

Besnoitia besnoiti auf der Spur

Ein Diagnostikleitfaden

von Nicole S. Gollnick^a, Wolfgang Klee^a, Julia C. Scharr^a, Martin C. Langenmayer^{a,b}, Monir Majzoub^b, Ana Rostaher^c, Walter Basso^d, Franz J. Conraths^e, Gereon Schares^e

Die bovine Besnoitiose des Rindes wird in einer von der European Food Safety Authority (EFSA) in Auftrag gegebenen aktuellen Stellungnahme vom 11. Februar 2010 als „emerging disease“ eingestuft. In diesem Votum wird dazu aufgerufen, in endemischen Gebieten flächendeckende epidemiologische Untersuchungen durchzuführen. Des Weiteren wird die Weiterentwicklung von diagnostischen Methoden und die Entwicklung von Strategien zur Kontrolle der bovinen Besnoitiose angeraten [1]. Einer weiteren Empfehlung der EFSA, nämlich Tierärzte und Landwirte ausführlich über die Erkrankung zu informieren, möchten wir mit diesem Artikel folgen. Bereits in der Märzausgabe berichteten wir ausführlich über die bovine Besnoitiose in Deutschland. Im folgenden Artikel stellen wir Ihnen nun wichtige diagnostische Methoden vor.



Abb. 2: Weiße, stecknadelkopfgroße Knötchen (Parasitenzysten) auf der skleralen Konjunktiva einer Kuh fünf Monate nach Infektion mit *B. besnoiti*.
Bild: Gollnick

Die klinische Untersuchung erhärtet den Verdacht

Meist stammen Rinder in Europa mit Anzeichen von boviner Besnoitiose aus Betrieben mit saisonaler Weidehaltung (z. B. Mutterkuhhaltung). Entscheidend für die sorgfältige klinische Untersuchung ist eine gute Fixierung der Tiere. Optimal ist die Nutzung eines Zwangs-

stands. Bei der spezifischen Untersuchung muss neben der Haut (Abb. 1) auch der skleralen Konjunktiva (Abb. 2) und der Schleimhaut im *Vestibulum vaginae* (Abb. 3) besondere Beachtung geschenkt werden. Damit wichtige Veränderungen nicht übersehen werden, ist es unbedingt notwendig, gute Lichtverhältnisse zu schaffen. Als besonders geeignet hat sich



Abb. 1: Grobknotig verdickte und verformte Zitzenhaut bei einer Kuh mit boviner Besnoitiose im chronischen Stadium.

Bild: Gollnick



Abb. 3: Bei einem Teil der chronisch mit *B. besnoiti* infizierten Rinder treten in der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae* weiße, stecknadelkopfgroße Knötchen (Parasitenzysten) auf.

Bild: Gollnick

^a Klinik für Wiederkäufer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

^b Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

^c Medizinische Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

^d Institut für Parasitologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, Schweiz

^e Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Epidemiologie, Wusterhausen, Deutschland



Abb. 4: Eine Stirnlampe ist ein gutes Hilfsmittel für die gründliche Untersuchung der Augen. Gerade bei milden klinischen Ausprägungen lassen sich Parasitenzysten auf der skleralen Konjunktiva nur bei guten Lichtbedingungen sicher erkennen.

Bild: Scharr

die Verwendung einer Stirnlampe erwiesen (Abb. 4), aber auch Halogenstrahler im Bereich des Zwangsstands oder lichtstarke Taschenlampen können eingesetzt werden.

Der Grad der Ausprägung klinischer Symptome ist bei der bovinen Besnoitiose möglicherweise abhängig von der Infektionsdosis. Nach einer Inkubationszeit von vier bis 14 Tagen beginnt das Anasarka-(Ödem-)Stadium [2]. In dieser Phase ist jedoch nur ein Teil der betroffenen Tiere klinisch auffällig. Diese können folgende Symptome zeigen: deutliche Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, Fieber, klammer Gang, Speicheln (Abb. 5a), Augenausfluss (Abb. 5b), Lichtscheue und Ödeme in der Unterhaut, insbesondere an den

distalen Gliedmaßen (Abb. 6a und 6b). Männliche Tiere können in dieser Phase an Orchitis erkranken. Das Anasarka-Stadium klingt nach wenigen Tagen bis zwei Wochen wieder ab und betroffene Rinder können wieder symptomfrei werden [3,4,5].

Erste typische Veränderungen lassen sich bei diesen Rindern dann frühestens 14 Tage nach dem Auftreten erster Anzeichen des Anasarka-Stadiums in Form von sehr kleinen, weißen Knötchen auf der skleralen Konjunktiva (Abb. 2) erkennen. Allerdings bedarf es einer gewissen Übung und Erfahrung, um diese Veränderungen in diesem frühen Stadium zu erkennen. Parasitenzysten in der Schleimhaut des *Vestibulum vaginae* (Abb. 3) treten in den von uns beobachteten Fällen mit

zeitlichem Abstand zu den Veränderungen an der skleralen Konjunktiva auf. Häufig sind die Zysten jedoch nur am Auge zu erkennen (Abb. 2). Bei der Untersuchung des *Vestibulum vaginae* darf man sich nicht von Bläschen in der Schleimhaut irritieren lassen. Diese treten nach eigenen Beobachtungen bei Kühen, bei denen ein Deckbulle mitläuft, häufig auf. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Bläschen und einer Infektion mit *B. besnoiti* besteht nicht.

Bei an boviner Besnoitiose erkrankten Rindern können Hautveränderungen auftreten, die umgangssprachlich als „Elefantenhaut“ bezeichnet werden. Die Primärläsion ist eine Hautverdickung unterschiedlichen Grades. Es können aber auch Krusten, Alopezie und Hypotrichose bestehen (Abb. 7) [4]. Bei den von uns untersuchten betroffenen Rinderherden traten die Hautveränderungen nur bei wenigen Tieren auf (1–3 Prozent). Meist ist zunächst die Zitzenhaut betroffen (Abb. 1), später können auch andere Körperregionen (Hintergliedmaßen, Flotzmaul, Hals, Schwanz) Hautveränderungen aufweisen (Abb. 8).

Pathologisch-anatomische Untersuchung

Die Sektion bietet eine weitere Möglichkeit, eine Verdachtsdiagnose zu stellen. Die pathologisch-anatomischen Befunde variieren je nach Grad der Erkrankung. Die akute Phase ist vor allem durch Unterhautödeme und Erweiterung der Gefäße mit Thrombenbildung gekennzeichnet. Dazu können noch eine lokalisierte Degeneration und Nekrose der Muskulatur, serofibrinöse Arthritiden, Petechien/Ekchymosen im Bereich der Nerven und der Gelenkinnenhaut, eine geringgradig vergrößerte Milz und Leberdegenerationen mit Cholestase vorliegen [5]. Im chronischen Stadium wird bei einer hochgradigen Infektion mit *B. besnoiti* oft nur fokal eine verdickte, haarlose Haut auffallen, zusätzlich können noch Erosionen oder sogar

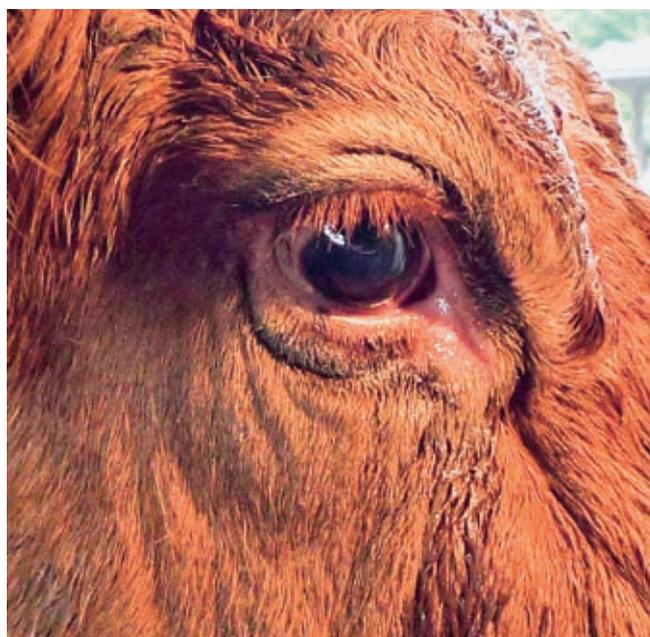
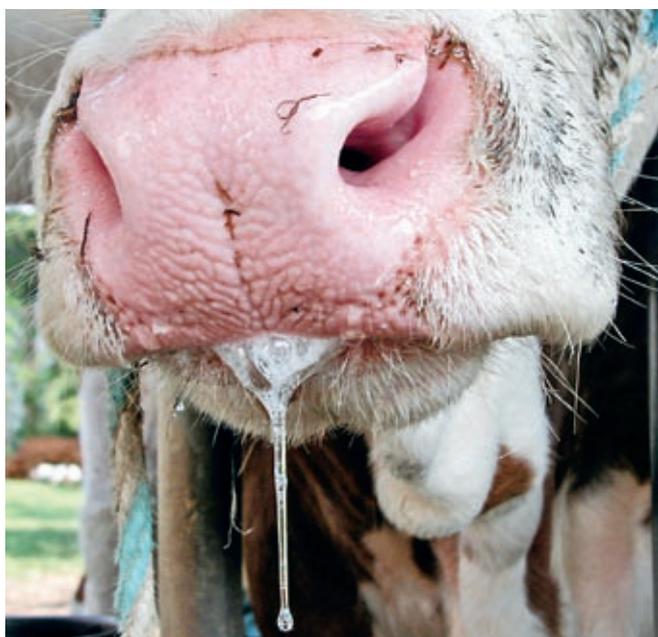


Abb. 5a und 5b: Speicheln und Augenausfluss können bei akut an boviner Besnoitiose erkrankten Rindern auftreten.

Bild 5a: Scharr/Bild 5b: Gollnick



Abb. 6a und 6b: Klinisch sichtbare subkutane Ödeme lassen sich nur bei einem Teil der Tiere im akuten Stadium der bovinen Besnoitiose feststellen. Im rechten Bild (6b) lässt sich erkennen, dass nach Entfernung des Daumens ein Abdruck bestehen bleibt (roter Kreis). Diese Befunde konnten bei der betroffenen Limousin-Kuh an allen distalen Gliedmaßen erhoben werden.

Bilder: Gollnick



Abb. 7: Hypotrichose oder Alopezie sind Folgen von Durchblutungsstörungen der stark mit *B. besnoiti*-Parasitenzysten durchsetzten Rinderhaut.

Bild: Gollnick

Ulzerationen der Haut beobachtet werden. Aufgrund der bestehenden Hautentzündung kann es zu einer Vergrößerung aller peripheren Lymphknoten kommen. Bei der Untersuchung der Schleimhäute im Nasenraum (Abb. 9) und im Vestibulum vaginae (Abb. 3) sowie der skle-

ralen Konjunktiva (Abb. 2) lassen sich zahlreiche submiliare weiße Herde (Parasitenzysten) feststellen [6]. Diese Zysten werden auch im Larynx und Pharynx, in der Trachea, an Sehnen und Muskeln, im Bereich der Klauen und an den Hoden gefunden [5].

Diagnose sichern mittels Antikörperrnachweis

Durch den Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *B. besnoiti* lässt sich die Diagnose sichern. Zu diesem Zweck stehen mehrere serologische Verfahren zur Verfügung, zu



Abb. 8: Grobknotig verdickte Haut in der Augenregion eines an boviner Besnoitiose erkrankten Chianina Bullen.

Bild: mit freundlicher Genehmigung von Arcangelo Gentile, Universität Bologna, Italien

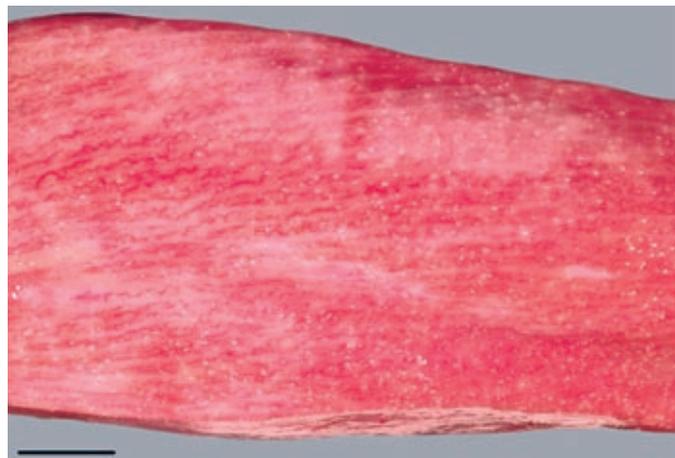


Abb. 9: Zahlreiche miliare, erhabene Herde in der Nasenschleimhaut einer Kuh mit boviner Besnoitiose im chronischen Stadium.

Bild: Majzoub



Abb. 10: Hautbiopate können mit einer herkömmlichen Hautstanze (8 mm Durchmesser) aus Bereichen veränderter Haut entnommen werden. Zuvor sollte das Haarkleid gekürzt werden. Dann wird der ausgewählte Hautbezirk mit einem zweiprozentigen Lokalanästhetikum betäubt. Reinigung und Desinfektion der Haut sollte vermieden werden, um die Morphologie der Epidermis nicht zu verändern. Bei der Biopsiedurchführung ist darauf zu achten, dass der Stanzenkopf nur in eine Richtung gedreht wird, bis sich das Hautstück leicht herauslösen lässt. Soll am Biopat eine histologische Untersuchung durchgeführt werden, so muss darauf geachtet werden, dass es nicht gequetscht wird, deshalb sollte man mit der Pinzette die Probe so tief wie möglich greifen.

Bild: Gollnick



Abb. 11: Für die zytologische Untersuchung entnimmt man mit einem Skalpell oder einem scharfen Löffel ein oberflächliches Geschabsel aus dem Bereich der veränderten Vulvaschleimhaut und streicht dieses dann auf einem Objektträger aus.

Bild: Gollnick

denen ELISA-, Immunfluoreszenz- und verschiedene Immunoblotverfahren zählen [7]. Bislang gibt es nur einen kommerziell verfügbaren und in Deutschland zugelassenen Test. Dabei handelt es sich um einen ELISA (Prionics AG, Deutschland). Nach Angaben des Herstellers hat der Test eine Sensitivität von 97,8 Prozent und eine Spezifität von 98,1 Prozent. Eine unabhängige Validierung des Tests steht aber noch aus. Für eines der Immunoblot-Verfahren wird eine Sensitivität von 90,9 Prozent und in Abhängigkeit von der Herkunft der untersuchten Seren eine Spezifität von 96,4 oder 100 Prozent angegeben [8]. Immunoblotverfahren haben den Vorteil, dass durch eine elektrophoretische Auftrennung verschiedener Antigenkomponenten spezifische Reaktionen leichter von unspezifischen unterschieden werden

können. Es ist somit das derzeit beste Verfahren, um eine *B. besnoiti*-spezifische Antikörperantwort zu erkennen. Daher empfiehlt das Friedrich-Loeffler-Institut, serologische Reihenuntersuchungen mit Hilfe des kommerziell verfügbaren ELISA durchzuführen und fragliche und positive Befunde in Immunoblot- und Immunfluoreszenzverfahren abzuklären.

Nachweis des Parasitengenoms

Im Körpergewebe chronisch infizierter Tiere, vor allem in den Schleimhäuten des Auges und des *Vestibulum vaginae* sowie in der Haut, befinden sich Gewebezysten, in denen mittels einer spezifischen Polymerasekettenreaktion (PCR) das Parasitengenom nachgewiesen werden kann. Entsprechende Protokolle sind publiziert [9,10]. Zur Probenentnahme

sollten in den Schleimhautbereichen, in denen Parasitenzysten-ähnliche Strukturen beobachtet wurden, mit Hilfe eines scharfen Löffels oder einer Skalpellklinge oberflächliche Geschabsel abgenommen und in ein sauberes Plastikgefäß (Reaktionsgefäß, Serumröhrchen) verbracht werden. Dasselbe gilt für Hautgewebeproben, die mit einer kommerziell erhältlichen Hautstanze (Abb. 10) entnommen werden. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Parasitendichte in der Haut von Tier zu Tier sehr stark variiert, sodass bei einem negativen Ausgang der Untersuchung eine Infektion nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Die frisch entnommenen Proben sollten innerhalb von 24 Stunden an ein geeignetes Diagnostiklabor verschickt oder bis zum Versand bei -20°C aufbewahrt werden.



Abb. 12a und 12b: Eine zytologische Untersuchung zum Nachweis von *B. besnoiti* kann an einem Abklatschpräparat veränderter Haut durchgeführt werden. Die Schnittfläche der halbierten Hautstanze wird hierfür auf einen Objektträger gedrückt.

Bilder: Rostaher

Zytologische Untersuchungen

Sind kleine weiße Knötchen auf der skleralen Konjunktiva und/oder auf der Schleimhaut im *Vestibulum vaginae* zu erkennen, kann auch eine zytologische Untersuchung weitere Aufschlüsse darüber geben, ob es sich hierbei um durch *B. besnoiti* verursachte Veränderungen handelt. Für diese Untersuchung trägt man mit einem scharfen Löffel oder einer Skalpellklinge ein wenig von der veränderten Schleimhaut ab und streicht das Gewebe auf einem Objektträger aus (Abb. 11). Bei Rindern, die adspektorisch und palpatorisch stark veränderte Hautbezirke aufweisen, kann in diesen Bereichen eine Hautbiopsie (Stanze oder Exzision) durchgeführt werden (Abb. 10) [11]. Nach Entnahme wird die Probe mit einem Skalpell vertikal in zwei Hälften geteilt, die Schnittfläche mit etwas Kraft auf einen Objektträger aufgedrückt und ein Abklatschpräparat gewonnen (Abb. 12a und 12b).

Sowohl Ausstriche als auch Abklatschpräparate können nativ (Zugabe von einem Tropfen physiologischer Kochsalzlösung) oder gefärbt (Giemsa oder Diff-Quik®) unter dem Mikroskop untersucht werden. Bei positivem Testausfall werden schon bei 400-facher Vergrößerung zahlreiche (6–8 µm lange), sichelförmige Zysten sichtbar (Abb. 13 und 14).

Wird die zytologische Untersuchung von einem geübten Untersucher durchgeführt, so ist das Ergebnis durchaus zuverlässig. Beim Einsatz dieser Untersuchungsmethode im eigenen Praxislabor sollte der Untersucher Erfahrung in der Zytologie und Diagnostik von Protozoen besitzen oder bei den ersten Untersuchungen sein Testergebnis validieren lassen. Hierzu sollten Proben des gleichen Untersuchungsmaterials zur PCR-Analyse an ein geeignetes Diagnostiklabor eingesandt werden (s. „Nachweis des Parasitengenoms“).

Histologische Untersuchung

Eine weitere Möglichkeit des Parasitennachweises ist die histologische Untersuchung der veränderten Haut. Auch bei dieser Untersuchungsmethode ist darauf hinzuweisen, dass aus einem negativen Untersuchungsergebnis nicht geschlossen werden darf, dass das Tier nicht mit *B. besnoiti* infiziert ist. Wie bereits erwähnt, besteht die Möglichkeit, dass in einer Hautstanzprobe nur sehr wenige oder gar keine Parasitenzysten vorhanden sind (s. „Nachweis des Parasitengenoms“). Dies bedeutet, dass die histologische Untersuchung nur zusätzlich zur serologischen Untersuchung durchgeführt werden sollte. Als Untersuchungsmaterial sollten Hautproben mit einer Hautstanze entnommen und möglichst unmittelbar in 7-prozentigem Formalin fixiert und in einem fest verschließbaren Probengefäß aus Plastik an ein geeignetes Diagnostiklabor versandt werden. Es wird ein Verhältnis von Probengröße zu Formalinvolumen von mindestens 1:10 empfohlen.

Bei der histologischen Untersuchung fallen sofort multiple, für bovine Besnoitiose charakteristische Zysten in der Dermis, weniger in der

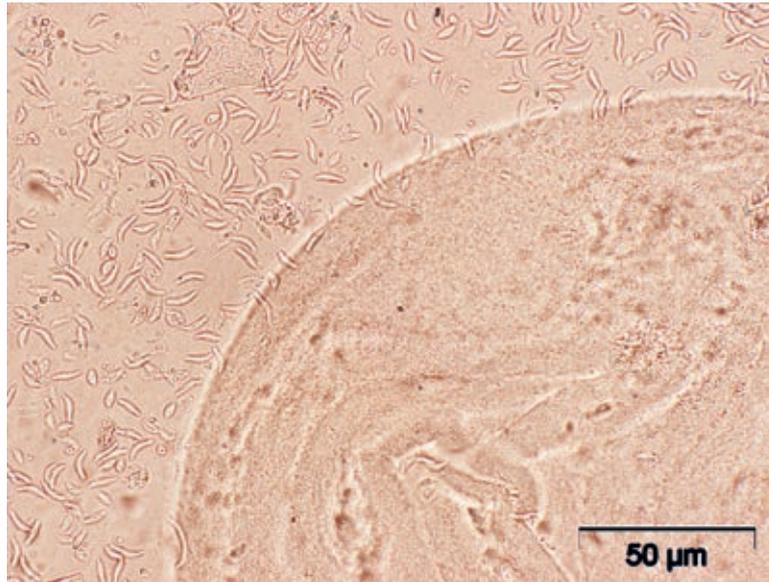


Abb. 13: Auch ohne Färbung lassen sich *B. besnoiti*-Bradyzoiten unter dem Mikroskop gut erkennen.

Bild: Basso

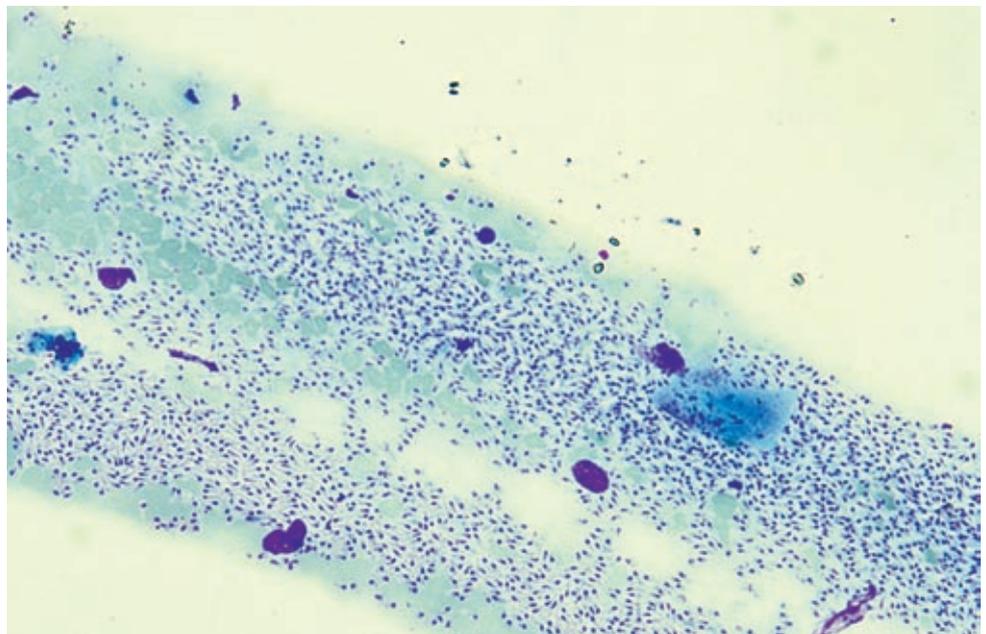


Abb. 14: Zahlreiche blau gefärbte *B. besnoiti*-Bradyzoiten im zytologischen Präparat eines Vaginalgeschabsels. Vereinzelt sind auch Entzündungszellen sichtbar (Diff-Quik®-Färbung-Farbsystem nach Romanowsky).

Bild: Rostaher

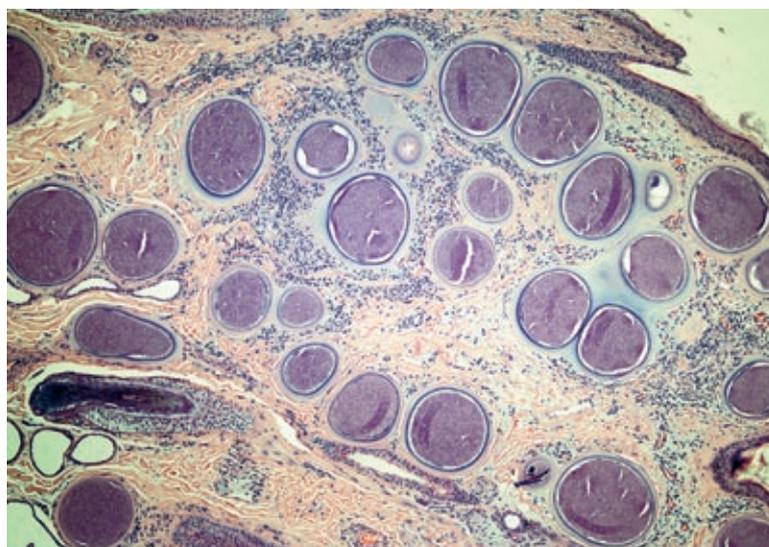


Abb. 15: Im histologischen Präparat lassen sich die typischen Parasitenzysten, welche tausende von Bradyzoiten enthalten, erkennen. Sie sind von einem Entzündungsinfiltrat umgeben. Die fehlenden Haarfollikel erklären die klinisch ausgeprägte Haarlosigkeit.

Bild: Rostaher

Epidermis oder der Subkutis auf (**Abb. 15**). Die Zysten bestehen aus einer externen hyalinen Schicht verschiedener Dicke, einer mittleren Schicht, die aus einer meistens mehrkernigen Wirtszelle besteht, und einer inneren Schicht, die je nach Größe tausende von Bradyzoiten (6–8 µm lang, 2 µm breit) beinhalten kann [5,6,12]. Des Weiteren können eine Hyperplasie der Epidermis und eine interstitielle Dermatitis auffallen. Das Gewebeeinfiltrat besteht überwiegend aus eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie aus Makrophagen. Bei einem starken Befall sind keine Haarfollikel und Anhangsdrüsen zu finden [5,6].

Kostenübernahme für Probenuntersuchung in Bayern

In Bayern werden Kosten für die Untersuchung von Proben zur differenzialdiagnostischen Abklärung von boviner Besnoitiose von der Bayerischen Tierseuchenkasse gemäß § 4 Nr. 20 Ziffer 1 der Leistungssatzung übernommen. Dies setzt jedoch voraus, dass die Untersuchung vom betreuenden Tierarzt veranlasst und an bestimmten Einrichtungen durchgeführt wird. Details können hierzu einem Merkblatt auf der Homepage der Bayerischen Tierseuchenkasse unter Downloads entnommen werden (www.bstkt.de).

Anschrift für die Verfasser: Dr. Nicole Gollnick, Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung, Ludwig-Maximilians-Universität München, Sonnenstr. 16, 85764 Oberschleißheim, Telefon: (089)21 80 78-870, Fax: -851, nicole.gollnick@lmu.de

Literatur:

- [1] European Food Safety Authority statement: Bovine besnoitiosis: An emerging disease in Europe. *Efsa Journal* 2010; 8(2):1499, siehe www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1499.htm
- [2] Eckert J, Friedhoff, KT, Zahner, H, Deplazes, P (2008): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin: 2. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.
- [3] Gottstein B (2008): Die bovine Besnoitiose: Schweizerische Vereinigung für Wiederkäuermedizin, 22. Siehe www.svwasmr.ch/aktuell/pdf/Besnoitia_08.pdf, letzter Zugriff am 28 Februar 2010.
- [4] Levine ND (1985): *Veterinary protozoology*. Iowa: The Iowa State University Press, 256-9.
- [5] Basson PA, McCully RM, Bigalke RD (1970): Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*; 37:105-26.
- [6] Majzoub M, Breuer W, Gollnick NS et al. (2010): Ein Ausbruch von Besnoitiose bei Rin-

dern in Deutschland: Pathomorphologische, ultrastrukturelle und molekularbiologische Untersuchungen. *Wiener Tierärztliche Monatschrift – Vet. Med. Austria*; 97:9-15.

[7] Cortes HC, Nunes S, Reis Y et al. (2006): Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Veterinary Parasitology*; 141:216-25.

[8] Schares G, Basso W, Majzoub M et al. (2010): Comparative evaluation of immunofluorescence antibody and novel immunoblot tests for the specific detection of bovine antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites. *Veterinary Parasitology*, im Druck.

[9] Cortes, HC, Reis, Y, Waap, H et al. (2006): Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Veterinary Parasitology*; 141, 226-233.

[10] Cortes HC, Reis Y, Gottstein B et al. (2007): Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Veterinary Parasitology*; 146: 352-6.

[11] Sannusi A (1991): A simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis. *Veterinary Parasitology*; 39:185-8.

[12] Dubey JP, Shkap V, Pipano E et al. (2003): Ultrastructure of *Besnoitia besnoiti* tissue cysts and bradyzoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*; 50:240-4.