



Rheinland-Pfalz  
LANDESUNTERSUCHUNGSAMT

# Zur Diagnostik der Equinen Infektiösen Anämie

**Karl Zimmer**

**Landesuntersuchungsamt  
Institut für Tierseuchendiagnostik**

**Erfahrungsaustausch Tierseuchen, Tierschutz und  
tierische Nebenprodukte**

**Koblenz, 08.11.2012**



# Equine Infektiöse Anämie

---

- Besonderheiten
  - Retrovirus-Infektion
    - Genom als provirale DNA in Körperzellen integriert
  - Antigen-Drift – Quasispezies
- permanente Immunreaktionen
  - lebenslange Antikörper-Persistenz ohne Eliminierung des Virus
- lebenslange Virus-Persistenz
  - Monozyten / (Gewebe-) Makrophagen als Zielzellen
- Antikörperträger sind auch Virusträger
  - Der Antikörpernachweis ist für die Feststellung der EIA ausreichend.

# Virus der Equinen Infektiösen Anämie

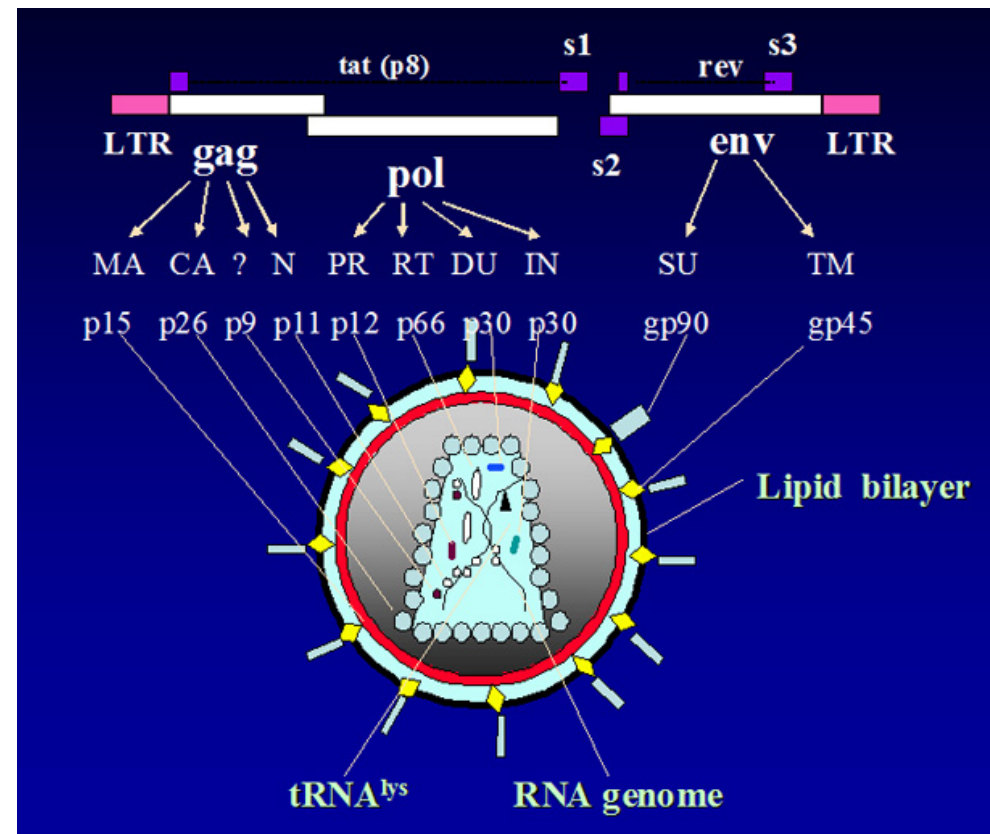
## ■ Aufbau 1

### • Genom

ss (+) RNA, linear, diploid

### 3 Segmente

- gag (gruppenspezif. Antigen)
  - (relativ) genetisch konserviert
  - kodiert für Kapsidproteine
- pol (Polymerase)
  - kodiert für Enzyme
- env (envelope)
  - hohe genetische Varianz
  - kodiert für Hüllproteine



Struktur und Aufbau des EIA-Virus

Quelle: Maxwell Gluck Equine Research Center,  
University of Kentucky, Lexington

# Virus der Equinen Infektiösen Anämie

## ■ Aufbau 2

### • Kapsid

Kapsidprotein p26

Matrixprotein p15

### ➤ Antigen-Stabilität

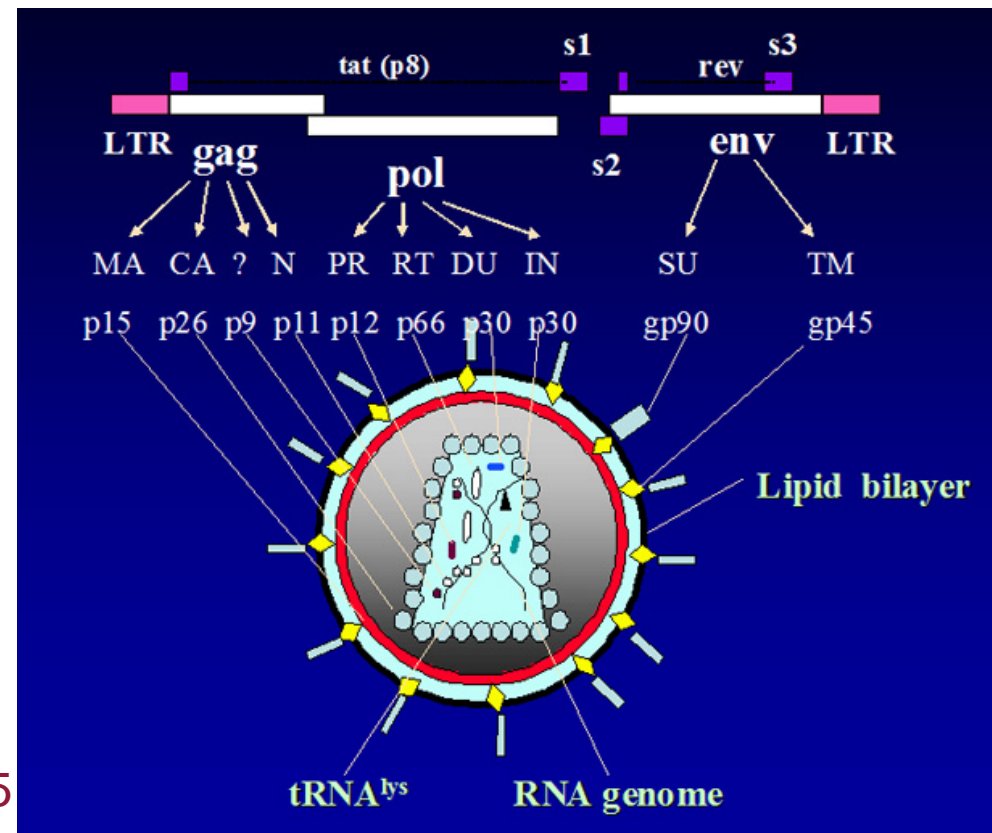
### • Hülle

Doppel-Lipidmembran

Transmembran-Glykoprot. gp45

äußeres Glykoprotein gp90

### ➤ Antigen-drift, Quasi-Spezies



Struktur und Aufbau des EIA-Virus

Quelle: Maxwell Gluck Equine Research Center,  
University of Kentucky, Lexington

# Equine Infektiöse Anämie

---

- Diagnostik 1

- Klinik

perakute, akute, chronische, subklinische Verlaufsform

Krankheitsschübe mit rekurrierenden Fieberanfällen, Konditionsverlust

Apathie, Ataxie, Ikterus, Ödeme, Petechien, (Anämie), vereinzelt Todesfälle

➤ (30 -) 90 % klinisch inapparente Carrier

- Hämatologie

Sideroleukozyten-Nachweis mittels Kaliumhexacyanidoferrat(II)-Färbung

- Pathologie

Ikterus, Ödeme, Petechien, Spleno-/Hepatomegalie, (Anämie)

# Equine Infektiöse Anämie

- Blutungen, Maulschleimhaut, Pferd



Foto: LUA

# Equine Infektiöse Anämie

- petechiale Blutungen, Maulschleimhaut, Pferd

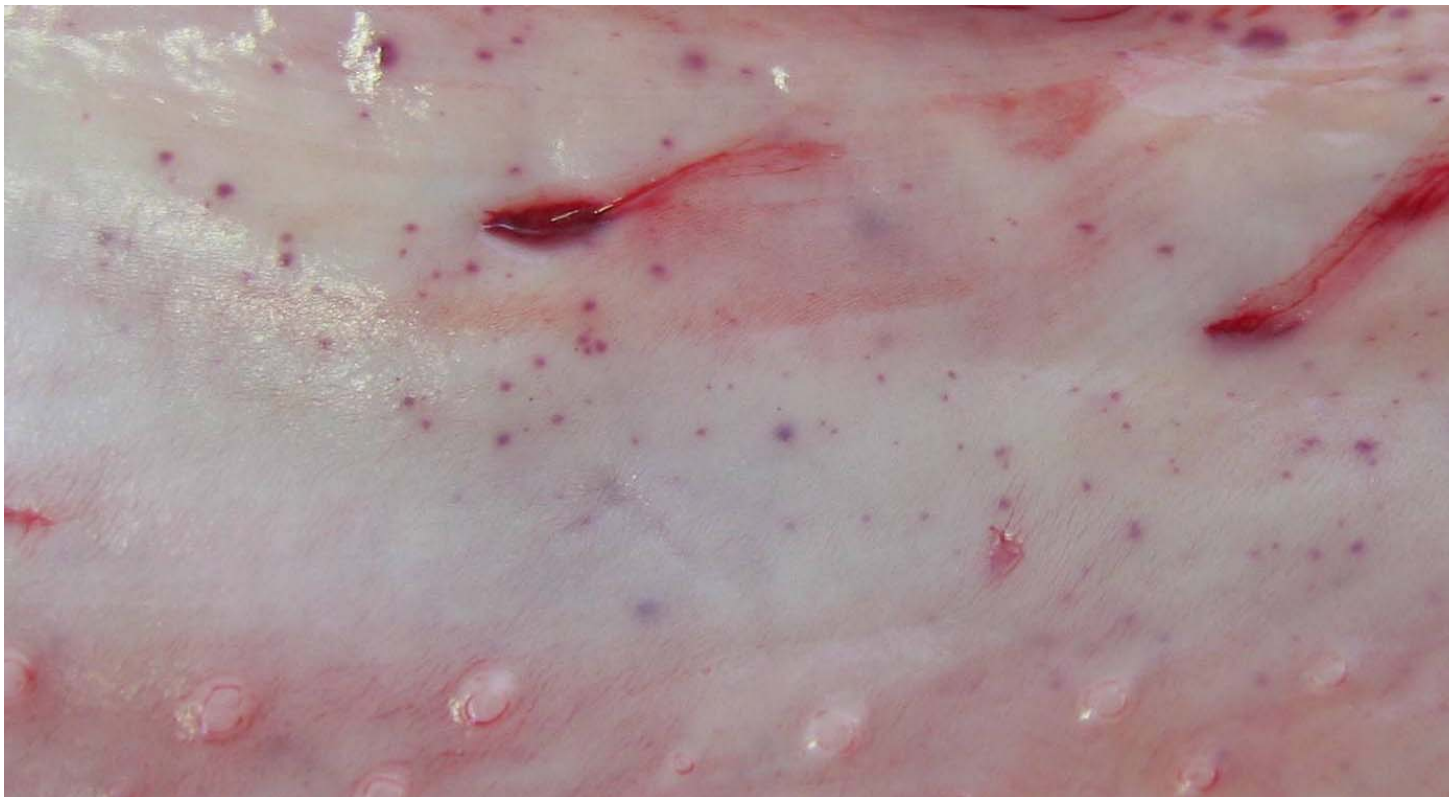


Foto: LUA



# Equine Infektiöse Anämie

---

- Diagnostik 2
  - Serologie
    - Antikörpernachweis mittels ELISA, AGID (Coggins-Test)
  - Molekularbiologie
    - Genomnachweis mittels konventioneller RT n PCR
  - Virologie
    - Virusnachweis mittels Zellkultur, Tierversuch (Pferd)





# Equine Infektiöse Anämie

---

- Antikörper nach Infektion
- Auftreten
  - 14 - 21 (12 - 24) d p.i.
  - „in seltenen Fällen“ erst nach mehr als 60 (45 - 90) d p.i.
- Persistenz
  - lebenslang



# Equine Infektiöse Anämie

---

- maternale Antikörper
  - Auftreten
    - unmittelbar nach Aufnahme Antikörper-haltiger Kolostralmilch
  - Persistenz
    - 6 (- 8) Monate
- Für die Beurteilung von serologischen Untersuchungsergebnissen bei Fohlen ist die Kenntnis des Status der Mutterstute erforderlich.

# Equine Infektiöse Anämie

---

- Differenzierung zwischen maternalen und infektionsbedingten Antikörpern  
Genom- / Virus-Nachweis  
wiederholte serologische Untersuchungen in 4-wöchigem Abstand
- Zur Feststellung, dass es sich um maternale Antikörper gehandelt hat, müssen Fohlen nach der Trennung von der Mutterstute und den anderen EIA-positiven Tieren und dem ersten negativen serologischen Untersuchungsergebnis mindestens 2 Monate lang Antikörper-negativ sein.



# Equine Infektiöse Anämie

---

- Nachweis von Antikörpern gegen EIA-V im ELISA
  - direkter ELISA
    - rekombinantes Kapsidprotein p26 als Antigen
    - IgM- (und IgG-) Antikörper
  - Matrix
    - Serum, Plasma
  - Einsatz
    - diagnostische Untersuchungen ohne konkreten Seuchenverdacht
    - Ansteckungsverdacht
    - Routineuntersuchungen
    - Handelsuntersuchungen



# Equine Infektiöse Anämie

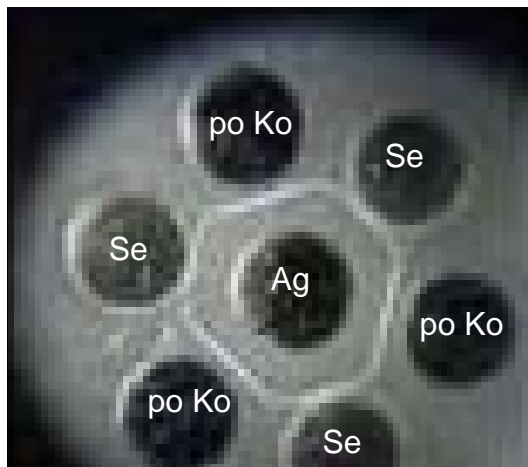
---

- Nachweis von Antikörpern im ELISA
- Vorteile
  - hohe Sensitivität (bis 100 %)
  - „früh im Verlauf des Infektionsgeschehens“ und „bei niedrigen Titern“
- Nachteile
  - „vereinzelt“ falsch positive Reaktionen
    - Impfung gegen andere Erkrankungen kurz vor der Probenentnahme
- Eine positive Reaktion im ELISA muss im Coggins-Test bestätigt werden.

# Coggins-Test

- Prinzip

Nachweis präzipitierender Antikörper im  
Agargel-Immundiffusionstest (AGID)



Leroy Coggins

Quelle: Center for Veterinary Health Sciences,  
Oklahoma State University, Stillwater

## Coggins-Test

Präzipitationslinie zwischen EIA-Antigen und EIA-Antikörper-positivem Kontrollserum  
in Kontinuität mit der Präzipitationslinie zwischen EIA-Antigen und zu testendem Serum

Quelle: Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, Stillwater

# Equine Infektiöse Anämie

---

- Nachweis von Antikörpern im Coggins-Test
- AGID
  - rekombinantes Kapsidprotein p26 als Antigen
  - präzipitierende Antikörper
- Matrix
  - Serum, Plasma
- Einsatz
  - diagnostische Untersuchungen bei konkretem Seuchenverdacht
  - Bestätigungsuntersuchung positiver ELISA-Ergebnisse
  - spezielle Handelsuntersuchungen



# Equine Infektiöse Anämie

---

- Nachweis von Antikörpern im Coggins-Test
- Vorteile
  - hohe Spezifität
- Nachteile
  - niedrige Sensitivität (90 – 98 %)
  - längere Dauer (24 - 48 h)
  - Art der Reaktion variiert in Abhängigkeit vom Antikörpertiter
- Der Coggins-Test ist der Goldstandard zum Nachweis (von Antikörpern gegen das Virus) der Equinen Infektiösen Anämie





# Equine Infektiöse Anämie

---

- Nachweis von Antikörpern
- nicht möglich
  - „(sehr) selten“
  - Frühphase der Infektion (12 – 90 d)
  - Immunschwäche
  - vollständige Bindung durch hohe Virustiter
- nur schwer möglich
  - über längere Zeit asymptomatische Carrier
  - begrenzte Virusreplikation infolge Teil-Immunität
  - maternale Antikörper



# Equine Infektiöse Anämie

---

- Nachweis von EIA-Virusgenom in der PCR
  - konventionelle RT n PCR  
Genomabschnitt im gag-Segment als Target  
virale RNA und provirale DNA
- Matrix  
Serum, Plasma, Vollblut, Organe



# Equine Infektiöse Anämie

---

- Nachweis von EIA-Virusgenom in der PCR
  - möglicher Einsatz
    - Untersuchung verendeter Tiere
    - Verifizierung serologischer Untersuchungsergebnisse
    - Nachweis einer bestehenden Infektion in der Frühphase des Geschehens
    - Untersuchung des Status eines Antikörper-positiven Fohlens
    - Bestätigung der Virusfreiheit von Plasma-Spendertieren und Tieren, die zur Serum- bzw. Impfstoffproduktion verwendet werden
    - in Verbindung mit Sequenzanalysen zur Typisierung des Virus
  - Der molekularbiologische Nachweis von EIA-Virusgenom ist für die Feststellung der EIA ausreichend, aber nicht erforderlich.



# Equine Infektiöse Anämie

---

- Nachweis von EIA-Virusgenom in der PCR
- Vorteile
  - hohe Sensitivität
  - hohe Spezifität
- Nachteile
  - falsch-negative Ergebnisse möglich
    - Virustiter unter der Sensitivitätsschwelle  
(insbesondere bei klinisch inapparenten Carriern)
    - nicht alle zirkulierenden EIA-V-Stämme werden von den zur Verfügung stehenden Primern erfasst  
(Variationen im gag-Gen)



# Equine Infektiöse Anämie

## ■ Nachweise 2012

Datum	Kreis	Bestand	Name	ELISA	AGID	PCR <sup>1</sup>	Bemerkung
15.08.12	SU	0	Cazimir	pos	pos	pos	Sequenzierung im gag-Gen
24.07.12	AK	1	Berti	pos	pos	pos	100 % homolog mit 0 <sup>1</sup> )
15.08.12	DAU	2	Nagur	pos	pos	pos	100 % homolog mit 0 <sup>1</sup> )
17.08.12	DAU	2	Oskar	pos	pos	pos	100 % homolog mit 0 <sup>1</sup> )
20.08.12	DAU	3	Rhimfafa	pos	pos	pos	99 % homolog mit 0 <sup>1</sup> )
21.09.12	COC	4	Dark Auke	pos	pos	pos	87 % homolog mit 0 <sup>1</sup> ) eigenständiges Geschehen
24.09.12	DAU	2	Svatie	pos	pos	pos	100 % homolog mit 0 <sup>1</sup> )
28.09.12	DAU	2	Fani	pos	pos	neg	
28.09.12	DAU	3	Glitta	pos	pos	pos	100 % homolog mit 0 <sup>1</sup> )
21.10.12	DAU	2	Dagur	pos	pos	->	
21.10.12	DAU	2	Blesa	pos	pos	->	
21.10.12	DAU	3	Hera	pos	pos	->	

- zwei unabhängige Infektionsgeschehen in drei Kreisen (AK - DAU / COC) 1) Untersuchungen im FLI  
in vier Beständen (1 - 2 / 1) bei 11 Tieren



# Equine Infektiöse Anämie

- Verlaufsuntersuchungen bei Tieren mit Nachweis von EIA 2012

Name	17.08.			28.09.			21./23.10.			29.10.		
	ELISA	AGID	PCR <sup>1)</sup>	ELISA	AGID	PCR <sup>1)</sup>	ELISA	AGID	PCR <sup>1)</sup>	ELISA	AGID	PCR <sup>1)</sup>
Dagur	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	pos	pos
Blesa	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos
Hera	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos

1) retrospektive Untersuchung im LUA

# Zur Diagnostik der Equinen Infektiösen Anämie

---

- Zusammenfassung
- Retrovirusinfektion, provirale DNA, Quasi-Spezies
- lebenslange Virus-Persistenz
- asymptomatische Carrier
- lebenslange Antikörper-Persistenz
- Antikörpernachweis ist ausreichend für die Feststellung
- ELISA und Coggins-Test sind geeignet für den Antikörper-Nachweis
- Genom-Nachweis ist mittels PCR möglich und ausreichend für die Feststellung
- alle Nachweisverfahren haben Vor- und Nachteile
- Untersuchungen zur Homologie des Genoms der EIA-Viren ermöglichen Aussagen zur Epidemiologie eines Seuchenzugs



# Danksagung

an

- Sektionshelfer
- technische Kräfte
- Tierärzte/Innen
- Verwaltungsmitarbeiter/Innen

des Landesuntersuchungsamts, Institut für Tierseuchendiagnostik  
für die Durchführung der Untersuchungen

- Sie

für Ihre Aufmerksamkeit!