

Diagnostik viral bedingter Atemwegserkrankungen beim Rind

A. Iglseder^{1,2}, S. Franz², V. Benetka¹, K. Möstl¹, M. Latif¹, K. Walk¹, W. Baumgartner²

¹Klinische Virologie, Department für Pathobiologie und ²Klinik für Wiederkäuer, Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien

Zusammenfassung

Die Enzootische Bronchopneumonie des Rindes ist eine multifaktorielle Infektionskrankheit mit maßgeblicher Beteiligung viraler Erreger. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die endoskopisch durchgeführte Bronchoalveolarlavage (BAL) von kaudalen Anteilen des Lobus cranialis dexter zur Gewinnung von BAL-Flüssigkeit (BALF) eignet und inwieweit die gewonnene BALF die Diagnose viraler Erreger (Bovines Respiratorisches Syncytialvirus, BRSV; Bovines Parainfluenzavirus Typ 3, BPIV-3; Bovines Coronavirus, BCoV) mittels RT-PCR erleichtert. Von 44 erkrankten Rindern wurden Nasentupferproben und Trachealabstriche entnommen sowie eine BAL durchgeführt. BRSV war bei 6/7 positiven Tieren in der BALF nachweisbar, jedoch nur bei 4/7 Tieren auch im Nasentupfer. Der BPIV-3-Nachweis fiel in 2/3 Fällen nur in der BALF positiv aus. BCoV war bei 15 Tieren und am häufigsten in den Nasentupfern zu finden. Die BAL war gut durchführbar, verursachte lediglich bei einem Tier hochgradigen Husten und bei 3 Tieren eine mittelgradige Verschlechterung der Dyspnoe. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die BAL eine dem Nasentupfer überlegene Methode darstellt, um BRSV und BPIV-3 im Respirationstrakt von Rindern nachzuweisen.

Schlüsselwörter: BAL, Enzootische Bronchopneumonie, BRSV, BCoV, BPIV-3

Diagnosis of bovine viral respiratory diseases

Enzootic bronchopneumonia (EBP) is an infectious, multifactorial respiratory disease of cattle. Different viruses may be involved in its pathogenesis. In this study an adapted method of endoscopic bronchoalveolar lavage (BAL) of caudal parts of the right cranial lung lobe was established and evaluated. The obtained bronchoalveolar lavage fluid (BALF) served as template for the detection of BRSV, BPIV-3 and BCoV specific nucleic acids by RT-PCR. BALF samples of 44 cattle affected with respiratory disease were compared to nasal swabs in their reliability to detect the causative agent(s). In 6/7 animals tested positive for BRSV, RNA of this virus was detected in the BALF, in 4 animals it could be found in the nasal swabs. In two of the three BPIV-3 positive animals, the BALF was the only material that tested positive. The most reliable samples for detection of 15 BCoV positive animals were the nasal swabs. BAL was easy to perform, it led to severe coughing in one case and moderate worsening of dyspnoe in three cases. In conclusion this study shows that BAL of the right cranial lung lobe is in many cases the only tool to detect BRSV and BPIV-3, major viral triggers of EBP.

Keywords: BAL, enzootic bronchopneumonia, BRSV, BCoV, BPIV-3

Einleitung

Die Bronchoalveolarlavage (BAL) ist eine diagnostische Maßnahme zur Untersuchung des Respirationstraktes, bei der mittels Spülung von Bronchien, Bronchiolen und Alveolen, anschließender Rückgewinnung dieser Spülflüs-

sigkeit (Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit, BALF) sowie folgender zytologischer, biochemischer und/oder mikrobiologischer Untersuchung, eine diagnostische Aussage über den Zustand der Lungen getroffen werden kann. Die BAL ist ein seit Ende der 70er Jahre beim Menschen routinemäßig durchgeführtes diagnostisches Verfahren,

442 Originalarbeiten

welches in den letzten Jahren auch in der Veterinärmedizin zunehmend an Bedeutung gewonnen hat (Reynolds und Newball, 1974; Pohunek et al., 1996). Während die BAL bei Hund, Katze und Pferd und teilweise auch beim Schwein als Standardverfahren zur Abklärung chronisch rezidivierender oder unklarer Erkrankungen des unteren Respirationstraktes gilt, wird sie in der Rindermedizin nur sehr selten durchgeführt. Dagegen ist die Entnahme und Untersuchung von Nasentupferproben die gängige Methode zur bakteriologischen, aber auch zur virologischen Diagnostik, die aber häufig nicht zu einem zufrieden stellenden Ergebnis führt. Vor allem im Hinblick auf die multifaktorielle Enzootische Bronchopneumonie (EBP) des Rindes eröffnet BAL besondere diagnostische Möglichkeiten. Da Lungenerkrankungen beim Rind häufig auf kraniale Lungenbereiche beschränkt bleiben (Reinhold, 2001), bietet sich hier besonders eine segmentale Spülung von Bereichen des Lobus cranialis dexter an, welcher über den Bronchus trachealis mit Luft versorgt wird und in welchen ein Endoskop nur unter Sichtkontrolle eingeführt werden kann.

Diese Arbeit beschreibt und evaluiert die praktische Durchführbarkeit einer BAL bei Kälbern und Rindern im Bereich der Pars caudalis des Lobus cranialis dexter. Die Nachweisbarkeit der viralen Atemwegserreger Bovines Respiratorisches Syncytialvirus (BRSV), Bovines Parainfluenza Virus 3 (BPIV-3) sowie Bovines Coronavirus mittels RT-PCR aus der BALF wird untersucht und mit der aus gängigerweise bei respiratorischen Erkrankungen untersuchten Nasentupferproben verglichen.

Tiere, Material und Methoden

Tiere

In diese Studie wurden 45 Rinder aufgrund einer bestehenden, klinisch diagnostizierten respiratorischen Erkrankung aufgenommen. Darunter waren 33 Kälber (jünger als 6 Monate), 5 Jungtiere (zwischen 6 Monaten und 1.5 Jahren) und 7 adulte Rinder. Für die durchgeführten Untersuchungen lag eine Tierversuchsgenehmigung vor (GZ 68.205/66-BrGT/2005).

Material für BAL

Es wurden je nach Tiergröße zwei verschiedene flexible Endoskope der Firma Karl STORZ (Tuttlingen, Deutschland) verwendet. Zur Darstellung der vor der Endoskopspitze liegenden Strukturen wurde ein Endoskopiegerät mit integriertem Monitor und Lichtquelle (Fa. Karl Storz MEDI PACK mit Telecam Kamerakopf) verwendet. Für die Untersuchungen wurden ein Fieberthermometer, ein Stethoskop (Littman Cardiology III), ein Paar autoklavierter Spezial-Nasentupfer (Fa. Richter, Lobendorf, Österreich) mit 30 cm langem Metallstiel, eine Zytologiebürste (Fa. Karl Storz, Wien, Österreich), welche in einen

Tabelle 1: Menge und Fraktionierung der Spülflüssigkeit in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Alter	Gesamtmenge NaCl (ml)	60 ml Spritzen	20 ml Spritzen
3–6 Wo	60	–	3
> 6 Wo–3 Mo	120	1	3
> 3–9 Mo	180	3	–
> 9 Mo	240	4	–

Wo: Wochen, Mo: Monate

passenden Kunststoffkatheter eingefädelt und anschließend autoklaviert wurde, einen autoklavierbaren Kunststoffkatheter, 60 ml und 20 ml Einwegspritzen sowie Einmal-Injektionskanülen benötigt. Außerdem waren zwei sterile Kombizangen und eine sterile Schere erforderlich. Zur BAL wurde auf 37 °C erwärmte NaCl-Lösung vorbereitet. Menge und Portionierung der Spülflüssigkeit sind in Tabelle 1 dargestellt.

Probenentnahme

Nasentupfer

Die Tiere wurden zunächst klinisch untersucht und anschließend mit 0.05 mg/kg Körpermasse Xylazin (Xylasol®, aniMedica, Deutschland) sediert. Nach trockener Reinigung der Nasenlöcher wurden die Nasentupfer so tief wie widerstandslos möglich in den rechten respektive linken ventralen Nasengang eingeführt, einige Sekunden lang gedreht, hin und her bewegt und anschließend entfernt.

Endoskopie, Trachealabstrich und BAL

Zu Beginn wurde NaCl durch den Arbeitskanal gespült und diese als Vorspülprobe aufgefangen, welche später als negative Kontrolle diente. Anschließend wurde die Zytologiebürste in den Arbeitskanal vorgeschoben, ohne jedoch am Endoskopende auszutreten, und das Endoskop in ein Nasenloch des Tieres eingeführt und zügig bis in die Trachea vorgeschoben. Nach Erreichen des Bronchus trachealis wurde der Kunststoffkatheter und in Folge auch die Zytologiebürste selbst vorgeschoben und unter Sicht ein Trachealabstrich der dem Abgang des Bronchus trachealis gegenüberliegenden Schleimhautstelle durchgeführt. Nach Entfernen der Zytologiebürste wurde der Kunststoffspülkatheter in den Arbeitskanal eingeführt, so dass er nicht ganz bis zur Endoskopspitze reichte. Das Endoskop wurde mit etwas Geschick in den Bronchus trachealis gelenkt, von dem man in den Segmentbronchus gelangt, der das kaudale Segment des Lobus cranialis dexter belüftet. War ein weiteres Voranschleichen des Endoskops nicht mehr möglich war («wedge position»), wurde mit der BAL be-

gonnen. Von einer Assistenzperson wurde nun der Spülschlauch bis zum unteren Endoskopende vorgeschoben und die vorbereitete, aufgewärmte Spülflüssigkeit für die BAL Spritze injiziert und gleich wieder aspiriert.

Reaktionen des Tieres während und nach der BAL, wie Husten sowie Heftigkeit allfälliger Abwehrbewegungen, wurden dokumentiert. Zehn Minuten nach Beendigung der Endoskopie wurden die Atemfrequenz sowie das Auftreten, bzw. die Verstärkung einer vorhandenen Dyspnoe ermittelt. Die BALF wurde in einem sterilen Gefäß gepoolt. Der Transport aller Proben erfolgte in einer Kühlbox, im Anschluss wurden die Proben bis zu deren Aufarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

Nachweis viraler Nukleinsäuren

Nach dem Auftauen wurde aus der Probe virale RNA mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (QIAamp® viral RNA Kit, Qiagen, Deutschland) nach den Instruktionen des Herstellers extrahiert. Das Reaktionsgemisch für die RT-PCR wurde entsprechend der Vorschrift eines kommerziell erhältlichen Kits (QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit Qiagen, Deutschland) hergestellt. Für den Nachweis von BRSV und BPIV-3 wurden Primer unter Verwendung entsprechender Software entworfen (Primer Designer, Version 4.10, Scientific and Educational Software; Primersequenzen BRSV: 5'-ACACCCCTGTTGGAAACTACA-3' forward und 5'-TCACAATACCCACCGATCTG-3' re-

verse; BPIV-3: 5'-ACATCAGAGACAGGCTGAAC-3' forward und 5'-GAGTCGGTGCTGAGTATGAA-3' reverse). Die Primersequenzen zur Amplifikation von BCoV wurden von Tsunemitsu et al. (1999) publiziert. Die Temperaturschemata bestanden aus zwei Vorbereitungsschritten mit $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min und $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min gefolgt von 45 Zyklen mit $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für jeweils 30 sek sowie einem finalen PCR-Schritt von $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min.

Ergebnisse

Das Einführen des Endoskops in den Bronchus trachealis erforderte etwas Übung, gelang aber in 44 Fällen problemlos. Ein Rind leistete schon beim Einführen des Endoskops so massiven Widerstand, dass die Untersuchung abgebrochen werden musste. Die Lavage selbst war bei 43 Tieren gut durchführbar, lediglich in einem Fall konnten wegen eines arbeitstechnischen Zwischenfalls nur 3 von instillierten 240 ml Spülflüssigkeit aspiriert werden, bevor das Endoskop entfernt werden musste. Während der BAL war bei 24 Tieren (54.5%) geringgradiger, bei 13 Tieren (29.5%) mittelgradiger und bei einem Tier (2.3%) hochgradiger Husten feststellbar. Die übrigen 6 Tiere (13.6%) zeigten während der Spülung keinen Husten. Von 44 Rindern wiesen 17 (38.6%) kein, 18 (40.9%) geringgradiges, 6 (13.6%) mittelgradiges und 3 Tiere (6.8%) hochgradiges Abwehrverhalten auf. Anschlie-

Tabelle 2: Nachweis von BCoV-spezifischer Nukleinsäure aus verschiedenen Abschnitten des Respirationstraktes von 44 Rindern.

BAL Nr.	Nasentupfer rechts	Nasentupfer links	Tracheal-abstrich	BALF	Anzahl pos. Proben
1	+	+	+	+	4
11	+	+	+	+	4
26	+	+	+	+	4
29	+	+	+	+	4
35	+	+	+	+	4
41	+	+	+	+	4
25	+	+	+	-	3
30	+	-	+	+	3
42	+	+	-	+	3
4	+	+	-	-	2
12	+	+	-	-	2
27	+	+	-	-	2
39	+	+	-	-	2
43	+	+	-	-	2
57	-	-	+	-	1
ges	14	13	9	8	44

444 Originalarbeiten

Tabelle 3: Nachweis von BRSV-spezifischer Nukleinsäure aus verschiedenen Abschnitten des Respirationstraktes von 44 Rindern.

BAL Nr.	Nasentupfer rechts	Nasentupfer links	Tracheal-abstrich	BALF	Anzahl pos. Proben
23	+	+	+	+	4
25	+	+	+	+	4
24	+	-	+	+	3
26	-	-	+	+	2
29	-	-	+	+	2
35	-	-	+	+	2
42	+	-	+	-	2
32	-	-	-	fraglich	1 x fraglich
56	-	fraglich	-	-	1 x fraglich
gesamt	4	2 x / 1 x fraglich	7	6 x / 1 x fraglich	19 x / 2 x fraglich

Tabelle 4: Nachweis von BPIV-3-spezifischer Nukleinsäure aus verschiedenen Abschnitten des Respirationstraktes von 44 Rindern.

BAL Nr.	Nasentupfer rechts	Nasentupfer links	Trachea	BALF	Anzahl pos. Proben
2	+	-	-	+	2
11	-	-	-	+	1
27	-	-	-	+	1
gesamt	1	0	0	3	4

ßend an die BAL zeigten 34 (77.3%) der 44 beprobten Tiere ein unverändertes Atemverhalten, 7 Tiere (15.9%) eine geringgradig und 3 Tiere (6.8%) eine mittelgradig stärkere Dyspnoe. Die prozentuelle Rückgewinnungsrate der instillierten Spülflüssigkeit lag im Mittel bei 29.4%, wobei in 3 von 44 Fällen weniger als 10% und in 10 von 44 Fällen mehr als 40% zurück gewonnen wurde.

Mittels RT-PCR wurde bei 15 der 44 untersuchten Tiere zumindest in einer Probe BCoV-spezifische Nukleinsäure nachgewiesen. Bei 14 Tieren (31.8%) waren die Nasentupferproben (bei 13 Tieren jeweils sowohl aus dem rechten als auch aus dem linken Nasenloch) positiv, bei 9 Tieren (20.5%) die Trachealabstriche und bei 8 Tieren (18.2%) die BALF. Bei 6 der 15 positiv getesteten Tiere waren alle 4 Proben positiv. Die Details sind Tabelle 2 zu entnehmen. Von 44 beprobten Tieren konnte bei 7 Tieren BRSV nachgewiesen werden. Bei 2 weiteren Tieren lieferte die RT-PCR ein fragliches Resultat. Bei 2 Tieren waren alle 4 Proben positiv auf BRSV-spezifische Nukleinsäure. Bei 3 (42.9%) der 7 BRSV positiven Tiere konnte BRSV nur in den unteren Abschnitten des Atmungs-traktes (Trachea und/oder BALF) nachgewiesen werden. In einem Fall lieferte die BALF ein fragliches Ergebnis, wohingegen die restlichen Proben eindeutig als negativ befundet werden konnten. Bei 6 (85.7%) von 7 Tieren, in deren Proben mittels PCR BRSV-spezifische Nukleinsäure nachgewiesen werden konnte, waren die BALF-Proben positiv (Tab. 3). Von 44 Tieren konnte in den Proben von

3 Tieren (6.8%) Nukleinsäure von BPIV-3 nachgewiesen werden. Davon war BPIV-3-spezifische Nukleinsäure in allen 3 Fällen in der BALF nachweisbar, in einem Fall auch im rechten Nasentupfer (Tab. 4). In den Vorspülproben waren keine viralen Nukleinsäuren nachweisbar.

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass es für den mit Endoskopie vertrauten Tierarzt relativ einfach möglich ist, bei sedierten und gut fixierten Kälbern beziehungsweise Rindern eine BAL in Abschnitten der Pars cranialis des Lobus cranialis dexter durchzuführen. Mit etwas Übung gelingt es problemlos, den kranial der Bifurkation rechts abzweigenden Bronchus trachealis aufzufinden, die Endoskopspitze hinein zu lenken und in eine «wedge position» zu bringen. Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten der Rinderlunge, wie zum Beispiel des hohen Segmentierungsgrades und der starken und auch funktionellen Abgrenzung der Lungenabschnitte voneinander, ist zu erwarten, dass Krankheitsprozesse oft auf gewisse Lungenregionen beschränkt bleiben und auch die Erregernachweisbarkeit vorwiegend in veränderten, meist kranialen Lungenbereichen gegeben ist (Heilmann et al., 1988; Reinhold, 2001).

Als Spülflüssigkeit wurde, wie von der European Respiratory Society (ERS) Task Force (De Blic et al., 2000) für

die BAL bei Kindern empfohlen, 37 °C warme, 0.9%ige NaCl-Lösung verwendet. Bezüglich Volumen und Fraktionierung der Spülflüssigkeit ist in der Literatur ein sehr breites Spektrum an Angaben zu finden. So werden a) Spülmenge und Fraktionierung auf die funktionelle Residualkapazität der Lungen und die Körpergröße (De Blic et al., 1987) oder die Körpermasse (Riedler et al., 1995) bezogen, b) mit definierten Portionen gespült, bis ein bestimmtes Rückgewinnungs-Volumen erreicht wird (Engen und Brown, 1991), oder c) einfach für Menschen bzw. Tiere innerhalb einer mehr oder weniger breiten Alters- oder Gewichtsspanne bestimmte Volumina in bestimmten Fraktionierungen gewählt (Allen et al., 1991; McKane et al., 1993; Malikides et al., 2003; Costabel, 2005; Tötsch et al., 2007). So spülten Pringle et al. (1988) Kälber im Alter von 2 bis 8 Wochen mit 250 ml 0.9%iger NaCl-Lösung (geteilt in 3 Fraktionen), während im Rahmen dieser Arbeit Kälber unter 7 Lebenswochen mit maximal 3 x 20 ml gespült wurden. Im Vergleich dazu führten McKane et al. (1993) BALs bei ausgewachsenen Rennpferden mit insgesamt nur 65 ml durch. Welches Volumen und welche Fraktionierung von Spülflüssigkeit die höchsten Mengen an viralen Nukleinsäuren in der BALF erzielt werden können und ob eine Konzentrierung viraler RNA aus der Probe zu besseren Untersuchungsergebnissen führt, könnte Ziel weiterer Arbeiten sein.

Die bei dieser Studie erreichte durchschnittliche Rückgewinnungsrate von 29.4% scheint, verglichen mit Angaben von Heilmann et al. (1988) von ca. 43%, Allen et al. (1991) und Fogarty (1990) von ca. 50%, sowie der durchschnittlichen Rückgewinnungsraten anderer Autoren (Wilkie und Markham, 1981; Reinhold, 2001) eher gering. Laut ERS Task Force ist, bezogen auf humanmedizinische Untersuchungen, bei korrekter Durchführung eine Rückgewinnungsrate von 40% bis 70% zu erwarten. Allerdings gaben Tötsch et al. (2007) an, bei Lungenumphysemen oder chronischen Obstruktionen nur 30% der Spülflüssigkeit aspirieren zu können. Weiter kann aus kranialen Abschnitten des Respirationstraktes weniger BALF zurück gewonnen werden als aus kaudalen (Pringle et al., 1988).

Da das anschließende Untersuchungsverfahren mittels RT-PCR sehr sensitives ist, muss darauf geachtet werden, Kontaminationen sowohl bei der Vorbereitung und Durchführung der Probennahme, als auch beim Verbringen der Proben in entsprechende Probengefäße zu vermeiden. Um keine Erreger von einem Tier auf das nächste zu übertragen, ist eine sorgfältige Desinfektion des Endoskops mit anschließender gründlicher Spülung unerlässlich. Der Kopf der Zytologiebürste war durch den Kunststoffschlauch beim Einführen in den Arbeitskanal bestmöglich geschützt und das Kontaminationsrisiko durch Erregerpartikel, die durch das Einführen des Endoskops über die Nasenhöhle gegeben war, wurde minimiert. Auch die BAL selber wurde nicht direkt über den Arbeitskanal des Endoskops durchgeführt, sondern durch einen, in den Arbeitskanal eingeführten Kunst-

stoffkatheter. Auch hier wurde der direkte Kontakt der Spülflüssigkeit mit dem Arbeitskanal möglichst gering gehalten.

Die Durchführung einer BAL unter endoskopischer Sichtkontrolle ist mit einem relativ hohen materiellen Aufwand verbunden und wird daher nur für sehr spezialisierte Nutztierpraktiker oder aber für gut ausgerüstete Praxisgemeinschaften oder Tierkliniken die Methode der Wahl sein. Weiter stellt sich die Frage, ob sich der Aufwand einer BAL zur Diagnostik von Einzeltierkrankungen lohnt oder ob eine Lavage lediglich im Rahmen von Bestandsproblemen durchgeführt werden sollte. Dies wird letztendlich von den finanziellen Möglichkeiten des Betriebsbesitzers abhängig sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die BAL an lediglich leicht sedierten Tieren durchgeführt und durchwegs gut akzeptiert. Nachdem von Seiten der Tierbesitzer keinerlei Spätfolgen mitgeteilt wurden, die mit der Durchführung der BAL in Zusammenhang zu stehen schienen, wird davon ausgegangen, dass die Tiere die Untersuchung und die Probennahme selbst gut tolerierten.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass aufgrund der alleinigen Entnahme und Analyse von Nasentupferproben keine verlässliche Aussage über das Vorhandensein von BRSV und BPIV-3 in distalen Abschnitten des Respirationstraktes getroffen werden kann.

Bei 3 (42.9%) der 7 BRSV positiven Tiere konnte BRSV nur in den unteren Abschnitten des Atmungstraktes (Trachea und/oder BALF) nachgewiesen werden. Damit wären knapp die Hälfte der BRSV Infektionen mittels alleiniger Entnahme von Nasentupferproben undiagnostiziert geblieben. Die Replikation von BRSV bei infizierten Kälbern findet zum Großteil in bronchialen, bronchiolären und alveolaren Bereichen der Lungen statt (Viuff et al., 2002), was für einen Virusnachweis wesentlich besser geeignet ist, als die Entnahme von Nasentupferproben (Caldow, 2001). Bei 6 (85.7%) von 7 BRSV-RNA positiven Tieren waren die BALF-Proben positiv. Von den 3 Tieren, bei denen sich BPIV-3-spezifische Nukleinsäure nachweisen ließ, waren immer die BALF-Proben positiv, einmal auch der rechte Nasentupfer. Auch hier scheint die BALF eine besser geeignete Probe zu sein als Nasentupfer. Im Unterschied dazu erwies sich die Untersuchung von Nasentupferproben im Fall von BCoV als aussichtsreicher als die alleinige Untersuchung von BALF. In 21.1% der im oberen Respirationstrakt positiv getesteten Fälle stimmten die Resultate aus dem rechten und dem linken Nasentupfer nicht überein. Es ist daher empfehlenswert beide Nasenlöcher zu beproben und die Tupfer einzeln oder gepoolt zu untersuchen. Inwieweit klinische Symptome mit dem Nachweis von BCoV, BRSV und BPIV-3 in der BALF in Zusammenhang stehen, war aufgrund der geringen und inhomogenen Tiergruppe nicht auswertbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die BAL des Lobus cranialis dexter zur Diagnostik von BRSV und BPIV-3 mittels RT-PCR durchaus eignet. Besonders

446 Originalarbeiten

Diagnostic des affections respiratoires virales chez les bovins

La bronchopneumonie enzootique des bovins est une maladie infectieuse multifactorielle avec une participation déterminante d'agents viraux. Dans ce travail, on examine si le lavage broncho-alvéolaire de la partie caudale du lobe cranial droit est adaptée à la récolte de liquide broncho-alvéolaire et dans quel mesure ce liquide facilite, au moyen de PCR en temps réel, le diagnostic de l'agent viral (virus syncytial respiratoire bovin (VRSB), virus parainfluenza 3 bovin (PI-3), coronavirus bovin, (BCoV)). On a prélevé chez 43 bovins malades des écouvillons nasaux et des frottis de trachées et effectué un lavage broncho-alvéolaire. Le VRSB a pu être mis en évidence chez 6 sur 7 des animaux positifs dans le liquide broncho-alvéolaire mais seulement dans 4 sur 7 dans l'écouvillon nasal. La mise en évidence du PI-3 a été possible dans 2 cas sur 3 uniquement dans le liquide broncho-alvéolaire. Le BCoV a été mis en évidence chez 15 animaux, tout particulièrement dans les écouvillons nasaux. Le lavage broncho-alvéolaire a été facile à exécuter et n'a causé que dans un cas une toux importante et chez 3 animaux une augmentation moyenne de la dyspnée. Le résultat de ce travail démontre que le lavage broncho-alvéolaire est plus performant que les écouvillons nasaux pour mettre en évidence VRSB et PI-3 dans l'appareil respiratoire des bovins.

Diagnostica delle malattie respiratorie virali nei bovini

La broncopneumonia enzootica dei bovini è una malattia infettiva multifattoriale che comporta una rilevante presenza di agenti patogeni virali. In questo studio abbiamo valutato se il lavaggio broncoalveolare (BAL) eseguito sulle parti caudali del lobo craniale destro è adatto al recupero del liquido da BAL e in che misura il liquido da BAL recuperato possa facilitare la diagnosi di un agente patogeno virale (virus respiratorio sinciziale bovino, BRSV, virus parainfluenzale di tipo 3, 3-BPIV, coronavirus bovin, BCoV) tramite RT-PCR. Dei tamponi nasali e degli strisci tracheali sono stati prelevati da 44 bovini infetti inoltre è stato eseguito un BAL. Il BRSV è stato rilevato nel liquido del BAL in 6 / 7 animali positivi tuttavia con il tampone nasale veniva rilevato solo in 4 / 7 animali. La prova del 3-BPIV era positiva solo in 2 / 3 casi e solo al BAL. Il BCoV è stato trovato in 15 animali e di frequente nei tamponi nasali. Il BAL si è potuto eseguire facilmente ma purtroppo in un animale ha causato forte tosse e in 3 animali un peggioramento moderato della dispnea. I risultati mostrano che il BAL rappresenta un metodo superiore al tampone nasale per rilevare la presenza di BRSV e 3-BPIV nel tratto respiratorio dei bovini.

bei Bestandsproblemen, aber auch bei Einzeltierkrankungen scheint sie in Bezug auf diagnostische Sicherheit der alleinigen Entnahme von Nasentupferproben überlegen zu sein.

Literatur

Allen, J.W., Viel, L., Bateman, K.G., Rosendal, S., Shewen, P.E., Physick-Sheard, P.: The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can. J. Vet. Res.* 1991, 55: 341–346.

Caldow, G.: Bronchoalveolar lavage in the investigation of bovine respiratory disease. In *Pract.* 2001, 23: 41–43.

Costabel, U.: BAL beim Menschen. In: *Vergleichende Aspekte der broncho-alveolären Lavage bei Mensch und Tier.* Hrsg. reinhold, P., Costabel, U., Hamacher, J., Rosenbruch, M., Theergarten, D. *Pneumol.* 2005, 59: 485–501.

de Blic, J., McKelvie, P., Le Bourgeois, M., Blanche, S., Benoit, M.R., Scheinmann, P.: Value of bronchoalveolar lavage in the management of severe acute pneumonia and interstitial pneumonitis in the immunocompromised child. *Thor.* 1987, 42: 759–765.

de Blic, J., Midulla, F., Barbato, A., Clement, A., Dab, I., Eber, E., Green, C., Grigg, J., Kotecha, S., Kurland, G., Pohunek, P., Ratjen, F., Rossi, G.: Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. *European Respiratory Society. Eur. Respir. J.* 2000, 15: 217–231.

Engen, R.L., Brown, T.T., Jr.: Changes in phospholipids of alveolar lining material in calves after aerosol exposure to bovine herpesvirus-1 or parainfluenza-3 virus. *Am. J. Vet. Res.* 1991, 52: 675–677.

Fogarty, U.: A bronchoalveolar lavage technique for routine diagnostic purposes. *Equine vet. Edu.* 1990, 2: 102–104.

Heilmann, P., Müller, G., Reinhold, P.: Bronchoskopie und segmentale bronchoalveoläre Lungenspülung beim narkotisierten Kalb. *Mh. Vet.-Med.* 1988, 43: 79–84.

Malikides, N., Hughes, K.J., Hodgson, D.R., Hodgson, J.L.: Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Aust. Vet. J.* 2003, 81: 685–687.

McKane, S.A., Canfield, P.J., Rose, R.J.: Equine bronchoalveolar lavage cytology: survey of thoroughbred racehorses in training. *Aust. Vet. J.* 1993, 70: 401–404.

Pohunek, P., Pokorna, H., Striz, I.: Comparison of cell profiles in separately evaluated fractions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in children. *Thor.* 1996, 51: 615–618.

Pringle, J.K., Viel, L., Shewen, P.E., Willoughby, R.A., Martin, S.W., Valli, V.E.: Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves: cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. *Can. J. Vet. Res.* 1988, 52: 239–248.

Reinhold, P.: Untersuchung zur Bestimmung pulmonaler Funktionen beim Kalb. Habilitation, Institut für Veterinär-Physiologie der freien Universität Berlin, 2001.

Reynolds, H.Y., Newball, H.H.: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J. Lab. Clin. Med.* 1974, 84: 559–573.

Riedler, J., Grigg, J., Stone, C., Tauro, G., Robertson, C.F.: Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 1995, 152: 163–168.

Tsunemitsu, H., Smith, D.R., Saif, L.J.: Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. *Arch. Virol.* 1999, 144, 167–175.

Tötsch, M., Guzman, J., Theegarten, D., Schmid, K.W., Costabel, U.: Bronchoalveolar lavage. *Pathologie* 2007, 28: 346–353.

Viuff, B., Tjørnehoj, K., Larsen, L.E., Rontved, C.M., Uttenthal, A., Ronsholt, L., Alexandersen, S.: Replication and clearance of respiratory syncytial virus: apoptosis is an important pathway of virus clearance after experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Am. J. Pathol.* 2002, 161: 2195–2207.

Wilkie, B.N., Markham, R.J.: Bronchoalveolar washing cells and immunoglobulins of clinically normal calves. *Am. J. Vet. Res.* 1981, 42: 241–243.

Korrespondenz

Dr. Angelika Iglseder
Klinische Virologie
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
AT-1210 Wien
Austria
E-Mail: angelika.iglseder@vetmeduni.ac.at

Manuskripteingang: 24. Januar 2011
Angenommen: 5. Mai 2011