

Untersuchungen zur klinischen Relevanz mikroskopisch nachweisbarer Eperythrozoon-ähnlicher Strukturen auf Pferde-Erythrozyten

Rutmer Niemendal¹, Ludwig Hoelzle², Karl Rohn³, Karsten Feige⁴ und Thomas Blaha¹

Außenstelle für Epidemiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover¹, Institut für Veterinärbakteriologie Universität Zürich², Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover³ und Klinik für Pferde der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover⁴

Zusammenfassung

Hämotrophe Mykoplasmen (*Haemobartonella* und Eperythrozoon Spezies) sind weitverbreitete Bakterien, die auf roten Blutzellen parasitieren. Sie sind Erreger der Haemobartonellose und der Eperythrozoonose. Infektionen mit hämotrophen Mykoplasmen sind beim Schwein, beim Schaf, bei der Ziege, beim Rind, bei der Katze, beim Hund und bei der Maus ausführlich dokumentiert. In der aktuellen wissenschaftlichen Literatur sind diese Infektionen beim Pferd nicht beschrieben. Seit einigen Jahren kommt es aber immer häufiger zu Berichten aus der Praxis über den mikroskopischen Nachweis einer vermuteten Eperythrozoonose bei Pferden. In der vorliegenden Studie wurden Blutproben von 108 Pferden, darunter 76 Tiere (Gruppe K) mit ungestörtem Allgemeinbefinden und 32 Pferde mit unspezifischen klinischen Symptomen in Form von Asthenie, schlechtem Fellzustand, Abmagerung und Leistungsschwäche (Gruppe S) zytologisch und hämatologisch untersucht. Drei Untersucher beurteilten Blutausstriche unabhängig voneinander hinsichtlich des Vorkommens von Eperythrozoon-ähnlichen Strukturen auf den Erythrozyten. Als Eperythrozoon-ähnliche Strukturen wurden punktförmige, dunkelviolett gefärbte meist multipel und in der Peripherie der Erythrozyten auftretende Veränderungen definiert. Zudem wurde eine hämatologische Untersuchung mit der Bestimmung von Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCHC, MCV und Thrombozyten durchgeführt. Eperythrozoon-ähnliche Strukturen wurden sehr häufig bei Tieren mit Symptomen (27, 22 und 7 positive zytologische Beurteilungen), als auch bei allgemein gesunden Pferden (55, 50 und 14 positive zytologische Beurteilungen), festgestellt. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgruppen konnten weder bei den zytologischen noch bei den hämatologischen Untersuchungen festgestellt werden. Die Übereinstimmung in der Beurteilung der drei Untersucher war sehr gering (κ -Werte 0,0225 und -0,0148). Es wurden keine Hinweise auf das vermehrte Vorkommen von Anämien bei symptomatischen Tieren (Gruppe S) gefunden. Auf Grund der Erkenntnisse über hämotrophe Mykoplasmen bei verschiedenen Tierarten und der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse kann bei Pferden, bei denen in der zytologischen Untersuchung verdächtige Strukturen auf den Erythrozyten nachgewiesen wurden, nicht ohne Weiteres von einer Infektion mit hämotrophen Mykoplasmen ausgegangen werden. Erst wenn hämotrophe Mykoplasmen nach phylogenetischer Genanalyse beim Pferd beschrieben und ein spezifischer PCR-Test entwickelt ist, kann die Diagnose einer Infektion mit diesem Erreger beim Pferd mit Sicherheit gestellt werden.

Schlüsselwörter: Eperythrozoonose, hämotrophe Mykoplasmen, Pferd, Diagnostik, Erythrozyten

Studies on the clinical relevance of microscopically demonstrable eperythrozoon-like structures on horse-erythrocytes

Hemotrophic mycoplasmas (*Haemobartonella* and Eperythrozoon species) are widely spread bacteria parasiting red blood cells. The disease is known as haemobartonellosis and eperythrozoonosis. Infections with hemotrophic mycoplasmas are described in detail in pigs, sheep, goats, cattle, cats and dogs. Infection in immunocompetent animals frequently is latent and considered to be a multifactorial disease. Typically acute disease is seen in immunosuppressed animals and can be provoked by splenectomy. The most important symptom in acute disease is hemolytic anemia. Clinical signs of disease in chronic infections are not specific symptoms, include weakness, weight loss, poor hair coat, slight anemia and, in live stock, decreased production. In acute disease great numbers of organisms can be observed as structures on the red blood cells in peripheral blood smears by light microscopic examination. Only in this acute stage can the diagnosis be made from the clinical signs and a blood smear. After the acute stage of disease infection can be diagnosed by direct detection by PCR or indirect detection by blood titers. The gold standard for diagnosing chronic latent infections is the microscopic detection of bacteriemia after splenectomy of a suspected animal or after the inoculation of suspected blood in a splenectomised laboratory animal. Hemotrophic mycoplasmas have not been grown in culture successfully. In the scientific literature, no publications are to be found dealing with systemic research considering the existence of hemotrophic mycoplasmas in horses. Since several years diagnosis and treatment of suspected eperythrozoonosis in horses are reported from the field in Germany. According to those reports detection of the parasite is done by microscopic examination of peripheral blood smears. In this study 108 horses were examined, partially with symptoms of suspected eperythrozoonosis (n=32). The other healthy horses composed a control group (n=76). After taking the anamnesis and performing a clinical examination to detect present symptoms peripheral blood was collected from every proband to run a hematology and prepare blood smears. The blood smear was blindly evaluated by three qualified examiners for the detection of eperythrozoon-like structures. As well as in symptomatic horses (27, 22 and 7 positiv smears) and in control animals (55, 50 and 14 positiv smears), suspected structures were observed regularly on the red blood cells. In the literature poor sensitivity and specificity are described for the light microscopic examination diagnosing hemotrophic mycoplasmas. Among other things the identification of artefacts as the structures looked for, can markedly raise the amount of false positive results. In this study the assessment of one examiner with only 21 positive diagnoses was significantly different than the two other examiners (each 72 and 82 positive diagnoses). Also the total correspondence of the three examiners was very low (κ values of 0.0225 and -0.0148). Comparing the hematological parameter, both groups did not show any relevant differences. No evidence was found confirming higher incidence of anemia in symptomatic horses. According to the knowledge about hemotrophic mycoplasmas in different species and the obtained results from this study, an infection with hemotrophic mycoplasmas in horses showing signs of chronic non-specific disease, where suspected structures in the blood smear are observed, cannot be just assumed. Only after the demonstration of hemotrophic mycoplasmas in the horse following phylogenetic analysis and the development of a specific PCR assay, an

accurate diagnosis of infection with this pathogen can be made in the horse. The results of this study do not allow for the assumption of any causality between eperythrozoon-like structures on horse erythrocytes and any clinical symptoms.

Keywords: eperythrozoonosis, hemotrophic mycoplasma, equine, diagnostics, erythrocyts

Einleitung

Hämotrophe Mykoplasmen (Haemobartonella und Eperythrozoon spp.) sind die Erreger der Haemobartonellose und der Eperythrozoonose. Diese Bakterien sind bei Schwein, Schaf, Ziege, Rind, Katze, Hund und Maus ausführlich beschrieben (Overas 1969, Foley und Pedersen 2001, Messick et al. 2002, Neimark et al. 2002a, 2002b, 2004, 2005, Willi et al. 2006). Auch bei verschiedenen anderen Tierarten und beim Menschen gibt es Hinweise auf hämotrophe Mykoplasmen als Krankheitsverursacher (Puntaric et al. 1986, McLaughlin et al. 1990, Reagan et al. 1990, Dillberger et al. 1994, Messick et al. 2000, Neimark et al. 2002a, Stoffregen et al. 2006). Diese Mikroorganismen, auch Hämoplasmen genannt, parasitieren auf roten Blutzellen. Es sind sehr kleine (0,3 bis 3 µm), pleomorphe Bakterien ohne Zellwand oder Flagellen, welche resistent gegen Penicillin, aber empfindlich gegenüber Tetrazyklin sind. Bis vor wenigen Jahren wurden die Haemobartonella und Eperythrozoon spp. den Rickettsien zugeordnet. Basierend auf der Analyse des 16S rRNA-Gens wurden die Spezies dann neu den Mykoplasmen zugeteilt (Messick et al. 2002, Neimark et al. 2001, 2002b, 2004, 2005).

Eine Infektion verläuft bei immunkompetenten Tieren häufig latent und wird als Faktorenkrankheit angesehen. Ein akuter Verlauf kommt typischerweise nur bei immungeschwächten Tieren vor und kann durch Splenektomie provoziert werden. Das Hauptsymptom ist eine hämolytische Anämie. Bei chronischen Infektionen werden viele unspezifische Symptome wie Schwäche, Gewichtsverlust, schlechter Fellzustand, leichte Anämie und bei Nutztieren ein Abfall der zootechnischen Leistungen beobachtet. In der akuten Phase der Erkrankung sind die Erreger in großer Zahl als eperythrozytäre Strukturen im peripheren Blutausschrieb lichtmikroskopisch nachweisbar. In der Regel kann eine Diagnose an Hand der klinischen Symptome und eines Blutausschriebes nur während eines solchen akut verlaufenden Krankheitsprozesses gestellt werden. Außerhalb dieser akuten Phase kann eine Infektion mittels direktem Erregernachweis durch die PCR oder serologisch durch indirekten Erregernachweis festgestellt werden. Der Goldstandard zur Diagnose chronisch latenter Infektionen ist der mikroskopische Nachweis einer Bakteriämie nach Splenektomie verdächtiger Tiere oder nach Übertragung einer verdächtigen Blutprobe auf bereits splenektomierte Versuchstiere. Hämotrophe Mykoplasmen wurden bisher nicht in vitro kultiviert (Overas 1969, Messick 2003, 2004; Sykes 2003, Hoelzle 2007).

In der wissenschaftlichen Literatur sind keine Publikationen über die systematische Untersuchung zum Vorkommen von hämotrophen Mykoplasmen beim Pferd zu finden. Lediglich eine Veröffentlichung aus dem Jahr 1978 beschreibt die Haemobartonellose beim Pferd in Afrika (Gretillat 1978). Ein anderer Autor beschreibt ein chronisches Erschöpfungssyndrom beim Pferd und weist auf eine Besserung der klinischen Symptomatik und ein Verschwinden der anfangs beobachteten eperythrozytären Strukturen nach Behandlung hin (Tarello

2001). Seit einigen Jahren kommt es aber immer häufiger zu Berichten aus der Praxis über die Diagnose und Behandlung einer vermuteten Eperythrozoonose bei Pferden. Laut Praxisberichten erfolgt der Nachweis dieser Parasiten beim Pferd an Hand einer lichtmikroskopischen Untersuchung eines Blutausschriebes. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, die klinische Bedeutung der auf Pferde-Erythrozyten nachweisbaren Eperythrozoon-ähnlichen Strukturen zu überprüfen.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden von August 2006 bis April 2007 an insgesamt 108 Pferden in Niedersachsen durchgeführt. Neben Aufnahme des Signalements und des Vorberichtes wurden die Pferde allgemein klinisch untersucht. Tiere mit unspezifischen Symptomen, die eine Infektion mit Eperythrozoon signalisieren könnten (Asthenie, schlechter Fellzustand, Abmagerung, Leistungsschwäche), wurden der symptomatischen Gruppe (Gruppe S) zugeordnet. Allgemein gesunde Pferde bildeten die Kontrollgruppe (Gruppe K). Pferde, bei denen nach der allgemeinen klinischen Untersuchung die Diagnose einer Krankheit des Respirations- oder Magen-Darmtraktes gestellt wurde, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Es wurden Blutproben aus der Vena jugularis externa in EDTA-Röhrchen aufgefangen. Wie von Latimer und Rakich (2002) beschrieben, wurden Ausstriche angefertigt und nach Herstellerangaben mit Diff-Quik® (Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) oder Giemsa-Färbung (Greiner-bio, Flacht) angefärbt. Nach Kodierung der angefärbten Blutausschriebe beurteilten drei Untersucher unabhängig voneinander das Vor-

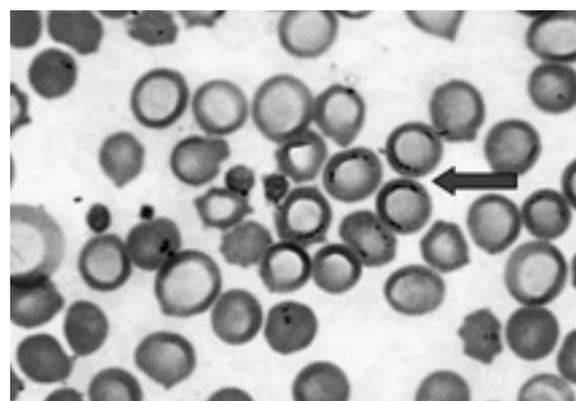


Abb. 1 Darstellung von Erythrozyten in einem peripheren Blutausschrieb eines Pferdes. Eperythrozoon-ähnliche Strukturen sind auf den Erythrozyten erkennbar. Als Eperythrozoon-ähnliche Strukturen wurden punktförmige, dunkelviolett gefärbte, meist multipel und in der Peripherie der Erythrozyten auftretende Veränderungen definiert (Pfeil). Diff-Quik®-Färbung, 1000 x.

Erythrocytes in a peripheral blood smear of a horse. Eperythrozoon-like structures are visible on the erythrocytes. Eperythrozoon-like structures were defined as point-like, dark-violet changes mostly seen in multiple numbers and in the margin of erythrocytes (arrow). Diff-Quik® Stain, 1000 x.

kommen von Eperythrozoon-ähnlichen Strukturen auf den Erythrozyten. Als Eperythrozoon-ähnliche Strukturen wurden punktförmige, dunkelviolett gefärbte meist multipel und in der Peripherie der Erythrozyten auftretende Veränderungen definiert (Abb.1), wie von Overas (1969) beim Schaf beschrieben. Ein Vorkommen von drei oder mehr Eperythrozoon-ähnlichen Strukturen pro 10 Blickfelder in einem Ausstrich wurde entsprechend dem Vorgehen anderer Autoren (Tasker et al. 2003) als positiver zytologischer Nachweis eingestuft.

Hämatologische Untersuchungen der Blutproben wurden mittels eines Abbott Cell-Dyn 3500 Analysegeräts (Abbott GmbH&Co. KG, Wiesbaden) durchgeführt. Die hämatologischen Parameter (Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCH, MCHC, MCV, Thrombozyten) der Gruppen S und K wurden ausgewertet und miteinander verglichen. Bei normalverteilten Daten wurde der T-Test verwendet, bei nicht-normalverteilten Daten der Wilcoxon-Test. Zur Evaluierung der zytologischen Diagnostik wurden die Übereinstimmungen zwischen den drei verschiedenen Untersuchern mittels des McNemar-Tests und der Errechnung des Kappa-Indexes überprüft. Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm SAS (Statistical Analysis Systems, Version 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA) angewandt. Bei der Beurteilung wurde jeder P-Wert < 0,05 als signifikant eingestuft.

Ergebnisse

Sowohl die Blutausstriche von Pferden der Gruppe S (n = 32), als auch die der Kontrolltiere (Gruppe K; n = 76) zeigten häufig Eperythrozoon-ähnliche Strukturen (Tab.1). Auffällig war, dass ein Untersucher mit nur 21 zytologisch positiven Bewertungen im Sinne einer Feststellung Eperythrozoon-ähnlicher Strukturen signifikant (P < 0,001) anders als die beiden anderen Untersucher (jeweils 72 und 82 positive Bewertungen) beurteilte. In Gruppe S beurteilten die Untersucher nur 3 Blutproben einheitlich, nämlich zweimal alle positiv und einmal alle negativ. In Gruppe K beurteilten die Untersucher in 10 Fällen einheitlich positiv, in 6 Fällen einheitlich

Tab. 1 Zytologische Beurteilung der peripheren Blutausstriche der Gruppen S und K durch drei Untersucher (Keine Diagnose bezeichnet die von zwei Untersuchern offen gelassene Diagnose).

Results of the peripheral blood smear examinations in both groups S and K by the three examiners (with some smears the diagnosis was left open by two examiners).

Diagnose	Untersucher 1			Untersucher 2			Untersucher 3		
	S	K	S+K	S	K	S+K	S	K	S+K
Gruppe									
Zytologisch positiv (Anzahl)	27	55	82	22	50	72	7	14	21
Zytologisch negativ (Anzahl)	5	21	26	9	26	35	12	24	36
Keine Diagnose (Anzahl)				1		1	13	38	51
Gesamt (Anzahl)	32	76	108	32	76	108	32	76	108

negativ und 21-mal wurden die Blutproben von den Untersuchern unterschiedlich beurteilt.

Untersucher 1 und 2 beurteilten mit P = 1,17 (Mc-Nemar-Test) ähnlich, wobei die tatsächliche Übereinstimmung mit einem κ -Wert von 0,0225 sehr niedrig war. Die Vergleiche der Beurteilungen von Untersucher 1 und 3 sowie von Untersucher 2 und 3 zeigten hoch signifikant (P < 0,001; Mc-Nemar-Test) sehr niedrige Übereinstimmungen mit einem sehr kleinen κ -Wert (-0,0148).

Ein Vergleich zwischen den Gruppen S und K wurde an Hand der hämatologischen Parameter durchgeführt (Tab. 2 und 3). Gruppe S und K wiesen keinen Unterschied (P > 0,05) in Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl oder mittlerer Hämoglobinkonzentration des Einzelerythrozyten (MCHC) auf. Die Erythrozytenzahl dagegen war hoch signifikant (P < 0,001) unterschiedlich. Gruppe S wies durchschnittlich höhere Erythrozytenzahlen auf. Auch der Hämoglobingehalt, der Hämatokritwert, das Einzelvolumen der Erythrozyten (MCV) und der Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten (MCH) waren in beiden Gruppen signifikant (P < 0,05) unterschiedlich. In Gruppe S wurden höhere Werte des Hämoglobingehaltes und des Hämatokrits und niedrigere Werte des MCV und MCH gemessen.

Diskussion

Obwohl beim Pferd in der wissenschaftlichen Literatur nicht beschrieben, wird das Vorkommen der Eperythrozoonose beim Pferd von Tierärzten diskutiert. Bei anderen Tierarten wurde der Verlauf der Eperythrozoonose beschrieben, welche mit Anämie, Schwäche, schlechtem Fellzustand und Anorexie einhergeht (Overas 1969, Messick 2003, 2004, Sykes 2003, Hoelzle 2007). Vergleichbare Symptome dienten in der vorliegenden Untersuchung als Einschlusskriterien.

Bei der lichtmikroskopischen Diagnostik von hämotrophen Mykoplasmen im peripheren Blutausstrich wird über das regelmäßige Vorkommen von sowohl falsch positiven, als auch von falsch negativen Ergebnissen berichtet (Overas 1969, Heinritzi 1990, Tasker und Lapin 2002, Sykes 2003). Zum Beispiel können Farb-Artefakte bei der Suche nach hämotrophen Mykoplasmen im peripheren Blutausstrich als Mikroorganismen angesprochen werden, was zu falsch positiven Ergebnissen führt. In einer Studie wurde sogar eine Sensitivität von nur 11% errechnet (Tasker et al. 2003). Gehlen et al. (2008) beurteilten bisher diagnostizierte Eperythrozoonosefälle bei Pferden als falsch positive Diagnosen, hervorgerufen durch Farbarteefakte im Blutausstrich. Wegen des Fehlens

eines pferdespezifischen PCR-Tests und um der bisher genutzten Methodik beim Pferd zu folgen, wurden in der vorliegenden Studie zytologische Untersuchungen als einziges labor-diagnostisches Hilfsmittel angewandt. Um die zytologische Diagnose zu validieren, wurden die Blutproben von drei unterschiedlichen Untersuchern unabhängig voneinander bewertet. Deutlich wurde, dass ein Untersucher mit nur 21 positiven und 51 offengelassenen Ergebnissen anders bewertete als die beiden anderen Untersucher (jeweils 72 und 82 positive Diagnosen). In der statistischen Auswertung war dieser Unter-

Tab. 2 Hämatologische Parameter der Gruppe S. Angegeben sind jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung (S) sowie der Medianwert, Minimal- und Maximalwerte sowie die 25- und 75-Perzentile.

Haematological parameters of group S. Shown are the mean with standard deviation, median-, minimal and maximal- values and lower and higher- quartiles.

Messwert	N	Mittelwert	S	Median	Minimum	Maximum	P25	P75
Leukozyten (G/l)	32	6,7	1,68	6,4	4,1	10,9	5,3	7,55
Erythrozyten (T/l)	32	8,5	1,19	8,3	6,2	10,8	7,6	9,1
Hämoglobin (g/dl)	32	13,4	1,88	13	10,6	18,3	12,1	14,35
Hämatokrit (%)	32	39,4	5,43	38,3	31,6	55,6	35,6	41,15
MCH (pg)	32	15,9	1,24	15,95	13,2	18,2	15,25	16,7
MCHC (g/dl)	32	33,9	0,68	34	32,5	35,4	33,5	34,3
MCV (fl)	32	46,9	3,65	46,7	40,2	53,5	44,9	49,05
Thrombozyten (G/l)	32	137,7	65,47	119	43,1	356	95,45	149

Tab. 3 Hämatologische Parameter der Gruppe K. Angegeben sind jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung (S) sowie der Medianwert, Minimal- und Maximalwerte sowie die 25- und 75-Perzentile.

Haematological parameters of group K. Shown are the mean with standard deviation, median-, minimal and maximal- values and lower and higher- quartiles.

Messwert	N	Mittelwert	S	Median	Minimum	Maximum	P25	P75
Leukozyten (G/l)	76	6,6	1,82	6,15	4	14,1	5,4	7,4
Erythrozyten (T/l)	76	7,5	0,93	7,3	5,3	10,1	6,7	8,15
Hämoglobin (g/dl)	76	12,5	1,47	12,35	9,6	16,1	11,35	13,45
Hämatokrit (%)	76	37,1	4,13	36,75	28,5	47,2	34,15	40,25
MCH (pg)	76	16,8	1,39	16,8	12,7	20,7	16	17,8
MCHC (g/dl)	76	33,7	1,10	33,75	30	37,7	33	34,4
MCV (fl)	76	50,0	4,09	49,4	41,7	61	47,45	52,7
Thrombozyten (G/l)	76	115,2	43,40	114	18	247	89,8	133,5

schied signifikant ($P < 0,001$). Auch die gesamte Übereinstimmung der drei Untersucher war sehr gering (κ -Werte 0,0225; -0,0148). Daraus wurde abgeleitet, dass Eperythrozoon-ähnliche Veränderungen entsprechend den Angaben der Literatur (Overas 1969, Heinritzi 1990, Tasker und Lapin 2002, Sykes 2003) lichtmikroskopisch nicht eindeutig anzusprechen sind. Dass es sich insgesamt um eine unspezifische Methode handelt wird dadurch unterstützt, dass Eperythrozoon-ähnliche Strukturen häufig sowohl in der Gruppe S als auch in der Gruppe K festgestellt wurden.

Entgegen der Erwartung, in Gruppe S mehr anämische Tiere anzutreffen, wurden bei symptomatischen Tieren häufiger im Referenzbereich befindliche Werte des roten Blutbildes festgestellt. Erythrozytenzahl, Hämoglobinwert und Hämatokrit waren in der Gruppe S signifikant höher als in der Gruppe K. Lediglich höhere Werte von MCV und MCH in der Gruppe S könnten Hinweise auf das Vorliegen von Anämien bei symptomatischen Tieren geben. Dies ist jedoch rein spekulativ und wird an dieser Stelle nicht weiter diskutiert.

Bei mehreren Tieren aus beiden Gruppen wurden vereinzelt niedrige Werte der Erythrozytenzahl, des Hämoglobingehalts und des Hämatokrits festgestellt. Tiere, bei denen alle Parameter deutlich unterhalb des Referenzbereiches lagen und bei denen ein Hinweis auf eine Anämie bestand, waren nicht unter den Probanden. Bei nur wenigen Tieren wurden im Zusammenhang mit klinischen Symptomen leichte Anämien und positive Bewertungen der zytologischen Untersuchungen festgestellt. Leichte Anämien werden aber häufig als Begleitsymptom bei chronisch erkrankten Tieren angetroffen, können aber keinesfalls als Hinweis auf eine Eperythrozoonose

verstanden werden. Chronische Infektionen, Entzündungen, Neoplasien oder Organversagen sind allgemein mögliche Ursachen (Carlson 2002).

Beim Schwein wurde eine deutliche Assoziation zwischen dem Abfall der Erythrozytenzahl, des Hämoglobingehalts, des Hämatokrits und einer Bakteriämie in der akuten Phase ausführlich beschrieben (Heinritzi 1983, 1989). In der vorliegenden Studie wurden hingegen keine Pferde mit Anzeichen einer akuten Phase der Eperythrozoonose angetroffen.

In der Literatur wird eine sehr schlechte Sensitivität der mikroskopischen Untersuchung zur Diagnose von hämotropen Mykoplasmen beschrieben (Tasker et al. 2003). Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich diese Methode wegen einer schlechten Reproduzierbarkeit als unzuverlässig. Nur in der akuten Phase der Infektion sind die Erreger in großen Zahlen einfach lichtmikroskopisch nachzuweisen. Ein akuter eperythrozoonotischer Anfall kann bei infizierten Tieren durch Splenektomie ausgelöst werden (Overas 1969, Messick 2003, 2004, Sykes 2003, Hoelzle 2007). Solche Eingriffe bei verdächtigen Pferden durchzuführen, ist auf Grund des Aufwandes und des dem Pferd zugefügten irreparablen Schadens nicht denkbar. Auch die Inokulation verdächtigen Blutes in ein für diesen Zweck splenektomiertes Versuchspferd wäre aus dem gleichem Grund abzulehnen. Ein möglicher Ansatz zum Nachweis von hämotropen Mykoplasmen beim Pferd könnte die Untersuchung von EDTA-Blut stark verdächtigter Tiere mittels spezifischer Primer (16S rRNA-Gen) sein. Nur nach phylogenetischer Analyse der erhaltenen Sequenzen könnte auf diese Weise – in Anlehnung an die Neubeschreibung verschiedener hämotropher Mykoplasmen-Spezies bei anderen

Tierarten – eine pferdespezifische, neue hämotrophe Mykoplasmen-Spezies beschrieben und das Krankheitsbild weiter erforscht werden.

Auf Grund der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse und der Erkenntnisse über hämotrophe Mykoplasmen bei verschiedenen Tierarten kann bei Pferden mit Symptomen einer chronisch unspezifischen Erkrankung, bei der in der zytologischen Untersuchung verdächtige Strukturen auf den Erythrozyten nachgewiesen wurden, nicht ohne weiteres von einer Infektion mit hämotrophen Mykoplasmen ausgegangen werden. Bei solchen Patienten sollten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Erst wenn hämotrophe Mykoplasmen nach phylogenetischer Genanalyse beim Pferd beschrieben werden und ein spezifischer PCR-Test entwickelt wurde und verfügbar ist, kann die Diagnose dieser Erreger beim Pferd mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit gestellt und mit klinischen Symptomen in Zusammenhang gebracht werden. Die eigenen Untersuchungsergebnisse lassen keinen Schluss über eine Kausalität zwischen zytologisch nachweisbaren Eperythrozoon-ähnlichen Strukturen auf Pferde-Erythrozyten und klinischen Symptomen zu.

Literatur

- Carlson G. P. (2002) Depression Anemia: Large animal internal medicine. Verlag Mosby, St. Louis, 3. Aufl., 1063-1065
- Dillberger J. E., Loudy D. E., Adler R. R. und Gass J. H. (1994) Hemobartonella-like parasites in Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet. Pathol.* 31, 301-307
- Foley J. E. und Pedersen N. C. (2001) 'Candidatus *Mycoplasma haemominitum*', a low-virulence eperythrocytic parasite of cats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 815-817
- Gehlen H., Venner M. und Ganter M. (2008) Eperythrozoonose – eine auch beim Pferd auftretende Erkrankung? *Pferdespiegel* 2008, 2-4
- Gretillat S. (1978) L'hémobartonellose équine au Niger. *Bull. Acad. Vet. Fr.* 51, 351-358
- Heinritzi K. (1983) Klinik, Hämatologie und Metabolismus des eperythrozoonotischen Anfalls. *Collegium Veterinarium* 14, 40-44
- Heinritzi K. (1989) Eperythrozoon-Infektion beim Schwein als Faktorenkrankheit. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.* 102, 337-342
- Heinritzi K. (1990) Zur Diagnostik der Eperythrozoon-suis-Infektion. *Tierärztl. Prax.* 18, 477-481
- Hoelzle L. E. (2007) Zur Bedeutung der hämotrophen Mykoplasmen in der Veterinärmedizin unter besonderer Berücksichtigung der *Mycoplasma suis*-Infektion beim Schwein. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.* 120, 34-41
- Latimer K. S. und Rakich P. M. (2002) Peripheral blood smears: Diagnostic cytology and hematology of the horse. Verlag Mosby, St. Louis, 2. Aufl., 200-216
- McLaughlin B. C., Evans C. N., McLaughlin P. S., Johnson L. W., Smith A. R. und Zachary J. F. (1990) An Eperythrozoon-like parasite in lambs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197, 1170-1175
- Messick J. B. (2003) New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, Haemobartonella and Eperythrozoon species) infections in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 1453-1465
- Messick J. B. (2004) Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Vet. Clin. Pathol.* 33, 2-13
- Messick J. B., Berent L. M., Ehrhart E. J. und Wasmer C. C. (2000) Light and electron microscopic features of eperythrozoon-like parasites in a North American opossum (*Didelphis virginiana*). *J. Zoo Wildl. Med.* 31, 240-243
- Messick J. B., Walker P. G., Raphael W., Berent L. und Shi X. (2002) 'Candidatus *Mycoplasma haemodidelphidis* sp. nov.', 'Candidatus *Mycoplasma haemolamae* sp. nov. and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., hemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*), and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 693-698
- Neimark H., Johansson K. E., Rikihisa Y. und Tully J. G. (2001) Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with the descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 891-899
- Neimark H., Barnaud A., Gounon P., Michel J. C. und Contamin H. (2002 a) The putative haemobartonella that influences *Plasmodium falciparum* parasitaemia in squirrel monkeys is a hemotrophic mycoplasma. *Microbes Infect.* 4, 693-698
- Neimark H., Johansson K. E., Rikihisa Y. und Tully J. G. (2002 b) Revision of hemotrophic *Mycoplasma* species names. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 683
- Neimark H., Hoff B. und Ganter M. (2004) *Mycoplasma ovis* comb. Nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 365-371
- Neimark H., Peters W., Robinson B. L. und Stewart L. B. (2005) Phylogenetic analysis and description of *Eperythrozoon coccoides*, proposal to transfer to the genus *Mycoplasma* as *Mycoplasma coccoides* comb. nov. and request for an opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1385-1391
- Overas J. (1969) Studies on *Eperythrozoon ovis*-infection in sheep. *Acta vet. scand.* 28, Beil. 1-148
- Puntaric V., Borcic D., Vukelic D., Jeren T., Burek V., Wikerhauser T. und Richter B. (1986) Eperythrozoonosis in man. *Lancet* 2, 868-869
- Reagan W. J., Gary F., Thrall M. A., Colgan S., Hutchison J. und Weiser M. G. (1990) The clinicopathologic, light, and scanning electron microscopic features of eperythrozoonosis in four naturally infected lambs. *Vet. Pathol.* 27, 426-431
- Stoffregen W. C., Alt D. P., Palmer M. V., Olsen S. C., Waters W. R. und Stasko J. A. (2006) Identification of a haemomycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*). *J. Wildl. Dis.* 42, 249-258
- Sykes J. E. (2003) Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 773-789
- Tarello W. (2001) Chronic fatigue syndrome in horses: diagnosis and treatment of 4 cases. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 24, 57-70
- Tasker S. und Lappin M. R. (2002) *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *J. Feline Med. Surg.* 4, 3-11
- Tasker S., Binns S. H., Day M. J., Gruffydd-Jones T. J., Harbour D. A., Helps C. R., Jensen W. A., Olver C. S. und Lappin M. R. (2003) Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominitum*' in cats in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 152, 193-198
- Willi B., Boretti F. S., Baumgartner C., Catorri V., Meli M. L., Doherr M. G., Reusch C. E. und Hofmann-Lehmann R. (2006) Feline Haemoplasmen in der Schweiz: Identifikation einer neuen Spezies, Diagnose, Prävalenz und klinische Bedeutung. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 148, 139-150

Dr. Rutmer Niemendal
 Außenstelle für Epidemiologie
 Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
 Büscheler Straße 9
 49456 Bakum
 rutmerniemendal@yahoo.de