

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Pathogenese, Gewebetropismus und genomische Variabilität von EHV-2 untersucht.

Primäres Ziel war es, weitere Daten über eine mögliche ätiopathologische Rolle von EHV-2 bei equinen Keratitiden und/oder Konjunktivitiden zu erhalten. Hierfür wurde die Nachweishäufigkeit von EHV-2 in unterschiedlichen Proben (Blut, Augen- und Nasentupfer) und mittels 2 verschiedener Probenträger (Cytobrush und Wattetupfer) zur Beprobung des Auges bei augenkranken und gesunden Equiden miteinander verglichen und aus Blut- und Cytobrushproben gewonnene Virusisolate wurden molekularbiologisch und biologisch charakterisiert (Kapitel 5.1). Auch die Untersuchungen zum Gewebetropismus von EHV-2 wurden vor allem an okulären Strukturen durchgeführt (Kapitel 5.2). Abschließend wurde ein Ausblick auf mögliche weitere Forschungsvorhaben gegeben (Kapitel 5.3).

5.1 Untersuchungen auf EHV-2 bei augenkranken und gesunden Equiden

Nach einem kurzen Überblick über Augenerkrankungen, deren Ätiologie auf Herpesviren zurückgeführt wird (Kapitel 5.1.1), werden die Ergebnisse der EHV-2-Untersuchungen bei augenkranken und gesunden Equiden ausführlich diskutiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 56 Equiden (Kapitel 5.1.2) - davon 28 augenkrank und 28 gesunde Tiere - in der TiHoHa unter standardisierten Bedingungen klinisch untersucht und beprobt.

Von den 56 in Hannover beprobten (Kapitel 5.1.3) Equiden wurden PCR-Analysen durchgeführt, um mögliche Zusammenhänge zwischen EHV-2-Nachweis mittels nPCR und einer Augenerkrankung festzustellen (Kapitel 5.1.4), um die beiden Probenträger, die für die Probennahme aus dem Auge verwendet wurden, zu vergleichen (Kapitel 5.1.5) und um die Entwicklung des Virusnachweises in einem Zeitraum von 4-5 Wochen zu beurteilen (Kapitel 5.1.6). Außerdem wurden Kokultivierungen (Kapitel 5.1.7) und serologische Tests (Kapitel 5.1.8) durchgeführt und genetische Unterschiede von PCR-Amplifikaten und isolierten Viren untersucht (Kapitel 5.1.9).

5.1.1 Durch Herpesviren verursachte Augenerkrankungen

Bei einigen Mammalia verursachen Herpesviren Keratitiden und/oder Konjunktivitiden. So ist das Herpes Simplex Virus (HSV) -1 beim Menschen der Hauptgrund für infektiöse Blindheit in Industriestaaten (Streilein et al., 1997; zur Übersicht siehe Carr et al., 2001). Aber auch das Varicella Zoster Virus (VZV) und das EBV rufen Erkrankungen von Kornea und Konjunktiva hervor (zur Übersicht siehe Ritterband & Friedberg, 1998). Bei Hauskatzen

wurden Keratokonjunktivitiden im Zusammenhang mit dem Felinen Herpesvirus (FHV) -1 beobachtet (Bistner et al., 1971; Nasisse et al., 1998). Auch bei Paarhufern, die den Unpaarhufern phylogenetisch am nächsten stehen, wurden durch Herpesviren verursachte Keratitiden und Konjunktivitiden beschrieben. So traten diese Symptome bei an BHV-1, -3 und -4 erkrankten Rindern (Sykes et al., 1964; Selman et al., 1978; Twiehaus, 1980; Mohanty et al., 1972) und bei unter der Aujetztkischen Krankheit (Suid Herpesvirus 1) leidenden Schweinen (Schneider, 1973) auf.

Bei augenkranken Pferden wurde der Nachweis von EHV-1, -2, -3, -4 und -5 beschrieben. In einer Studie von Kershaw et al. (2001) wurden in Watteaugentupferproben von 27 augenkranken und 21 gesunden Pferden weder EHV-1 noch EHV-4 gefunden, wobei auf die Untersuchung auf EHV-3 und -5 verzichtet wurde. EHV-5 wurde wiederholt häufiger in gesunden als in erkrankten Augen detektiert (Krüdwagen et al., 2001; Besthorn, 2002). EHV-3 wurde nur bei einem an einer Uveitis erkrankten Fohlen aus dem Augentupfer angezüchtet (Cullinane et al., 1994). Somit scheinen EHV-1, -3, -4 und -5 als infektiöse Agentien bei Erkrankungen des Pferdeauges keine entscheidenden Rollen zu spielen.

Durch EHV-2 verursachte Augenerkrankungen

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich versucht, EHV-2 nachzuweisen, da es das einzige equine Herpesvirus ist, das immer wieder bei equinen Keratokonjunktivitiden nachgewiesen wurde. So gelang es, EHV-2 in erkrankten Augen von Fohlen und adulten Pferden durch Virusanzucht (Thein & Böhm, 1976; Thein, 1978; Miller et al., 1990; Collinson et al., 1994; Borchers et al., 1998) oder PCR (Kershaw et al., 2001; Krüdwagen et al., 2001; Besthorn, 2002) nachzuweisen. Nur Kershaw, Krüdwagen und Besthorn verglichen dabei die Nachweishäufigkeit von EHV-2 in einer augenkranken Testgruppe mit der in einer gesunden Kontrollgruppe. In 2 Studien wurde EHV-2 häufiger in der Test- als in der Kontrollgruppe nachgewiesen (Kershaw et al., 2001; Krüdwagen et al., 2001), wobei sich bei Kershaw ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem EHV-2-Nachweis und einer Augenerkrankung zeigte. In der dritten Untersuchung wurde EHV-2 hingegen öfter in gesunden als in erkrankten Augen detektiert (Besthorn, 2002).

5.1.2 Test- und Kontrollgruppe

In der hier vorgelegten Arbeit setzte sich die Testgruppe aus 10 Stuten und 18 Wallachen im Alter von 3-22 Jahren (Durchschnittsalter 10 Jahre) zusammen. Vier der Tiere gehörten nicht zur Gattung *Equus caballus*. Es handelte sich bei diesen Tieren um Maultiere, also eine Kreuzung von Pferdestute und Eselhengst.

Bei Eseln gibt es ein EHV-2-Äquivalent, nämlich AHV-2 (Browning et al., 1988), wobei auch AHV-4 und AHV-5 eine starke Homologie mit EHV-2 aufweisen (Kleiboeker et al., 2002). Mehrere Untersuchungen legten nahe, daß EHV-2 auch in anderen Equidenspezies als dem Pferd vorkommen kann (Borchers & Fröhlich, 1997; Borchers et al., 1999c; Borchers et al., 2005 [Kapitel 1.4.2]).

Durch diese Untersuchungen inspiriert, wurden die an einer Keratitis punctata seu maculosa erkrankten Maultiere - obwohl keine Daten über die Detektion von AHV-2 mittels der hier verwendeten EHV-2-Testverfahren bekannt waren - ebenfalls untersucht. Nachdem EHV-2 direkt (nPCR und Kokultivierung bei T27) und indirekt (NT und IFT bei allen Maultieren) nachgewiesen werden konnte, wurden diese Tiere in die Testgruppe aufgenommen. Der EHV-2-Nachweis läßt vermuten, daß Maultiere tatsächlich für EHV-2 permissiv sind. Allerdings könnte es sich auch um eine Kreuzreaktion mit AHV-2 gehandelt haben. Anhaltspunkte dafür ließen sich im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht finden.

Die Kontrollgruppe setzte sich aus 9 Stuten und 19 Wallachen im Alter von 2 bis 19 Jahren zusammen (Durchschnittsalter 8,4 Jahre). Bei diesen Tieren zeigten sich weder bei der klinischen Allgemeinuntersuchung noch bei der ophthalmologischen Untersuchung Symptome einer EHV-2-Infektion.

5.1.3 Probennahme

Nach einer allgemeinen klinischen- und einer speziellen ophthalmologischen Untersuchung wurde den Tieren Zitratblut entnommen. Weiterhin wurden Nasen und Augen mit Wattetupfern beprobt, und von jedem Auge wurden zwei weitere Proben mittels Cytobrush gewonnen.

Da als Latenzort für EHV-2 unter anderem die B-Lymphozyten genannt wurden (Gleeson & Coggins, 1985; Drummer et al., 1996), sollte die Herleitung des Infektionsstatus eines Tieres über den Nachweis von EHV-2 in - aus dem Blut präparierten - PBMC möglich sein. Aus diesem Grunde wurden von den Equiden die Blutproben genommen.

Um den EHV-2-Nachweis aus dem Auge in der Routinediagnostik so sicher und schnell wie möglich zu gestalten, sollten bei der Beprobung von Pferden das Verletzungsrisiko minimiert und gleichzeitig die Menge der entnommenen Proben maximiert werden.

In der humanmedizinischen HSV-1-Diagnostik konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Beprobung mittels Wattetupfern und mittels Korneabiopsie festgestellt werden (Hidalgo et al., 1998; Pramod et al., 2000), so daß sich HSV-1 mittels PCR sicher aus mit Wattetupfern entnommener Tränenflüssigkeit nachweisen läßt (Yamamoto et al., 1994; Kudo

et al., 1996; Pramod et al., 2000). Auf die Veterinärmedizin übertragen stellt die Probennahme mittels Wattetupfer aus dem Konjunktivalsack des Pferdes eine wenig invasive - und deshalb für den Patienten sehr gut verträgliche - Methode dar (Oppen et al., 2001).

Die Gewinnung größerer Mengen Zellmaterials mit einem Cytobrush erfolgt in der Humanmedizin für zytologische Untersuchungen von Zervixabstrichen (Trimbos & Arentz, 1986) und Konjunktivalzellen (Tsubota et al., 1990). Bei Pferden wurden Cytobrushproben aus dem Auge für die Diagnostik von Keratomykosen (Bolliger et al., 2000) und für zytologische Untersuchungen (Krüdwagen et al., 2001) entnommen. Die virologische Untersuchung von Cytobrushproben ist bisher allerdings noch nicht beschrieben worden. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sich bei der Probennahme aus dem Auge der Cytobrush für die EHV-2-Diagnostik mittels nPCR als geeigneter erweist als die bisher verwendeten Wattetupfer.

Durch die Entnahme des Nasentupfers zusätzlich zu den entnommenen Augentupfern sollte festgestellt werden, ob eine Virusausbreitung vom Atmungstrakt zu okulären Geweben, respektive andersherum, wahrscheinlich erscheint.

5.1.4 Untersuchungen bezüglich des Zusammenhanges zwischen EHV-2-Nachweis mittels nPCR in den verschiedenen Proben und einer Augenerkrankung

Um festzustellen, ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen EHV-2-Nachweis in den einzelnen Proben und den Merkmalen augenkrank und gesund bestand, wurden die nPCR-Ergebnisse von Test- und Kontrollgruppe mittels χ^2 -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit überprüft.

Der EHV-2-Nachweis gelang mittels nPCR zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung bei den jeweils 28 Tieren der Test- bzw. Kontrollgruppe in Cytobrushproben bei 61% bzw. 64%, in Wattetupferproben bei 21% bzw. 7%, in Nasentupferproben bei 18% bzw. 15% und in PBMC bei 50% bzw. 54% der Pferde.

Bei der Zweituntersuchung war bei den jeweils 25 nachuntersuchten Tieren der Test- bzw. Kontrollgruppe in Cytobrushproben bei 48% bzw. 44%, in Wattetupferproben bei 32% bzw. 20%, in Nasentupferproben bei 8% bzw. 4% und in PBMC bei 31% bzw. 52% der Pferde EHV-2-DNA vorhanden.

Bei keiner der Proben ließ sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Nachweishäufigkeit von EHV-2 mittels nPCR und den Merkmalen augenkrank und gesund herstellen.

Auch bei der Betrachtung von erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten und gesunden Augen der Testtiere ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen klinischen Symptomen und dem EHV-2-Nachweis mittels nPCR in Wattetupfer- oder Cytobrushproben feststellen.

Die Ergebnisse von Kershaw et al. (2001) ließen sich somit nicht reproduzieren. Es wurde vielmehr - wie auch in der Studie von Krüdwagen et al. (2001) - ein zwar vermehrter, aber nicht signifikant erhöhter EHV-2-Nachweis in Wattetupferproben von erkrankten Tieren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt. Die Detektion von EHV-2 in Wattetupferproben bei der Erstuntersuchung gelang mit 21% bei den Testtieren und 7% bei den Kontrolltieren nahezu genauso oft wie bei den von Krüdwagen et al. (2001) durchgeführten PCR-Untersuchungen (20,0% [3/15] in der Testgruppe und 6,7% [1/15] in der Kontrollgruppe).

Die hier vorliegende Arbeit ist also neben denen von Kershaw et al. (2001) und Krüdwagen et al. (2001) die dritte Publikation, bei der EHV-2 - wenn auch nur einmal mit statistischer Signifikanz - vermehrt in Augen erkrankter Tiere nachgewiesen wurde.

Aus diesem Grunde wurden die nPCR-Ergebnisse von Test- und Kontrollgruppe mittels explorativer Datenanalyse erneut überprüft. Dabei zeigte sich im χ^2 -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit, daß der gleichzeitige EHV-2-Nachweis in Cytobrush- und Wattetupferproben aus den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testtiere (15% [8/55]) statistisch signifikant häufiger geführt wurde als in den gesunden Augen von Test- und Kontrolltieren (5% [8/157]). Ein solcher Vergleich ist allerdings nur unter der Voraussetzung zulässig, daß das Vorkommen von EHV-2 in dem erkrankten und dem gesunden Auge ein und desselben Pferdes nicht miteinander in Zusammenhang steht. Da diese Prämisse wohl nicht zutreffend ist, sollte die Aussagekraft dieser Feststellung äußerst kritisch betrachtet werden, bietet aber dennoch - vor allem in Verbindung mit den häufigen EHV-2-Nachweisen von anderen Autoren (Kapitel 1.4.4) - einen Anhaltspunkt dafür, daß EHV-2 primär oder als Ko-Faktor an der equinen Keratokonjunktivitis beteiligt sein kann. Es scheinen aber auch andere Noxen unabhängig von EHV-2 dieses Krankheitsbild verursachen zu können, so daß - je nach Ätiologie - Proben aus einem erkrankten Auge EHV-2-positiv oder -negativ ausfallen können.

Diese Theorie wird durch Therapieversuche von Keratokonjunktivitiden mit Virostatika, welche von anderen Autoren beschrieben wurden, gestützt. Beispielsweise zeigte sich bei Kershaw et al. (2001) bei einigen mit Virostatika behandelten Tieren eine Besserung des Krankheitsgeschehens bis hin zur Heilung, bei anderen schlugen Virostatika hingegen nicht an. Kritisch muß die Verwendung von Glukokortikoiden betrachtet werden, da latente Herpesviren durch die immunsupprimierenden Eigenschaften dieser Pharmaka reaktiviert werden können (Edington et al., 1985; Gibson et al., 1992; Slater et al., 1994; Borchers et al., 1998). So ließ sich EHV-2 häufiger in Wattetupfern von solchen Pferden nachweisen, deren Augenerkrankungen mit Glukokortikoiden behandelt worden waren (Besthorn, 2002). Da in der Praxis ein erkranktes Auge nur äußerst selten vor einer - wie von Riis (1981) und von Lavach et al. (1987) empfohlenen - Behandlung mit Antibiotika und Glukokortikoiden beprobt wird, sollte bei positivem EHV-2 Nachweis stets die Möglichkeit einer Reaktivierung von latentem EHV-2 bedacht werden. Daher ist es kaum möglich - vor allem bei so geringen Patientenzahlen wie bei den bisher durchgeführten Studien - eine wissenschaftlich fundierte Aussage über die Beteiligung von EHV-2 an der equinen Keratokonjunktivitis zu treffen.

Da der EHV-2-Nachweis allerdings auch in klinisch unauffälligen Augen beschrieben wurde, scheint das Virus - möglicherweise infolge seiner immunmodulierenden Eigenschaften (Kapitel 1.4.3) - eher eine Rolle als Ko-Faktor, denn als auslösendes Agens bei der equinen Keratokonjunktivitis zu spielen.

Betrachtung des EHV-2-Nachweises in PBMC und Cytobrushproben

Da die PBMC als Latenzort für EHV-2 beschrieben wurden (Gleeson & Coggins, 1985; Drummer et al., 1996), war anzunehmen, daß sich das Virus in diesen Zellen öfter als in den anderen untersuchten Proben nachweisen lassen würde. Überraschenderweise gelang der EHV-2-Nachweis in Cytobrushproben (bei 44%-64% der Equiden) häufiger als in PBMC (bei 31%-54% der Equiden). Sollte sich dieses Ergebnis bei anderen Studien reproduzieren lassen, wäre es genauer und auch leichter, die Prävalenz von EHV-2 mittels Cytobrushproben aus dem Konjunktivalsack als durch Blutentnahme mit anschließender PBMC-Präparation zu ermitteln.

Bei bisherigen PCR-Untersuchungen von PBMC lag die Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Deutschland zwischen 30% (52/172 klinisch gesunde Tiere [Borchers et al., 1997]) und 63% (17/27 augenranke Tiere [Kershaw et al., 2001]), in Australien bei 31% (25/83 Renn- und Zuchtpferde [Reubel et al., 1995]), in Schweden bei 68% (26/38 Tiere [Nordengrahn et al., 2002]) und in Großbritannien bei 71% (15/21 Tiere [Nordengrahn et al., 2002]). In dieser Arbeit lag die Prävalenz von EHV-2 in PBMC von Test- und Kontrolltieren mit

zusammengerechnet 48% innerhalb der bisher für deutsche Pferde beschriebenen Prävalenzen.

Das Phänomen des häufigeren EHV-2-nPCR-Nachweises in Cytobrushproben als in PBMC verlangt nach einer intensiveren Analyse.

Zunächst ist zu sagen, daß Fehler in der Nachweisprozedur unwahrscheinlich sind, da bei den PBMC-Präparationen immer eine saubere, weiße Bande auftrat, stets eine Gesamt-DNA-Konzentration von 1-2 µg in die PCR eingesetzt wurde und die PCR-Kontrollen immer das erwartete Ergebnis zeigten.

Da die Konjunktiva ein gut durchblutetes und lymphgefäßreiches Gewebe ist, könnte eine Kontamination der Probe mit in der Konjunktiva vorhandenen B-Lymphozyten stattgefunden haben. Auch ein ständiges über Zell-zu-Zell-Kontakte vermitteltes EHV-2-Turnover von B-Lymphozyten in permissive Epithelzellen der Konjunktiva (Studdert, 1996) wäre vorstellbar. In beiden Fällen könnte die Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Cytobrushproben jedoch nicht höher sein als in den PBMC. Außerdem ist ein Kardinalsymptom einer Konjunktivitis eine Hyperämie. Somit wäre bei rein hämatogem Virustransport in die Konjunktiva anzunehmen, daß sich EHV-2 sowohl mittels Cytobrush als auch mittels Wattetupfer wesentlich öfter in den stärker durchbluteten erkrankten als in gesunden Konjunktivae nachweisen ließe.

Da das Trigeminalganglion als Latenzort für EHV-2 diskutiert wurde (Rizvi et al., 1997), könnte infektiöses EHV-2 - nach Reaktivierung aus der Latenz - aus dem Ganglion zentrifugal über den ersten oder zweiten Nebenast des *Nervus trigeminus* - beide innervieren die Konjunktiva sensibel - in die Konjunktiva gewandert sein. Ähnliches gilt für das Ziliarganglion (Thein, 1978; 1996), das als Teil des *Nervus oculomotorius* die Augenmuskulatur innerviert. In Anbetracht der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in der Konjunktiva scheint eine Ausbreitung von reaktiviertem, infektiösem Virus aus einem der erwähnten Ganglien in die Konjunktiva als unwahrscheinlich, da sonst bei über 50% der Tiere beider Gruppen aus der Latenz reaktiviertes, infektiöses EHV-2 im Auge präsent gewesen wäre.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, daß es sich bei dem Auge um eine Eintrittspforte für EHV-2 handelt. Dagegen sprechen allerdings die bisher angenommenen Infektionswege, die direkt und horizontal (Browning & Studdert, 1987a) über die oberen Atemwege verlaufen sollen (Bagust et al., 1972; Blakeslee et al., 1975; Sherman et al., 1977). Indirekte Infektionen scheinen nur über kurze Distanzen möglich, so daß aerogener Transport über Vektoren in das Auge keine entscheidende Rolle spielen dürfte. Allerdings wurde in dieser Arbeit bei 9/12 (75%) Tieren mit EHV-2-positiven Nasentupferproben EHV-2 auch im Auge nachgewiesen. Bei Oppen (2001) zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Dies könnte ein Hinweis auf eine Virusausbreitung vom Auge über den Tränennasenkanal in den nasalen Teil des

Respirationstraktes sein (siehe auch Kapitel 5.2). Da keine Studien über einen intraokulären Infektionsweg vorliegen, kann das Auge als Eintrittspforte für EHV-2 nicht völlig ausgeschlossen werden, zumal der Nachweis von EHV-2-DNA und -Antigen in Langerhansschen Zellen der Submukosa der Konjunktiva einen Hinweis darauf zu geben scheint, daß infektiöses EHV-2 über die Konjunktiva in den Pferdekörper gelangte und dort von den Langerhansschen Zellen phagozytiert wurde (Borchers et al., 2006b).

Letztlich sollte in Betracht gezogen werden, daß es sich bei der Konjunktiva um einen weiteren Latenzort für EHV-2 handeln könnte. Da die regelmäßige Präsenz eines Virus in einem Gewebe sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Tieren als Indikator für Latenz anzusehen ist, würde dies die erhaltenen Ergebnisse am besten erklären. Der Nachweis von EHV-2-DNA und -Antigen in Langerhansschen Zellen der Submukosa der Konjunktiva scheint allerdings eher auf das Vorhandensein von infektiösem Virus hinzudeuten (Borchers et al., 2006b). Es könnte sich bei dem Antigennachweis aber auch um reaktiviertes Virus oder um eine Primär- bzw. Reinfektion handeln.

Die Konjunktiva wurde bisher für kein anderes Herpesvirus als Latenzort beschrieben, obwohl die Persistenz von BHV-4 in diesem Gewebe diskutiert wurde (Egyed & Bartha, 1998). Für HSV und das Humane Cytomegalovirus (HCMV) ist bekannt, daß diese durch Transplantationen von gesunden Korneae übertragen werden können (Eastlund, 1995). Auch das EBV wurde häufig in gesunden Augengeweben nachgewiesen (Chodosh et al., 1996), wobei das Vorkommen in der Konjunktiva nicht untersucht wurde.

5.1.5 Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 mittels nPCR in Cytobrush- und Wattetupferproben

Um einen für die Routinediagnostik von viralen Keratokonjunktividen geeigneten Probenträger zu finden, wurde die Nachweishäufigkeit von EHV-2 mittels nPCR zu beiden Untersuchungszeitpunkten in Cytobrushproben (nur Cytobrushprobe positiv: c) und Wattetupferproben (nur Wattetupferprobe positiv: b) bei der Testgruppe ($\chi^2=6,1$; b:2, c:25), bei der Kontrollgruppe ($\chi^2=12$; b:3, c:33) und bei den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testtiere ($\chi^2=4,1$; b:0, c:14) mittels McNemar-Test statistisch ausgewertet. Hierbei zeigte sich in allen untersuchten Fällen ein signifikant häufigerer EHV-2-Nachweis in Cytobrushproben als in Wattetupferproben. Obwohl der Cytobrush eindeutig der sensitivere Probenträger ist, läßt sich die Frage nach der besten Methode, um eine mögliche Beteiligung von EHV-2 an einer equinen Keratokonjunktivitis zu diagnostizieren, nicht eindeutig beantworten. Die EHV-2-nPCR-Nachweise in den Cytobrushproben von Test- und Kontrollgruppe gelangen etwa gleich oft (in Test- bzw. Kontrollgruppe zur Erstuntersuchung bei 61% bzw. 64% und zur Zweituntersuchung bei 48% bzw. 44% der Pferde). Die

Nachweishäufigkeit von EHV-2 in den Wattetupferproben wies hingegen größere Unterschiede zwischen Test- und Kontrollgruppe auf (in Test- bzw. Kontrollgruppe zur Erstuntersuchung bei 21% bzw. 7% und zur Zweituntersuchung bei 32% bzw. 20% der Pferde). Da sich in dieser Arbeit aber weder bei Cytobrush- noch bei Wattetupferproben ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer Augenerkrankung und dem EHV-2-Nachweis mittels nPCR aufzeigen ließ, ist der sensitivere Probenträger - nämlich der Cytobrush - für die Beprobung des Auges zu bevorzugen.

Es fällt auf, daß die Abweichung von der Symmetrie in der Kontrollgruppe ($\chi^2=12$) wesentlich höher war als in der Testgruppe ($\chi^2=6,1$) und in den erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten Augen der Testtiere ($\chi^2=4,1$). Wie weiter oben erwähnt, traten in der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Cytobrushproben nur geringe Differenzen bei Test- und Kontrolltieren auf. Die Unterschiede in der Abweichung von der Symmetrie müßten sich demnach aus der Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Wattetupferproben ergeben. Es läßt sich hier also indirekt zeigen, daß EHV-2 seltener in Wattetupfern von Kontrolltieren als in solchen von Testtieren nachgewiesen wurde. Ferner gelang die Detektion bei den Testtieren öfter in erkrankten bzw. (ehemals) erkrankten als in gesunden Augen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von EHV-2 an der equinen Keratokonjunktivitis.

Wie bereits erwähnt, ist es mit einem Cytobrush möglich, bei der Probennahme viel Zellmaterial zu erhalten, während sich mit Wattetupfern eher Sekrete entnehmen lassen. EHV-2 ist ein langsam zytopathogenes, stark zellassoziertes Virus (Turner et al., 1970). Es liegt also selbst in infektiöser Form lange Zeit intrazellulär vor, bevor es zum Zelltod kommt. Nach dem Absterben von infizierten Zellen müßte das freigesetzte Virus ebenfalls in Wattetupferproben von zellfreien Sekreten gefunden werden. Der signifikant häufigere Nachweis von EHV-2 in Cytobrushproben als in Wattetupferproben von augenkranken und gesunden Tieren scheint darauf hinzudeuten, daß das Virus vor allem in tieferen Schichten der Konjunktiva intrazellulär vorliegt. So wurde EHV-2 in Langerhansschen Zellen in der Submukosa der Konjunktiva mittels *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen (Borchers et al., 2006b). Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, daß EHV-2 latent in der Konjunktiva vorkommt.

5.1.6 Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 mittels nPCR in den einzelnen Proben bei Erst- und Zweituntersuchung

Um Informationen zur Entwicklung des EHV-2-Nachweises über längere Zeiträume in den unterschiedlichen Proben (Cytobrush-, Wattetupfer-, Nasentupferproben und PBMC) zu erhalten, erfolgte eine Nachuntersuchung der Tiere etwa 4-5 Wochen nach der ersten Probennahme.

Im McNemar-Test zeigte sich bei keiner der Proben von Test- und Kontrollgruppe ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Virusnachweis bei der Erst- und Zweituntersuchung.

Die Detektion von EHV-2 gelang in beiden Gruppen und bei allen Proben - außer bei den Wattetupferproben (Testgruppe: Erstuntersuchung 21%, Zweituntersuchung 32%; Kontrollgruppe: Erstuntersuchung 7%, Zweituntersuchung 20%) - zur Nachuntersuchung seltener als zur Erstuntersuchung. Der seltenere EHV-2-Nachweis zur Zweituntersuchung könnte, zumindest bei der Testgruppe, auf die bei einigen Tieren erfolgte Anwendung von Virostatika zurückzuführen sein.

Die Probennahme mittels Wattetupfer fand in beiden Gruppen zur Erstuntersuchung nach der Beprobung für eine zytologische Untersuchung statt (erfolgte in der TiHoHa, daher Daten hier nicht gezeigt), die mit einem Cytobrush durchgeführt wurde. Zur Zweituntersuchung wurde hingegen auf eine zytologische Untersuchung verzichtet, so daß bei diesem Untersuchungstermin die Wattetupferproben die ersten aus den Augen entnommenen Proben waren. Dies scheint eine plausible Erklärung dafür zu sein, daß EHV-2 nur in Wattetupfern bei der Zweituntersuchung öfter als bei der Erstuntersuchung nachgewiesen wurde.

5.1.7 Ergebnisse der Kokultivierung von EHV-2

EHV-2 zeichnet sich durch eine genetische Variabilität aus, die stärker als bei allen anderen Herpesviren ausgeprägt ist (Browning & Studdert, 1987b; 1989b). Dies bestätigte sich auch bei Isolaten, die aus erkrankten Augen von 3 Fohlen angezüchtet wurden (Collinson et al., 1994). Bei Infektionsversuchen an 2 Ponys und an Mäusen, die mit verschiedenen EHV-2-Isolaten infiziert wurden, konnten die einzelnen Stämme mittels nPCR in unterschiedlichen *post-mortem* Geweben gefunden werden, was als Zeichen für stammspezifischen Gewebetropismus gedeutet wurde (Borchers et al., 1998; 2002). Es könnte also die Möglichkeit bestehen, an Hand von genetischen Unterschieden bei EHV-2-Isolaten Rückschlüsse auf deren Virulenz und Gewebetropismus zu ziehen.

Das Ziel der Virusanzucht aus Cytobrushproben und PBMC war es, EHV-2-Isolate aus erkrankten und gesunden Augen und aus einem Auge und dem Blut bei ein und demselben Tier zu erhalten. In weiteren Studien könnten diese Isolate auf biologische und molekularbiologische Merkmale untersucht werden, die möglicherweise Aufschlüsse über Virulenz und Gewebetropismus erbringen könnten. Als Anzuchtmethode wurde die Kokultivierung gewählt, da sich auf diese Weise sowohl latentes als auch infektiöses Virus gewinnen läßt.

In dieser Arbeit wurde die Kokultivierung von Cytobrushproben und PBMC in equinen Dermalzellen zumeist unter Zugabe von PMA, teils auch parallel mit und ohne PMA, durchgeführt. PMA induziert als Phorbolsäureester die DNA-Replikation und Expression sehr früher Gene und überführt so latentes in infektiöses Virus (Hausen et al., 1978; Tenny & Morahan, 1987). Erste deutliche cpE zeigten sich nach 3-5maliger Passagierung der Zellen (10-22 Tage), wobei die Anzuchtdauer unter Zugabe von PMA durchschnittlich 15 Tage und ohne PMA durchschnittlich 18 Tage betrug.

Charakterisierung der Isolate

Das hier beobachtete, langsame Viruswachstum in der Zellkultur ist typisch für EHV-2 und andere γ -Herpesviren, so daß die Anzucht von equinen α -Herpesviren (EHV-1, -3, -4) - bei denen sich erste cpE schon nach 24-48 Stunden zeigen würden - äußerst unwahrscheinlich erschien. Für einige der hier gewonnenen Isolate lag der Zeitraum, in dem sich deutliche cpE zeigten mit etwa 3 Wochen über der von anderen Autoren für EHV-2 beschriebenen Anzuchtdauer von 7-17 Tagen (Harden et al., 1974; Thein & Böhm, 1976; Collinson et al., 1994). Da für EHV-5 längere Anzuchtzeiten als für die meisten EHV-2-Stämme angenommen werden (Browning & Agius, 1996), bestand die Möglichkeit, daß es sich bei einigen Isolaten um EHV-5 hätte handeln können. Mikroskopisch zeigten die cpE das für beide γ -Herpesviren charakteristische Bild von langsam-progressiv wachsenden Plaques mit zellfreien Höfen, in deren Peripherie sich ballonartig vergrößerte Zellen und Trauben von kleinen, abgerundeten Zellen befanden (Harden et al., 1974; Thein & Böhm, 1976; Collinson et al., 1994; Kershaw et al., 2001; zur Übersicht siehe Browning & Studdert, 1988). Nach gleicher Anzuchtdauer von gleichzeitigen Virussuspensionen variierte die Größe der Plaques bei den einzelnen Isolaten, sie waren aber stets kleiner als die von EHV-1- und EHV-4-Referenzstämmen gebildeten cpE. Auch dieses Verhalten ist typisch für EHV-2 (Plummer et al., 1969; 1973; Turner et al., 1970; Studdert et al., 1970; Harden et al., 1974).

Die endgültige Charakterisierung der angezüchteten Viren erfolgte über Isolierung und Aufreinigung ihrer DNA und anschließender EHV-2-nPCR. So konnte bewiesen werden, daß es sich bei allen Isolaten um EHV-2 handelte.

In dieser Arbeit konnte EHV-2 aus insgesamt 13/45 (29%) Test- und Kontrolltieren aus der TiHoHa isoliert werden. Von diesen 13 Tieren wurden insgesamt aus 22 Proben 25 EHV-2-Isolate angezüchtet, wobei sich das Virus in 3 Fällen sowohl mit als auch ohne PMA-Zugabe kokultivieren ließ.

Virusisolierung aus PBMC

Aus den PBMC gelang die Kokultivierung von EHV-2 bei 21% (3/14) der Proben von Testtieren sowie bei 43% (16/37) der Proben von Kontrolltieren und insgesamt bei 37% (19/51) der Blutproben.

In anderen Studien konnte EHV-2 mit 23% (11/48 [Kershaw et al., 2001]) und 31% (53/172 [Borchers et al., 1997]) ähnlich oft aus PBMC von deutschen Pferden isoliert werden und aus 24% (34/139) der PBMC von polnischen Pferden (Ruszczuk et al., 2004). Ältere Berichte, in denen der γ -Herpesvirus-Nachweis aus PBMC mittels Kokultivierung bei 89% der getesteten Tiere in den USA (71/80 [Kemeny & Pearson, 1970]) und in Großbritannien (17/19 [Roeder & Scott, 1975]) gelang, lagen weit über den hier erhaltenen Ergebnissen. Dafür könnten teilweise regionale Unterschiede verantwortlich sein. Ein weiterer möglicher Grund ist, daß in diesen Studien nicht ausschließlich EHV-2, sondern ebenfalls EHV-5 angezüchtet wurde, da eine Differenzierung der beiden γ -Herpesviren erst später erfolgte (Browning & Studdert, 1987b; 1989a; Agius et al., 1992).

Virusisolierung aus Cytobrushproben

Es wurden bei Test- und Kontrolltieren 172 Kokultivierungen von Cytobrushproben durchgeführt, wobei nur 3 Isolate (2%) aus 2 Kontrollpferden gewonnen wurden. Bei dem Tier K9 gelang die Isolierung zu beiden Untersuchungen. Bei dem Pferd K14 konnte zu ein und demselben Untersuchungszeitpunkt EHV-2 aus dem Auge und den PBMC angezüchtet werden. Aus Augen von Testtieren wurde kein EHV-2 isoliert.

Zusätzlich zu den Cytobrushproben von Test- und Kontrollgruppentieren wurden Kokultivierungen von 9 Cytobrushproben, die von einer Klinik in Newmarket, England, eingesendet worden waren, durchgeführt (Daten hier nicht gezeigt). Diese Proben wurden von einjährigen Welsh Ponys entnommen, die zusammen in einer Gruppe lebten und die alle unter einer Konjunktivitis litten. Bei den Anzuchtversuchen dieser Cytobrushproben konnte in 2/9 (22%) Fällen EHV-2 aus dem Auge isoliert werden.

Insgesamt gelang die EHV-2-Anzucht aus dem Auge also bei 3% (5/181) der kokultivierten Cytobrushproben.

Im Gegensatz zu den Test- und Kontrolltieren, die über einen längeren Zeitraum als einzelne Patienten in die TiHoHa kamen und dann in 2 Gruppen zusammengefaßt wurden, handelte es sich bei den Pferden aus England um einjährige Tiere, die zusammen in einer Gruppe gehalten wurden.

Bei equinen Keratokonjunktivitiden, deren Ätiologie auf EHV-2 zurückgeführt wurde, kam es bei Fohlen häufig zu Erkrankungen mehrerer Tiere in einer Gruppe (Thein, 1978; Collinson, 1994). Thein et al. (1983) erwähnt explizit das Auftreten von EHV-2-bedingten Keratokonjunktivitiden bei 6% von 100 Araber-Saugfohlen, die innerhalb der ersten 30 Tage *post-partum* erkrankten. Hierbei muß bedacht werden, daß die Immunabwehr von Araber-Fohlen aus hereditären Gründen als besonders schwach einzuschätzen ist. Es wäre also möglich, daß bei immunsupprimierten oder noch nicht immunkompetenten Tieren - oder Tiergruppen - EHV-2-Infektionen besonders leicht angehen. Da aber Immunsuppressionen bei adulten Pferden eher sporadisch auftreten, würde es zumeist nur bei Einzeltieren zu klinischen Symptomen kommen. Das Immunsystem von Fohlen bildet EHV-2-Antikörper zwar schon im ersten Lebensmonat, doch steigt der Titer etwa bis zum sechsten Lebensmonat stetig an (Fu et al., 1986; Murray et al., 1996), so daß sich Infektionen bei unter 6 Monate alten Tieren - deren Antikörpertiter noch nicht das Niveau von älteren Pferden erreicht haben - schneller in einer Gruppe ausbreiten könnten. Hier läßt sich eine Parallele zu anderen Krankheitsbildern ziehen, die im Zusammenhang mit EHV-2-Infektionen beschrieben wurden. Beispielsweise gelang bei Erkrankungen des Respirationstraktes ein - im Vergleich mit gesunden, gleichaltrigen Tieren - häufigerer EHV-2-Nachweis vor allem bei Fohlen (Palfi et al., 1978; Fu et al., 1986; Ames et al., 1986; Schlocker et al., 1995; Murray et al., 1996). Ferner wurde bei Fohlen mit respiratorischen Symptomen EHV-2 öfter aus Nasentupfern von Tieren isoliert, die jünger als 6 Monate waren als aus Nasentupfern von älteren Pferden (Turner et al., 1970). In diese Richtung gehend könnten auch Vakzinationsversuche bei Fohlen gegen EHV-2 gedeutet werden, bei denen sich durch passive Immunisierung der Virusnachweis in Nasentupfern (Belak et al., 1980) und durch aktive Immunisierung die Morbidität und Mortalität von respiratorischen Erkrankungen (Morein & Merza, 1991; Nordengrahn et al., 1996; Varga et al., 1997) senken ließen.

Es könnte sich also als empfehlenswert erweisen, Fohlen oder immunsupprimierte Pferde, die Symptome einer Keratokonjunktivitis zeigen zu isolieren, um eine horizontale Virusausbreitung zu verhindern.

Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 mittels Kokultivierung von Cytobrushproben und PBMC

Die Kokultivierung gelang aus 3% (5/181) der Cytobrushproben (inklusive der Proben aus England) und 37% (19/51) der PBMC. Ein Grund für diesen frappierenden Unterschied dürfte sein, daß die Versuchsbedingungen der Kokultivierung von Cytobrushproben im Laufe dieser Arbeit erst optimiert werden mußten, wofür 64 Anzuchtversuche benötigt wurden. Ferner war es bei der Kokultivierung von Zellmaterial aus Cytobrushproben - im Gegensatz zu den

PBMC - unmöglich, konstante Zellmengen zu erhalten, wobei die Anzahl der eingesetzten Zellen aus dem Auge deutlich geringer war als bei den PBMC. Die geringere und nicht standardisierte Zellenmenge bei den Anzuchtversuchen von Cytobrushproben könnte erklären, warum die EHV-2-Anzucht aus dem Auge wesentlich seltener gelang als aus den PBMC.

Einen weiteren kritischen Faktor für das Gelingen der Kokultivierung stellen die Transportbedingungen und -zeiten für den Weg der Probe vom Patienten bis zum untersuchenden Labor dar. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß die Proben aus England tiefgefroren eingeschickt worden sind. Dies könnte erklären, warum die Kokultivierung von EHV-2 bei 22% (2/9) der Anzuchtversuche aus Cytobrushproben von englischen Tieren gelang und nur bei 2% (3/172) der Test- und Kontrolltiere.

Betrachtung von Isolaten, die zu beiden Untersuchungszeitpunkten aus PBMC bzw. dem Auge von ein und demselben Tier gewonnen wurden

In Test- und Kontrollgruppe gelang die Virusisolierung zu beiden Untersuchungszeitpunkten bei 7 Pferden aus den PBMC und bei einem Kontrolltier aus dem Auge, somit also bei insgesamt 73% (16/22) der in der Anzucht positiven Proben.

Um festzustellen, ob in diesen Fällen bei Erst- und Zweituntersuchung ein und derselbe EHV-2-Stamm per Kokultivierung isoliert worden war oder ob die Virusanzucht aus der Probe der Zweituntersuchung das Ergebnis einer Re- oder Superinfektion war, wurden die Isolate, die von ein und demselben Tier stammten mittels *Eco* RI-, *Hind* III- und *Spe* I-REA untersucht. Dabei stimmten die REA-Schnittmuster der Erst- und Zweituntersuchung in 2 Fällen bei den PBMC und außerdem bei den Augenisolaten (K9a und K9b) ein und desselben Pferdes überein. Es ist also davon auszugehen, daß ein und derselbe EHV-2-Stamm relativ häufig sowohl in den PBMC als auch in der Konjunktiva über Zeiträume von mindestens 4 Wochen präsent sein kann, ohne ein Krankheitsgeschehen auszulösen.

Dieses Ergebnis war für PBMC - zumal sich mittels Kokultivierung auch latentes Virus nachweisen läßt - zu erwarten, da es sich bei ihnen um einen Latenzort für EHV-2 handelt (Gleeson & Coggins, 1985; Drummer et al., 1996). Das Vorkommen ein und desselben EHV-2-Stammes in der Konjunktiva über einen so langen Zeitraum ohne klinische Symptome hervorzurufen, ist ein weiterer Anhaltspunkt für eine Latenz von EHV-2 in diesem Gewebe.

5.1.8 Ergebnisse der serologischen Untersuchungen auf EHV-2-spezifische Antikörper

Um zu überprüfen, ob Antikörpertiterhöhen gegen EHV-2 und ein Titeranstieg bei Serumpaaren mit einer Augenerkrankung oder mit einem positiven EHV-2-nPCR- oder Kokultivierungs-Befund korrelieren würden, wurden IFT und NT (Referenzstamm: Melissa) durchgeführt. Die mittels IFT und/oder NT ermittelten Infektionstiter korrelierten weder mit dem Merkmal augenkrank noch mit dem EHV-2-Nachweis in den beiden durchgeführten, direkten Virusnachweismethoden.

Dies bestätigt die Ergebnisse von Kershaw et al. (2001), daß serologische Methoden auch für die Diagnose von möglicherweise EHV-2-bedingten Keratokonjunktivitiden ungeeignet sind.

Probleme der serologischen Diagnose von EHV-2 Infektionen

Trotz kollostraler Übertragung von Antikörpern (Belak et al., 1980) treten EHV-2-Infektionen häufig schon in den ersten Tagen oder Wochen *post-partum* auf. Zum einen kann durch den Geburtsstreß latentes EHV-2 reaktiviert werden, so daß Mutterstuten häufig massiv Virus ausscheiden (Mayr & Thein, 1984), zum anderen findet eine horizontale Übertragung zwischen den Fohlen statt. Deshalb sind in endemischen Gebieten quasi alle Fohlen in einem Alter von 3-4 Monaten mit EHV-2 infiziert (Fu et al., 1986; Murray et al., 1996). Vermutlich wird die Antikörperbildung durch häufige Re- und Superinfektionen mit antigenetisch unterschiedlichen EHV-2-Stämmen (Studdert, 1974; Browning & Studdert, 1987a) stimuliert, so daß hohe Antikörpertiter gegen EHV-2 in der gesamten Pferdepopulation weit verbreitet sind (Bagust et al., 1972; McGuire et al., 1974; Rose et al., 1974; Jolly et al., 1986; Borchers et al., 1997). Signifikante Titeranstiege, die das Resultat einer Re- oder Superinfektion mit EHV-2 sind, scheinen nur sehr selten aufzutreten. Sie kommen hauptsächlich bei Erstinfektionen von Fohlen (Thein, 1976; Murray et al., 1996) oder bei iatrogen immunsupprimierten und anschließend experimentell infizierten Tieren (Borchers et al., 1998) vor. Andere Autoren konnten mittels NT weder bei natürlich noch bei experimentell infizierten Pferden auffällige Titeranstiege gegen EHV-2 feststellen (Wilks & Studdert, 1976).

5.1.9 Genetische Heterogenität von EHV-2

Wie bereits in Kapitel 5.1.7 erläutert, ist EHV-2 in höchstem Maße genetisch variabel. Dies führt bei richtig gewählten Primern zu unterschiedlich großen PCR-Amplifikaten (Borchers et al., 1997; Holloway et al., 2000).

In diesem Kapitel wurde überprüft, ob sich an Hand des Amplifikatgrößenpolymorphismus bei der hier verwendeten EHV-2-IL-10-nPCR (Borchers et al., 1997) oder an Hand unterschiedlicher REA-Schnittmuster (*Eco* RI, *Hind* III und *Spe* I) von EHV-2-Isolaten Rückschlüsse auf Ursprung der Probe und Gesundheitszustand des Tieres und damit auf Gewebetropismus und Virulenz ziehen lassen.

Vergleich von Isolaten, die aus Cytobrush- und Blutproben ein und desselben Pferdes bei der Erstuntersuchung gewonnen wurden

Mittels nPCR von Tupfer- und Blutproben wurde bereits gezeigt, daß zu ein und demselben Untersuchungszeitpunkt in unterschiedlichen Organen eines Tieres EHV-2-Varianten vorkommen können, die genetisch divergieren (Kapitel 4.1.4.5). Dies ist ein Anzeichen dafür, daß unterschiedliche EHV-2-Stämme gleichzeitig in ein und demselben Pferd vorkommen können (Browning & Studdert, 1987b).

Mittels Kokultivierung wurde EHV-2 zu ein und demselben Untersuchungszeitpunkt nur bei dem Pferd K14 aus einem Auge und dem Blut isoliert. Zwischen den beiden Virusisolaten wurden weder bei Wachstumsverhalten und Plaquemorphologie noch mittels REA von gereinigter Virus-DNA Unterschiede festgestellt. Es ließ sich also bei den hier gewonnenen EHV-2-Isolaten eines Pferdes - im Gegensatz zu den Ergebnissen von Browning & Studdert (1987b) und im Gegensatz zu den nPCR Ergebnissen von anderen Test- und Kontrolltieren - kein Hinweis auf das gleichzeitige Vorkommen unterschiedlicher EHV-2-Stämme in Blut und Auge bei ein und demselben Tier finden. Da bei dem Pferd K14 auch bei den nPCR-Amplifikaten, die direkt aus der Cytobrush- und Blutprobe angereichert worden waren, keine Unterschiede festzustellen waren, ist davon auszugehen, daß es sich bei den beiden Isolaten tatsächlich um ein und denselben EHV-2-Stamm gehandelt hat.

Genetische Unterschiede beim EHV-2-Nachweis von Proben, die mit identischem Ursprung zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten von ein und demselben Tier entnommen wurden

Beim EHV-2-Nachweis wurden zwischen Erst- und Zweituntersuchung von Tupfer- bzw. Blutproben, die einem Tier entnommen worden waren, mittels nPCR (Kapitel 4.1.4.5) sowie mittels REA von aus PBMC isolierter und gereinigter Virus-DNA (Kapitel 4.1.5.2.2) genetische Unterschiede festgestellt.

Es könnte sich bei den beobachteten genetischen Differenzen sowohl um unabhängig voneinander verlaufende Re- oder Superinfektionen mit einem anderen EHV-2-Stamm als auch um genetische Mutationen des bei der Erstuntersuchung nachgewiesenen EHV-2-

Stammes gehandelt haben. Da die genetischen Unterschiede teilweise sehr markant waren, scheint es unwahrscheinlich, daß diese auf spontanen Mutationen beruhten. Re- und Superinfektionen mit anderen EHV-2-Stämmen scheinen also häufig vorzukommen (Browning & Studdert, 1987a). Bei einem genetisch so heterogenen Virus wie EHV-2 dürften allerdings auch Mutationen des viralen Genoms während der Infektion eines Tieres regelmäßig auftreten.

Endbeurteilung der genetischen Heterogenität von EHV-2

Es war weder an Hand von nPCR-Amplifikaten noch an Hand von REA-Schnittmustern (von nPCR-Amplifikaten und der DNA von EHV-2-Isolaten) möglich, Gemeinsamkeiten zwischen EHV-2-Stämmen in kranken und gesunden Tieren oder dem Ursprungsgewebe der einzelnen Proben festzustellen.

In dieser Arbeit konnten - wie auch bei Borchers et al. (1997), Wolfinger (1998) und Kershaw et al. (2001) - mittels EHV-2-IL-10-nPCR an Hand der Amplifikatgröße keine Rückschlüsse auf das Ursprungsgewebe von Proben und den Gesundheitszustand von Augen bzw. Tieren gezogen werden. Die Anzahl der Wiederholungen des repetitiven Motivs in dem extronischen DNA-Bereich scheint somit innerhalb der untersuchten Parameter keinen erkennbaren Einfluß auf die Eigenschaften von EHV-2 zu haben.

5.2 Untersuchungen von *post-mortem*-Geweben auf EHV-2

EHV-2 ist mit einer Prävalenz von bis zu 89% (Kemeny & Pearson, 1970; Roeder & Scott, 1975) weit in der gesamten Pferdepopulation verbreitet. Das Virus konnte in den unterschiedlichsten Geweben nachgewiesen werden (Kapitel 1.4.2).

Um Daten über den Gewebetropismus von EHV-2 in okulären Strukturen zu erhalten, wurden - soweit dies aus organisatorischen Gründen möglich war - beiderseits Konjunktiva, Tränendrüse, Sehnerv, Kammerwasser, Nasenschleimhaut und Trigeminalganglion sowie ein Stück des rechten mittleren Lungenlappens - als Indikatorgewebe, da dieser häufig positive Ergebnisse in der EHV-2-nPCR aufweist (Borchers, 2001) - von 18 augengesunden Pferden, aus dem Institut für Pathologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der FU-Berlin, entnommen und mittels EHV-2-nPCR untersucht. Ferner wurden Gewebe von einem abortierten Fötus und des Testtier T11 mittels nPCR untersucht.

Nachweis von EHV-2 in einem abortierten Fötus

Zunächst soll die interessante Tatsache diskutiert werden, daß bei den 5 Tieren, von denen die Trigeminalganglien untersucht wurden, EHV-2 nur bei einem im achten Trächtigkeitsmonat abortierten Fötus (P17) nachgewiesen werden konnte. Alle übrigen Gewebe des Fötus waren EHV-2-negativ.

Die Ergebnisse von Rizvi et al. (1997), der bei 50% von 12 natürlich infizierten Ponys EHV-2 mittels PCR im Trigeminalganglion nachwies und daraus einen möglichen Latenzort ableitete, ließen sich in dieser Arbeit nicht bestätigen. Mit 20% positiven Trigeminalganglien lag die Nachweishäufigkeit von EHV-2 eher bei der von Edington et al. (1994), der das Virus in 10% von 40 untersuchten Schlachtpferden fand. Kershaw et al. (2001) konnte hingegen bei keinem von 9 Schlachtpferden EHV-2 im Trigeminalganglion detektieren.

Natürliche, intrauterine EHV-2-Infektionen wurden kontrovers diskutiert. So gelang der EHV-2-Nachweis bei abortierten Föten (Petzoldt, 1967; Galosi et al., 2005), aber auch bei gesund geborenen Fohlen (Thein et al., 1983). Andere Autoren konnten hingegen keine Anzeichen von natürlichen, intrauterinen Infektionen feststellen (Harden et al., 1974; Studdert, 1974). Nach experimenteller, intrauteriner Infektion wurde ein Fohlen geboren, bei dem sich EHV-2 bis zum 65. Tag *post-partum* nachweisen ließ (Gleeson & Studdert, 1977). Eine intrauterine Infektion scheint also, wenn auch nur unter bestimmten Umständen, möglich. Da bei dem Tier P17 beide Trigeminalganglien nPCR-positiv und alle übrigen Gewebe nPCR-negativ waren, kann eine EHV-2-Kontamination des Fötus im Stall bzw. auf der Weide ausgeschlossen und eine natürliche, intrauterine Infektion angenommen werden.

Nachweis von EHV-2 in equinen Augengeweben

Der EHV-2-Nachweis gelang bei den einzelnen Pferden am häufigsten in Schleimhäuten (56% [10/18] der Konjunktivae, 100% [2/2] der Nasenschleimhäute), gefolgt von der Tränendrüse (31% [5/16]), der Lunge (24% [4/17]) und Nervengewebe (20% [1/5] der Trigeminalganglien, 10% [2/20] der Sehnerven). In den 4 untersuchten Kammerwasserproben wurde kein EHV-2 gefunden.

Mittels McNemar-Test wurde die Nachweishäufigkeit von EHV-2 in der Konjunktiva mit der Nachweishäufigkeit in Tränendrüse und Sehnerv verglichen. Dabei zeigte sich ein statistisch signifikant häufigerer Virusnachweis in der Konjunktiva als im Sehnerv. Auf weitere statistische Untersuchungen wurde verzichtet, da die übrigen Gewebe wesentlich seltener entnommen worden waren bzw. ein Vergleich von Konjunktiva und Lunge - da die Lunge als Indikatorgewebe dienen sollte - als uninteressant angesehen wurde.

Der im Vergleich zur Konjunktiva signifikant seltenere EHV-2-Nachweis im Sehnerv könnte - da sich EHV-2 intranukleär repliziert - auf die geringe Zellkerndichte in peripheren Nervengewebe zurückzuführen sein. Dieses Phänomen wurde auch für andere Nerven beschrieben (Rizvi et al., 1997).

Es fällt auf, daß die Detektion von EHV-2 in der Konjunktiva mit 56% positiven Pferden in dieser Gruppe (P1-P20) nahezu genauso oft wie in den Cytobrushproben von Test- (T1-T28) und Kontrolltieren (K1-K28) (insgesamt 55% EHV-2 positive Pferde) gelang.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, daß - außer bei dem abortierten Fötus (P17), bei dem lediglich die Trigeminalganglien EHV-2-positiv waren - bei negativer Konjunktiva niemals ein anderes Organ positiv auf EHV-2 getestet wurde. Außerdem wurde EHV-2 in anderen Augengeweben (Sehnerv und Tränendrüse) und in der Nasenschleimhaut stets nur auf der Seite detektiert, die auch eine positive Konjunktiva aufwies. Bei 3/18 (17%) Tieren wurde EHV-2 ausschließlich in der Konjunktiva gefunden. Ferner konnte in den 2 Geweben (Nasenschleimhaut und Tränendrüse), die über den Tränennasenkanal bzw. die *Ductuli excretorii* direkt mit der Konjunktiva verbunden sind, häufiger als in den übrigen untersuchten Geweben EHV-2 nachgewiesen werden. Dies scheint ein Indiz dafür zu sein, daß sich EHV-2 von der Konjunktiva, bei der es sich möglicherweise sogar um eine Eintrittspforte für EHV-2 handeln könnte, in andere okuläre Gewebe ausbreitet. Eine solche Ausbreitung könnte beispielsweise über in der Submukosa der Konjunktiva lokalisierte Langerhanssche Zellen geschehen, in denen EHV-2-DNA und -Antigen nachgewiesen wurden (Borchers et al., 2006b). Bisher konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob die Präsenz von EHV-2-Antigenen in diesen Zellen auf einer langfristigen, produktiven Infektion, einer primären Infektion, einer Reinfektion oder einer Reaktivierung von latentem Virus beruht.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte im Gegensatz zu der Publikation von Kershaw et al. (2001) kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen EHV-2-Nachweis und den Merkmalen augenkrank und gesund festgestellt werden.

Als Probenträger sollte in zukünftigen Forschungsprojekten der Cytobrush zum Einsatz kommen, da er sich gegenüber dem Wattetupfer als sensitiver erwies.

Anscheinend treten häufig EHV-2-unabhängige Keratokonjunktivitiden auf, so daß die Testgruppe - um bakterielle Infektionen auszuschließen - aus Tieren zusammengesetzt sein sollte, deren Krankheitsbilder trotz Gabe von Antibiotika über längere Zeiträume chronisch-rezidivierend verlaufen. Da Glukokortikoide eine Reaktivierung von latentem EHV-2 bewirken können, sollte in der Testgruppe streng zwischen Tieren, die mit glukokortikoidhaltigen Medikamenten behandelt worden waren und Tieren, bei denen dies nicht der Fall war, unterschieden werden. Es wäre weiterhin interessant, die Effekte von lokaler und systemischer Glukokortikoidapplikation zu vergleichen. Ferner sollten vor allem junge Tiere (< 12 Monate) untersucht werden, da bei Fohlen am häufigsten Verbindungen zwischen EHV-2 und einer Augenerkrankung hergestellt wurden.

Es konnte nicht geklärt werden, ob EHV-2 bei der equinen Keratokonjunktivitis eine Rolle als Ko-Faktor, als primärer Auslöser oder aber als nur zufällig auftretendes Agens spielt. Aus diesem Grunde sollte neben den EHV-2-Tests auch auf andere Viren, Bakterien und Ko-Faktoren hin untersucht werden. Insbesondere könnte dem Auftreten von EHV-5, Adenoviren, grampositiven Kokken, Mykoplasmen und Chlamydien im Auge nachgegangen werden, und es könnten zur Klärung des Immun- und Gesundheitsstatus Blutparameter herangezogen werden.

Auch dem häufig beschriebenen Zusammenhang zwischen Besserung bzw. Abheilung von Keratokonjunktivitiden und der Gabe von Virostatika und unter Umständen auch von Glukokortikoiden (Thein & Böhm, 1976; Thein, 1978; Matthews & Handscombe, 1983; Miller et al., 1990) sollte in klinischen Studien weiter nachgegangen werden.

In dieser Arbeit wurden - wie auch schon von anderen berichtet (Browning & Studdert, 1987b; 1989b; Borchers et al., 1997; Wolfinger, 1998; Kershaw et al., 2001) - keine genetischen Gemeinsamkeiten von EHV-2-Stämmen festgestellt, die in erkrankten Augen oder in ein und demselben Gewebe nachgewiesen wurden. Somit ließ sich erneut kein Zusammenhang zwischen den untersuchten genetischen Merkmalen und dem

Gewebetropismus oder der Virulenz von verschiedenen EHV-2-Stämmen entdecken. Trotzdem sollte weiterhin in dieser Richtung geforscht werden, da ein Gelingen vermutlich zu einer immensen Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten führen würde. Daher sollte in weiteren Studien stets versucht werden, EHV-2 aus den untersuchten Proben zu isolieren. Hierbei sollte beachtet werden, daß eine erfolgreiche Kokultivierung von EHV-2 aus dem Auge von der beprobten Gruppe und von dem Umgang mit dem Probenmaterial abzuhängen scheint, wobei sich EHV-2 in dieser Arbeit am häufigsten aus Cytobrushproben isolieren ließ, die von Jährlingen entnommen und tiefgefroren in Tupferisoliermedium eingesandt worden waren.