

## Amtliche Methodensammlung

# Ansteckende Metritis des Pferdes *(Taylorella equigenitalis)*

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

## Ansteckende Metritis des Pferdes

### 1. Charakterisierung der Infektion

#### 1.1 Erreger

Der Erreger der Kontagiösen Equinen Metritis (Contagious Equine Metritis - CEM), *Taylorella (T.) equigenitalis*, ist ein kleines gramnegatives kokkoides Stäbchenbakterium.

#### 1.2 Klinische Symptomatik

Bei der CEM handelt es sich um eine Erkrankung des Geschlechtsapparates bei Equiden. Die Infektion wird durch *Taylorella equigenitalis* verursacht und kann eine temporäre Infertilität verursachen. Falls klinische Veränderungen auftreten, sind das Endometriums-, Zervix- und Vaginalentzündungen gekennzeichnet durch einen mukopurulenten Vaginalausfluss. Der Erreger persistiert vor allem im Klitorissinus, in der Fossa und im Uterus. Aborte sind äußerst selten. Auch wenn keine klinischen Zeichen auftreten, können die Stuten den Erreger ausscheiden und beim Deckakt auf den Hengst übertragen, der seinerseits symptomlos bleibt und den Erreger weiter übertragen kann. Der Erreger besiedelt beim Hengst die Schleimhaut der äußeren Genitalien, wobei die bevorzugten Kolonisationsorte die primäre und die sekundären Eichelgruben sind.

#### 1.3 Differentialdiagnose

Als Differentialdiagnose kommen andere mit Endometritiden einhergehende Infektionskrankheiten, verursacht vor allem durch *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Klebsiella pneumoniae*, in Betracht.

*Taylorella equigenitalis* ist von *Taylorella asinigenitalis* zu differenzieren.

#### 1.4 Diagnostische Indikation

- Klinisch oder epidemiologisch begründeter Verdacht
- Ungeklärte Fruchtbarkeitsstörungen (Aborte)
- Exportuntersuchungen, Monitoring von Zuchtpferden

#### 1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Private und staatliche Laboratorien
- Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Referenzlabor für Kontagiöse Equine Metritis, Naumburger Str. 96 a, 07743 Jena, Tel: 03641 804 2466, Fax: 03641 804 2228.

## 1.6 Rechtsgrundlagen

- Entscheidung 93/197/EWG der Kommission vom 05.02.1993 über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen und die Beurkundung für die Einfuhr von registrierten Equiden sowie Zucht- und Nutzequiden
- Verordnung über meldepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung
- Richtlinie 92/65/EWG über die tierseuchenrechtlichen Bedingungen für den Handel mit Tieren, Samen, Eizellen und Embryonen in der Gemeinschaft sowie für ihre Einfuhr in die Gemeinschaft, soweit sie diesbezüglich nicht den spezifischen Gemeinschaftsregelungen nach Anhang A Abschnitt I der Richtlinie 90/425/EWG unterliegen vom 13. Juli 1992 in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung über die Gewinnung, Abgabe und Verwendung von Samen, Eizellen und Embryonen von Zuchttieren (Samenverordnung - SamEnV) in der jeweils gültigen Fassung

## 2. Untersuchungsmaterial

Vorgeschriebene Proben zur Untersuchung von Hengsten, die zur Gewinnung von Samen für die künstliche Besamung vorgesehen sind:

1. nach § 3 Nr. 6 und 7 der Samenverordnung:  
„ eine Samen- oder Vorsekret- und Harnröhrenprobe und eine Eichelgrubentupferprobe (kultureller Erregernachweis oder PCR), Wiederholung der Untersuchung jeweils nach 120 Tagen“
2. gemäß Richtlinie 92/65/EWG in der aktuellen Fassung für den Handel innerhalb der EU:  
Anhang 1 Kapitel II (Anforderungen an Spendertiere), I.(Anforderungen an Spenderhengste), 1.5c):  
„...Vorsekret oder Samenprobe und Genitalabstriche, die zumindest an Penisschaft, Harnröhre und Fossa glandis zu entnehmen sind ...(kultureller Erregernachweis oder PCR), zwei Tests im Abstand von sieben Tagen (genauere Angaben siehe Text der Richtlinie).

Vorgeschriebene Untersuchungen für Spenderstuten (~~Richtlinie 92/65/EWG~~ Embryonen und Eizellen):

Gemäß Richtlinie 92/65/EWG Anhang 1 Kapitel IV (Anforderungen an weibliche Spendertiere), 4., 4.3:  
Proben, die von den Schleimhäuten der Fossa clitoridis und des Sinus clitoridis entnommen wurden, werden zweimalig mittels Kultur im Abstand von wenigstens 7 Tagen oder einmalig mittels PCR untersucht.

Allgemeine Untersuchungen von Urogenitaltupferproben von Stuten und Hengsten:

Hengst: Vorsekret oder Samenprobe, sowie Genitalabstriche (Tupfer) mindestens von Penisschaft (Penis sollte vollständig ausgeschachtet sein), Harnröhre und Fossa glandis

Stuten: Genitalabstriche (Tupfer) mindestens von Fossa clitoridis und Sinus clitoridis (spezielle Klitoristupfer verwenden), Endometriumstupfer (während Östrus)

## Ansteckende Metritis des Pferdes

Für Vollblutpferde siehe „Codes of Practice **2014 2018**“:

Die einzelnen Tupfer werden in Amies-Transportmedium mit Aktivkohlezusatz verbracht und gekühlt versandt.

Der Ausstrich bzw. die Untersuchung im Labor hat spätestens 48 Stunden nach der Probenahme zu erfolgen, deshalb kein Probenversand übers Wochenende. **Die Untersuchung kann mittels Kultur oder PCR erfolgen.**

Tylorellaverdächtige Isolate können mit dem entsprechenden Einsendebogen an das FLI gesendet werden. Dieser kann unter folgendem Link heruntergeladen werden:

<https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-bakterielle-infektionen-und-zoonosen-ibiz/referenzlabore/nrl-fuer-kontagioese-equine-metritis/>

Zur Bestandskontrolle auf das Vorkommen einer CEM- Infektion kann neben dem kulturellen Erregernachweis auch der indirekte Erregernachweis im Probenmaterial (Genitaltupfer) mittels PCR- Analyse erfolgen.

## 3. Untersuchungsgang

### 3.1 Kultureller Erregernachweis

#### Chemikalien und Nährmedien (z. B.)

1. modifizierte EUGON Schokoladenagar (MECA)  
(Grundsubstanz: Tryptikase-Soja-Agar, (BD, Heidelberg)
  - mit Amphotericin B (MECA+A)
  - mit Amphotericin B und Streptomycin (MECA+AS)
  - mit Clindamycin, Trimethoprim und Amphotericin B (MECA+CTA)
  - oder C.E.M.O.- Agar (MAST Diagnostica, Reinfeld)
  - mit MAST C.E.M.O. Selectab (MS 31) streptomycinhaltig
  - mit MAST C.E.M.O. Selectab (MS 32) streptomycinfrei
2. Nähragar mit 7,5 % Kälberblut
3. Hirn-Herz-Aufguss-Bouillon
4. Oxidase-Reagenz (1 % Tetramethyl-p-Phenylendiamindihydrochloride)
5. Katalase-Reagenz (3 % Wasserstoffperoxid)
6. Phosphatase-Reagenz
- 7. PCR zur Identifizierung der verdächtigen Kulturen**
8. Alternativ, aber kein offiziell zugelassener Kit in Deutschland: MONO-TAYL Agglutination Kit zur Identifizierung von *T. equigenitalis* (Bionor, Norwegen, <http://www.bionor.com/monotayl.pdf>)

### 9. Vergleichsstämme:

- *T. equigenitalis* (Streptomycin resistenter Biotyp) ATCC 35865 DSM 10668
- (*T. equigenitalis* (Streptomycin sensitiver Biotyp) NCTC 11225)
- *Escherichia (E.) coli* ATCC 25922 (Oxidase Ø, beweglich) DSM 1103
- *Streptococcus (Str.) agalactiae* ATCC 13813 (Katalase Ø) DSM 2134
- *Oligella (O.) urethralis* ATCC 17960 (Phosphatase Ø) DSM 7531
- (*T. asinigenitalis* DNA für PCR über NRL CEM)

### Herstellung der MECA-Platten:

- Die auf dem Packungsetikett angegebene Menge Agar in dem entsprechenden Volumen destilliertem
- Wasser suspendieren (1l)
- bis zum vollständigen Lösen erhitzen und gut mischen
- pH: 7,1 +/- 0,2 überprüfen und ggf. einstellen  
→ Zugabe von Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Natriumsulfit), FW 126,0 0,2 g  
und L-Cystine (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>), FW 240,3 0,3 g
- 15 min bei 121 °C autoklavieren
- im Wasserbad auf 80 °C abkühlen lassen
- Medium mit 5 % (50 ml) sterilem defibriniertem Pferdeblut versetzen und gut mischen
- auf ca. 50 °C abkühlen lassen

### MECA+A

→ Zugabe von Amphotericin B (C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>20</sub>), FW 960,1 5,0 mg

- gut mischen und in sterile Petrischalen gießen  
(25 ml Medium pro 100 x 15 mm Platte)
- Platten in waagerechter Position erstarren lassen.  
Die Platten sind schokoladenbraun.

### MECA+AS

- Herstellung wie MECA+A)
- jedoch zusätzlich Streptomycinsulfat (Menge: 0,2 g/l) unter sterilen Bedingungen zugeben  
(25 ml Medium pro 100 x 15 mm Platte)

### MECA+CTA

- Herstellung wie MECA+A,
- jedoch zusätzlich Trimethoprim (Menge: 1 mg/l) und Clindamycin (Menge: 5 mg) sowie 50 ml lysiertes Pferdeblut unter sterilen Bedingungen zugeben (25 ml Medium pro 100 x 15 mm Platte)

## Ansteckende Metritis des Pferdes

### 3.1.1 Durchführung des Tests

**Achtung: Alle Arbeiten mit Proben und Kulturen in einem Sicherheitslabor der Klasse 2 ausführen!**

Die Agarplatten nach folgender Methode beimpfen:

- Tupfer auf jeder der 3 o. g. MECA- Platten so ausstreichen, dass gut isolierte Kulturen entstehen können

Alle inokulierten Medien (MECA- Platten) bei 35 - 37 °C, hoher Luftfeuchte und 5 - 10 % CO<sub>2</sub> inkubieren

Kolonien von *T. equigenitalis* erscheinen auf MECA+A und MECA+AS meist nach 48 Stunden Inkubationszeit als sehr kleine stecknadelkopfgroße Kolonien, weiß, etwas grau oder beige gefärbt. Die Größe kann von stecknadelkopf groß bis 2 mm variieren. Nach 72 Stunden werden die Kolonien größer und klar und nach weiterer Inkubation werden sie gelblich braun und wachsartig und können über die Agaroberfläche erhaben sein. Kolonien auf MECA+CTA wachsen langsamer und sind etwas kleiner, ansonsten aber gleich den Kolonien auf den anderen Isolierungsmedien.

Eine längere Inkubationszeit kann bei Erstisolierung des Organismus notwendig sein. Einige Isolate benötigen bis zu 13 Tage bevor ein Wachstum festgestellt werden kann. Ein negatives Ergebnis sollte erst nach mindestens 7 Tagen (bis zu 14 Tagen) Inkubationszeit festgestellt werden.

Verdächtige Kolonien von Platte entnehmen und Identifizierungstest durchführen wie im Weiteren beschrieben (siehe Flussdiagramm).

Wenn ein gemischtes Wachstum oder nur ganz geringes Wachstum der verdächtigen Kolonie zu verzeichnen ist, dann erfolgt eine Subkultur auf einer modifizierten EUGON Schokoladenagarplatte (MECA+A), die für 48 bis 72 Stunden inkubiert wird, um ein ausreichendes Wachstum einer Reinkultur für die notwendigen weiteren Tests zu ermöglichen.

Die verdächtigen Kolonien z. B. auf die Oxidase-, und Katalase- und Phosphatasereaktion sowie auf Beweglichkeit prüfen oder/und in der PCR untersuchen.

Tabelle: Zusammenfassung der wichtigsten kulturellen und biochemischen Eigenschaften von *T. equigenitalis*, *T. asinigenitalis* und *Oligella urethralis*

	<i>T. equigenitalis</i>	<i>T. asinigenitalis</i>	<i>Oligella urethralis</i>
Wachstumsbedingungen	37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>	aerob, 37 °C
aerobes Wachstum	negativ	negativ	positiv
Gramverhalten	gramnegativ	gramnegativ	gramnegativ
Oxidase	positiv	positiv	positiv
Katalase	positiv	positiv	positiv
Phosphatase	positiv	positiv	negativ
Beweglichkeit	unbeweglich	unbeweglich	unbeweglich
Mono-Tayl Agglutination	positiv	schwach positiv	negativ
z. B. <b>cador T. equigenitalis</b> PCR	<b>Positiv</b>	<b>negativ</b>	<b>negativ</b>

### 3.1.2 Interpretation der Ergebnisse

*T. equigenitalis* ist ein kleiner gramnegativer kokkoider Bakterienorganismus. Das Bakterium wächst nicht aerob auf Blutagar, ist unbeweglich und reagiert positiv im Oxidase-, Phosphatase- und Katalasetest sowie im Monotayl Agglutination Test.

Zur Bestätigung von *T. equigenitalis* verdächtigen Kolonien sollte generell ein für *T. equigenitalis* spezifischer PCR-Nachweis erfolgen, z. B. mittels Real Time PCR (z. B. Wakeley et al., 2006).

Wenn ein Isolat die oben genannten Kriterien erfüllt (mind. PCR), wird eine positive Diagnose für CEM gestellt.

Ein vom FLI zugelassener PCR-Kit (FLI-B 470) "cador T. equigenitalis PCR Kit" (QIAGEN Leipzig GmbH) wurde vom Hersteller auch für die Verwendung von aus Tupferprobenmaterial isolierter DNA validiert. Damit kann die PCR für klinische bzw. vorgeschriebene Zuchtuntersuchungen als gleichwertig zur Kultur betrachtet werden. Allerdings ist die PCR bisher nicht für Exportuntersuchungen akzeptiert.

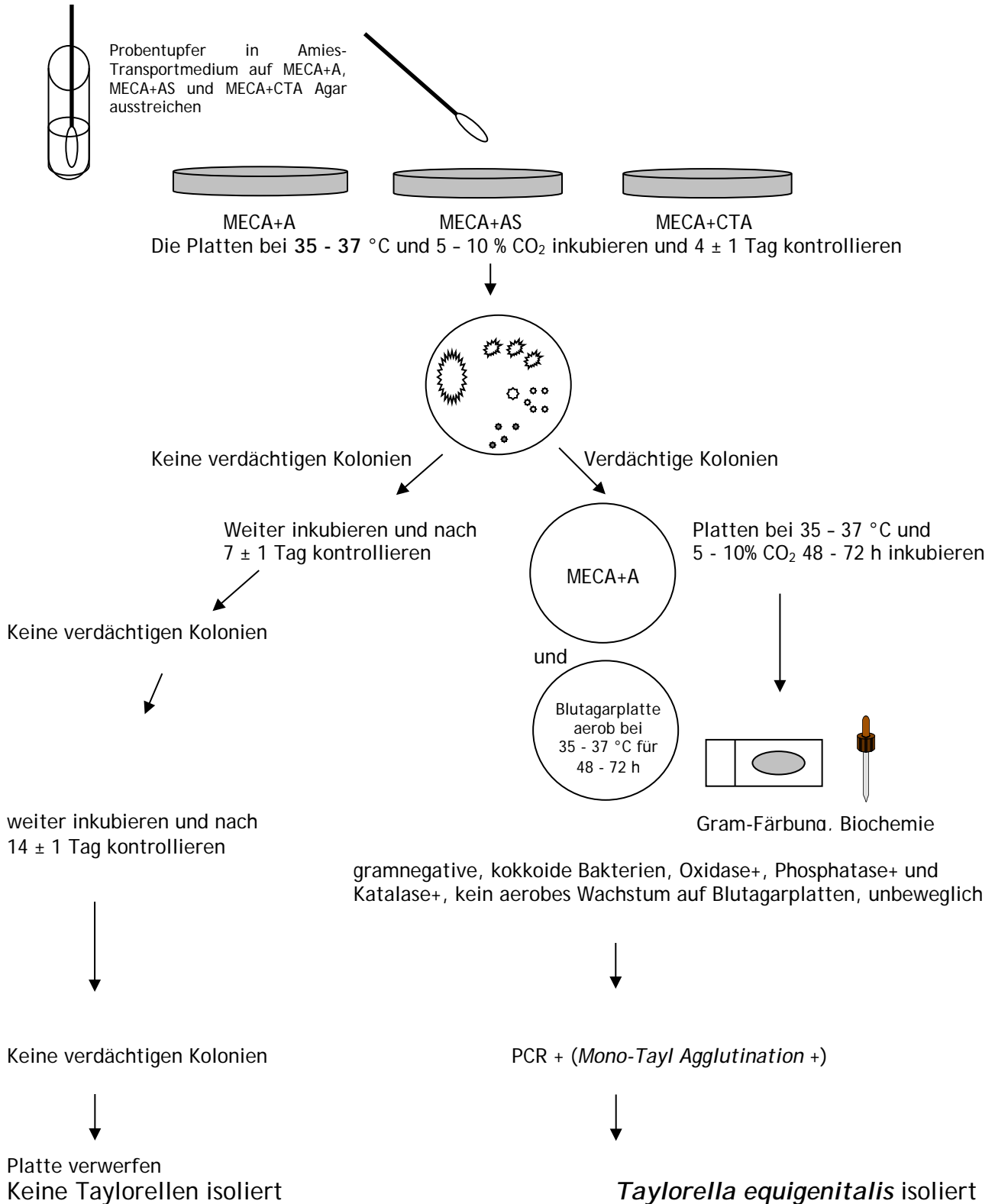
### 3.1.3 PCR

In Deutschland ist eine Realtime-PCR der Firma QIAGEN amtlich zugelassen: cador T. equigenitalis PCR Kit, Zul.\_Nr.: FLI-B 470.

Bei Verwendung des Kits und der Tupferaufarbeitung ist den Herstellerangaben zu folgen. Wenn möglich, ist bereits bei der Tupferprobe anstelle des Amies-Transportmediums ein geeigneter PCR-Puffer zu verwenden.

# Ansteckende Metritis des Pferdes

## Flussdiagramm zur Isolierung von *Taylorella equigenitalis*





### Literatur

- OIE: Manuel of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.02\\_CEM.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.02_CEM.pdf))
- Codes of Practice 2014 2018 (<http://codes.hblb.org.uk/>)
- Richtlinie 92/65/EWG in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung über die Gewinnung, Abgabe und Verwendung von Samen, Eizellen und Embryonen von Zuchttieren (Samenverordnung - SamEnV) in der jeweils gültigen Fassung
- Wakeley, P. R. *et al.* (2006): Development of real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *Taylorella asinigenitalis*, *Veterinary Microbiology* 118, 247-254