



Lyme-Borrelien sind sehr selten in „Flüssigkeiten“ (z. B. Blut), daher findet die Serologie eine breite Anwendung.

ZECKENÜBERTRAGENE ERKRANKUNGEN BEIM HUND

DR. MED. VET NIKOLA PANTCHEV¹, DR. RER. NAT. SILVIA PLUTA¹, DR. MED. VET ELKE HUISINGA¹, DR. MED. VET STEPHANIE NATHER¹, DR. MED. VET MIRIAM SCHEUFELN¹, DR. MED. VET MAJDA GLOBOKAR VRHOVEC¹, DR. MED. VET ANDREA SCHWEINITZ¹, DR. MED. VET HERWIG HAMPEL¹, PROF. DR. MED. VET REINHARD K. STRAUBINGER²

¹ IDEXX LABORATORIES, ² LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TEIL 2:

Borreliose, Anaplasmose, Babesiose: Diagnostik.

LYME-BORRELIEN

Die Verdachtsdiagnose „Lyme-Borreliose“ beim Hund schließt mehrere Kriterien ein (Littman et al. 2006; Krupka & Straubinger 2010). Das sind eine Anamnese hinsichtlich Zeckenexposition und Leben in einem Endemiegebiet, diagnostische Hinweise auf eine Infektion mit dem Erreger, Ausschluss von Differenzialdiagnosen, passende klinische Symptome sowie Ansprechen auf spezifische Behandlung inklusive Therapiekontrolle. Der Nachweis mittels direkter Methoden (PCR/Kultur) ist schwer und wenig praktikabel. Lyme-Borrelien werden sehr selten in „Flüssigkeiten“ wie Blut (Abb. 1), Urin (selten auch Blasenbeteiligung), Gelenksflüssigkeit oder Liquor und häufiger in Bindegewebe, Gelenkkapseln (der Nachweis gelingt nicht in allen betroffenen Gelenken), Haut (nahe des Zeckenstichs), Lymphknoten, Muskel (auch Herz) u. a.

Teil 1 (Verbreitung, Übertragung und Prophylaxe) ist in der Ausgabe 03/2017 erschienen.

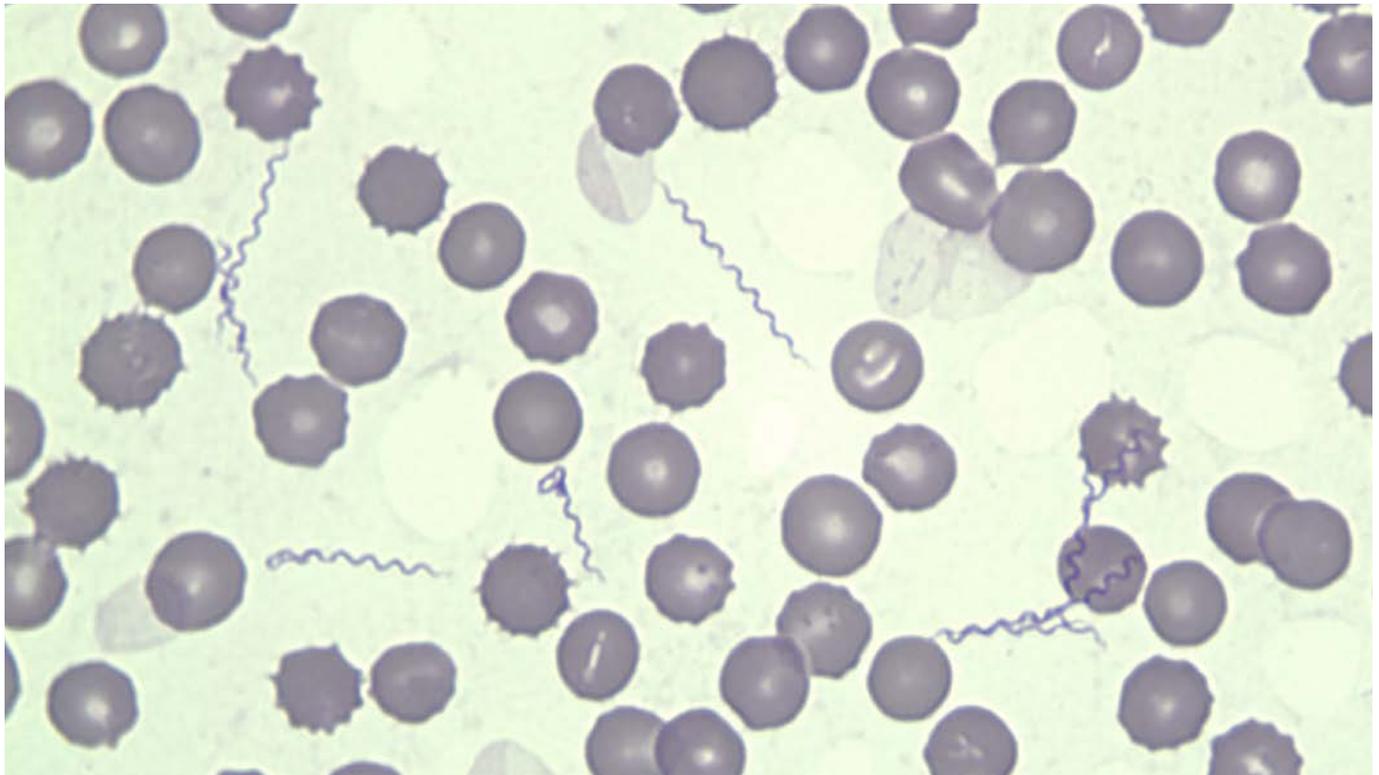


Abb. 1: *Borrelia hispanica* im gefärbten Blutausstrich eines Hundes in Spanien: Nur Rückfallfieber-Borrelien sind im Blut zu finden (1000 x).

nachgewiesen (aber oft in niedriger Kopienzahl zum Zeitpunkt des Nachweises) (u. a. Chou et al. 2006).

In der Human- und Veterinärmedizin setzt sich kontinuierlich der Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper mittels des C₆-Peptids durch (Liang et al. 1999a; Embers et al. 2007; Wagner et al. 2012), weil dieser Vorteile gegenüber anderen Methoden bietet. Das C₆-Peptid ist Teil des VlsE-Proteins von *B. burgdorferi* und ist konserviert innerhalb verschiedener Borrelien-Arten (Liang et al. 2000a). IR₆ („conserved“ Peptid = C₆) ist eine von sechs nicht variablen Regionen (IR₁-IR₆) innerhalb der zentralen variablen Domäne und präsentiert sich als das immun-dominanteste unter ihnen (Liang et al. 1999b; Embers et al. 2007). Die Vorteile C₆-basierter Tests gegenüber bisherigen Methoden (IgM/IgG-ELISA/IFAT) sind, dass das Antigen nicht mit Impfantikörpern (O'Connor et al. 2004; Goldstein et al. 2007) oder mit Antikörpern gegen andere Spirochäten wie etwa Leptospiren kreuzreagiert (Liang et al. 2000b). Spezifische C₆-Antikörper stellen zudem einen frühen und robusten Marker einer Infektion ab 21 bis 35 Tagen p.i. dar (Wagner et al. 2012) und persistieren für mindestens zwölf Monate in unbehandelten Hunden (Philip et al. 2001; Levy et al. 2008). Nach Behandlung fällt die C₆-Antikörperkonzentration innerhalb von drei bis sechs Monaten ab. Es wurde ein Abfall um mehr als 58,3 % nach sechs Monaten bei Tieren mit einer Ausgangskonzentration von mehr als 29 U/ml festgestellt (Levy et al. 2008), während die Werte von ganzzellbasierten Tests nicht in dem Maße sanken (Straubinger 2000; Straubinger et al. 2000; Philip et al. 2001). Die letzten zwei Punkte, Persistenz der Antikörper und Abfall nach Therapie, deuten darauf hin, dass C₆-Antikörper als ein Marker einer

aktiven Infektion angesehen und zur Therapiekontrolle herangezogen werden können, wie dies auch bei experimentell infizierten Affen gezeigt werden konnte (Philip et al. 2001; Embers et al. 2012).

Wie in Abb. 2 zu sehen, erscheint es wichtig, bei Borrelien-infizierten Tieren abzuklären, ob eine Proteinurie vorliegt. Angenommen wird eine mit Borrelien in Zusammenhang stehende Nierenerkrankung, die als „Lyme-assoziierte Proteinverlust-Nephropathie“ oder „Lyme-Nephritis“ (LN) bezeichnet wird (Dambach et al. 1997; Chou et al. 2006; Littman 2013). LN wird auch als Ausdruck einer rassebedingten, hereditären Glomerulopathie angesehen, bei der sich Borrelien-spezifische Immunkomplexe auf einer vorgeschädigten Basalmembran ablagern und so erst eine klinisch apparente Nierenerkrankung auslösen können (Littman 2013, 2015; Horney & Stojanovic 2013). Hunde mit einer C₆-spezifischen Antikörperkonzentration von über 30 U/ml weisen ein signifikant erhöhtes Risiko für Proteinurie (UPC > 0,5) auf (Tab. 1).

Hunde mit erhöhtem UPC in der Gruppe 3 (Tab. 1) waren zudem jünger (5,5 Jahre) als Hunde mit erhöhtem UPC in den Gruppen 1 und 2 (7,9 Jahre). Der UPC-Median betrug 6,5 in der Gruppe 3 versus 1,4 in den Gruppen 1 und 2. 21 von 35 Hunden in der Gruppe 3 hatten zudem Quant C₆-Werte über 100 U/ml. Eine aktuelle Untersuchung konnte auch einen Zusammenhang zwischen dem Quant C₆-Wert bei Hunden mit Verdacht auf Lyme-Borreliose und einer erhöhten SDMA-Konzentration im Serum bestätigen (Nather et al. 2016). Hunde mit einem Quant C₆-Wert über 100 U/ml wiesen in 55 % der Fälle eine erhöhte SDMA-Konzentration (>14 µg/dl) auf, wohingegen bei Quant C₆-Werten <30 und 30–100

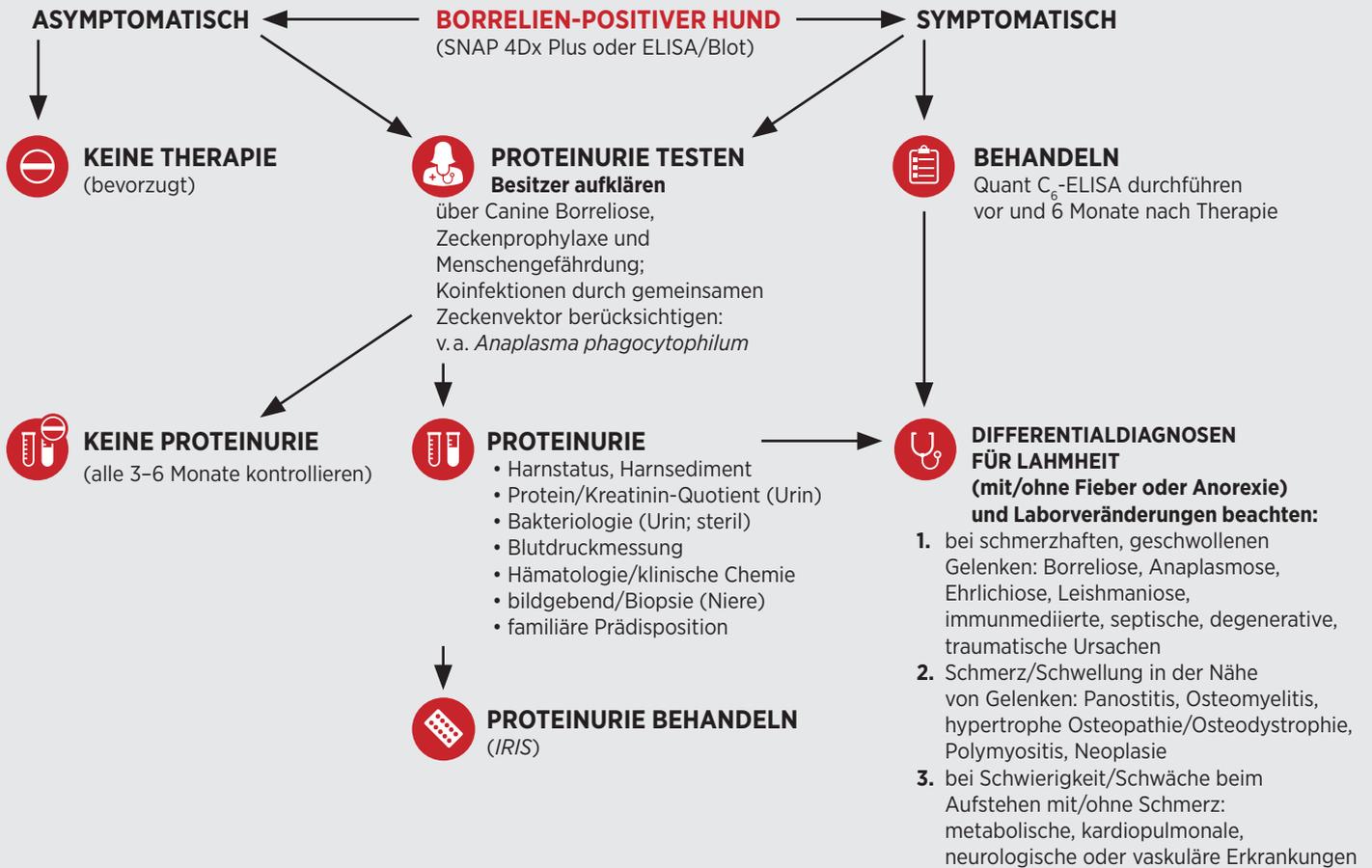


Abb. 2: Flussdiagramm für den Borrelien-Antikörper-positiven Hund.

der SDMA-Wert bei nur 22 % bzw. 26 % der Proben erhöht war (signifikanter Unterschied). Diese Daten deuten darauf hin, dass C₆-spezifische Antikörper und insbesondere eine Konzentration über 100 U/ml bei entsprechender Anamnese als Marker einer LN in Betracht kommen.

ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM

Die Kriterien für die Diagnose einer CAG (Canine Granulozytäre Anaplasrose) beinhalten Zeckenkontakt/Bluttransfusion mit klinischen Veränderungen oder Blutbildauffälligkeiten, positive PCR/Morulae in Neutrophilen oder einen vierfachen Antikörperanstieg innerhalb von vier Wochen (Kohn et al. 2008). Es scheint keine Rasseprädisposition vorzuliegen, evtl. aber eine Altersprädisposition. So waren in den USA 35,3 % der betroffenen Hunde zwischen acht und zehn Jahre, 58,8 % mindestens sechs Jahre und nur 11,7 % unter ein Jahr alt (Greig et al. 1996). In einer schwedischen Studie waren rund ein Drittel der Hunde über neun Jahre und kein Patient unter ein Jahr (Egenvall et al. 1997). Es besteht eine saisonale Häufung und zwar parallel zum Aufkommen von Zecken von April bis September (Kohn et al. 2008; Carrade et al. 2009).

Die charakteristischen Abweichungen in der Hämatologie/klinischen Chemie sowie die Möglichkeiten spezifischer Diagnostik werden anhand von drei Fallbeispielen in Tab. 2 dargestellt. Vielversprechend ist die Messung des C-reaktiven Proteins (CRP), das in der akuten Phase der Erkrankung bis zu zehnfach erhöht sein kann (Pantchev 2010a). Im Zuge einer experimentellen Infektion (mit verschiedenen Isolaten; i. v. mit autologen infizierten Neutrophilen, nicht mit Zecken) wurden die Hunde ab zwei Tage p. i. PCR-positiv (Blut), eine Serokonversion trat ab zehn bis 14 Tage p. i. im IFAT ein, Morulae in Blutaussstrichen waren zwischen Tag zehn und elf p. i. zu sehen (Scorpio et al. 2011). Dies macht deutlich, dass die Ergebnisse der diagnostischen Tests je nach Zeitpunkt p. i. variieren und daher ein gleichzeitiger Einsatz von Serologie und PCR die Wahrscheinlichkeit einer exakten Diagnose erhöht. Der quantitative ELISA als weiterführende Untersuchung im Labor erlaubt die Bestimmung der Antikörperkonzentration im Blut und deren zeitlicher Fluktuation. Die Titer steigen innerhalb von zwei bis drei Wochen nach dem Nachweis im Blutaussstrich an und können vier bis acht Monate nach dem ersten Bakteriennachweis im Ausstrich und unter Doxycyclinthherapie abfallen (Egenvall et

Gruppe	Quant C ₆ , Units/ml*	Konzentration	UPC >= 0,6**	% und 95% CI***
1	<10	negativ bis sehr niedrig	15/39	38,5; 23,3–55,4
2	10–30	niedrig	5/18	27,8; 9,7–53,6
3	>30	mittel bis hoch	35/46	76,1; 61,2–87,5

* **EINTEILUNG** nach Levy et al. 2008

** **CUT-OFF NACH GOLDSTEIN** et al. 2013 und www.iris-kidney.com; Methodik in Kürze: Kreatininbestimmung in mg/dl nach der Jaffe-Methode (kinetisch und photometrisch), Proteinbestimmung in mg/dl turbidimetrisch (bei 505 nm) nach Zugabe von Benzethoniumchlorid

*** **STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DES ERHÖHTEN UPC** in Bezug auf C₆-Konzentration (Chi-Quadrat-Test; p < 0,05)

Gruppe 1 versus 2: p = 0,432; nicht signifikant

Gruppe 1 versus 3: p = 0,0004; signifikant

Gruppe 2 versus 3: p = 0,0003; signifikant

Gruppen 1 und 2 (20/57; 35,1%, 95% CI: 22,9–48,9) versus 3 (35/46): p < 0,0001 signifikant

Tabelle 1: Korrelation der C₆-Antikörperkonzentration (Quant C₆-ELISA in U/ml) und Proteinurie (Protein-Kreatinin-Quotient/UPC im Urin) bei 103 parallel untersuchten Hundeproben (Serum und Urin) 2009–2013.

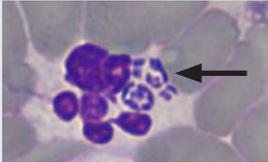
	 HUND AUS DEUTSCHLAND	 HUND AUS HOLLAND	 HUND AUS ÖSTERREICH
Alter	6 Jahre	10 Jahre	11 Jahre
Klinik	41,3–41,8 °C, perakute Erkrankung mit Bewegungsunlust, Lethargie, Anorexie, blasse Schleimhäute	40,9 °C, Lethargie, Vorderbauchschmerz	Lethargie, Anorexie, blasse Schleimhäute, starker Durchfall
LABOR			
CRP (0–9,7 mg/L)	↑ 48,8	↑ 57,0	↑ 63,8
Thrombozyten (150–500 G/l)	↓ 50	nicht auswertbar	↓ 118
Lymphozyten (1000–4000/μl)	↓ 656	↓ 748	↓ 284
Monozyten (0–500/μl)	↑ 1.031	↑ 534	↑ 663
Albumin (3,2–4,7 g/dl)	↓ 3,10	↓ 3,0	↓ 2,38
AP (<81 U/l)	↑ 436	→ 65	↑ 115
ALT (5–125 U/l)	→ 65,5	↑ 277	→ 50,4
Blutausstrich			
Real-Time PCR	positiv (C _t -Wert: 16)	positiv (C _t -Wert: 26)	positiv (C _t -Wert: 14)
Serologie (IFAT)	negativ (< 1:50)	1:100 (2 Wo. danach 1:3.200)	negativ (< 1:50)

Tabelle 2: Drei Anaplasmose-Fälle bei Hunden, die im Monat April in der Tierarztpraxis vorgestellt wurden.

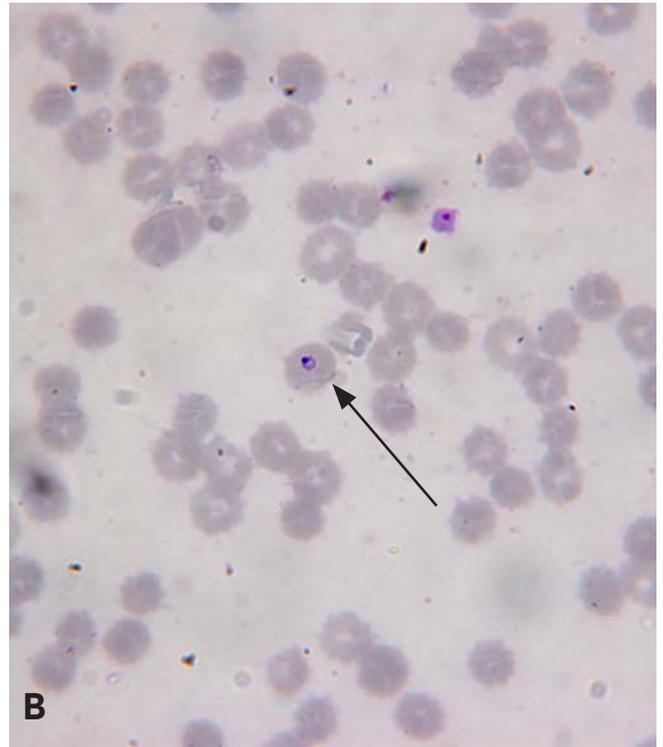
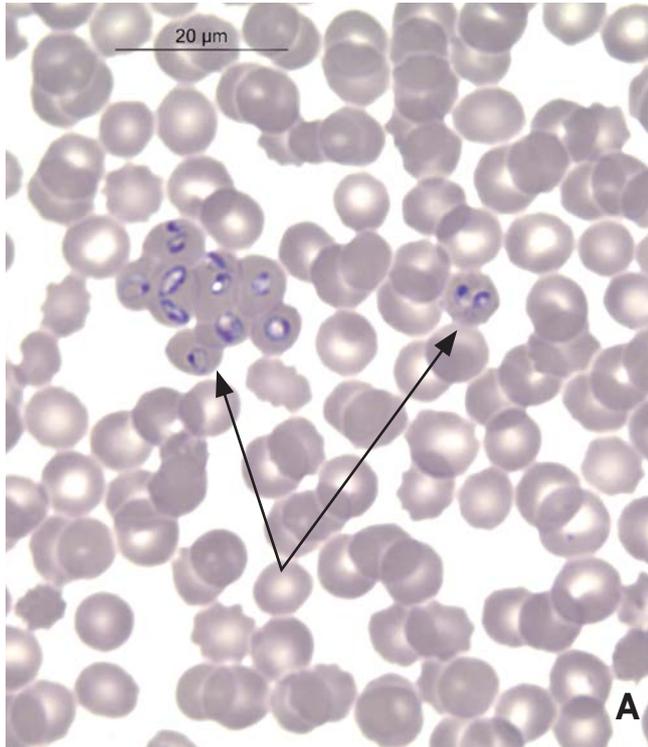


Abb. 3: A: *Babesia rossi* (Pfeile; im gefärbten Blutausstrich eines aus Südafrika importierten Hundes), B: atypische, kleinere und rundliche Form von *Babesia canis* (Pfeil).

al. 1997). Ganzzell-basierte Tests (qELISA/IFAT) weisen Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen *Ehrlichia canis* auf (Pantchev et al. 2015). Die Stärke der Kreuzreaktion solcher Sera verstärkt sich mit der Dauer der *E. canis*-Infektion und der Höhe des *E.-canis*-Titers (Harrus et al. 2012). Peptid-basierte serologische Tests wie der SNAP® 4Dx® Plus wiesen in epidemiologischen Studien keine Kreuzreaktionen zwischen den Gattungen *Anaplasma* und *Ehrlichia* auf (Pantchev et al. 2015). Die PCR für den direkten Erreger-DNA-Nachweis im Blut ist empfindlicher als der gefärbte Ausstrich. Experimentell infizierte Hunde werden dadurch sechs bis acht Tage früher positiv getestet, als der Nachweis von Morulae im peripheren Blut gelingt (Scorpio et al. 2011). Die PCR erlaubt auch die Differenzierung von *A. phagocytophilum* und *A. platys* (Letztere ist wichtig bei Hunden mit Auslandsanamnese; Dyachenko et al. 2012), die wiederum serologisch miteinander kreuzreagieren (Gaunt et al. 2010).

BABESIEN

Die Diagnostik der caninen Babesiose schließt Auslandsanamnese inklusive Zeckenbefall, Bluttransfusion oder anderer Übertragungsmöglichkeiten (s. Teil 1), klinische Erscheinungen und Laborveränderungen, den direkten Erregernachweis im gefärbten Blutausstrich und/oder PCR sowie den indirekten Erregernachweis mittels Serologie (qELISA, IFAT) ein (Pantchev 2012a). Typische Laborbefunde sind eine hämolytische Anämie (zunächst aregenerativ, normozytär und normochrom; später regenerativ, makrozytär und hypochrom), eine sekundäre immunhämolytische Anämie mit positivem Coombs-Test, Sphärozyten sowie oftmals eine Leukozytose mit Linksverschiebung,

Thrombozytopenie und Neutropenie. Weiterhin können eine Hämoglobinurie, Bilirubinurie, Bilirubinämie und Proteinurie (intravasale Hämolyse), ein Anstieg der Leberenzyme (AST, ALT; Hepatopathie) und Azotämie sowie eine lang anhaltende Hypoalbuminämie (Hepato- und Glomerulopathie) beobachtet werden (Ayoob et al. 2010; Birkenheuer 2012). Je nach Babesien-Art existieren auch Unterschiede. So werden in Fällen von *Theileria/Babesia annae* (syn. *Babesia microti*-like, *Babesia vulpes* sp. nov.) bei Hunden in Nordwestspanien häufig auch Eosinopenie und Hyperglobulinämie festgestellt (Miro et al. 2015). Eine schlechte Prognose bei der akuten Babesiose durch *B. canis* war mit mäßiger Anämie, schwerer Thrombozytopenie, milder bis mäßiger Leukopenie, Hyperlaktatämie, mäßiger Hyperphosphatämie, Triglyceridämie und Hypoproteinämie assoziiert (Eichenberger et al. 2015). Die Möglichkeiten spezifischer Diagnostik in der tierärztlichen Praxis während der akuten Phase sind beschränkt auf gefärbte Blutausstriche, die eine Unterscheidung zwischen großen (Abb. 3) und kleinen Babesien ermöglichen. Kapilläres Blut oder eine Buffy-Coat-Präparation eignen sich oft besser, weil befallene Erythrozyten in Kapillaren sequestrieren bzw. Babesien eher Retikulozyten befallen als reife Erythrozyten (Irwin 2009; Ayoob et al. 2010; Ogo et al. 2011). Diese Unterscheidung gelingt gut bis auf seltene Fälle atypischer *B.-canis*-Stadien, die mit kleinen, abgerundeten Formen überraschen können. Kleine und große Babesien sollten diagnostisch klar differenziert werden (z. B. mittels PCR, s. u.), denn die Therapie ist unterschiedlich. Weiterführende Untersuchungen in spezialisierten Laboren schließen die Serologie und PCR ein. Spezifische Antikörper konnten bei experimentell



Zeckenprophylaxe: Häufigste Ursache für „fehlende“ Wirkung ist eine fehlerhafte Anwendung.

infizierten Hunden (mit *D. reticulatus* und *B. canis*) ab Tag 14 p. i. nachgewiesen werden (Jongejan et al. 2011). Nach einer experimentellen parenteralen Infektion mit *B. vogeli* bei Hunden wurden steigende Titer 14 bis 21 Tage p. i. und Höchstititer (1:1.280 bis 1:5.120) 48 bis 55 Tage p. i. gesehen; sie fielen leicht ab bis Tag 160 (etwa um zwei Titer-Stufen) auf 1:640 bis 1:1.280 (Brandao et al. 2003). Die serologischen Ergebnisse der behandelten Gruppe (Imidocarb; sieben mg/kg; an den Tagen 15 und 27 p. i.) waren in dieser Studie signifikant unterschiedlich, in dem die Titer niedriger waren und schneller abfielen (ab dem Tag 34 p. i.). Eine (kapilläre) Parasitämie war bis 41 Tage p. i. (in dieser Phase intermittierend) zu beobachten (Brandao et al. 2003). Der Zeitpunkt des Verschwindens der Babesien aus dem Blut korrelierte in dieser Studie in etwa mit dem Erreichen der Höchstititer. Die Limitierungen der Serologie liegen in Kreuzreaktionen (v. a. unter verschiedenen Babesien-Arten) und falsch-negativen Befunden bei jungen oder immun supprimierten Hunden oder früh in der Infektion, bevor eine Serokonversion eingetreten ist (Ayooob et al. 2010). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Babesien-Diagnostik beim Hund ist daher die PCR. Die einmalige mikroskopische Blutaussstrich-Untersuchung hatte im Vergleich zur PCR als angesehenem „Goldstandard“ eine relative Sensitivität von nur 38 % und eine relative Spezifität von mehr als 99 % (Globokar Vrhovec 2013). Ein zusätzlicher Vorteil der PCR ist, dass im Anschluss an einen positiven Babesien-PCR-Befund eine Differenzierung der Babesien-Art etwa mittels artspezifischer Real-time-PCRs vorgenommen werden kann (Dyachenko et al. 2012), was bei der Auswahl des richtigen Wirkstoffs von entscheidender Bedeutung ist. 📍

LITERATUR

Zitierungen in Klammern repräsentieren eine Auswahl; vollständige Literaturliste kann dem Originalartikel entnommen werden; folgende Artikel wurden ergänzt:

- Eichenberger RM, Riond B, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P (2015):** Prognostic Markers in Acute *Babesia canis* Infections. J Vet Intern Med. DOI: 10.1111/jvim.13822
- Littman MP (2015).** Emerging perspectives on hereditary glomerulopathies in canines. Advances in Genomics and Genetics 2015: 5 179–188
- Miró G, Checa R, Papparini A, Ortega N, González-Fraga JL, Gofton A, Bartolomé A, Montoya A, Gálvez R, Mayo PP, Irwin P (2015):** *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. Parasit Vectors. 10;8: 217
- Nather S, Globokar Vrhovec M, Frisch T, Huisinga E, Pantchev N (2016):** Frühe Marker für Lyme-Nephritis beim Hund: Korreliert die quantitative Serologie mit SDMA? 24. Jahrestagung der FG Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der DVG (InnLab) 29./30. Januar 2016 in Berlin. Abstrakt in der Tierärztl. Praxis Kleintiere 1/2016, 12–13 pp.
- Pantchev N, Schnyder M, Vrhovec MG, Schaper R, Tsachev I (2015):** Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. Parasitol Res. 114 Suppl 1: S. 117–30
- Philipp MT, Bowers LC, Fawcett PT, Jacobs MB, Liang FT, Marques AR, Mitchell PD, Purcell JE, Ratterree MS, Straubinger RK (2001):** Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. J Infect Dis. 184(7): 870-8.

KORRESPONDIERENDER AUTOR:

Dr. med. vet. Nikola Pantchev, FTA für Parasitologie
nikola-pantchev@idexx.com

ABGECÜRZTE ÜBERSETZUNG DER FOLGENDEN ORIGINALARBEIT:

Pantchev N, Pluta S, Huisinga E, Nather S, Scheufelen M, Globokar Vrhovec M, Schweinitz A, Hampel H, Straubinger RK (2015): Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis. Parasitol Res. 114 Suppl 1: S. 19–54

Der Originalartikel ist frei zugänglich unter dem Link:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-015-4513-0>