

Diagnostik der BDV-Infektion beim Pferd: Widersprüche zwischen Intra-vitam- und Post-mortem-Untersuchungen

Sibylle Herzog¹, Christiane Herden^{2,3}, Knut Frese², Hildburg Lange-Herbst¹ und Arthur Grabner⁴

Institut für Virologie¹ und Institut für Veterinär-Pathologie² der Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Pathologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover³ und Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin⁴

Zusammenfassung

Im Zeitraum von 1993–2007 wurden sechs Pferde mit zentralnervöser Symptomatik untersucht, bei denen intra vitam eine „aktivierte Bornavirus-Infektion“ diagnostiziert wurde. Diese Diagnose war aufgrund des Nachweises von Bornavirus-Antikörpern und/oder Bornavirus-Antigen im Blut (fünf Fälle) und des Nachweises von zirkulierenden Immunkomplexen im Plasma zwei Fälle mittels eines BDV-Triple-Enzymimmunoassays gestellt worden. In drei Fällen waren neuropathologische Veränderungen nachweisbar: Bei Fall 1 lag eine Equine degenerative Myeloencephalopathie vor; bei Fall 2 fanden sich massive vornehmlich aus T-Zellen bestehende lymphozytäre Infiltrate in der Leptomeninx des Hirnstammes und des Halsmarkes, die differentialdiagnostisch eine sichere Unterscheidung zwischen einem Lymphom und einer Meningitis nicht zuließen; bei Fall 3 bestand eine chronische degenerative Neuropathie des Nervus facialis und eine Trigeminalganglionitis. Bei einem anderen Fall lag eine Salmonellose mit hochgradiger eitrig-nekrotisierender Kolitis und Peritonitis vor. Bei zwei weiteren Fällen konnte die Ursache der beobachteten neurologischen Störungen nicht geklärt werden. Somit ließen sich in keinem Fall histopathologische Veränderungen nachweisen, die mit der Diagnose Bornasche Krankheit vereinbar waren. Mittels Immunhistologie und mit verschiedenen virologischen Methoden war in keinem Fall Virus der Bornaschen Krankheit nachweisbar. Damit konnte post mortem bei keinem der sechs untersuchten Fälle die intra vitam gestellte Diagnose „aktivierte BDV-Infektion“ bestätigt werden.

Schlüsselwörter: Pferd, Bornasche Krankheit, Klinik, Intra-vitam-Diagnostik, ELISA, Immunfluoreszenz, Post-mortem-Diagnostik, Histopathologie

Borna disease virus infection of horses: contradictory results between antemortem and postmortem investigations

Between 1993 – 2007, six horses with neurological signs - diagnosed „activated Bornavirus-infection“ - were examined. The diagnosis was based on the detection of BDV-antibodies and/or BDV-antigen in blood samples (five cases) and of BDV-specific circulating immune complexes (CIC) in plasma (two cases) by an ELISA-based sandwich assay. The clinically suspected neurological disorders could be confirmed in three cases by histological findings. Case 1 showed equine degenerative myeloencephalopathy. Case 2 was found to have a massive lymphocytic infiltration mainly consisting of T-cells in the leptomeninges of the brain stem and cervical spinal cord. However, it was not possible to differentiate definitely between lymphoma and meningitis. Case 3 exhibited a trigeminal ganglionitis and chronic degenerative neuropathy. For two further cases, the cause of neurological signs remained unclear. Another case showed a purulent necrotic colitis and peritonitis caused by an infection with *Salmonella* spp. In summary, all cases did not exhibit the typical non purulent meningoencephalitis which is regularly present in BD of horses. In all six cases, no evidence of a BDV infection was found by various virological and immunohistological investigations. Therefore, the postmortem examinations did not confirm the antemortem diagnosis of „activated Bornavirus-infection“.

Keywords: Equine, Borna disease, clinical signs, antemortem diagnostic, ELISA, immunofluorescence, postmortem diagnostic, histopathology

Einleitung

Die Diagnose der akuten Bornaschen Krankheit (Borna disease, BD) beim Pferd kann heute intra vitam durch das gleichzeitige Vorkommen von Antikörpern gegen das Virus der Bornaschen Krankheit (BDV) im Serum und in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) gestellt werden (Grabner et al. 2002). Dabei ist die Bestimmung von Antikörpern in der CSF unerlässlich. Die Bestätigung wird post mortem durch den Nachweis einer nicht eitrigen Meningoenzephalitis mittels histologischer Untersuchungen und durch den Nachweis von BDV mit immunhistologischen und virologischen Methoden (Bilzer et al. 1996, Herden et al. 1999) geführt. Abweichend davon wird eine BDV-Diagnostik durch den Intra-vitam-Nachweis Bornavirus-spezifischer Antikörper (AK) im Plasma, von Bor-

navirus-Antigen (AG) in den Leukozyten oder im Plasma und zirkulierender Immunkomplexe (CIC) im Plasma postuliert. Die Bestimmung dieser Parameter mittels BDV-Triple-Enzymimmunoassay soll einen sicheren Nachweis respektive Ausschluss einer bestehenden „aktivierten Bornavirus-Infektion“ ermöglichen. Darüber hinaus soll die Antigenbestimmung eine Aussage über den Aktivierungszustand der (persistierenden) Bornavirus-Infektion erlauben (Bode et al. 2001, Dieckhöfer et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird über Post-mortem-Untersuchungen von sechs Pferden mit neurologischen Störungen berichtet, bei denen mittels BDV-Triple-Enzymimmunoassay intra vitam eine „aktivierte Bornavirus-Infektion“ (Bode et al. 2001) festgestellt worden war.

Material

Im Zeitraum von 1993-2007 wurden sechs Pferde mit zentralnervöser Symptomatik in den Instituten für Veterinär-Pathologie und Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht. Vorberichtlich wurden in fünf Fällen Bornavirus-Antigen (AG) (für Fall 1 bis Fall 4 in Leukozyten, für Fall 5 im Plasma), in Fall 2 zusätzlich Bornavirus-Antikörper (AK) (im Plasma) und in dem Fall 5 zusätzlich Bornavirus-Antikörper (im Plasma) und zirkulierende Immunkomplexe (CIC) (im Plasma) in einem auswärtigen Labor (Bode et al. 2001) festgestellt. Der Fall 6 war nur auf BDV-CIC (im Plasma) untersucht worden, die auch nachgewiesen wurden. Welche Untersuchungen *intra vitam* bei den sechs Fällen durchgeführt wurden, kann der jeweiligen Tabelle entnommen werden. Die Ergebnisse wurden nach den Beurteilungskriterien von Bode et al. (2001) und von Dieckhöfer et al. (2004) mit der Diagnose „aktivierte“ bzw. „floride Bornavirus-Infektion“ interpretiert.

Methoden

Histologie und Immunhistologie

Für die Histologie und Immunhistologie wurden die Organe (s. Fall 1 bis Fall 6) routinemässig in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden zur histologischen Auswertung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Im Fall 3 wurde zusätzlich eine Trichromfärbung nach Goldner (Romeis und Böck 1989) angewendet. Zum immunhistologischen Nachweis von BDV-Antigenen wurden die ABC-Methode und der monoklonale Antikörper Bo18, der gegen das BDV-Nukleoprotein (p38/39) gerichtet ist (Haas et al. 1986), verwendet. Dabei diente DAB als Chromogen (Herdén et al. 1999). Im Fall 3 wurden zusätzlich Neurofilament und T-Zellen mittels eines monoklonalen Anti-Neurofilament-Antikörpers (Dako, Hamburg) und eines polyklonalen Anti-CD3-Antikörpers (Dako) nachgewiesen.

Virusnachweis

Zur Virusanzucht wurden embryonale Kaninchen-Gehirnzellen verwendet (Herzog und Rott 1980).

Immunoblot

Zum Nachweis von BDV-Antigenen in den Organsuspensionen wurde der Immunoblot eingesetzt. Antigene wurden mit einem polyklonalen Serum von BDV-infizierten Ratten detektiert (Herzog et al. 1994).

RT-PCR

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

Indirekte Immunfluoreszenz

Der Nachweis BDV-spezifischer Antikörper in Serum und Cerebrospinalflüssigkeit und die Bestimmung der Antikörpertiter erfolgten auf persistent BDV-infizierten MDCK-Zellen mittels des indirekten Immunfluoreszenztests (Herzog und Rott 1980).

Ergebnisse

Fall 1

Eine 1-jährige Haflinger-Stute aus Niedersachsen wurde im Oktober 1993 nach einer 3-wöchigen Erkrankung mit den Symptomen Taumeln und Festliegen in die Klinik für Pferde der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover eingewiesen. Wegen ständig sich wiederholender Phasen des Festliegens wurde das Pferd infolge infauster Prognose aus tierschützerischen Gründen euthanasiert und im Institut für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover pathologisch-anatomisch und histologisch untersucht. Für die eigenen Untersuchungen lagen nur Teile des Gehirnes und des Rückenmarkes vor. Gehirn und Rückenmark waren makroskopisch ohne besonderen Befund. Histologisch wurde im Bereich der Medulla oblongata (besonders des Nucleus cuneatus) sowie im Rückenmark eine mittel- bis hochgradige neuroaxonale Dystrophie festgestellt (Abb 1). Als Erkrankungsursache lag somit eine Equine degenerative Myeloenzephalopathie vor. Die immunhistologischen, virologischen und serologischen Befunde können der Tabelle 1 entnommen werden.

Tab 1 Fall 1 - Zusammenfassung der Ergebnisse der *Intra-vitam*- und *Post-mortem*-Untersuchungen.
Case 1 - Summary of the results of the *antemortem* and *postmortem* investigations.

Fall 1:	Haflinger-Stute 1 Jahr (1993)
virologische Anamnese <i>intra vitam</i>	BDV-Antikörper im Plasma: negativ BDV-Antigen in den Leukozyten: positiv Bewertung: aktivierte Bornavirus-Infektion
Ergebnisse post mortem	
pathologisch-anatomisch	ZNS und Rückenmark makroskopisch o.b.B.
histologisch	neuroaxonale Dystrophie im N. cuneatus und RM; Gehirn: keine entzündlichen Veränderungen
immunhistologisch	BDV-Antigen im Gehirn nicht nachweisbar
BDV-Virologie	Immunoblot negativ (Gehirn, Rückenmark) PCR negativ (s.o.)
BDV-Serologie	BDV-Antikörpertiter im Serum 1:80 CSF wurde nicht untersucht
Diagnose	Equine degenerative Myeloenzephalopathie

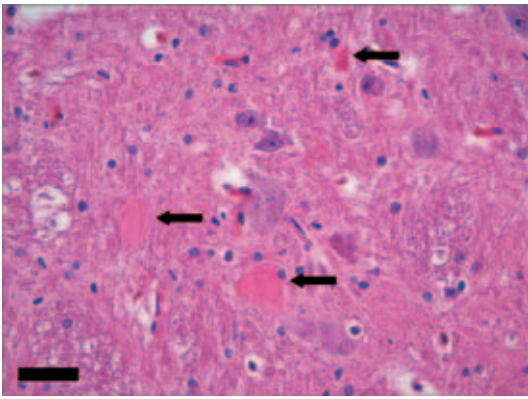


Abb 1 Charakteristische Sphäroide (Pfeile) im Nucleus cuneatus der Medulla oblongata bei Equiner degenerativer Myeloenzephalopathie. H&E-Färbung. Balken = 100 µm. Aufnahme P. Wohlsein, Institut für Pathologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Fall 1)
Characteristic sphaeroid (arrows) in the cuneate nucleus of the medulla oblongata, Equine degenerative Myeloencephalopathy. H&E. bar = 100 µm. Picture P. Wohlsein, Institute of Pathology, University of Veterinary Medicine Hannover (Case 1)

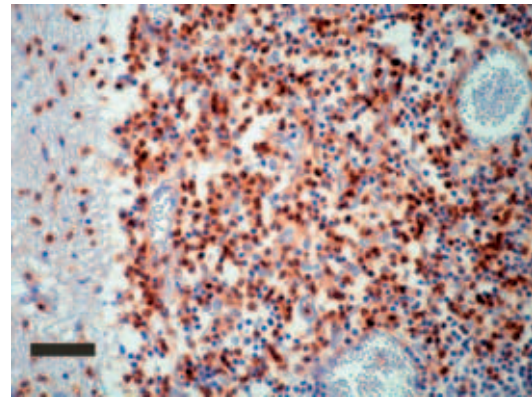


Abb 2 b Beteiligung zahlreicher CD3-positiver T-Lymphozyten. Immunhistochemischer Nachweis (ABC-Methode) von CD3 (braun). Balken = 50 µm (Fall 2)
Infiltrates contain numerous CD3-positive T-lymphocytes. Immunohistochemical demonstration (ABC method) of CD3 (brown). Bar = 50 µm (Case 2)

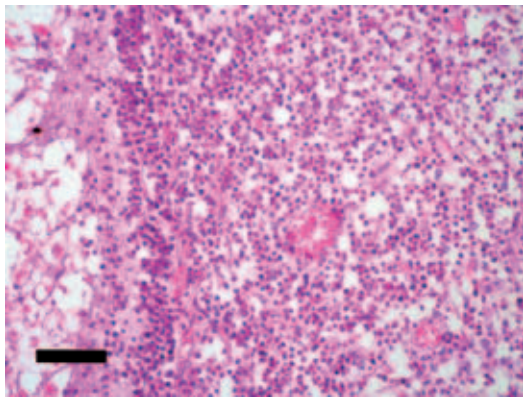


Abb 2 a Massive diffuse lymphozytäre Infiltrate in der Leptomeninx der Medulla oblongata. H&E-Färbung. Balken = 50 µm (Fall 2)
Strong lymphocytic leptomeningeal infiltrates in the medulla oblongata, H&E. Bar = 50 µm (Case 2)

Jahr rezidivierende Schübe mit zentralnervösen Störungen und zunehmender Erblindung, Schwanken in der Hinterhand, unkontrollierten Bewegungen und hängender Unterlippe beschrieben. Wegen erhöhter Anfallsneigung musste das Tier euthanasiert werden. Die Sektion wurde im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU) durchgeführt.

Pathologisch-anatomisch fand sich im Bereich der Medulla oblongata eine geringgradige Verdickung der Leptomeninx. Die übrigen Organe wiesen keine Veränderungen auf. Histopathologisch fanden sich massive mononukleäre Infiltrate in der Leptomeninx der Medulla oblongata und des Halsmarkes, die vornehmlich aus T-Zellen bestanden, aber auch B-Zellen und Makrophagen enthielten. Eine sichere differentialdiagnostische Unterscheidung zwischen einem T-Zell-Lymphom und einer massiven nicht eitrigen Leptomeningitis war nicht möglich. Die immunhistologischen, virologischen und serologischen Befunde können der Tabelle 2 entnommen werden.

Fall 2

Bei einem 1,5-jährigen Araber-Hengst aus Nordrhein-Westfalen wurden im Juli 1995 nach vorberichtlichen Angaben seit einem

Fall 3

Bei einer 16-jährigen Warmblut-Stute aus Hessen wurde ab Mai 1995 ein starker Juckreiz mit Aufscheuern der Nüstern

Tab 2 Fall 2 - Zusammenfassung der Ergebnisse der Intra-vitam- und Post-mortem-Untersuchungen.
Case 2 - Summary of the results of the antemortem and postmortem investigations.

Fall 2:	Araber-Hengst 1,5 Jahre (1995)
virologische Anamnese intra vitam	BDV-Antikörper im Plasma: positiv BDV-Antigen in Leukozyten: positiv Bewertung: aktivierte Bornavirus-Infektion
Ergebnisse post mortem	
pathologisch-anatomisch	Leptomeninx im Bereich Medulla oblongata verdickt; Organe o.b.B.
histologisch	Medulla oblongata, Rückenmark: massive meningeale mononukleäre Infiltrate vornehmlich aus T-Zellen
immunhistologisch	BDV-Antigen im Gehirn und RM nicht nachweisbar
BDV-Virologie	Virusisolierung negativ (Gehirn, Retina, Tränendüse, Parotis, Glandula submandibularis) Immunoblot negativ (Organe s.o.) PCR negativ (Organe s.o.)
BDV-Serologie	BDV-Antikörper im Serum und Liquor nicht nachweisbar
Diagnose	meningeales Lymphom / massive nicht eitrige Leptomeningitis von Medulla oblongata und Halsmark

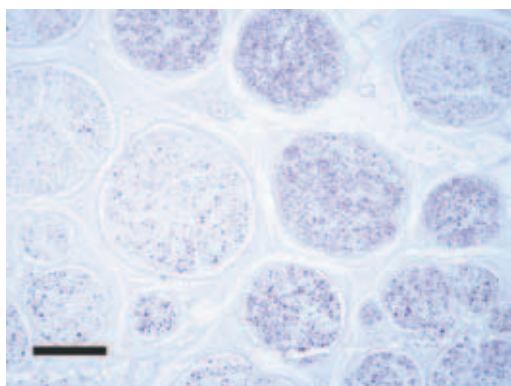


Abb. 3 a Degenerative Neuropathie im N. facialis. Querschnitt durch mehrere Nervenfaserbündel. Neben intakten Faserbündeln solche mit unterschiedlich ausgeprägtem Verlust von Nervenfasern (Nervenfasern braun). Immunhistochemischer Nachweis (ABC-Methode) von Neurofilamenten, Balken = 200 μm (Fall 3)
Degenerative neuropathy in the N. facialis. Transverse section of several nerve fiber bundles. Besides intact fiber bundles such with a more or less intense loss of nerve fibers (nerve fibers brown). Immunohistochemical demonstration (ABC method) of neurofilament. Bar = 200 μm . (Case 3)

bis zu den Augen und Kopfschlagen beobachtet. Das Pferd verließ immer wieder fluchtartig die Weide und flüchtete in die Dunkelheit. Es trat auf der linken Seite des Kopfes eine Lähmung mit Muskelschwund auf. Daraufhin wurde die Stute aus tierschützerischen Gründen im Januar 1996 euthanasiert. Die Sektion erfolgte an der Tierkörperbeseitigungsanstalt Fritzlär. Alle weiteren Untersuchungen wurden im Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Gießen durchgeführt. Pathologisch-anatomisch zeigten die Augen eine herdförmige chronische Keratitis im Limbusbereich. Die übrigen Organe waren ohne besonderen Befund.

Histopathologisch waren im Gehirn lediglich einzelne Sphäroide im Nucleus cuneatus nachzuweisen. Das übrige Gehirn sowie Retina und Uvea waren ohne besonderen Befund. Es zeigte sich eine chronische herdförmige Keratitis. Die Trigeminalganglien wiesen geringgradige, herdförmige, gemischt-zellige Infiltrate mit Beteiligung von vereinzelt neutrophilen und eosinophilen Granulozyten auf. Außerdem fand sich eine Degeneration von Nervenfasern mit Ansammlung von Myelo-

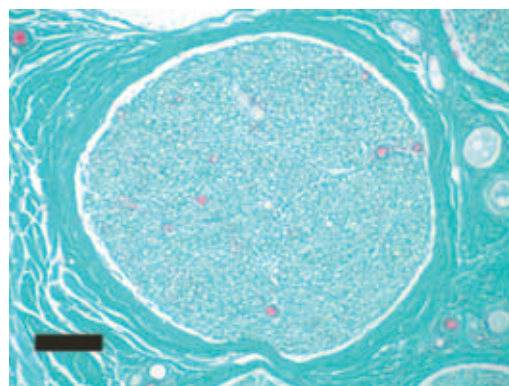


Abb 3 b Nervenfaserbündel mit vollständigem Faserverlust und interstitieller Fibrose. Trichromfärbung nach Goldner (Bindegewebe grün). Balken = 100 μm (Fall 3).
Bundles with complete loss of nerve fibers and interstitial fibrosis. Trichrom-Goldner. Bar = 100 μm . (Case 3).

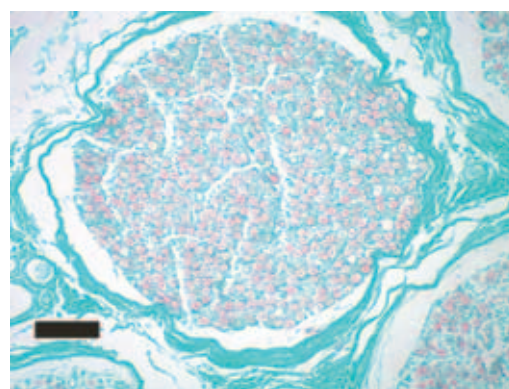


Abb 3 c Intaktes Nervenfaserbündel mit erhaltenen Markscheiden (rot). Trichromfärbung nach Goldner. Balken = 100 μm (Fall 3).
Bundle with intact fibers and myelin sheaths (red). Trichrom-Goldner. Bar = 100 μm (Case 3).

phagen. Im Nervus facialis lag beidseitig eine massive chronische degenerative Neuropathie mit Verlust zahlreicher Nervenfasern, herdförmiger Ansammlung von Myelophagen und interstitieller Fibrose vor. Die immunhistologischen, virologischen und serologischen Befunde können der Tabelle 3 entnommen werden.

Tab 3 Fall 3 - Zusammenfassung der Ergebnisse der Intra-vitam- und Post-mortem-Untersuchungen.
Case 3 - Summary of the results of the antemortem and postmortem investigations.

Fall 3:	Warmblutstute 16 Jahre (1996)
virologische Anamnese <i>intra vitam</i>	BDV-Antikörper im Plasma: negativ BDV-Antigen in Leukozyten: positiv Bewertung: aktivierte Bornavirus-Infektion
Ergebnisse post mortem	
pathologisch-anatomisch	Augen: herdförmige chronische Keratitis im Limbusbereich; Organe o.b.B.
histologisch	chronische Keratitis; Trigeminalganglionitis; chronische degenerative Neuropathie des N. facialis; Gehirn: keine entzündlichen Veränderungen
immunhistologisch	BDV-Antigen im Gehirn nicht nachweisbar
BDV-Virologie	Immunoblot negativ (Gehirn, Retina, Tränendrüse, Parotis) PCR negativ (Organe s.o.)
BDV-Serologie	BDV-Antikörper im Serum und Liquor nicht nachweisbar
Diagnose	Trigeminalganglionitis und chronische degenerative Neuropathie des N. facialis unklarer Ätiologie

Tab 4 Fall 4 - Zusammenfassung der Ergebnisse der Intra-vitam- und Post-mortem-Untersuchungen.
Case 4 - Summary of the results of the antemortem and postmortem investigations.

Fall 4:	Haflinger-Stute 11 Jahre (1997)
virologische Anamnese intra vitam	BDV-Antikörper im Plasma: negativ BDV-Antigen in Leukozyten: positiv Bewertung: aktivierte Bornavirus-Infektion
Ergebnisse post mortem	
pathologisch-anatomisch	Rötung von Pharynx- und Luftsackschleimhaut
histologisch	ZNS o.b.B., N. lingualis: nicht eitrige Neuritis; Gaumensegel und Luftsackwand: Hyperplasie des lymphatischen Gewebes; herdförmige chronische eitrige Entzündung an Eintrittsstelle des N. opticus; Gehirn: keine entzündlichen Veränderungen
immunhistologisch	BDV-Antigen im Gehirn nicht nachweisbar
BDV-Virologie	Virusisolierung negativ (Gehirn, Retina, Parotis) Immunoblot negativ (s.o.) PCR negativ (s.o.)
BDV-Serologie	serologische Untersuchung wurde nicht durchgeführt
Diagnose	Ursache der Bewegungsstörungen unklar

Fall 4

Eine 11-jährige Haflinger-Stute aus Hessen hatte über Monate hinweg immer wieder Fieberschübe und zeigte Bewegungsstörungen. Aus tierschützerischen Gründen wurde das Tier euthanasiert. Die pathologisch-anatomischen und histologischen Untersuchungen erfolgten am Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt-Mittelhessen in Gießen. Für die eigenen Untersuchungen lagen nur Teile des Gehirns sowie ein Auge und Teile der Parotis vor.

Pathologisch-anatomisch war eine starke Rötung von Pharynx- und Luftsackschleimhaut mit Hyperplasie der Lymphknötchen nachweisbar. Histologisch waren verschiedene Stammhirn-, Groß- und Kleinhirnlokalisationen und das Ammonshorn, die Trigeminalganglien und die Hypophyse ohne besonderen Befund. Der Nervus lingualis wies multiple herdförmige, vorwiegend mononukleäre, entzündliche Infiltrate auf. Gaumensegel und Luftsackwand zeigten eine ausgeprägte Hyperplasie des lymphatischen Gewebes. In der Schleimhaut der Luftsackwand waren multiple hyperplastische Lymphknötchen nachweisbar. Das Auge im Bereich der Eintrittsstelle des Nervus opticus zeigte herdförmige, gemischt-

zellige im retroorbitalen Fettgewebe. Der Nervus opticus und der Augenhintergrund waren ohne besonderen Befund. Die Ursache der Bewegungsstörungen konnte nicht geklärt werden. Die immunhistologischen, virologischen und serologischen Befunde können der Tabelle 4 entnommen werden.

Fall 5

Eine 10-jährige Quarterhorse-Stute aus Baden-Württemberg zeigte im Juli 2005, vier Wochen bevor sie verstarb, massiven Gewichtsverlust und eine Schwäche in der Hinterhand. Eine Woche zuvor traten Fieberschübe und eine rezidivierende Koliksymptomatik ohne Rektalbefund auf. Vier Tage vor Exitus waren zunehmend Ödeme an Hinterhand und Unterbauch zu beobachten. Es trat ein zunehmender Abdominalumfang auf, der auf eine Flüssigkeitsansammlung im Abdomen und auch Thorax (vermehrtes Husten) hinwies. Außerdem waren mehrere Pferde in diesem Bestand mit ähnlicher Symptomatik erkrankt. Die Sektion der Stute wurde im Institut für Veterinär-Pathologie der JLU in Gießen durchgeführt.

Pathologisch-anatomisch fanden sich hochgradige Unterhautödeme im Bereich der Hintergliedmaßen und am Unter-

Tab 5 Fall 5 - Zusammenfassung der Ergebnisse der Intra-vitam- und Post-mortem- Untersuchungen.
Case 5 - Summary of the results of the antemortem and postmortem investigations.

Fall 5:	Quarterhorse-Stute 10 Jahre (2005)
virologische Anamnese intra vitam	BDV-Antikörper im Plasma: positiv BDV-Antigen im Plasma: positiv BDV-CIC im Plasma: positiv Bewertung: floride Bornavirus-Infektion
Ergebnisse post mortem	
pathologisch-anatomisch	Gehirn, Rückenmark: o.b.B., hochgradige Unterhautödeme im Bereich Hintergliedmaßen und Unterbauch; hochgradiges Ödem der Darmwand; fibrinös-eitrige Peritonitis, eitrig nekrotisierende Kolitis
histologisch	Gehirn: keine entzündlichen Veränderungen
immunhistologisch	BDV-Antigen im Gehirn nicht nachweisbar
BDV-Virologie	Immunoblot negativ (Gehirn, Retina, Leber, Milz, Niere, Lunge, Darm) PCR negativ (Organe s.o.)
BDV-Serologie	BDV-Antikörper im Serum und Liquor nicht nachweisbar
Diagnose	hochgradige eitrig-nekrotisierende Kolitis mit Peritonitis verursacht durch Salmonellen-Infektion

leib. Im Abdomen lag eine hochgradige fibrinös-eitrige exsudative Peritonitis mit einem Erguss (40 l) vor. In der rechten dorsalen Kolonlage fand sich auf einer Länge von circa 40 cm eine zirkulär verlaufende Nekrose der Schleimhaut. Alle weiteren Kolonabschnitte zeigten ein hochgradiges Ödem der Darmwand. Im Magen fanden sich multiple akute Schleimhautulzera in der Pars glandularis. Die Mesenteriallymphknoten stellten sich deutlich vergrößert dar. Im Herzen fanden sich zahlreiche subepikardiale Blutungen. Die Oberschenkelmuskulatur der rechten Hintergliedmaße wies eine herdförmige Blutung mit Verkalkung auf. Makroskopisch war das ZNS ohne besonderen Befund.

Pathologisch-histologisch fand sich in der rechten dorsalen Kolonlage eine hochgradige Schleimhautnekrose mit eitriger Entzündung. In einer Lokalisation war ein älterer in Organisation befindlicher und rekanalisierter Thrombus in einer submukösen Arterie mit zahlreichen hämosiderinhaltigen Makrophagen zu sehen. Daneben fanden sich vereinzelte Lymphgefäßthromben in der Submukosa. Weiterhin fand sich eine subakute fibrinös-eitrige Peritonitis. Die Oberschenkelmuskulatur zeigte frische Blutungen und eine beginnende Abräumreaktion. Gehirn, Rückenmark, Vagusganglien und Ganglion coeliacum waren bis auf beginnende postmortale Veränderungen ebenfalls ohne besonderen Befund, insbesondere fanden sich keine entzündlichen Veränderungen. Die Erkrankungs- und Todesursache lag somit in einer hochgradigen eitrig-nekrotisierenden Kolitis mit anschließender Peritonitis verursacht durch eine Salmonellen-Infektion (*Salmonella* sp. Gr. C), die durch eine bakteriologische Untersuchung nachgewiesen wurde. Die immunhistologischen, virologischen und serologischen Befunde können der Tabelle 5 entnommen werden.

Fall 6

Bei einer 16-jährigen Stute aus Niedersachsen trat über 10 Tage hinweg immer wieder Fieber auf. Die Stute war apathisch, zeigte Koordinationsstörungen, hatte einen ataktischen Gang und einen reduzierten Schluckreflex. Das Tier nahm kaum Futter und wenig Wasser auf, wirkte wie sediert und knirschte mit den Zähnen. Nach sieben Tagen fingen die Augen der Stute an zu tränen und eiterten. Trotz Verabreichung von Antibiotika trat keine Besserung ein. Aufgrund des Nachweises von BDV-CIC (Bode et al. 2001) wurde die Stu-

te ab dem dritten Krankheitstag über sieben Tage mit Amantadinsulfat behandelt. Am ersten Behandlungstag betrug die orale Tagesdosis 800 mg Amantadinsulfat, vom zweiten bis zum siebten Tag 1000 mg. Da keine Besserung eintrat, musste das Tier nach 11 Tagen aus tierschützerischen Gründen euthanasiert werden.

Nur der Kopf der Stute kam zur Sektion zum Veterinärinstitut des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit in Hannover. Für unsere Untersuchungen erhielten wir lediglich Teile des Gehirns sowie ein Auge. Im Gehirn konnten histologisch weder entzündliche noch auffällige degenerative Veränderungen festgestellt werden. Die Ursache der neurologischen Störungen konnte nicht geklärt werden. Die immunhistologischen, virologischen und serologischen Befunde können der Tabelle 6 entnommen werden.

Diskussion

Als typisches Krankheitsbild der BD beim Pferd wurde in der Literatur das gleichzeitige oder zeitlich versetzte Auftreten von Symptomen hinsichtlich Psyche, Sensorium, Sensibilität, Motilität und Vegetativum oftmals und ausführlich beschrieben (Zwick 1939, Schmidt 1952, Dürrwald 1993, Grabner et al. 2002, Richt et al. 2007). Die multifokale Verteilung der mononukleären Infiltrate (perivaskulär, parenchymal, leptomeningeal) im ZNS, vorwiegend in der grauen Substanz, resultiert in einer Variabilität der Ausprägung. Bei natürlicher BDV-Infektion verläuft die Krankheit überwiegend als akute bis subakute, nicht eitrige Meningoenzephalitis (Joest 1937, Bilzer et al. 1996). Bei weniger schwerem Krankheitsverlauf können die klinischen Zeichen abklingen (Spontanheilungen). In einem geringen Teil der Fälle kann die BD einen chronischen Verlauf nehmen, der teilweise rekurrend ist (Richt et al. 2000).

Die akute BDV-Infektion kann intra vitam durch den Nachweis von Antikörpern in Serum und CSF, durch eine Serokonversion oder einen Titeranstieg über drei bis vier Titerstufen mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Herzog et al. 1994). Ausnahmen sind perakute Krankheitsverläufe und BD-Fälle nach Vorbehandlung mit Kortikosteroiden. In diesen Fällen kann der Antikörpernachweis in Serum und/oder CSF negativ ausfallen (Grabner et al. 2002). Post

Tab 6 Fall 6 - Zusammenfassung der Ergebnisse der Intra-vitam- und Post-mortem- Untersuchungen.
Case 6 - Summary of the results of the antemortem and postmortem investigations.

Fall 6:	Stute 16 Jahre (2007)
virologische Anamnese <i>intra vitam</i>	BDV-CIC-Test: positiv Bewertung: Bornavirus-Infektion mit Virusaktivierung
Ergebnisse Post mortem	
pathologisch-anatomisch	Gehirn o.b.B.
histologisch	Gehirn: keine entzündlichen Veränderungen
immunhistologisch	BDV-Antigen im Gehirn nicht nachweisbar
BDV-Virologie	Immunoblot negativ (Gehirn, Retina) PCR negativ (s.o.)
BDV-Serologie	serologische Untersuchung wurde nicht durchgeführt
Diagnose	Ursache der neurologischen Störungen unklar

mortem lässt sich die klinische Diagnose durch den histologischen Nachweis einer nicht eitrigen Meningoenzephalitis und den BDV-Nachweis mittels immunhistologischer und virologischer Methoden (Virusisolierung, Immunoblot, PCR) bestätigen (Bilzer et al. 1996, Herden et al. 1999). Jedoch konnte in den peripheren mononukleären Zellen im Blut (PBMCs) bei akut an BD erkrankten Pferden (n=27) in keinem Fall BDV mittels PCR nachgewiesen werden (Grabner et al. 2002). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach allen bisherigen Untersuchungen in der akuten Phase der Bornaschen Krankheit beim Pferd immer Virus im Gehirn nachweisbar ist.

Dagegen sind bei einer inapparenten BDV-Infektion, die eine Prävalenz von ungefähr 10% in Deutschland aufweist (Lange et al. 1987), Antikörper gegen BDV ausschließlich im Serum, jedoch nie in der CSF nachweisbar. Auch lässt sich kein BDV aus dem Gehirn isolieren. Das bestätigen Post-mortem-Untersuchungen bei BDV-seropositiven Pferden mit neurologischen Symptomen, die nicht durch eine BDV-Infektion hervorgerufen worden waren. Bei diesen Tieren konnte weder mit immunhistologischen noch mit virologischen Methoden infektiöses BDV, BDV-Antigen oder BDV-RNA im Gehirn nachgewiesen werden (n=25, Herden et al. 1999). Auch in den PBMCs von Pferden mit inapparenter BDV-Infektion (n=53) konnte mittels PCR kein BDV nachgewiesen werden (Grabner et al. 2002).

In der vorliegenden Studie untersuchten wir sechs Pferde, die anamnestisch neurologische Störungen aufgewiesen hatten und deren Blutproben an anderer Stelle (Bode et al. 2001) mittels eines ELISA-Verfahrens untersucht worden waren. Der Nachweis von Bornavirus-Antigenen in den Leukozyten oder im Plasma, von Bornavirus-Antikörpern im Plasma oder zirkulierenden Immunkomplexen im Plasma (s. Tabellen) führte in diesen Fällen zu der Diagnose „aktivierte Bornavirus-Infektion“. Alle Pferde wurden aus tierschützerischen Gründen euthanasiert. Aus Gründen der Meldepflicht ist zur Bestätigung der Diagnose „Bornasche Krankheit“ eine Post-mortem-Untersuchung unerlässlich.

In keinem der 6 Fälle gab es histopathologisch und immunhistologisch Hinweise auf eine BDV-Infektion im Gehirn. Insbesondere fanden sich keine entzündlichen Veränderungen, die bei der akuten Bornaschen Krankheit stets vorhanden sind (Bilzer et al. 1996, Herden et al. 1999). Dies veranlasste uns zu weiteren virologischen Untersuchungen von Gehirn und Organen (s. Tabellen) mittels Virusisolierung, Immunoblot und nested RT-PCR. Auch mit diesen Methoden, die routinemäßig in der Diagnostik eingesetzt werden, war kein BDV nachweisbar.

In drei Fällen (Fall 1–3) fanden sich als Ursache der klinischen, neurologischen Symptome anderweitige Veränderungen im ZNS. Im Fall 1 einer 1-jährigen Haflinger-Stute lag anamnestisch ein BDV-Antikörpertiter von 1:80 im Serum vor. Dieser serologische Befund und die Ergebnisse der immunhistologischen und virologischen Untersuchungen des Gehirns lassen auf eine inapparente BDV-Infektion schließen, die nicht in Zusammenhang mit dem post mortem festgestellten Krankheitsbild steht. Die histopathologischen Befunde einer neuroaxonalen Dystrophie im Nucleus cuneatus des Stammhirns und im Rückenmark sind typisch für die Equine degenerative Myeloenzephalopathie, die familiärer Genese ist (Beech und Haskins 1987). Dabei wird in der Literatur auf einen

Zusammenhang der neuroaxonalen Dystrophie mit einer Vitamin-E-/Selen-Mangelsituation oder einer Vitamin-E-Utilisationsstörung hingewiesen (Baumgärtner et al. 1990, Cummings et al. 1995).

Im Fall 2 des 1,5-jährigen Hengstes wurde histopathologisch eine massive mononukleäre, vorwiegend aus T-Lymphozyten bestehende Infiltration der Leptomeninx der Medulla oblongata und des Halsmarkes festgestellt. Es konnte nicht sicher entschieden werden, ob es sich hierbei um entzündliche Veränderungen oder um ein meningeales Lymphom handelte, zumal weitere Hinweise auf eine leukotische Erkrankung fehlten. Mit der Diagnose „Bornasche Krankheit“ sind die Veränderungen aber nicht vereinbar, da keine zusätzliche Enzephalitis vorlag und isolierte Leptomeningitiden bei der BD des Pferdes nicht bekannt sind.

Im Fall 3 der Stute mit vorberichtlich über 7 Monate beobachtetem Juckreiz und Aufscheuern im Kopfbereich und andauerndem Kopfschlagen fanden sich histopathologisch eine Trigeminalganglionitis und eine chronische Neuropathie des N. facialis. Dieses Krankheitsbild wird im Zusammenhang mit einem meist idiopathischen Headshaking-Syndroms gesehen, jedoch liegen neuropathologische Befunde dazu nicht vor (Newton et al. 2000). Bei der Polyneuritis equi (Neuritis caudae equinae) kann es auch zu einer Beteiligung des N. facialis kommen, doch kann diese Erkrankung nicht zuletzt wegen des Fehlens nennenswerter entzündlicher Veränderungen weitgehend ausgeschlossen werden (Dahme et al. 2007). Bei der BD des Pferdes sind degenerative Neuropathien nicht bekannt.

Im Fall 4 einer Haflinger-Stute wurden über Monate hinweg Fieberschübe und Bewegungsstörungen festgestellt, deren Ursache bei der Sektion nicht nachgewiesen werden konnte. Ob die nicht eitrige Neuritis des N. lingualis und die chronische eitrige Entzündung an der Eintrittsstelle des N. opticus mit der vorberichtlich geschilderten Bewegungsstörungen in Zusammenhang stehen, muss offen bleiben.

Im Fall 5 einer 10-jährigen Quarterhorse-Stute lag eine schwere Allgemeinerkrankung mit hochgradiger eitrig-nekrotisierender Kolitis und Peritonitis vor, verursacht durch eine Salmonellen-Infektion.

Im Fall 6 einer 16-jährigen Stute wurden anamnestisch rekurrendes Fieber, Koordinationsstörungen, ataktischer Gang und reduzierter Schluckreflex beschrieben. Da keine vollständige Sektion durchgeführt wurde, war in diesem Fall eine Aussage über die Krankheitsursache nicht möglich. Aufgrund des negativen histopathologischen Hirnbefundes konnte aber das Vorliegen einer entzündlichen Erkrankung im ZNS ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Post-mortem-Untersuchungen der sechs Fälle mittels histologischer, immunhistologischer und virologischer Methoden keine Hinweise auf eine BDV-Infektion erbrachten. Widersprüchliche Ergebnisse gab es bei der Intra-vitam-Diagnostik beim Nachweis von Antikörpern gegen BDV. Im Fall 1 konnten wir BDV-spezifische Antikörper nachweisen, die jedoch an anderer Stelle (Bode et al. 2001) nicht bestimmt werden konnten. In den Fällen 2 und 5 war der Nachweis von Antikörpern mittels

Enzymimmunoassay positiv, mittels des indirekten Immunfluoreszenztests negativ. In Fall 3 stimmten die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen überein. In den Fällen 4 und 6 lag uns kein Material für eine serologische Untersuchung vor. Zum Nachweis von Antikörpern gegen das BDV setzen wir den indirekten Immunfluoreszenztest ein, der nach ISO 17025 akkreditiert ist. Die Sensitivität der indirekten Immunfluoreszenz liegt bei ungefähr 90%. Der Anteil falsch negativer Ergebnisse ist hauptsächlich auf perakute Krankheitsverläufe und auf Fälle mit einer Vorbehandlung mit Kortikosteroiden zurückzuführen. Die Sensitivität des BDV-Triple-Enzymimmunoassays (basierend auf einem Double-Sandwich-Prinzip) wurde bisher in keiner Publikation aufgezeigt.

Zum Nachweis von Antigen in den PBMCs und im Plasma wurde ebenfalls der BDV-Triple-Enzymimmunoassay eingesetzt. Die Überprüfung der Zuverlässigkeit dieser Methode mit einer Immunaффinitätschromatographie zum Nachweis von BDV-Antigen und mit der hoch sensitiven real-time RT-PCR zum Nachweis von BDV-RNA durch Wolff et al. (2006) brachte keine Bestätigung der Ergebnisse mittels Triple-Enzymimmunoassay. Auch bei unseren Untersuchungen von PBMCs von Pferden mit akuter BD mittels nested RT-PCR konnte kein BDV nachgewiesen werden. Post mortem war mittels Immunhistologie und mit verschiedenen virologischen Methoden bei diesen Pferden BDV im Gehirn nachweisbar (n=27, Grabner et al. 2002).

Die vorliegenden Untersuchungen der 6 Fälle zeigen, dass die in intra vitam gestellte Diagnose mittels BDV-Triple-Enzymimmunoassay post mortem nicht bestätigt werden konnte. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Intra-vitam-Untersuchungen von Serum und CSF mittels indirektem Immunfluoreszenztest, die durch den Post-mortem-Nachweis der BDV-Infektion beim Pferd bestätigt werden. Vorbehaltlich des Ergebnisses einer notwendigen vergleichenden Validitätsstudie kann der BDV-Triple-Enzymimmunoassay nach den vorstehenden Befunden nicht als geeignete Methode zur Intra-vitam-Diagnostik der Bornaschen Krankheit des Pferdes angesehen werden.

Danksagung

Unser Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-J. Thiel und Herrn Prof Dr. M. Reinacher für hilfreiche Diskussion und Durchsicht des Manuskriptes, Herrn Dr. P. Wohlsein für die Überlassung der Aufnahmen und allen beteiligten Tierärzten für ihre Kooperation.

Literatur

Baumgärtner W., Frese K. und Elmadfa J. (1990) Neuroaxonal dystrophy associated with vitamin E deficiency in two Haflinger horses. *J. Comp. Pathol.* 103, 114-119
 Beech J. (1987) Equine degenerative myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* 3, 379-383
 Bilzer T., Grabner A. und Stitz L. (1996) Immunpathologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd: Klinische, virologische und neuropathologische Befunde. *Tierärztl. Prax.* 24, 567-576
 Bode L., Reckwald P., Severus W. E., Stoyloff R., Ferszt R., Dietrich D. E. und Ludwig H. (2001) Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies – the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Mol. Psychiatry* 6, 481-491

Cummings J. F., de Lahunta A., Mohammed H. O., Divers T. J., Summers B. A., Valentine B. A. und Jackson C. A. (1995) Endothelial lipopigment an indicator of α -tocopherol deficiency in two equine neurodegenerative disease. *Acta Neuropathol* 90, 266-272
 Dahme E., Schmahl W. und Matiassek K. (2007) Nervensystem. In: Dahme E. und Weiss E. (Hrsg.) *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.* 6. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 310-311
 Dieckhöfer R., Bode L., Ludwig H., Kiefer M., Reckwald P. und Rupp A. (2004) Bornavirus (BDV) beim Pferd – Klinik, Diagnostik und Therapie bei einem lokalen Infektionsgeschehen im Saarland und tierseuchenrechtliche Betrachtungen. *Tierärztl. Umschau* 59, 619-623
 Dürrwald 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*
 Grabner A., Herzog S., Lange-Herbst H. und Frese K. (2002) Die Intra-vitam-Diagnose der Bornaschen Krankheit (BD) bei Equiden. *Pferdeheilkunde* 18, 579-586
 Haas B., Becht H. und Rott R. (1986) Purification and properties of an intranuclear virus-specific antigen from tissues infected with Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 67, 235-241
 Herden C., Herzog S., Wehner T., Zink C., Richt J. A. und Frese K. (1999) Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. *Equine Infectious Diseases VIII*, 286-290
 Herzog S. und Rott R. (1980) Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med. Microbiol. Immunol.* 168, 153-158
 Herzog S., Frese K., Richt J. A. und Rott R. (1994) Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit der Pferde. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 81, 374-379
 Joest E. (1937) Die Bornasche Krankheit des Pferdes. In: Ernst Joest's Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, Band 2, 2. Auflage, bearbeitet von Dobberstein J., Berlin, 651-657
 Lange H., Herzog S., Herbst W. und Schließer T. (1987) Seroepidemiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit (Ansteckende Gehirn- und Rückenmarksentzündung der Pferde). *Tierärztl. Umschau* 12, 938-946
 Newton S. A., Knottenbelt D. C. and Eldridge P. R. (2000) Headshaking in horses: possible aetiopathogenesis suggested by the results of diagnostic tests and several treatment regimes used in 20 cases. *Equine Vet. J.* 32, 208-216
 Richt J. A., Grabner A. und Herzog S. (2000). Borna Disease. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.* 16, 3, 579-595
 Richt J. A., Grabner A., Herzog S., Garten W. und Herden C. (2007) Borna Disease. In: Sellon D. C. und Long M. T. (Hrsg.): *Equine infectious diseases*, 207-213, Saunders, Elsevier, St. Louis
 Romeis B. und Böck P. (1989) *Mikroskopische Technik.* 17. Auflage, Urban & Fischer
 Sauder C., Müller A., Cubitt B., Maer J., Steinmetz J., Travert W., Ziegler B., Wanker K., Müller-Lantsch N., de la Torre J. und Grässler F. (1996) Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J. Virol.* 70, 7712-7724
 Schmidt J. (1912) Untersuchungen über das klinische Verhalten der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornaschen Krankheit) des nebst Angaben über diesbezügliche therapeutische Versuche. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 28, 581-586
 Wolff T., Heins G., Pauli G., Burger R. und Kurth R. (2006) Failure to detect Borna disease virus antigen and RNA in human blood. *J. Clin. Virol.* 36, 312-313
 Zwick W. (1939) Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere. In: *Gildenmeister E., Haagen E. und Waldmann O. (Hrsg.): Handbuch der Viruskrankheiten, Fischer, Jena* 252-354

Prof. Dr. Arthur Grabner
 Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin
 Oertzenweg 19 B
 14163 Berlin
 grabner.arthur@vetmed.fu-berlin.de