

## **4 Ergebnisse**

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Forschungsarbeit teilen sich in 2 Kapitel:

4.1 Systematische Untersuchungen von Equiden mit und ohne Augenerkrankungen aus der Klinik für Pferde (TiHoHa)

4.2 Untersuchungen zum Gewebetropismus von EHV-2

Kapitel 4.1 beschäftigt sich mit einer möglichen Beteiligung von EHV-2 an der equinen Keratokonjunktivitis. Es wurden die nPCR-Ergebnisse verschiedener Proben, Gruppen und Untersuchungszeitpunkte miteinander verglichen, die nPCR-Amplifikate näher betrachtet, gewonnene Virusisolate molekularbiologisch und biologisch untersucht und serologische Tests ausgewertet.

Kapitel 4.2 versucht dem Gewebetropismus und möglichen Latenzorten von EHV-2, vor allem in okulären Geweben, auf den Grund zu gehen.

## **4.1 Systematische Untersuchungen von augenkranken und gesunden Equiden aus der Klinik für Pferde (TiHoHa)**

### **4.1.1 Einleitung**

Wie schon in Kapitel 1.4.4 erörtert, postulieren viele Autoren eine Beteiligung von EHV-2 an der equinen Keratokonjunktivitis. Beispielsweise gelang Thein und Böhm (1976) die Isolierung von EHV-2 aus Augentupfern eines an einer Keratokonjunktivitis erkrankten Fohlens. Von Kershaw et al. (2001) wurde mittels nPCR ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen EHV-2-Nachweis und der Keratokonjunktivitis festgestellt. So waren von 27 augenkranken Tieren 44% EHV-2-positiv, hingegen aber nur 10% der 21 gesunden Kontrollpferde.

In der hier vorliegenden Studie wurden die Untersuchungsergebnisse einer Testgruppe von 28 Tieren mit Keratitis und/oder Konjunktivitis mit einer zahlenmäßig gleichstarken, klinisch unauffälligen Kontrollgruppe verglichen. Beide Gruppen (Kapitel 4.1.2) wurden zweimal im Abstand von etwa 4-5 Wochen einer allgemein klinischen- und einer speziell ophthalmologischen Untersuchung unterzogen (Kapitel 4.1.3), in deren Rahmen von jedem Tier Zitratblut, eine Nasentupferprobe und aus beiden Augen Cytobrush- und Wattetupferproben genommen wurden. Jeweils 3 Tiere von Test- und Kontrollgruppe sind nicht zur Nachuntersuchung erschienen.

Bei der Bearbeitung der Proben wurden verschiedene Methoden für den EHV-2-Nachweis angewendet. Die Untersuchung sämtlicher Tupferproben und der PBMC mittels nPCR dienten der Beantwortung der Frage, ob EHV-2 in den verschiedenen Proben bei einer der beiden Gruppen häufiger nachzuweisen war als bei der anderen sowie dem Vergleich des EHV-2-Nachweises zwischen Erst- und Zweituntersuchung (Kapitel 4.1.4.1 und 4.1.4.3). Zusätzlich wurden Wattetupfer und Cytobrushes als Probenträger für die Probennahme aus dem Auge verglichen (Kapitel 4.1.4.2). Ferner wurde einem Einfluß des Vorhandenseins von EHV-2 im Auge auf den Nachweis in der Nase nachgegangen (Kapitel 4.1.4.4), und es wurde der in Kapitel 3.8.2.2 erwähnte nPCR-Amplifikatgrößenpolymorphismus untersucht, um mögliche Zusammenhänge zwischen Fragmentgröße und einer Augenerkrankung bzw. dem Ursprungsgewebe der Probe zu erkennen (Kapitel 4.1.4.5). Außerdem wurden mit den Cytobrushproben und den PBMC Kokultivierungen durchgeführt und die so gewonnenen Isolate molekularbiologisch und biologisch charakterisiert (Kapitel 4.1.5). Das Blut wurde serologisch getestet, und die Ergebnisse von Test- und Kontrollgruppe wurden auf einen Zusammenhang zwischen EHV-2-Antikörper-Nachweis und den Merkmalen augenkrank und gesund hin geprüft (Kapitel 4.1.6).

#### 4.1.2 Zusammensetzung der Test- und Kontrollgruppe

Die insgesamt 56 Tiere unterteilen sich in zwei Gruppen zu je 28 Equiden. Die an Keratitis, Konjunktivitis oder Keratokonjunktivitis erkrankten Tiere der Testgruppe wurden mit T1-T28, die gesunden Pferde der Kontrollgruppe mit K1-K28 fortlaufend durchnummeriert. Ferner wurden die Ergebnisse der Erstuntersuchung mit einem „a“ nach der Nummer gekennzeichnet, die der Zweituntersuchung mit einem „b“.

Die 10 Stuten und 18 Wallache der Testgruppe waren zwischen 3 und 22 Jahre alt. Das Durchschnittsalter betrug 10 Jahre. Die Gruppe setzte sich aus 20 Warmblutpferden, 4 Maultieren, 2 Island-Ponys, einem Traber und einem Vollblut XX zusammen. Da die Patienten T22, T23 und T24 nicht zur Nachuntersuchung erschienen waren, konnten nur 25 der 28 Testtiere erneut untersucht und beprobt werden.

In der Kontrollgruppe befanden sich 9 Stuten und 19 Wallache, die zwischen 2 und 19 Jahre alt waren. Das Durchschnittsalter betrug 8,4 Jahre. Die Gruppe setzte sich aus 19 Warmblutpferden, 7 Trabern und 2 Reitponys zusammen. Auch in dieser Gruppe wurden 3 Pferde (K1, K2, K13) kein zweites Mal vorgestellt. Detailliertere Angaben über Diagnose, Alter, Geschlecht und Rasse befinden sich im Anhang (Kapitel 8.1, Tabelle I a&b).

#### 4.1.3 Ergebnisse der klinischen Allgemeinuntersuchungen und der ophthalmologischen Untersuchungen

Bei der allgemeinen klinischen Untersuchung waren bis auf zwei Tiere alle unauffällig. Das Pferd „India“ mit der Nummer T4 zeigte bei der Zweituntersuchung erhöhte Puls- und Atemfrequenzen und Transpiration. Im weiteren Verlauf der Untersuchung fiel das Pferd in ein akutes Schockgeschehen und verstarb leider, wie sich bei der Sektion herausstellte, an einem ruptierten Hämangiosarkom in der Milz. Das Pferd T17 litt zu beiden Untersuchungsterminen an einer geringgradigen chronischen Lungenerkrankung.

**Tabelle 5** Ophthalmologische Diagnosen der Testgruppe bei Erst- und Zweituntersuchung

Diagnose bei [n Tieren]	Erstuntersuchung [n=28]	Zweituntersuchung [n=25]
Keratitis punctata/maculosa	12	5 *
Keratitis superficialis	6	3
Keratitis vasculosa	3	2
Keratitis profunda	3	3
Konjunktivitis	2	0
Bullöse Keratopathie	1	1
Hornhautabrasion	1	0
klinisch unauffällig	0	11

\* bei 3 Pferden wurde keine Zweituntersuchung durchgeführt

Bei der ophthalmologischen Untersuchung der Testgruppe wurden Keratitis punctata, Keratitis maculosa, Keratitis superficialis, Keratitis vasculosa, Keratitis profunda, Konjunktivitis, bullöse Keratopathie und Hornhautabrasion diagnostiziert. Die jeweiligen Symptome traten bei 27 Tieren nur auf einem Auge auf. Der Patient T27 war hingegen auf beiden Augen an einer Keratitis punctata erkrankt, so daß bei den 28 Testtieren 29 erkrankte und 27 gesunde Augen vorkamen. Die Tabelle 5 gibt die ophthalmologischen Diagnosen der Testgruppe bei Erst- und Zweituntersuchung wieder. Die Diagnosen für jedes einzelne Tier finden sich im Anhang (Kapitel 8.1, Tabelle I a).

Die Tiere der Kontrollgruppe waren in der klinischen- und ophthalmologischen Untersuchung unauffällig.

#### **4.1.4 Nachweis von EHV-2 in den verschiedenen Tupferproben und in PBMC mittels nPCR**

Ziel dieser Untersuchung war es erstens zu überprüfen, ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen EHV-2-Nachweis bei den verschiedenen Tupferproben oder den PBMC und den Merkmalen augenkrank und gesund besteht sowie den EHV-2-Nachweis zwischen Erst- und Zweituntersuchung zu vergleichen (Kapitel 4.1.4.1 und 4.1.4.3), zweitens festzustellen, welcher der verwendeten Probenträger für die Beprobung des Auges besser geeignet ist (Kapitel 4.1.4.2), drittens zu ermitteln, ob bei positiven Augenbefunden die Nachweishäufigkeit im Nasentupfer ansteigt (Kapitel 4.1.4.4) und viertens, einer möglichen Korrelation zwischen Amplifikatgröße und Virulenz oder Gewebetropismus auf den Grund zu gehen (Kapitel 4.1.4.5).

Dazu wurden aus PBMC, Cytobrush-, Wattetupfer- und Nasentupferproben DNA isoliert, welche dann der molekularbiologischen nPCR-Analyse unterzogen wurden.

Die nPCR-Ergebnisse sind detailliert im Anhang (Kapitel 8.1, Tabelle I c-f) dargestellt.

##### **4.1.4.1 Ergebnisse der EHV-2-nPCR-Untersuchungen von Cytobrush- und Wattetupferproben bei Test- und Kontrollgruppe zur Erst- und Zweituntersuchung**

In diesem Kapitel wurde untersucht, mit welcher Häufigkeit sich EHV-2 in den verschiedenen Tupferproben aus dem Auge detektieren ließ, um einen möglichen Zusammenhang zwischen EHV-2-Nachweis und den Merkmalen augenkrank und gesund zu erkennen. Ferner wurden die nPCR-Ergebnisse der Augentupferproben von Erst- und Zweituntersuchung beider Gruppen miteinander verglichen.

Es wurden von jedem Tier aus jedem Auge je eine Wattetupferprobe und 2 Cytobrushproben entnommen. Die Proben wurden, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, aufgearbeitet und anschließend mittels nPCR (Kapitel 3.8.2) untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Cytobrush- und Wattetupferproben wurden in den Tabellen 6 und 7 zusammengefaßt und detailliert im Anhang (Kapitel 8.1, Tabelle I c-f) dargestellt. Im folgenden werden die Augen der Testtiere, die zur Erstuntersuchung Symptome einer Augenerkrankung aufwiesen zum Zeitpunkt der Zweituntersuchung als „(ehemals) erkrankte Augen“ bezeichnet.

**Tabelle 6** Zusammenfassung der nPCR-Ergebnisse bei der Erst- und Zweituntersuchung von Cytobrush- und Wattetupferproben der Test- und Kontrollgruppe in Bezug auf die Nachweishäufigkeit von EHV-2

EHV-2- Nachweis [n Tiere] in	Testgruppe				Kontrollgruppe			
	Erstunter- suchung [n=28]		Zweitunter- suchung [n=25]		Erstunter- suchung [n=28]		Zweitunter- suchung [n=25]	
	CB	WT	CB	WT	CB	WT	CB	WT
keinem Auge	11	22	13	17	10	26	14	20
einem Auge	15	6	6	8	13	2	8	5
beiden Augen	2	0	6	0	5	0	3	0
mindestens einem Auge	17	6	12	8	18	2	11	5

CB: Cytobrushproben      WT: Wattetupferproben

**Tabelle 7** Zusammenfassung der nPCR-Ergebnisse bei der Erst- und Zweituntersuchung von Cytobrush- und Wattetupferproben der Test- und Kontrollgruppe in Bezug auf die Nachweishäufigkeit von EHV-2 in erkrankten, (ehemals) erkrankten und gesunden Augen

EHV-2-positive Proben/insges. untersuchte Proben aus	Testgruppe				Kontrollgruppe			
	Erstunter- suchung [n=56]		Zweitunter- suchung [n=50]		Erstunter- suchung [n=56]		Zweitunter- suchung [n=50]	
	CB	WT	CB	WT	CB	WT	CB	WT
krk Augen	11/29	3/29	11/26	5/26	0/0	0/0	0/0	0/0
gesunden Augen	8/27	3/27	7/24	3/24	23/56	2/56	14/50	5/50

CB: Cytobrushproben      WT: Wattetupferproben      insges.: insgesamt

krk: erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten

Da der Patient T27 als einziger auf beiden Augen erkrankt war, sind in Tabelle 9 29 bzw. 26 erkrankte Augen bzw. (ehemals) erkrankte Augen der 28 bzw. 25 untersuchten Testtiere aufgeführt.

In den folgenden Absätzen wird auf die Tabellen 6 und 7 Bezug genommen, wobei für jede Gruppe, jeden Untersuchungszeitpunkt und jeden Probenträger zunächst die Daten der Tabelle 6 und dann die Daten der Tabelle 7 beschrieben werden.

Bei der Erstuntersuchung der Testgruppe konnte in den Cytobrushproben von 11/28 (39%) Pferden kein EHV-2 gefunden werden. Bei 17/28 (61%) Tieren wurde EHV-2-Genom in der Cytobrushprobe von mindestens einem Auge nachgewiesen. Bei 2 Pferden gelang der Nachweis auf beiden Augen. Diese beiden Tiere waren die Patienten T21 und T27, wobei ersterer nur auf einem Auge und letzterer auf beiden Augen Symptome einer Augenerkrankung zeigte. Insgesamt wurde bei der Erstuntersuchung in Cytobrushproben von 11/29 (38%) erkrankten und 8/27 (30%) klinisch unauffälligen Augen EHV-2 detektiert. In Wattetupferproben konnte bei 22/28 (79%) Pferden kein EHV-2 nachgewiesen werden. Bei 6/28 (21%) Tieren wurde in einer der beiden Wattetupferproben EHV-2-DNA gefunden. Bei diesen 6 Tieren stammten die EHV-2-positiven Wattetupferproben in 3 Fällen aus dem erkrankten Auge und in 3 Fällen aus dem klinisch unauffälligen Auge.

Bei der Zweituntersuchung der Testgruppe fielen die EHV-2-nPCR-Untersuchungen der Cytobrushproben bei 13/25 (52%) Pferden negativ aus. Bei 12/25 (48%) Patienten erfolgte der EHV-2-Nachweis in Cytobrushproben auf mindestens einem Auge, wobei er in 11/26 (42%) (ehemals) erkrankten und in 7/24 (29%) klinisch unauffälligen Augen gelang. Bei 6 Tieren (T2, T18, T20, T21, T27, T28) konnte EHV-2 in Cytobrushproben von beiden Augen gefunden werden. In den Wattetupferproben konnte bei 17/25 (68%) Pferden kein EHV-2 nachgewiesen werden. Bei den Wattetupferproben von 8/25 (32%) Pferden konnte EHV-2-DNA detektiert werden. Bei diesen 8 Tieren wurde in 5 Fällen im (ehemals) erkrankten und in 3 Fällen im klinisch unauffälligen Auge EHV-2-DNA nachgewiesen.

Bei der Erstuntersuchung der Kontrollgruppe konnte bei 10/28 (36%) Pferden kein EHV-2 in Cytobrushproben gefunden werden. EHV-2-DNA wurde bei 18/28 (64%) Tieren in Cytobrushproben von mindestens einem Auge detektiert. Bei 5 Pferden waren beide Augen positiv. Die Untersuchungen der Wattetupferproben blieben bei 26/28 (93%) Tieren negativ. Der EHV-2-Nachweis gelang bei 2/28 (7%) Kontrolltieren in der Wattetupferprobe von jeweils einem Auge.

Bei der Zweituntersuchung der Kontrollgruppe wurde in den Cytobrushproben bei 14/25 (56%) Tieren kein EHV-2 gefunden. EHV-2-Genom konnte bei 11/25 (44%) Pferden in der Cytobrushprobe von mindestens einem Auge detektiert werden, wobei 3 Kontrolltiere auf beiden Augen positiv waren. Bei 20/25 (80%) Pferden konnte EHV-2 in Wattetupferproben nicht nachgewiesen werden. EHV-2 wurde bei 5/25 (20%) Kontrolltieren in der Wattetupferprobe eines Auges gefunden.

Mittels  $\chi^2$ -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit (Kapitel 3.10.1) konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem EHV-2-Nachweis in Cytobrush- oder Wattetupferproben und den Merkmalen augenkrank und gesund festgestellt werden. Bei dem Vergleich des EHV-2-Nachweises in Proben aus den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten und gesunden Augen der Testtiere ließ sich in erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen zwar häufiger EHV-2 nachweisen, doch zeigte der  $\chi^2$ -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit auch hier keinen statistisch signifikanten Zusammenhang.

Die Tabellen 8a bis 9b vergleichen die Ergebnisse der Erst- und Zweituntersuchung von Cytobrush- und Wattetupferproben bei Test- und Kontrollgruppe, um eine statistische Auswertung der Entwicklung des Virusnachweises in einem Zeitraum von etwa 4-5 Wochen durchzuführen.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt für jedes Auge einzeln, wobei in den Vergleich nur die 25 Tiere (somit  $2 \times 25 = 50$  Augen) einfließen konnten, die zur Zweituntersuchung vorgestellt worden waren.

**Tabelle 8a** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Cytobrushproben der Testtiere bei Erst- und Zweituntersuchung

Nachweis von EHV-2 in [n Cytobrushproben] bei der		Erstuntersuchung	
		positiv [n=19]	negativ [n=31]
Zweitunter- suchung	positiv [n=18]	9	9
	negativ [n=32]	10	22

**Tabelle 8b** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Cytobrushproben der Kontrolltiere bei Erst- und Zweituntersuchung

Nachweis von EHV-2 in [n Cytobrushproben] bei der		Erstuntersuchung	
		positiv [n=22]	negativ [n=28]
Zweitunter- suchung	positiv [n=14]	8	6
	negativ [n=36]	14	22

Wie Tabelle 8a zeigt, gelang in den Cytobrushproben der Testgruppe der EHV-2-Nachweis auf ein und demselben Auge zu beiden Untersuchungsterminen in 9 Proben, nur bei der Erstuntersuchung in 10 Proben, nur bei der Zweituntersuchung in 9 Proben und in 22 Proben zu keinem Zeitpunkt.

Aus Tabelle 8b wird ersichtlich, daß die Untersuchung der Cytobrushproben der Kontrollgruppe in 8 Fällen bei Erst- und Zweituntersuchung, in 14 Fällen lediglich bei der

Erstuntersuchung und in 6 Fällen lediglich bei der Zweituntersuchung EHV-2-positive Resultate erbrachte. Zu beiden Untersuchungsterminen konnte in 22 Proben kein EHV-2 gefunden werden.

Bei beiden Gruppen konnte in Cytobrushproben zum Zeitpunkt der Zweituntersuchung seltener EHV-2 nachgewiesen werden als zur Erstuntersuchung.

**Tabelle 9a** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Wattetupferproben der Testtiere bei Erst- und Zweituntersuchung

Nachweis von EHV-2 in [n Wattetupferproben] bei der		Erstuntersuchung	
		positiv [n=6]	negativ [n=44]
Zweitunter- suchung	positiv [n=8]	2	6
	negativ [n=42]	4	38

**Tabelle 9b** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Wattetupferproben der Kontrolltiere bei Erst- und Zweituntersuchung

Nachweis von EHV-2 in [n Wattetupferproben] bei der		Erstuntersuchung	
		positiv [n=2]	negativ [n=48]
Zweitunter- suchung	positiv [n=5]	0	5
	negativ [n=45]	2	43

In den Wattetupferproben der Testgruppe (Tabelle 9a) konnte in 2 Fällen bei Erst- und Zweituntersuchung, in 4 Fällen nur bei der Erstuntersuchung, in 6 Fällen nur bei der Zweituntersuchung und in 38 Fällen gar kein EHV-2-Genom detektiert werden.

Die Tabelle 9b zeigt, daß bei den Wattetupferproben der Kontrollgruppe zu beiden Untersuchungsterminen nie EHV-2 in ein und demselben Auge nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis gelang in 2 Augen bei der Erstuntersuchung, in 5 Augen bei der Zweituntersuchung und in 43 Augen gar nicht.

Bei beiden Gruppen konnte EHV-2 in Wattetupferproben häufiger zum Zeitpunkt der Zweituntersuchung als zur Erstuntersuchung nachgewiesen werden.

Mittels McNemar-Test (Kapitel 3.10.2) ließ sich bei den Tieren der Test- und der Kontrollgruppe weder bei den Cytobrushproben noch bei den Wattetupferproben ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den EHV-2-nPCR-Ergebnissen der Erst- und Zweituntersuchung feststellen.



*Zusammenfassend ist zu sagen, daß sich mittels  $\chi^2$ -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Virusgenom-Nachweis und einer Augenerkrankung zeigten.*

*In der nPCR wurde der EHV-2-Nachweis in Cytobrushproben bei der Zweituntersuchung seltener geführt als zur Erstuntersuchung. In den Wattetupferproben hingegen ließ sich EHV-2 bei der Zweituntersuchung häufiger detektieren.*

*Im McNemar-Test zeigten sich in den beiden Augenprobenträgern der Test- und Kontrolltiere keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den nPCR-Ergebnissen der Erst- und Zweituntersuchung.*

#### **4.1.4.2 Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Wattetupfer- und Cytobrushproben**

In den Tabellen 10-12 wird die Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Cytobrush- und Wattetupferproben verglichen, um festzustellen, welche Probennahmetechnik in Bezug auf Sensitivität und diagnostische Relevanz am geeignetsten ist, EHV-2 nachzuweisen. Dabei wurden die Untersuchungsergebnisse der Cytobrush- und Wattetupferproben von jedem einzelnen Auge zu beiden Untersuchungszeitpunkten zusammengefaßt (von Test- und Kontrollgruppe jeweils 2x28 Augen zur Erstuntersuchung und jeweils 2x25 Augen zur Zweituntersuchung, somit jeweils 106 Augen pro Gruppe) und für die Testgruppentiere in Tabelle 10 und für die Kontrollgruppentiere in Tabelle 11 dargestellt. In der Tabelle 12 wurden die nPCR-Ergebnisse beider Untersuchungszeitpunkte der erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen betrachtet.

**Tabelle 10** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Wattetupfer- und Cytobrushproben, die von den Testtieren zu beiden Untersuchungszeitpunkten entnommen wurden

	Nachweis von EHV-2 in [n Augen]	Cytobrush	
		positiv [n=37]	negativ [n=69]
Wattetupfer	mittels positiv [n=14]	12	2
	negativ [n=92]	25	67

Wie aus Tabelle 10 hervorgeht, gelang der EHV-2-Nachweis in der Testgruppe zu beiden Untersuchungsterminen in 12 Fällen sowohl bei der Cytobrush- als auch bei der Wattetupferprobe desselben Auges, in 25 Fällen lediglich in Cytobrushproben und in 2 Fällen nur in Wattetupferproben. Bei 67 Augen blieben die Untersuchungen auf EHV-2-negativ.

**Tabelle 11** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Wattetupfer- und Cytobrushproben, die von den Kontrolltieren zu beiden Untersuchungszeitpunkten entnommen wurden

	Nachweis von EHV-2 in [n Augen]	Cytobrush	
		positiv [n=37]	negativ [n=69]
Wattetupfer	mittels positiv [n=7]	4	3
	negativ [n=99]	33	66

Die Ergebnisse der Kontrollgruppe werden in Tabelle 11 aufgezeigt. Aus ihr ist zu entnehmen, daß in 4 Fällen Cytobrush- und Wattetupferprobe, in 33 Fällen nur die Cytobrushprobe und in 3 Fällen nur die Wattetupferprobe EHV-2-positiv waren. In den Proben von 66 Augen ließ sich kein EHV-2-Nachweis führen.

Bei Test- und Kontrolltieren wurden insgesamt 212 Augen (von Test- und Kontrollgruppe jeweils 106 Augen) untersucht. Dabei wurde EHV-2 in 16 (8%) Augen in Cytobrush- und Wattetupferproben, in 58 (27%) Augen nur in Cytobrushproben, in 5 (2%) Augen nur in Wattetupferproben und in 133 Augen (63%) gar nicht nachgewiesen.

Eine statistische Auswertung mittels McNemar-Test (Kapitel 3.10.2) zeigte, daß sowohl in der Testgruppe ( $\chi^2=6,1>3,84$ ) als auch in der Kontrollgruppe ( $\chi^2=12>3,84$ ) zu beiden Untersuchungszeitpunkten der EHV-2-Nachweis mittels nPCR in Cytobrushproben signifikant häufiger gelang als in Wattetupferproben.

Die Tabelle 12 vergleicht die Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Cytobrush- und Wattetupferproben, wobei nur die erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testtiere Berücksichtigung finden.

**Tabelle 12** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Wattetupfer- und Cytobrushproben, die aus den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testtiere zu beiden Untersuchungszeitpunkten entnommen wurden

	Nachweis von EHV-2 in [n Augen]	Cytobrush	
		positiv [n=22]	negativ [n=33]
Wattetupfer	mittels positiv [n=8]	8	0
	negativ [n=47]	14	33

Da das Pferd T27 auf beiden Augen erkrankt war, wurden zur Erst- bzw. Zweituntersuchung 29 erkrankte bzw. 26 (ehemals) erkrankte Augen der 28 bzw. 25 untersuchten Tiere beprobt, so daß insgesamt 55 (29+26 Augen) erkrankte bzw. (ehemals) erkrankte Augen in der Tabelle 12 aufgeführt sind.

Die Tabelle 12 zeigt, daß bei den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen in 8 Fällen Wattetupfer- und Cytobrushprobe und in 14 Fällen nur die Cytobrushprobe EHV-2-positiv waren. In 33 Augen ließ sich kein EHV-2 detektieren.

Mittels McNemar-Test (Kapitel 3.10.2) konnte - auch bei ausschließlicher Betrachtung der erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testtiere - in der nPCR ein statistisch signifikant häufigerer EHV-2-Nachweis in Cytobrushproben als in Wattetupferproben festgestellt werden ( $\chi^2=4,1>3,84$ ).

In den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testgruppe gelang die gleichzeitige Detektion von EHV-2 in Cytobrush- und Wattetupferproben aus 8/55 (15%) Augen, wobei immer dann, wenn der EHV-2-Nachweis in der Wattetupferprobe gelang, auch die Cytobrushprobe positiv war. In den gesunden Augen von Test- und Kontrollgruppe (Testgruppe: 27 und 24 Augen und Kontrollgruppe: 28x2 und 25x2 Augen, somit insgesamt 157 Augen) wurde gleichzeitig in Cytobrush- und Wattetupferproben bei 8/157 (5%) Augen EHV-2 gefunden. Wendet man hier den  $\chi^2$ -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit (Kapitel 3.10.1) an, so zeigt er, daß der gleichzeitige EHV-2-Nachweis in Wattetupfer- und Cytobrushproben statistisch signifikant häufiger in den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testtiere als in den gesunden Augen von Test- und Kontrolltieren geführt werden konnte ( $\chi^2=5,2>3,84$ ). Ein solcher Vergleich ist allerdings nur unter der Prämisse zulässig, daß das Vorkommen von EHV-2 in dem erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten und dem gesunden Auge ein und desselben Tieres unabhängig voneinander ist.

*Zusammenfassend ist zu sagen, daß im McNemar-Test beim Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Testgruppe, Kontrollgruppe und in den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testtiere die Cytobrushproben stets statistisch signifikant häufiger EHV-2-positiv waren als die Wattetupferproben.*

*Bei der statistischen Auswertung der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Cytobrush- und Wattetupferproben mittels McNemar-Test lag die Abweichung von der Symmetrie bei der Kontrollgruppe ( $\chi^2=12$ ) höher als bei der Testgruppe ( $\chi^2=6,1$ ). Der niedrigste Wert trat bei ausschließlicher Betrachtung der erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen von den Testtieren auf ( $\chi^2=4,1$ ).*

Mittels  $\chi^2$ -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit wurde festgestellt, daß der gleichzeitige EHV-2-Nachweis mittels nPCR in Wattetupfer- und Cytobrushproben statistisch signifikant häufiger in den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testtiere als in den gesunden Augen von Test- und Kontrolltieren geführt wurde.

#### 4.1.4.3 Ergebnisse der EHV-2-nPCR-Untersuchungen von Nasentupfern und PBMC bei Test- und Kontrollgruppe zur Erst- und Zweituntersuchung

In diesem Kapitel wurde versucht zu klären, ob es einen möglichen Zusammenhang zwischen dem EHV-2-Nachweis in den Nasentupferproben und PBMC und den Merkmalen augenkrank und gesund gibt. Hierfür wurde von jedem Tier ein Nasentupfer entnommen, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, aufgearbeitet und anschließend mittels nPCR (Kapitel 3.8.2) untersucht. Die PBMC wurden aus Zitratblut über einen Biocollgradienten isoliert (Kapitel 3.5.1), dann die Gesamt-DNA präpariert (Kapitel 3.5.2) und im Massenspektrometer vermessen, um schließlich per nPCR (Kapitel 3.8.2) auf EHV-2 getestet zu werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Nasentupfer und der PBMC wurden in der Tabelle 13 zusammengefaßt und detailliert im Anhang (Kapitels 8.1, Tabellen I c-f) dargestellt.

**Tabelle 13** Zusammenfassung der nPCR-Ergebnisse bei der Erst- und Zweituntersuchung der Test- und Kontrollgruppe von Nasentupferproben und PBMC

EHV-2-positive Proben/insgesamt untersuchte Proben bei der	Erstuntersuchung		Zweituntersuchung	
	NaT	PBMC	NaT	PBMC
Testgruppe	5/28	9/18	2/24	5/16
Kontrollgruppe	4/26	14/26	1/23	13/25

NaT: Nasentupferprobe

Die Tabelle 13 gibt die nPCR-Ergebnisse der Untersuchung von Nasentupferproben und PBMC wieder. Es wurde zwar angestrebt, von jedem Tier bei jeder Untersuchung jeweils eine Nasentupfer- und eine Blutprobe zu entnehmen, aber aus organisatorischen Gründen war dies nicht immer möglich, so daß die Anzahl der entnommenen Proben zumeist geringer als die Anzahl der Test- bzw. Kontrolltiere ist.

Der EHV-2-Nachweis per Nasentupfer konnte bei der Erstuntersuchung der Testgruppe bei 5/28 (18%) Pferden geführt werden. Zum Zeitpunkt der Zweituntersuchung waren 2/24 (8%) Tiere EHV-2-positiv, wobei eines der beiden Tiere (T16) auch bei der Erstuntersuchung ein positives Ergebnis gezeigt hatte.

In der Kontrollgruppe konnte EHV-2 bei der Erstuntersuchung bei 4/26 (15%) Pferden und bei der Zweituntersuchung bei 1/23 (4%) Tieren in Nasentupferproben gefunden werden.

Bei den Untersuchungen der PBMC gelang die Detektion von EHV-2-DNA in der Testgruppe bei 9/18 (50%) Pferden bei der Erstuntersuchung und bei 5/16 (31%) Tieren bei der Nachuntersuchung, wobei 3 Tiere (T10, T14, T16) beide Male ein positives Ergebnis zeigten. In der Kontrollgruppe ließ sich bei Erst- bzw. Zweituntersuchung der PBMC bei 14/26 (54%) bzw. 13/25 (52%) Pferden EHV-2 nachweisen. Hier waren 8 Tiere (K4, K6, K7, K8, K12, K15, K26, K27) zu beiden Terminen EHV-2-positiv.

Die Tabellen 14a bis 15b vergleichen die Ergebnisse der Erst- und Zweituntersuchung von Nasentupferproben und PBMC bei Test- und Kontrollgruppe, um die Entwicklung der Virusinfektion in einem Zeitraum von etwa 4-5 Wochen zu beobachten.

**Tabelle 14a** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Nasentupferproben der Testtiere bei Erst- und Zweituntersuchung

Nachweis von EHV-2 in [n Nasentupferproben] bei der		Erstuntersuchung	
		positiv [n=4]	negativ [n=20]
Zweituntersuchung	positiv [n=2]	1	1
	negativ [n=22]	3	19

**Tabelle 14b** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Nasentupferproben der Kontrolltiere bei Erst- und Zweituntersuchung

Nachweis von EHV-2 in [n Nasentupferproben] bei der		Erstuntersuchung	
		positiv [n=4]	negativ [n=19]
Zweituntersuchung	positiv [n=1]	0	1
	negativ [n=22]	4	18

Bei den Pferden T27, K14 und K15 lagen bei der Zweituntersuchung keine Nasentupfer vor, so daß bei diesen Tieren kein Vergleich von Erst- und Zweituntersuchung möglich ist. Somit konnten von den jeweils 25 zur Zweituntersuchung erschienenen Tieren nur 24 Testtiere und 23 Kontrolltiere in den Vergleich einbezogen werden.

Der EHV-2-Nachweis in den Nasentupferproben der Testgruppe (Tabelle 14a) gelang einmal zu beiden Untersuchungsterminen, in 3 Proben nur bei der Erstuntersuchung, einmal nur bei der Zweituntersuchung und in 19 Proben gar nicht.

Wie in Tabelle 14b zu erkennen ist, wurde in den Nasentupferproben der Kontrollgruppe nie bei ein und demselben Tier zu beiden Untersuchungen EHV-2 gefunden. Die Detektion von EHV-2-Genom gelang in 4 Proben nur bei der Erstuntersuchung, einmal nur bei der Zweituntersuchung und in 18 Proben gar nicht.

**Tabelle 15 a** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in PBMC der Testtiere bei Erst- und Zweituntersuchung

Nachweis von EHV-2 in [n PBMC] bei der		Erstuntersuchung	
		positiv [n=9]	negativ [n=6]
Zweitunter- suchung	positiv [n=4]	3	1
	negativ [n=11]	6	5

**Tabelle 15 b** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in PBMC der Kontrolltiere bei Erst- und Zweituntersuchung

Nachweis von EHV-2 in [n PBMC] bei der		Erstuntersuchung	
		positiv [n=14]	negativ [n=11]
Zweitunter- suchung	positiv [n=13]	8	5
	negativ [n=12]	6	6

Aus organisatorischen Gründen konnten nur bei 15 Testtieren zu beiden Untersuchungszeitpunkten Blutproben entnommen werden.

Tabelle 15a zeigt, daß zu beiden Untersuchungsterminen die PBMC der Testtiere in 3 Fällen EHV-2-positiv waren. Bei 6 Patienten konnte nur bei der Erstuntersuchung, bei einem nur bei der Zweituntersuchung und bei 5 Pferden gar kein EHV-2 in den PBMC detektiert werden.

Aus Tabelle 15b ist abzulesen, daß in den PBMC der Tiere der Kontrollgruppe in 8 Fällen bei der Erst- und Zweituntersuchung, in 6 Fällen nur bei der Erstuntersuchung, in 5 Fällen nur bei der Zweituntersuchung und in 6 Fällen zu keinem Zeitpunkt EHV-2 nachgewiesen wurde.

Mittels  $\chi^2$ -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit (Kapitel 3.10.1) war kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem EHV-2-Nachweis in Nasentupfern oder PBMC und den Merkmalen augenkrank und gesund feststellbar. Mittels McNemar-Test (Kapitel 3.10.2) ließ sich weder in PBMC noch in Nasentupferproben ein signifikanter Unterschied zwischen den nPCR-Ergebnissen der Erst- und Zweituntersuchung der Test- und Kontrolltiere feststellen.

*Zusammenfassend bleibt zu bemerken, daß sich im  $\chi^2$ -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem EHV-2-Nachweis in Nasentupfern und PBMC und einer Augenerkrankung zeigte.*

*In den Nasentupferproben und in den PBMC beider Gruppen wurde EHV-2 seltener zum Zeitpunkt der Zweituntersuchung als zur Erstuntersuchung gefunden. Mittels McNemar-Test ließ sich weder in den PBMC noch in den Nasentupferproben ein signifikanter Unterschied bei der Nachweishäufigkeit von EHV-2 zur Erst- und Zweituntersuchung feststellen.*

#### 4.1.4.4 Nachweis von EHV-2 im Auge bei EHV-2-positiver Nasentupferprobe

In der Testgruppe wurde insgesamt in 7 Nasentupferproben EHV-2 mittels nPCR nachgewiesen. In 5 dieser Fälle wurde in mindestens einer Cytobrush- oder Wattetupferprobe des Auges ebenfalls EHV-2 gefunden.

In der Kontrollgruppe wurde EHV-2 in 5 Nasentupferproben detektiert, wobei in 4 dieser Fälle gleichzeitig auch mindestens eine Cytobrush- oder Wattetupferprobe des Auges EHV-2-positiv war.

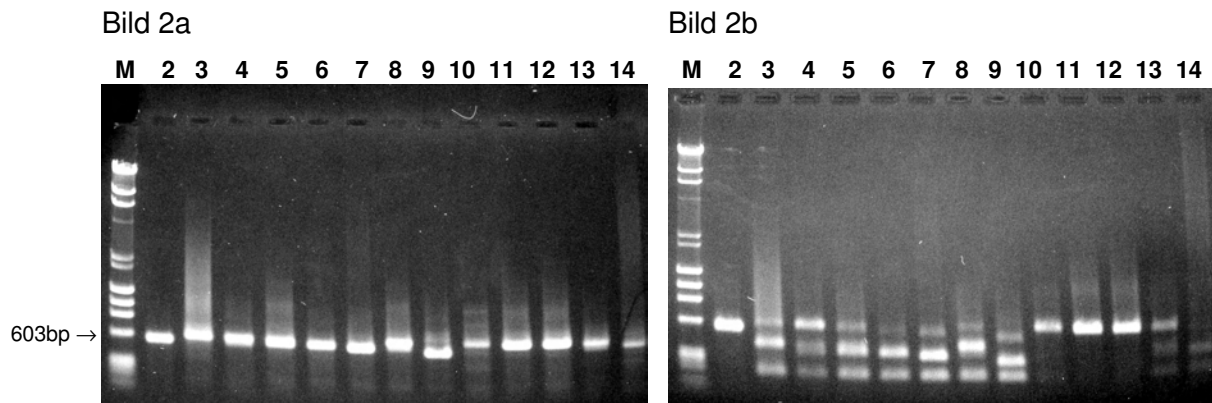
*Zusammenfassend ist festzuhalten, daß insgesamt in der Test- und Kontrollgruppe bei EHV-2-positiver Nasentupferprobe bei 9/12 (75%) Pferden ebenfalls der Virus-Nachweis im Auge gelang.*

#### 4.1.4.5 Vergleich der unterschiedlich großen nPCR-Amplifikate (Teil-Genom-Vergleich)

Wie bereits in Kapitel 3.8.2.2 beschrieben, werden bei der EHV-2-IL-10-nPCR eine 19 bp große Repeatsequenz und ein Teil des ORF E7 amplifiziert. Da sich das repetitive Motiv stammabhängig verschieden oft wiederholt (9-16mal), variieren die nPCR-Produkte in ihrer Größe zwischen 488 und 621 bp, also um bis zu 133 bp (Borchers et al., 1997).

In diesem Kapitel soll überprüft werden, ob bestimmte Amplifikatgrößen bevorzugt in gesunden/erkrankten Augen, der Nase oder in den PBMC vorkommen. Außerdem werden Amplifikate von verschiedenen Proben desselben Tieres miteinander verglichen. Zur besseren Differenzierung wurden die nPCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym *Dra* I verdaut (Kapitel 3.9.1) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.9.2). Die Bilder 2a und 2b zeigen exemplarisch einige der (verdauten) Amplifikate von 6 Tieren. In der ersten Spur wurde  $\lambda$ /Hind III,  $\Phi$ X 174 RF DNA/Hae III als Marker aufgetragen.

Um zu überprüfen, ob an Hand der Amplifikatgröße Aussagen zu treffen sind, ob es sich um Proben aus erkrankten oder gesunden Augen handelt, wurden alle (verdauten) Amplifikate von Proben aus erkrankten Augen sowie alle (verdauten) Amplifikate von Proben aus den gesunden Augen augenkranker Pferde und einige (verdaute) Amplifikate aus den Augen gesunder Pferde auf Agarosegele aufgetragen und verglichen (Daten hier nicht komplett gezeigt). Hierbei wurden die Amplifikate in die zuvor genannten 3 Gruppen eingeteilt (gesunde Augen der Kontrolltiere, gesunde und kranke Augen der Testtiere) und die ermittelten Amplifikatgrößen und deren Schnittstellen für das Restriktionsenzym *Dra* I verglichen. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen Amplifikatgröße und dem Gesundheitszustand des Auges feststellen.



**Bild 2a und 2b** Vergleich der Amplifikatgrößen und der *Dra* I-Schnittmuster verschiedener EHV-2-nPCR-Amplifikate

Auftragung: M: Marker	Spur 6: T16a (CB li)	Spur 11: T13a (CB re)
Spur 2: T10a (CB re)	Spur 7: K7a (CB re)	Spur 12: T13b (CB re)
Spur 3: T10a (PBMC)	Spur 8: K7a (PBMC)	Spur 13: T16a (Nase)
Spur 4: T16a (Nase)	Spur 9: T18a (CB re)	Spur 14: T16b (Nase)
Spur 5: T16a (PBMC)	Spur 10: T18a (PBMC)	

CB: Cytobrushprobe re: rechts li: links Marker:  $\lambda$ Hind III,  $\Phi$ X 174 RF DNA/Hae III

Mit einigen nPCR-Produkten von PBMC und mit Nasentupferproben wurde analog verfahren (Daten hier nicht komplett gezeigt). Auch hierbei ließ sich kein Zusammenhang zwischen Amplifikatgrößen und dem Ursprung der Probe (Auge, Nase, Blut) feststellen. So ließen sich beispielsweise einige der Amplifikate, die aus Augen-, Nasen- und Blutproben angereichert worden waren, von dem Restriktionsenzym *Dra* I nicht schneiden (Bild 2b Spuren 2, 10-12), andere hingegen wiesen 2 *Dra* I-Schnittstellen auf (Bild 2b: Spuren 3-9, 13). Vereinzelt kamen auch Amplifikate mit nur einer *Dra* I-Schnittstelle vor (Bild 2b: Spuren 14).

Alle in dieser Arbeit untersuchten Amplifikate waren kleiner als die des Referenzstammes LK4, also unter 621 bp.

Beim Vergleich von nPCR-Amplifikaten und deren *Dra* I-Schnittmustern von verschiedenen Proben, die zum gleichen Untersuchungszeitpunkt aus ein und demselben Tier entnommen worden waren, traten häufig Unterschiede auf. Dies zeigte sich am eindeutigsten in dem Vorhandensein von verschieden vielen *Dra* I-Schnittstellen (Bild 2b: Spuren 2&3, 9&10).

Bei der Betrachtung von nPCR-Produkten und deren *Dra* I-Schnittmustern, die bei Erst- und Zweituntersuchung aus ein und derselben Blut- oder Tupferprobe gewonnen worden waren, wurden bei einigen Tieren Unterschiede festgestellt (Bild 2b: Spuren 13&14), bei anderen hingegen nicht (Bild 2a&b: Spuren 11&12). Auch diese Daten wurden hier nicht komplett gezeigt, sondern nur exemplarisch einige Unterschiede dargestellt.



*Zusammenfassend scheint es keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen den Größen der bei der EHV-2-IL-10-nPCR amplifizierten nPCR-Produkte und dem Ursprung der untersuchten Proben aus gesunden/erkrankten Augen, der Nase oder den PBMC zu geben.*

*Die Amplifikate aus Proben ein und desselben Tieres differieren teilweise beim gleichzeitigen EHV-2-Nachweis in verschiedenen Organen, was darauf hindeutet, daß in einem Pferd gleichzeitig unterschiedliche EHV-2-Stämme präsent sein können.*

*Außerdem traten auch beim nPCR-Nachweis aus Cytobrush- bzw. Blutproben bei Erst- und Zweituntersuchung Größenunterschiede auf, was ein Indiz für genetische Veränderungen bzw. eine Re- oder Superinfektion zwischen den beiden Untersuchungsterminen sein könnte.*

#### **4.1.5 Isolierung von EHV-2 aus Cytobrushproben und PBMC**

EHV-2 ist ein geno- und phänotypisch höchst variables (Plummer et al., 1973; Browning & Studdert, 1987b) und in unterschiedlichen Geweben nachweisbares (Kapitel 1.4.2) Virus. Bei den Infektionsversuchen von Borchers et al. (1998; 2002) an unterschiedlichen Mäusestämmen und 2 Ponys konnte gezeigt werden, daß sich verschiedene EHV-2-Stämme bei gleichem Infektionsweg in unterschiedlichen Organen nachweisen lassen. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, daß sich der Gewebetropismus bei den jeweils verwendeten Stämmen unterscheidet.

Aus diesem Grunde wäre es interessant, ein aus einem Auge gewonnenes Isolat mit anderen Stämmen, die beispielsweise aus dem Blut angezüchtet wurden, biologisch und molekularbiologisch zu vergleichen. Da EHV-2 auch aus gesunden Augen angezüchtet werden kann (Harden et al., 1974), könnte es Stämme von unterschiedlicher Virulenz geben. Darüber könnten Vergleiche von aus gesunden Augen isolierten Stämmen mit solchen, die aus erkrankten Augen stammen, weitere Informationen liefern.

Darum wurde in dieser Arbeit die Isolierung von EHV-2 mittels Kokultivierung (Kapitel 3.8.1) sowohl aus Blut- als auch aus Augenproben von gesunden und erkrankten Tieren angestrebt. Bei der Kokultivierung kann sowohl infektiöses als auch aus der Latenz reaktiviertes Virus angezüchtet werden, ohne daß es möglich wäre, diese beiden Varianten zu unterscheiden.

Da die Virusisolierung aus den Augen wesentlich seltener beschrieben wurde und die Gewinnung eines Isolates aus dem Auge das vorrangige Ziel der Kokultivierungsversuche

war, wurde die Virusisolierung zunächst nur aus Augenproben versucht. Um die Bedingungen für eine Anzucht zu verbessern, wurden Cytobrushproben verwendet, da bei ihnen mehr Zellen zu erwarten waren als in einem Wattetupfer. Außerdem wurde PMA eingesetzt, um latentes Virus zu reaktivieren. Nachdem eine erste Isolierung aus dem Auge gelungen war, wurden bei den folgenden Tieren auch die PBMC kokultiviert.

#### **4.1.5.1 Ergebnisse der Kokultivierung**

Die mittels der Kokultivierung von Cytobrush- und Blutproben gewonnenen EHV-2-Isolate sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Bis sich deutliche cpE zeigten, mußte 3-5mal blind passagiert werden, was einer Anzuchtzeit von 10 (K26a) bis 22 (K18a) Tagen entsprach. Im Durchschnitt traten Plaques unter Zugabe von PMA nach 15 Tagen und ohne PMA nach 17 Tagen auf. Da es aus organisatorischen Gründen nicht möglich war, die Kokultivierung aller Proben mit und ohne PMA durchzuführen, wurde teilweise auf die Anzucht ohne Zugabe von PMA verzichtet. Somit ist die Häufigkeit, mit der die Virusisolierung mit und ohne PMA-Zugabe gelang, nicht aussagekräftig.

Insgesamt konnte aus 22 Proben (3 Cytobrushproben, 19 Blutproben) der Test- und Kontrollgruppentiere EHV-2 angezüchtet werden, davon waren 7 Proben (32%; eine Cytobrushprobe, 6 Blutproben) in der EHV-2-nPCR negativ.

Bei den Testtieren gelang die Virusanzucht in 0/70 (0%) Fällen aus der Cytobrushprobe und aus den PBMC bei 3/14 (21%) Proben, wobei sich bei dem Patienten T27 sowohl bei der Erst- als auch bei der Zweituntersuchung EHV-2 aus den PBMC isolieren ließ.

In der Kontrollgruppe konnten bei 3/102 (3%) durchgeführten Kokultivierungsversuchen aus Cytobrushproben EHV-2-Isolate gewonnen werden, wobei das Pferd K9 zu beiden Untersuchungsterminen in der Anzucht positiv war. Aus den PBMC wurde das Virus bei 16/37 (43%) Blutproben kultiviert, dabei konnte bei 6 Tieren (K14, K15, K16, K17, K26, K27) zur Erst- und Zweituntersuchung EHV-2 angezüchtet werden.

In der Test- und Kontrollgruppe gelang die Virusisolierung aus insgesamt 22 Proben (3 Cytobrushproben, 19 Blutproben), wobei in 6/22 Fällen (27%; eine Cytobrusprobe, 5 Blutproben) nur zu einem Untersuchungszeitpunkt EHV-2 kokultiviert werden konnte. Die Virusisolierung aus ein und demselben Auge bzw. dem Blut von ein und demselben Tier gelang sowohl zur Erst- als auch zur Zweituntersuchung bei 8 Tieren (T27, K9, K14, K15, K16, K17, K26, K27), also bei 16/22 (73%) der in der Anzucht positiven Proben.

**Tabelle 16** Mittels Kokultivierung gewonnene EHV-2-Isolate

Tier	Probe	PMA	nPCR	cpE in	cpE nach	Titerhöhe
T25a	PBMC	mit	positiv	p4	16 Tagen	6x10 <sup>5</sup> PFU/ml
T27a	PBMC	mit	positiv	p3	16 Tagen	2,5x10 <sup>5</sup> PFU/ml
T27b	PBMC	mit	negativ	p3	12 Tagen	2,5x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K9a	CB li	mit	positiv	p3	15 Tagen	3x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K9a	CB li	ohne	positiv	p5	21 Tagen	4x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K9b	CB li	mit	negativ	p3	21 Tagen	3,5x10 <sup>4</sup> PFU/ml
K12a	PBMC	mit	positiv	p4	18 Tagen	3x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K14a	CB re	mit	positiv	p4	15 Tagen	7,5x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K14a	PBMC	mit	positiv	p4	15 Tagen	3x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K14b	PBMC	mit	negativ	p3	12 Tagen	1x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K15a	PBMC	mit	positiv	p3	13 Tagen	1x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K15b	PBMC	mit	positiv	p3	12 Tagen	3x10 <sup>6</sup> PFU/ml
K16a	PBMC	mit	negativ	p4	13 Tagen	2x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K16b	PBMC	mit	positiv	p3	15 Tagen	5x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K17a	PBMC	mit	negativ	p4	19 Tagen	3x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K17b	PBMC	mit	positiv	p3	12 Tagen	1,2x10 <sup>6</sup> PFU/ml
K18a	PBMC	mit	positiv	p5	22 Tagen	1x10 <sup>4</sup> PFU/ml
K23b	PBMC	mit	negativ	p4	17 Tagen	1x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K26a	PBMC	mit	positiv	p3	10 Tagen	2x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K26a	PBMC	ohne	positiv	p3	15 Tagen	1x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K26b	PBMC	mit	positiv	p3	13 Tagen	3x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K27a	PBMC	mit	positiv	p3	13 Tagen	1x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K27b	PBMC	mit	positiv	p4	16 Tagen	1,5x10 <sup>5</sup> PFU/ml
K28a	PBMC	mit	negativ	p4	14 Tagen	4x10 <sup>4</sup> PFU/ml
K28a	PBMC	ohne	negativ	p4	14 Tagen	4x10 <sup>5</sup> PFU/ml

CB: Cytobrushprobe      p: Passage      re: rechts      li: links

*Zusammenfassend wurde EHV-2 bei 3/172 (2%) Anzuchtversuchen aus Cytobrushproben und bei 19/51 (37%) Anzuchtversuchen aus Blutproben - also insgesamt bei 24/223 (3/172 Cytobrushproben + 19/51 Blutproben) Kokultivierungsversuchen - angezüchtet. Dabei waren 7 der Proben, aus denen die Anzucht gelang, in der nPCR negativ.*

#### 4.1.5.2 Spezifizierung und weitere Untersuchung der Isolate

Um abzuklären, ob es sich bei den Isolaten tatsächlich um EHV-2 handelt, wurden biologische und molekularbiologische Charakterisierungen vorgenommen. Ferner wurden nPCR-Amplifikate und REA-Schnittmuster verglichen.

#### 4.1.5.2.1 Biologische Untersuchungen der Isolate

Von den isolierten Viren wurden das Wachstumsverhalten und die Morphologie der cpE in der ED-Zellkultur beurteilt.

##### Wachstumsverhalten

Erste Indizien dafür, daß es sich bei den isolierten Viren um EHV-2 handeln könnte, waren das Auftreten sichtbarer Plaques bei der Anzucht in ED-Zellen und das für  $\gamma$ -Herpesviren typische, langsame Wachstum (bei allen Isolaten traten erste cpE nach frühestens 10 Tagen auf).

##### Morphologie der Plaques

In der ED-Zellkultur wurde die Morphologie der Plaques von den Isolaten mit der Plaquemorphologie von EHV-1, -2, und -4 Referenzstämmen verglichen. Dazu wurden semikonfluente ED-Zellrasen mit 1 m.o.i. des jeweiligen Virus infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei EHV-1 und EHV-4 bzw. 7 Tagen bei EHV-2 und den Isolaten, wurden die Zellen mit 4%Formalin/PBS fixiert und dann mit GiemsaLösung gefärbt. Die Bilder 3a-i zeigen Plaques einiger Referenzstämmen und repräsentativer Isolate.

Dabei zeigte sich bei den von EHV-2 hervorgerufenen Plaques dasselbe Bild wie bei den cpE der isolierten Viren, nämlich von Zellen in verschiedenen Apoptosestadien umringte, zellfreie Höfe. Es traten dabei sowohl Trauben von kleinen abgerundeten Zellen als auch ballonartige Vergrößerungen bis hin zur Riesenzellbildung auf.

Bei den schnellwachsenden  $\alpha$ -Herpesviren EHV-1 und -4 waren die zellfreien Plaques größer und deren Ränder wesentlich glatter, da infolge des schnelleren Zelltodes nur kurzfristig degenerative Erscheinungen von sich im Untergang befindenden Zellen auftraten.

*Zusammenfassend ließ sich durch den Vergleich der Plaquemorphologie endgültig ausschließen, daß es sich bei den gewonnenen Isolaten um EHV-1 oder -4 handelte.*

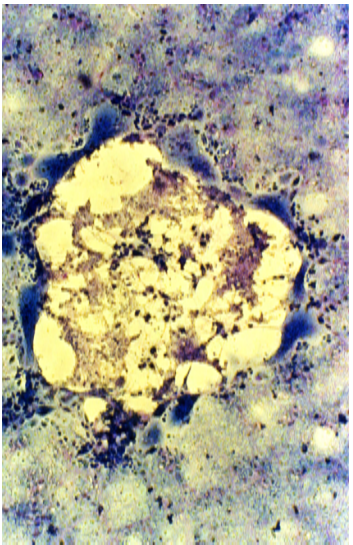
#### 4.1.5.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen der Isolate

Um molekularbiologische Tests vornehmen zu können, wurde die DNA der angezüchteten Viren isoliert und aufgereinigt (Kapitel 3.3.4). Die DNA wurde in die nPCR (Kapitel 3.8.2) und in die REA (Kapitel 3.9.1) eingesetzt.

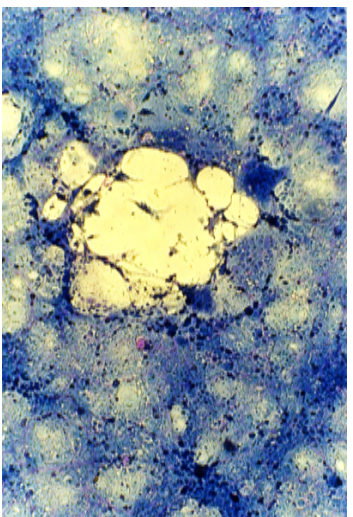
##### nPCR

Bei der mit verdünnter Virus-DNA durchgeführten nPCR konnten alle Isolate als EHV-2 charakterisiert werden.

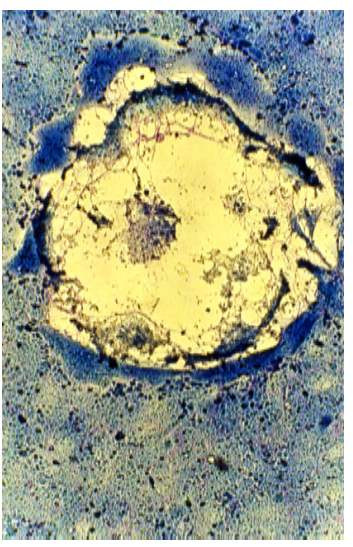
**Bild 3a-3i Vergleich der Plaquemorphologie von einigen EHV-2-Isolaten mit EHV-Referenzstämmen**



**Bild 3a** EHV-2-Isolat CB K9a +



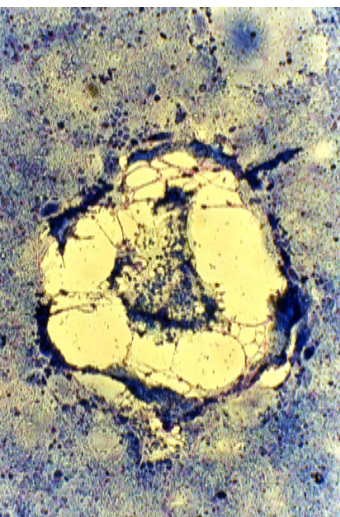
**Bild 3b** EHV-2-Isolat CB K14a +



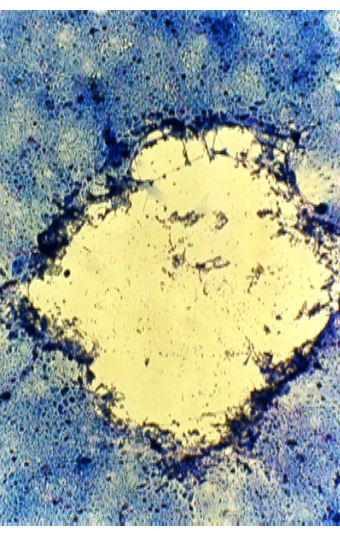
**Bild 3c** EHV-2-Isolat PBMC T27a +



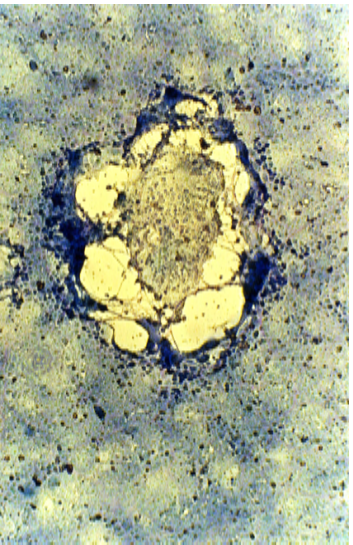
**Bild 3d** EHV-2-Isolat PBMC K16a +



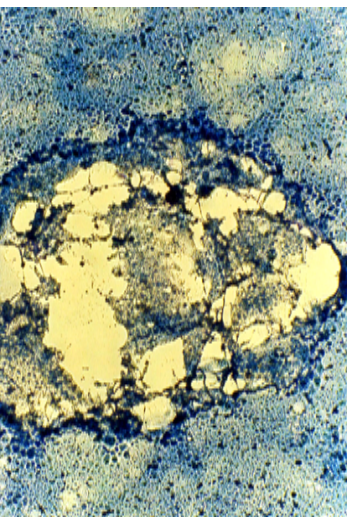
**Bild 3e** EHV-2-Isolat PBMC K26a +



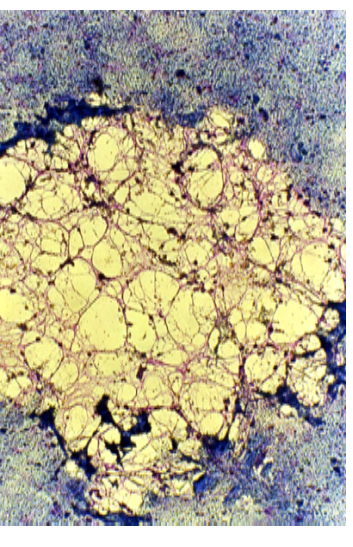
**Bild 3f** EHV-2-Referenzstamm LK4



**Bild 3g** EHV-2-Referenzstamm T16



**Bild 3h** EHV-2-Referenzstamm Melissa



**Bild 3i** EHV-4-Referenzstamm T252

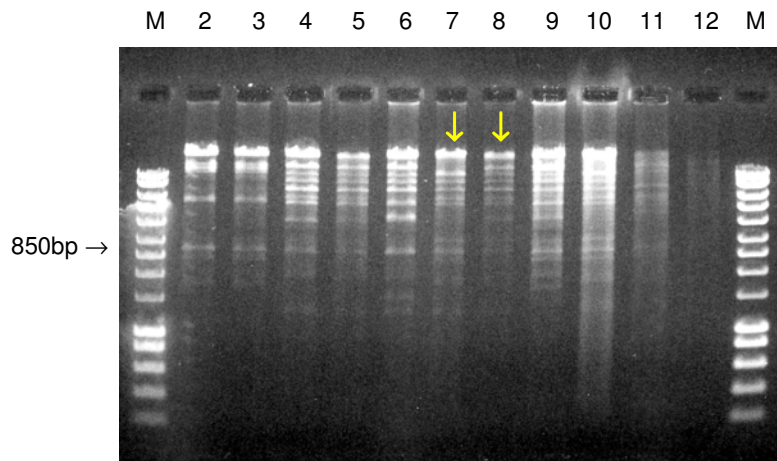
CB: aus der Cytobrushprobe

PBMC: aus den PBMC

+: Kokultivierung mit Zugabe von PMA

### REA (Gesamt-Genom-Vergleich)

Der Verdau der Gesamt-DNA der Isolate mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I, *Hind* III und *Spe* I erfolgte so, wie es in Kapitel 3.9.1 beschrieben wurde. Wie zu erwarten war, zeigten sich infolge der hohen genotypischen Heterogenität von EHV-2 keine einheitlichen REA-Schnittmuster. Das Bild 4 zeigt exemplarisch die *EcoR* I-Schnittmuster einiger Isolate, die unter Zugabe von PMA angezüchtet worden waren. Als Marker wurde eine 100bp Leiter (Bild 4: M) aufgetragen, als Referenzstämme wurden für EHV-2 der Stamm LK4 (Bild 4: Spur 11) und für EHV-5 der Stamm P48 (Bild 4: Spur 12) verwendet. Auf dem Transluminator waren eindeutige Unterschiede in den REA-Schnittmustern zwischen dem EHV-5-Referenzstamm und den gewonnenen Isolaten zu sehen. Leider ist der EHV-5-Referenzstamm auf der Fotografie des Gels nur sehr schwach zu erkennen (Bild 4: Spur 12).



**Bild 4** Vergleich der *EcoR* I-Schnittmuster verschiedener Isolate

Auftragung: M: 100 bp-DNA-Leiter	Spur 5: K14a (PBMC)	Spur 9: K15a (PBMC)
Spur 2: K9a (Auge)	Spur 6: K12a (PBMC)	Spur 10: K17a (PBMC)
Spur 3: K9b (Auge)	Spur 7: K16b (PBMC)	Spur 11: LK4 (EHV-2)
Spur 4: K14a (Auge)	Spur 8: K16a (PBMC)	Spur 12: P48 (EHV-5)

In Bezug auf das beprobte Organ (Auge/Blut) oder den Gesundheitszustand des Tieres (augenkrank/gesund) konnten keine Gemeinsamkeiten in den REA-Schnittmustern der Isolate festgestellt werden.

Das Pferd K14 war das einzige Tier, bei dem zu ein und demselben Untersuchungszeitpunkt die Virusanzucht aus unterschiedlichen Proben gelang. In den REA-Schnittmustern beider Isolate konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Bild 4: Spur 4&5).

Die REA-Schnittmuster von Isolaten, die aus ein und demselben Organ eines Tieres bei Erst- und Zweituntersuchung gewonnen worden waren, wiesen bei einigen Tieren Unterschiede auf (Bild 4: Spur 7&8; EHV-2-Isolate aus den Blutproben von Erst- und Zweituntersuchung des Kontrollgruppenpferdes K16 [siehe zweitgrößte Bande]), bei anderen

nicht (Bild 4: Spur 2&3; EHV-2-Isolate aus den Cytobrushproben desselben Auges von Erst- und Zweituntersuchung des Kontrollgruppenpferdes K9).

*Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die REA-Schnittmuster der verschiedenen Isolate infolge der genotypischen Variabilität von EHV-2 teilweise stark voneinander abwichen, sich aber deutlich von EHV-5 abgrenzen ließen.*

*Es traten Unterschiede in den REA-Schnittmustern von Isolaten aus ein und demselben Gewebe eines Tieres zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten auf (Bild 4: Spur 7&8).*

#### **4.1.6 Serologischer Nachweis von EHV-2-spezifischen Antikörpern**

Da eine Infektion mit EHV-2 häufig schon im Fohlenalter stattfindet (Murray et al., 1996) und das Virus über lange Zeit im Körper verbleibt, lassen sich in manchen Equidenpopulationen bei bis zu 90% der Tiere mittels IFT Antikörpertiter gegen EHV-2 (1:640-1:5120) feststellen (Borchers et al., 1997). Hohe Antikörpertiter sind also auch bei klinisch gesunden Tieren detektierbar (McGuire et al., 1974), so daß sich zwischen Antikörpertiterhöhe und einer EHV-2 bedingten Erkrankung kaum ein Zusammenhang herstellen läßt.

Mit dem aufgearbeiteten Zitratblut (Kapitel 3.4) wurden Neutralisationstests (Kapitel 3.4.1) und indirekte Immunfluoreszenztests (Kapitel 3.4.2) durchgeführt, wobei in beiden Tests Melissa als Referenzstamm verwendet wurde. Als auffällig beurteilt wurden im IFT Titer von  $\geq 1:5120$ , im NT von  $\geq 1:20$  und zum anderen grundsätzlich Titeranstiege um mindestens das Vierfache bei im Abstand von etwa 4-5 Wochen genommenen Serumpaaren.

Im Indirekten Immunfluoreszenztest konnten bei allen untersuchten Pferden Antikörper nachgewiesen werden.

Wie im Anhang (Kapitel 8.1, Tabelle I c) dargestellt, lagen die Titer in der Testgruppe bei der Erstuntersuchung zwischen 1:640 und 1:10240. Bei 4/28 (14%) Tieren lag ein auffälliger Titer vor, wobei sich dieser zum Zeitpunkt der Zweituntersuchung bei 2 Pferden (T12, T18) nicht verändert hatte und bei einem Pferd (T26) um eine Verdünnungsstufe höher lag. Der vierte Patient mit auffälligem Titer (T23) ist nicht zur Nachuntersuchung erschienen.

Aus dem Anhang (Kapitel 8.1, Tabelle I d) ist zu entnehmen, daß bei der Zweituntersuchung die Titer zwischen 1:640 und 1:10240 lagen und bei 5/21 (24%) Testtieren ein auffälliger Titer festgestellt wurde. Zusätzlich zu den Patienten T12, T18 und T26 stieg bei dem Tier T27 der Titer im Vergleich zur Voruntersuchung um den Faktor 2 auf 1:5120 an. Bei einem Pferd (T14) war ein auffälliger Titeranstieg um den Faktor 4 von 1:1280 auf 1:5120 zu beobachten.

Aus dem Anhang (Kapitel 8.1, Tabelle I e) ist zu entnehmen, daß in der Kontrollgruppe die Titer bei der Erstuntersuchung zwischen 1:320 und 1:10240 lagen, wobei 7/26 (27%) Tiere einen erhöhten Titer aufwiesen.

Dem Anhang (Kapitel 8.1, Tabelle I f) ist zu entnehmen, daß bei der Zweituntersuchung die Titer zwischen 1:640 und 1:20480 lagen und 5/24 (21%) Pferde auffällige Titer zeigten.

Bei 4 Tieren waren auffällige Titterschwankungen feststellbar. Bei zwei Pferden (K7, K14) stieg der Titer um den Faktor 4 an, bei den beiden anderen (K3, K15) fiel er um denselben Faktor.

Mittels Neutralisationstest wurden von beiden Gruppen und zu beiden Untersuchungszeitpunkten insgesamt 99 Seren untersucht, von denen 93 (94%) Antikörpertiter unter der Quantifizierungsgrenze von 1:10 aufwiesen.

In der Testgruppe (Anhang: Kapitel 8.1, Tabellen I c&d) traten keine auffälligen Titer auf. Das Tier T18 war der einzige Patient, bei dem ein Titer oberhalb der Quantifizierungsgrenze festzustellen war. Er lag bei Erst- und Zweituntersuchung bei 1:10.

In der Kontrollgruppe (Anhang: Kapitel 8.1, Tabellen I e&f) wies nur ein Pferd (K4) bei der Erstuntersuchung einen auffälligen Titer von 1:20 auf, der bei der Nachkontrolle auf 1:10 gefallen war. Bei 2 weiteren Tieren (K15, K27) aus der Kontrollgruppe lag der Titer bei der Erstuntersuchung bei 1:10.

Sowohl mittels IFT als auch mittels NT ließ sich bei dem  $\chi^2$ -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit (Kapitel 3.10.1) kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen auffälligen Titern bzw. auffälligen Titterschwankungen und einer Augenerkrankung oder dem direkten EHV-2-Nachweis feststellen.

Diese Daten bestätigen die Beobachtung von Kershaw et al. (2001).

*Zusammenfassend bleibt zu sagen, daß sich kein Zusammenhang zwischen Antikörpernachweis und den Merkmalen augenkrank und gesund feststellen ließ.*



## 4.2 Untersuchungen zum Gewebetropismus von EHV-2

### 4.2.1 Einleitung

Wie bereits in Kapitel 1.4.2 beschrieben, konnte EHV-2 in unterschiedlichsten Organen wie Milz, Niere, Uterus, Knochenmark, Milch- und Speicheldrüsen (Browning & Studdert, 1987a), im Lymphapparat (Harden et al., 1974; Edington et al., 1994; Wolfinger, 1998), im zentralen und peripheren Nervensystem (Rizvi et al., 1997; Wolfinger, 1998) und in anderen Zellen und Geweben von Pferden nachgewiesen werden. Auch in verschiedenen Strukturen der optischen Reizaufnahme und Weiterleitung konnte das Virus detektiert werden. So wurde vor allem der EHV-2-Nachweis in Kornea und Konjunktiva häufig beschrieben (Thein & Böhm, 1976; Thein, 1978; Miller et al., 1990; Collinson et al., 1994; Borchers et al., 1998; Kershaw, 2001).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde dem Gewebetropismus von EHV-2 - vor allem in okulären Strukturen - nachgegangen. Dazu wurden *post-mortem*-Gewebeproben von insgesamt 20 Pferden, die fortlaufend mit P1-P20 durchnummeriert worden waren, entnommen (Kapitel 3.7.1) und untersucht. Die Probennahme erfolgte - außer bei den Tieren P4 und P17 - von natürlich gehaltenen Pferden, die keine Anzeichen einer Augenerkrankung oder einer EHV-2-Infektion zeigten. Bei dem Tier P4, das mit dem Testtier T11 identisch ist, wurde, wie schon erwähnt, zum Zeitpunkt der Zweituntersuchung in der TiHoHa eine Extirpation des rechten Auges durchgeführt. Das entnommene Gewebe wurde in Formalin fixiert und zum Institut für Virologie versandt. Bei dem Tier mit der Nummer P17 handelte es sich um einen im 8. Trächtigkeitsmonat abortierten Fötus.

Soweit es organisatorisch möglich war, wurden beiderseits Sehnerv, Tränendrüse, Konjunktiva und Trigeminalganglion und ein Stück des rechten, mittleren Lungenlappens entnommen. Zusätzlich wurden bei 4 Pferden das Kammerwasser der vorderen Augenkammer und bei 2 Tieren die Nasenschleimhaut beprobt (Kapitel 3.7.1). Die Aufarbeitung des Kammerwassers erfolgte wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben. Alle übrigen Gewebe wurden wie in Kapitel 3.7.2 beschrieben aufgearbeitet und dann mittels PCR (Kapitel 4.2.2) untersucht.

### 4.2.2 Ergebnisse der Untersuchungen mittels nPCR

Die aufgearbeiteten Proben wurden mittels  $\beta$ -Aktin-PCR (Kapitel 3.8.2.1) und EHV-2-nPCR (Kapitel 3.8.2) untersucht, um festzustellen, ob die DNA-Präparation erfolgreich verlief und um herauszufinden, in welchen Geweben EHV-2 vermehrt lokalisiert werden könnte. Bei der  $\beta$ -Aktin-PCR ließ sich stets Wirts-DNA nachweisen.

Bei den Tieren P2, P4, P5, P6, P7, P10, P12 und P13 ließ sich in keinem der untersuchten Gewebe EHV-2 nachweisen. Bei 12/20 (60%) Tieren konnte in mindestens einem Gewebe EHV-2 gefunden werden. In der Tabelle 17 sind die nPCR-Ergebnisse von Sehnerv, Tränendrüse, Konjunktiva und Lunge aufgeführt. Die Ergebnisse der anderen Proben sind im Text - und ausführlich im Anhang (Kapitel 8.1, Tabelle II) - dargestellt.

**Tabelle 17** Darstellung der EHV-2-nPCR-Untersuchungsergebnisse von Sehnerv, Tränendrüse, Konjunktiva und Lunge

Nr.	Sehnerv		Tränendrüse		Konjunktiva		Lunge
	re	li	re	li	re	li	
P1	neg.	neg.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	positiv
P2	neg.	neg.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	neg.
P3	neg.	neg.	neg.	neg.	positiv	positiv	n.v.
P4	neg.	n.v.	neg.	n.v.	neg.	n.v.	n.v.
P5	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
P6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
P7	neg.	neg.	n.v.	n.v.	neg.	neg.	neg.
P8	positiv	neg.	positiv	n.v.	positiv	positiv	positiv
P9	neg.	neg.	neg.	n.v.	positiv	neg.	neg.
P10	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
P11	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	positiv	neg.
P12	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
P13	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
P14	positiv	neg.	neg.	positiv	positiv	positiv	neg.
P15	neg.	neg.	neg.	positiv	positiv	positiv	n.v.
P16	neg.	neg.	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
P17	neg.	neg.	n.v.	n.v.	neg.	neg.	neg.
P18	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	positiv	positiv
P19	neg.	neg.	neg.	positiv	positiv	positiv	neg.
P20	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	positiv	neg.

Nr.: Nummer      re: rechts      li: links      neg.: negativ      n.v.: nicht vorhanden

Wie aus Tabelle 17 hervorgeht, wurde im Sehnerv bei 2/20 (10%) Pferden EHV-2-DNA gefunden. In der Tränendrüse konnte bei 5/16 (31%) Tieren EHV-2 per nPCR nachgewiesen werden, wobei dies bei dem Pferd P16 beiderseits gelang.

Die Konjunktiva wurden bei 10/18 (56%) Pferden - bei 6 dieser Tiere beiderseits - mit positivem Ergebnis auf EHV-2 getestet. Interessanterweise gab es - außer bei dem Tier P17, bei dem lediglich die Trigeminalganglien EHV-2-positiv waren - keinen Fall, in dem bei negativen Konjunktivae ein anderes Organ positiv auf EHV-2 getestet worden war. Außerdem gelang der EHV-2-Nachweis in anderen Augengeweben (Sehnerv und Tränendrüse) und in der Nasenschleimhaut stets nur auf der Seite, die auch eine positive Konjunktiva aufwies. Bei 3/18 (17%) Tieren wurde EHV-2 ausschließlich in der Konjunktiva gefunden. Da die Konjunktiva unter den untersuchten okulären Organen eine herausragende Rolle zu spielen scheint, wurde die Nachweishäufigkeit von EHV-2 in diesem Gewebe mittels McNemar-Test (Kapitel 3.10.2) mit der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Tränendrüse und Sehnerv verglichen (Tabelle 18&19).

**Tabelle 18** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Konjunktiva und Tränendrüse

Nachweis von EHV-2 in [n Proben] von		Konjunktiva	
		positiv [n=15]	negativ [n=14]
Tränendrüse	positiv [n=6]	6	0
	negativ [n=23]	9	14

**Tabelle 19** Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Konjunktiva und Sehnerv

Nachweis von EHV-2 in [n Proben] von		Konjunktiva	
		positiv [n=16]	negativ [n=19]
Sehnerv	positiv [n=2]	2	0
	negativ [n=33]	14	19

Aus Tabelle 18 geht hervor, daß 29mal Konjunktiva und Tränendrüse aus ein und derselben Orbita untersucht wurden. Hierbei waren in 6 Fällen sowohl Konjunktiva als auch Tränendrüse und in 9 Fällen nur die Konjunktiva in der nPCR EHV-2-positiv. In 14 Fällen enthielt keines der beiden Gewebe EHV-2.

Wie Tabelle 19 zeigt, standen Konjunktiva und Sehnerv aus ein und derselben Orbita 35mal zur Verfügung. EHV-2 konnte in beiden Geweben in 2 Fällen, nur in der Konjunktiva in 14 Fällen und in 19 Fällen in keinem der beiden Gewebe nachgewiesen werden.

Wie mittels McNemar-Test gezeigt werden konnte, wurde EHV-2 statistisch signifikant häufiger in Konjunktivae als in Sehnerven ( $\chi^2=8>3,84$ ) gefunden. Bei der Betrachtung von Konjunktivae und Tränendrüsen lag keine Signifikanz vor.

Bei 5 Pferden (P1, P11, P12, P13, P17) wurden beiderseits die Trigeminalganglien mittels nPCR auf EHV-2 untersucht. Bei den Ganglien des Tieres P17 konnte das Virus beiderseits detektiert werden, die übrigen Proben wiesen negative Ergebnisse auf. Bei dem Tier P17 handelte es sich um einen im 8. Trächtigkeitsmonat abortierten Fötus.

Von den Pferden P19 und P20 wurden beiderseits die Nasenschleimhäute untersucht. Die nPCR-Ergebnisse korrelierten mit denen der Konjunktivae insofern, daß bei P19 beide Nasenschleimhäute und bei P20 nur die linke Nasenschleimhaut in der EHV-2-nPCR positiv waren.

In dem Kammerwasser von 4 Pferden (P15, P16, P17, P18) wurde kein EHV-2 nachgewiesen.

Die Lunge wurde bei 4/17 (24%) Tieren mit positivem Ergebnis auf EHV-2 getestet.

*Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich EHV-2 weitaus häufiger in Schleimhäuten (56% der Konjunktivae und in beiden untersuchten Nasenschleimhäuten) als in Drüsengewebe (31% der Tränendrüsen), Lunge (24%) oder Nervengeweben (10% der Sehnerven, 20% der Trigeminalganglien) nachweisen ließ. Von den 4 untersuchten Kammerwasserproben war keine EHV-2-positiv.*

*Von einem im 8. Trächtigkeitsmonat abortierten Fötus (P17) wurden Sehnerv, Konjunktiva, Kammerwasser, Trigeminalganglion und Lunge untersucht, wobei lediglich in beiden Trigeminalganglien der EHV-2-Nachweis mittels nPCR gelang.*