

Diagnostik von Infektionskrankheiten des Pferdes mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zählt zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie, daher haben die PCR- Erregernachweise in der Diagnostik vielfach die konventionellen Nachweismethoden abgelöst.

PCRs basieren auf einer Vervielfältigung kurzer, genau definierter DNA-Sequenzen des Erregers. Daraus resultieren eine extrem hohe Sensitivität und Spezifität dieser Methode. Da bei der PCR Erreger-DNA bzw. RNA nachgewiesen wird, ist früher und darüber hinaus durch einmalige Untersuchung ein Erregernachweis zu führen als z.B. durch Antikörpernachweise oder kulturelle Techniken. Nach erfolgter Behandlung des Tieres ist das PCR-Ergebnis in den meisten Fällen negativ.

Die hohe Sensitivität der PCR-Tests erfordert eine sorgfältige Probenentnahme. Bzgl. Probentransport ist die PCR relativ robust, da keine vermehrungsfähigen Erreger (wie z.B. bei der kulturellen Erregeranzüchtung) erforderlich sind, extreme Temperaturschwankungen sollten jedoch vermieden werden.

Wichtig für den einsendenden Tierarzt ist die optimale Probenauswahl, die sich aus dem wahrscheinlichen Aufenthaltsort des Erregers ergibt:

- z.B.
- bei Virämie/Bakteriämie ==> Blut
 - betroffenes (Ziel-)Organ ==> Abstriche, Urin o.ä.
 - Rückzugs-(Latenz-) Organ ==> z.B. Lymphknoten, Granulozyten

Da die PCR geringste Mengen an Erregermaterial qualitativ nachweist, muss das positive Ergebnis unter Berücksichtigung der Klinik kritisch interpretiert werden. Ein positives PCR-Ergebnis gibt keine Auskunft über die Vermehrungsfähigkeit des Erregers.

Eingesandte Untersuchungsmaterialien sollten in sterilen, unbeschichteten Behältnissen transportiert werden. Kühlung der Proben (2-8°C) ist möglich, aber nicht erforderlich. Einfrieren der Proben ist ebenfalls möglich; ein Auftauen und Wiedereinfrieren ist jedoch unbedingt zu vermeiden.

Für Untersuchungen aus dem Blut sollte EDTA-Blut verwendet werden. Heparinblut ist ungeeignet! Abstriche müssten Sie bitte trocken -also ohne Medium- einschicken!

Im Folgenden werden die Infektionserkrankungen des Pferdes näher erläutert, für die sich eine Diagnostik via PCR anbietet. Dabei werden auch die für die jeweilige Erkrankung geeigneten Untersuchungsmaterialien dargestellt.

1) Bakterielle Erkrankungen

Borreliose

Erreger der durch Zecken übertragenen Erkrankung sind in Europa wahrscheinlich 3 pathogene Borrelienspezies der Gruppe *Borrelia burgdorferi sensu lato*: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*.

Die Diagnostik der Erkrankung gestaltet sich nach wie vor schwierig, zumal in Endemiegebieten sehr hohe Seroprävalenzen auch in der gesunden Pferdepopulation festge-

stellt werden. Eine Vielzahl klinischer Symptome wird beim Pferd mit Borrelien in Verbindung gebracht: Allgemeinstörungen, Gelenk-/Gliedmassenmanifestationen, Haut-, Augen- und Herzerkrankungen, neurologische Symptome bis hin zu Fortpflanzungsstörungen und Aborten. Dementsprechend vielfältig stellen sich auch die möglichen zur Untersuchung kommenden Materialien dar; am üblichsten beim Pferd sind die Erregerdiagnostik aus Synovia oder Liquor, evtl auch Haut. Der Erregernachweis aus dem Blut hat auch in einer Fieberphase wenig Aussicht auf Erfolg, da sich die Erreger im Gewebe und nicht über die Blutbahn verbreiten.

Lawsonia intracellularis

Dieses obligat intracelluläre, gram-negative Bakterium hat sich in den zurückliegenden Jahren zunehmend als ein bedeutendes Pathogen in der Differentialdiagnose von Fohlendiarrhoen erwiesen. Betroffen sind v.a. Fohlen im Absetzalter (<6-7 Monate), bei denen sich *L. intracellularis* in den Kryptzellen des Ileums festsetzt und dort eine proliferative Enteropathie verursacht. Daraus kann eine intestinale Malabsorption und/oder eine (meist) chronische Diarrhoe resultieren. Die Erkrankung tritt meist als Einzeltiererkrankung auf; Mehrfacherkrankungen in einem Betrieb sind aber beschrieben. Da nur sehr wenig Erreger mit den Faeces ausgeschieden werden, ist die PCR aus dem Kot die Methode der Wahl, um diese nachzuweisen; falsch negative Ergebnisse sind aufgrund der geringen Ausscheidungsrate aber möglich.

Leptospirose

Die über den Urin von Schädigern verbreiteten Leptospireninfektionen des Pferdes verlaufen meist klinisch inapparent; die Seroprävalenz unter den gesunden Pferden ist daher hoch (ca. 75%). Der Erreger wird über Futter oder Wasser aufgenommen und kann bei Pferden zu eher unspezifischen Symptomen führen: Fieber - oft intermittierend, Ikterus, Inappetenz, Leistungsminderung; Aborte sind beschrieben. Eine Erregerübertragung von Pferd zu Pferd kommt praktisch nicht vor. Der DNA-Nachweis bei fieberhaften Allgemeinerkrankungen kann über EDTA-Blut, bei chronischen Verläufen über den Urin geführt werden.

Equine Rezidivierende Uveitis (ERU)

Die Beteiligung einer intraokulär persistierenden Leptospireninfektion an der Ätiologie der ERU gilt als erwiesen. Sich daraus ergebende Autoimmunreaktionen führen zu einer fortschreitenden Schädigung innerer Strukturen des Auges bis hin zur Erblindung. Antikörpernachweis (=sensitivster Nachweis) oder aber Antigennachweis mittels PCR aus Kammerwasser oder Glaskörpermaterial sind beweisend für eine ERU. Cave: Serum-Ak-Titer haben keine Relevanz bzgl. ERU!

Rhodococcus equi

Rhodococcus equi ist ein fakultativ pathogener Keim, der im Boden und im Kot anderer Pferde vorkommt. *R. equi* ist der häufigste Erreger schwerer Pneumonien mit hohen Letalitätsraten bei Fohlen im Alter von 3 Wochen bis 6 Monaten. Eintrittspforte und Prädilektionsstelle ist die Lunge (Abszessbildungen!), von wo auch eine hämatogene Streuung in andere Organe möglich ist. Eine weitere Eintrittspforte kann der Magen-Darm-Trakt sein (Diarrhoen und Ulzera) und auch Nabelinfektionen sind möglich. Darüberhinaus weist *R. equi* eine Affinität zu Knochen und Gelenken auf. Untersuchungsmaterial der Wahl ist bei einer Lungenmanifestation ein Nasenabstrich oder -noch geeigneter- eine Trachealspülprobe. Die PCR bietet hier die Möglichkeit aufgrund ihrer Sensitivität auch die klinisch gesunden Ausscheider zu identifizieren. Der PCR-Nachweis von *Rhodococcus equi* erlaubt die Differenzierung zwischen dem *R. equi*-spezifischen Gen *choE* und dem Gen *vapA* („virulence-associated protein A“), welches auf dem Virulenzplasmid liegt. Das Virulenzplasmid, welches in die Pathogenese der Rhodococcose involviert ist und als Virulenzfaktor angesehen wird, ist den meisten *R. equi* Isolaten zu finden.

Streptococcus equi equi (Druse)

Druse ist eine weltweit verbreitete hochansteckende eitrige Lymphadenitis und Pharyngitis. Es ist eine typische Jungtiererkrankung, die eine langanhaltende Immunität induziert; ältere Tiere erkranken deshalb nur selten. Der DNA-/Erregernachweis erfolgt hauptsächlich aus Nasentupfern, Tracheobronchialsekret oder Abszesseiter. Die PCR hat gegenüber der kulturellen Anzucht den Vorteil, ein schnelleres Ergebnis liefern zu können bei gleichzeitig vergleichsweise höherer Sensitivität und Spezifität. So gelingt auch zuverlässiger die Identifikation klinisch gesunder Ausscheider, die in der Erregerepidemiologie eine zentrale Rolle spielen.

Da die PCR nicht zwischen toten und lebenden Organismen unterscheiden kann, sollte ein positiver Erregernachweis immer als Verdachtsdiagnose formuliert werden und durch eine kulturelle Untersuchung bestätigt werden.

2) Virale Erkrankungen

Equine Virusarteriitis/ EVA

EVA ist eine durch das equine Arteriitis-Virus verursachte ansteckende Viruserkrankung der Equiden, die weltweit verbreitet ist. Bestätigte Ausbrüche scheinen in den zurückliegenden Jahren zugenommen zu haben. Die Mehrheit der natürlich erworbenen Infektionen verläuft subklinisch; dennoch kommt es zur Serokonversion. Wo klinische Symptome auftreten, variieren sie in Art und Ausprägung: Fieber, Depression, Anorexie und periphere Ödeme, Konjunktivitis („pink eye“), Nesselfieber oder Aborte, bei Jungtieren auch fulminante Pneumonien und Pneumo-Enteritiden. Zur Virusübertragung kommt es hauptsächlich über den Samen; persistent infizierte Carrierhengste beherbergen das Virus in ihren akzessorischen Geschlechtsdrüsen, von wo es -intermittierend- mit den Genitalsekretoren ausgeschieden wird. Wallache, präpubertäre Hengste und Stuten können keine Carrier sein. V.a. bei erkrankten Tieren kann es zu einer Ausscheidung über andere Körpersekrete kommen: aerolisierte Sekrete des Respirationstraktes, Urin, Abortmaterial o.a. Neben dem Hengstsamen kommen auch diese Sekrete erkrankter Tiere für den RNA-Nachweis in Frage. Bei fieberhaft erkrankten Pferden kann auch ein RNA-Erregernachweis aus dem EDTA-Blut versucht werden.

Equine Herpesviren 1 und 4/ EHV 1 und 4

Infektionen sowohl mit EHV1 als auch mit EHV4 verursachen primär Erkrankungen des Respirationstraktes, wobei die Ausprägung der klinischen Symptome abhängig ist von Alter und Immunstatus des infizierten Tieres. V.a. Infektionen mit EHV1 sind in der Lage sich über die Respirationsschleimhaut hinaus auszubreiten und die schwerwiegenderen Manifestationen der Erkrankung herbeizuführen: Aborte, perinataler Fohlentod, neurologische Erkrankungen. Einmal infizierte Pferde bleiben zeitlebens Virusträger, wobei das Virus unter ungünstigen Umständen (Stress etc.) endogen wieder aktiviert werden kann. Latenzorgane stellen hauptsächlich Lymphorgane und die Leukozytenfraktion dar.

Bevorzugte Untersuchungsmaterialien für die PCR sind Nasentupfer/Sekrete des Respirationstraktes, Liquor cerebrospinalis oder Abortmaterial inkl. Eihäute. Blut sollte nur in 2. Linie und nur in einer Fieberphase zur Untersuchung kommen; da -wie o.a.- die Leukozytenfraktion ein Latenzorgan der Herpesviren darstellt könnte eine Untersuchung aus dem buffy coat versucht werden. Ein positives Ergebnis lässt im Wesentlichen die Aussage zulässt, dass das untersuchte Pferd Kontakt zu Herpesviren hatte – ob für einen akut in Frage stehenden Fall oder schon weiter zurückliegend kann in die Befunde meist nicht hineininterpretiert werden. Bei Jungtieren kann die Untersuchung aus dem Blut dagegen sinnvoll sein.

Equine Influenza

Die equine Influenza wird verursacht durch die beiden Subtypen Influenza A equi 1 (H7N7) und A equi 2 (H3N8), wobei Subtyp 1 in den letzten 30 Jahren kaum noch in Erscheinung trat. Bei empfänglichen Equiden führt die Infektion zu Fieber und einem rauen, trockenen Husten. In ungeimpften Populationen breitet sich das Virus rasch aus. Bakterielle Sekundärinfektionen mit muko-purulentem Nasenausfluss sind häufig und maskieren das klinische Bild v.a. in teilimmunen Populationen. Die PCR aus Nasentupfern, TBS/BALF kann hier zu einer schnellen und sicheren Diagnose führen.

3) „Blutparasiten“

Theileria equi/Babesia caballi – Babesiose – Piroplasmose

Equine Piroplasmose oder Babesiose ist eine durch Zecken übertragene Protozoeninfektion, die in den meisten tropischen und subtropischen Gebieten endemisch ist und bis in die gemäßigten Zonen hineinreicht. Bedingt durch Pferdetransporte und die Ausweitung des Verbreitungsgebietes der Vektoren kann auch in Deutschland inzwischen mit klinischen Fällen und seropositiven Pferden gerechnet werden. Erreger sind *Babesia caballi* und *Theileria equi*, welche in den Erythrozyten infizierter Tiere gefunden werden. Die klinischen Symptome sind oft unspezifisch, der Verlauf perakut bis chronisch. Charakteristisch wären: Fieber – auch intermittierend, Inappetenz, erhöhte Atem- und Herzfrequenz, Depression, Ikterus und Hämoglobinurie, bei chronischem Verlauf: Gewichtsverlust. Infizierte Tiere bleiben oft lange Zeit Carrier und stellen so Infektionsquellen für die Vektoren dar. Das geeignete Untersuchungsmaterial für die PCR ist EDTA-Blut. In einem 1. Schritt würde übergeordnet auf Babesien/Theilerien untersucht. Bei positivem Ergebnis könnte über eine Sequenzierung eine Differenzierung *Theileria equi/Babesia caballi* angeschlossen werden.

Anaplasmosen/ „Ehrlichiose“

Erreger der equinen granulozytären Ehrlichiose ist *Anaplasma phagocytophilum* (ehemals *Ehrlichia equi*), ein obligat intrazelluläres gramnegatives, kokkoides Bakterium. In Europa steht die durch Zecken übertragene granulozytäre Ehrlichiose im Vordergrund; nach Inokulation kommt es zu einer lymphogenen oder hämatogenen Ausbreitung mit anschließender Besiedlung der Zielzellen: neutrophile und eosinophile Granulozyten. Initiale klinische Symptome sind Fieber, Apathie, Gliedmassenödeme und Bewegungsunlust; labordiagnostisch findet man Thrombozytopenie, milde Anämie und Hyperbilirubinämie. Adulte Tiere > 4 Jahren zeigen eine deutlichere Ausprägung der Symptome als jüngere Pferde. Nach überstandener Erkrankung entwickeln die Pferde eine über ca. 2 Jahre belastbare Immunität; diese ist dabei unabhängig von einer latenten Infektion oder einem Carrierstatus.

Der DNA-Nachweis gelingt im EDTA-Blut erkrankter Pferde ca. 5 Tage nach Inokulation, d.h. zeitgleich mit Einsetzen des Fiebers, während der mikroskopische Nachweis der Blutparasiten erst ca. 5 Tage nach Beginn der fieberhaften Erkrankung möglich ist.