Zelle gefunden werden. Die PCR ist immer noch positiv, wobei die Menge an nachge-

wiesener Babesien-DNA im Vergleich zu den beiden Voruntersuchungen gesunken ist. Ausserdem ergab die serologische Untersuchung ein positives *B. canis*-Resultat mit einem Titer von 1:160. Trotz dieses Befundes erfolgt keine weitere Therapie und eine erneute Kontrolluntersuchung in 3–4 Wochen wird verabreitet. Am 25. 10. geht es Dayna sehr gut und die klinische Untersuchung ist wieder ohne besonderen Befund. Auch die klinisch-chemischen und hämatologischen Parameter sind bis auf eine leicht erniedrigte Leukozytenzahl alle wieder im Normalbereich (Tab. 1). Im Blutausschrieb werden keine Babesien mehr gefunden und die PCR ist negativ. Die serologische Untersuchung ergibt einen *B. canis*-Titer von 1:640.

### «Fall Jimbo» – eine autochthone Babesien-Infektion im Kanton Schaffhausen

Bei dem zweiten Fall handelt es sich um den zweijährigen kastrierten Mischlingsrüden Jimbo, der am 6. April 2005 in der Kleintier-Klinik Rhenus vorgestellt wird. Der Besitzer berichtet von Mattigkeit, Inappetenz und Mühe beim Aufstehen seit einer Woche. In dieser Zeit musste Jimbo auch einmal erbrechen. Die klinische Untersuchung ergibt ein reduziertes Allgemeinbefinden, ein gespanntes Abdomen, sowie eine KT von 40.7 °C. Es erfolgt eine

Blutentnahme und Harnengewinnung mittels Cystozentese. Die Urinuntersuchung ergibt eine Hämoglobinurie. Der Hund wird stationär aufgenommen und erhält Ringer-Laktat im Dauertropf intravenös, sowie eine Antibiose (Amoxicillin/Marbofloxacin iv). Die am 7.4. erfolgte Laboranalyse ist in Tabelle 2 zusammengestellt. Im Blutausschrieb werden einige Babesien-verdächtige Zellen identifiziert, was mittels PCR eindeutig bestätigt wird. *B. canis*-spezifische Antikörper können nicht nachgewiesen werden. Als Behandlung erfolgt eine einmalige Imidocarb-Verabreichung (Carbesia®, 6mg/kg, subcutan) am 8.4., was schon am nächsten Tag zu einer deutlichen Besserung des Allgemeinbefindens führt. Bei der Kontrolluntersuchung am 2.5. geht es Jimbo gut und die klinische Untersuchung ist ohne besonderen Befund. Die klinisch-chemischen und hämatologischen Werte haben sich alle deutlich verbessert (Tab. 2). Im Blutausschrieb können keine Babesien-verdächtigen Zellen mehr gefunden werden. Auch PCR und die serologische Untersuchung sind negativ. Zur Frage des möglichen Infektionsortes gibt der Besitzer an, dass er mit Jimbo nie im Ausland war und auch den Raum Schaffhausen nie verlassen hatte. Er berichtet von periodischem Zeckenbefall nach regelmässigen Spaziergängen in einem Waldstück bei Herblingen in der Zeit vor dem Auftreten der Symptomatik.

Tabelle 2: «Fall Jimbo» – Laboruntersuchungen (Fall 2).

Untersuchungsparameter (Referenzbereich)	Untersuchungsdatum	
	7. 4. 2005	3. 5. 2005
Albumin (30–37 g/l)	33	35
Alkalische Phosphatase (bis 240 U/l)	<b>765</b>	199
Bilirubin (bis 6.8 µmol/l)	<b>16.4</b>	6.2
Gesamteiweiss (54–68 g/l)	61	59
GOT (bis 40 U/l)	<b>93</b>	29
GPT (bis 75 U/l)	40	38
Eisen (16–43 µmol/l)	<b>9</b>	21
Kreatinin (bis 133 µmol/l)	<b>169</b>	124
Harnstoff (2.5–8.8 mmol/l)	<b>11.0</b>	7.9
Amylase (350–1200 U/l)	<b>2438</b>	1104
Creatin-Kinase (bis 180 U/l)	<b>225</b>	165
Erythrozyten (5.5–8.5 × 10 <sup>12</sup> /l)	6.3	6.7
Hämatokrit (42–57%)	46	50
Hämoglobin (14.0–20.0 g/dl)	15.2	17.2
Leukozyten (5.7–12.4 × 10 <sup>9</sup> /l)	<b>3.5</b>	5.9
Thrombozyten (200–400 × 10 <sup>9</sup> /l)	<b>21</b>	273
<b>Parasiten im Blutausschrieb</b>	<b>positiv</b>	negativ
<b>Babesien-PCR</b>	<b>positiv</b>	negativ
<b><i>B. canis</i>-IFAT (Titer)</b>	negativ	negativ

## Canine Babesiose – Fälle bei ALOMED

Im Zeitraum von April bis Dezember 2005 konnten bei ALOMED insgesamt sieben Fälle von caniner Babesiose eindeutig diagnostiziert werden. Alle uns vorliegenden Daten der fünf nicht im Detail beschriebenen Fälle sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Immer ist der Nachweis von Babesien-DNA mittels PCR positiv ausgefallen und die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab in sechs Fällen eine Infektion mit *Babesia canis canis*. Bei einem Hund konnte *Babesia canis vogeli* identifiziert werden (Fall 3). Die Sequenzanalysen ergaben dabei in all diesen Fällen eine 100%ige Homologie zu publizierten Sequenzen. Obwohl alle sieben PCR-positiven Hunde eine massive Thrombozytopenie und erhebliche Symptomatik aufwiesen, wurden bei nur zwei Patienten eindeutig Babesien im Blutausstrich gefunden (Fall 2 und 5).

Im Fall «Dayna» (Fall 1) konnten, wie oben beschrieben, nur zwei Babesien-verdächtige Zellen ausgemacht werden. Bei einem weiteren Fall (Fall 6) war die Qualität der Ausstriche durch die zu lange Lagerung des Blutes nicht optimal und die verdächtigen Zellen stark verzerrt. Beide Befunde wurden als fragwürdig eingestuft. In drei Fällen (Fall 3, 4 und 7) konnten in den Blutausstrichen keine Babesien identifiziert werden. Bei einem Patienten (Fall 4) konnte im Anschluss an ein positives PCR-Resultat eine Babesie in einem im Labor neu angefertigten Blutausstrich gefunden werden. *B. canis*-spezifische Antikörper konnten nur bei zwei der sieben Hunde nachgewiesen werden (Fall 4 und 7), alle anderen Tiere waren bei der Erstuntersuchung serologisch unauffällig. Fünf Hunde waren nachweislich kurz vor dem Auftreten von Symptomen als Urlaubsbegleiter in einem südlichen Land (zwei in Südfrankreich, drei in Ungarn) gewesen, ein Hund war frisch aus Teneriffa (Spanien) importiert worden. Von diesen sechs «Reisehunden» waren bei dreien die Blutausstriche unverdächtig, zwei fragwürdig und einer klar positiv. Die Serologie von nur zwei der sechs Hunde war positiv.

## Diskussion

Bis heute existiert kein befriedigender Standard für die Diagnostik der caninen Babesiose (Bose et al., 1995). Der lichtmikroskopische Direktnachweis der Babesien im gefärbten Blutausstrich und der serologische Nachweis von *B. canis*-spezifischen Antikörpern sind bisher Mittel der Wahl zur Diagnosesicherung. Es wird jedoch häufig von Fällen berichtet, bei denen keine Parasiten im Ausstrich entdeckt werden und/oder die serologisch unauffällig sind, obwohl die Hunde nachweislich mit Babesien infiziert waren (Birkenheuer et al., 1999; Breitschwerdt et al., 1983;

Macintire et al., 2002). Der Fall «Dayna» steht exemplarisch für solche meist akuten Infektionen mit der beschriebenen massiven Symptomatik, welche – in einem frühen Stadium erkannt – gut behandelt werden können. Ein unsicherer mikroskopischer Nachweis von Babesien und die unauffällige Serologie spiegeln jedoch die Nachteile dieser diagnostischen Strategie wider. Nur durch den molekularbiologischen Direktnachweis des Erregers konnte in diesem Fall diagnostische Sicherheit erreicht und eine gezielte Therapie eingeleitet werden.

In Verbindung mit einer Abklärung von Reisekrankheiten wird gegenwärtig von veterinärmedizinisch tätigen Einrichtungen neben dem mikroskopischen Nachweis praktisch ausschliesslich die Antikörperbestimmung zur Babesien-Diagnostik empfohlen. Im «Fall Dayna» war diese selbst 15 Tage nach dem Auftreten massiver Symptome negativ, obwohl im Normalfall spezifische Antikörper acht bis zehn Tage nach Infektion nachweisbar sein sollen (Boozer und Macintire, 2003; Taboada et al., 1992). Bei den sieben von uns im Jahre 2005 diagnostizierten Fällen caniner Babesiose konnten lediglich bei zwei Hunden *B. canis*-spezifische Antikörper gefunden werden. Auf der anderen Seite wurden auch immer wieder Fälle von asymptomatischen Hunden beschrieben, die serologisch positiv waren, bei denen aber weder der mikroskopische Nachweis noch die PCR auf eine Infektion mit Babesien hindeuteten (Birkenheuer et al., 2003; Wlosniewski et al., 1997). Der «Fall Dayna» zeigt in diesem Zusammenhang, dass eine Serokonversion erst mehr als zwei Wochen nach der Infektion eintreten kann und es trotz erfolgreicher Therapie aufgrund der verzögerten Immunantwort noch zu einem Titeranstieg kommen kann, der ohne ein Wissen über die Vorgeschichte durchaus zu falschen Schlussfolgerungen verleiten könnte.

Der Fall «Jimbo» repräsentiert eine akute Babesien-Infektion, die schon anhand des mikroskopischen Nachweises diagnostiziert werden konnte. Hier diente die PCR zur Diagnosesicherung und zur Beurteilung des Therapieerfolges. Dieser Fall zeigt weiter, dass die canine Babesiose nicht mehr nur als eine typische Reisekrankheit anzusehen ist, sondern in autochthoner Form auch im Kanton Schaffhausen vorkommt.

In sechs der sieben Fälle konnte durch Sequenzierung eine Infektion mit der als sehr pathogen geltenden Unterart *Babesia canis canis* ausgemacht werden. Dagegen war Fall 3 mit der anderen in Europa vorkommenden Unterart, *Babesia canis vogeli*, infiziert. Dieser Erreger gilt als weniger pathogen und soll meist nur subklinische Infektionen verursachen (Hauschild und Schein, 1996; Schetters et al., 1997). Für den beschriebenen Fall trifft diese These jedoch nicht zu, da eine vergleichbar massive Symptomatik aufgetreten ist.

Tabelle 3: ALOMED-Babesiose-Fälle 2005 – Anamnese, Klinik, Labor und Therapieverlauf.

Fall 3			
<b>Aufenthaltsorte</b>	Südfrankreich-Urlaub im April 2005		
<b>Symptomatik</b>	Ab dem Tag der Abreise Symptome: Fieber, Apathie, Erbrechen, Anorexie		
<b>Laboruntersuchung</b>	6.5.2005		
Hämatologie	Thrombozytopenie		
Blutausstrich	negativ		
PCR	positiv ( <i>Babesia canis vogeli</i> )		
IFAT	negativ		
<b>Therapie/Verlauf</b>	Leichte Besserung auf Amoxycyclin. Nach Diagnosestellung Glindamycin: sofortige Besserung und Symptommfreiheit nach 2 Tagen		
Fall 4			
<b>Aufenthaltsorte</b>	Südfrankreich-Urlaub vom 15.9.–29.9.2005		
<b>Symptomatik</b>	Leichte Symptome (müde, matt) treten direkt nach Urlaub auf. Bei Vorstellung (18.10.): Fieber, Schwäche, Bewegungsunlust		
<b>Laboruntersuchung</b>	19.10.2005		
Hämatologie	Thrombozytopenie und Anämie		
Blutausstrich	negativ		
PCR	positiv ( <i>Babesia canis canis</i> )		
IFAT (Titer)	positiv (1:320)		
<b>Therapie/Verlauf</b>	Einmalige Carbesia-Gabe: symptomfrei nach 3–4 Tagen		
Fall 5			
<b>Aufenthaltsorte</b>	Ungarn (Hundeausstellung) am 15.5.2005		
<b>Symptomatik</b>	Am 18.5. treten Symptome auf: Anorexie, Apathie, Schwäche, Fieber, Erbrechen		
<b>Laboruntersuchung</b>	21.5.2005		
Hämatologie	Thrombozytopenie		
Blutausstrich	positiv	Kontrolluntersuchung am 2.6.:	negativ
PCR	positiv ( <i>Babesia canis canis</i> )		negativ
IFAT	negativ		negativ
<b>Therapie/Verlauf</b>	Zweimalige Carbesia-Gabe (14-Tage-Abstand): symptomfrei nach 3 Tagen		
Fall 6			
<b>Aufenthaltsorte</b>	Importiert aus Teneriffa (Spanien) am 1.6.2005		
<b>Symptomatik</b>	Symptome (Apathie, Anorexie, Erbrechen) werden direkt bei Ankunft festgestellt. Bei Vorstellung (2.6.): Apathie, Gewichtsverlust, Schwäche, Fieber, Erbrechen, Ikterus, Abszesse, starker Durchfall, Hautveränderungen und starker Zeckenbefall		
<b>Laboruntersuchung</b>	3.6.2005		
Hämatologie	Thrombozytopenie und Anämie		
Blutausstrich	fraglich		
PCR	positiv ( <i>Babesia canis canis</i> ) (Ko-Infektion mit <i>Ehrlichia canis</i> und <i>Mycoplasma haemocanis</i> )		
IFAT	negativ		
<b>Therapie/Verlauf</b>	Einmalige Carbesia-Gabe und antibiotische Behandlung; keine Angaben über Verlauf		
Fall 7			
<b>Aufenthaltsorte</b>	Ungarn-Urlaub vom 30.4–7.5.2005		
<b>Symptomatik</b>	Symptome (Apathie, Anorexie, Erbrechen) treten am 9.5. auf. Bei Vorstellung (18.10.): Anorexie, Apathie, Schwäche, Fieber, Erbrechen, Ikterus		
<b>Laboruntersuchung</b>	19.10.2005		
Hämatologie	Thrombozytopenie und Anämie		
Blutausstrich	negativ		
PCR	positiv ( <i>Babesia canis canis</i> ) (Ko-Infektion mit <i>Mycoplasma haemocanis</i> )		
IFAT (Titer)	positiv (1:80)		
<b>Therapie / Verlauf</b>	Zweimalige Carbesia-Gabe (14-Tage-Abstand): Besserung am folgenden Tag, symptomfrei nach 3 Tagen		

Einige Studien zeigen, dass der Einsatz der PCR in der Babesiose-Diagnostik viele Vorteile bringt und in Sensitivität und Spezifität den anderen Verfahren überlegen ist (Birkenheuer et al., 2005; Bose et al., 1995). Einem standardmässigen Einsatz der PCR in der Babesiose-Diagnostik werden jedoch zahlreiche Argumente entgegengehalten. Es sind dies vor allem die Gefahr von falsch-positiven Resultaten durch Kontaminationen, ein zu hoher Kosten- und Zeitaufwand und eine nur bedingt routinemässige Durchführbarkeit. All diese Punkte treffen auf die von uns etablierte Real-Time-PCR nicht mehr zu. Diese ist hoch spezifisch, sehr sensitiv und es bedarf im Notfall nur etwa 2 Stunden, um die DNA aus dem Blut zu extrahieren und mittels PCR auf Babesien zu untersuchen. Durch das geschlossene System der Real-Time-PCR ist die Kontaminationsgefahr auf ein Minimum reduziert. Die quantitative PCR ermöglicht es zudem, die Menge an Erreger-DNA zu bestimmen und so Aussagen über den Therapieerfolg treffen zu können. Der «Fall Dayna» zeigt, dass zwar auch zehn Tage nach wiederholter Carbesia®-Gabe noch Erreger-DNA im Blut nachweisbar ist, jedoch in deutlich reduzierter Menge. Diese Information und das Wissen über die relativ lange Halbwertszeit des Medikamentes ermöglichte die sinnvolle Entscheidung gegen eine erneute Applikation, was durch die folgenden Kontrolluntersuchung bestätigt werden konnte.

Aus den vorliegenden Daten ergeben sich folgende diagnostische Empfehlungen: (1) Der PCR-Nach-

weis von Babesien-DNA aus EDTA-Blut ist zum Nachweis der caninen Babesiose im Anfangs- oder Akutstadium das labordiagnostische Mittel der Wahl. (2) Durch eine Kombination aus mikroskopischem Direktnachweis und PCR ist eine Diagnosestellung am schnellsten und sichersten möglich. (3) Der Nachweis von Babesien-spezifischen Antikörpern kann bei asymptomatischen Hunden (z.B. Import-Tiere) dann sinnvoll sein, wenn es darum geht, einen zurückliegenden Kontakt oder Infektion auszuschliessen. Bei symptomatischen Tieren ist diese Methode nur als Ergänzung, keinesfalls als Ersatz von mikroskopischem Direktnachweis und PCR anzuwenden.

## Dank

Unser Dank geht an Frau A. Hahmann-Müller, Frau S. Blum, Frau S. Wolf und den Mitarbeiterinnen der Kleintier-Klinik Rhenus für deren hervorragende technische Unterstützung. Für die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken wir uns bei Dr. T. Naucke (D-Niederkassel). Bedanken wollen wir uns auch ganz herzlich bei den kooperierenden Tierärzten Dr. A. Betzl (Tierklinik Oberhaching, D-Oberhaching), Dr. U. Dinger (D-Villingen), Dr. L. Goldinger (tezet AG, CH-Müllheim), Dr. M. Schärz (CH-Hegnau) und Dr. G. Soldati (Tierklinik Rigiplatz, CH-Cham) für deren grosse Hilfe beim Zusammenstellen der anamnestischen und klinischen Daten.

### Importance de la PCR dans le diagnostic de la babésiose canine

Lors de suspicion clinique de babésiose chez le chien, on effectue principalement, outre la recherche directe de l'agent pathogène dans des frotis sanguins colorés, la mise en évidence d'anticorps dirigés contre *Babesia canis*. Le présent travail permet de montrer, sur la base de sept cas (avec des données relatives à l'anamnèse à la clinique, aux diagnostics de la laboratoire et au suivi de traitement), qu'une nouvelle stratégie de laboratoire est nécessaire pour démontrer une infection à *Babesia canis*. La mise en évidence par des techniques de génétique moléculaire au moyen d'une PCR en temps réel joue ici le rôle central pour un diagnostic sûr. Bien que les chiens positifs à la PCR aient tous présenté une symptomatologie marquée, on a trouvé des babésias ou des anticorps spécifiques que chez deux d'entre eux. Un cas autochtone de babésiose acquise dans le canton de Schaffhouse est placé en regard de 6 cas typiques d'infection contractées lors de voyages.

### Importanza del PCR nella diagnosi di babesiosi canina

Oggigiorno, se c'è sospetto clinico di babesiosi in un cane, oltre alla dimostrazione diretta del vettore con uno striscio di sangue colorato viene effettuato prevalentemente la prova serologica di anticorpi specifici di *Babesia canis*. In questo studio si è potuto dimostrare sulla base di sette casi (con dati sull'anamnesi, clinici, diagnosi di laboratorio e decorso della malattia) che è necessario disporre di una nuova strategia di laboratorio per comprovare un'infezione da *Babesia canis*. La prova genetico molecolare della babesiosi tramite PCR Real Time gioca un ruolo centrale per una sicura diagnosi. Anche se i cani risultati positivi al PCR presentavano una sintomatologia pronunciata è stata rilevata, tramite striscio di sangue oppure riscontrando anticorpi, una babesiosi solo ogni due pazienti. Sei erano tipici casi in infezioni da viaggio contro un caso di babesiosi canina autoctona nel canton Sciaffusa.

## Literatur

- Bernasconi M. V., Valsangiacomo C., Balmelli T., Peter O., Piffaretti J. C.: Tick zoonoses in the southern part of Switzerland (Canton Ticino): occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* sp. Eur. J. Epidemiol. 1997, 13: 209–215.
- Birkenheuer A. J., Correa M. T., Levy M. G., Breitschwerdt E. B.: Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000–2003). J. Am. Vet. Med. Assoc. 2005, 227: 942–947.
- Birkenheuer A. J., Levy M. G., Savary K. C., Gager R. B., Breitschwerdt E. B.: *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 1999, 35: 125–128.
- Birkenheuer A. J., Levy M. G., Stebbins M., Poore M., Breitschwerdt E.: Serosurvey of AntiBabesia Antibodies in Stray Dogs and American Pit Bull Terriers and American Staffordshire Terriers From North Carolina. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 2003, 39: 551–557.
- Boozer A. L., Macintire D. K.: Canine babesiosis. Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract. 2003, 33: 885–904.
- Bose R., Jorgensen W. K., Dalglish R. J., Friedhoff K. T., de Vos A. J.: Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. Vet. Parasitol. 1995, 57: 61–74.
- Breitschwerdt E. B., Malone J. B., MacWilliams P., Levy M. G., Qualls C. W. Jr., Prudich M. J.: Babesiosis in the Greyhound. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1983, 182: 978–982.
- Hauschild S., Schein E.: The subspecies specificity of *Babesia canis*. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 1996, 109: 216–219.
- Macintire D. K., Boudreaux M. K., West G. D., Bourne C., Wright J. C., Conrad P. A.: *Babesia gibsoni* infection among dogs in the southeastern United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2002, 220: 325–329.
- Pfister K., Schwallbach B., P. A., C., Liz J. S., A., A.: Präliminäre Untersuchung zur endemischen Ausbreitung von *Babesia canis* und der Zecke *Dermacentor reticulatus* in der Schweiz. Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 1993, 15: 1–6.
- Sager H., Casati S., Hartmeier G., Sommer B.: Autochthonous cases of canine babesiosis in the canton Solothurn. Schweiz. Arch. Tierheilk. 2005, 147: 259–265.
- Schettler T. P., Moubri K., Precigout E., Kleuskens J., Scholtes N. C., Gorenflot A.: Different *Babesia canis* isolates, different diseases. Parasitology 1997, 115: 485–493.
- Schuster F. L.: Cultivation of *Babesia* and *Babesia*-like blood parasites: agents of an emerging zoonotic disease. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15: 365–373.
- Taboada J., Harvey J. W., Levy M. G., Breitschwerdt E. B.: Seroprevalence of babesiosis in Greyhounds in Florida. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1992, 200: 47–50.
- Wlosniewski A., Leriche M. A., Chavigny C., Ulmer P., Donnay V., Boulouis H. J., Mahl P., Druilhe P.: Asymptomatic carriers of *Babesia canis* in an enzootic area. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1997, 20: 75–86.
- Zahler M., Gothe R.: Endemic risk of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* in Germany. An epidemiologic study. Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere 1997, 25: 666–670.
- Zahler M., Steffenz T., Lutz S., Hähnel W., Rinder H., Gothe R.: *Babesia canis* und *Dermacentor reticulatus* in München, ein neuer Naturherd in Deutschland. Tierarztl. Prax. 2000, 28: 116–120.

## Korrespondenzadresse

Dr. Daniel Schaarschmidt, ALOMED – Analytisches Labor Dr. Werner Müller, Öschlestrasse 77  
D- 78315 Radolfzell, Tel. +49 (0) 7732 9527-0, Fax. +49 (0) 7732 9527-27  
E-Mail: schaarschmidt@alomed.de

Manuskripteingang: 23. Januar 2006  
Angenommen: 1. März 2006