

5 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Bedeutung des EHV-2 und der Rolle von immunologischen Mechanismen bei der bis dato noch nicht vollständig geklärten Pathogenese entzündlicher Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva des Pferdes durchgeführt. Auch eine mögliche Beteiligung viraler und bakterieller Co-Faktoren wurde untersucht. Weiterer Gegenstand der Untersuchungen war schließlich der Gewebe- und Zelltropismus von EHV-2 und EHV-5 im Auge.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Frage, inwieweit bei EHV-2-infizierten augenkranken Pferden Abweichungen bei den zellulären Komponenten des Immunsystems vorkommen und sich diese mittels der Erstellung eines Immunstatus feststellen lassen. Diese virologischen und immunologischen Analysen wurden in Kooperation mit dem Labor Laboklin vergleichend bei zehn augenkranken und 21 klinisch gesunden Pferden durchgeführt. Anhand der im Rahmen dieser Untersuchungen erzielten Ergebnisse sollten schließlich Rückschlüsse gezogen werden darauf, ob die Pathogenese der Erkrankung möglicherweise durch immunsupprimierende Mechanismen des EHV-2 beeinflusst werden könnte.

Zweitens sollte anhand von Stichprobenuntersuchungen geprüft werden, ob bakterielle bzw. virale Doppelinfektionen mit Chlamydien, Mykoplasmen, EHV-5 und/oder EAdV-1 die equine Keratokonjunktivitis mitverursachen. Für diese Fragestellung war die Etablierung einer EAdV-1-spezifischen nested PCR Voraussetzung.

Schließlich schlossen sich EHV-2- und EHV-5-Untersuchungen an gesunden, *post mortem* gewonnenen Augengeweben und -Tupfern mittels nPCR und - im Falle von EHV-2 - *In situ*-Hybridisierung bei 14 Pferden an. Diese Studien zum Tropismus sollten einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva beim Pferd liefern und insbesondere den häufigen Nachweis beider Viren im gesunden Auge aufzeigen.

5.1 Evaluierung der Rolle immunsupprimierender Mechanismen des EHV-2 bei der equinen Keratokonjunktivitis

Bei entzündlichen Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva bei Pferden wurde EHV-2 zwar nicht mit statistisch gesichertem häufigerem Nachweis aus Tupfermaterial im Vergleich zu Kontrollpferden nachgewiesen (Krüdwagen *et al.*, 2001; von Borstel, 2003). Dennoch spricht die Tatsache, dass sich unterschiedliche Keratokonjunktivitisfälle mit dem gegen DNA-Viren wirksamen Nukleosidanalogen Idoxuridin therapieren ließen, für eine ätiologische Beteiligung des EHV-2 (Matthews und Handscombe, 1983; von Oppen *et al.*, 2001). Es ist zu vermuten, dass EHV-2 mehr als prädisponierender und damit die Entstehung der Augenentzündung begünstigender Faktor wirkt, möglicherweise durch Mechanismen, die das Immun-

system entscheidend beeinflussen. Herpesviren haben generell vielfältige Strategien entwickelt, mit denen sie das Abwehrsystem des Wirtes unterlaufen können (Carr *et al.*, 2001). Speziell EHV-2 werden immunsupprimierende Wirkungen nachgesagt (Fu *et al.*, 1986). Diese könnten in der Tatsache begründet sein, dass das Virus in B-Lymphozyten latent vorkommt und verschiedene, für Virokine codierende Gene in seinem Genom trägt (Rode *et al.*, 1993; Drummer *et al.*, 1996), die auf vielfältige Strategien zur Suppression und Umgehung der Immunantwort schließen lassen. Auch die Induktion ähnlicher immunpathologischer Wirkungen wie bei der HSK-1 bedingten Keratokonjunktivitis, bei der CD4-positive Th-Zellen Cytokine sezernieren, durch die es zur Migration der PMKL ins Gewebe und dadurch zu den spezifischen Entzündungsreaktionen kommt (Pentlarge, 1991; Nasisse *et al.*, 1998; Hendricks, 1999), sind denkbar. Bisher gibt es jedoch noch keine fundierten Daten, die einen tatsächlichen Einfluss des EHV-2 auf das Immunsystem belegen würden. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor Laboklin von zehn EHV-2-nPCR positiven sowie von 21 EHV-2-nPCR negativen augenkranken und gesunden Pferden ein Immunstatus (bestehend aus der Gesamtleukozytenanzahl und den relativen Anteilen der B-, T-, CD4⁺-, CD8⁺-Zellen, neutrophilen, basophilen, eosinophilen Granulozyten, stab- und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten sowie der CD4⁺:CD8⁺-Ratio) mittels Durchflusszytometrie und Differentialblutbildanalyse erstellt. So sollte geklärt werden, ob EHV-2 einen Einfluss auf die zellulären Komponenten des Immunsystems ausübt und mittels der Erstellung eines Immunstatus erfassen lässt. Die vergleichende Betrachtung der Immunstatus-Ergebnisse zwischen augenkranken und augengesunden EHV-2 positiven und negativen Pferden sollte schließlich Aufschluss darüber geben, ob sich möglicherweise ein von der Norm abweichender Immunstatus auf die Entstehung der Erkrankung auswirkt.

Wie zunächst die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen, wurden bei allen Pferden insbesondere bei den CD8⁺-T-Zellen und der CD4:CD8-Ratio häufig Abweichungen in Form erhöhter bzw. erniedrigter relativer Anteile festgestellt, während bei den B-, T- und CD4⁺-Zellen nur bei wenigen Pferden Normabweichungen festgestellt wurden (Tab. 10). Denkbar wäre, dass das gehäufte Auftreten dieser Normabweichungen in einer individuellen Streuung von Einzelergebnissen bedingt ist, zumal eine relativ kleine Stichprobenzahl (60 Pferde) von dem Labor Laboklin für die Festlegung der Referenzwerte der einzelnen Lymphozytensubpopulationen beim Pferd herangezogen worden waren. Auch aus der Humanmedizin sind hohe Individualschwankungen bekannt weshalb es hier üblich ist, den zellulären Immunstatus nicht nur anhand eines Einzelergebnisses zu bestimmen, sondern Verlaufskontrollen durchzuführen (Bokemeyer, 2003). Individuelle Unterschiede bei Lymphozytensubpopulationen stellten Smith *et al.* (2002) auch bei Fohlen fest. In der Veterinärmedizin müssen weiterhin bestimmte alters- und rassenabhängige Abweichungen mit-

berücksichtigt werden. So sind bei älteren Pferden die absolute Lymphozytenzahl und die relativen Anteile der B-, T-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen im Vergleich zu jungen Pferden erniedrigt, bei den CD8⁺-Zellen ist dieser Unterschied sogar signifikant. Zusätzlich weisen junge Pferde eine signifikant niedrigere CD4⁺:CD8⁺ Ratio auf, als ältere Tiere (McFarlane *et al.*, 2001). Altersabhängige Schwankungen könnten auch bei den im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit untersuchten Pferden eine Rolle gespielt haben.

Die Korrelation der klinischen und virologischen Ergebnisse der Pferde mit denen der Durchflusszytometrie entsprechend der Darstellung in Tab. 10 ergab, dass die relativen Anteile der T-, CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten sowie die CD4⁺:CD8⁺ Ratio in allen vier untersuchten Gruppen ähnlich häufig erhöht bzw. erniedrigt waren. Dagegen wiesen augenranke EHV-2-nPCR positive Pferde (Gruppe 1) etwas häufiger einen erhöhten relativen B-Lymphozytenanteil auf, als augengesunde EHV-2-nPCR negative Pferde (Gruppe 4). Auffällig ist die Verminderung des relativen B-Lymphozytenanteils bei 67% der EHV-2-nPCR positiven augengesunden Pferde (Gruppe 2). Im Vergleich zu EHV-2-nPCR negativen augenranken (Gruppe 3) und klinisch gesunden Pferden (Gruppe 4) war diese Verminderung signifikant unterschiedlich ($p = 0,0303$ bzw. $0,0307$). Interessanterweise waren drei von vier Pferden (75%) der Gruppe 2 (Pferde LG 8, LG 14, LG 15) mit einem erniedrigten relativen B-Lymphozytenanteil in den PBL, und nur ein Pferd (LG 10) im Augentupfer EHV-2-nPCR positiv (Tabelle 2b im Anhang). Zudem wies das vierte PBL-EHV-2-nPCR positive Pferd (LG 21) dieser Gruppe (Tabelle 1c im Anhang) einen relativen B-Lymphozytenanteil (6%) am unteren Normwert auf.

Ob eine EHV-2 Infektion oder Reaktivierung die B-Zellzahl messbar reduzieren kann oder aber andere Faktoren hierfür verantwortlich sind, lässt sich anhand der Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit nicht klären. Auch ist nicht bekannt, ob Pferde mit einem verminderten relativen B-Lymphozytenanteil und einer EHV-2 Infektion eher eine Augenerkrankung entwickeln als andere. Es ist aber zu vermuten, dass insbesondere individuelle Unterschiede im Immunsystem, aber auch Faktoren wie Alter, Rasse, Gesundheitszustand, Infektionsstatus und rezidivierende Infekte der Pferde entscheidend Einfluss nehmen auf den Ausbruch einer eventuellen EHV-2-induzierten Keratokonjunktivitis. Auch Ackermann (2006) vermutet, dass die Entstehung von mit Gammaherpesvirusinfektionen assoziierten Krankheiten dadurch begünstigt wird, dass das Immunsystem daran scheitert, die bei der Aufrechterhaltung der Latenz vorliegende Balance der komplexen Interaktion von Virus und Wirtszelle zu wahren - virale Cytokine wie das viruscodierte Interleukin 10 könnten dabei eine bedeutende regulatorische Funktion übernehmen. Smith *et al.* (2002) wiederum vermuten bei Fohlen, dass individuelle Unterschiede bei den Lymphozytensubpopulationen dafür verantwortlich sind,

dass einige Tiere während der Perinatalperiode empfänglich für Infektionen sind und andere nicht.

Zu einer Erhöhung der Lymphozytenanteile kommt es unter anderem bei chronischen Entzündungen wie sie zum Beispiel bei manchen viralen Infektionskrankheiten ausgelöst werden, wohingegen akute Virusinfektionen und chronischer Stress eher zu einer Erniedrigung der Lymphozyten führen (Kraft und Dürr, 2005). Altersabhängige oder rassenspezifische Unterschiede könnten in diesem Zusammenhang wiederum eine Rolle spielen. Beim Menschen wurde eine signifikante Erhöhung des B-Lymphozytenanteils bei HIV-positiven Patienten im Vergleich zu gesunden Personen festgestellt (Sampalo *et al.*, 1993). Auch bei mit einem bestimmten Isolat des BVD (Bovine Virus Diarrhoe)- Virus infizierten Kälbern wurde ein im Vergleich zum gesunden Tier erhöhter relativer B-Zellanteil in der Literatur beschrieben (Marshall *et al.*, 1994). Schließlich wurden bei an einer *Rhodococcus equi* Pneumonie leidenden Fohlen höhere absolute und prozentuale B-Zellkonzentrationen festgestellt, als bei gleichaltrigen gesunden Tieren (Flaminio *et al.*, 1999). Bedeutende, individuell unterschiedliche immunologische Mechanismen sollen dabei mit einer erhöhten Empfänglichkeit für eine *Rhodococcus equi* Infektion assoziiert sein (Chaffin *et al.*, 2004b).

Bei Schweinen wird eine Aktivierung des Immunsystems durch das Porcine Circovirus Typ 2 (PCV-2) als Ursache für die Ausprägung des bei Absatzferkeln vorkommenden und zu massiven Verlusten in Ferkelerzeugerbetrieben führenden so genannten „Postweaning Multi-systemic Wasting“ (PMWS)- Syndroms diskutiert (Segalés *et al.*, 2001). Dabei spricht vieles für einen immunsupprimierenden Effekt des Virus, der sich in einer geringeren antigenpräsentierenden Fähigkeit und einem Funktionsverlust von B- und CD4⁺-Zellaktivität bedingen soll (Sarli *et al.*, 2001). Bei durchflusszytometrischen Analysen wurde bei Schweinen mit PMWS unter anderem ein reduzierter Gehalt an CD8⁺-T-Zellen festgestellt (Darwich *et al.*, 2002).

Als Indiz für eine gestörte Immunantwort werden auch Normabweichungen der mittels des Differentialblutbildes erfassbaren zellulären Komponenten des Immunsystems angesehen. Bei der hier beschriebenen Studie wurde daher von allen 31 Pferden ein Differentialblutbild in Ergänzung der durchflusszytometrischen Untersuchungen erstellt und mit den Resultaten der virologischen Untersuchungen korreliert. Insgesamt wiesen nur wenige Pferde Normabweichungen beim Differentialblutbild auf. Auch signifikante Unterschiede zwischen EHV-2-nPCR positiven und negativen augenkranken bzw. gesunden Pferden traten nicht auf (Tab. 11). Dies deutet zusammen mit den zuvor diskutierten Resultaten der Durchflusszytometrie darauf hin, dass das Immunsystem auf eine EHV-2-Infektion insbesondere mit einer Adaption der lymphozytären Komponenten reagiert. Dies erscheint insofern auch naheliegend, als

dass letztere vor allem gegen Viren hocheffektiv sind (Kayser *et al.*, 2001). Generell reagieren die Leukozyten beim Pferd, zum Beispiel im Vergleich zum Hund oder der Katze, weniger sensibel, daher ist das Auftreten einer Abweichung bei der Leukozytenzahl bei erstgenannter Spezies auch wesentlich kritischer zu bewerten (Eikmeier und Manz, 1968). Abweichungen bei der Leukozytenzahl wiesen insgesamt nur drei augengesunde (LG 10, LG 12, LG 19) und ein augenkrankes Pferd (LK 10) auf, zudem lagen die Werte der Pferde auch nur knapp über dem oberen Referenzwert (siehe Tabelle 2 a und b im Anhang). Einzig bei Pferd LG 10 wurde eine deutliche Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl festgestellt, interessanterweise erwiesen sich bei diesem Pferd auch beide Augentupfer als EHV-2-nPCR positiv. Denkbar wäre, dass EHV-2-Genom hier aufgrund einer Virusreaktivierung, oder aber in Folge einer Neuinfektion im Auge detektiert wurde, da eine pathologische Erhöhung der Leukozytenzahl insbesondere bei akuten Infektionskrankheiten auftritt. Neueste Befunde, die eine mögliche Präsenz von EHV-2 Genom und Antigen in Konjunktiven augengesunder Pferde in Langerhans-Zellen aufzeigen (Borchers *et al.*, 2006a), was ebenfalls eher auf eine Neuinfektion bzw. Reaktivierung des Virus, als auf eine latente Infektion hindeutet, untermauern diese Hypothese.

Insgesamt gesehen liefern die Ergebnisse dieser Studie erste Hinweise darauf, dass bei augengesunden EHV-2 positiven Pferden die B-Lymphozytenzahlen erniedrigt sind. Da B-Lymphozyten unter anderem Antikörper produzieren, die eine bedeutende Rolle bei der Eliminierung von Antigenen aus dem jeweiligen Organismus spielen, könnte dies bei EHV-2 infizierten Pferden zu einer entscheidenden Infektanfälligkeit führen. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs sollten diese Ergebnisse jedoch nur als erste Indizien für einen möglichen Einfluss des EHV-2 auf die zellulären bzw. humoralen Komponenten des Immunsystems angesehen werden. In jedem Fall liefert die Durchflusszytometrie zusätzliche, bei der diagnostischen und möglicherweise prognostischen Bewertung entzündlicher Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva des Pferdes hilfreiche Informationen. Gezielte Untersuchungen hinsichtlich der Beeinflussung der B-Lymphozyten wären jedoch sinnvoll und sollten bei einer größeren Anzahl von Pferden mit unterschiedlichen klinischen Symptomen durchgeführt werden. Dabei sollten auch die zu untersuchenden Pferdeguppen gezielter ausgewählt und beispielsweise mehr akut erkrankte, unbehandelte Pferde untersucht werden. Auch langfristige Verlaufskontrollen zur genauen Dokumentation des An- und Abstiegs der B-Lymphozytenzahl in Kombination mit wiederholten klinischen und virologischen Untersuchungen wären sinnvoll. In diesem Zusammenhang wäre auch die Untersuchung ehemals gesunder, aber EHV-2 positiv getesteter Pferde auf die spätere Entwicklung klinischer Symptome hin von besonderem Interesse.

5.2 PCR-Untersuchung von diagnostischen Blut- und Tupferproben augenkranker und augengesunder Pferde auf Doppelinfektionen mit EHV-2 und/oder EHV-5, EAdV-1, Chlamydien und Mykoplasmen

Der Verdacht einer möglichen ätiologischen Beteiligung von viralen und/oder bakteriellen Co-Faktoren an der Pathogenese der Keratokonjunktivitis des Pferdes war einerseits in der Tatsache begründet, dass sowohl EHV-5 als auch EAdV-1 im Zusammenhang mit entzündlichen Augenerkrankungen des Pferdes detektiert wurden (Gleeson *et al.*, 1978; Krüdwagen *et al.*, 2001) und andererseits bei augenkranken Tieren unterschiedlicher Spezies Doppelinfektionen mit Herpesviren und Chlamydien (Nasisse *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 2002) bzw. Mykoplasmen (Haesebrouck *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1998) beschrieben sind bzw. postuliert werden.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit auf EHV-2 untersuchten Proben wurden weder in Cytobrush-/Augentupfern noch in den peripheren Blutleukozyten signifikante Unterschiede im PCR-Nachweis zwischen augenkranken und gesunden Pferden erzielt. Während 20 Prozent der zehn augenkranken (LK1-LK10) bzw. 9,5 Prozent der 21 gesunden Pferde (LG1-LG21) der Laboklin-Studie Tupfer-EHV-2-nPCR positiv waren, erwiesen sich bei den Diagnostikuntersuchungen 13,8 Prozent der 94 untersuchten kranken und 18,2 Prozent der 44 gesunden Augen als EHV-2-nPCR positiv. Diese Resultate repräsentieren die in jüngster Zeit von anderen Autoren (Krüdwagen *et al.*, 2001; Besthorn, 2002) beschriebenen Ergebnisse, die ebenfalls keine signifikante Korrelation der Merkmale augenkrank und EHV-2 positiv erzielen konnten. Erneut wurde auch eine vom Krankheitsbild unabhängige Präsenz des Virus in den PBL, wie bereits von mehreren Autoren aufgezeigt (Kemeny und Pearson, 1970; Roeder und Scott, 1975; Schlocker *et al.*, 1995; Borchers *et al.*, 1997; Kershaw, 2002; von Borstel, 2003), bei dieser Arbeit festgestellt, da sich 20 Prozent der zehn augenkranken Pferde der Laboklin-Studie (LK1-LK10) bzw. 25 Prozent der zwölf im Rahmen der Diagnostik untersuchten augenkranken Pferde als PBL-EHV-2-nPCR positiv erwiesen, während bei klinisch gesunden Pferden EHV-2-Genom mit einer Nachweisrate von jeweils 19% bei 21 respektive 26 Pferden in den PBL detektiert wurde. Entsprechend den Ergebnissen von Drummer *et al.* (1996) dürfte somit auch hier latent in den B-Lymphozyten vorliegendes EHV-2 detektiert worden sein.

Auffällig ist jedoch, dass im Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren (Borchers *et al.*, 1997; Kershaw *et al.*, 2001; von Borstel, 2003) insgesamt nur bei sehr wenigen Pferden EHV-2-Genom in den Augentupfern bzw. peripheren Blutleukozyten mittels nPCR festgestellt wurde, obwohl die bei den Pferden der Laboklin-Studie durchgeführten serologischen Untersuchungen einen erfolgten vorausgegangenen Kontakt mit EHV-2 bei allen Pferden aufzeigten. Insbesondere die Chronizität der Erkrankung bei den augenkranken Pferden der

Studie könnte jedoch Ursache dafür sein, dass EHV-2 diagnostisch nicht mehr im Augentupfer zu erfassen war, da neun der zehn Pferde zum Zeitpunkt der Probennahme bereits seit mehreren Wochen Krankheitssymptome zeigten. Zum Teil waren die Studientiere auch schon vorbehandelt. Im Rahmen der Diagnostikuntersuchungen wurden, soweit eine Aussage anhand der vorliegenden Anamnesedaten getroffen werden kann, ebenfalls überwiegend chronisch kranke Pferde beprobt. Auch Gilger *et al.* (2005) gehen von falsch negativen Ergebnissen aufgrund einer zu geringen im Gewebe vorliegenden Erregeranzahl aus. Generell hängt die Sensitivität einer PCR-Methode von vielen Faktoren ab. Einerseits können bei der Untersuchung von Augentupfern falsch-negative Ergebnisse aufgrund zu wenig Zellmaterial und/oder wenig „virus load“ in den Zellen vorkommen. Andererseits wurde im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit eine sehr sensitive nested PCR eingesetzt, bei der ein positives Ergebnis schon bei 1 fg gereinigter Virus-DNA (entspricht rund drei EHV-2-Genomen) erzielt werden kann.

Auch die Einsendung durch unterschiedliche Probennehmer könnte die geringe Nachweisrate von EHV-2 bedingt haben. Bei den Arbeiten von Kershaw (2002) und von Borstel (2003) wurden die Pferde hingegen immer von ein und demselben Tierarzt mit entsprechender praktischer Erfahrung in der Diagnostik der equinen Keratokonjunktivitis und unter weitgehend standardisierten Bedingungen untersucht und beprobt. Denkbar wäre auch, dass die sich aus organisatorischen Gründen ergebende Zeitspanne zwischen Probennahme und virologischer Untersuchung zu groß war und die Stabilität des Virus beeinflusst wurde, insbesondere bei Tupfern die sich nicht im Isolationsmedium befanden. Erschwerend kommt hinzu, dass augenkranken Pferde mit den unterschiedlichsten Krankheitsbildern untersucht wurden, wenngleich dies in den vorangegangenen Studien zu EHV-2 und equiner Keratokonjunktivitis in ähnlicher Weise erfolgt ist (Kershaw *et al.*, 2001; Krüdwagen *et al.*, 2001; Besthorn, 2002). Gemeinsamkeit aller entzündlichen Erkrankungsformen der Kornea und/oder Konjunktiva des Pferdes ist zudem, dass es sich um einen entzündlichen Prozess handelt, dessen Ursache in Ermangelung eindeutiger ätiologischer Zusammenhänge (wie Trauma oder ähnliches) unklar ist und der durch eine Chronizität und unter Umständen Therapieresistenz gekennzeichnet ist. Ohnehin ist die klinische Symptomatik der am ehesten mit einer Virusinfektion im ätiologischen Zusammenhang beschriebenen so genannten „Herpeskeratitis“ nicht einheitlich, am häufigsten wird hierfür das Bild einer Keratitis punctata genannt (Thein und Hartl, 1976a; Miller *et al.*, 1990; Collinson *et al.*, 1994). Von Oppen (2001) hingegen geht davon aus, dass es kein spezifisches klinisches Bild für das Vorliegen einer Viruskeratitis gibt.

EHV-2-Genom wurde bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pferden mit nahezu gleicher Häufigkeit sowohl in kranken, als auch in gesunden Augen detektiert. Dies unterstützt die These, dass EHV-2 die klinische Symptomatik der equinen Keratokonjunktivitis nicht alleine hervorrufen kann. Vielmehr dürfte es sich bei der Erkrankung um ein multifaktorielles Geschehen handeln, an dem möglicherweise auch mitverursachende virale und/oder bakterielle Co-Faktoren beteiligt sind. Inwieweit dabei Doppelinfektionen des EHV-2 mit EHV-5, EAdV-1, Chlamydien und/oder Mykoplasmen von Bedeutung sind, wurde daher im Anschluß an die EHV-2-Untersuchungen überprüft.

Wie zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen auf EHV-5 zeigen, wurde Virusgenom bei einem Viertel (25 Prozent) aller untersuchten kranken und jedem fünften (20 Prozent) gesunden Auge nachgewiesen. Diese Nachweisrate war zwischen kranken und gesunden Augen zwar nicht signifikant unterschiedlich, lag jedoch im Vergleich mit der Nachweisrate von EHV-2 insgesamt höher. Im Gegensatz zu den Studien von Besthorn (2002) und Krüdwagen *et al.* (2001), die EHV-5-Genom häufiger aus dem gesunden als dem kranken Auge mittels PCR nachwiesen, bei Besthorn (2002) sogar signifikant häufiger, wurde EHV-5-Genom im Rahmen dieser Arbeit häufiger im kranken Auge detektiert. Auch wurde in der vorliegenden Arbeit eine wesentlich sensitivere „nested“ PCR im Vergleich mit den zuvor genannten Untersuchungen (Krüdwagen *et al.*, 2001; Besthorn, 2002) angewendet. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass EHV-5 - neben EHV-2 - an der Pathogenese entzündlicher Augenerkrankungen des Pferdes beteiligt ist.

Ob sich die beiden equinen Gammaherpesviren dabei gegenseitig beeinflussen und so zur Erkrankung führen, kann von den Ergebnissen dieser Arbeit nicht zweifelsfrei abgeleitet werden, da Doppelinfektionen mit EHV-2 und EHV-5 nur selten - jeweils in einem von 40 kranken bzw. zehn gesunden Augen - festgestellt wurden. Auch Besthorn (2002) respektive Krüdwagen *et al.* (2001) wiesen EHV-2- und EHV-5-Genom gleichzeitig nur bei drei von 81 kranken respektive einem von 15 gesunden Pferden nach.

Hinweise auf eine Beteiligung des equinen Adenovirus an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva des Pferdes ergaben sich aus der Bedeutung von Adenoviren als Verursacher von Keratokonjunktividen beim Mensch (Sundmacher *et al.*, 2001), der Isolation des EAdV-1 aus dem Auge bei mehreren Fohlen mit Keratokonjunktivitis (Todd, 1969; England *et al.*, 1973; Thompson *et al.*, 1976) und der selten erfolgten parallelen Isolation von Adenoviren und dem Herpes Simplex Virus bei entzündlichen humanen Augenerkrankungen (Deutsch, 1989). Für die gezielte Untersuchung von Augentupferproben auf EAdV-1 war zunächst die Etablierung einer nested PCR im Rahmen dieser Arbeit nötig, deren Spezifität und Sensitivität vor der Untersuchung von Probenmaterial überprüft

worden war. In 19, von 15 augenkranken Pferden stammenden Augentupferproben - davon drei EHV-2-nPCR positive - konnte EAdV-1-Genom jedoch nicht nachgewiesen werden. McMullen (2003), der eine weitaus größere Augentupferprobenzahl - 58 klinisch apparente und 34 dazugehörige klinisch inapparente kontralaterale Augen von 47 augenkranken sowie 72 klinisch inapparente Augen von 36 gesunden Pferden - vergleichend mittels PCR auf EAdV-1/-2, EHV-2 und EHV-5 untersuchte, konnte EAdV-1-Genom ebenfalls nur bei einem gesunden Pferd beidseitig im Auge detektieren, während er EHV-2- bzw. -5-Genom in jeweils 14 von 46 (Nachweisrate 30 Prozent) kranken Augen nachwies. Der Autor kommt dabei zu dem Schluss, dass es wohl keinen ätiologischen Zusammenhang zwischen equinen Adenoviren und entzündlichen Augenerkrankungen beim Pferd gibt. Im Vergleich zur Studie von McMullen (2003) wurde bei der hier vorgelegten Arbeit die sensitivere nested PCR eingesetzt, auch die Probennahmetechnik und Probandenpopulation unterschied sich von der McMullens: während McMullen (2003) die Probennahme mittels Baumwolltupfern durchführte, wurden bei der hier vorgelegten Arbeit Cytobrushtupfer eingesetzt, durch die eine wesentlich größere Zellmaterialmenge und gegebenenfalls vorhandene Virusmenge vom Auge abgenommen werden kann. Bei McMullen (2003) bestand die Gruppe der augenkranken Pferde zudem sowohl aus Tieren mit entzündlicher Symptomatik der Kornea und/oder Konjunktiva, als auch aus Tieren mit inneren Augenerkrankungen (Uveitis, Glaukom), während bei der hier vorgelegten Arbeit ausschließlich Augen mit Kerato- und/oder Konjunktivitis untersucht wurden. Insgesamt verdichten sich somit die Anzeichen dafür, dass equine Adenoviren - und hier insbesondere das EAdV-1 - an der Pathogenese der equinen Keratokonjunktivitis nicht beteiligt sind.

In Ergänzung der Untersuchungen auf virale Erreger wurden im Rahmen dieser Arbeit stichprobenartig Augentupferproben von Pferden auf Chlamydien und Mykoplasmen mittels spezifischer PCR untersucht, da okuläre Doppelinfektionen mit diesen beiden Bakterienarten und Herpesviren bei verschiedenen Spezies vorkommen. Insbesondere *Chlamydophila felis* wurde bereits des öfteren gemeinsam mit FHV-1 im Auge bei Katzen mit Konjunktivitis detektiert (Mard *et al.*, 1993; Nasisse *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 2002; Helps *et al.*, 2003; Rampazzo *et al.*, 2003), während Mykoplasmen zusammen mit IBRV bei Rindern mit Infektiöser Boviner Keratokonjunktivitis nachgewiesen wurden (Naglic *et al.*, 1996) und gemeinsam den Krankheitsprozess beschleunigen sollen (Brown *et al.*, 1998). Insgesamt wurden bei dieser Arbeit 20 Tupferproben (davon sechs Tupfer in denen zuvor EHV-2-Genom detektiert worden war) von jeweils sechs augenkranken und -gesunden Pferden untersucht. Chlamydien- und Mykoplasmen-Genom wurde jedoch in keinem Tupfer nachgewiesen. Hinweise für eine Beteiligung dieser beiden Erreger an entzündlichen Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva des Pferdes ergaben sich demnach nicht, auch wenn eine definitive Aussage auf-

grund der geringen Stichprobenzahl nicht getroffen werden sollte. Zu berücksichtigen ist auch, dass möglicherweise aufgrund einer zu geringen DNA-Ausbeute falsch negative Ergebnisse erzielt wurden. Auch der untersuchte hohe Anteil chronisch kranker Pferde, bei denen mögliche, die Krankheit verursachende Erreger bereits wieder aus dem Auge eliminiert wurden, könnte falsch negative Ergebnisse bedingt haben.

Insgesamt konnten durch die Untersuchungen auf bakterielle und virale Co-Faktoren keine wirklich entscheidenden, die Pathogenese der equinen Keratokonjunktivitis klärenden neuen Erkenntnisse erzielt werden, zumal auch die klinische Relevanz von EHV-2 aufgrund der geringen und zwischen augenkranken und gesunden Pferden kaum unterschiedlichen Nachweisrate kontrovers diskutiert werden muss. Die Wahrscheinlichkeit einer die Krankheit beeinflussenden Wirkung durch Chlamydien, Mykoplasmen oder EAdV-1 scheint zwar nicht sehr hoch zu sein, dennoch sollte eine definitive Aussage aufgrund der geringen Probenzahl und DNA-Ausbeute noch nicht getroffen werden. Vielversprechender als die Ergebnisse der Untersuchungen auf Bakterien und EAdV-1 waren in jedem Fall die EHV-5-Resultate die den Schluss zulassen, dass EHV-5 durchaus eine Rolle bei equinen entzündlichen Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva spielen könnte, insbesondere da im kranken Auge EHV-5-Genom im Vergleich zu EHV-2 häufiger detektiert wurde.

5.3 Untersuchungen zum Gewebe- und Zelltropismus des EHV-2 und des EHV-5 im Augengewebe

Bisher wurde von mehreren Autoren die Vermutung geäußert, dass EHV-2 in latentem Zustand im Auge vorliegen könnte (Borchers *et al.*, 1998; Kershaw, 2002; Ebert *et al.*, 2003), ohne jedoch den letztendlich entscheidenden Beweis hierfür zu liefern. Vielmehr begründete sich dieser Verdacht in dem häufigen Virusgenomnachweis in Konjunktival- bzw. Kornealgeweben insbesondere auch bei klinisch gesunden Pferden, da bei regelmäßiger Präsenz des Virus in bestimmten Geweben auf eine Latenz geschlossen werden kann. Auch aufgrund der von anderen Spezies vorliegenden Ergebnisse werden Kornea und Konjunktiva als Latenzorte von EHV-2 im Auge favorisiert: beim Menschen respektive der Katze erwies sich die Kornea als HSV-1- und EBV-, respektive FHV-1-PCR-positiv (Chodosh *et al.*, 1996; Nasisse *et al.*, 1998; Kaye *et al.*, 2000), während bei Rindern BHV-4-Genom-Nachweise mittels PCR in Proben der Konjunktiva geführt wurden (Egyed und Bartha, 1998). Von EHV-5 fehlen direkte Untersuchungen hinsichtlich eines Vorkommens im Augengewebe noch ganz, vielmehr beschränkten sich die bisherigen Untersuchungen auf einige wenige PCR-Analysen von Tupferproben (Krüdwagen *et al.*, 2001; Besthorn, 2002).

Durch die Kooperation mit einem Pferdeschlachthof in Genthin war es möglich geworden, bei 14 augengesunden Pferden Augenpaare und zusätzlich bei neun dieser Pferde Cytobrushtupferproben zu entnehmen. Die Cytobrushtupfer und aus den Augen präparierten Gewebe-

proben (Konjunktiva, Kornea, Nervus opticus und Retina bei fünf Pferden, Konjunktiva bei neun Pferden) wurden dann im Rahmen dieser Arbeit mittels nPCR systematisch auf EHV-2 untersucht. Zusätzlich wurden Cytobrushtupfer von neun und Augengewebeproben von zwölf der 14 Pferde auch auf EHV-5 untersucht. Schließlich wurde die *In situ*-Hybridisierung für die direkte Detektion von EHV-2 im Augengewebe angewendet, da diese Methode im Vergleich zur PCR den Vorteil birgt, dass positive Reaktionen in Bezug zur Morphologie gesetzt werden können. Diese Untersuchungen an gesunden Augengeweben sollten weitere Anhaltspunkte hinsichtlich des Gewebe- und Zelltropismus von EHV-2 und -5 und damit zum Verständnis der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva beim Pferd liefern. Die Lokalisation von EHV-2 im Auge mittels *In situ*-Hybridisierung könnte zusätzlich Aufschluss darüber geben, ob und wenn ja in welchem Zelltyp das Virus in latentem Zustand vorliegt, oder ob der häufige EHV-2-Genom-Nachweis im Auge in der Übertragung des Virus auf epitheliales Gewebe durch latent infizierte zirkulierende Blutleukozyten und der damit verbundenen fluktuierenden Ausscheidung von EHV-2 mit dem Mucus begründet ist.

Insgesamt wurde weder in der Kornea, noch in der Retina, noch im Nervus opticus EHV-2-Genom detektiert. Während Kershaw (2002) noch von einer 10%igen Nachweisrate in Korneaprobe augengesunder Pferde berichtet und auch FHV-1 (Nasisse *et al.*, 1998) bzw. HSV-1 (Kaye *et al.*, 2000) in der Kornea mittels PCR nachgewiesen wurden, konnte eine tatsächliche Präsenz des Virus in der Kornea augengesunder Pferde bei dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Gleiches gilt für eine Präsenz von EHV-2 im Nervus opticus. Borchers *et al.* (2006a) erzielten in diesem Nervengewebe hingegen bei 13 augengesunden Pferden aus der Pathologie eine Nachweisrate von 15 Prozent, zudem wurde EHV-2-Genom hier bei vier Pferden in der Tränendrüse detektiert (Nachweisrate 31 Prozent). Vergleichbare Untersuchungen an der Retina sind in der Literatur zumindest für EHV-2 nicht beschrieben. Von HSV-1 ist bekannt, dass es in schweren Verlaufsformen über die Hornhaut hinaus alle Strukturen des Auges befallen und so zum Beispiel die Retina infizieren kann (Culbertson *et al.*, 1982).

In der Konjunktiva konnte EHV-2-Genom hingegen aus beiden Augen eines Pferdes (S 9) sowie in zwei Cytobrushtupfern eines weiteren Pferdes (S 6) detektiert werden. Diese geringe Nachweisrate von EHV-2 in der Konjunktiva (7,1%) steht im deutlichen Gegensatz zu den Beobachtungen von Ebert *et al.* (2003) bzw. Borchers *et al.* (2006a) bei 13 augengesunden Pferden aus der Pathologie, bei denen 62% der untersuchten Konjunktiven EHV-2-nPCR positiv waren. Insgesamt deuten die Ergebnisse jedoch darauf hin, dass EHV-2 im Auge vor allem in der Konjunktiva präsent ist. Welche Zellen der Konjunktiva genau Träger

des EHV-2 sind, sollte mittels der *In situ*-Hybridisierung versucht werden zu klären. Wie die exemplarisch am Konjunktivalgewebe des Pferdes S 9 durchgeführte *In situ*-Hybridisierung ergab, ist EHV-2 im Auge in der Bindegewebsschicht der Conjunctiva palpebralis präsent. Denkbar wäre, dass EHV-2 in diesem Gewebe in latentem Zustand vorliegt, da die Konjunktiva des untersuchten Pferdes keinerlei Anzeichen einer Augenentzündung zeigte, durch die auf ein akutes Geschehen, möglicherweise unter EHV-2-Beteiligung, geschlossen werden könnte. Letztendlich kann diese Vermutung jedoch nur durch den Nachweis von nicht-infektiösen, jedoch mittels Kokultivierung reaktivierbaren Viren verifiziert werden.

Um zu klären, in welcher Zellart des konjunktivalen Bindegewebes EHV-2 präsent ist, wurden im Anschluß an diese Arbeit weiterführende Untersuchungen durchgeführt (Borchers *et al.*, 2006a). Da die Konjunktiva zu den Gewebearten zählt, die besonders reich an Immunzellen sind war zu vermuten, dass EHV-2 hier in lymphatischen Zellen präsent ist. Insbesondere CD8⁺-T-Zellen, aber auch einige B- bzw. CD4⁺-T-Zellen lassen sich in der Lamina propria der Conjunctiva palpebralis detektieren (Gelatt, 1999). Weiterhin könnten die positiven Signale auch von CD1⁺ Dendritischen Zellen bzw. Makrophagen ausgehen, da diese Immunzellen in der Konjunktiva ebenfalls in größerer Anzahl vorkommen, was in Anbetracht der Tatsache, dass mukosale Gewebe sehr häufig die primäre Eintrittspforte für Pathogene darstellen, nicht überraschen dürfte. Diese letzte Vermutung konnte mit den Untersuchungen von Borchers *et al.* (2006a) auch bestätigt werden. Mittels immunhistologischer Färbung und Phänotypisierung (Bartels *et al.*, 1998), einer Methode die unter anderem schon seit längerem zur Diagnostik der humanen Herpes-Keratitis erfolgreich angewendet wird (Herbort, 1985; Collum *et al.*, 1987) und bei der man die Spezifität von Antikörpern nutzt, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen, konnten virale DNA und Antigen von EHV-2 mit großer Wahrscheinlichkeit in Langerhans-Zellen ausgemacht werden. Als Langerhans-Zellen werden antigenpräsentierende, sternförmige Zellen in der Haut bezeichnet, die als Prototyp unreifer Dendritischer Zellen gelten (Steinman, 1991). Bei *in vitro* Versuchen konnten aus equinen Monozyten isolierte dendritische Zellen ebenfalls mit einer Mutante des EHV-2 infiziert werden (Borchers *et al.*, 2005a). Dies erhärtet den Verdacht, dass EHV-2 in Langerhans Zellen in der Konjunktiva präsent ist. Diese könnten neben den B-Lymphozyten (Drummer *et al.*, 1996) einen weiteren möglichen Latenzort des EHV-2 innerhalb des lymphatischen Gewebes darstellen, auch wenn Borchers *et al.* (2006a) eher von einer produktiven Infektion der Konjunktiva ausgehen. Das murine Gammaherpesvirus MHV-68 kann, in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebetyp, zum Beispiel auch in Dendritischen Zellen in der Milz in latentem Zustand vorkommen (Flano *et al.*, 2000).

Die erzielten Ergebnisse lassen auch gewisse Rückschlüsse auf die Pathogenese der equinen Keratokonjunktivitis zu. Da Dendritische Zellen die Fähigkeit besitzen, Pathogene aufzunehmen (Levine und Chain, 1992) ist zu vermuten, dass EHV-2 infolge einer Infektion des Auges vom Immunsystem zwar zunächst erkannt, jedoch nicht vollständig eliminiert werden konnte. Entsprechend den Ausführungen von Gilger (2005), der bei Pferden mit ätiologisch ungeklärter Keratitis davon ausgeht, dass die aktive Entzündung des Gewebes entweder durch Mikroorganismen direkt, oder durch deren Induktion von immunologischen Kreuzreaktionen mit Autoantigenen in der Kornea erfolgt, könnte die klinische Symptomatik auch bei Pferden mit Keratokonjunktivitis durch die permanente Präsentation von EHV-2-Antigenen in Langerhans Zellen der Konjunktiva ausgelöst werden.

Der Nachweis von EHV-5-Genom aus Konjunktivalgewebe bei augengesunden Pferden, wie im Rahmen dieser Arbeit bei zwei Augen eines Pferdes (S 6) erfolgt, ist in der Literatur bis dato noch nicht beschrieben. Dies deutet zusätzlich zu den bei dieser Arbeit erzielten Diagnostikergebnissen von Augentupferproben augenkranker und gesunder Pferde auf eine Beteiligung dieses Virus bei entzündlichen Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva hin und sollte Anlass weiterführender Untersuchungen sein.

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte erneut die Präsenz des Equinen Herpesvirus Typ 2 bei Pferden in Augentupfern und den PBL aufgezeigt werden, wenn auch statistisch nicht relevant mit einer entzündlichen Augenerkrankung korrelierend.

Vielmehr verdichten sich die Anzeichen dahingehend, dass es sich bei der equinen Keratokonjunktivitis um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bei dem EHV-2 zwar vermutlich beteiligt ist, es jedoch bedingt durch individuelle Unterschiede des Immunsystems erst zur Entstehung einer klinischen Symptomatik kommt. Dies würde generell auch die hohe Prävalenz des Virus unter klinisch gesunden Pferden erklären. Möglicherweise ist in diesem Zusammenhang auch eine Beeinflussung der B-Lymphozyten durch EHV-2 von Bedeutung, wie sie aufgrund der erzielten durchflusszytometrischen Ergebnisse vermutet werden kann. In Anbetracht des geringen Stichprobenumfangs sollten diesbezüglich gezielte Untersuchungen und auch langfristige Verlaufskontrollen durchgeführt werden.

Die Präsenz des Virus in den lymphatischen Langerhans Zellen der Konjunktiva gesunder Augen, die nach Aufnahme des viralen Antigens als antigenpräsentierende Zellen fungieren deutet zudem darauf hin, dass es sich ähnlich der HSK des Menschen auch bei der equinen Keratokonjunktivitis um eine Erkrankung handeln könnte, der immunpathologische Prozesse zugrunde liegen. Die ständige Präsentation des EHV-2-Antigens könnte dabei eine immunzellvermittelte Entzündungsreaktion und damit die klinische Symptomatik bedingen. Weiterführende Untersuchungen sollten daher auf den Nachweis von Entzündungszellen, Cyto-

kinen oder auch von Immunkomplexen in cytologischen Präparaten von Augentupfern abzielen. Zudem sollten zukünftige Studien die bei der Pathogenese der Erkrankung möglicherweise bedeutende Funktion der Langerhans Zellen als Virusreservoir berücksichtigen.

Aufgrund des sowohl in kranken, als auch in gesunden Augen erfolgten Virusgenomnachweises ist eine Beteiligung des EHV-5 an der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva des Pferdes ebenfalls denkbar, unabhängig ob als alleiniges Pathogen oder in Form eines Co-Faktors mit EHV-2. Zukünftige Untersuchungen zur equinen Keratokonjunktivitis sollten in jedem Fall auf eine mögliche Beteiligung des EHV-5 abzielen. Dabei sollte auch geklärt werden, inwieweit sich die beiden equinen Gammaherpesviren bei der Pathogenese der Erkrankung gegenseitig beeinflussen. Nicht sehr wahrscheinlich ist hingegen, dass Chlamydien, Mykoplasmen und/oder EAdV-1 eine Rolle als Co-Faktoren bei der equinen Keratokonjunktivitis spielen, aufgrund der geringen Stichprobenzahl und limitierten DNA-Ausbeute sollte diese Möglichkeit jedoch (noch) nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Auch andere, bisher noch nicht näher untersuchte Co-Faktoren könnten von Bedeutung sein. So könnte ein neuer Untersuchungsansatz auf den Nachweis der so genannten „Umweltchlamydien“ abzielen, einer in jüngster Zeit entdeckten Bakterienart, die mit den „klassischen“ Chlamydien (wie *C. felis*) eng verwandt sind und als potenzielle Krankheitserreger diskutiert werden (Birtles *et al.*, 1997). „Umweltchlamydien“, die ebenfalls zur Ordnung *Chlamydiales* gehören, hier aber zwei neue Gattungen, *Parachlamydia* und *Neochlamydia*, repräsentieren sind weit verbreitet und haben ein breites Wirtsspektrum, wobei die Mehrzahl aller bislang bekannten „Umweltchlamydien“ als Symbionten frei lebender Amöben vorkommen (Collingro und Horn, 2005). Aufgrund ihrer Fähigkeit, sich in Amöben zu vermehren vermutet man, dass „Umweltchlamydien“ auch resistent gegenüber einer Zerstörung durch phagozytäre Zellen des Immunsystems sind (Goy und Greub, 2005). Eine Isolation dieser neuen Chlamydienarten gelang bereits bei Katzen mit neutrophiler und eosinophiler Keratokonjunktivitis (Sykes, 2005). Denkbar wäre, dass „Umweltchlamydien“ auch bei Pferden mit ätiologisch ungeklärter Keratokonjunktivitis eine Rolle spielen.

Neben „Umweltchlamydien“ könnten aber auch Leptospiren oder die zu den Nematoden zählenden *Onchocercus*-Arten an entzündlichen Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva des Pferdes beteiligt sein. Leptospiren manifestierten sich bereits in Form einer Keratouveitis im Auge eines Pferdes (Wada *et al.*, 2003), während *Onchocercus cervicalis* mit Keratitis, Keratokonjunktivitis und Keratouveitis beim Pferd assoziiert wird (Munger, 1983).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Pathogenese der entzündlich bedingten Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva des Pferdes auch mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen noch nicht letztendlich geklärt werden konnte und es nach wie vor noch genügend offene Fragen gibt, die es in detaillierten Untersuchungen zu beantworten gilt.