

Moleculaire diagnostiek van infectieziekten bij gezelschapsvogels en reptielen

A. Martel, F. Pasmans

Afdeling Pluimvee en Bijzondere Diersoorten – vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

INLEIDING

Polymerase Chain Reaction (PCR) is een belangrijke moleculaire test voor het opsporen van klinische en subklinische infecties bij vogels en reptielen. Het is een gevoelige test waarmee snel een resultaat verkregen wordt. Door het voorkomen van valspositieve en valsnegatieve resultaten moet de practicus steeds kritisch de resultaten van de test beoordelen. In dit kort overzichtje worden de techniek, staalname en staalbewaring besproken. Daarnaast wordt het gebruik van de PCR-test voor de meest voorkomende infectieuze aandoeningen bij gezelschapsvogels en reptielen besproken.

TECHNIEK

PCR is een techniek waarmee zeer kleine hoeveelheden van een specifieke DNA-sequentie kunnen aangetoond worden. De test bootst in drie stappen de DNA-duplicatie na. In elke cyclus worden achtereenvolgens de volgende fasen doorlopen: de denaturatie of ontdebelling van het dubbelstrengige DNA, de aanhechting van primers op de enkelvoudige DNA-strengen en de aanmaak van een nieuwe DNA-keten door DNA-polymerase. Voor RNA-virussen moet het RNA eerst overgeschreven worden tot DNA (= reverse transcriptase PCR). Voor de ontwikkeling van een PCR-test is het nodig om de DNA- of RNA-sequentie van de ziekteverwekker te kennen. Op basis van deze sequentie kunnen dan specifieke primers ontworpen worden die kunnen gebruikt worden om het DNA van het agens op te sporen in stalen. Wanneer er te veel variaties in deze sequenties tussen verschillende species van een genus voorkomen, kan het gebeuren dat men met een bepaalde primerset slechts één species kan opsporen (= speciesspecifieke PCR). In andere gevallen kan men met één test alle leden van een genus opsporen (= genus-specifieke PCR). Voor de practicus is het belangrijk om te weten of de test die hij/zij laat uitvoeren een genus- of speciesspecifieke test is. Dit moet dus steeds nagevraagd worden bij het laboratorium om een foutieve interpretatie van de resultaten (valsnegatief omdat een niet-geschikte test is gekozen) te vermijden. De PCR is een zeer gevoelige techniek: vaak is één molecule DNA voldoende om het agens te kunnen opsporen. Deze gevoeligheid is een van de belangrijkste troeven van de test, maar kan ook een belangrijk nadeel zijn. Contaminatie van het staal kan leiden tot

valspositieve resultaten. De practicus dient er dus rekening mee te houden dat de stalen aseptisch en in een niet-gecontamineerd milieu (bijvoorbeeld rondvliegend vederstof) dienen genomen te worden. Met behulp van kwantitatieve PCR (= real time (RT) PCR) kan een idee bekomen worden van de mate waarin het agens aanwezig is. Hiermee kan vaak het onderscheid tussen contaminatie en infectie gemaakt worden. Deze RT-PCR's zijn echter maar zelden beschikbaar.

Zoals hoger besproken wordt met de PCR-test de aanwezigheid van genetisch materiaal van het agens aangetoond. Dit wil zeggen dat een positieve PCR-test niet aantoont dat er levende agentia aanwezig zijn.

STAALNAME EN BEWARING

Bloed, orale of cloacale swabs, weefsel en zelfs omgevingswabs kunnen gebruikt worden voor PCR-onderzoek. Welke stalen het best genomen worden is afhankelijk van de ziekteverwekker die men wil onderzoeken en het ziektestadium op het tijdstip van staalname.

Bloed (0,2 ml minimum) dient bewaard te worden in een gehepariniseerd buisje. Orale of cloacale swabs worden het best bewaard in 70% ethanol. Weefsels kunnen ofwel diepgevroren worden ofwel bewaard worden in 70% ethanol.

INFECTIEUZE AANDOENINGEN WAARBIJ DE PCR-TEST ALS DIAGNOSE-TECHNIEK KAN GEbruikt WORDEN

Vogels

Hierna zal het gebruik van de PCR-test voor de diagnose van de meest voorkomende aandoeningen bij gezelschapsvogels besproken worden. De PCR's voor de detectie van circovirus, polyomavirus, herpesvirus en *Chlamydophila* worden ook gebruikt voor de ingangscntrole van nieuw aangekochte vogels. Omdat men slechts voor een beperkt aantal aandoeningen controleert, kan een PCR-test een quarantaineperiode echter niet vervangen.

Circovirus

Circovirussen werden reeds beschreven bij papegaaiachtigen, zang- en watervogels, duiven en hoenderachtigen. Door de hoge variabiliteit in de cir-

covirusgenoomsequentie zijn de ontwikkelde PCR's vaak specifiek voor een bepaald species. Dit betekent dat een laboratorium dat over een PCR-test beschikt om het circovirus van papegaaiaachtigen op te sporen niet in staat is het duivencircovirus aan te tonen.

Circovirose bij papegaaiaachtigen veroorzaakt "psittacine beak and feather disease" (PBFD). Bij een levende vogel kan PCR gebruikt worden om PBFD-virus DNA te detecteren in het bloed van een klinisch ziek dier of om asymptomatische dragers op te sporen. Een positief staal bij een vogel met klinische ziekte wijst erop dat de vogel permanent geïnfecteerd is en waarschijnlijk zal sterven aan de infectie. Wanneer een schijnbaar gezonde vogel positief test dient hij opnieuw getest te worden na 3 maanden. Wanneer de vogel positief is bij die test wordt het dier beschouwd als permanent geïnfecteerd en wordt er verwacht dat het dier ziek zal worden. Een negatief staal bewijst niet dat het dier niet geïnfecteerd is, want een incubatieperiode tot 4 weken kan nodig zijn vooraleer het virus in het bloed gedetecteerd kan worden. Aangezien het virus in grote hoeveelheden wordt uitgescheiden via mest en vederstof, moet men zeer bedacht zijn op kruiscontaminatie. Omgevingsswabs kunnen genomen worden om de effectiviteit van de desinfectie te controleren.

Polyomavirus

Het aviaire polyomavirus (APV) is wereldwijd verspreid en is één van de belangrijkste virale pathogenen van voliërevogels. Viremie kan aangetoond worden vanaf 9 dagen na infectie bij grasparkieten en tot 2 weken na infectie bij andere soorten. Kort na de viremie kan het virus aangetoond worden in cloacaswabs. De duur van de viremie en de cloacale virusuitscheiding variëren naargelang de leeftijd en de soort vogel. Voor de screening van individuele vogels wordt een PCR-analyse van het bloed aangeraden. Een volwassen positieve vogel dient opnieuw getest te worden na 4 tot 6 weken. Een jonge, positieve vogel dient opnieuw getest te worden na 12 tot 16 weken. Indien de vogel bij de tweede bloedtest negatief is, moet het dier toch nog in quarantaine voor de volgende 4 weken om er zeker van te zijn dat hij het virus niet meer zal uitscheiden. Het komt immers voor dat het virus niet meer in het bloed aan te tonen is, maar nog wel wordt uitgescheiden. Jonge of volwassen dieren die in contact gekomen zijn met APV, zullen kort na de blootstelling het virus dragen en uitscheiden. Men kan bij deze vogels het best 12 tot 16 weken na het contact het viraal DNA in het bloed opsporen. Negatieve dieren moeten ook weer vier weken in quarantaine. Cloacaswabs kunnen ook nuttig zijn om geïnfecteerde dieren op te sporen maar sommige vogels scheiden het virus intermitterend uit en kunnen dus valsnegatieve resultaten opleveren.

Herpesvirus

Herpesvirusinfecties komen voor bij verschillende soorten vogels. Zoals bij andere diersoorten kunnen



Figuur 1. Herpesvirusinfecties kunnen zware verliezen veroorzaken in bestanden van landschildpadden, zoals bij deze pannenkoekschildpad (*Malacochersus tornieri*).

ook vogels latent drager zijn van het virus. Helaas is er geen accurate en praktische manier om latente infecties bij levende dieren op te sporen. Zieke dieren zullen grote hoeveelheden virus uitscheiden via feces en in faryngale secreties. Het virus kan bij deze dieren dus opgespoord worden in cloaca- of mondswabs. Tijdens de viremische fase kan het virus ook in het bloed aangetoond worden. Bij gestorven dieren kan in de lever viraal DNA opgespoord worden.

Chlamydomydia psittaci

Ornithose is de belangrijkste bacteriële ziekte bij papegaaiaachtigen en komt ook bij andere vogels, zoals duiven en kalkoenen, frequent voor. Met PCR kan het DNA van het organisme gedetecteerd worden in orale swabs, bij voorkeur van de choanae, vanaf 5 dagen na infectie, in cloacaswabs vanaf 10 dagen na infectie en in bloed vanaf 15 dagen na infectie. Bij vogels waarbij de behandeling reeds gestart is vóór de staalname kunnen valsnegatieve resultaten voorkomen.

Mycoplasmen

Diverse species mycoplasmen werden reeds beschreven bij vogels. Omdat de kiemen moeilijk te kweken zijn, wordt de diagnose vaak met behulp van PCR gesteld. Het wordt aangeraden om een genus-specifieke PCR te gebruiken om de kiemen op te sporen in neusswabs.

Reptielen

De diagnostische mogelijkheden voor infectieuze ziekten bij reptielen zijn eerder beperkt. Belangrijke aandoeningen, zoals "inclusion body disease" bij boa's, kunnen tot op heden enkel met behulp van invasieve technieken gediagnosticeerd worden. De verschillende diagnostische mogelijkheden worden samengevat in Wellehan (2006). Een overzicht van de diagnostiek van de belangrijkste infectieuze aandoeningen wordt gegeven in Pasmans *et al.* (2008).

Herpesvirus

Herpesvirusinfecties komen het meest frequent voor bij landschildpadden en kunnen leiden tot hoge mortaliteit (Figuur 1). Alvorens nieuw aangekochte schildpadden in een bestand te introduceren, worden deze het best gecontroleerd op de aanwezigheid van een herpesvirusinfectie. Bij levende dieren kan PCR toegepast worden op swabs van de mondholte. Bij dode dieren kan dit gebeuren op een mondswab, de tong of de lever. Latent geïnfecteerde dieren kunnen niet met behulp van PCR geïdentificeerd worden. Het is daarom het best om PCR te combineren met serologie.

Mycoplasmen

Infecties met mycoplasmen worden vooral gezien bij landschildpadden, waarbij ze een aandoening van de bovenste luchtwegen ("upper respiratory tract disease" (URTD)) veroorzaken. Het aantonen van mycoplasmen met behulp van PCR gebeurt bij voorkeur in vocht, opgevangen na een neusspoeling. Bij landschildpadden is het vooral van belang om door mycoplasmen veroorzaakte URTD te differentiëren van een herpesvirusinfectie. Als omwille van financiële restricties één PCR-test wordt gekozen, wordt aangeraden het dier bij voorkeur te testen op herpesvirus.

Paramyxovirus

Hoewel paramyxovirussen vooral bij slangen uitbraken kunnen veroorzaken met grote sterfte tot gevolg, is de aandoening in België zeer zeldzaam. Toch is het zinvol van elke slang met zenuw- en/of ademhalingsstoornissen een mondswab te verzamelen voor viruscultuur en/of PCR. Van gestorven dieren kunnen het best de long, hersenen en nier worden ingestuurd.

Chlamydiales

Het belang van Chlamydiales bij ziekten bij reptielen wordt vermoedelijk sterk onderschat. In het geval van ademhalingsstoornissen is het zeker zinvol om de aanwezigheid van chlamydiën in mondswabs of bronchiaal spoelvocht te laten onderzoeken met behulp van PCR. Gezien de zeer diverse species die tot nu toe werden gevonden bij reptielen, verdient het de voorkeur een PCR-test te kiezen die zoveel mogelijk Chlamydiales kan aantonen.

REFERENTIES

- Lane R.F. (2005). Practical interpretation of infectious disease testing. In: *Proceedings of the 26th Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians*, 203-207.
- Pasmans F., Blahak S., Martel A., Pantchev N. (2008). Introducing reptiles into a captive collection: The role of the veterinarian. *The Veterinary Journal* 175, 53-68.
- Phalen D.N. (2006). Preventive Medicine and Screening. In: Harrison G.J, Lightfoot T.L. (eds.). *Clinical Avian Medicine*. Spix Publishing, Inc., Palm Beach, Florida.
- Ritchie B.W. (1995). *Avian Viruses: Function and Control*. Wingers Publishing.
- Wellehan J. (2006). Understanding diagnostic testing. In: Mader, D. (ed.). *Reptile Medicine and Surgery*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 1062-1067.