

Die Intra-vitam-Diagnose der Bornaschen Krankheit (BD) bei Equiden

A. Grabner¹, Sibylle Herzog², Hildburg Lange-Herbst² und K. Frese³

Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin¹, Institut für Virologie² und Institut für Veterinärpathologie³ der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zusammenfassung

In einer retrospektiven Studie aus einem 14-jährigen Zeitraum (1988-2002) wurden bei Equiden (n = 113) mit Bornascher Krankheit (BD) die diagnostischen Möglichkeiten intra vitam und post mortem gegenübergestellt mit dem Ziel, Hinweise für die geeignete Methode zur Intra-vitam-Diagnose zu gewinnen. Das Untersuchungsmaterial (Serum, Liquor, Gehirn) stammte von Pferden (n = 97) und Ponies (n = 12) unterschiedlicher Rassen im Alter zwischen 6 Monaten und 28 Jahren sowie drei Eseln und einem Zwergmaultier. Die Tiere lebten überwiegend in endemischen Gebieten in Bayern, außerdem in Baden-Württemberg, Hessen und Niedersachsen. Eine klinische Verdachtsdiagnose BD ist bei entsprechenden neurologischen Ausfallserscheinungen und dem Vorliegen einer nichteitrigen Meningoenzephalitis (mononukleäre Pleozytose) als Ergebnis der Liquorpunktion möglich. Die ätiologische Diagnose konnte in 86/98 Fällen durch den Nachweis BDV-spezifischer Antikörper in Serum und Liquor mittels indirekter Immunfluoreszenz (IFA) gestellt werden. In allen Fällen wurde die ätiologische Diagnose post mortem durch den Antigen- und den RNA-Nachweis im Gehirn bestätigt. Die Sensitivität des IFA kann mit 88 % angegeben werden. Der Anteil falsch-negativer Ergebnisse (12 %) war ausschließlich auf perakute Krankheitsverläufe (n = 10) bzw. zu Beginn einer akuten Erkrankung (n = 1), bei denen Antikörper im Liquor und teilweise auch im Serum noch nicht gebildet wurden oder der Antikörpertiter unter der Nachweisgrenze liegt, und auf eine Vorbehandlung mit Kortikosteroiden (n = 1) zurückzuführen. Die Zuverlässigkeit der Methode wird auch durch deren Spezifität (100 %) belegt, da bei Pferden mit inapparenter BDV-Infektion (n = 20) und bei neurologischen Störungen ohne BDV-Infektion (n = 20) keine falsch-positiven Ergebnisse erzielt wurden. Im Gegensatz dazu konnte ein RNA-Nachweis in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels RT-PCR weder bei Pferden mit BD (n = 27), bei inapparenter BDV-Infektion (n = 53) noch bei neurologischen Störungen ohne BDV-Infektion (n = 95) geführt werden.

Schlüsselwörter: Bornasche Krankheit, Intra-vitam-Diagnose, Immunfluoreszenz, Liquor, Pferd

Antemortem diagnosis of Borna disease (BD) in equids.

In a retrospective study during a 14-year period (1988-2002) equids with Borna disease (n = 113) were evaluated. The goal of the study was to find the most reliable method for diagnosing BD by comparing antemortem and postmortem results. Serum, cerebrospinal fluid (CSF) and brain tissue were taken from horses (n = 97) and ponies (n = 12) of different breeds and age (between 6 months and 28 years). Furthermore, 3 donkeys and 1 mule were afflicted with BD. The animals lived in endemic areas mainly in Bavaria and other federal states of Germany (Baden-Württemberg, Hessen, Niedersachsen). Clinically, BD can be suspected with appropriate neurological signs and CSF results (nonsuppurative meningoencephalitis with mononuclear pleocytosis). In 86 out of 98 cases a diagnosis was based on the detection of BDV specific antibodies both in serum and CSF by indirect immunofluorescence assay (IFA). In all cases the diagnosis was confirmed by the detection of antigen and RNA in brain tissue. Therefore the sensitivity of the IFA method was 88 percent. False negative results (12 percent) occurred in peracute disease (n = 10) and in one horse at the beginning of an acute form of BD. Another horse was pretreated with corticosteroids. In these cases there might have been no production of antibodies mainly in the CSF but also in the serum or the antibody titer was too low for detection. In horses with inapparent BDV infection (n = 20) and with neurologic disease without BDV infection (n = 20) no false positive results were obtained. Therefore the specificity of the IFA method was 100 percent. The detection of RNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by RT-PCR was not useful, since the results were negative in equids with BD (n = 27), in horses with inapparent BDV infections (n = 53) or in horses with neurological diseases without BDV infections (n = 95).

Keywords: Borna disease, antemortem diagnosis, immunofluorescence, cerebrospinal fluid, equids.

Einleitung

Die Bornasche Krankheit (BD) ist eine akut bis subakut, selten chronisch verlaufende Meningoenzephalomyelitis, die außer bei Equiden und Schafen, gelegentlich auch bei anderen Spezies wie Rind, Ziege, Kaninchen, Hund, sowie offenbar auch bei Katzen, Straußen und Zootieren vorkommt (Heinig 1969; Lundgren et al. 1993; Caplazi et al. 1994; Schüppel et al. 1994; Rott und Becht 1995; Weissenböck et al. 1998). Der Erreger ist ein behülltes RNA-Virus mit einem einzelsträngigen, nicht-segmentierten Genom negativer Polarität (de la

Torre 1994) und wird in der Ordnung Mononegavirales einer eigenen Virusfamilie – Bornaviridae – zugeordnet. Versuche am Modell der Lewis-Ratte zeigten, dass die Genese der BD auf einer virusinduzierten, T-zellvermittelten immunpathologischen Reaktion beruht (Narayan et al. 1983). Wichtige Hinweise zur Immunpathologie der BD konnten auch beim Pferd dargestellt werden (Bilzer et al. 1996).

Das Vorkommen der BD ist bisher nur in Deutschland und der Schweiz (Schmidt 1952; Metzler et al. 1979) und auch in Österreich (Suchy et al. 1997) gesichert. In 72 % der unter-

suchten Bestände waren es Einzelfälle der Krankheit. Wiederholte Ausbrüche wurden frühestens 2 Monate bis mehrere Jahre nach der Ersterkrankung in 28 % der Bestände festgestellt (Grabner et al. 1998). Die Erkrankung tritt heute sporadisch auf, und ist nicht nur auf die früher beschriebenen, klassischen Endemiegebiete in Mittel- und Süddeutschland beschränkt. In Mitteldeutschland erstellte Erhebungen zeigten, dass sich geographische Veränderungen in der Häufigkeit des Auftretens der BD ergaben (Dürwald 1993). Die derzeitige Inzidenz in Bayern kann nach eigenen Aufzeichnungen mit jährlich 0,02 bis 0,04 Prozent geschätzt werden (Grabner et al. 1998). Die Inkubationszeit natürlicher BD-Fälle ist nicht definitiv bekannt. Realistisch ist die Zeit von 2 bis 6 Monaten, die anhand früherer hoher Fallzahlen angesetzt wurde (Schmidt 1952). Eine saisonale Häufung der Krankheitsfälle im Frühjahr mit deutlicher Abnahme zum Jahresende hin wurde allgemein beobachtet (Schmidt 1912; Heinig 1969; Grabner und Fischer 1991; Herzog et al., 1994; Uhlig und Kinne 1998).

Bei natürlicher BDV-Infektion verläuft die Krankheit überwiegend als akute bis subakute Meningoenzephalitis, die nach eigenen Untersuchungen in 95/101 der Fälle zum Tod führte. Bei weniger schwerem Krankheitsverlauf können Spontanheilungen auftreten, wobei eine persistierende Infektion angenommen wird. In einem geringen Teil der Fälle kann die BD einen chronischen Verlauf nehmen, der teilweise rekurrend ist. Das Vorkommen einer klinisch inapparenten, blauen Enzephalitis scheint ebenfalls möglich (Richt et al. 2000). Im Gegensatz zur geringen Inzidenz der Erkrankung liegt nach umfangreichen seroepidemiologischen Untersuchungen in den alten Bundesländern eine Seroprävalenz von 11,5 % (1.057/9.187) bei klinisch unauffälligen Pferden vor, die unabhängig von der Anzahl der Untersuchungen im einzelnen Bundesland ähnlich hoch ausfiel (Herzog et al. 1994). In endemischen Gebieten wurde darüber hinaus bei klinisch inapparenten Pferden eine mit 22,4 % wesentlich höhere Seropositivität festgestellt (Kailer 1998). In Beständen mit an BD erkrankten Pferden stieg die Rate der seropositiven, klinisch inapparenten Pferde auf über 50 % an.

Die hohe Verbreitung der BDV-Infektion und die Variabilität des neurologischen Krankheitsbildes der BD erfordern neben der klinisch-neurologischen Untersuchung und der zytologischen Liquordiagnostik eine zuverlässige labordiagnostische Methode in vivo mit hoher Sensitivität und Spezifität. Diese retrospektive Studie hatte zum Ziel, an einem ausreichend hohen Untersuchungsmaterial die Zuverlässigkeit der indirekten Immunfluoreszenz zur Intra-vitam-Diagnostik der BD bei Equiden im Vergleich mit anderen Untersuchungsverfahren zu überprüfen.

Material und Methoden

Für die vergleichenden Untersuchungen zur intra vitam und post mortem Diagnostik wurden 113 Equiden, darunter 97 Pferde, 12 Ponies, 3 Esel und ein Zwergmaultier ausgewählt, die in den Jahren 1988 bis 2002 an der Bornaschen Krankheit (Borna disease, BD) erkrankten. Die Tiere stammten hauptsächlich aus Bayern, sowie aus Baden-Württemberg, Hessen und Niedersachsen. Das Alter der Tiere lag zwischen sechs Monaten und 28 Jahren. Nach einem standardisierten klinischen Untersuchungsgang (Grabner und Fischer 1991)

wurden bei der überwiegenden Anzahl der Equiden (78/113) die neurologischen Symptome im Krankheitsverlauf erfasst und zeitlich zugeordnet. Das restliche Tiermaterial rekrutierte sich aus Überweisungen und Einsendungen aus der tierärztlichen Praxis. Bei den meisten Equiden konnten Serum (112/113) und Liquor (98/113) auf Antikörper gegen BDV untersucht werden.

Die Cerebrospinalflüssigkeit wurde in allen Fällen durch Punktion des Intrathekalraums im Spatium atlanto-occipitale in Xylazin-Ketamin-Narkose und bei korrekter seitlicher Lagerung der Tiere mittels einer 10 bis 12 cm langen Tuohy-Kanüle gewonnen.

Für die Histopathologie und den Nachweis von BDV-Antigen stand in den 113 Fällen mit der Verdachtsdiagnose BD Gehirnmaterial zur Verfügung.

Zur Bestimmung der Spezifität der Untersuchungsmethoden wurden weitere 40 Pferde herangezogen, die in den Jahren 1987 bis 1997 wegen einer neurologischen Symptomatik ohne Verdachtsdiagnose BD im Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Gießen seziiert wurden. Für den Nachweis BDV-spezifischer RNA wurden die Zellen aus jeweils 10 bis 20 ml Liquor bzw. EDTA-Blut eingesetzt.

Die Methoden umfassten die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis BDV-spezifischer Antikörper, die histopathologische Untersuchung für den Nachweis von entzündlichen Veränderungen im Gehirn, die Immunhistologie und den Westernblot für den Nachweis von BDV-Antigen, einen Infektiositätstest zum Nachweis von BD-Virus in der Zellkultur und die reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) zum Nachweis von BDV-RNA.

Der Nachweis BDV-spezifischer Antikörper in Serum und Liquor und die Bestimmung der Titer erfolgte auf persistent BDV-infizierten MDCK-Zellen mit dem indirekten Immunfluoreszenztest (Herzog und Rott 1980).

Für die Histologie und Immunhistologie wurde das Gehirn routinemäßig in Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden zur histologischen Auswertung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und zur immunhistologischen Auswertung nach der ABC-Methode mit dem monoklonalen Antikörper Bo18, der gegen das BDV-Nucleoprotein (p38/39) gerichtet ist (Haas et al. 1986), angefärbt.

Mittels Westernblot wurden viruspezifische Antigene mit einem polyklonalen Rattenserum, das von experimentell mit BDV-infizierten Tieren stammte, und dem monoklonalen Antikörper Bo18 nachgewiesen.

Die Isolierung von infektiösem Virus erfolgte auf embryonalen Kaninchen-Gehirnzellen (Herzog und Rott, 1980).

Der Nachweis BDV-spezifischer RNA erfolgte mittels nested RT-PCR mit p24-spezifischen Primern (Sauder et al. 1996).

Ergebnisse

Die neurologischen Symptome bei BD sind komplex und variabel, und werden durch den Krankheitsverlauf, der perakut, akut bis subakut und in seltenen Fällen auch chronisch sein kann, relativiert. Entsprechend ihrer neuroanatomischen Zuordnung kann die Leitsymptomatik (Tab. 1) in Störungen des Verhaltens und des Bewusstseins, in Veränderungen des Bewegungsablaufs, in Hirnnervenausfälle und in Krampfanfälle eingeteilt werden. Die klinischen Zeichen sind geprägt von der Lokalisation und dem Schweregrad der entzündlichen

Tab 1 Klinischer Verlauf und Intra-vitam-Diagnose ausgewählter Fälle von BD. *Clinical course and ante mortem diagnosis in selected cases of Borna disease*

Legende: TPP = Gesamtprotein im Plasma/Serum, LP = Liquorprotein (Bestimmung nach der Mikroproteinmethode), Leuco = Leukozytenzahl im Blut, Bili = Gesamtbilirubin im Serum, CK = Creatinkinase; ZZ = Liquorzellzahl; Ly = Lymphozyten; Mono = Monozyten; (+) = vereinzelt; + = geringgradig; ++ = mittelgradig; +++ = hochgradig

Patient	Krankheitsdauer (Tage)	Verlaufssymptomatik	Klinische Labordiagnostik		Serologie (IFA)	
			Blut	Liquor	Serum	Liquor
Bayer. Warmblut Wallach, 4 Jahre	7	Initial Fieber, Inappetenz, Apathie, Hypo-kinese, häufiges Gähnen, Hypästhesie, Zwangsbewegungen, Trismus, Strabismus, Exzitationen, Konvulsionen, Krampfanfall	Laktat: 2,0 mmol/l TPP: 74 g/l Leuco: 9,0 G/l Bili: 118 µmol/l	Laktat: 3,7 mmol/l LP: 0,84 g/l ZZ: 128/3 pro µl Ly +++ Mono ++	1:40	1:32
Westf. Warmblut Stute, 11 Jahre	25	Initial intermitt. Fieber, Motilitätsstörung der Nachhand, Verhaltensänderung, Harn-inkontinenz, Gähnen, „Pfeifenrauchen“, Somnolenz, Parästhesie im Kopf- und Hals-bereich, Fazialisparese, Drangwandern, „Schlittschuhschritt“	Laktat: 0,7 mmol/l TPP: 74 g/l Leuco: 9,9 G/l Bili: 62 µmol/l	Laktat: 3,0 mmol/l LP: 0,58 g/l ZZ: 348/3 pro µl Ly +++ Mono +++	1:20	1:64
Hafflinger Stute, 9 Jahre	4	Temporär sistierende Futteraufnahme, „Kolik“, Manegebewegungen, Ataxie subfebrile Temperatur, Propriozeptions-defizit, Miosis, Blindheit, Anorexie, manifomes Vorwärtsdrängen, Stupor, Trismus, Kopfpresen, Parästhesie, Festliegen, Paralyse, Koma	Laktat: 3,4 mmol/l TPP: 88 g/l CK: 12.070 U/l Leuco: 5,0 G/l Bili: 96 µmol/l	Laktat: 4,9 mmol/l LP: 1,40 g/l CK: 22 U/l ZZ: 128/3 pro µl Ly +++ Mono +	1:20	1:32
Warmblut Stute, 6 Jahre	7	Müdigkeit, Apathie, „leichte Kolik“, Hypokinesie, Gähnen, Hypästhesie, Propriozeptionsdefizit, Anorexie, Torticollis, Somnolenz	Laktat: 0,6 mmol/l TPP: 65 g/l Leuco: 7,5 G/l Bili: 87 µmol/l	Laktat: 2,3 mmol/l LP: 0,82 g/l ZZ: 51/3 pro µl Ly ++ Mono ++	1:80	1:8
Reitpony Stute, 4 Jahre	5	Initial Fieber, Mattigkeit, häufiges Liegen, Apathie, Hypästhesie, Ataxie, Propriozeptionsdefizit, Manegebewegungen, Torti-collis, Rektum-und Blasenparaese, verminderte Zungenspannung, Anorexie, Stupor, Trismus, Krampfanfälle, Koma	Laktat: 0,9 mmol/l TPP: 66 g/l Leuco: 11,5 G/l Bili: 87 µmol/l	Laktat: 2,8 mmol/l LP: 0,74 g/l ZZ: 97/3 pro µl Ly +++ Mono +	1:10	1:5
Welsh-Pony Hengst, 17 Jahre	8	Apathie, temporäre Aggressivität, Steifheit der Nachhand, Hypästhesie, häufiges Ausschachten des Penis ohne Harnabsatz, Anorexie, Bruxismus, Inkoordination, Propriozeptionsdefizit, Torticollis, manifomes Vorwärtsdrängen	Laktat: 1,0 mmol/l TPP: 74 g/l Leuco: 9,1 G/l Bili: 50 µmol/l	Laktat: 3,3 mmol/l LP: 0,66 g/l ZZ: 72/3 pro µl Ly ++ Mono ++	1:40	1:64
Trakehner Stute, 2 Jahre	6	Initial Fieber, Hypokinesie, Verlust von Stell- und Haltungsreflexen, Somnolenz, „Pfeifenrauchen“, Gähnen, Fazialisparese, Anorexie, totaler Propriozeptionsverlust, Stupor	Laktat: 1,4 mmol/l TPP: 69 g/l Leuco: 7,6 G/l Bili: 72 µmol/l	Laktat: 2,5 mmol/l LP: 0,84 g/l ZZ: 83/3 pro µl Ly +++ Mono ++	1:40	1:2
Bayer. Warmblut Wallach, 7 Jahre	20	Initial Fieber, Hypokinesie, Depression, Ataxie, Leerkauen, „Pfeifenrauchen“, Hypästhesie, Stupor, Kopfpresen	Laktat: 0,6 mol/l TPP: 67 g/l Leuco: 17,4 G/l Bili: 142 µmol/l	Laktat: 3,5 mmol/l LP: 1,01 g/l ZZ: 25/3 pro µl Ly + Mono (+)	1:20	1:2
Shetland-Pony Stute, 15 Jahre	12	Müdigkeit, Dysphagie, Pharynxparalyse, Aspiration von Futterteilen, Bruxismus, Ataxie, Blindheit, Stupor, Vorwärtsdrängen, Krampfanfälle	Laktat: 1,4 mmol/l TPP: 75 g/l CK: 209 U/l Leuco: 7,9 G/l Bili: 109 µmol/l	Laktat: 4,1 mmol/l LP: 1,25 g/l CK: 14 U/l ZZ: 102/3 pro µl Ly +++ Mono +++	1:400	1:320
Esel Wallach, 7 Jahre	40	Initial aggressives Verhalten, Inappetenz, Apathie, Manegebewegungen, Leerkauen, Bruxismus, Salivation, Pharynxparese, temporärer Stupor, Exzitationen	Laktat: 0,9 mmol/l TPP: 82 g/l Leuco: 11,4 G/l Bili: 15 µmol/l	Laktat: 2,5 mmol/l LP: 0,62 g/l ZZ: 204/3 pro µl Ly +++ Mono ++	1:160	1:128

Veränderungen im ZNS. Die Krankheit äußert sich überwiegend in den Depressionszuständen, Apathie, Somnolenz und Stupor (Abb. 1).

Im fortgeschrittenen Stadium der BD fallen besonders Störungen der Bewegungskoordination und des Gleichgewichts auf, es fehlen adäquate Reaktionen auf Schmerzstimuli und als Zeichen gestörter Propriozeption die Korrektur abnormer Körperhaltung (Abb. 2). Auf Störungen der Hirnnervenfunktionen infolge entzündlicher Veränderungen im Kerngebiet dieser Nerven oder auch direkt den Nerv betreffend (N. trigeminus V) weisen Symptome, wie Dysphagie und Salivation aufgrund einer Pharynxparese (Nn. IX, X), verminderte Zungenspannung und häufige Zungenbewegungen (N. XII), Zähneknirschen und Trismus (Nn. V, VII), Fazialisparese (N. VII), Nystagmus, Strabismus und Miosis (N. III) hin. Fehlender Pupillarreflex und Strabismus sind im späten Stadium der Krankheit häufig zu finden (Müller und Fritsch 1955). Die relativ häufig

zu beobachtende Blindheit bei akutem Verlauf der BD könnte auf Störungen im zentralen Optikussystem zurückzuführen sein, da schwere Entzündungen im Thalamus opticus mit diesem Befund assoziiert waren (Bilzer et al. 1996).

Verhaltens- und Bewusstseinsstörungen werden in hohem Maße bereits zu Beginn der Erkrankung beobachtet und verstärken sich progressiv bis zum Finalstadium. Klinische Zeichen, wie verlangsamte und sistierende Futteraufnahme mit „Pfeifenrauchen“ (Abb. 3) sowie Leerkauen, das durch häufiges Gähnen unterbrochen wird, oder manifomes Vorwärtsdrängen können bereits frühzeitig vorliegen. Sie sind, wie auch wiederholtes Ausschachten des Penis ohne Harnabsatz und verstärkte Rosseanzeichen bei der Stute wertvolle diagnostische Hinweise. Diese Symptome können auf Funktionsstörungen im limbischen System, welches das Affekt- und Triebverhalten und dessen Verknüpfung mit vegetativen Funktionen regelt, zurückgeführt werden. Im späten Stadium der BD tritt auch eine neurogene Torticollis mit einer möglicher-



Abb 1 Tiefe Depression (stuporöses Stadium) bei einer 8-jährigen Bayer. Warmblutstute.

Deep depression (stuporous stage) in a 8-year-old mare.

weise auf die Nacken- und Halsmuskulatur begrenzten Torsionsdystonie auf (Abb. 3), die teilweise mit compulsiven Kreisbewegungen kombiniert ist.

Besonders bei akutem Verlauf fallen die schon bei 50 % aller erkrankten Pferde initial nachweisbaren Störungen der Kau- bewegungen und des Schluckvorgangs auf. Dadurch ist bereits mit Beginn der Erkrankung die Futter- und Wasserauf- nahme deutlich vermindert, was sich limitierend auf die Krankheitsdauer auswirken dürfte. Gegen Ende der Erkran- kung wird die Futteraufnahme eingestellt und nur etwa 20 % der erkrankten Tiere nehmen noch geringe Mengen an Was- ser auf (Uhlig und Kinne 1998). Als Begleitsymptom zur Stö- rung der Futteraufnahme entsteht regelmäßig eine inanitions- bedingte Hyperbilirubinämie (Tab. 1), die sich in leicht ikteri- schen Schleimhäuten manifestiert. Als weiteres extraneurales Symptom wird bei akutem Verlauf in der Initialphase überwie- gend ein therapieresistentes, rekurrendes Fieber festgestellt (Grabner und Fischer 1991; Dürrwald 1993).



Abb 2 Fehlende Korrektur abnormer Körperhaltung (Ausfall der Propriozeption) und Fazialisparalyse bei einer 2-jährigen Trakehner- stute.

A 2-year-old mare affected with disturbances in proprioception (abnormal posture) and paralysis of the facial nerve.

In allen BD-Fällen ist eine entzündungsbedingte Druckerhö- hung des Liquors festzustellen (Hiepe 1960). Bei akutem bis subakutem Verlauf der BD trat in allen Fällen eine mehr oder weniger deutlich erhöhte Zellzahl in der CSF ($56,4 \pm 32,8$ Zellen/ μ l; $n = 78$), eine mononukläre Pleozytose in dem nach Wright gefärbten Objektträgerausstrich (Abb. 4), eine positive Pandy-Reaktion auf Globuline und nach der Micro- proteinmethode eine gering- bis mäßig erhöhte Proteinkon- zentration in der CSF auf ($0,86 \pm 0,14$ mg/l; $n = 78$). Das Laktat in der CSF wies teilweise erheblich erhöhte Konzentra- tionen auf (Tab. 1).

Mit Hilfe des Nachweises BDV-spezifischer Antikörper in Serum und Liquor mittels indirekter Immunfluoreszenz ließ sich in 86/98 Fällen die Verdachtsdiagnose BD intra vitam



Abb 3 Neurogene Torticollis und "Pfeifenrauchen" bei einem 2-jäh- rigen Zwergmaultier.

Neurogenic torticollis and arrested eating ("Pfeifenrauchen") in a 2- year old mule.

ätiologisch bestätigen (Tab. 2). Damit ergibt sich eine Sensiti- vität der Methode von 88 %. In den Fällen, in denen Antikör- per im Liquor nicht nachweisbar waren, handelt es sich um perakute Krankheitsverläufe ($n = 10$), in einem Fall um den Beginn einer akuten BDV-Infektion und in einem weiteren Fall

Tab 2 Vergleich der Ergebnisse verschiedener diagnostischer Methoden bei Pferden mit perakuter und akuter BD
Comparison of the results of the intra vitam and post mortem dia- gnostic in horses with peracute and acute Borna disease

Methode	Material	Positive Proben / Gesamtzahl	Sensitivität
<i>Intra vitam</i>			
Antikörpernachweis	Serum	107/112*	96 %
	Liquor	86/98**	88 %
<i>Post mortem</i>			
Histopathologie	Gehirn	113/113	100 %
Virusisolierung	Gehirn	78/90	87 %
<i>Antigennachweis</i>			
Westernblot	Gehirn	113/113	100 %
	Gehirn	113/113	100 %
Immunhistologie	Gehirn	100/100	100 %
RNA-Nachweis	Gehirn	100/100	100 %

* negative Proben: perakuter Verlauf ($n=5$) ** negative Proben: pera- kuter Verlauf ($n=10$), Beginn einer akuten BD ($n=1$), Kortikoid- therapie ($n=1$)

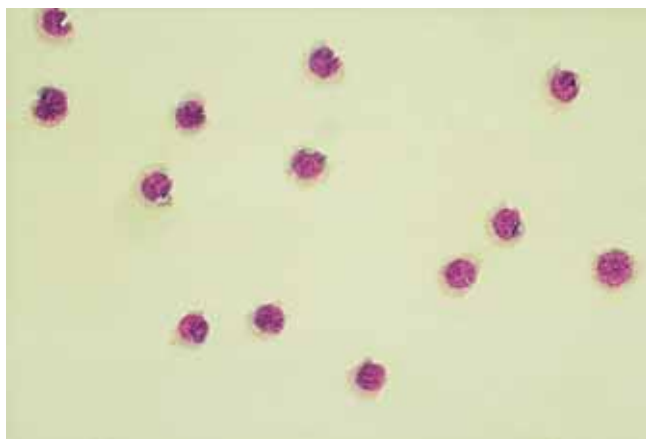


Abb 4 Mononukleäre Pleozytose im Liquor bei BD. Färbung nach Wright, Vergrößerung 500 x
Mononuclear pleocytosis in CSF in a case of BD. Wright's stain, original magnification x 500

um eine Vorbehandlung mit Kortikosteroiden. Auch in den Fällen, in denen Antikörper im Serum nicht nachweisbar waren, handelte es sich um perakute Krankheitsverläufe (n=5). Die Titer der Seren lagen zwischen 1:5 und 1:1280 (Abb.5) und die Titer der Liquores zwischen 1:2 und 1:1024. Dagegen beträgt die Sensitivität der ätiologischen Bestätigung der Verdachtsdiagnose BD intra vitam mittels Erregernachweis 28 %. In nur 16/57 Fällen ließ sich mittels RT-PCR virusspezifische RNA im Liquor nachweisen (Tab. 4). Es sollte erwähnt werden, dass bei 20 der 41 Fälle mit negativem Befund der Versand des Liquors zu beanstanden war: zu langer Transport (mehr als 48 Stunden), ungeeignete Probenröhrchen zur Aufnahme des Liquors (EDTA- oder mit Heparin beschichtete Röhrchen).

Außerdem zeigte sich die Untersuchung der mononukleären Zellen im peripheren Blut (PBMK) mittels RT-PCR ungeeignet für eine intra vitam Diagnostik. In 12 Fällen von BD, bei denen auch Liquor für die Untersuchung zur Verfügung stand, war keine virusspezifische RNA im EDTA-Blut nachweisbar (Tab. 4), insbesondere auch nicht in den 2/12 Fällen, bei denen im Liquor BDV-RNA nachgewiesen wurde (Tab. 4). Darüber hinaus war bei weiteren 27 Fällen von BD (Tab. 5) in den PBMKs ebenfalls kein Erregernachweis möglich. Eine Spezifität von 100 % der intra vitam Diagnose BD durch den Nachweis von Antikörpern in Serum und Liquor mittels

Tab 3 Gegenüberstellung diagnostischer Methoden bei Fällen mit unterschiedlicher neurologischer Symptomatik
Comparison of diagnostic methods in cases with different neurological signs due to BD and diseases other than BD

Methode	Pferde mit BD (n = 20)	Pferde mit inapparenter BDV-Infektion (n = 20)	Pferde ohne BDV-Infektion (n = 20)
Antikörpernachweis			
Serum	20/20	20/20	0/20
Liquor	20/20	0/20	0/20
Histopathologie			
	20/20	9/20*	11/20*
Nachweis von infektiösem BDV			
	20/20	0/20	0/20
Antigennachweis			
Westernblot	20/20	0/20	0/20
Immunhistologie	20/20	0/20	0/20
RNA-Nachweis			
RT-PCR	20/20	0/20	0/20

* histologische Befunde im ZNS bei Krankheiten anderer entzündlicher oder degenerativer und metabolischer Genese

Tab 4 RNA-Nachweis in Liquores (n = 77) und in PBMKs (n = 18) mittels RT-PCR bei neurologischen Fällen mit und ohne BD
Demonstration of BDV-RNA in CSFs (n = 77) and PBMKs (n = 18) by RT-PCR in horses with and without Borna disease.

RNA-Nachweis	BD (n = 57)	Ohne BD (n = 20)
Liquor	16/57	0/20
PBMK	0/12	0/6

PBMK=mononukleäre Zellen im peripheren Blut

indirekter Immunfluoreszenz beweisen die post mortem Untersuchungen im Gehirn der BD-Fälle (Tab. 2), die negativen Befunde der Untersuchungen an Pferden mit inapparenter BDV-Infektion und an Pferden mit neurologischen Störungen ohne BDV-Infektion (Tab. 3).

In allen 113 Fällen von BD waren histopathologische Veränderungen in Form nichteitriger perivaskulärer und parenchymaler mononukleärer Infiltrate (Abb. 7a) sowie BDV-Antigen mittels Westernblot und Immunhistologie (Abb. 7b) nachzuweisen. Eine identische Sensitivität von 100 % wurde beim RNA-Nachweis mittels RT-PCR erreicht. Dagegen liegt die

Tab 5 RNA-Nachweis in PBMKs (n = 175) mittels RT-PCR bei Pferden mit BD, Pferden mit inapparenter und ohne BDV-Infektion
Demonstration of BDV-RNA in PBMKs (n = 175) by RT-PCR in horses with Borna disease, horses with inapparent and without BDV infection

RNA-Nachweis	Pferde mit BD (n = 27)	Pferde mit inapparenter BDV-Infektion (n = 53)	Pferde ohne BDV-Infektion (n = 95)
PBMK	0/27	0/53	0/95

Sensitivität der Virusisolierung nur bei 87 %, da diese Methode sehr abhängig vom Zustand des Gehirnmaterials ist. Eine weitere Bestätigung der Zuverlässigkeit des intra vitam Nachweises von Antikörpern im Serum und Liquor zeigen die Untersuchungen, die in Tabelle 3 dargestellt sind. In den serologischen Untersuchungen von Pferden mit einer inapparenten BDV-Infektion waren Antikörper ausschließlich im Serum, jedoch nie im Liquor nachweisbar. Bei den Pferden mit neurologischen Störungen ohne BDV-Infektion waren BDV-spezifische Antikörper weder im Serum noch im Liquor zu bestimmen. Darüber hinaus war bei den Pferden dieser beiden Untersuchungsgruppen kein BDV nachweisbar, und somit die neurologischen Symptome nicht auf eine BD zurückzuführen. In den Fällen, die histologische Veränderungen zeigten, handelte es sich um Enzephalitiden anderer Genese (n = 6),

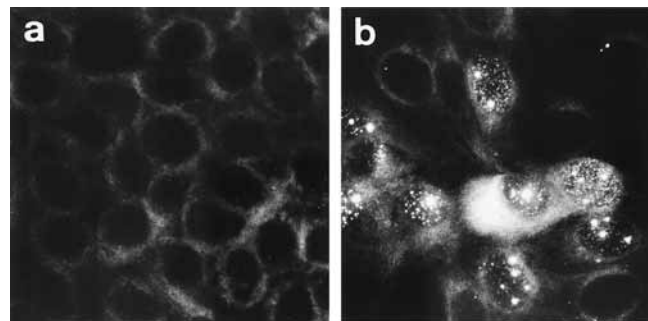


Abb 5 Indirekter Immunfluoreszenztest: Nachweis von Antikörpern gegen das BDV auf persistently BDV-infizierten MDCK-Zellen:
 a) Kontrollserum eines Pferdes,
 b) Serum eines Pferdes mit BD, Titer 1:160.
Indirect immunofluorescence assay, demonstration of antibodies against BDV in persistently BDV-infected MDCK-cells:
 a) normal horse serum
 b) serum in a horse with BD, titer 1:160

degenerative Enzephalo-myelopathien (n = 6), Enterotoxämien (n = 2), HE-Syndrom (n = 1), Grass sickness (n = 4) und ERU (n = 1).

Diskussion

Als typisches Krankheitsbild der BD beim Pferd wurde in der Literatur das gleichzeitige oder zeitlich versetzte Auftreten von Symptomen bezüglich Psyche, Sensorium, Sensibilität, Motilität und Vegetativum oftmals und ausführlich beschrieben (Zwick 1939; Schmidt 1952; Ludwig et al. 1985; Dürrwald 1993). Die multifokale Verteilung der Läsionen des ZNS resultiert in einer Variabilität der klinischen Ausprägung. Somit ist die Symptomatik bei BD nicht pathognomonisch und erlaubt lediglich eine Verdachtsdiagnose, die durch die vorher beschriebenen Variationen im Krankheitsverlauf erschwert sein kann. Zudem können sich zentralnervöse Störungen anderer infektiöser Genese und auch Depressionszustände infolge degenerativer oder metabolischer Veränderungen ähnlich manifestieren (Grabner 1993). Differentialdiagnostisch sind in den von BD betroffenen Ländern sporadisch auftretende, virale Entzündungen des ZNS durch equine Herpes-

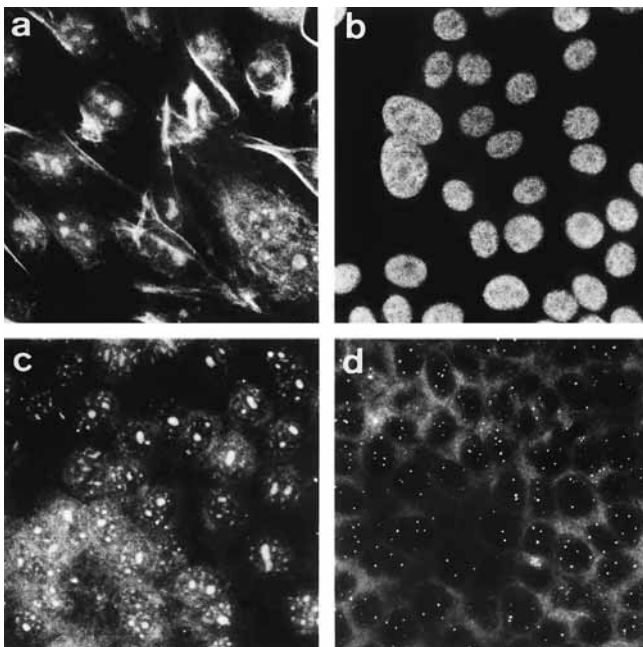


Abb 6 Indirekter Immunfluoreszenztest: Unspezifische Anfärbungen im Nukleus und Zytoplasma (a) und nur im Nukleus (b, c, d) auf MDCK-Zellen bei vier Kontrollseren von Pferden.

Indirect immunofluorescence assay: unspecific reaction in the nucleus and cytoplasm (a) and only in the nucleus (b, c, d) with four normal horse sera in MDCK-cells.

viren (Kohn und Fenner 1987), die Tollwut, die Zeckenenzephalitis (Waldvogel et al. 1981) und Erkrankungen des ZNS bakterieller Genese, wie bakterielle Meningitis mit cerebraler Abszessbildung, Botulismus oder parasitärer Genese, wie Nematodeninvasionen des ZNS und die equine protozoäre Myeloenzephalitis (EPM) zu berücksichtigen. Die EPM ist in Deutschland wegen ihrer langen Inkubationszeit als importierte ZNS-Krankheit zu beachten (Weigand und Grabner 1997).

Hämatologische und klinisch-chemische Parameter sind bei BD meist im Referenzbereich und deshalb diagnostisch nicht

verwertbar. Eine stets vorhandene Hyperbilirubinämie ist unspezifisch und auf die gestörte Futteraufnahme im Verlauf der BD zurückzuführen. Als weiterführende neurodiagnostische Maßnahme ist die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis unverzichtbar (Hiepe 1960; Uhlig und Kinne 1998). In allen akuten bis subakuten BD-Fällen wird eine erhöhte Zellzahl und nach Sedimentierung des Liquors im gefärbten Objektträgerausstrich eine lymphomonozytäre Pleozytose im Sinne einer nichteitrigen Meningoenzephalitis festgestellt. Dagegen ist bei chronischem Krankheitsverlauf und Vorliegen einer Enzephalitis mit normaler Zellzahl und gering bis mäßig erhöhter Proteinkonzentration in der CSF zu rechnen. Das CSF-Laktat weist jedoch bei beiden Verlaufsformen der BD teilweise erheblich erhöhte Konzentrationen auf (Richt et al. 2000). Nur mit diesen Daten ist im Kontext eines entsprechenden Krankheitsbildes von einer klinischen Verdachtsdiagnose BD auszugehen.

Die Untersuchungen dieser Studie haben gezeigt, dass mit Hilfe des Nachweises BDV-spezifischer Antikörper in Serum und Liquor im indirekten Immunfluoreszenztest (IFA) sich die Verdachtsdiagnose BD mit hoher Sensitivität ätiologisch stellen lässt. Nur bei perakutem Krankheitsverlauf, in der Früh-

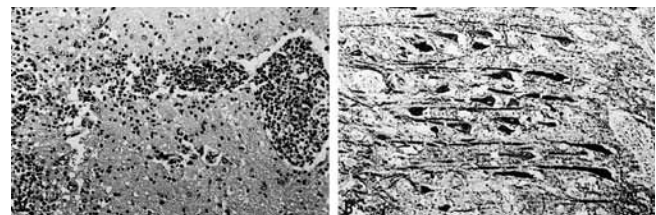


Abb. 7 a) Akute nichteitrige Enzephalitis mit massiven perivaskulären und geringgradigen parenchymalen Infiltraten im Ammonshorn bei einem Pferd mit BD. HE, Vergrößerung 60x.

b) Immunhistologischer Nachweis von BDV-spezifischem Antigen in Pyramidenzellen des Ammonshorns. ABC-Technik.

a) Acute nonpurulent encephalitis with perivascular and parenchymal infiltrates in the hippocampus of a horse with BD. Hematoxylin and eosin, x 60.

b) Immunohistological demonstration of BDV-antigen in cells of the brain. ABC-method.

phase einer akuten Erkrankung und durch immunsuppressive Maßnahmen kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass bei serologischen Folgeuntersuchungen Sero- und Liquorkonversionen auftraten. Die hohe Sensitivität des IFA ist nur mit persistenter BDV-infizierten MDCK (Madine darby canine kidney)-Zellen zu erreichen. Frühere Untersuchungen mit einer anderen Zelllinie wiesen eine deutlich geringere Sensitivität auf (Grabner und Fischer 1991). Ein weiteres Problem in der Diagnostik sind unspezifische Fluoreszenzbilder, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können, wenn bei den Untersuchungen nicht infizierte MDCK-Zellen eingesetzt werden (Abb. 6). Vergleichende serologische Untersuchungen mittels ELISA und Westernblot zeigten bei Verwendung von rekombinanten Proteinen in Serum und Liquor von Pferden im Gegensatz zu Serum und Liquor von Ratten oftmals falsch positive Ergebnisse (Herzog, pers. Mitteilung). Aus diesem Grund sind diese Methoden zur intra vitam Diagnose nicht zuverlässig. Somit sind positive Antikörperbefunde in der CSF mittels Westernblot bei stets negativen Ergebnissen im IFA bei inapparent infizierten Pferden (Kao et al., 1993) im vorgenannten Sinne zu interpretieren. Angaben zum Nachweis BDV-spezifischer Anti-

körper in Serum und Liquor bei an BD erkrankten Equiden mittels ELISA bzw. Westernblot liegen zwar in der Literatur vor (Dürwald und Ludwig 1997), sind aber auf ihre Zuverlässigkeit bisher nicht überprüft worden.

Die Spezifität des IFA wurde an Pferden mit neurologischen Ausfallserscheinungen überprüft. Dabei handelte es sich um Pferde mit einer inapparenten BDV-Infektion und Pferde ohne BDV-Infektion. In diesen Fällen waren ausnahmslos keine BDV-spezifischen Antikörper im Liquor nachweisbar. Außerdem schlossen post mortem Untersuchungen eine BD aus, da virusspezifisches Antigen nicht nachweisbar war. Die vergleichenden ätiologischen intra vitam Untersuchungen zeigten eine wesentlich geringere Sensitivität von 28 % beim RNA-Nachweis im Liquor gegenüber einer Sensitivität von 88 % beim Nachweis von Antikörpern in Serum und Liquor. Die Ergebnisse der Untersuchungen in PBMCs zeigen, dass diese Methode zur intra vitam Diagnostik der BD bei Equiden ungeeignet ist. Die Zuverlässigkeit des IFA wird nach unseren Untersuchungen durch seine hohe Sensitivität und Spezifität belegt.

Literatur

- Bilzer T., A. Grabner und L. Stitz (1996): Immunpathologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd: Klinische, virologische und neuropathologische Befunde. *Tierärztl. Prax.* 24, 567-576
- Caplazi P., A. Waldvogel, L. Stitz, U. Braun und F. Ehrensperge, (1994): Borna disease (BD) in naturally infected cattle. *J. Comp. Path.* 111, 65-72
- De la Torre J.C. (1994): Molecular biology of Borna disease virus: Prototype of a new group of animal viruses. *J. Virol.* 68, 7669-7675
- Dürwald R. (1993): Die natürliche Bornavirus-Infektion der Einhufer und Schafe. Untersuchungen zur Epidemiologie, zu neueren diagnostischen Methoden (ELISA, PCR) und zur Antikörperkinetik bei Pferden nach Vakzination mit Lebendimpfstoff. *Vet. Med. Diss.*, Fachbereich Vet. Med., Freie Univ. Berlin
- Dürwald R. und H. Ludwig (1997): Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *J. Vet. Med. B*, 44, 147-184
- Grabner A. und A. Fischer (1991): Symptomatologie und Diagnostik der Borna-Enzephalitis des Pferdes. Eine Fallstudie der letzten 13 Jahre. *Tierärztl. Prax.* 19, 68-73
- Grabner A. (1993): Klinische Differentialdiagnose infektiös bedingter Krankheiten des ZNS beim Pferd mit besonderer Berücksichtigung der EHV-Infektionen. *Prakt. Tierarzt* 75, coll. *Vet.* XXIV, 27-31
- Grabner A., S. Herzog, A. Hafner und P. Schmidt (1998): BDV infections and BD in horses in Germany. In: Abstracts of the International Bornavirus Meeting, Freiburg, p. 18.
- Haas, B., H. Becht und R. Rott (1986): Purification and properties of an intranuclear virus-specific antigen from tissues infected with Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 67, 235-241
- Heinig A. (1969): Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In: Röhrer, H. (Hrsg.): *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren.* Fischer, Jena, 83-148
- Herzog S. und R. Rott (1980): Replication of Borna disease virus in cell culture. *Med. Microbiol. Immunol.* 168, 153-158
- Herzog S., K. Frese, J.A. Richt und R. Rott (1994): Ein Beitrag zur Epidemiologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 81, 374-379
-

- Hiepe T. (1960): Die Bedeutung der Liquoruntersuchung für die Neu-
radiagnostik bei Pferd und Schaf. Zentralbl. Veterinärmed. 7, 152-
159
- Kailer S. (1998): Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Bor-
naschen Krankheit bei Pferden mit verschiedenen Primärkrankhei-
ten. Vet. Med. Diss. München
- Kao M., A.N. Hamir, C. Rupprecht, Z.F. Fu, V. Shankar, H. Koprowski
und B. Dietzschold (1993): Detection of antibodies against Borna
disease virus in sera and cerebrospinal fluids of horses in the USA.
Vet. Rec. 132, 241-244
- Kohn C.W. und W.R. Fenner (1987): Equine herpes myeloencepha-
lopathy. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 3:2, 405-419
- Ludwig H., W. Kraft, M. Kao, G. Gosztanyi, E. Dahme und H. Krey
(1985): Borna-Virus-Infektion (Borna-Krankheit) bei natürlichen
und experimentell infizierten Pferden: ihre Bedeutung für Forschung
und Praxis. Tierärztl. Prax. 13, 421-453
- Lundgren A.L., G. Czech, L. Bode und H. Ludwig (1993): Natural Bor-
na disease in domestic animals others than horses and sheep. J.
Vet. Med. B 40, 298-303
- Metzle A., H.T. Minder, C. Wegmann und W. Zindel (1979): Die Bor-
nasche Krankheit, ein veterinärmedizinisches Problem von regio-
naler Bedeutung. Schweiz. Arch. Tierheilk. 121, 207-213
- Müller L.F. und R. Fritsch (1955) Die Augenveränderungen bei der
Bornaschen Krankheit. Wien. Tierärztl. Mschr. 42, 866-871
- Narayan O., S. Herzog, K. Frese, H. Scheefers und R. Rott (1983):
Behavioral disease in rats caused by immunopathological respon-
ses to persistent Borna virus in brain. Science 220, 1401-1403
- Richt J.A., A. Grabner und S. Herzog (2000): Borna disease in hor-
ses. Vet. Clin. North Am.: Equine Pract. 16:3, 579-595
- Rott R. und H. Becht (1995): Natural and experimental Borna disea-
se in animals. In: Koprowski, H. and W.I. Lipkin (eds.): Borna disea-
se. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 190, 17-30
- Saude, C., A. Müller, B. Cubitt, J. Maer, J. Steinmetz, W. Travert, B.
Ziegler, K. Wanker, N. Müller-Lantzsch, J.C. de la Torre und F. Grä-
ser (1996): Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and
BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence con-
servation of human blood-derived BDV RNA. J. Virol. 70, 7713-
7724
- Schmidt J. (1912): Untersuchungen über das klinische Verhalten der
seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornaschen
Krankheit) des Pferdes nebst Angaben über diesbezügliche thera-
peutische Versuche. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 28, 581-586
- Schmidt J. (1952): Die Bornakrankheit des Pferdes. 55 Jahre For-
schung und Lehre. Arch. Exp. Veterinärmed. 6, 177-187
- Schüppel K.F., J. Kinne und M. Reinacher, (1994): Bornavirus-Anti-
gennachweis bei Alpakas (Lama pacos) sowie bei einem Faultier
(cholepus didactylus) und einem Zwergflusspferd. Verh. Erkrq.
Zootiere 36, 189-193
- Suchy A., H. Weissenböck, R. Waller, P. Schmidt und N. Nowotny
(1997): Nachweis der Bornaschen Krankheit bei einem Pferd in
Österreich. Wien. Tierärztl. Mschr. 84, 317
- Uhlig A. und J. Kinne (1998): Neurologische Befunde bei Pferden mit
Bornascher Krankheit. Prakt. Tierarzt, coll. Vet. XXVIII, 33-36
- Waldvogel A., H. Matile, C. Wegmann et al. (1981): Zeckenenze-
phalitis beim Pferd. Schweiz. Arch. Tierheilk. 123, 227-230
- Weigand K. und A. Grabner (1997): Equine protozoäre Myeloenze-
phalitis (EPM) bei einem importierten Paint-Horse. Pferdeheilkunde
13, 231-234
- Weissenböck H., N. Nowotny, P. Caplazi, J. Kolodziejek, und F.
Ehrensperger (1998): Borna disease in a dog with lethal menin-
goencephalitis. J. clin. Microbiol. 36, 2127-2130
- Zwick W. (1939): Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der
Tiere. In: Gildenmeister, E., E. Haagen und O. Waldmann (Hrsg.):
Handbuch der Viruskrankheiten, 252-354. Fischer, Jena

Prof. Arthur Grabner
Klinik für Pferde
Freie Universität Berlin
Oertzenweg 19 b
14163 Berlin
grabner@vetmed.fu-berlin.de