

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. Klaus Osterrieder,
wissenschaftliche Betreuung: PD Dr. Kerstin Borchers)

**Virologische und Molekularbiologische Studien zur Verbreitung und
Bedeutung von EHV-5-Infektionen beim Pferd**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von Nadine Richter
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2008
Journal-Nr.: 3243

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ. Prof. Dr. Leo Brunnberg

Erster Gutachter: PD Dr. Kerstin Borchers

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Corinna Eule

Dritter Gutachter: PD Dr. Michael Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses, horse diseases, eye diseases, Equid Herpesvirus 5, Equid Herpesvirus 2,
viral infections, polymerase chain reaction, sampling, *in situ* hybridization

Tag der Promotion: 9.09.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-480-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mbv 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

In Liebe für

Mama und Papa

und für

Paul-Ajoy

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	16
1.1 Herpesviridae	16
1.1.1 Familien der Herpesviren	19
1.2 Equine Herpesviren.....	22
1.2.1 Das Equine Herpesvirus Typ 1 und das Equine Herpesvirus Typ 4.....	23
1.2.2 Das Equine Herpesvirus Typ 2	25
1.2.3 Das Equine Herpesvirus Typ 3	29
1.3 Das Equine Herpesvirus Typ 5	30
1.4 Impfung mit Resequin NN Plus® und Behandlung mit dem Immunmodulator Zylexis®	33
2. Zielsetzung der Dissertation	36
3. Material- und Methodenteil	38
3.1 Materialnachweis	38
3.1.1 Chemikalien-, Gebrauchsmaterialien- und Gerätenachweis	38
3.1.1.1 Chemikaliennachweis.....	38
3.1.1.2 Gerätenachweis	39
3.1.1.3 Gebrauchsmaterialiennachweis	39
3.1.2 Primernachweis.....	40
3.1.3 Viren und Zellen	41
3.1.3.1 Zellkulturen.....	42
3.1.3.2 Passagierung von ED- Zellen	43
3.1.3.3 Virusvermehrung	43
3.1.3.4 Virustitration	44
3.1.4 Untersuchungsgruppen.....	45
3.2 Methoden	47
3.2.1 Serologische Tests	47
3.2.1.1 Neutralisationstest (Nt).....	47
3.2.1.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)	48
3.2.2 Bearbeitung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	51
3.2.2.1 Isolierung von equinen PBMC.....	51
3.2.2.2 Zellzählung	52
3.2.2.3 DNA- Isolierung aus PBMC.....	54
3.2.3 Bearbeitung von Augen- und Nasentupferproben	54
3.2.3.1 DNA- Isolierung aus trockenen Tupferproben	54
3.2.3.2 DNA- Isolierung aus Tupferproben in Isoliermedium	55
3.2.4 Bearbeitung von <i>post-mortem</i> Geweben	56
3.2.4.1 DNA-Isolierung aus <i>post-mortem</i> Geweben	56
3.2.4.2 DNA-Präparation aus Paraffinschnitten für die Durchführung der PCR	57
3.2.5 Virusnachweis in PBMC, Augen- und Nasentupferproben und <i>post-mortem</i> Geweben ..	57

3.2.5.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	57
3.2.5.1.1	Beta-Aktin-PCR zur Überprüfung der DNA-Qualität.....	58
3.2.5.1.2	Nested Polymerase Kettenreaktion(nPCR).....	59
3.2.6	Virusspezifikation	61
3.2.6.1	Analytische Gelelektrophorese	61
3.2.6.2	Zytozentrifugation von EHV-5 infizierten und nicht EHV-5 infizierten ED-Zellen zur Herstellung einer Positiv- und Negativkontrolle für die <i>in-situ</i> -Hybridisierung, sowie die Zytozentrifugation von PBMC.....	62
3.2.6.3	Präparation und Reinigung von Virus-DNA für die DNA-Sondenherstellung und die Herstellung der Viruskontrollen für die PCR	64
3.2.6.4	Herstellung einer Digoxigenin-d-UTP-markierten DNA-Sonde	65
3.2.6.5	Dot Blot Verfahren zur Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der markierten Sonde	66
3.2.6.6	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	68
3.3	Statistische Methoden.....	73
3.3.1	McNemar-Test	73
4.	Ergebnisse	75
4.1	Einleitung.....	75
4.2	Beschreibung der Stichproben.....	76
4.3	Ergebnisteil.....	78
4.3.1	Ergebnisteil A: Ergebnisse zur Verbreitung und Bedeutung von EHV-5.....	78
4.3.1.1	Ergebnisse zum Vorkommen von EHV-5 in Deutschland und zum Nachweis des Virus in PBMC, Augen- und Nasentupfern.....	78
4.3.1.2	Ergebnisse zum Nachweis des EHV-5 bei respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Symptomen	85
4.3.1.3	Untersuchungen zur Nachweishäufigkeit von EHV-5 in PBMC unter dem Einfluss von Resequin NN Plus® und Zylexis®	87
4.3.1.4	Ergebnisse zum Einfluss von Doppelinfektionen mit dem EHV-1,-2- und -4 auf das EHV-5	91
4.3.2	Ergebnisteil B: Ergebnisse zum Gewebe- und Zelltropismus von EHV-5 in Augen und in PBMC	95
4.3.2.1	Ergebnisse zur Detektion von EHV-5 in Konjunktiven und PBMC mittels <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	95
4.3.2.2	Ergebnisse zum Nachweis von EHV-5 in Zellen des Konjunktivengewebes und in PBMC per <i>in-situ</i> -Hybridisierung	106
5.	Diskussion	113
5.1	Verbreitung, Bedeutung und der Einfluss von Impfstoff und Immunmodulator auf die Präsenz des EHV-5 sowie der Einfluss viraler Doppelinfektionen mit dem EHV-1,-2,-4 auf das Equine Herpes Virus Typ 5	113

5.1.1	Verbreitung des Equinen Herpesvirus Typ 5	113
5.1.2	Bedeutung des EHV-5	115
5.1.3	Der Einfluss von Impfstoff und Immunmodulator sowie viraler Doppelinfektionen von EHV-1,-2,-4 auf die Präsenz des Equine Herpesvirus Typ 5	116
5.2	Gewebe- und Zelltropismus des Equinen Herpesvirus Typ 5.....	119
5.3	Schlussfolgerungen.....	121
5.4	Ein Ausblick auf weitere Forschungsvorhaben	122
6.	Zusammenfassung	124
6.	Summary	126
7.	Literaturverzeichnis	128
8.	Anhang.....	145
8.1	Detallierte Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse	145
8.2	Liste der eigenen Veröffentlichungen	166
8.3	Danksagung	167
8.4	Selbstständigkeitserklärung	169

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Virion des Herpes-simplex-Virus	17
Abbildung 2: Varicella-Zoster-Virus (VZV)	19
Abbildung 3: Humanes Herpesvirus Typ 6.....	20
Abbildung 4: Epstein-Barr-Virus	22
Abbildung 5: Infektionswege des EHV-2	27
Abbildung 6: Indirekter Immunfluoreszenztest	51
Abbildung 7: Neubauer Zählkammer.....	53
Abbildung 8: Neubauer Zählkammer, Gruppenquadrate	53
Abbildung 9: Nested PCR.....	60
Abbildung 10: Nachweis des Zellstrukturgens Beta-Aktin mittels der Beta-Aktin-PCR in PBMC von Pferden der Gruppe 1.1 (Gruppe der gesunden Pferde)	80
Abbildung 11: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR in PBMC, Augentupfer-und Nasentupferproben von Pferden aus der Gruppe 1.2 (Gruppe der kranken Pferde).....	83
Abbildung 12: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR in Augentupfer-und Nasentupferproben von Pferden aus der Gruppe 1.2 (Gruppe der kranken Pferde).....	84
Abbildung 13: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR an PBMC der Gruppe 1.1 (Gruppe der gesunden Pferde)	89
Abbildung 14: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR an PBMC der Gruppe 1.1 (Gruppe der gesunden Pferde)	90
Abbildung 15: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR in PBMC von gesunden Pferden	92
Abbildung 16: Nachweis der EHV-2-DNA mittels nPCR in PBMC von gesunden Pferden	93
Abbildung 17: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Infizierte ED- Zellen dienten als Positivkontrolle	99
Abbildung 18: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Nichtinfizierte ED- Zellen dienten als Negativkontrolle.....	100
Abbildung 19: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des linken Auges von Pferd SH 7, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.....	102
Abbildung 20: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des linken Auges von Pferd SH 7, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.....	103
Abbildung 21: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des linken Auges von Pferd SH 8, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.....	104
Abbildung 22: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis eines Ponys, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.	105
Abbildung 23: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des rechten Auges von Pferd SH 7, welche im Vorfeld mittels nPCR negativ getestet wurde.....	107

Abbildung 24: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des rechten Auges von Pferd SH 7, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.	108
Abbildung 25: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der PBMC von Pferd V07-10-07, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurden	109
Abbildung 26: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der PBMC von Pferd V07-10-07, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurden	110
Abbildung 27: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der PBMC von Pferd V07-7-6, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurden	111
Abbildung 28: Ergebnisse der <i>in-situ</i> -Hybridisierung: Darstellung der PBMC von Pferd V07-8-21, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurden	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Equine Herpesviren	23
Tabelle 2: Impfschema	34
Tabelle 3: Primersequenzen und „Annealing“-Temperaturen der zum Nachweis von Beta-Aktin verwendeten Polymerase-Kettenreaktionen	40
Tabelle 4: Primersequenzen und „Annealing“-Temperaturen der zum Nachweis des gB-Gens EHV-2 (Borchers et al., 2006) und zum Nachweis des gB-Gens EHV-5 (Agius et al., 1994) optimiert für einen MWG-Heizblockcycler durch (Borchers et al., 1999)	41
Tabelle 5: Verwendete Viren	42
Tabelle 6: Übersicht über die Einteilung der untersuchten Proben von natürlich infizierten Pferden und <i>post-mortem</i> Geweben von Pferden	45
Tabelle 7: Bestandteile des Hybridisierungsmixes für die Konjunktialgewebe	70
Tabelle 8: Bestandteile des Hybridisierungsmixes für die PBMC	72
Tabelle 9: McNemar-Test	74
Tabelle 10: Darstellung der EHV-5 Ergebnisse mittels nPCR von gesunden und kranken Pferden auf Pferdebasis	81
Tabelle 11: Darstellung der EHV-5 Ergebnisse mittels nPCR von gesunden und kranken Pferden auf Probenbasis	84
Tabelle 12: Darstellung der EHV-5 Ergebnisse mittels nPCR bei ophthalmologischen, respiratorischen und unspezifischen Symptomen von kranken Pferden	86
Tabelle 13: Die Darstellung des Resequin NN Plus®-und Zylexis®-Einflusses auf die Präsenz des EHV-5 mittels McNemar-Test	88
Tabelle 14: Ergebnisdarstellung zu Doppelinfektionen des EHV-2 und des EHV-5 mittels nPCR in PBMC und Augentupferproben	91
Tabelle 15: Ergebnisdarstellung zum Nachweis des Beta-Aktin-Gens mittels Beta-Aktin-PCR, der EHV-5-DNA mittels nPCR und der EHV-5-DNA mittels <i>in-situ</i> -Hybridisierung in Konjunktiven und PBMC	97

Tabelle 16: Gruppe 1.1: Ergebnisse der nPCR-Untersuchungen auf EHV-2 und EHV-5 an PBMC von 18 gesunden Pferden (A1-A18).....	145
Tabelle 17: Gruppe 1.2: Ergebnisse der nPCR-Untersuchungen auf EHV-2 und EHV-5 und der serologischen Untersuchungen auf EHV-1 und EHV-4 an 107 kranken Pferden.....	147
Tabelle 18: Gruppe 1.1: Ergebnisse der positiven nPCR-Untersuchungen auf EHV-2 und EHV-5 an 6 gesunden Pferden (A1-A6).....	158
Tabelle 19: Gruppe 1.2: Ergebnisse der positiven nPCR-Untersuchungen auf EHV-2 und EHV-5 und der serologischen Untersuchungen auf EHV-1 und EHV-4 an 28 kranken Pferden (D1-D28).....	159
Tabelle 20: Gruppe E: Ergebnisse der nPCR-Untersuchungen auf EHV-5 an Konjunktivalgeweben von 14 Schlachtpferden (E1-E14)	162
Tabelle 21: Gruppe F: Ergebnisse der nPCR- und <i>in-situ</i> -Untersuchungen auf EHV-5 an Konjunktivalgewebe von 3 Schlachtpferden und 3 klinisch kranken Pferden (F1-F10).....	163
Tabelle 22: Gruppe P: Ergebnisse der nPCR- und <i>in-situ</i> -Untersuchungen auf EHV-5 an PBMC von 5 kranken Pferden (P1-P5).....	165

A

A	Ampere
Abb	Abbildung
AHV	Asmines Herpesvirus
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Aqua bidest	bidestilliertes Wasser, zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	destilliertes Wasser, einfach destilliertes Wasser
AT	Augentupfer

B

BHV	Bovines Herpesvirus
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
B-Zellen	B- (Bursa fabricii) Lymphozyten

C

°C	Grad Celsius
CB	Cytobrush
CHV	Canines Herpesvirus
Cl	Chlorid
CMC	Carboxymethylcellulose
CMV	Cytomegalovirus
Co-	Mit-
cpE	cytopathogener Effekt

D

DC	Dentritic cells, Dentritische Zellen
d.h.	das heißt
dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat

E

EAdV	Equines Adenovirus
EAV	Equines Arteritisvirus
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED	Equine Dermalzellen
EDM	Eagles's minimum essential medium, Dulbecco's modification
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHV	Equines Herpesvirus
EIAV	Equines Infektiöses Anämievirus
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent Assay
et al.	und Mitarbeiter
etc.	et cetera, und das übrige

F

FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
FHV	Felines Herpesvirus
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat

G

g	Gramm
gB	Glykoprotein B
GHV	Gammaherpesvirus

H

h	Stunde
HAdV	Humanes Adenovirus
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundeficiency Virus, humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes simplex Virus
HVS	Herpesvirus saimiri

I

IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenstest
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin

K

KB	Kaltblut
kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton

L

l	Liter
LAT	Latenz-assoziierte Transkripte
li	links

M

M	Mol
M	Marker
m	milli
mAK	monoklonaler Antikörper
Mg	Magnesium
mg	milligramm
µg	mikrogramm
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MHV	Murines Herpesvirus
ml	milliliter
µl	mikroliter
mM	millimol
µM	mikromol
moi	Multiplicity of infection, Infektionsmultiplizität
mPCR	multiplex PCR
mRNA	Messenger RNA

N

Na	Natrium
NBT	Nitroblau- Tetrazoliumsalm
NCS	Newborn calf serum, Serum von neugeborenen Kälbern
ng	Nanogramm
n.g.	nicht gemacht
nm	Nanometer
nPCR	nested PCR
n.s.	Nicht signifikant
Nt	Neutralisationstest
NT	Nasentupfer

O

ORF	Open reading frame, offener Leserahmen
ORI	Origin of replication, Replikationsursprung
OT	Objektträger
OvHV	ovines Herpesvirus

P

pg	pikogramm
p.i.	post infectionem
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells, mononucleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PCV	Porcines Circovirus
PFU	Plaque forming unit, Plaque- bildende Einheiten
PMLK	Polymorphkernige Leukozyten
PMWS	Postweaning multisystemic wasting syndrome
<i>Post-mortem</i>	nach dem Tod

R

re	rechts
RhCMV	Rhesusaffen Cytomegalovirus
RK	Rabbit Kidney, Känninchennieren
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

S

SDS	Sodium Dodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SHV	Suid Herpesvirus
snPCR	semi nested PCR
SSC	Standard sodium citrate, Standard Natrium- Citrat Lösung
ssp	Salmon sperm, Lachssperma

T

TAE	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
Taq	Thermus Aquaticus
TB	Englisches Vollblut
TE	Tris- EDTA
Th- Zellen	T- Helfer- Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
T-Zellen	T- (Thymus) Lymphozyten

U

U	Unit, Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht

V

V

Volt

v/v

Volume/ volume, Volumen/Volumen,

W

WB

Warmblut

WT

Wattetupfer

w/v

weight/ volume, Gewicht/ Volumen

w/w

weight/ weight, Gewicht/ Gewicht

Z

ZNS

Zentralnervensystem

1. Einleitung

Diese wissenschaftliche Arbeit beschäftigt sich mit der Verbreitung und Bedeutung des Equinen Herpes Virus Typ 5. Die folgende Literaturrecherche gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Abschnitt wird auf die Familie der Herpesviridae eingegangen, insbesondere auf die Equinen Herpesviren, das Equine Herpesvirus Typ 5 und die Doppelinfectionen des EHV-5 mit dem EHV-1, EHV-2 und EHV-4 werden genauer untersucht. Im zweiten Teil werden die Auswirkungen der Zylexis[®]- und Resequin NN Plus[®]-Applikation auf die Präsenz des EHV-5 betrachtet.

1.1 Herpesviridae

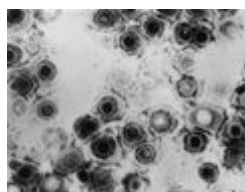
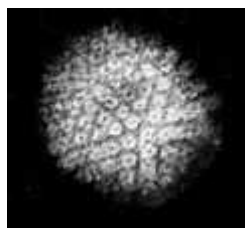
Allgemeines

Bei der Familie der Herpesviren handelt es sich um eine Familie weltweit vorkommender Viren. Der Name kommt aus dem Griechischen, „herpein“ und heißt übersetzt „kriechen“. Man kann die Herpesviridae in 3 Subfamilien, die Alpha-, Beta-, und Gammaherpesvirinae einteilen. Herpesviren sind ubiquitär im Tierreich verbreitet. Neben den Humanen Herpesviren (Abbildung 1) wurden diese auch bei Säugetieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und sogar bei Fischen nachgewiesen (Teifke, Lohr et al. 2000) und weisen morphologische und biologische Gemeinsamkeiten auf (White DO 1994), welche im Folgenden dargestellt werden.

Morphologie

Herpesviren sind doppelsträngige, lineare DNA-Viren. Der Durchmesser eines Herpesviruspartikels kann bis zu 200 nm betragen (Roizmann, Desrosiers et al. 1992), (Steven 1997). Das Genom besteht aus 120-210 Kilobasenpaaren und wird von einem Core, dem Virusinnenkörper, umgeben. Das Core wird wiederum von einem ikosaedrischen Kapsid umschlossen, welches aus 162 Kapsomeren besteht. Der Durchmesser des Kapsid beträgt etwa 100 nm (Knopf 2000). Das Kapsid wird von einer mit Spikes, so genannte Glykoproteinfortsätze, besetzten Hülle umgeben (Steven 1997). Die Glykoproteine spielen eine essentielle Rolle für die Infektiosität, die Replikation und die Antigenität des Virus, worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird. Durch die Virushülle sind Herpesviren relativ labil gegenüber Umwelteinflüssen, Detergenzien und Desinfektionsmittel. Den Raum zwischen Virushüllenmembran und Kapsid füllt das virale Tegument, was aus mehreren Proteinen besteht, die teilweise asymmetrisch angeordnet sind.

Abbildung 1: Virion des Herpes-simplex-Virus



Quelle: wikipedia. de

Infektionsweg und Virusvermehrung

Die Infektion mit Herpesviren erfolgt meist über direkten Schleimhautkontakt der Individuen. Durch Adsorption haftet das Virus an die Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Die Wechselwirkung wird durch die Glykoproteine in der Virusmembran vermittelt. Nach der Adsorption gelangt das Virus durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran in die Wirtszelle. Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch ein spezielles Fusionsprotein bei der Bindung des Viruspartikels an die Zellmembran der Wirtszelle virale und zelluläre Membran verschmelzen und dabei das Viruskapsid sofort in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen wird (Roizman 1974). Eine andere Variante, wie das Virus in die Wirtszelle gelangen kann, ist die Endophagozytose (Roizman, 1996). Durch das Uncoating wird die Penetration abgeschlossen und das Virusgenom freigesetzt. Das Genom und das Tegument werden nun durch die Kernporen in den Zellkern transportiert, wo nun die Replikation stattfindet. Die Transkription, die Übertragung der genetischen Information der DNA auf die einzelsträngige mRNA, gliedert sich in drei getrennte Phasen und läuft im Zellkern ab. Die Translation, die Übersetzung der Basensequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine, findet im Cytoplasma statt. Die linearen Genome der Herpesviren werden in der Wirtszelle zirkularisiert. Während der Latenz, der Phase, in der sich das Virus nicht vermehrt und somit für das Immunsystem nicht aufzufinden ist, liegt die virale DNA episomal (extrachromosomal) vor (Roizman 1974). In der lytischen Phase der Infektion, das heißt, wenn es zu einer Vermehrung des Virus kommt, läuft die Replikation nach dem „Rolling-circle-Prinzip“ (Ben-Porat, Kaplan et al. 1976), (Mocarski und Roizman 1982), (Roizman 1990), (Skaliter, Makhov et al. 1996) ab. Bei diesem Prinzip wird ein Strang des zirkulären

DNA-Moleküls am Replikationsursprung (ORI, origin of replication) geschnitten. Am somit entstandenen 3'-OH-Ende werden die Nucleotide durch die virale DNA-Polymerase angebaut. Als Matrize dient der intakte DNA-Strang. In der Konsequenz löst sich auf diese Weise das 5'-Ende vom Matrizenstrang und wird „abgerollt“. Es ist somit ein DNA-Einzelstrang entstanden. Dieser wird nun durch so genannte Okazaki-Fragmente im Bereich der Replikationsgabel zum Doppelstrang ergänzt und durch Endonukleasen in einzelne Virusgenome geschnitten. In der späten Phase, im Anschluss an die Replikation, kommt es zur Bildung der Strukturproteine. Diese Strukturproteine dienen dem Zusammenbau des Kapsids. Die virale DNA wird nun in das Kapsid integriert. Durch Budding (Knospung) an der inneren Kernmembran der Wirtszelle erhalten die Viren ihre äußere Hülle (Baines, Wills et al. 2007). Durch den Golgi-Apparat werden die Virionen zur Zellmembran transportiert und verlassen die Zelle meist durch Zellyse (Roizman 1996), (Hellums, Markert et al. 2005). Diesen Vorgang nennt man Elution. Der nächste Abschnitt widmet sich der Latenz von Herpesviren.

Latenz

Herpesviren haben die Eigenschaft nach einer Infektion des Wirtes die Zellen des Wirtes latent zu infizieren und in diesem zu persistieren (Roizman 1974), (Ahlqvist, Fotheringham et al. 2005), (Csire, Mikala et al. 2007). Die Wirtszellen beherbergen somit vermehrungsfähiges Virus. Latenz ist definiert als eine „reversible“, nichtproduktive Infektion einer Zelle durch ein replikationskompetentes Virus“ (Garcia-Blanco und Cullen 1991). Das Virus liegt dann in einem so genannten Ruhezustand in der Wirtszelle vor. Durch externe oder interne Reize kann das Virus jedoch reaktiviert werden und es kommt zu einer erneuten Virusvermehrung in der Zelle. Folglich kehren die Symptome der Primärinfektion wieder. Weiterhin ist erwiesen, dass durch eine Immunsuppression des Wirtes, durch beispielsweise Stress oder Glukokortikoidgaben, latentes Virus wieder in die infektiöse Form überführt werden kann (Soderberg-Naucler 2006). Herpesviren zeigen während der Latenzphase oft nur eine geringe Proteinproduktion, bei Alphaherpesviren wird die Produktion ganz eingestellt und es werden nur latent-assoziierte Transkripte (LAT) gebildet (Fraser, Block et al. 1992). Die Familien der Herpesviren werden im Folgenden genauer erläutert, wobei den Gammaherpesviren besondere Beachtung geschenkt wird.

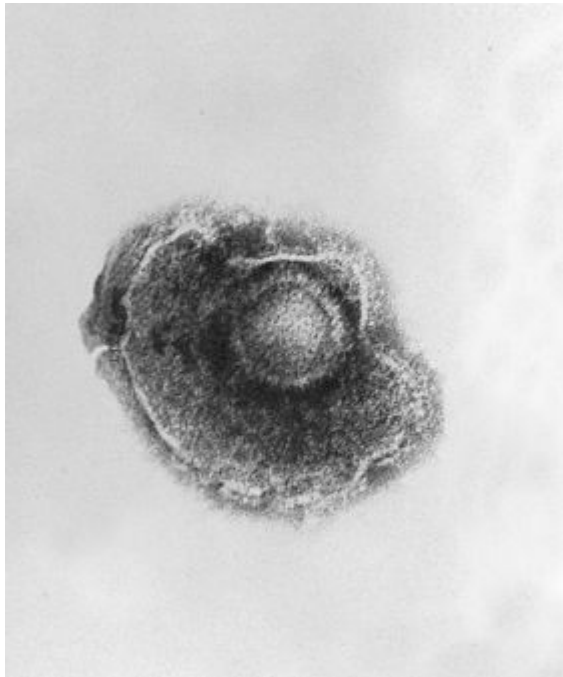
1.1.1 Familien der Herpesviren

Die Familie der Herpesviren wird in drei Subfamilien, Alpha-, Beta-, und Gammaherpesviren, unterteilt. Diese Einteilung wird anhand der biologischen Eigenschaften vorgenommen.

Alphaherpesviren

Diese Subfamilie kann weiterhin in zwei Genera eingeteilt werden, Simplexvirus und Varicellovirus (Abbildung 2) wobei diesen Genera verschiedene Spezies zugeordnet werden. Die Alphaherpesviren zeichnen sich *in vivo* durch ein variables Wirtsspektrum aus. Auch die Organmanifestation dieser Subfamilie zeigt eine große Varianz. Als Beispiele sind zu nennen: Respirationstrakt, Genitaltrakt, ZNS oder die Haut (Engels und Ackermann 1996). *In vitro* zeigen die Alphaherpesviren einen kurzen Replikationszyklus und eine schnelle Ausbreitung in der Zellkultur. Alphaherpesviren persistieren in Ganglienzellen und in Lymphozyten (Engels und Ackermann 1996). Als bekannte Vertreter dieser Subfamilie sind das Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), das Canine Herpesvirus 1 (CHV-1), die Equinen Herpesviren 1, 3 und 4 (EHV-1,-3 und -4), das Feline Herpesvirus 1 (FHV-1), die Humanen Herpesviren 1 und 2 (HHV-1 und -2) und das Suid Herpes Virus 1 (SHV-1) zu nennen.

Abbildung 2: Varicella- Zoster-Virus (VZV)

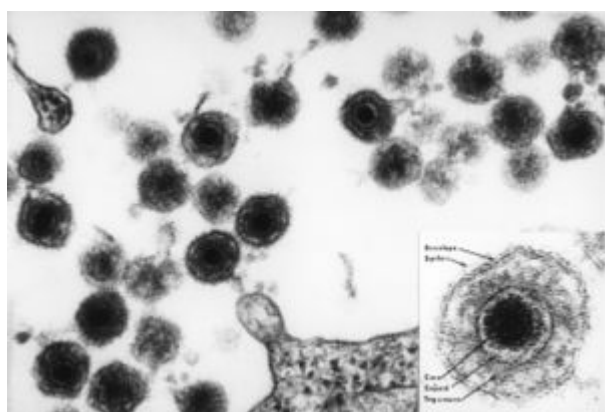


Quelle: www.wikipedia.de

Betaherpesviren

Die Betaherpesviren kann man in zwei Genera einteilen, Cytomegalovirus und Muromegalovirus. Das Genus Roseolovirus ist noch nicht offiziell als solches anerkannt (Mayo 1995; Fauquet 2005). *In vivo* zeichnet sich diese Subfamilie durch ein engeres Wirtsspektrum aus als das der Alphaherpesviren, wobei die Organmanifestation variabel ist. Häufig findet eine Allgemeinerkrankung statt, mit einer Affinität des Virus zu Leber und Niere. Als Latenzorte sind vor allem Speicheldrüsen, Lymphgewebe, ZNS und Nieren zu nennen. *In vitro* erfolgt das Wachstum der Viren langsamer als das der Alphaherpesviren und es kommt zu einer Riesenzellbildung (Cytomegalie), was auch den Namen des Genus erklärt. Vertreter dieser Unterfamilie sind das Humane Herpesvirus 5 (HHV-5), das Humane Herpesvirus Typ 6 (HHV-6), (Abbildung 3) das Murine Herpesvirus 1 (MHV-1) und-2 und das Equine Herpesvirus 7 (EHV-7, noch nicht offiziell anerkannt), (Mayo 1995; Fauquet 2005).

Abbildung 3: Humanes Herpesvirus Typ 6



Quelle: www.wikipedia.de

Gammaherpesviren

Biologie der Gammaherpesviren

Diese Subfamilie wird in 2 Genera eingeteilt. Das Lymphocryptovirus zeigt als bekannte Vertreter das Cercopithecine Herpesvirus 12, 13, und 14, das Epstein-Barr-Virus (HHV-4), (Abbildung 4) das Humane B-lymphotropen Virus (HHV-7) und das Pongine Herpesvirus 1, 2 und 3. Dem Genus Rhadinovirus sind als bekannte Vertreter das Alcelaphine Herpesvirus 1, das Ateline Herpesvirus 2, das Bovine Herpesvirus 4 (BHV-4), die Equinen Herpes Viren 2 und 5 (EHV-2 und -5), das Humane Herpesvirus 8 (HHV-8), das Murine Herpesvirus 68 (MHV-68), das Ovide Herpesvirus 2 (OvHV-2) und das Saimiriine Herpesvirus 2 (HVS)

zuzuordnen. Gammaherpesviren zeichnen sich durch ihre Verschiedenheit in ihrem Genom aus. Hier kommen sowohl konservierte als auch variable Genbereiche vor (Gompels, Nicholas et al. 1995). Die konservierten Genombereiche kodieren für biologische Eigenschaften wie Genregulation und Latenz (Karlin, Mocarski et al. 1994). Die besondere Fähigkeit der Gammaherpesviren zur „Piraterie“ zelleigener, immunmodulierter Gene beruht wahrscheinlich darauf, dass das virale Genom viele repetitive, nicht codierende Sequenzen besitzt und dadurch die Möglichkeit hat, viele DNA-Sequenzen aufzunehmen, ohne dabei eigene Genomsequenzen zu verlieren (Neipel, Albrecht et al. 1998) und (Albrecht 2000).

Epidemiologie

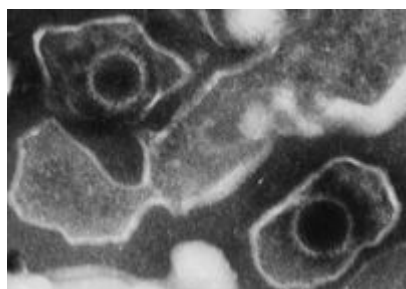
Das Wirtsspektrum der Gammaherpesviren ist eng begrenzt. Vertreter, wie das OvHV-2, das MHV-68 und das EHV-2 können auch Tiere anderer Familie infizieren (Ackermann 2006). Das OvHV-2, welches als Hauptwirt Schafe infiziert und bei diesen die Krankheit mit dem Namen „Katarrhalfieber“ hervorruft, wurde in diesem Zusammenhang auch schon bei Schweinen, Elchen und Bisons nachgewiesen (Albini 2003), (Ackermann 2005). In Organen besteht eine Manifestation zu B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und zu Endothelzellen von Blutgefäßen (Rajcani und Kudelova 2003). Erstinfektionen laufen meist in den ersten Lebensmonaten des Wirtes ab. Sie verlaufen asymptomatisch und das Virus geht schnell in Latenz über (Ackermann 2006). Auf dieses Phänomen wird im kommenden Abschnitt näher eingegangen. *In vitro* lassen sich Gammaherpesviren in Lymphozytenkulturen und in Einschichtzellkulturen bestimmter Gewebe der jeweiligen Wirtsspezies anzüchten, allerdings nicht immer regelmäßig (Renne 1998), (Hüssey 2001). Auch kann man dabei nicht immer cpE's nachweisen und der Replikationszyklus schreitet nur langsam voran. Bei humanen Virusspezies, wie dem HHV-8 oder dem EBV, können Gammaherpesviren unter bestimmten Bedingungen Zelltransformationen hervorrufen. Die Wirtszelle verliert somit die Kontrolle über diese transformierten Zellen und diese können sich dann proliferativ und neoplastisch vermehren (Meinl, Fickenscher et al. 1998).

Latenz von Gammaherpesviren

Diese Subfamilie persistiert in den unterschiedlichsten Zellen. Zellen, die besonders häufig latent infiziert werden, sind solche in lymphatischen Geweben, wie Makrophagen (Weck, Kim et al. 1999), (Osorio, Rock et al. 1985) und B- Lymphozyten bei dem EHV-2 (Gleeson und Coggins 1985), (Drummer, Reubel et al. 1996) bei dem MHV-68 (Nash, Dutia et al. 2001), (Weck, Kim et al. 1999), bei dem HHV-8 (Schulz 2000) und in T-Zellen bei dem HVS

(Fleckenstein 1982). Es werden weiterhin dendritische Zellen, wie bei dem MHV-68 (Flano, Husain et al. 2000), (Flano, Kayhan et al. 2005), neurologische Gewebe, d.h. Ganglien wie bei dem EHV-2 (Thein und Epp 1978), (Rizvi, Slater et al. 1997) und auch Epithelzellen wie bei dem MHV-68 (Robertson, Ooka et al. 1996), (Stewart, Usherwood et al. 1998), (Rajcani und Kudelova 2005) latent infiziert. Die Gammaherpesviren exprimieren während ihrer latenten Phase spezifische Latenzgene (Rowe, Lear et al. 1992). Das ist ein wesentlicher Unterschied zu den Alphaherpesviren, welche lediglich LAT bilden (Fraser, Block et al. 1992). Der Vorgang der Expression von Latenzgenen wurde sehr genau am Beispiel des EBV untersucht. Es gibt drei verschiedene Formen der Latenzexpression, Typ 1 bis 3 (Rowe, Lear et al. 1992). Bei Typ 3 der Latenzexpression werden durch das EBV B-Zellen in immortalisierte Lymphoblasten transformiert, in denen nahezu alle latenten Gene exprimiert werden. In Typ 1 und 2 wird nur eine geringe Anzahl an latenten Genen exprimiert (Iwakiri 2006). Am Beispiel des EBV wird auch gleichfalls deutlich, dass die Genexpression abhängig vom Immunstatus der infizierten Zelle (Kieff 1996) und vom Phänotyp ist.

Abbildung 4: Epstein-Barr-Virus



Quelle: www.wikipedia.de

1.2 Equine Herpesviren

Für die Equinen Herpesviren können bis dato 9 Herpesviren identifiziert werden. Von diesen 9 Virustypen gehören sechs zu den Alphaherpesviren und drei zu den Gammaherpesviren, (Borchers, 1999), (Tabelle 1).

Tabelle 1: Equine Herpesviren

Virustyp	Unterfamilie
EHV-1	Alphaherpesvirinae
EHV-2	Gammaherpesvirinae
EHV-3	Alphaherpesvirinae
EHV-4	Alphaherpesvirinae
EHV-5	Gammaherpesvirinae
EHV-6 (AHV-1)	Alphaherpesvirinae
EHV-7 (AHV-2)	Gammaherpesvirinae
EHV-8 (AHV-3)	Alphaherpesvirinae
EHV-9 (GHV-1)	Alphaherpesvirinae

In den nächsten Abschnitten wird auf die Equinen Herpesviren EHV-1, -2, -3, -und 4 eingegangen. Dem EHV-5 wird ein extra Kapitel gewidmet.

1.2.1 Das Equine Herpesvirus Typ 1 und das Equine Herpesvirus Typ 4

Das Equine Herpesvirus Typ 1 hat als Erreger des Virusaborts eine besondere Bedeutung. Früher wurden serologisch von diesem Spezies zwei Subtypen unterschieden, wobei Subtyp 1 hauptsächlich in abortierten Föten und Subtyp 2 bei respiratorischen Erkrankungen (Rhinopneumonitis) detektiert wurde. Aufgrund des Nachweises bei verschiedenen Erkrankungen, wie Aborten, perinatalen Erkrankungen und Myeloenzephalitiden, wurden weiterführende, molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt und es ließ sich belegen, dass es sich bei den so genannten Subtypen um verschiedene, aber immunologisch eng verwandte Serotypen handelte. Das EHV-1 wurde als das Equine Abortvirus detektiert und für den Erreger der Rhinopneumonitis wurde die Nomenklatur EHV-4 eingeführt (Studdert, Simpson et al. 1981). EHV-1 und EHV-4 sind beide hochkontagiöse Erreger, welche als Infektionsspektrum unter natürlichen Bedingungen Pferde, Esel, Grevy's Zebras und Maultiere besitzen (Borchers, Böttner et al. 2006). Aber auch aus anderen Spezies, wie Thomson's Gazellen, schwarzen Rehböcken, Hirschziegenantilopen, Alpakas und Ilamas konnte EHV-1 isoliert werden (Fukushi, Tomita et al. 1997), (Borchers, Böttner et al. 2006).

Die Infektion mit diesen Virustypen ist weltweit verbreitet und verläuft enzootisch. Es kommt dabei meist zu Erstinfektionen ohne oder mit milder Symptomatik, wobei diese sich selbst limitieren (Gibson, Slater et al. 1992).

Anschließend geht das Virus in Latenz über (Hussey, Clark et al. 2006), wobei als Latenzorte für EHV-1 das Trigeminalganglion (Slater, Borchers et al. 1994), Lymphknoten (Iqbal und Edington 2002), (Taouji, Collobert et al. 2002) und die Nasenschleimhaut (Carvalho, Oliveira et al. 2000) beschrieben werden. Das Equine Herpesvirus Typ 4 persistiert dagegen in Bronchial- und Alveolarepithel (Borchers, Wolfinger et al. 1997), in Lymphknoten des Respirationstraktes, in dem Trigeminalganglion und in PBMC (Welch, Bridges et al. 1992). Latent infizierte Tiere scheiden das Virus über Sekrete intermittierend aus und können somit nichtinfizierte Bestände in sehr kurzer Zeit durchseuchen. Andere Übertragungswege sind durch direkten Kontakt, über Tröpfcheninfektion nach dem Schnauben oder Husten der Pferde, vertikal von dem Muttertier auf das Fohlen oder von Fohlen zu Fohlen direkt möglich (Gilkerson, Love et al. 1998). Bis zu 100 % der Tiere können in einem Fohlenbestand erkranken (Thein 1996).

Die respiratorische Erkrankung, Rhinopneumonitis, breitet sich meistens schnell in den Fohlenjahrgängen während der Absatzzeit aus, da die Tiere erheblichem Stress, wie der Trennung vom Muttertier, neuer Umgebung etc., ausgesetzt sind. Diese Erkrankung wird vor allem durch EHV-1 hervorgerufen, seltener durch EHV-4 (Matsumura, Sugiura et al. 1992). Die Rhinopneumonitis verläuft zyklisch und das Virus vermehrt sich primär in den Nasenschleimhäuten, wobei es milde Entzündungserscheinungen hervorruft. Über das Lymphsystem gelangt es ins Blut und breitet sich dann im gesamten Organismus aus. Nach einer kurzen Inkubationszeit kommt es zu Fieber, Anorexie und Entzündungen der Atemwege, die sich erst in serösem und später in mukösem Nasenausfluss äußern. Die Möglichkeit einer Sekundärinfektion besteht und es kann zu einer mukopurulenten Rhinitis und Pharyngitis kommen. Im Allgemeinen erholen sich die Tiere relativ schnell. In chronischen Fällen verbleiben respiratorische Entzündungen mit Follikulitis.

Der Stutenabort wird in den meisten Fällen durch das Equine Herpesvirus Typ 1 hervorgerufen (Studdert, Crabb et al. 1992). Im letzten Drittel der Trächtigkeit kommt es bei Stuten zu einer Infektion der Uterusschleimhaut und der Frucht. Das Virus vermehrt sich stark in fötalen Geweben und zeigt eine Affinität zu Leber, Milz und Lunge. Die Frucht stirbt als Folge einer Placentitis und wird abgestoßen. Der Abort verläuft ohne Symptome. Fohlen werden tot oder lebensschwach geboren, wenn die Infektion sehr spät in der Trächtigkeitsphase stattgefunden hat (Murray, del Piero et al. 1998). Wenn die Laktation der

Stute einsetzt, ist diese erhöhtem Stress ausgesetzt und latentes EHV-1 kann reaktiviert und auf das Saugfohlen übertragen werden (Gilkerson, Whalley et al. 1999).

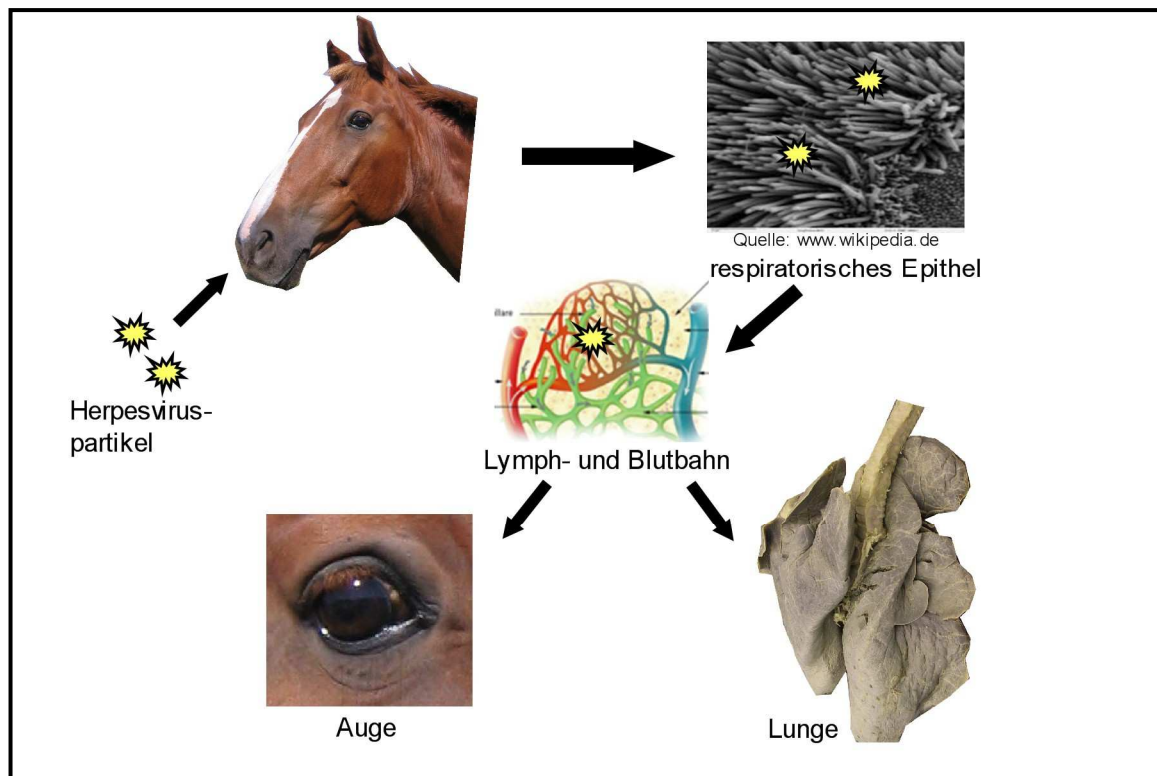
Die zentralnervöse Form, Myeloenzephalitis, wurde überwiegend bei Stuten nach einem Abort beobachtet, kann aber auch unabhängig davon auftreten. Diese Veränderungen werden auf eine Vaskulitis im Neuroparenchym im Rückenmark zurückgeführt (Jackson, Osburn et al. 1977), (Allen und Bryans 1986), (Edington, Bridges et al. 1986), (Thein 1996). Das Parese-Paralyse-Syndrom, was als Folge Ataxien nach sich zieht, resultiert aus einer Affinität von EHV-1 zum Gefäßendothel. Durch diesen Endotheltropismus kommt es zu einer Vaskulitis und Thrombosierung von Gefäßen und damit zu einer Ischämie und Degeneration des Nervengewebes (Petzoldt und Bisping 1972; Petzoldt, Luttmann et al. 1972), (Jackson et al. 1977), (Petzoldt, Rosenbruch et al. 1982), (Edington et al. 1986), (Whitwell und Blunden 1992), (Thein 1996), (Wilson 1997). Die Vaskulitis wird wahrscheinlich durch Ablagerung von Immunkomplexen ausgelöst (Ostlund 1993). Die Symptome variieren von einer milden Ataxie (Meyer, Thein et al. 1987) bis zu einer hochgradigen Paralyse. EHV-1 wird des Öfteren als Ursache für das Parese-Paralyse-Syndrom genannt als EHV-4.

1.2.2 Das Equine Herpesvirus Typ 2

Auch beim Pferd kommt ein spezifisches Cytomegalievirus, das Equine Herpesvirus Typ 2, vor. Die Isolation dieser Virusart gelang das erste Mal im Jahre 1963 aus dem Magen der Stute „Lady Kells“ und trug daher den Namen „EHV2.LK“ (Plummer und Waterson 1963). Es gehört zur Familie der Gammaherpesviren, zum Genus Rhadinovirus (Telford, Studdert et al. 1993). Das Genom des EHV-2 ist linear, doppelsträngig, 192 kbp groß und liegt als Isomer vor. Die komplette DNA-Sequenz des Genoms des EHV-2-Stammes 86/67 ist erforscht. Dabei kodieren 79 Offene Leserahmen (ORF) für 77 Proteine. Vergleiche der Aminosäuresequenz haben gezeigt, dass das Gammaherpesvirus genetisch kollinear ist mit dem HVS und EBV, wobei es genetisch mehr verwandt ist mit dem HVS (Telford, Watson et al. 1995). Das Genom von EHV-2 ist weiterhin durchgängig und weist intern indirekte, kurze Wiederholungen auf. An den Enden wird es von 18 kbp langen, direkten Wiederholungssequenzen flankiert (Browning und Studdert 1989). Es wird daher auch der Genomgruppe A zugeordnet. Die genetische Variabilität ist bei EHV-2 stärker ausgebildet als bei anderen Herpesviren (Browning und Studdert 1989). Das Equine Herpesvirus Typ 2 ist in Pferdepopulationen weit verbreitet (Craig, Barrundeguy et al. 2005). Das Virus konnte weltweit in den verschiedensten Geweben des Respirationstraktes (Turner, Studdert et al. 1970), (Rose, Hopes et al. 1974; Wilks und Studdert 1974), des Genital- und

Verdauungstraktes, der Milz, der Lunge und in Geweben des lymphatischen Systems, sowie in okulären Geweben, wie zum Beispiel Konjunktiven (Studdert 1971), (PN, O'Rielly et al. 1994) von klinisch gesunden und klinisch kranken Pferden isoliert werden (Turner, Studdert et al. 1970), (Wilks und Studdert 1974), (Borchers, Ebert et al. 2006). In Milch- und Speicheldrüsen (Browning und Studdert 1987) und in Geweben des peripheren und zentralen Nervensystems konnte EHV-2 detektiert werden (Rizvi, Slater et al. 1997), (Borchers, Wolfinger et al. 1998). Man konnte EHV-2 auch aus den peripheren Zellen des Blutes isolieren (Kemeny und Pearson 1970), (Wilks und Studdert 1974), (Roeder und Scott 1975), (Fu, Robinson et al. 1986). Für EHV-2 kommt als Wirt nicht nur das Hauspferd in Frage, sondern auch bei anderen Pferden lies sich das Virus detektierten. Bei Bergzebras in Namibia konnten Antikörpertiter gegen EHV-2 bei 20 von 21 Zebras mittels indirekten IFT nachgewiesen werden (Borchers und Frölich 1997). Bei Przewalski- Pferden, Zebras als auch bei wilden und domestizierten Eseln wurden in 93 % von 55 Wildpferden und Zebras EHV-2 mittels IFT nachgewiesen (Borchers, Frölich et al. 1999). In einer Studie, die an wild lebenden Burchell's Zebras (*Equus burchelli*) im Serengeti Nationalpark in Tansania durchgeführt wurde, konnte EHV-2 mittels serologischer Methoden in keinem der 51 Zebras nachgewiesen werden (Borchers, Wiik et al. 2005). Als Infektionswege für EHV-2 werden direkte, horizontale Wege (Browning und Studdert 1987), meist über die oberen Atemwege beschrieben (Sherman, Thorsen et al. 1977). Das Virus vermehrt sich wohl primär im respiratorischen Epithel und verbreitet sich dann über Blut- und Lymphbahn im gesamten Organismus (Abbildung 5). Die Verbreitung über vertikale, intrauterine Wege spielt eine untergeordnete Rolle. EHV-2 wurde in diesem Zusammenhang bei zwei abortierten Föten (Galosi, de la Paz et al. 2005) und einem gesund geborenen Fohlen (Thein 1983) detektiert.

Abbildung 5: Infektionswege des EHV-2



Erkrankungen durch EHV-2 manifestieren sich vor allem im oberen Respirationstrakt (Murray, Eichorn et al. 1996), mit entsprechenden Symptomen wie Husten, Nasen- und Augenausfluss, in den Lungen (Schlocker, Gerber-Bretscher et al. 1995) und im Augenapparat, mit Konjunktivitis und Keratokonjunktivitis (Blakeslee, Olsen et al. 1975), (McAllister und Blakeslee 1977), (Kershaw, von Oppen et al. 2001), (Borchers, Ebert et al. 2006). Leistungsschwäche (Rose, Hopes et al. 1974), (Jensen-Waern, Persson et al. 1998), Fieber, Pharyngitis (Blakeslee, Olsen et al. 1975), (McAllister und Blakeslee 1977) und Lymphadenitis wurden weniger beschrieben. Weiterhin kann EHV-2 aber auch bei Pferden, die klinisch unauffällig sind, nachgewiesen werden (Kershaw, von Oppen et al. 2001), (Kershaw 2001), (Besthorn, 2002). EHV-2 im Zusammenhang mit respiratorischen Symptomen wie Pneumonien (Fu, Robinson et al. 1986), (Lakritz, Wilson et al. 1993) tritt vor allem bei Fohlen und Jährlingen auf (Wilcox 2001), (Dunowska, Wilks et al. 2002), (Wang, Raidal et al. 2007). Weiterhin wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass EHV-2-Infektionen im frühen Fohlenalter auftreten (Nordengrahn, Merza et al. 2002), (Bell, Balasuriya et al. 2006). Als Latenzorte sind bei dem Equinen Herpesvirus Typ 2 B-Lymphozyten (Drummer, Reubel et al. 1996), Makrophagen (Dutta und Campbell 1978; Schlocker, Gerber-Bretscher et al. 1995), das Trigeminalganglion (Rizvi, Slater et al. 1997),

(Borchers, Wolfinger et al. 1998) und das Ganglion ciliare (Thein und Hartl 1976), (Thein 1978) zu nennen.

Zu einer Suppression des Immunsystems führen Viren in dem sie Immunzellen infizieren (Ackley, Yamamoto et al. 1990), (Novotney, English et al. 1990), (Bishop, Williams et al. 1992). Dem Equinen Herpesvirus Typ 2 werden auch immunsuppressive Wirkungen nachgesagt (Fu, Robinson et al. 1986). Das könnte unter anderem so erklärt werden, dass das virale Interleukin-10-Gen, welches immunsuppressive Wirkungen besitzt, bei EHV-2 (Rode, Bugert et al. 1994), (Holloway, Lindquester et al. 2000) und anderen Viren, wie dem EHV-5, dem EBV (EBV-IL-10), dem Parapoxvirus Orf (Orf-Virus-IL-10), (Fleming, McCaughan et al. 1997), dem humanen Cytomegalovirus (HCMV-IL-10), (Kotenko, Saccani et al. 2000) sowie dem Rhesusaffen Cytomegalovirus (RhCMV-IL-10) nachgewiesen wurde. Man versuchte durch geeignete *in vitro* und/oder *in vivo*-Modelle mittels Vergleichen zwischen der Bioaktivität von Virokin und zellulärem Gegenstück bzw. rekombinantem und Wildtypvirus Erkenntnisse über die Funktion von IL10 zu gewinnen. Dabei fand man mittels *in vitro* Versuche folgendes heraus: Aufgrund der Fähigkeit des EBV-IL-10 die Proliferation von Makrophagen bzw. Monozyten sowie die Produktion von IFN- γ zu hemmen (Stuart, Stewart et al. 1995), (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001) wird die antivirale Immunantwort unterdrückt. Wenn man diese Mechanismen der Immunsuppression auf das EHV-2 überträgt, dann könnte das Vorkommen von Keratokonjunktiven als Folge dieser Immunsuppression erklärt werden. In verschiedenen Studien wurde vermutet, dass die EHV-2-Infektionen eine Prädisposition haben und als Sekundärinfektionen durch andere Viren oder Bakterien (Palfi, Belak et al. 1978), (Belak, Palfi et al. 1980), (Nordengrahn, Rusvai et al. 1996) auftreten, als Folge einer Unterdrückung der PBL-Funktion. In einer anderen Studie trat die EHV-2-Infektion sekundär als Folge einer Infektion mit *Rhodococcus equi* beim Fohlen auf (Nordengrahn, Rusvai et al. 1996).

Virale und bakterielle Co-Faktoren bei der Erkrankung der Keratokonjunktivitis sollen nun kurz erläutert werden, wobei auf das Equine Herpes Virus Typ 5 in Abschnitt 1.3 näher eingegangen wird. Das Equine Adenovirus Typ 1 (EAdV-1) wird beim Pferd vor allem mit respiratorischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (McChesney, England et al. 1974). Dieses Virus wurde auch aus Pferden mit dem Symptom der Cauda Equina Neuritis isoliert (Edington, Wright et al. 1984). Über eine Beteiligung des EAdV-1 bei Augenerkrankungen ist dagegen wenig bekannt. Im Rahmen einer systemischen Infektion mit dem EAdV-1 kann es bei Pferden zu einer okulären Manifestation kommen, das konnte im

Rahmen einer Studie mittels der Anzucht in homologen Zellkulturen und der Vermehrung mit cpE nachgewiesen werden (Gleeson, Studdert et al. 1978). Da bei mehreren Fohlen die Erkrankung der Keratokonjunktivitis mit der Detektion des EAdV in Zusammenhang gebracht wurde, indem man das Virus aus Augentupferproben durch Anzucht isolierte (England, McChesney et al. 1973), wurde diesem eine Beteiligung an der Keratokonjunktivitis des Pferdes zugesprochen (von Borstel 2003). Die Beteiligung von Mycoplasmen und Chlamydophilen an der Symptomatik der Keratokonjunktivitis werden diskutiert, konnten aber bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht belegt werden (Borchers, Ebert et al. 2006).

1.2.3 Das Equine Herpesvirus Typ 3

Das Equine Herpesvirus Typ 3 gehört zu der Familie der Alphaherpesviren und ist als Erreger des Koitalexanthems (Bläschenausschlag), einer gutartigen, milden Deckinfektion bei Pferden, bekannt. EHV-3 konnte in den USA, in Australien, Kanada, Dänemark, Norwegen und England isoliert werden (Seki, Seimiya et al. 2004). Auch in Südindien konnte EHV-3 in Stuten und Hengsten, welche an dem Bläschenausschlag erkrankt waren, detektiert werden (Uppal, Yadav et al. 1989). Der Aufbau des Genoms von dem EHV-3 wurde unter anderem 1984 beschrieben (Sullivan, Atherton et al. 1984). Das EHV-3 verursacht bei Stuten im Scheidenvorhof und an der benachbarten Haut sowie am Penis und am Präputium beim Hengst Bläschen, Pusteln und Erosionen. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich durch den Deckakt (Pascoe und Bagust 1975), aber auch durch enge Kontakte oder durch rektale und vaginale Untersuchungen kann das Virus übertragen werden. Der Respirationstrakt kann ebenfalls Eintrittspforte für das Virus sein. Tiere, die einmal infiziert wurden, bleiben lebenslang Virusträger. Klinisch gesunde Stuten und Hengste können, wenn das in ihnen latent verweilende Virus reaktiviert wird, andere Tiere anstecken und es kommt dann zu den oben beschriebenen Symptomen. Die Heilung erfolgt spontan nach zwei bis drei Wochen, wenn eine Sekundärinfektion ausgeschlossen werden kann. Narben in Form von pigmentlosen Flecken bleiben oft zurück.

1.3 *Das Equine Herpesvirus Typ 5*

Taxonomie

Das Equine Herpesvirus Typ 5 wurde genauso wie das Equine Herpesvirus Typ 2 erst zur Familie der Betaherpesviren gezählt, aufgrund der biologischen Eigenschaften, der Genomstruktur, Größe und des langsamen Wachstums in der Zellkultur (Browning und Studdert 1987). Im Jahre 1993 erfolgte jedoch eine Reklassifizierung beider Virustypen. Die Sequenzen zufälliger DNA-Fragmente wurden analysiert und man identifizierte 25 EHV-2- und 28 EHV-5-Gene, welche für Proteine kodieren, die sehr große Ähnlichkeit hatten mit dem EBV und dem HVS (Telford, Studdert et al. 1993). Beide Herpesviren wurden dem Genus Rhadinovirus zugeordnet (Agius und Studdert 1994), (Telford, Watson et al. 1995). Auch wurden beide Viren bis 1987 aufgrund ihrer genetischen und antigenetischen Varianz als ein Virustyp identifiziert. Durch die Methode der Restriktionsenzymanalyse wurden 52 EHV-2-Isolate identifiziert, vier von diesen Isolaten hatten identische Profile, stimmten aber mit den anderen 48 Isolaten nicht überein (Browning und Studdert 1987). Schon im Jahre 1973 wurden mittels Nt signifikante Antigenunterschiede zwischen der Gruppe der vier Virusisolate und der anderen Isolate festgestellt (Plummer, Goodheart et al. 1973). Diese vier Virusisolate wurden dann 1987 als Isolate des EHV-5 identifiziert (Browning und Studdert 1987). Man kann also zusammenfassend sagen, dass das EHV-5 mit dem EHV-2 verwandt ist, sich aber sich von diesem auf genomischer Ebene deutlich unterscheidet (Telford, Studdert et al. 1993). Die Genomstruktur von EHV-5 ähnelt unter anderem der des Genoms von MCMV (Ebeling, Keil et al. 1983).

Biologische Eigenschaften

Ein lineares, doppelsträngiges, 179 kpb großes DNA- Molekül wurde als Genom des EHV-5 detektiert (Browning und Studdert 1989), (Agius, Nagesha et al. 1992), (Telford, Studdert et al. 1993). Durch die Methode der REA des EHV-5-Stammes 2-141 wurde nachgewiesen, dass das EHV-5 keine langen terminalen bzw. internen Wiederholungssequenzen besitzt (Browning und Studdert 1989), (Agius, Nagesha et al. 1992). Das EHV-5 wird aus diesem Grund der Genomgruppe F zugeordnet, wobei Genomgruppen von A bis F beschrieben sind. Das EHV-5-gB ist ein 870 bp großes Aminosäureprotein und zu 79 % ähnlich und zu 66 % identisch dem EHV-2-gB (Holloway, Lindquister et al. 1999), (Dunowska, Holloway et al. 2000). Das EHV-5-gB ist wie das EHV-2-gB ein Heterodimer mit Untereinheiten von 92 kDa. (Holloway, Lindquister et al. 1999).

Epidemiologie

Nicht viele EHV-5- Isolate wurden bis dato identifiziert. In Deutschland wurde bisher nur ein Isolat aus PBMC von einem gesunden Przewalskipferd aus dem Münchener Zoo dokumentiert (Borchers, Frölich et al. 1999). EHV-5 wurde isoliert aus Nasenhöhlen von Pferden, die respiratorische Symptome zeigten und aus PBMC von Pferden in Australien und Großbritannien (Browning und Studdert 1987). Mittels virusspezifischer PCR wurde 1995 EHV-5 in PBMC bei 13 von 70 Pferden nachgewiesen (Reubel, Crabb et al. 1995). Weiterhin wurde EHV-5 mittels dieser Methode bei 38 von 114 Fohlen und adulten Pferden in Neuseeland aus peripheren, mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) oder aus Nasentupfern (Dunowska, Meers et al. 1999) detektiert, allerdings war es nicht möglich, das Virus mit dem Vorkommen von respiratorischen Symptomen zu assoziieren. Interessant war der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von EHV-5 und EHV-2-Infektionen in den meisten Pferden (36/38), die untersucht wurden (Dunowska, Meers et al. 1999). In anderen Studien wurden Fohlen und adulte Pferde mittels virusspezifischer PCR in PBMC und in Nasentupfern in verschiedenen Regionen Europas auf EHV-5 untersucht: Das Virus wurde aus PBMC in Fohlen in Ungarn zu 15 % von 27 arabischen Vollblutfohlen und in adulten Pferde der Rasse Welshmountain in England zu 24 % von 21 Pferden nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Studie indizieren die Vermutung, dass EHV-5-Infektionen im späteren Fohlenalter auftreten (Nordengrahn, Merza et al. 2002), (Bell, Balasuriya et al. 2006). Weitere Studien belegen, dass EHV-5 mehrfach in jungen Pferden vorkommt, sowohl bei gesunden Fohlen (70/90), (Wilcox 2001), als auch bei experimentell infizierten Jährlingen mit respiratorischen Symptomen (14/14), auch wenn nicht bewiesen werden kann, dass EHV-5 für das Auftreten der respiratorischen Erkrankung verantwortlich war (Wilcox 2001). EHV-5 wurde in dieser Studie mittels multiplex PCR (mPCR) aus Nasentupfern und PBMC isoliert (Wilcox 2001). Die Prävalenz des EHV-5 in einer Gruppe von jungen Rennpferden wurde auf 64 % (30/47) geschätzt, wobei man das Virus aus Nasentupfern mittels EHV-5 spezifischer PCR detektiert hat (Bell, Balasuriya et al. 2006). Wiederholt konnte EHV-5 in klinisch gesunden Pferden detektiert werden (Reubel, Crabb et al. 1995), (Dunowska, Meers et al. 1999), (Nordengrahn, Merza et al. 2002). In einer aktuellen Studie wurde EHV-5 aus PBL von gesunden Wallachen mittels spezifischer Virus-PCR detektiert.

Die Pathogenese des EHV-5 ist so gut wie nicht erforscht. Infektionen mit Gammaherpesviren sind nicht absolut pathogen und Infektionen mit EHV-5 verlaufen klinisch minimal oder inapparent (Studdert, Turner et al. 1970), (Turner und Studdert 1970),

(Kemeny und Pearson 1970), (Harden, Bagust et al. 1974), (Murray, Eichorn et al. 1996). Es wäre anzunehmen, dass das Virus einen ähnlichen Infektionsweg nimmt, wie das EHV-2. Die Beteiligung des Virus an respiratorischen Erkrankungen wird noch diskutiert und kann nicht immer nachgewiesen werden (Dunowska, Meers et al. 1999). Somit lässt es sich auch nur vermuten, dass das EHV-5 über den Respirationstrakt in den Organismus gelangt, sich im respiratorischen Epithel vermehrt, über die Blut- und Lymphbahn im Organismus verteilt und sich eventuell über Endothelzellen oder dendritische Zellen im Auge manifestiert. Auch Krüdewagen hält eine Beteiligung von EHV-5 an ophthalmologischen Erkrankungen für möglich. In einer Studie wurden augenranke und augengesunde Tiere mittels nPCR auf EHV-5 untersucht. Bei 28,6 % der 14 Pferde, welche an Keratokonjunktivitis oder Konjunktivitis erkrankt waren und bei 41,7 % der augengesunden Tiere konnte EHV-5 nachgewiesen werden (Krüdewagen, 2001). Fetsch wies EHV-5 häufiger bei augenranken (25 %) als bei augensunden (20 %) Pferden nach (Fetsch 2007). Somit könnte eine ätiopathologische Beteiligung an diesem Krankheitsgeschehen angenommen werden, ein Beweis liegt derzeit noch nicht vor. In einer anderen Studie ließ sich EHV-5 signifikant häufiger ($p < 0,5$) in gesunden Augen nachweisen, als bei Viruskeratitiden. Weiterhin wurde gezeigt, dass EHV-5 sich in Konjunktivaltpfern signifikant ($p < 0,01$) häufiger detektierten ließ, als in Korneatupfern (Besthorn, 2002). An der Verbreitung von EHV-5 und der Bedeutung bei respiratorischen und ophthalmologischen Erkrankungen wird geforscht.

Zelltropismus und Latenz

Im Jahre 1995 wurde die Latenz von EHV-5 in PBMC angenommen (Reubel, Crabb et al. 1995). Später wurden latente EHV-5-Infektionen zu 88 % in PBMC in sechs Monate alten Fohlen mittels Co-Kultivation und virusspezifischer PCR detektiert (Bell, Balasuriya et al. 2006). Die Resultate einer anderen Studie, in der von Fohlen und Jährlingen über drei Jahre lang in verschiedenen Abständen Nasentupfer und Blutserum als Probenmaterial genommen wurden, ließen die Autoren zu dem Schluss kommen, dass EHV-5 in jungen Pferden über mehrere Monate persistiert (Wilcox 2001). Von verschiedenen Gammaherpesviren ist bekannt, dass sie verschiedene Zelltypen als Latenzorte besitzen. Das murine Gammaherpesvirus ist latent in B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (Sunil-Chundra, Efstathiou et al. 1992), (Kuppers 2003), (Steed, Buch et al. 2007). Als Latenzorte für das HCMV sind unter anderem myeloide Vorläuferzellen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen genannt (Jarvis und Nelson 2007). In den vorangegangenen Studien fokussierte man vor allem die glatten Muskelzellen und die myeloiden Vorläuferzellen (Jarvis

und Nelson 2002), (Vossen, van Dam-Mieras et al. 1996). Über den Zell- und Gewebetropismus von EHV-5 ist wenig bekannt. Wie oben erwähnt, wurde das Virus vor allem in respiratorischen (Dunowska, Meers et al. 1999), ophthalmologischen Geweben (Krüdwagen, 2001) und in PBMC nachgewiesen (Borchers, Frölich et al. 1999), (Bell, Balasuriya et al. 2006).

Die Rolle von viralen Co-Faktoren auf das EHV-5

Das Vorkommen von EHV-5 mit anderen Equinen Herpesviren wurde bis dato nur in einzelnen Fällen untersucht. Borchers formulierte 1999 eine mögliche Reaktivierung von EHV-1 und EHV-4 durch EHV-2 und EHV-5 (Borchers, Frölich et al. 1999). Welch vermutete, dass nur EHV-2 eine Rolle bei der Reaktivierung des latenten EHV-1 und des EHV-4 spielt (Welch, Bridges et al. 1992). Das gemeinsame Vorkommen von EHV-2 und EHV-5 hat Dunowska 1999 in einer Studie nachgewiesen. Die meisten (36/38) der 114 untersuchten Fohlen und adulten Pferden waren mit EHV-2 und EHV-5 infiziert (Dunowska, Meers et al. 1999). In einer anderen Studie, die in Bayern durchgeführt wurde, ließen sich EHV-2 und EHV-5 häufiger in gesunden als in pathologisch veränderten Augen mittels virusspezifischer PCR nachweisen: bei 16 von 185 untersuchten Augen augenkranker und augengesunder Pferde kam EHV-2 und EHV-5 gemeinsam vor (Besthorn, 2002).

Im zweiten Teil der Literaturrecherche soll erörtert werden ob Impfungen mit Resequin NN Plus[®] gegen EHV-1, EHV-4 und EIV Typ A und Behandlungen mit dem Immunmodulator Zylexis[®] einen Einfluss auf die Präsenz des EHV-5 haben.

1.4 Impfung mit Resequin NN Plus[®] und Behandlung mit dem Immunmodulator Zylexis[®]

Impfstoff Resequin NN Plus[®]

Bei der aktiven Immunisierung wird der Impfling mittels Einfach- oder Mehrfachimpfstoffe selbst veranlasst, spezifische Serum-Antikörper (humorale Immunantwort), Immunzellen (zelluläre Immunantwort) oder Memoryzellen gegen die im Impfstoff enthaltenen vermehrungsfähigen Antigene zu bilden (Rolle 2002). Derzeit gibt es keinen Impfstoff gegen EHV-2 und/ oder EHV-5, aber durchaus Stallvakzine, mit denen erfolgreich gegen andere Equine Herpesviren geimpft wird. Bei Resequin NN Plus[®] handelt es sich um eine inaktivierte Kombinationsvakzine, die gegen das EHV-1,- 4 und das Equine Influenzavirus A bei Pferden angewandt wird. Der Impfstoff enthält inaktiviertes Equines Herpesvirus Typ 1,

Stamm RAC- H; inaktiviertes Equines Herpesvirus Typ 4, Stamm 2252, inaktivierte Equine Influenzavirus-Antigene der Stämme A/equi 1/ Prag/1/56/, A/ equi 2/ Newmarket/1/93 (Amerikanischer Typ), A/ equi 2/ Newmarket/ 2/ 93 (Europäischer Typ) und zusätzlich ein Adjuvans, welches die immunisierende Eigenschaft der inaktivierten Keime fördert. Eine Impfpfrophylaxe gegen das Equine Herpesvirus Typ 1 und Typ 4 und gegen das Equine Influenza A Virus kann nur erfolgreich durchgeführt werden, wenn alle Pferde im Bestand in regelmäßigen Abständen geimpft werden. Durch diese Maßnahme kann man den Infektionsdruck verringern, da geimpfte Pferde wesentlich weniger Virus ausscheiden. Somit verringert sich gleichsam die Gefahr einer Erkrankung, die mit klinischen Symptomen einhergeht und in den meisten Fällen medikamentell behandelt werden muss. Die Impfpfrophylaxe sollte durch Maßnahmen zur Stressprävention unterstützt werden, da Impfungen für Pferde immer mit Stress verbunden sind und gerade durch Stress latente Viren wie EHV-2 oder EHV-5 reaktiviert werden können. Für die Impfpfrophylaxe sollte folgendes Impfschema (Tabelle 2) verwendet werden.

Tabelle 2: Impfschema

Art der Immunisierung	Zeitraum der Immunisierung
Grundimmunisierung	Erste Impfung: 3- 6 Lebensmonat
	Zweite Impfung: 1-2 Monate nach Erstimpfung
	Dritte Impfung: 4-6 Monate nach Zweitimpfung
Wiederholungsimmunisierung	Alle 6 Monate

Bei tragenden Stuten wird eine Immunisierung im fünften, siebten und neunten Monat nach Trächtigkeit empfohlen. Voraussetzung ist eine erfolgreiche Grundimmunisierung.

Immunmodulator Zylexis[®]

Als Immunmodulation wird einer Veränderung der Immunantwort durch verschiedene Substanzen definiert (Engst 2002). Die Veränderung kann positiv, im Sinne einer Immunstimulation oder negativ, im Sinne einer Immunsuppression, ausfallen (Mulcahy und Quinn 1986). Die Einteilung der Immunmodulatoren erfolgt entsprechend ihrer Herkunft. Dabei unterscheidet man körpereigene, synthetische, pflanzliche, tierische und mikrobielle Immunmodulatoren. Zylexis[®], früher Baypamune[®], ist ein Immunmodulator für Hunde, Katzen, Pferde, Rinder und Schweine. Er enthält zum überwiegenden Teil inaktiviertes Parapox ovis Stamm D 1701 und ein Adjuvans. Er dient zur Unterstützung der Vorbeugung

und Behandlung von infektiösen und stressbedingten Erkrankungen durch eine Stimulierung der Proliferation von Lymphozyten in Hund, Katze, Pferd, Rind und Schwein sowie der Induktion von antiviralen Interferonen und Interleukinen (z.B. IL-6; IL-12; TNF- α). In Rindern und Pferden konnten durch Zylexis[®] klinische Symptome einer respiratorischen Erkrankung signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduziert werden (Ziebell, Kretzdorn et al. 1997). Beim Pferd (Lindner, von Wittke et al. 1993), Hund und Rind konnten „Crowding-assoziierte“ respiratorische Erkrankungen ebenfalls durch diesen Immunmodulator verringert werden. In einer anderen Studie wurde die Wirksamkeit von Zylexis[®] im Rahmen der Prophylaxe von Lungenabzessen bei Fohlen untersucht. Hier erhielten 45 Fohlen Zylexis[®] subkutan und 45 Fohlen den Immunmodulator intranasal. Eine Kontrollgruppe aus 44 Fohlen wurde zum Vergleich herangezogen. In diesem Fall konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Testgruppen und der Kontrollgruppe in Bezug auf die Erkrankung festgestellt werden. Es konnte keine protektive und immunstimulierende Wirkung formuliert werden (Baumann 2006). Abschließend kann man sagen, dass beim Wirkungsmechanismus von Zylexis[®] die Aktivierung von Zytokinen eine wichtige Rolle spielt. Dabei sind besonders die Bedeutung von IFN α und die antivirale Aktivität von IFN γ hervorzuheben (Weber, Siegling et al. 2003). Die Behandlung mit Zylexis[®] könnte möglicherweise einen positiven Einfluss auf eine EHV-5 -Infektion haben, in dem es vor dieser schützt. Kombiniert mit einer Impfung, wie mit Resequin NN Plus[®] könnte dieser positive Einfluss noch verstärkt werden. Es ist aber auch genauso gut möglich, dass die Behandlung mit Resequin NN Plus[®] und Zylexis[®] zu einer Reaktivierung des EHV-5 führen könnte.

2. Zielsetzung der Dissertation

Die Verbreitung von EHV-5, die Bedeutung des Virus bei respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Erkrankungen und die Bedeutung viraler Co-Faktoren sowie der Einfluss von Impfung und Immunmodulator auf die Präsenz des Equinen Herpes Virus Typ 5 sollten im ersten Teil der Dissertation erörtert werden. Der zweite Teil dieser wissenschaftlichen Arbeit beschäftigte sich mit dem Gewebe- und Zelltropismus von EHV-5 am Auge und in PBMC.

Mit dem Thema der Verbreitung von EHV-5 sollten folgende Fragen erörtert werden:

1. Kommt EHV-5 in Deutschland vor?
2. Wie häufig kommt es vor?
3. Kann man EHV-5 mittels nPCR in PBMC, Augentupfer- und Nasentupferproben nachweisen?

Zusätzlich wurde nach der Beteiligung des EHV-5 bei verschiedenen Erkrankungen gefragt:

4. Spielt EHV-5 eine Rolle bei respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Symptomen?

Um diese Fragestellungen zu erörtern, wurden Pferde der Untersuchungsgruppe 1 mit Ausnahme der Gruppe P teilweise durch mich persönlich, teilweise durch externe Tierärzte im Rahmen der Diagnostikeinsendungen des virologischen Institutes an der Freien Universität Berlin beprobt. Bei den Proben handelte es sich um PBMC, Augen- und Nasentupfer. Diese Proben wurden nun per nPCR auf EHV-2 und EHV-5 untersucht.

Der letzte Fragenkomplex des ersten Teils der Arbeit geht näher auf virale Doppelinfektionen und die Behandlung mit dem Impfstoff Resequin NN Plus[®] und dem Immunmodulator Zylexis[®] ein:

5. Haben Impfungen und Immunmodulatoren (Resequin NN Plus[®] und Zylexis[®]) einen Einfluss auf die Präsenz des EHV-5?
6. Kommen Doppelinfektionen mit EHV-1,-2,-4 und dem EHV-5 vor?

Um die Wirkung von Zylexis® auf EHV-5 zu erörtern wurden Blutproben von Pferden der Gruppe A genommen. Es wurden PBMC-Proben von 18 Pferden per nPCR auf EHV-5 untersucht. Nach vier Wochen wurden dieselben 18 Pferde unter denselben Bedingungen erneut beprobt. Zu dem Zeitpunkt der zweiten Beprobung waren die Tiere dreimal mit Zylexis® und einmal mit Resequin NN Plus® behandelt worden.

Die Fragestellung ob Doppelinfektionen mit dem EHV-5 und den EHV-1,-2 und -4 vorkommen, wurde wie folgt methodisch erörtert. Der EHV-2- und 5-Nachweis von Pferden der Untersuchungsgruppe 1, mit Ausnahme der Gruppe P erfolgte mittels nPCR. Die Detektion von EHV-1 und 4 wurde serologisch mittels Nt und IFT untersucht.

Der zweite Teil der Dissertation beschäftigte sich mit dem Zell- und Gewebetropismus von EHV-5 im Auge und in PBMC. Dafür wurden *post-mortem* Gewebe der Untersuchungsgruppe 2 und PBMC der Gruppe P aus der Untersuchungsgruppe 1 mittels nPCR und danach mittels *in-situ*-Hybridisierung auf EHV-5 untersucht. Hierbei sollten folgende Fragen erörtert werden:

1. Kann EHV-5 mittels *in-situ*-Hybridisierung in Konjunktiven und in PBMC detektiert werden?
2. In welchen Zellen kann EHV-5 mittels der Methode der *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden?

3. Material- und Methodenteil

3.1 Materialnachweis

3.1.1 Chemikalien-, Gebrauchsmaterialien- und Gerätenachweis

3.1.1.1 Chemikaliennachweis

Assistent, Sondheim:	Histokit
BDM Laboratory Supplies, Poole (UK):	Carboxymethylcellulose- Natriumsalz
Biochrom AG, Berlin:	Bicoll Separating Solution, Dichte: 1,077, Ficoll 400, Foetal Calf Serum (FCS)
Bioline GmbH, Luckenwalde:	dNTP, Hyperladder I (100 lanes)
Bio mol, Hamburg:	Albumin Bovine Fraction V
Boehringer, Mannheim:	Klenow Enzym
DAKO, Glostrop	Konjugat Anti DIG/AP
Dianova, Hamburg:	Ziege-Anti-Pferd-IgG (H+L) FITC- Konjugat
Difco, Michigan (USA):	Trypsin
Invitek, Berlin:	RTP DNA/ RNA-Virus Mini Kit
Kodak- Pathe, Stuttgart:	Fotoflo- Netzmittel
Life Technologies (Gibco- BRL), Gaithersburg (USA):	Eagle's minimum essential medium Dulbeccos's modification (EDM), Ethidiumbromid
Merck, Darmstadt:	Chemikalien, ohne weiteren Vermerk
Promega GmbH, Mannheim:	nukleasefreies Wasser 25ml
Qiagen GmbH, Hilden:	10x PCR- Puffer (enthält 15 mM MgCl ₂), Taq DNA Polymerase (5 Einheiten/ µl)
Roche Diagnostics, Mannheim:	Proteinase K, DNA-Markierungs- und Detektionskit
Roth GmbH + Co., Karlsruhe:	Agarose, Giemsalösung,

	Sodium-Dodecylsulfat (SDS)
Sigma - Aldrich, Inc., St. Louis (USA):	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalz Dihydrat, Penicillin G, Mineralöl für PCR, Streptomycinsulfat

3.1.1.2 Gerätenachweis

Assistent, Sondheim:	Neubauer Zählkammer
Beckmann, München:	L8-70 M Ultrazentrifuge, Rotor SW 32 Ti
Bio- med GmbH, Oberschleißheim:	Thermocycler 60
Biometra, Göttingen:	FLX- 20M (Transluminator)
Carl Zeiss, Oberkochen:	Axiovert 100 (Fluoreszenzmikroskop)
Eppendorf, Wesseling- Berzdorf:	Eppendorfpipetten, Zentrifuge 5403, Thermocycler 5436
Heraeus Christ, Osterode:	begasbarer Feuchtbrutschrank, Biofuge A, Minifuge 2
Kendo Laboratory Products, Wien (A):	Clean Air (Sterilbank)
Martin, Gebrüder Martin, Tuttlingen:	Einmalskapelle
Memmert, Schwabach:	Inkubator
Ole Dich, Hvidore (DE):	Micro Zentrifuge 154
Omni Gene, Cambridge (USA):	Hybai limited (PCR- Cycler)
Olympus, Hamburg:	Lichtmikroskop, Model: CK2
Polaroid Film 667 Black & White Polaroid, Offenbach:	Polaroid, Camera CU-5-88-46,
Pharmacia, Freiburg:	Power Supply
Shandon Cytospin 3, Frankfurt am Main:	Zytozentrifuge
Shimadzu, Kyoto (Japan):	UV-1202 (Photometer)
Stratagene, Amsterdam (NL):	horizontale Gelkammer

3.1.1.3 Gebrauchsmaterialienachweis

Flexam, München:	Latex- Einmalhandschuhe
Braun, Melsungen:	Einmalinjektionskanüle
Marabu, Tamm:	Fixo Gum, Kleber

Nunc Brund Products, Denmark:	Kunststoffrichter, Plastic Coverslips
Ratiomed, Stuttgart:	Einmalskapellklingen
Roth GmbH + Co., Karlsruhe:	Multi [®] -Reaktionsgefäße, 1,7 ml & 0,65 ml
Kodak, Stuttgart:	Kodak Color 400, 36 er Film
Sorenson Bio Science, Inc., Salt Lake City (USA):	MultiGuard [®] - Tips, RNase-/ DNase- free 5-10 µl, 1-200 µl, 100- 1000 µl
Shandon Cytoslide, Chestire:	Objektträger
Shandon, Frankfurt am Main:	Filterpapier
TPP Tissue culture, Trasadingen (CH):	steriles Plastikeinmalmaterial (Zentrifugenröhrchen, Zellkulturplatten)

3.1.2 Primernachweis

Im Folgenden wird die Herkunft der benutzten Primer tabellarisch (Tabelle 3, Tabelle 4) dargestellt. Die in Tabelle 3 verwendeten Primer mit ihren Sequenzen entstammten dem Institut für Virologie und wurden dort erfolgreich verwendet.

Tabelle 3: Primersequenzen und „Annealing“- Temperaturen der zum Nachweis von Beta-Aktin verwendeten Polymerase-Kettenreaktionen

Primer	Sequenz	Temperatur	Fragmentgröße
A	5'-GTGTGGTGCCAAATCTTCTTC-3'	56°	248 bp
B	5'-GCGCTCGTCGTCGACAACGG- 3'	56°	248 bp

Tabelle 4: Primersequenzen und „Annealing“-Temperaturen der zum Nachweis des gB-Gens EHV-2 (Borchers et al., 2006) und zum Nachweis des gB-Gens EHV- 5 (Agius et al., 1994) optimiert für einen MWG- Heizblockcycler durch (Borchers et al., 1999)

Herpes-virus	Pri-mer	Sequenz	Temp.	Position	Fragment-größe
EHV-2	1	5`-ATCAACCCCACCAGCGTCAT- 3`	50°	33677	1. Runde 948 bp
EHV-2	2	5`-TTTTACTTCTTCCTCTCGTC- 3`	50°	34605	1. Runde 948 bp
EHV-2	3	5`-CCCAGGAACGAGATTGTGCT- 3`	50°	33899	2. Runde 512 bp
EHV-2	4	5`-GCTATGATGAGGACTATGAG- 3`	50°	34391	2. Runde 512 bp
EHV-5	1	5`- CAGACTATGGTGTGGGG- 3`	60°	897-913	1. Runde 1328 bp
EHV-5	2	5`- GCTGGCCACGTTCACTA- 3`	60°	2208- 2224	1. Runde 1328 bp
EHV-5	3	5`-GGACCAAGAGAGCGTGTTTGT-3`	66°	1681- 1702	2. Runde 492 bp
EHV-5	4	5`-TCCCCCAAGAACTGGATAAAGC- 3`	66°	2172- 2151	2. Runde 492 bp

3.1.3 Viren und Zellen

Die von PD Dr. K. Borchers (FU, Berlin) zur Verfügung gestellten Referenzstämme, die in dieser Arbeit benutzt wurden, sind in Tabelle 5 dargestellt.

Es wurden für EHV-1: A IV, für EHV-2: T 400, für EHV-4: T 252 und für EHV-5: P 48 als Referenzstämme verwendet.

Für die Vermehrung von EHV-1, 2, 4 und -5 wurden Equine Dermalzellen (ED), für EHV-5 wurden zusätzlich Nierenzellen von Kaninchen (RK, rabbit kidney) verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Viren

Herpesvirus	Isolat	Herkunft	Referenz
EHV-1	A IV	Fohlen, Abort	Chowdhury et al., 1986
EHV-2	T400	Fohlen, untere Atemwege	Thein et Hartl, 1976
EHV-4	KT- 4	Pferd, Nasentupfer	Borchers et al., 2005
EHV-5	P 48	Przewalski- Pferd, PBMC	Borchers et al., 1999a

3.1.3.1 Zellkulturen

Material, Lösungen, Reagenzien:

Nährmedium: Eagle's Minimum essential Medium, Dulbeccos's modification (EDM)

EDM-Pulver für 10 l

NaHCO ₃	37,0 g
Penicillin G	0,2 g
Streptomycinsulfat	0,2 g
Aqua bidest.	Ad 10 l
PH 7,2	

Phosphat Buffered Saline (PBS)

NaCl	137,0 mM (8,0 g)
KCL	2,7 mM (0,20 g)
Na ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	8,0 mM (1,42 g)
KH ₂ PO ₄	1,8 mM (0,24 g)
Aqua bidest.	Ad 1,0 l
PH 7,4	
Trypsinlösung (0,25 %)	
Trypsin	2,5 g
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)- Dinatriumsalz Dihydrat	2,0 mM (0,744 g)

PBS ad 1,0 l
Fötales Kälberserum (Foetal Calf Serum, FCS)

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Plastikpetrischalen (TPP, Tissue culture, Schweiz) mit EDM versetzt und unter Zusatz von 5 % FCS in begasbaren Feuchtbrutschränken bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Passagierung der Zellen wurde das EDM abpipettiert und die Zellen für 1 Minute mit Trypsin überschichtet. Das Trypsin wurde entfernt und die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem sich die Zell-Zell-Verbindungen durch Zugabe des Trypsins gelöst hatten, konnten sie in frisches Nährmedium aufgenommen und in einer neuen Plastikzellkulturschale ausgesät werden. Die dabei permanent genutzte ED-Zelllinie stammte aus der Institutssammlung (siehe 3.1.3).

3.1.3.2 Passagierung von ED- Zellen

Material, Lösungen, Reagenzien:

EDM-Medium/5 % FCS

Trypsinlösung (0,25 %, 2,5 g Trypsin auf 1 l PBS)

ED- Zellen

In der Zellkulturschale (TPP, Tissue culture, Schweiz) wurde begutachtet, ob die ED-Zellen einen konfluenten Zellrasen bildeten und steril waren. Dann wurde das Nährmedium aus der Petrischale abgenommen und sofort Trypsin dazu pipettiert, um die toten Zellen zu lösen. Das Trypsin wurde sofort wieder abgenommen. Im Anschluss nahm man die vom Boden der Zellkulturschale gelösten Zellen in EDM-Medium/5 % FCS auf und passagierte sie im Verhältnis 1:5. Dann pipettierte man pro Zellkulturschale 10 ml Nährmedium dazu. Die Zellkulturschale wurde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert, maximal zwei Tage inkubiert und bei Bedarf verwendet. Die nicht verwendeten ED-Zellen wurden verworfen.

3.1.3.3 Virusvermehrung

Material, Lösungen, Reagenzien:

EDM/5% FCS, PBS, Trypsinlösung (0,25 %)

Es wurden ED-Zellen in Kulturmedium (EDM/5 % FCS) in einer Zellkulturschale (TPP, Tissue culture, Schweiz) ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C in einem Feuchtbrutschrank inkubiert, bis sich ein semikonfluenten Zellrasen bildete.

Nun wurde das EDM/5 % FCS entfernt, der Zellrasen mit einer auf 0,1 MOI eingestellten Virussuspension infiziert und diese durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Damit die Viren an den Zellrasen adsorbieren konnten und sich cytopathische Effekte (cpE) bildeten, wurde einstündig bei 37°C im Feuchtbrutschrank inkubiert. Danach wurde die überschüssige Virussuspension durch das Hinzugeben von PBS auf den Zellrasen entfernt und frisches EDM/5 % FCS dazugegeben. Nach jeweils 5-7 Tagen wurden die EHV-2,5 infizierten Zellen bis zu dreimal im Verhältnis 1:2 umgesetzt, bei EHV-1,4- infizierten Zellen reichten 3 Tage Inkubation. Nachdem deutliche cpE erkennbar waren, wurde das virushaltige Medium abpipettiert und zur Entfernung grober Zellbestandteile bei 3000 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 10 Minuten zentrifugiert (Minifuge 2, Heraeus Christ, Hanau). Der virushaltige Überstand wurde anschließend in abgefüllten Portionen bei -70°C in Eppendorfgefäßen bis zum Bedarf eingefroren.

3.1.3.4 Virustitration

Material, Lösungen, Reagenzien:

Carboxymethylcellulose- Overlay medium (CMC)	
Carboxymethylcellulose- Natriumsalz	8,0 g
EDM	500,0 ml
FCS	10,0 ml
4 % (v/v) Formalinlösung in PBS	
Formalin (37 %)	10,8 ml
PBS	ad 100,0 ml
FCS, EDM, Giemsalösung	

Die Virussuspension wurde logarithmisch zur Basis 10 in EDM/5 %FCS verdünnt. Danach wurde je 200 µl der Verdünnungsstufen in jeweils zwei Kavitäten einer 24-Lochplatte (TPP, Tissue culture, Schweiz) pipettiert. Pro Kavität wurden nun 5×10^4 permissive ED-Zellen in EDM/5 %FCS hinzu pipettiert und die 24-Lochplatte im Feuchtbrutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Um eine Virusausbreitung von Zelle zu Zelle zu gewährleisten und einer extrazellulären Virusausbreitung vorzubeugen, wurde der Zellrasen mit 400µl CMC Overlay medium überschichtet. Die 24-Lochplatte wurde nun bis zum Ausbilden virusspezifischer Plaques (cpE), bei 37°C und 5 % CO₂ im Feuchtbrutschrank inkubiert. Zur Darstellung wurde der Zellrasen zunächst mit 4 % Formalin/PBS für 20 Minuten fixiert und anschließend mit Giemsa für 15 Minuten gefärbt. Für die Virustiterbestimmung zählte man die cytopathischen

Effekte unter einem Lichtmikroskop (ICM 405, Carl Zeiss, Oberkochen) aus und gab sie in Plaque-bildenden Einheiten (Plaque forming units, PFU) pro ml an.

3.1.4 Untersuchungsgruppen

In der vorliegenden Dissertation wurden Studien an natürlich infizierten Pferden und an *post-mortem* Geweben von Pferden durchgeführt. Die Gruppe der natürlich infizierten Pferde bildete die Gruppe 1 und beinhaltete Untergruppe 1.1: Die Gruppe der klinisch gesunden Pferde und die Untergruppe 1.2: Die Gruppe der klinisch kranken Pferde. Die Gruppe 2 lieferte Daten zu *post-mortem* Gewebeproben von Pferden.

Die Tabelle 6 liefert eine Übersicht über die verschiedenen Pferdeproben, die untersucht wurden.

Tabelle 6: Übersicht über die Einteilung der untersuchten Pferdeproben von natürlich infizierten Pferden und *post-mortem* Geweben von Pferden

Gruppe 1: Natürlich infizierte Pferde
<u>1.1: Gruppe der klinisch gesunden Pferde</u>
A1- A18
<u>1.2: Gruppe der klinisch kranken Pferde</u>
D1- D107
P1- P5
Gruppe 2: <i>post-mortem</i> Gewebe von Pferden
E1- E14
F1- F10

Die Gruppe 1 setzte sich aus natürlich infizierten Pferden zusammen. Als gesund galten Tiere, bei denen in der Anamnese keine Angaben zu allgemeinen oder ophthalmologischen Erkrankungen gemacht wurden. Die Untergruppe 1.1 enthält Gruppe A (A1- A18), welche Blutproben von Pferden des Zuchtbetriebes Pausin beinhaltet. Die 18 Warmblutpferde waren im Durchschnitt 11 Jahre alt und wurden zweimal im Abstand von 4 Wochen beprobt. Zum ersten Termin waren die Pferde weder geimpft, noch mit dem Immunmodulator Zylexis[®] behandelt worden. Zum zweiten Termin waren die Patienten einmal mit Resequinimpfstoff NN Plus[®] und dreimal mit Zylexis[®] behandelt worden. Diese Patienten zeigten keine Augenerkrankungen. Die Untergruppe 1.2. beinhaltet Daten der klinisch erkrankten Pferde. Dabei handelte es sich überwiegend um Warmblutpferde mit einem Durchschnittsalter von 11

Jahren. Bei der Gruppe D (D1-D107) handelt es sich um Blut- und Tupferproben die zur Diagnostik aus verschiedenen Gebieten Deutschlands in das Institut der Virologie eingesandt wurden und von Pferden mit respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Symptomen stammten. Diese Blut- und Tupferproben wurden serologisch auf EHV-1,-2 und -4 und molekularbiologisch auf EHV-2 und -5 untersucht. Die Gruppe P (P1-P5) beinhaltet PBMC, die durch Zytozentrifugation auf beschichtete Objektträger aufgebracht wurden und im Rahmen der *in-situ*-Hybridisierung auf EHV-5 untersucht wurden. Die dafür verwendeten Blutproben stammten von Pferden mit ophthalmologischen Symptomen aus der Tierklinik Aggertal, Tierklinik Hochmoor und aus der Pferdeklinik Seeburg und gehören zu der Diagnostiksammlung des Institutes für Virologie. Die zweite Gruppe setzt sich aus *post-mortem* Gewebeproben von insgesamt 21 Pferden zusammen und beinhaltet Gruppe E bis F. Bei Gruppe E (E1-E14) handelt es sich um Gewebeproben des Auges, die *post-mortem* von 14 Pferden von einem privaten Schlachthof in Brandenburg im Rahmen der Dissertation von Frau Fetsch genommen wurden und in deren Dissertation der Gruppe S1- S14 (Tabelle 4) zu entnehmen sind. Es wurden von jedem Pferd an beiden Augen Cornea, Konjunktiven, Retina, Nervus opticus und Tränendrüse molekularbiologisch auf EHV-2 und -5 untersucht. All diese Pferden zeigten keinerlei Krankheitsanzeichen und wurden daher für schlachttauglich befunden (Dissertation A. Fetsch, Kapitel 3.2.3). Die Gruppe F (F1-F10) beinhaltet histologische Schnitte von insgesamt 6 Pferden, die in der Arbeitsgruppe Virologie unter der Leitung von Frau PD Dr. K. Borchers, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie an der Freien Universität Berlin angefertigt wurden und Frau Dr.A. Fetsch, Frau Dr. U. Wolfinger und Herrn Dr. M. Ebert im Rahmen derer Dissertationen zur Verfügung gestellt wurden. Diese Paraffinschnitte wurden durch die Methode der *in-situ*-Hybridisierung auf EHV-5 untersucht wurden. Alle sieben Paraffinschnitte wurden anhand ihrer im Vorfeld gestesteten EHV-2/EHV-5-nPCR-Ergebnisse ausgewählt. Man wählte sowohl EHV-2/-5 positive und negative Paraffinschnitte aus, um Vergleichskontrollen zu erlangen.

3.2 Methoden

3.2.1 Serologische Tests

Um Antikörpertiter in EDTA -oder Citratblut ermitteln zu können, wurden der Neutralisationstest (Nt) und der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) angewandt. Der Neutralisationstest weist neutralisierende Antikörper nach, die das spezifische Virus neutralisieren, während durch den Immunfluoreszenztest auch andere Antikörper, wie Antikörper mit bekannter Spezifität, nachgewiesen werden können.

3.2.1.1 Neutralisationstest (Nt)

Material, Lösungen, Reagenzien:

Virusstamm: EHV-2, T400, ED, Titer: 6×10^4 Zellen/ml

EHV-5, p 48, RK 13, Titer: 5×10^6 Zellen/ml

EHV-2- Positivkontrolle: Referenzserum mit signifikanten neutralisierenden AK- Titer,

Name: Pferdepool, Tierklinik Hochmoor; Titer: 1:20

EHV-2- Negativkontrolle: Referenzserum, in dem keine neutralisierenden AK nachgewiesen wurden; Name: Pferdepool

EDM

EDM/ 5 %FCS - Medium

CMC Overlay medium

3 % Formalin/ PBS

Giemsa für die Mikroskopie

Das Komplementsystem der zu untersuchenden Seren wurde zuvor bei 56°C im Wasserbad für 30 Minuten inaktiviert. Von den equinen Seren, die zu testen waren, wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe zur Basis 2 erstellt (Borchers et. al 1997). In jedes Loch der 24-Lochplatte (TPP, Tissue culture, Schweiz) wurde $100\mu\text{l}$ EDM/5 %FCS und in die erste Reihe zusätzlich $60\mu\text{l}$ EDM/5 %FCS pipettiert. In die erste Reihe wurden nun $40\mu\text{l}$ der jeweiligen Serumprobe pipettiert. Für die logarithmische Verdünnungsreihe zur Basis 2 wurden $100\mu\text{l}$ aus der ersten Verdünnungsstufe in die zweite Verdünnungsstufe pipettiert, bis zur Verdünnungsstufe 80. Die $100\mu\text{l}$ aus der Verdünnungsstufe 80 wurden verworfen. Danach wurde die Virusverdünnung vorbereitet. Man benötigte $100\mu\text{l}$ Virusverdünnung pro Kavität. So wurde von einer in EDM-Medium auf 10^2 PFU/ $100\mu\text{l}$ Loch eingestellte

Virussuspension erstellt. Aus dieser Virussuspension wurden 100µl in jedes Loch pipettiert. Die 24-Lochplatte wurde für 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, damit neutralisierende Antikörper, sofern sie dann vorhanden waren, an das Virus binden und es neutralisieren konnten. Anschließend wurden 5×10^4 equine Dermalzellen in EDM/5 % FCS-Medium aufgenommen und pro Kavität dazu pipettiert. Dann wurde die 24-Lochplatte erneut für 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nun pipettierte man 0,4ml CMC-Medium pro Kavität hinzu, um den Zellrasen zu fixieren. Anschließend wurde die 24-Lochplatte für EHV-2 für 7 Tage bei 37°C im Feuchtbrutschrank und für EHV-5 für 10 Tage inkubiert, bis sich virusspezifische Plaques bildeten. Danach wurden die Zellen mit 3 % Formalin für 20 Minuten fixiert. Nun wurde die 24-Lochplatte mit GiemsaLösung für 30 Minuten gefärbt und die neutralisierenden AK-Titer unter dem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg/Modell: CK2) ausgewertet. Als Titer wird diejenige Verdünnungsstufe definiert, bei der mehr als 50 % der virusspezifischen Plaques reduziert sind. Der aussagekräftige Antikörpertiter lag für EHV-2/-5 bei 1:20 und größer. Als Kontrollen wurden eine Zellkontrolle ohne Virus, eine Viruskontrolle, eine EHV-2 Positivkontrolle und eine EHV-2 Negativkontrolle verwendet.

3.2.1.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IFT)

Material, Lösungen, Reagenzien:

1x10⁶ ED/ Zellkulturschale (TPP, Tissue culture, Schweiz, 100x20 mm)

1x 10⁶ RK13/Zellkulturschale (TPP, Tissue culture, Schweiz 100x20 mm)

Virusstamm: T400; EHV-2; ED-Zellen, Titer: 6×10^4 PFU/ml

Virusstamm: p48; EHV-5; RK13- Zellen; Titer: 5×10^6 Zellen/ml

EHV-2 Positivkontrolle: Referenzserum mit einem spezifischen, aussagekräftigen

Antikörpertiter von 1:5120; Name: Pferdepool

Trypsin/ EDTA 0,2 M, 1%

EDM-Medium/ 5 % FCS

3 % Formalin/PBS

1 % Triton/PBS: Triton x-100, 10 ml

PBS Ad 11

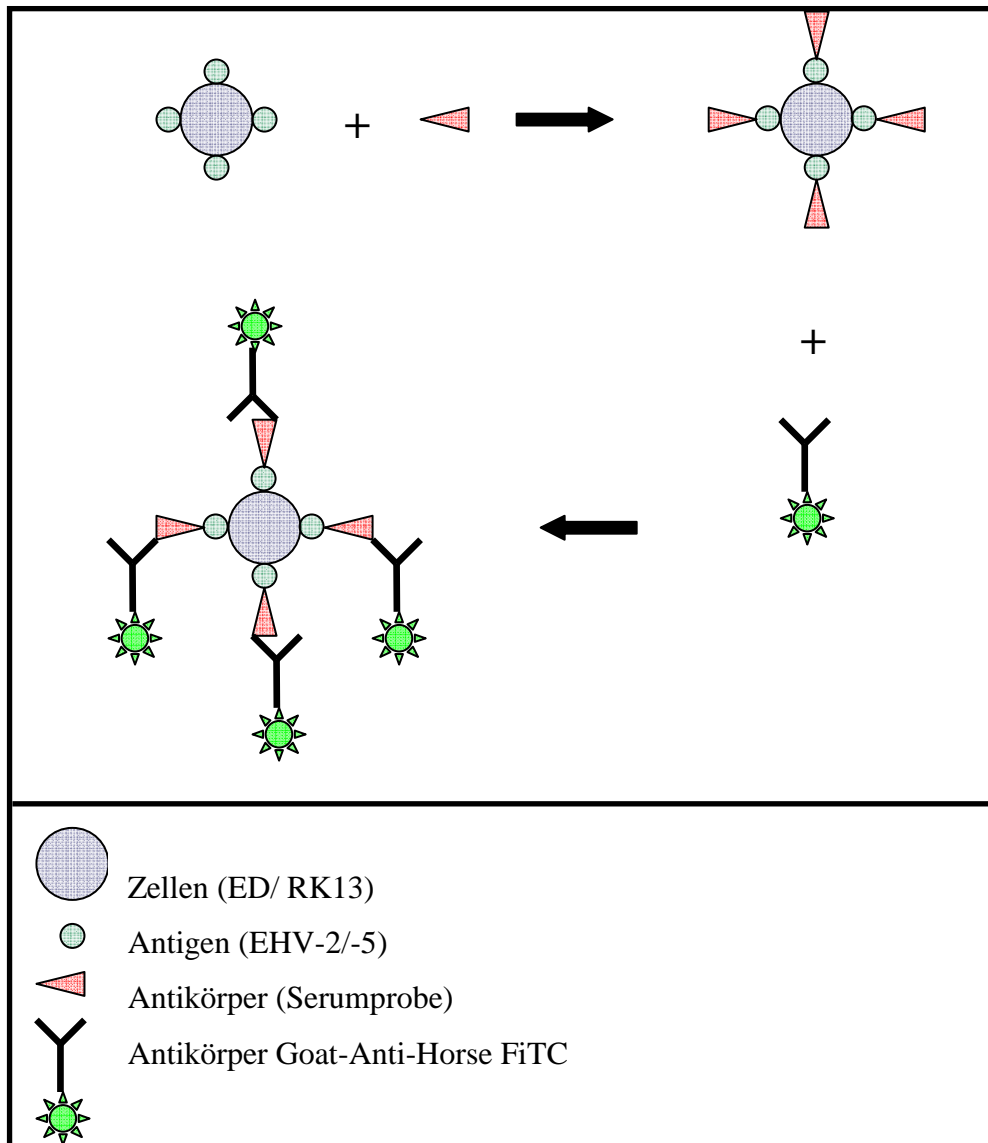
1 % PBS/ FCS

FITC

Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (Zellkulturplatte der Firma TPP, gammasterilisiert, zellkulturbehandelt, Durchmesser: 100x20 mm) wurde verwendet. Man benötigte 10^6 ED oder RK13 (Equine Dermal/ Rabbit Kidney) Zellen. Von der Zellkulturschale wurde das Medium abgenommen und anschließend wurde der Zellrasen mit Trypsin versetzt, um die bereits toten Zellen von dem Zellrasen zu lösen. Das Trypsin, mit den darin enthaltenen toten Zellen wurde sofort wieder abpipettiert. Ein Volumen von 1 ml Trypsin verweilte auf der Zellkulturschale und nach etwa 5-10 Minuten löste sich der Zellrasen. Nun nahm man den abgelösten Zellfilm in 10 ml EDM-Medium auf und gab 10^4 PFU/10ml dazu (100 PFU/Loch). Von dieser Viruszellsuspension gab man 100 μ l in jede Kavität der 96-Loch-Mikrotiterplatte. Die EHV-2/EHV-5 infizierten Zellen wurden nun für 3 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert und danach mit 3 %Formalin/PBS fixiert. Die 96-Lochplatte wurde bis zum Bedarf im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Die ED/RK13-Zellen wurden auf 96-Loch-Flachbodenplatten ausgesät und mit EHV-2/EHV-5 infiziert (Borchers et. al, 1997). Dann wurden die Zellen im Feuchtbrutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 3 %Formalin/PBS fixiert und die Platten bis zur Verwendung im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Um die Zellen für den IF -Test (Abbildung 6) aufzuschließen, das heißt um die Zellmembran für die Antikörper permeabel zu machen, musste man sie mit 1 %Triton/PBS überschichten, dann für 30 Minuten inkubieren, das Triton verwerfen und nun dreimal mit 1 %PBS/FCS- Lösung waschen. Nun wurden eine Verdünnungsreihe logarithmisch zur Basis 2 hergestellt. Die erste Reihe verdünnte man im Verhältnis 1:10, hier wurden zu den 90 μ l PBS 10 μ l der entsprechenden Serumprobe dazu pipettiert. Dann wurden logarithmische Verdünnungsreihen hergestellt, das heißt, 50 μ l aus der ersten Verdünnungsstufe in die zweite geben, bis zur Verdünnungsstufe 1: 20480. Nun wurde auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Mit der höchsten Verdünnungsstufe beginnend gab man 50 μ l der Verdünnungsreihe auf die 96-Lochplatte und inkubierte diese für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C. Eventuell vorhandene Antikörper in der Serumprobe konnten in dieser Zeit an das Antigen binden. Dann wurde 3x mit PBS/FCS-Lösung gewaschen. Nach dem Waschen wurden die zweiten Antikörper (Goat-Anti-Horse FITC-Konjugat, Dianova Hamburg) in einer Verdünnung von 1:100 in 1 %PBS/ FCS aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde nun erneut für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert um eventuell an die infizierten Zellen gebundene Antigene zu markieren. Nun wurde mit 1 %PBS/FCS-Lösung 3x gewaschen. In jede Kavität pipettierte man nun 100 μ l Aqua dest. Mittels Fluoreszenz im Cytoplasma konnten nun markierte Antigene, welche an die EHV-2/-5 infizierten ED/RK13 Zellen gebunden hatten, sichtbar gemacht werden.

Jetzt konnte man unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Zeiss) die AK-Titer bestimmen, in dem man die Verdünnungsstufe auswertete, wo gerade noch fluoreszierende Plaques zu sehen waren. Eine Positivkontrolle wurde immer mitgeführt. Als auffällig wurde ein Antikörpertiter von 1:5120 und größer im EHV-2/-5-IFT angesehen.

Abbildung 6: Indirekter Immunfluoreszenztest



3.2.2 Bearbeitung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

3.2.2.1 Isolierung von equinen PBMC

Material, Lösungen und Reagenzien:

3-5ml Bicol (density=1.077) (Biochrom AG)

PBS

In ein steriles 10 ml Zentrifugenröhrchen (TPP, Tissue culture, Schweiz) wurden 3-5ml Bicol pipettiert. Das EDTA-Blut, 3-5 ml Volumen, wurde vorsichtig darüber geschichtet.

In ein separates Kontrollröhrchen, welches als Lymphozytenkontrolle diente, wurde ebenfalls 3-5 ml Bicol pipettiert und dann mit sterilem PBS aufgefüllt, so dass in beiden Zentrifugenröhrchen das gleiche Volumen vorhanden war (Borchers et. al, 1997). Nun wurde 15 Minuten, bei 1900U/min und 4°C zentrifugiert (Heraeus, Christ, Minifuge 2). Der Buffy Coat stellte sich nach der Zentrifugation als schmale, beige Bande dar. Oberhalb dieser Bande stellt sich das Plasma gelblich dar, welches mit einer Pasteurpipette kreisend abgetragen wurde. Nun wurden die Lymphozyten und Monozyten mit einer Pasteurpipette kreisend und großzügig abgesaugt und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die PBMC mit 10 ml sterilem PBS gewaschen. Ein neues, steriles Kontrollröhrchen für die Lymphozytenkontrolle wurde auf 10 ml mit sterilem PBS aufgefüllt. Nun wurde für 5 Minuten bei 1000U/min und 4°C zentrifugiert (Heraeus, Christ, Minifuge 2). Der Überstand wurde dekantiert und das PBMC-Pellet in 1 ml sterilem PBS aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Mit der Lymphozytenkontrolle wurde in gleicher Weise verfahren. Nun wurde bei 13 000U/min für 1 Minute zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und die PBMC und die Lymphozytenkontrolle bei -20°C bis zur weiteren Verwendung im Gefrierschrank eingefroren.

3.2.2.2 Zellzählung

Material, Lösungen, Reagenzien:

Neubauer- Zählkammer (Assistant, Sondheim)

Zur Zählung der PBMC wurde eine Neubauer-Zählkammer (Assistant, Sondheim), (Abbildung 7) benutzt (Kershaw, von Oppen et al. 2001). Die Zählung der PBMC erfolgte für PCR- Zwecke, um eine gleiche Konzentration von Zellen zu gewährleisten. Der optisch plane Boden der Zählkammer ist mit einem rechtwinkligen Zählnetz versehen, das aus Linien in definierten Abständen besteht. Mittels Aufbringens eines optisch geschliffenen Deckglases und durch das Anfeuchten der Zählkammer wurde über der Bodenfläche ein Raum abgegrenzt, in dem die Partikel mikroskopisch ausgezählt wurden. Auf beiden Flächen wurden nun die Newtonsche Ringe sichtbar. Zum Füllen der Kammer wurde die Pipettenspitze dicht am Rand des Deckglases schräg auf den Boden der Zählkammer aufgesetzt und es wurden 5 µl der 10^6 PBMC/ml PBS-Zellsuspension in die Kammer pipettiert. Nun zählte man je 2 x 16 kleine Quadrate (Abbildung 8), also vier große Eckquadrate, aus und teilte diese Anzahl durch 4, um einen Mittelwert pro Eckquadrat zu erhalten. Dieser Wert wurde nun mit 10 multipliziert und man erhielt so die PBMC- Zahl pro

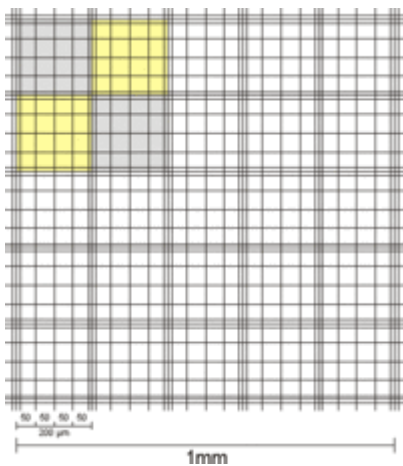
Volumeneinheit. Der Faktor 10 errechnete sich dadurch, dass jedes Eckquadrat eine Fläche von 1 mm aufwies und die Kammerhöhe 0,1mm betrug. Somit entsprach ein Eckquadrat einem Volumen von $0,1 \mu\text{l} = 0,1 \text{ mm}^3 \times 0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}^2$. Die Zellzahl pro Quadrat teilte man nun durch das Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ oder multiplizierte es mit dessen Kehrwert 10. Bei dieser Rechnung musste auch die entsprechende Verdünnung, die man gemacht hatte, bevor die Zellen auf die Kammer aufgebracht wurden, berücksichtigt werden.

Abbildung 7: Neubauer Zählkammer



Quelle: www.wikipedia.com

Abbildung 8: Neubauer Zählkammer, Gruppenquadrate



Quelle: www.wikipedia.com

3.2.2.3 DNA- Isolierung aus PBMC

Material, Lösungen, Reagenzien:

Proteinase K:	Konzentration: 15,1mg/ml = 15,1µg/µl PH: 7,5; in 10mM Tris- HCL
Verdaupuffer/ Digestpuffer:	2,5ml Twen 1,79g EDTA 30,35 Tris Aqua bidest. ad 500 ml

Die Durchführung erfolgte unter der Sterilbank (Kendo, Wien), mit Einmalhandschuhen (Flexam, München), die nach jeder Probenaufarbeitung gewechselt wurden. Pro Reaktionsansatz wurden 2,0- 4,0x10⁶ mononukleäre Zellen pro ml an PBMC- Probe, in einem steriles Eppendorfgefäß (2ml) in 200µl Verdaupuffer und 8µl Proteinase K (Endkonzentration 120,8µg in 8µl; Roche, Mannheim) aufgenommen (Borchers, Wolfinger et al. 1997) . Über Nacht wurden die PBMC-Proben im Wasserbad bei 56°C durch die Proteinase K verdaut. Anschließend wurden die Deckel der Eppendorfgefäße mit einer sterilen Kanüle (Braun, Melsungen) durchstoßen und die PBMC-Proben zur Inaktivierung des Enzyms auf 100°C für 10 Minuten erwärmt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch (Shimadzu, UV- 1202, Kyoto).

3.2.3 Bearbeitung von Augen- und Nasentupferproben

3.2.3.1 DNA- Isolierung aus trockenen Tupferproben

Material, Lösungen, Reagenzien:

Proteinase K:	Konzentration: 15,1mg/ml = 15,1µg/µl PH: 7,5 in 10mM Tris- HCL
Verdaupuffer/ Digestpuffer:	2,5 ml Twen 20 1,79g EDTA 30,35 Tris (Trihydroxymethylaminomethan)

Die DNA-Präparation erfolgte unter der Sterilbank (Kendo, Wien) und die Einmalhandschuhe (Flexam, München) wurden nach jeder Probenaufarbeitung gewechselt.

Die eingesandten trockenen Tupfer wurden in einem sterilen 2ml Eppendorfgefäß in 50µl Digestpuffer aufgenommen und ausgedrückt (Kershaw et. al, 2001). Danach wurde 2µl Proteinase K (Endkonzentration 30,2µg in 2µl, Roche, Mannheim) hinzugegeben. Die Präparationskontrolle enthielt lediglich 50 µl Digestpuffer und 2 µl Proteinase K und wurde mitgeführt, um eine Kontamination auszuschließen. Die Tupfer-Proben und die Präparationskontrolle wurden im Wasserbad bei 56°C durch die Proteinase K über Nacht verdaut. Anschließend wurde der Deckel des Eppendorfgefäßes mit einer sterilen Kanüle (Braun, Melsungen) durchstoßen und die Tupferproben zur Inaktivierung des Enzyms auf 100°C für 10 Minuten erwärmt. Danach erfolgte die DNA-Konzentrationsbestimmung photometrisch (Shimadzu, UV 1202, Kyoto).

3.2.3.2 DNA- Isolierung aus Tupferproben in Isoliermedium

Material, Lösungen, Reagenzien:

Proteinase K:	Konzentration: 15,1mg/ml = 15,1µg/µl PH: 7,5 in 10mM Tris- HCL
Verdaupuffer/ Digestpuffer:	2,5 ml Twen 20 1,79g EDTA 30,35 Tris (Trihydroxymethylaminomethan)

Die DNA-Präparation erfolgte unter der Sterilbank (Kendo, Wien) und die Einmalhandschuhe (Flexam, München) wurden nach jeder Probenaufarbeitung gewechselt. Die eingesandten Tupfer wurden im Isoliermedium kräftig ausgeschüttelt, ausgedrückt und danach verworfen. Von dem Medium wurden 1,5 ml in ein steriles, beschriftetes Eppendorfgefäß a 2 ml gefüllt und für 10 Minuten bei 4°C und 10 000U/min in einer Hochgeschwindigkeits-Tischzentrifuge (Ole Dich, Hvidore) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 50µl Digestpuffer und 2µl Proteinase K (Endkonzentration 30,2µg in 2µl, Roche, Mannheim) aufgenommen. Eine Präparationskontrolle mit lediglich 50 µl Digestpuffer und 2 µl Proteinase K wurde mitgeführt. Die Tupfer-Proben und die Präparationskontrolle wurden im Wasserbad bei 56°C durch die Proteinase K über Nacht verdaut. Anschließend wurden die Deckel der Eppendorfgefäße mit einer sterilen Kanüle (Braun, Melsungen) durchstoßen und man erwärmte die Tupferproben zur Inaktivierung des Enzyms auf 100°C für 10 Minuten. Danach erfolgte die DNA- Konzentrationsbestimmung photometrisch (Shimadzu, UV 1202, Kyoto).

3.2.4 Bearbeitung von *post-mortem* Geweben

3.2.4.1 DNA-Isolierung aus *post-mortem* Geweben

Material, Lösungen, Reagenzien:

Proteinase K:	Konzentration: 15,1mg/ml = 15,1µg/µl PH: 7,5 in 10mM Tris- HCL
Verdaupuffer/ Digestpuffer:	2,5 ml Twen 20 1,79g EDTA (Sigam) 30,35 Tris (Trihydroxymethylaminomethan)

Die DNA-Präparation von Augengewebe, welches in einer Gefriertruhe bei -70°C gelagert wurde, erfolgte unter der Sterilbank (Kendo, Wien). Es wurden Eppendorfgefäße a 2ml mit je 200 µl Digestpuffer und je 8 µl Proteinase K (Endkonzentration 120,8 µg in 8 µl, Roche, Mannheim) versetzt (Borchers, Brackmann et al. 2002). Die zu untersuchenden Augengewebeproben, wobei es sich um Cornea, Konjunktiven, Retina, Nervus opticus und Tränendrüsen handelte, wurden mit sterilen Einmalskapellklingen (Ratiomed, Stuttgart) entnommen, auf einer Zellkulturschale (TPP, Tissue culture, Schweiz, Durchmesser: 100x200mm) zerkleinert und mit einer sterilen anatomischen Pinzette in das Eppendorfgefäß gegeben. Die nicht sterilen Einmalhandschuhe (Flexam, München), die sterilen Einmalskapellklingen (Ratiomed, Stuttgart) und die sterilen Zellkulturschalen (TPP, Tissue culture, Schweiz) wurden für jedes unterschiedliche Gewebe neu verwendet. Ein Eppendorfgefäß diente als Präparationskontrolle und enthielt lediglich 50 µl Digestpuffer und 2 µl Proteinase K und wurde mitgeführt, um eine Kontamination auszuschließen. Die Augengewebeproben und die Präparationskontrolle wurden im Wasserbad bei 56°C durch die Proteinase K über Nacht verdaut. Anschließend wurden die Deckel der Eppendorfgefäße mit einer sterilen Kanüle durchgestochen und man erwärmte die Gewebeproben zur Inaktivierung des Enzyms auf 100°C für 10 Minuten. Danach erfolgte die DNA-Konzentrationsbestimmung photometrisch (Shimadzu, UV 1202, Kyoto).

3.2.4.2 DNA-Präparation aus Paraffinschnitten für die Durchführung der PCR

Material, Lösungen und Reagenzien:

Xylol

Ethanol absolut

Diese Methode der DNA-Präparation aus Paraffinschnitten wurde von K. Smith und K. Borchers im Jahr 2001 publiziert und von Frau PD. Dr. K. Borchers etabliert (Smith und Borchers 2001). Drei 4 µm dicke Schnitte aus Paraffin von Konjunktivengewebe wurden durch 10 minütige Inkubation in Xylol und 2x 5 minütige Inkubation in absolutem Ethanol entparaffinisiert. Die Gewebeschnitte wurden nun mit nukleasefreiem Wasser kurz angefeuchtet und das Gewebe im Anschluss mit Einmalskapellklingen (Ratiomed, Stuttgart) angeschabt. Das somit von den Objektträgern gelöste Konjunktivengewebe wurde nun in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und zum Verdau mit 100 µl Digestpuffer und 2 µl Proteinase K (5 mg/ml, Roche, Mannheim) versetzt. Eine Präparationskontrolle mit 50 µl Digestpuffer und 2 µl Proteinase K wurde mitgeführt. Die Gewebeproben wurden über Nacht im Wasserbad bei 56°C verdaut und die Enzymreaktion im Anschluss bei 100° für 10 Minuten abgestoppt. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm im Photometer (Shimadzu, UV- 1202, Kyoto). In die nested PCR wurden 1-2 µg Gesamt- DNA eingesetzt.

3.2.5 Virusnachweis in PBMC, Augen- und Nasentupferproben und *post-mortem* Geweben

3.2.5.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction), erstmals detektiert von K.B. Mullis (1983), dient der Vervielfältigung der DNS. Sie beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten, der Denaturierung, der Hybridisierung und der Synthese oder Verlängerung. Bei der Denaturierung werden die beiden komplementären Stränge der DNS getrennt, in dem die Reaktionslösung für 30 Sekunden auf 94°C erhitzt wird. Durch das Herabsetzen der Temperatur auf eine primerspezifische Temperatur für die Dauer von 30 Sekunden verbinden sich die Primer mit der DNS. Diesen Vorgang nennt man Hybridisierung.

Diese Verbindung ist nur dann stabil, wenn Primer und DNS-Abschnitt komplementär sind, sich also zwischen ihren Bausteine Basenpaare bilden können. An dieser Stelle beginnen die Polymerasen damit, weitere komplementäre Nukleotide anzubauen und die Verbindung zwischen Primern und DNS zu stärken. In der Verlängerung bzw. der Synthese wird die Temperatur nun wieder für 60 Sekunden auf 72°C erhöht. Das ist die ideale Arbeitstemperatur für die verwendeten Polymerasen, welche weitere Nukleotide an die entstehenden DNS-Stränge anbauen. Aufgrund der ständigen Wiederholung dieser drei Schritte verdoppelt sich jedes Mal die Anzahl an kopierten DNS-Molekülen.

3.2.5.1.1 Beta-Aktin-PCR zur Überprüfung der DNA-Qualität

Für den Nachweis des konservierten Zellstrukturgens, welches für das Protein Beta-Aktin codiert, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt (Shankar, Kao et al. 1992) kam eine Beta-Aktin-PCR zum Einsatz. Diese ist notwendig, um die Qualität der DNA der eingesetzten Gewebe-, Tupfer- oder Blutproben zu kontrollieren. Es wurde eine PCR durchgeführt, in der ein Teilstück aus der DNA der PBMC-, Tupfer-, oder Gewebeprobe amplifiziert und vervielfältigt wurde.

Es wurde ein Thermocycler 60 (Bio- med, Oberschleißheim) nach dem folgendem Reaktionsschema verwendet:

Initiale Denaturierung:	4 Minuten,	94°C
Denaturierung:	2 Minuten,	94°C
Annealing:	2 Minuten,	56 °C
Elongation:	2 Minuten,	72°C
Finale Elongation:	10 Minuten,	72 °C
Anzahl von Zyklen:	40	

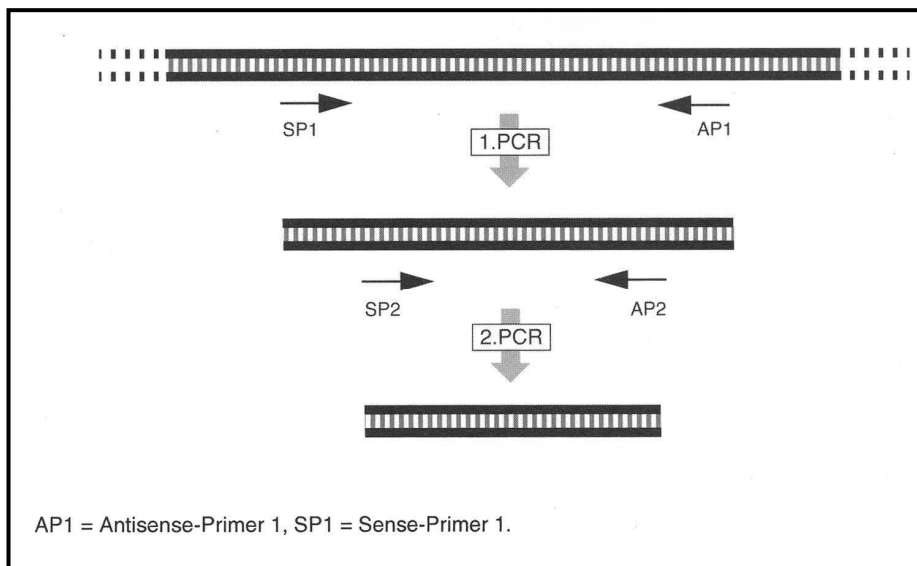
Die PCR wurde in Ansätzen zu je 50µl Gesamtvolumen durchgeführt. Als Kontrolle wurde 1 µl ED-Zellen-DNA, das entspricht einer Konzentration von 1-2 µg, verwendet. Zusätzlich zu dieser Positivkontrolle wurde eine Substanzenkontrolle (Negativ- oder PCR-Kontrolle) mitgeführt. Die Substanzenkontrolle enthielt Primer, Nukleotidverdünnungen, Puffer und Wasser. Die Substanzenkontrolle prüft die PCR- Substanzen auf Kontamination. Die Reaktionsansätze bestanden jeweils aus 1µlVorwärts- und Rückwärtsprimer (Stocklösung: 20 µM), 5µl dNTP's (2,5 mM, Bioline, Luckenwalde), 0,3 µl Taq- Polymerase (5 U/µl, Bioline,

Luckenwalde), 5 μ l 10x Reaktionspuffer (15 mM Magnesium, Qiagen, Hilden) und der DNA-Probe. An DNA wurde 1-2 μ g Gesamt-DNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes wurde nun mit RNasefreiem Wasser (Promega, Madison) auf 50 μ l aufgefüllt.

3.2.5.1.2 Nested Polymerase Kettenreaktion(nPCR)

Für den Nachweis des gB (Glykoprotein B)-Gens von EHV-2 (Borchers, Brackmann et al. 2002) und EHV-5 kam eine virusspezifische nPCR (Borchers et. al, 1997), „verschachteltePCR“ (Abbildung 9), zum Einsatz. Durch die nested PCR können auch geringste Templatemengen nachgewiesen werden. Das Prinzip funktioniert folgendermaßen: man führt eine PCR durch und verwendet das Produkt als Template für eine zweite Amplifikation mit anderen Primer (Chelly, Concordet et al. 1989). Das zweite Primerpaar liegt dabei zwischen dem Ersten. Durch dieses Prinzip werden die falschen Amplifikationsprodukte der ersten Runde selektiert. Somit kann man mittels dieser Methode extrem geringe Templatemengen nachweisen.

Abbildung 9: Nested PCR



Quelle: Dr. C. Mühlhardt, „Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics“, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag (Mühlhardt 2006)

Für die Kettenreaktionen zum Nachweis des gb-Gens von EHV-2 und -5 Genomen wurde ein Heizblockcycler (MWG, Biotech, Hybaid omnigene, Cambridge) nach dem folgendem Reaktionsschema verwendet:

Denaturierung:	30 Sekunden, 94°C
Annealing:	30 Sekunden primerspezifische Temperatur
Synthese:	60 Sekunden 72°C
Anzahl von Zyklen:	EHV-2 (gb): 2. Runde 30, sonst 35

Die PCR wurde in Ansätzen zu je 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Als Kontrolle wurden für EHV-2, 3 µl und für EHV-5 6 µl Virus-DNA in der ersten Runde verwendet. Diese Kontrollen gereinigter Virus-DNA mit einer Konzentration von 20-40 pg stammten aus dem Institut für Virologie und wurden, wie unter 3.2.6.3 beschrieben, hergestellt. Zusätzlich zu diesen Positivkontrollen wurde eine Substanzenkontrolle (Negativ-oder PCR- Kontrolle) und eine Präparationskontrolle mitgeführt. Die Substanzenkontrolle enthielt Primer, Nukleotidverdünnungen, Puffer und Wasser. Die Präparationskontrolle bestand aus Digestpuffer und Proteinase K, aus der DNA-Präparation (3.2.2.1). Die Substanzenkontrolle prüft die PCR-Substanzen, die Präparationskontrolle die bei der DNA-Präparation verwendeten Substanzen auf Kontamination. Die Reaktionsansätze bestanden jeweils aus 1 µl

Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Gebrauchslösung: 20 μ M), 5 μ l dNTP's (2,5 mM, Bioline, Luckenwalde), 0,3 μ l Taq- Polymerase (5 U/ μ l Bioline, Luckenwalde), 5 μ l 10x Reaktionspuffer (15 mM Magnesium, Qiagen, Hilden) und der DNA- Probe. An DNA wurde in die erste Runde 1-2 μ g Gesamt-DNA und in die zweite Runde stets 1 μ l Amplifikat der ersten Runde, eingesetzt. Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes wurde nun mit RNase freiem Wasser (Promega, Madison) auf 50 μ l aufgefüllt.

3.2.6 Virusspezifikation

3.2.6.1 Analytische Gelelektrophorese

Material, Lösungen, Reagenzien

TAE- Puffer (10x)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	48,5 g
Na- Acetat	4,13 g
EDTA- Dinatriumsalz- Dihydrat, 0,01 M, PH: 7,9 (Sigma)	3,7 g
Aqua bidest.	ad 1l

1 % Ethidiumbromidlösung (Merck)

Ethidiumbromid	1 g
Aqua bidest.	Ad 100 ml

Laufpuffer 1x TAE

TAE- Puffer (10x)	10 % (w/v)
In Aqua bidest.	

Probenpuffer

Ficoll Typ 500 (Biotech)	15 %
Bromphenol (Serva)	0,25 %
Aqua bidest.	ad 100 ml

Die analytische Gelelektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird (Ibelgaufts 1993). Weiterhin dient dieses Verfahren auch der Konzentrationsbestimmung nach der PCR. Die Agarose (Roth, Karlsruhe) wurde in 1 % Konzentration in 1x TAE- Puffer verwendet. Dazu löste man zunächst 1g Agarose (1 %) in 100ml TAE (1x) und ließ diese Suspension anschließend in der Mikrowelle vorsichtig schmelzen. Der TAE- Puffer (10x) ad 2l setzte sich wie folgt zusammen:

200ml TAE, 1800 ml Bidest und 80µl Ethidiumbromid. Die viskösen Gele wurden in horizontalen Gelkammern (Stratagene, Amsterdam) gegossen. Nach dem Erhärten überschichtete man diese mit Laufpuffer, dem Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/ml) zugesetzt wurde. Das Ethidiumbromid gehört zu den sequenzspezifischen DNA-Bindenden Substanzen, die sich zwischen einzelne Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls einlagern können (Ibelgaufits 1993). Die DNA-Fragmente können durch Ethidiumbromid unter dem UV-Licht angefärbt und so sichtbar gemacht werden. Die Reaktionsansätze setzten sich aus 2µl Probenpuffer und 15µl Amplifikat der zweiten Runde zusammen. Der Markeransatz bestand aus 2µl Probenpuffer, 5µl DNA- Längenstandard (Hyper Ladder 1 Marker-Ma, Bioline, Luckenwalde) und 7µl Bidest. Die Reaktionsansätze wurden nun in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese bei 96 V für eine Stunde gestartet. Nachdem die einzelnen DNA-Banden vollständig aufgetrennt waren, wurden die Gele auf einem Transluminator (Biometra, FLX-20M, Göttingen) begutachtet und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera (Polaroid, Offenbach), zur Dokumentation fotografiert.

3.2.6.2 Zytozentrifugation von EHV-5 infizierten und nicht EHV-5 infizierten ED- Zellen zur Herstellung einer Positiv- und Negativkontrolle für die *in-situ*-Hybridisierung, sowie die Zytozentrifugtion von PBMC

Material, Lösungen und Reagenzien:

Sodiumdodecylsulfat (SDS)- Lösung 10 %:

SDS	100 g
Aqua bidest.	Ad 1l

4 % Paraformaldehyd in PBS/ 5mM MgCl₂:

Paraformaldehyd	20 g
PBS/ mM MgCl ₂	ad 500 ml

Fotoflo- Netzmittel, Ethylen- Glykol, 1 %, Kodak- Pathe:

Fotoflo	5ml
PBS	ad 500 ml

Aceton

Ethanol 70 %:

Ethanol	700 ml
Aqua bidest.	ad 1l

Die für die Zytozentrifugation vorgesehenen Objektträger (Shandon Cytoslide, Chestire) wurden mit Handschuhen (Flexam, München) aus ihrer Originalpackung genommen und in 10 % SDS-Lösung gewaschen und gereinigt. Danach spülte man sie unter fließendem Leitungswasser ab, um das restliche SDS zu entfernen und wusch sie drei- bis viermal in Aqua bidest, um einer Verkalkung vorzubeugen. Nun wurden die Objektträger bei Raumtemperatur in einem Glasständer staubfrei über Nacht getrocknet. In einer Küvette, welche mit 300 ml 1 % Fotoflolösung (Kodak- Pathe, Stuttgart) gefüllt war, inkubierte man die Objektträger, um sie danach zweimal in PBS zu waschen. Das Netzmittel verhindert die Lösung des Gewebes oder der Zellen, die für die *in-situ*-Hybridisierung durch die Methode der Zytozentrifugation, auf die Objektträger aufzentrifugiert werden. Bei Raumtemperatur wurden die Objektträger nun staubfrei und über Nacht getrocknet. Nach dieser Behandlung wurden die Objektträger mit Filterpapier (Shandon, Frankfurt am Main) bedeckt, mit einem Kunststofftrichter (Nunc Brund Products, Denmark) versehen und in die Metallhalter der Zytozentrifuge (Shandon, Cytospin 3, Frankfurt am Main) eingespannt. ED- Zellen, wurden vorher mit den EHV-1 (Mar 87), 2 (T400) und 5 (P48)- Stämmen infiziert und gezählt. Von diesen infizierten Zellen wurden 5×10^6 Zellen in 20 ml PBS aufgenommen und 5 Minuten bei 800 UpM und 20 °Celsius zentrifugiert (Hereaus Christ, Minifuge 2, Osterode). Ein Volumen von 200 μ l der zu 5×10^4 Zellen pro ml PBS verdünnten Zellen wurden unter der Sterilbank (Kendo, Wien) in die Kunststofffilter pipettiert und die Objektträger nun bei 800 UpM für 5 Minuten zentrifugiert. Die Trichter und das Filterpapier wurden nun vorsichtig und ohne Ablösung der infizierten Zellen entfernt. Das Filterpapier wurde verworfen und die Kunststofftrichter für 15 Minuten in 70 % Ethanol gereinigt, in Aqua bidest. gewaschen und danach bei Raumtemperatur getrocknet. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur unter der Sterilbank getrocknet, für 10 Minuten in Aceton fixiert und erneut bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zum erneuten Gebrauch wurden die Objektträger bei -20 °C gelagert. Bevor die Zytozentrifugation der PBMC erfolgen konnte, wurden sie, wie unter 3.2.2 beschrieben, isoliert und gezählt. Die Zytozentrifugation der PBMC erfolgte wie beschrieben, nur mit dem Unterschied, dass 200 μ l einer 10^5 eingestellten Zellsuspension pro 10 ml PBS bei 400 Upm für 5 Minuten zentrifugiert wurden.

3.2.6.3 Präparation und Reinigung von Virus-DNA für die DNA-Sondenherstellung und die Herstellung der Viruskontrollen für die PCR

Material, Lösungen und Reagenzien:

RTP DNA/ RNA Virus Mini Kit (Invitex, Berlin):

Binding Solution

Elution Buffer R

Wash Buffer R1

Wash Buffer R2

RTA Spin Filter Set

RTA Receiver Tubes

Elution Tubes

Extractions Tubes

20 % Sucroslösung:

20 g Sucrose

1 ml 1 M Tris- HCL, PH: 7, 4

1, 5 ml 0, 2 M EDTA, PH: 7, 2

Ad 100 ml Aqua Bidest

Es wurde ein virushaltiger Zellkulturüberstand von 200 ml bei 3000 Upm (Heraus Christ, Minifuge 2, Osterode) für 10 Minuten zentrifugiert. Der somit gewonnene zellfreie Kulturüberstand wurde nun zum Entfernen der Zelltrümmer erneut 10 Minuten bei 8000 Upm zentrifugiert. Der vorgereinigte Virusüberstand wurde auf ein 5 ml umfassendes 20 % ige Sucrosekissen geschichtet, in dem man die Sucroslösung langsam in den Virusüberstand einspritzte. Dabei sollte die Kanülenspritze den Boden des Zentrifugenröhrchens berühren. Nun folgte die Zentrifugation in einem SW-32 Ti Rotor (Beckmann, München) für 1 Stunde bei 2700 Upm. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet, welches aus 100 ml Überstand gewonnen wurde, in 400 µl RNasefreies Wasser resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Extractions Tube (Invitex, Berlin) überführt und für 15 Minuten bei 65°C und danach für 10 Minuten bei 95°C geschwenkt. Zum Binden der DNA wurde nun der Suspension 400 µl Binding Puffer (Kit, Invitex, Berlin) zugeführt. Ein Spin-Filter (Kit, Invitex, Berlin) wurde in ein neues Receiver Tube gelegt, die Suspensionprobe auf den Filter überführt und für 1 Minute bei 10 000 Upm (Z 5403 Zentrifuge, Eppendorf, Wesseling- Berzdorf) zentrifugiert. Zum Waschen der Virus-DNA-Probe wurde das Filter Tube in ein neues Receiver Tube

verbracht und die Suspension für 30 Sekunden in 500 µl Puffer R1 (Kit, Invitex, Berlin) bei 10 000 Upm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Virus-DNA-Probe mit 800 µl Buffer R2 versetzt und bei 10 000 Upm für 30 Sekunden erneut zentrifugiert. Das Filtrat wurde dekantiert und das Pellet für 4 Minuten bei 15 000 Upm trocken zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde der Filter Tube mit dem Pellet auf einen Elutionstube überführt, das Pellet mit 60 µl Puffer R (bei 80°C gelöster Elutionspuffer) für 3 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Virus- DNA- Probe für 1 Minute bei 10 000 Upm zentrifugiert und nun für 10 Minuten in 37°C temperiertem Wasserbad verbracht. Es wurden 3 µl der Virus-DNA-Probe mit 5 µl Hyper Ladder Marker, 2 µl Laufpuffer und 8 µl Bidest versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel (Roth, Karlsruhe) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 45 Minuten bei 96 Volt gestartet und die Konzentrationsbestimmung der Virus-DNA im Anschluss durchgeführt. Die Virus-DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.2.6.4 Herstellung einer Digoxigenin- d-UTP-markierten DNA-Sonde

Material, Lösungen und Reagenzien:

0,2 M EDTA-Lösung:

EDTA	7,44 g
Aqua bidest.	Ad 100 ml

5 M Amoniumacetat:

NH ₄ - Acetat	38,54 g
Aqua bidest.	Ad 100 ml

15 µl DNA

DNA- Markierungs- und Detektions-Kit:

2 µl Hexanukleotide

2 µl d NTP's

1 µl Klenow Enzym

5 µl ssp- DNA (Heringssperma)

Ethanol absolut

Ethanol 80 %

TE – Puffer (Tris-EDTA)

Um eine Digoxigenin-d-UTP-markierte DNA-Sonde herzustellen, wurde ein Digoxigenin-DNA-Markierungs- und Detektions-Kit (Roche, Mannheim) benutzt. Es wurden 75 ng, also

15 µl gereinigte EHV-5 DNA (p 48) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und im Wasserbad bei 100°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend gleich wieder auf Eiswasser gekühlt, um das Renaturieren der eben denaturierten Doppelstränge zu verhindern. Nun pipettierte man zu den 15 µl DNA, 2µl Hexanukleotide (Roche, Mannheim), 2 µl dNTP's (Roche, Mannheim), 1 µl Klenowenzym (Boehringer, Mannheim) hinzu. Nun wurde zum Abstoppen der Enzymreaktion, 2 µl 0,2 M EDTA hinzu gegeben und die Fällung der DNA durch Hinzugabe von 5 µl Heringssperma (10µg/µl), 40 µl 5 M Ammoniumacetat, 33 µl Aqua bidest. und 300 µl absolutem, eiskaltem Ethanol, eingeleitet. Es folgte eine einstündige Inkubation bei -20°C im Gefrierschrank. Dann wurde der DNA-Sondenansatz bei 20 000 UpM und 15 Minuten zentrifugiert (Ole Dich Mikrozentrifuge 154, Hvidore), der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 200 µl 80 %igen Ethanol gewaschen. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 20 000 Upm (Ole Dich Mikrozentrifuge 154, Hvidore), der Überstand wurde erneut verworfen und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 40 µl TE- Puffer aufgenommen und die Sonde bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

3.2.6.5 Dot Blot Verfahren zur Überprüfung und Konzentrationsbestimmung der markierten Sonde

Material, Lösungen und Reagenzien:

Puffer 1:

Tris	1	100 mM (12,11 g)
NaCl		150 mM (8,77 g)
Aqua bidest.		ad 1 l

Puffer 2:

0,5 % (w/v) Blockingreagenz (Digoxigenin- DNA- Markierungskit)	0,5 g
Puffer 1	ad 100 ml

Puffer 3:

Tris:	100 mM (12,11 g)
NaCl	100 mM (5,84 g)
MgCl ₂	50 mM (4,76 g)
Aqua bidest.	Ad 1l

Puffer 4:

Tris:	10 mM (1,21 g)
-------	----------------

EDTA	1 mM (0,372 g)
Aqua bidest.	ad 1l
Nitroblau- Tetrazoliumsalz (NBT)	50 mg/ml In 70 % Dimethylformamid
X- Phosphat:	
5- Bromo- 4- chloro- indolylphosphat	50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid
Färbelösung:	
NBT- Lösung	45 µl
X- Phosphat	35 µl
Puffer 3	ad 10 ml

Für das Dot Blot Verfahren wurde erneut der Digoxigenin-DNA-Markierungs- und Detektions-Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Von der markierten Sonde und einer markierten Kontrollsonde (Konzentration: 5 µl/µl) wurde eine Verdünnungsreihe von 1:10¹ bis 1:10⁶ hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde 1 µl auf eine Nylonmembran aufgetragen und diese Membran für 30 Minuten bei 80°C getrocknet, um die DNA der Sonde zu denaturieren. Nach Trocknung der Nylonmembran wurde diese kurz in Puffer 1 gewaschen, dann für 30 Minuten in Puffer 2, einem Blockingpuffer, auf einem Schwenkgerät geschüttelt und danach erneut kurz in Puffer 1 gewaschen. Das Konjugat Anti-Digoxigenin-AP (Glostrup, Denmark) wurde 1:1000 in Puffer 1 verdünnt und die Nylonmembran in dieser Verdünnung für 30 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Nun wurde diese zweimal 15 Minuten in Puffer 1 und danach zwei Minuten in Puffer 3 gewaschen. Abgedunkelt erfolgte nun die Farbreaktion mit der Färbelösung (NBT/ X-Phosphat) für zwei- bis fünf Minuten, welche durch das Schwenken in Puffer 4 abgestoppt wurde. Die Nylonmembran wurde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und die Konzentrationsbestimmung der markierten Sonde erfolgte anhand der Verdünnungsreihe im Vergleich mit der markierten Kontrollsonde (5 ng/ µl) und betrug 0,5 ng/µl.

3.2.6.6 *In-situ*-Hybridisierung

Material, Lösungen und Reagenzien:

100 % Foramid (v/v) / 20 % Dextransulfat (w/v)

20 x Standard Sodium Citrat (SSC)

Na Cl 3 M (175, 3g)

Tri- Na- Citrat- Dihydrat 0,3 M (88,2g)

Aqua bidest. ad 1 l

50 x Denhardt- Puffer

Ficoll 2 g

Polyvinylpyrrolidose 2 g

BSA (Bovines Serum Albumin) 2 g

Aqua bidest. Ad 200 ml

6,6 µg/ µl Lachssperma- DNA (SSP)

5 M MgCl₂ in PBS

Mg Cl₂ 47,6 g

PBS ad 100 ml

Puffer 1

2 M Tris/HCl, pH: 7,5 25 ml

5 M NaCl 15 ml

Aqua bidest. Ad 500 ml

Puffer 3

2 M Tris/ HCl, pH: 7,5 25 ml

5 M NaCl 15 ml

5 M MgCl₂ 5 ml

Aqua bidest. Ad 500 ml

Puffer 4

2 M Tris/ HCl, pH: 7,5 2,5 ml

0,5 M EDTA 1 ml

Aqua bidest. Ad 500 ml

5 mM MgCl in PBS

5 M MgCl₂ in PBS 1 ml

PBS ad 1l

2 mg/ ml Glycin in PBS

Glycin	2 g
PBS	ad 1 l

4 % Paraformaldehyd in PBS/ 5 mM MgCl₂

Paraformaldehyd	20 g
PBS/ mM MgCl ₂	ad 500 ml

Xylol

Ethanol absolut

Ethanol 70 %

Die *in-situ*-Hybridisierung (Borchers, Ebert et al. 2006) dient der Detektion von EHV- 5 in EHV-5 infizierten ED- Zellen und in Paraffinschnitten von Konjunktiven. Als Markierung diente eine Digoxigenin- markierte EHV-5-DNA-Sonde (0,5 ng/ μ l). Die Paraffinschnitte wurden zur Entparaffinisierung 10 Minuten in Xylol und danach zweimal fünf Minuten in absolutem Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Paraffinschnitte und die mit EHV-5 infizierten ED-Zellen zweimal fünf Minuten in 5 mM MgCl₂/PBS rehydriert. Im Anschluss folgte eine Proteinase K-Behandlung um die Membranen der EHV-5 infizierten ED- und Konjunktivalzellen aufzuschließen. Dazu wurden die infizierten ED- Zellen mit einer Proteinase K Konzentration von 0,1 mg/ ml in PBS und die Paraffinschnitte mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml in PBS für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch dreimaliges Waschen für fünf Minuten in 2mg/ml Glycin/ PBS bei Raumtemperatur gestoppt. Anschließend wurden die Paraffinschnitte und die EHV-5 infizierten ED-Zellen für fünf Minuten in 4 % igem Paraformaldehyd/ PBS/ 5 mM MgCl fixiert. Nun folgten zwei Waschschritte für je fünf Minuten in 2mg/ml Glycin/ PBS um eventuell restliche Proteinase K zu eliminieren. Die Schnitte wurden je zwei Minuten in 70 % igem Ethanol und in absolutem Ethanol dehydriert und dann luftgetrocknet.

Für den Hybridisierungsmix wurde ein 10 µl Ansatz gewählt, welcher pro Paraffinschnitt/ED-Zellprobe folgende Bestandteile enthielt (Tabelle 7):

Tabelle 7: Bestandteile des Hybridisierungsmixes für die Konjunktivengewebe

Bestandteil des Hybridisierungsmixes	Funktion des Bestandteils
2 µl Aqua bidest.	Auffüllen des Hybridisierungsmixes
1 µl 20x SSC	Eliminierung von Acetyl- und Schwefelverbindung, welche im Rahmen der Hybridisierung entstanden sind
0,4 µl 50 x Denhard Puffer	Milieuaufrechterhaltung Schutz vor Austrocknung
0,6 µl SSP- DNA	Unspezifischer Carrier Substrat für DNA-Angreifende Enzyme an Stelle der SSP-DNA kann auch Heringsspermien-DNA verwendet werden
5 µl 50 % iges Foramid/ 10 % iges Dextransulfat	Lösungsmittel Absenkung des Schmelzpunktes Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA- Einzelsträngen durch starke Polarität
0,5 ng/ µl EHV-5 Sonde	Bezeichnung für jede Art von NS, mit deren Hilfe man ein gesuchtes Gen oder eine bestimmte DNA-Sequenz im Genom einer Organismus nachweisen kann, Anlagerung an die zu untersuchende DNA

Von diesem wurden je 10 µl pro Objektträger aufgetropft und mit einem Kunststoffgläschen abgedeckt. Die Denaturierung erfolgte durch das Erhitzen auf 120°C für circa zwei Minuten. Um die Denaturierung rechtzeitig zu stoppen wurde ein Hitzeindikator mitgeführt. Danach wurden die Gewebeschnitte und EHV-5 infizierten ED- Zellen sofort auf Eiswasser abgekühlt, um eine Renaturierung der DNA zu verhindern. Die Kunststoffdeckgläschen wurden nun mit Fixo Gum (Marabu, Tamm) abgedichtet und die Objektträger für 48 Stunden in einer feuchten Kammer mit 6 x SSC, einem Standardpuffer, welcher für die Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts verantwortlich ist, bei 37°C im Inkubator (Memmert, Schwabach) inkubiert. Nachdem die Deckgläschen vorsichtig von den Objektträgern entfernt worden waren, folgten diverse Waschschrte mit SSC, um durch die

Hybridisierung entstandenen „Abfall“ sowie nicht spezifisch gebundene Sonde unter stringenten Bedingungen zu entfernen und um somit Bindungsstellen für die EHV-5 Sonde zu schaffen:

zweimal kurz in zweimal SSC, dreimal 10 Minuten in zweimal SSC bei Raumtemperatur, 30 Minuten in zweimal SSC, bei 55°C im Wasserbad, zwei- bis drei Minuten in 0,2x SSC bei Raumtemperatur equilibrieren, 30 Minuten in 0,2x SSC bei 45°C im Wasserbad. Die Objektträger wurden nun kurz in Puffer 1 equilibriert, bevor für 30 Minuten in 6% BSA (Biomol, Hamburg) in Puffer 1 geblockt wurde, um die Hybridisierung zu unterbinden. Dem Blocken schloss sich ein dreimaliger Waschgang für je 10 Minuten in Puffer 1 an. Nun wurden die Paraffinschnitte mit einem Kaninchen- anti- Digoxigenin-AP Konjugat (Dako, Glostrop), Verdünnung 1: 100 in Puffer 1, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschgänge mit jeweils 15 Minuten in Puffer 1. Dann wurde für 3 Minuten in Puffer 3 equilibriert. Dem Equilibrieren schloss sich die Färbereaktion in 4,5 µl NBT, 3,5 µl X- Phosphat ad 1 ml Puffer 3 an. Der Schritt des Färbens wurde abgedunkelt durchgeführt. Nach einer acht minütigen Inkubation wurde die Farbreaktion in Puffer 4 abgestoppt. Die EHV-5 infizierten ED-Zellen wurden mit einem Tropfen Glycerol fixiert. Die Paraffinschnitte wurde je fünf Minuten in 70 % igem Ethanol, absolutem Ethanol und Xylol inkubiert, um die Grundlage für die Histokitbehandlung zu schaffen. Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte mit einem Tropfen Histokit fixiert. Nun folgte die Auswertung der spezifischen Signale unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Jena). Als Positivkontrolle wurde bei jeder *in-situ*-Hybridisierung ein Objektträger (Shandon, Chestire) mit zytozentrifugierten EHV-5 infizierten ED-Zellen (P48) und als Negativkontrolle ein Paraffinschnitt mit EHV-5 negativen Konjunktivengewebe (Fetsch 2007) mitgeführt.

Die *in-situ*-Hybridisierung dient des Weiteren der Detektion von EHV-5 in PBMC. Als Markierung diente eine Digoxigenin-markierte EHV-5-DNA-Sonde (0,5 ng/µl). Die auf Objektträger (Shandon, Chestire) zytozentrifugierten 10^6 PBMC wurden zweimal fünf Minuten in 5 mM MgCl₂/PBS rehydriert. Im Anschluss wurden die PBMC für fünf Minuten in 4 % igem Paraformaldehyd/ PBS/ 5 mM MgCl fixiert. Nun folgte die Dehydrierung für je zwei Minuten in 70 % igem Ethanol und in absolutem Ethanol. Danach wurden die PBMC für kurze Zeit luftgetrocknet.

Für den Hybridisierungsmix wurde ein 10 µl Ansatz gewählt, welcher pro PBMC-Zellprobe folgende Bestandteile enthält (Tabelle 8):

Tabelle 8: Bestandteile des Hybridisierungsmixes für die PBMC

Bestandteil des Hybridisierungsmixes	Funktion des Bestandteils
2 µl Aqua bidest.	Auffüllen des Hybridisierungsmixes
1 µl 20x SSC	Eliminierung von Acetyl- und Schwefelverbindung, welche im Rahmen der Hybridisierung entstanden sind
0,4 µl 50 x Denhard Puffer	Milieuaufrechterhaltung Schutz vor Austrocknung
0,6 µl SSP- DNA	Unspezifischer Carrier Substrat für DNA- angreifende Enzyme an Stelle der SSP-DNA kann auch Heringsspermien-DNA verwendet werden
5 µl 50 % igen Foramid/ 10 % iges Dextransulfat	Lösungsmittel Absenkung des Schmelzpunktes Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA- Einzelsträngen durch starke Polarität
0,5 ng/ µl EHV-5 Sonde	Bezeichnung für jede Art von NS, mit deren Hilfe man ein gesuchtes Gen oder eine bestimmte DNA-Sequenz im Genom einer Organismus nachweisen kann Anlagerung an die zu untersuchende DNA

Von diesem wurden je 10 µl pro Objektträger (Shandon, Cestire) aufgetropft und mit einem Kunststoffgläschen abgedeckt. Die Denaturierung erfolgte durch das Erhitzen auf 120°C für circa zwei Minuten. Um die Denaturierung rechtzeitig zu stoppen wurde ein Hitzeindikator mitgeführt. Danach wurden die mononukleären Zellen sofort auf Eiswasser abgekühlt, um eine Renaturierung der DNA zu verhindern. Die Kunststoffdeckgläschen wurden nun mit Fixo Gum (Marabu, Tamm) abgedichtet und die Objektträger für 48 Stunden in einer feuchten Kammer mit 6 x SSC, einem Standardpuffer, welcher für die Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts verantwortlich ist, bei 37°C im Inkubator (Memmert, Schwabach) inkubiert. Nachdem die Deckgläschen vorsichtig von den Objektträgern entfernt worden waren, folgten diverse Waschschrte mit SSC, um durch die Hybridisierung

entstandenen „Abfall“ sowie nicht spezifisch gebundene Sonde unter stringenten Bedingungen zu entfernen und um somit Bindungsstellen für die EHV-5 Sonde zu schaffen: zweimal kurz in zweimal SSC, dreimal 10 Minuten in zweimal SSC bei Raumtemperatur, 30 Minuten in zweimal SSC, bei 55°C im Wasserbad. Die Objektträger wurden nun kurz in Puffer 1 equilibriert, bevor für 30 Minuten in 6 % BSA(Biomol, Hamburg) in Puffer 1 geblockt wurde, um die Hybridisierung zu unterbinden und um unspezifische DNA-Fragmente zu blockieren. Dem Blocken schloss sich ein einmaliger Waschgang für je 10 Minuten in Puffer 1 an. Nun wurden die zytozentrifugierten PBMC mit einem Kaninchen-anti- Digoxigenin- AP Konjugat (Dako, Glostrop), Verdünnung 1: 100, in Puffer 1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschgänge für 10 Minuten in Puffer 1. Dann wurde für drei Minuten in Puffer 3 equilibriert. Dem Equilibrieren schloss sich die Färbereaktion in 4,5 µl NBT, 3,5 µl X- Phosphat ad 1 ml Puffer 3 an. Der Schritt des Färbens wurde abgedunkelt durchgeführt. Nach einer acht minütigen Inkubation wurde die Farbreaktion in Puffer 4 abgestoppt. Die mononukleären Zellen wurden mit einem Tropfen Glycerol fixiert. Nun folgte die Auswertung der spezifischen Signale unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Jena). Als Positivkontrolle wurde bei jeder *in-situ*-Hybridisierung ein Objektträger (Shandon, Chestire) mit cytozentrifugierten EHV-5 infizierten ED- Zellen (P48) mitgeführt.

3.3 Statistische Methoden

3.3.1 McNemar-Test

Der McNemar-Test ist ein Häufigkeitstest für zwei verbundene Stichproben, die hinsichtlich eines Alternativmerkmals mit den Ausprägungen A und \bar{A} zu vergleichen sind (Weiss 2005). In diesem Fall wurde das Merkmal „Resequin NNPlus[®]/Zylexis[®]-Erfolg“ mit den Ausprägungen „ja“ und „nein“ untersucht. Der Mc Nemar-Test wurde angewandt um die Ergebnisse hinsichtlich der EHV-5- Detektion vor und nach der Resequin NNPlus[®]/Zylexis[®]- Applikation zu vergleichen. Der Stichprobenumfang lässt sich wie folgt aufteilen (Tabelle 9):

Tabelle 9: McNemar-Test

		Nach Zylexis [®] - Applikation		
		<i>EHV-5- positiv</i>	<i>EHV-5- negativ</i>	Zeilensumme
Vor Zylexis[®]- Applikation	<i>EHV-5- positiv</i>	a	b	a+b
	<i>EHV-5- negativ</i>	c	d	c+d
Spaltensumme		a+c	b+d	

Die Formel für den McNemar-Test lautet:

$$X^2 = (b - c)^2 : b + c, \text{ (Weiss 2005)}$$

Der Grenzwert für den die Alternativhypothese angenommen werden kann, liegt bei $p = 0,05$.

Als Software für den McNemar -Test wurde BiAS. für Windows benutzt.

4. Ergebnisse

4.1 Einleitung

Das Ziel meiner Dissertation war es, Kenntnisse über die Verbreitung und Bedeutung von EHV-5 Infektionen bei Pferden zu erlangen und diese mittels molekularbiologischer und serologischer Methoden nachzuweisen. Der Ergebnissteil dieser Arbeit gliedert sich in folgende zwei Teile:

A. Ergebnisse zur Verbreitung und Bedeutung von EHV-5:

1. Kommt EHV-5 in Deutschland vor?
2. Wie häufig kommt es vor?
3. Kann man EHV-5 mittels nPCR in PBMC, Augentupfer- und Nasentupferproben nachweisen?
4. Spielt EHV-5 eine Rolle bei respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Symptomen und kann es bei diesen Symptomen in PBMC, Augentupfern und Nasentupfern mittels spezifischer nPCR nachgewiesen werden?

Der letzte Fragenkomplex des ersten Teils der Arbeit geht näher auf Doppelinfektionen mit EHV-1, EHV-2 und EHV-4 sowie auf die Impfung mit Resequin NN Plus[®] und die Immunmodulatorbehandlung mit Zylexis[®] ein:

5. Haben Impfungen (Resequin NN Plus[®]) und Immunmodulatoren (Zylexis[®]) einen Einfluss auf die Präsenz des EHV-5?
6. Kommen Doppelinfektionen von EHV-5 mit EHV-1,-2-und 4 vor?

B. Ergebnisse zum Gewebe- und Zelltropismus von EHV-5 in Augen und in PBMC:

1. Kann EHV-5 mittels *in-situ*-Hybridisierung in Konjunktiven und PBMC detektiert werden?
2. In welchen Zellen kann EHV-5 mittels der Methode der *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden?

Während sich der erste Teil der Dissertation mit der Bedeutung und Verbreitung des Equinen Herpesvirus 5 befasst, beschäftigt sich der zweite Teil der Arbeit mit dem Gewebe- und Zelltropismus von EHV-5 in Augengeweben und in peripheren mononukleären Zellen des Blutes.

4.2 Beschreibung der Stichproben

In der vorliegenden Dissertation wurden Studien an natürlich infizierten Pferden und an *post-mortem* Gewebe von Pferden durchgeführt. Die Gruppe der natürlich infizierten Pferde bildet die Gruppe 1 und beinhaltet Untergruppe 1.1: Die Gruppe der klinisch gesunden Pferde und die Untergruppe 1.2: Die Gruppe der klinisch kranken Pferde. Die Gruppe 2 liefert Daten zu *post-mortem* Gewebeproben von Pferden.

Bei der Gruppe 1.1 (Tabelle 16) handelte es sich um eine verbundene Stichprobe, weil dieselben Tiere mehrmals untersucht wurden. Die Proben entstammten dem Institut für Virologie und wurden im Rahmen der Dissertation von Frau Heinemann (D. Heinemann, 2008; eine Publikation ist in Arbeit) entnommen. Es handelte sich um 18 Warmblutpferde (A1-A18), mit einem Durchschnittsalter von 11 Jahren, die unter denselben Bedingungen an zwei verschiedenen Tagen im Abstand von vier Wochen beprobt wurden. Bei der Probe handelte es sich um eine Blutprobe. Zum ersten Zeitpunkt der Beprobung, am 26.09.2006 (A1-A18) waren die Pferde unbehandelt, zum zweiten Zeitpunkt, am 26.10.2006 (A1-A18), sind die Pferde dreimal mit Zylexis[®] (Immunmodulator) und einmal mit Resequin NN Plus[®] (Impfstoff) behandelt worden. Bei der Gruppe 1.2 (Tabelle 17) handelte es sich um eine Stichprobe, die im Zeitraum vom 19.12.2005 bis zum 28.05.2007 erhoben und dieser Dissertation zu Forschungszwecken durch das Institut für Virologie zugänglich gemacht wurde. Bei dieser Stichprobe wurden überwiegend Warmblutpferde (D1-D107) mit einem Durchschnittsalter von 11 Jahren aus Deutschland im Rahmen der Diagnostik auf EHV-1, -2, -4 und -5 untersucht. Diese Pferde waren laut Anamnese an ophthalmologischen, respiratorischen und/oder unspezifischen Symptomen erkrankt. Von diesen Pferden wurden Blut-, Augentupfer- und Nasentupferproben durch Tierärzte erworben, wobei nicht alle drei Arten von Proben von jedem Pferd erhoben wurden. Gruppe P (Tabelle 22) beinhaltet fünf Blutproben von Pferden mit ophthalmologischen Symptomen aus verschiedenen Tierkliniken in Deutschland. Aus den Blutproben wurden PBMC isoliert, durch Zytozentrifugation auf beschichtete Objektträger aufgebracht, fixiert und im Rahmen der *in-situ*-Hybridisierung auf EHV-5 untersucht wurden.

Die Gruppe 1 mit Ausnahme von Gruppe P wurde für den Ergebnisteil A herangezogen. Die gesamten Ergebnisse der Gruppe 1.1 sind in Tabelle 16, die gesamten Ergebnisse der Gruppe 1.2 sind in Tabelle 17 im Anhang detailliert aufgelistet.

Die zweite Gruppe setzte sich aus *post-mortem* Gewebeproben von insgesamt 21 Pferden zusammen und beinhaltete Gruppe E und F. Bei Gruppe E (Tabelle 20) handelte es sich um Gewebeproben des Auges, die *post-mortem* von 14 Pferden von einem privaten Schlachthof in Brandenburg im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. A. Fetsch genommen wurden und in deren Dissertation der Gruppe S1- S14 (Anhang, Tabelle 4) zu entnehmen sind (Borchers, Ebert et al. 2006), (Fetsch 2007). Es wurde von jedem Pferd an beiden Augen frisches Gewebe Cornea, Konjunktiva, Retina, Nervus opticus und Tränendrüse molekularbiologisch mittels nPCR auf EHV-2 und -5 untersucht. All diese Pferde wiesen keinerlei Krankheitsanzeichen auf und wurden daher für schlachttauglich befunden (Fetsch 2007), (Kapitel 3.2.3). In der hier vorliegenden Dissertation wurden die Konjunktiven dieser 14 Pferde entsprechend präpariert (3.2.4.1) und nochmals auf EHV-5 mittels nPCR (3.2.5.1.2) untersucht. Die Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle 20 dargestellt. Die Gruppe F (Tabelle 21) beinhaltet histologische Schnitte von insgesamt 6 Pferden, die im Rahmen von Forschungsarbeiten am Institut für Virologie unter der Leitung von PD Dr. K. Borchers und in Kooperation mit dem Institut für Tierpathologie an der Freien Universität Berlin angefertigt und Frau Dr. A. Fetsch (Fetsch 2007), Frau Dr. U. Wolfinger (Wolfinger 1998) und Herrn Dr. M. Ebert (Ebert 2006) im Rahmen deren Dissertationen zur Verfügung gestellt wurden. Diese Schnitte wurden durch die Methode der nPCR und *in-situ*-Hybridisierung auf EHV-5 untersucht. Diese zehn Paraffinschnitte wurden anhand ihres PCR-Ergebnisses bzw. der Anamnese ausgesucht. Dabei suchte man gezielt nach Konjunktivalschnitten, die im Vorfeld aus frischen Geweben in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. K. Borchers per nPCR EHV-2 und EHV-5 positiv und negativ getestet wurden, um Vergleichskontrollen für positive und negative Proben zu haben. Gruppe 2 und Gruppe P aus Gruppe 1 wurden für den Ergebnisteil B betrachtet.

4.3 Ergebnisteil

4.3.1 Ergebnisteil A: Ergebnisse zur Verbreitung und Bedeutung von EHV-5

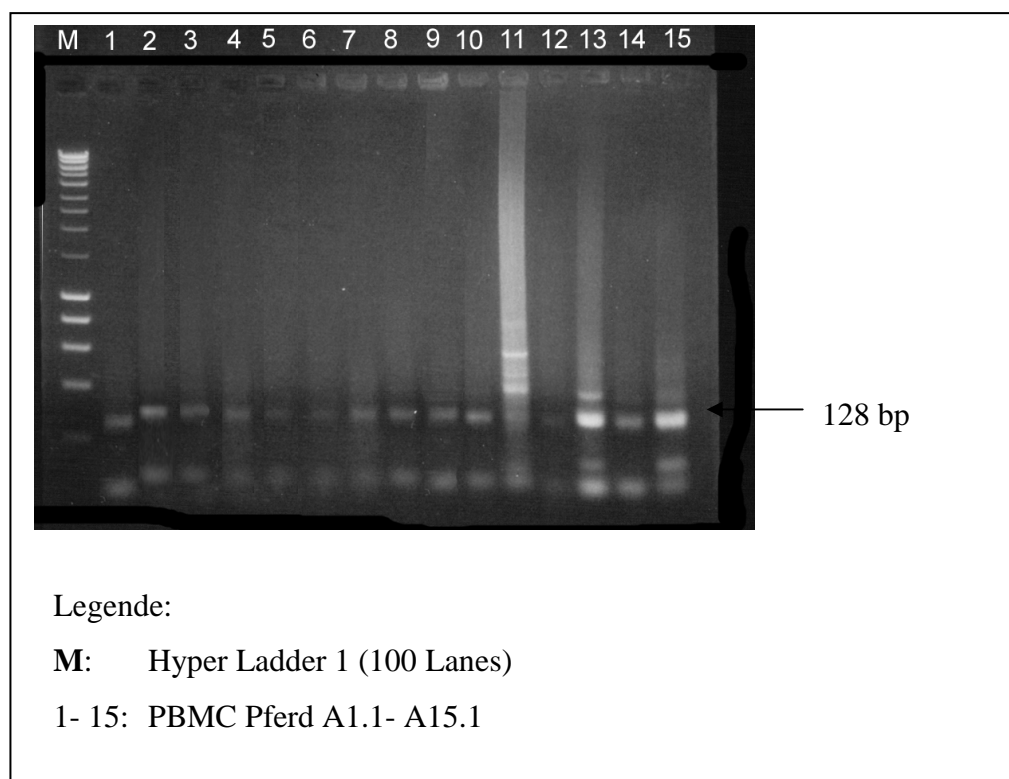
In diesem ersten Teil der Ergebnisdarstellung sollte die Verbreitung und Bedeutung von EHV-5 mit Hilfe der Methode der nPCR erörtert werden. In verschiedenen Studien waren typspezifische PCR-Assays eine unverzichtbare Methode zur Detektion von EHV-2 und EHV-5. Reubel benutzte 1995 nested multiplex PCR-Assays um EHV-2 und EHV-5 zu detektieren (Reubel, Crabb et al. 1995). Er benutzte dazu Nukleotidsequenzen des Glycoprotein B-(gB)-Gens von EHV-2 und des Thymidinkinase-(TK)-Gens von EHV-5. EHV-2 und EHV-5 spezifische Primer wurden in einer multiplex PCR genutzt, um eine spezifische und sensitive Diagnose für jedes einzelne Virus zu erstellen (Reubel, Crabb et al. 1995). Diese Methode war 10 mal sensitiver für EHV-2 und EHV-5 als die Virusisolation in einer Zellkultur (Reubel, Crabb et al. 1995). Nordengrahn benutzte zur Detektion der EHV-2 DNA eine semi-nested PCR, um Nukleotidfragmente der Region 424 und 354 des H-Gens zu verstärken. Die DNA des EHV-5 wurde durch eine single PCR nachgewiesen, welche die 344-bp Region des H-Gens amplifiziert (Nordengrahn, Merza et al. 2002). Zur Detektion des EHV-2 und EHV-5 Genoms in 31 Augentupfern von Pferden mit ophthalmologischen Erkrankungen und von 15 klinisch gesunden Pferden benutzten Borchers und Mitarbeiter die gB-typ-spezifische nested PCR (Borchers 2005).

4.3.1.1 Ergebnisse zum Vorkommen von EHV-5 in Deutschland und zum Nachweis des Virus in PBMC, Augen- und Nasentupfern

Um den Sachverhalt zum Vorkommen von EHV-5 in Deutschland zu beantworten, wurden die Gruppe der gesunden (Gruppe 1.1) und die Gruppe der kranken Pferde (Gruppe 1.2) mittels nPCR auf EHV-5 untersucht. Die Gruppe der gesunden Pferde wurde nochmals in Kapitel 4.3.1.3 unter dem Aspekt der Impfstoff- und der Immunmodulatorbehandlung und in Kapitel 4.3.1.4 unter dem Aspekt von Doppelinfektionen des EHV-5 mit dem EHV-1,-2 und -4 untersucht. Die Gruppe der kranken Pferde wurde ebenfalls mehrfach untersucht. Zusätzlich zu Kapitel 4.3.1.1, wurde diese Gruppe unter dem Aspekt von respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Symptomen in Kapitel 4.3.1.2 und unter dem Aspekt von Doppelinfektionen des EHV-5 mit EHV-1,-2 und -4 in Kapitel 4.3.1.4 untersucht. Während bei der Gruppe der gesunden Pferde nur Blutproben zur Untersuchung eingesandt wurden, wurden bei der Gruppe der kranken Pferde Augentupfer, PBMC und Nasentupfer

einzelnen aber auch Kombinationen dieser Probenmaterialien von Pferden eingeschickt. Die Aufarbeitung der verschiedenen Proben erfolgte wie unter 3.2.2.3 und unter 3.2.4 beschrieben. Um den Erfolg der DNA-Präparationen der Blutzellproben zu überprüfen, wurden diese Proben stichprobenartig mit der Methode der Beta-Aktin-PCR (3.2.5.1.1) untersucht. Tupferproben wurden aufgrund der zu geringen Gesamt-DNA-Menge keiner Beta-Aktin-PCR unterzogen. Eine Beta-Aktin-Positivkontrolle, eine DNA-Präparationskontrolle sowie eine PCR-Negativkontrolle wurden mitgeführt. Das hochkonservierte Zellstrukturgene Beta-Aktin und in Folge dessen eine ausreichende DNA-Qualität der einzelnen PBMC-Stichproben konnte bei allen PBMC-Stichprobenkontrollen nachgewiesen werden. Ein Ausschnitt der Ergebnisse dieser Untersuchung ist in Abbildung 10 dargestellt und zeigt alle positiven PBMC-Stichprobenkontrollen der Beta-Aktin-PCR. Im Anschluss erfolgte die Detektion des EHV-5 mittels nPCR bei allen Proben, das heißt, sowohl bei denen, die Beta-Aktin positiv getestet worden waren, als auch bei denen, die nicht mittels Beta-Aktin-PCR untersucht wurden. Auch bei dieser Methode wurden eine EHV-5-Positivkontrolle, eine DNA-Präparationskontrolle und eine PCR-Negativkontrolle mitgeführt.

Abbildung 10: Nachweis des Zellstrukturgens Beta-Aktin mittels der Beta-Aktin-PCR in PBMC von Pferden der Gruppe 1.1 (Gruppe der gesunden Pferde)



Die EHV-5 PCR-Ergebnisse auf Pferdebasis sind in der Abbildung 11 und der Abbildung 12 dargestellt. Die EHV-5 Positivkontrollen sind erwartungsgemäß ausgefallen. „Pferdebasis“ bedeutet in diesem Fall, dass der Nachweis des EHV-5 für jedes Pferd (auf Pferdebasis) und die dazugehörige Probe bzw. Probenkombination und nicht für jede Probe einzeln betrachtet wurde. Als Beispiel: Von 47 kranken Pferden wurden nur Augentupfer eingesandt, von 50 kranken Pferden die Kombination Augentupfer/PBMC. Die Augentupfer aus der Kombination sind nicht in den Augentupfern der 47 Pferde enthalten. Die Ergebnisse auf der Basis der Probeneinsendungen folgen in Tabelle 11.

Tabelle 10: Darstellung der EHV-5 Ergebnisse mittels nPCR von gesunden und kranken Pferden auf Pferdebasis

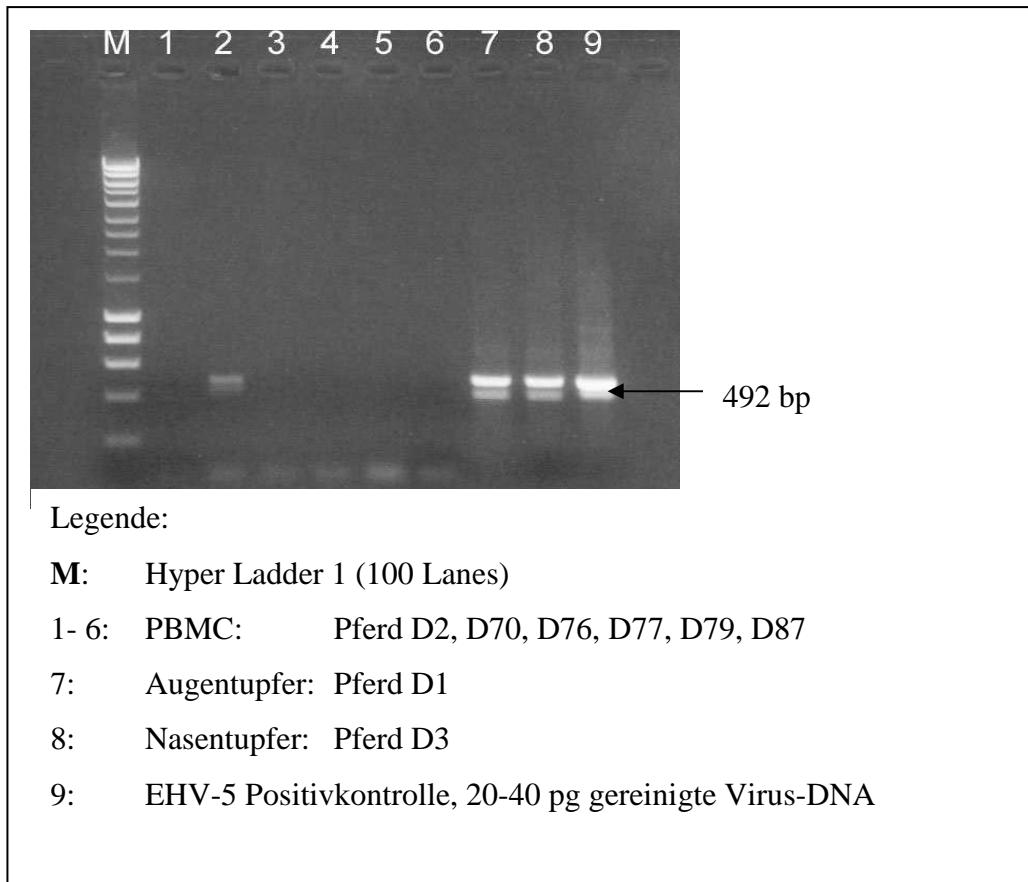
Pferde(n): Gesund/Krank	Kombinationen der Probenmaterialien:	Ergebnis: EHV-5 positiv	Ergebnis: EHV-5 negativ
47 krank	Augentupfer (AT)	6 (12,8 %) Pferde	41 (87,2 %)
22 gesamt	PBMC	6 (27,3 %) Pferde	16 (72,7 %)
18 gesund 4 krank			
1 krank	Nasentupfer (NT)	0	1 (100 %)
50 krank	Augentupfer PBMC Augentupfer/PBMC	13 (26 %)	30 (60 %)
		6 (12 %)	
		1(2%)	
		Total: 20 Pferde (40,0 %)	
3 krank	Augentupfer/Nasentupfer	2 Pferde	1 (33,3 %)
		2 (66,7 %)	
1 krank	PBMC	0	1 (100 %)
	Nasentupfer	0	
1 krank	Augentupfer	0	1 (100 %)
	PBMC	0	
	Nasentupfer	0	
125		34 Pferde (27,2 %)	91 Pferde
18 Gesund			(72,8 %)
107 Krank			

Das Equine Herpesvirus Typ 5 konnte in Deutschland nachgewiesen werden. Das Virus wurde bei 34 (27,2%) von insgesamt 125 Pferden detektiert. Dabei ließ sich EHV-5 28mal bei klinisch kranken Pferden und sechsmal bei klinisch gesunden Pferden detektieren. Von den 28 klinisch kranken Pferden, wiesen 25 ophthalmologische Symptome und drei unspezifische Symptome auf (Tabelle 18). Genauere Ergebnisse dazu folgen in Abschnitt 4.3.2.1. Der Nachweis des EHV-5 mittels nPCR gelang aus sieben verschiedenen Kombinationen von Probenmaterialien, die in Tabelle 10 aufgelistet sind. In Augentupfern

konnte EHV-5 sechsmal (12,8%), in PBMC sechsmal (27,3%) und in Nasentupfern gar nicht detektiert werden. In der Kombination von Augentupfern und PBMC, das heißt wenn beide Proben von einem Pferd eingesandt worden waren, wurde EHV-5 13mal (26%) in Augentupfern, sechsmal (12%) in PBMC und einmal (2%) in Augentupfern und PBMC gemeinsam nachgewiesen. In Augentupfern und Nasentupfern als Kombination ließ sich EHV-5 zweimal (66,6%) detektieren, dabei waren sowohl Augentupfer als auch Nasentupfer EHV-5 positiv. Von 22 EHV-5 positiven Tupferproben (22/101), konnte EHV-5 20mal in Cytobrushproben (20/90) und zweimal in Wattetupferproben (2/11) detektiert werden. Die Probenkombination PBMC und Nasentupfer kam einmal vor, jedoch wurde EHV-5 mittels nPCR nicht detektiert. Die Probeneinsendung von allen drei Proben, Augentupfer, PBMC und Nasentupfer, kam ebenfalls einmal vor und wurde ebenfalls EHV-5 negativ getestet.

Als wichtiges Fazit ist zu sagen, dass EHV-5 in Deutschland aktuell in klinisch gesunden und klinisch kranken Pferden detektiert werden konnte und dass als Probenmaterialien PBMC und Augentupfer bei gesunden Pferden und vor allem Augentupfer bei ophthalmologisch erkrankten Pferden bevorzugt zum Nachweis des Virus mittels nested PCR eingesandt werden sollten.

Abbildung 11: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR in PBMC, Augentupfer- und Nasentupferproben von Pferden aus der Gruppe 1.2 (Gruppe der kranken Pferde)



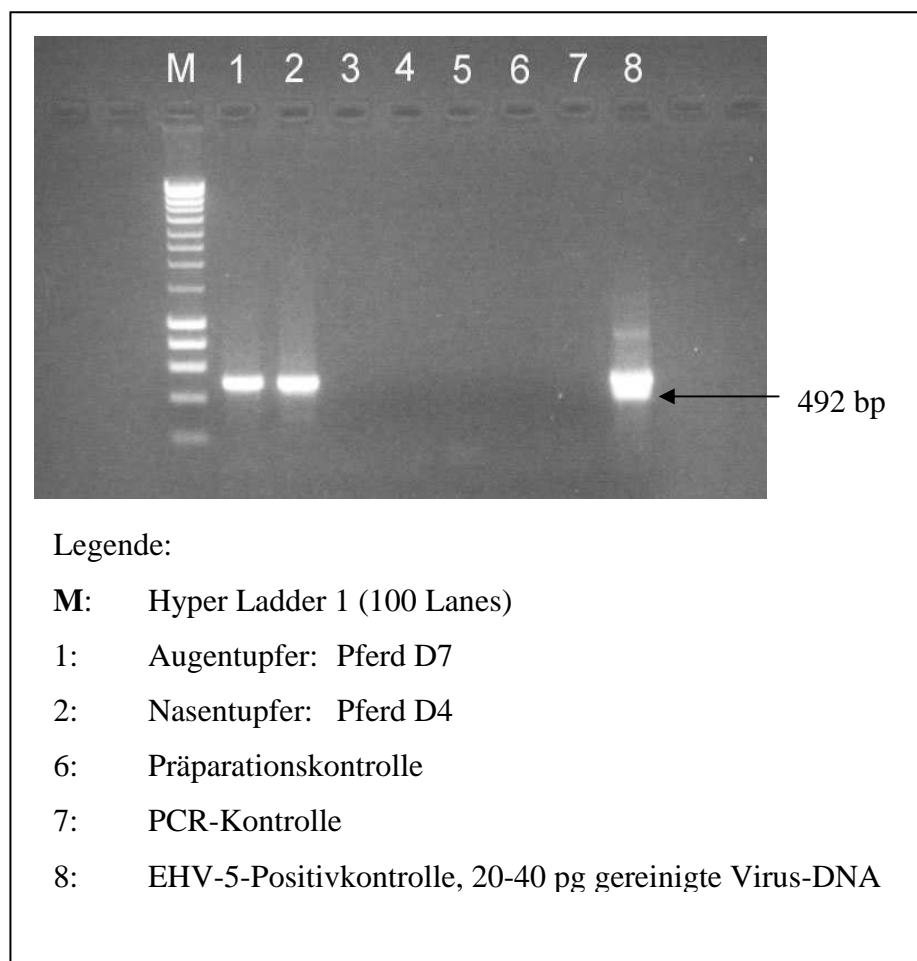
Um den Nachweis von EHV-5 in den verschiedenen Probenmaterialien deutlich zu machen, wurde eine Tabelle auf Probenbasis erstellt. In dieser Tabelle sind alle positiven EHV-5 Ergebnisse von gesunden und kranken Pferden aufgelistet und in welchen Probenmaterialien sie vorkamen.

Tabelle 11: Darstellung der EHV-5 Ergebnisse mittels nPCR von gesunden und kranken Pferden auf Probenbasis

Probenmaterial (n):	Ergebnis: EHV-5 positiv	Pferde (n): Gesund/Krank
Augentupfer	22/101(21,8%); 20 CB/90; 2 WT/11	22 krank
PBMC	13/72 (18,0%)	6 gesund, 7 krank
Nasentupfer	2/6 (33%)	2 krank
Spaltensumme	37/179(100%)	37/125 (100%)

Von 37 EHV-5 positiven Proben, wurde EHV-5 22mal (21,8%) in Augentupfern (22/101), dabei in 20 Cytobrushs (20/90) und in zwei Wattetupfer (2/11), 13mal (18,0%) in PBMC (13/72) und zweimal (33%) in Nasentupfern (2/6) detektiert. Die 37 positiven Proben dieser Tabelle erklären sich daraus, dass mehrere Proben von einem Pferd eingesandt wurden.

Abbildung 12: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR in Augentupfer- und Nasentupferproben von Pferden aus der Gruppe 1.2 (Gruppe der kranken Pferde)



4.3.1.2 Ergebnisse zum Nachweis des EHV-5 bei respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Symptomen

Um zu klären, ob EHV-5 bei respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Symptomen eine Rolle spielt, wurden in diesem Kapitel nur die Ergebnisse der kranken Pferde mit n= 107 mittels nPCR (3.2.5.1.2) ausgewertet. Die anamnestischen Daten und die Probeneinsendungen stammten, wie in Kapitel 4.2 erläutert, aus dem Institut für Virologie und wurden dieser Dissertation zu Forschungszwecken zugänglich gemacht. Die anamnestischen Daten von Pferden aus dieser Gruppe wurden in die Symptomkomplexe „respiratorisch“, „augenkrank“ und „unspezifisch“ unterteilt und die verschiedenen Proben der Pferde den entsprechenden Symptomkomplexen zugeordnet. Das Ziel sollte sein, EHV-5 in den verschiedenen Probenmaterialien zu detektieren und einen möglichen Zusammenhang zwischen der Detektion des Virus in den verschiedenen Probenmaterialien und des jeweiligen Symptomkomplexes zu erheben. Die Ergebnisse sind tabellarisch (Tabelle 12) dargestellt.

Tabelle 12: Darstellung der EHV-5 Ergebnisse mittels nPCR bei ophthalmologischen, respiratorischen und unspezifischen Symptomen von kranken Pferden

Pferde (n):	Symptomkombinationen:	Ergebnis: EHV-5 positiv	Ergebnis: EHV-5 negativ
3	respiratorisch	0	3 (100%)
82	augenkrank	20 Augentupfer (18 CB/90CB, 2WT/11WT) 6 PBMC/72 PBMC 2 NT/6 NT)	57 (69,5%)
		Total: 25 augenkrankte Pferde (30,5%)	
19	unspezifisch	2 CB/ 90 CB 1 PBMC/72 PBMC	16(84,3%)
		Total: 3 Pferde mit unspezifischen Symptomen (15,7 %)	
1	respiratorisch augenkrank unspezifisch	0	1 (100%)
1	respiratorisch unspezifisch	0	1 (100%)
1	respiratorisch augenkrank	0	1 (100%)
107		28 (26,1 %)	79 (73,9 %)

Von insgesamt 107 Pferden, die beprobt wurden, wurden bei drei Pferden respiratorische Symptome diagnostiziert. Bei diesen drei Pferden ließ sich EHV-5 weder in PBMC, noch in Augentupferproben, noch in Nasentupferproben nachweisen. Das Merkmal „augenkrank“ konnte bei 82 (76,6%) von insgesamt 107 Pferden diagnostiziert werden. Bei 25 (30,5%) von diesen augenkranken Probanden konnte EHV-5 diagnostiziert werden. EHV-5 wurden bei den 25 augenkranken Patienten 18mal in Cytobrushproben (18/90), zweimal in Wattetupferproben (2/11), 6mal in PBMC (6/72) und zweimal in Nasentupfern (2/6) detektiert. Bei 19 Pferden (17,6%) von insgesamt 107 Probanden konnten unspezifische Symptome wie Allergien und Reitprobleme nachgewiesen werden. Drei (15,7%) von diesen 19 Pferden waren mittels nPCR EHV-5 positiv getestet worden. Von diesen drei positiv

gestesteten Pferden, wurde EHV-5 zweimal in Augentupfern und einmal in der Kombination PBMC und Augentupfer, dabei in PBMC detektiert. Die Kombination von den Symptomen „respiratorisch, augenkrank und unspezifisch“ sowie „respiratorisch, unspezifisch“ und „respiratorisch, augenkrank“ kam jeweils dreimal vor. Jedoch konnte bei diesen Kombinationen von Symptomen EHV-5 nicht detektiert werden.

Bei klinisch kranken Pferden wurde EHV-5 im Zusammenhang mit ophthalmologischen Symptomen detektiert. Dabei ließ es sich vorrangig in Cytobrushprobenträgern nachweisen.

Zum Abschluss des ersten Ergebnisteils sollte nun näher auf den Einfluss von dem Impfstoff Resequin NN Plus[®] und dem Immunmodulator Zylexis[®] auf die Präsenz des EHV-5 und auf Doppelinfectionen im Zusammenhang mit dem Equine Herpes Virus Typ 5, eingegangen werden.

4.3.1.3 Untersuchungen zur Nachweishäufigkeit von EHV-5 in PBMC unter dem Einfluss von Resequin NN Plus[®] und Zylexis[®]

Die Hypothese zu diesen Untersuchungen lautete: EHV-5 kann durch die Immunisierung aus PBMC reaktiviert werden. Für diese Untersuchungen wurde nun erneut die Gruppe der gesunden Pferde mit n=18 untersucht, allerdings unter dem Aspekt der Impfstoff- und Immunmodulatorbehandlung (Tabelle 13). Die Gruppe der gesunden Pferde wurde schon einmal in Kapitel 4.3.1.1 unter dem Aspekt der Verbreitung von EHV-5 in Deutschland untersucht. Es wurden Blutproben von 18 Pferden genommen, wie unter 3.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet und mittels nPCR (3.2.5.1.2) auf EHV-5 untersucht. Anamnestische Daten dieser Pferde sind in Tabelle 16 wieder zu finden. Zur Auswertung wurde als statistische Methode der McNemar-Test (Tabelle 13) angewandt und BiAS. als Programm für Windows benutzt. Aufgrund von logistischen Problemen, dass heißt, zuwenig Probanden und somit zuwenig Probenmaterial, konnte keine Kontrollgruppe zusammengestellt werden. Vor der Resequin NN Plus[®]/Zylexis[®]-Applikation waren alle Pferde weder mit dem Impfstoff Resequin NN Plus[®] noch mit dem Immunmodulator Zylexis[®] behandelt worden. Zu dem Zeitpunkt der zweiten Beprobung, vier Wochen nach der ersten Blutabnahme, waren die Tiere dreimal mit Zylexis[®] und einmal mit Resequin NN Plus[®] behandelt worden. Die Ergebnisse des McNemar-Test sollen wie folgt erklärt werden: Vor der Resequin NN Plus[®]/Zylexis[®]-Applikation waren sechs Pferde EHV-5 positiv und 12 Pferde EHV-5 negativ in PBMC getestet worden. Nach der Applikation von Resequin NN Plus[®] und Zylexis[®] war

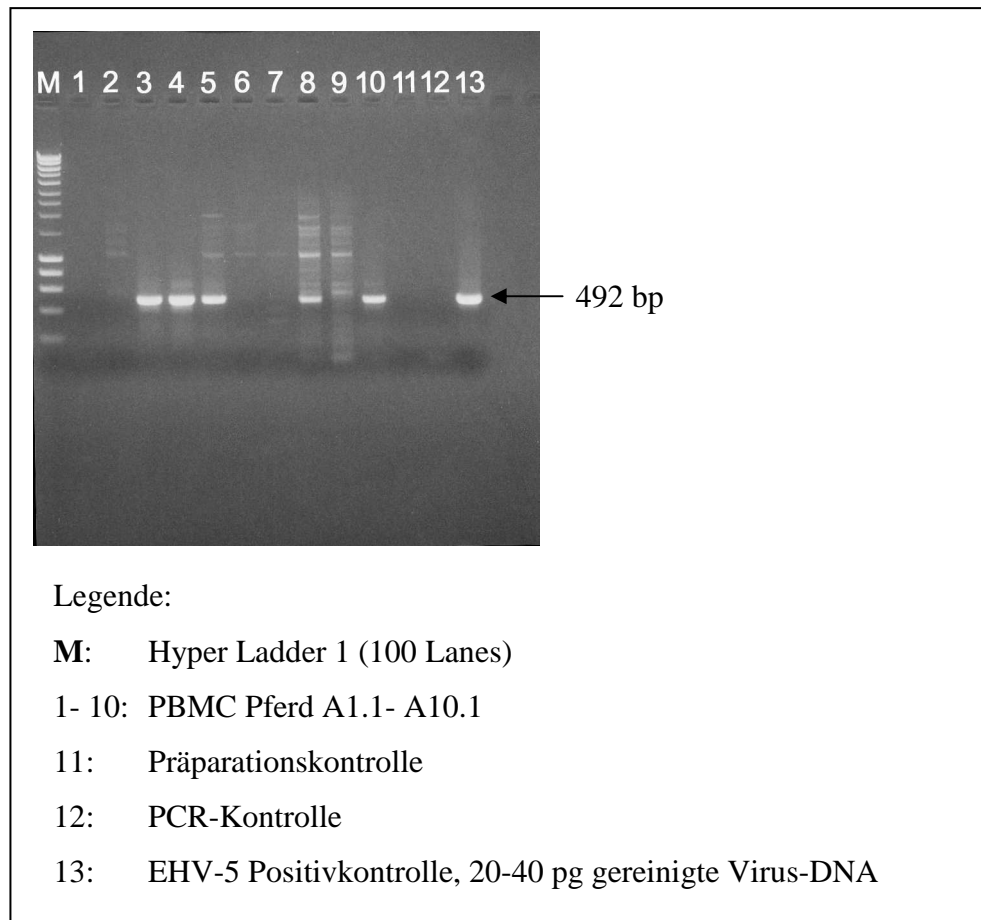
ein Pferd EHV-5 positiv und 17 Pferde EHV-5 negativ in PBMC mittels nPCR getestet worden.

Tabelle 13: Die Darstellung des Resequin NN Plus®-und Zylexis®-Einflusses auf die Reaktivierung von EHV-5 mittels McNemar-Test

		Nach Zylexis® - Applikation		
		<i>EHV-5- positiv</i>	<i>EHV-5- negativ</i>	Zeilensumme
Vor Zylexis® - Applikation	<i>EHV-5- positiv</i>	0 (0%)	6 (33,3 %)	6 (33,3%)
	<i>EHV-5- negativ</i>	1 (5,6 %)	11 (61,1 %)	12 (65,7%)
Spaltensumme		1 (5,6%)	17 (94,4%)	18 (100%)

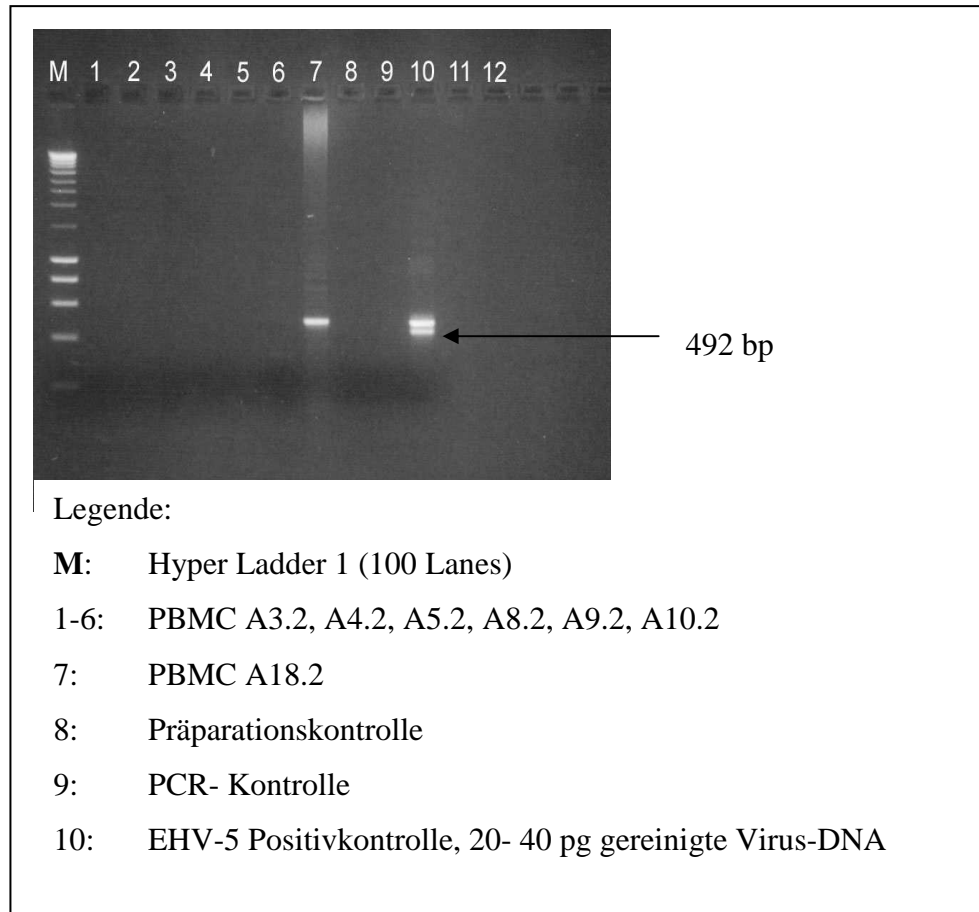
Im folgenden Text werden die Ergebnisse der Tabelle 13 näher erläutert. Keines der 18 Pferde war vor und nach Resequin NN Plus®/Zylexis®-Applikation positiv (0%). Ein Pferd (5,6%) war vor der Resequin NN Plus®/Zylexis®-Applikation negativ und nach der Applikation positiv. Sechs (33,3%) der untersuchten Pferde waren vor der Resequin NN Plus®/Zylexis®-Applikation positiv und nach dieser negativ und elf Pferde waren vor und nach der Resequin NN Plus®/Zylexis®-Applikation negativ (61,1%). Nach Auswertung durch den McNemar-Test kann kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der EHV-5-Reaktivierung durch die Resequin NN Plus®/Zylexis®-Applikation formuliert werden ($p > 0,05$). Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass vor der Resequin NN Plus®/Zylexis®-Applikation sechs Pferde positiv auf EHV-5 getestet wurden. Nach der Applikation von Resequin NN Plus® und Zylexis® wurde EHV-5 nur noch einmal via nPCR detektiert und das zudem bei einem Pferd, welches vorher nicht EHV-5 positiv getestet worden war. Die Ergebnisse der nPCR sind in der Abbildung 13 und der Abbildung 14 wieder zu finden. Die EHV-5 Positivkontrollen sind erwartungsgemäß ausgefallen.

Abbildung 13: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR an PBMC der Gruppe 1.1 (Gruppe der gesunden Pferde) vor der Applikation von Resequin NN Plus® und Zylexis® (A1.1.-A18.1)



Die PBMC-Proben Nr. 2,6,7 der Pferde A2.1, A6.1 und A7.1 wiesen unspezifische DNA-Banden auf, welche nicht der Fragmentgröße von EHV-5 entsprachen.

Abbildung 14: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR an PBMC der Gruppe 1.1 (Gruppe der gesunden Pferde) nach der Applikation von Resequin NN Plus® und Zylexis® (A1.2-A18.2)



Die PBMC-Probe des Pferdes A18.2 ist mittels nPCR als EHV-5 positiv detektiert worden. Die Doppelbande der EHV-5 Positivkontrolle entstand durch den Einsatz einer zu hohen DNA-Konzentration.

Eine postulierte Reaktivierung des Virus durch den Impfstoff Resequin NN Plus® und den Immunmodulator Zylexis® konnte nicht nachgewiesen werden.

4.3.1.4 Ergebnisse zum Einfluss von Doppelinfektionen mit dem EHV-1,-2- und -4 auf das EHV-5

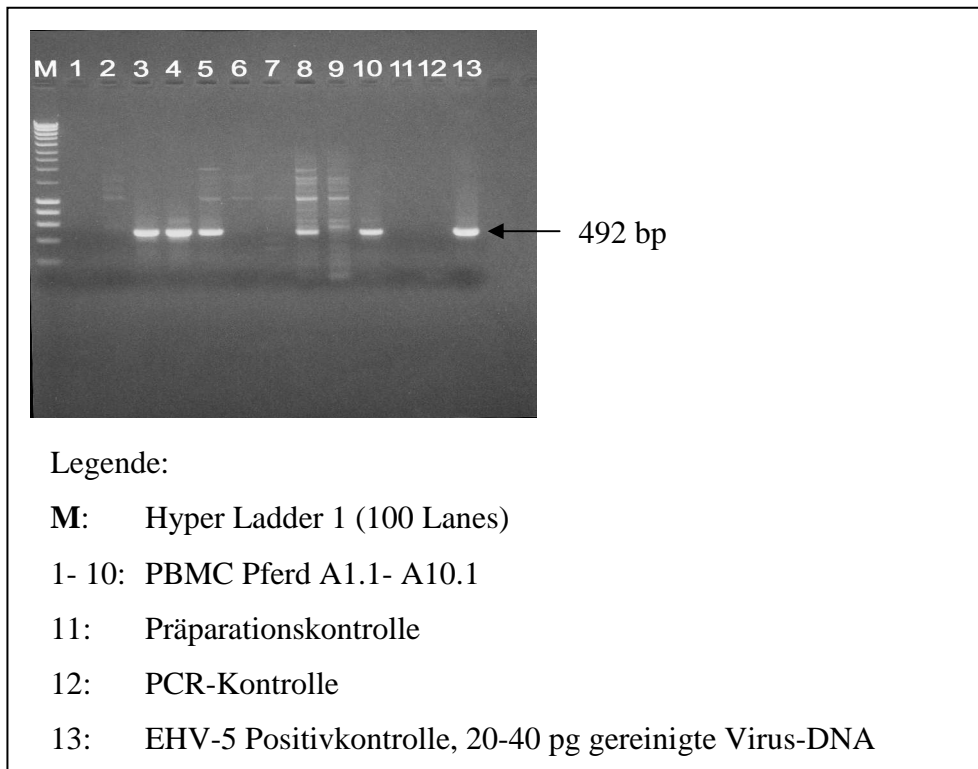
Um die Frage zu beantworten, ob Doppelinfektionen von EHV-5 mit dem EHV-1,-2- und -4 vorkommen, wurden die Gruppen der gesunden und der kranken Pferde mit Gesamt-n= 125 miteinbezogen (Tabelle 14). Die PBMC- und Augentupferproben wurden wie unter 3.2.2.3 und unter 3.2.3 beschrieben, präpariert. Der Nachweis von EHV-2 und EHV-5 erfolgte mittels nPCR (3.2.5.1.2) und so war es möglich, die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Der Nachweis von EHV-1 und EHV-4 erfolgte nur indirekt, nämlich serologisch mittels Nt und IFT.

Tabelle 14: Ergebnisdarstellung zu Doppelinfektionen des EHV-2 und des EHV-5 mittels nPCR in PBMC und Augentupferproben

Pferde (n):	Ergebnisse: gemeinsame Detektion von EHV-2 und- EHV-5
Pferde positiv	5 (4 %)
Pferde negativ	120 (96 %)
Spaltensumme	125 (100 %)

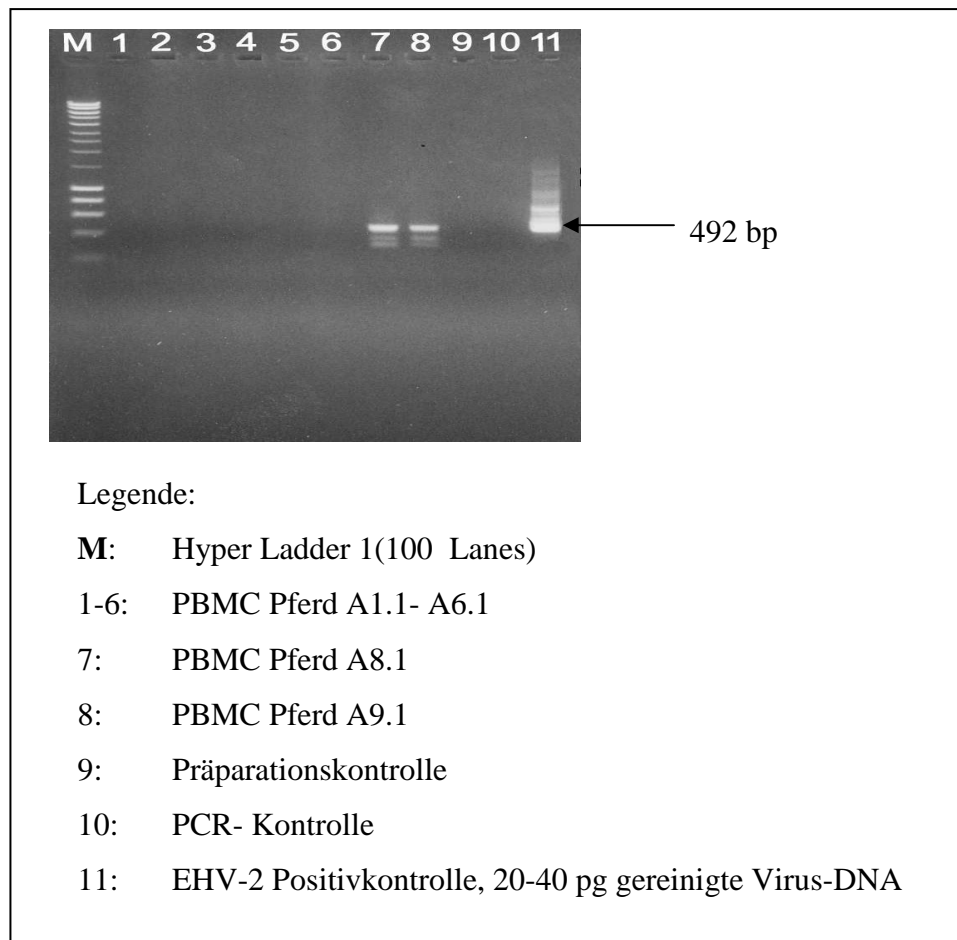
Von insgesamt 125 Probanden wurden alle mittels nPCR auf EHV-2 und -5 untersucht. Davon waren fünf Pferde gleichzeitig EHV-2 und -5 positiv getestet worden. EHV-2 und EHV-5 wurden dabei zweimal in PBMC von gesunden Pferden (Tabelle 18) und dreimal in Augentupfern von Pferden mit ophthalmologischen Symptomen (Tabelle 19) detektiert. Die Abbildung 15 und die Abbildung 16 spiegeln die Ergebnisauszüge der EHV-2 und EHV-5 Doppelinfektionen der Gruppe 1.1 (Gruppe der gesunden Pferde) wieder. Von insgesamt 107 Pferden wurden 64 Probanden einmalig auf EHV-1 und -4- Infektionen indirekt mittels IFT (3.2.1.2) und Nt (3.2.1.1) untersucht (Tabelle 17). Fünf Pferde von 64 zeigten sowohl im IFT (> 1:2560) also auch im Nt (> 1:10) einen erhöhten Antikörpertiter für EHV-1 und EHV-4. Da die Blutproben von diesen 64 Pferden einmalig eingesandt wurden, war es nicht möglich Serumpaare zu bilden und somit Vergleiche der Antikörpertiter zu erheben. Folglich konnten keine Zusammenhänge zwischen den erhöhten Antikörpertitern und Erkrankungen laut Anamnese formuliert werden. In der Anamnese gab es keine Hinweise auf EHV-1/4-Infektionen.

Abbildung 15: Nachweis der EHV-5-DNA mittels nPCR in PBMC von gesunden Pferden (Gruppe 1.1.)



In den PBMC-Proben der Pferde A3.1, A4.1, A5.1, A8.1, A9.1 und A10.1 konnte EHV-5 mittels nPCR detektiert werden. Die PBMC-Proben der Pferde A8.1 und A9.1 sind mit EHV-5 (Abbildung 15) und EHV-2 (Abbildung 16) doppelt infiziert. Die Probennummern 2, 6 und 7 der PBMC stellen unspezifische DNA-Banden dar, welche nicht mit der Fragmentgröße von EHV-5 identisch sind.

Abbildung 16: Nachweis der EHV-2-DNA mittels nPCR in PBMC von gesunden Pferden (Gruppe 1.1.)



Die PBMC-Proben der Pferde A8.1 und A9.1 konnten mittels nPCR sowohl EHV-5 positiv (Abbildung 15) als auch EHV-2 positiv (Abbildung 16) detektiert werden.

Doppelinfectionen mit EHV-2 und EHV-5 kommen sowohl in gesunden, als auch in ophthalmologisch erkrankten Pferden in PBMC und Augentupfern vor. Als Probenmaterialien spielen dabei PBMC und Augentupfer in gesunden Pferden aufgrund der möglichen Latenz und Augentupferproben in ophthalmologisch kranken Pferden eine wichtige Rolle. Eine Korrelation zwischen den nPCR-Ergebnissen von PBMC und Augentupferproben bestand nicht, da die EHV-2- und EHV-5 positiven PBMC-Proben von gesunden Pferden und die EHV-2 und EHV-5 positiven Augentupferproben von kranken Pferden stammten.

Man kann zusammenfassend sagen, dass EHV-5 in Deutschland mit einer Häufigkeit von 27,2% (34/125) aktuell auftrat. Dabei wurde EHV-5 28mal bei klinisch kranken Pferden und sechsmal bei klinisch gesunden Pferden in PBMC detektiert. Von den 28 klinisch kranken Pferden zeigten 25 ophthalmologische und drei unspezifische Symptome. Im Zusammenhang mit ophthalmologischen Symptomen wurde EHV-5 18mal in Cytobrushproben (18/90), zweimal in Wattetupferproben (2/11), sechsmal in PBMC (6/72) und zweimal in Nasentupfern (2/6) detektiert. Im Zusammenhang mit unspezifischen Symptomen konnte EHV-5 zweimal in Cytobrushs (2/90) und einmal in PBMC(1/72) detektiert werden.

Weiterhin sollte erörtert werden, ob die Impfung mit Resequin NN Plus[®] und die Behandlung mit dem Immunmodulator Zylexis[®] einen Einfluss auf die Präsenz des EHV-5 haben. Hierzu wurden 18 Pferde vor und nach der Behandlung mit dem Impfstoff Resequin NN Plus[®] und dem Immunmodulator Zylexis[®] beprobt. Vor der Applikation waren sechs (33,3%) von 18 Pferden EHV-5 positiv getestet worden. Nach der Verabreichung des Impfstoffs und des Immunmodulators, vier Wochen nach der ersten Probenentnahme, war nur noch ein Pferd (5,6%) von diesen 18 EHV-5 positiv. Hierbei muss erwähnt werden, dass dieses Pferd bei der ersten Probenentnahme EHV-5 negativ war. Somit konnte ein Einfluss des Impfstoffs und des Immunmodulators auf die Präsenz des Virus deutlich gemacht, eine postulierte Reaktivierung des Virus jedoch nicht festgestellt werden.

Das EHV-2 Genom konnte bei 7 klinisch kranken (5,6%), davon bei 5 augenkranken Pferden, in 7 Augentupfern und bei zwei klinisch gesunden Pferden in zwei PBMC detektiert werden (Tabelle 17).

Doppelinfektionen von EHV-2 mit dem EHV-5 konnten bei 5 (4%) von 125 Pferden insgesamt detektiert werden, dabei waren drei Pferde an ophthalmologischen Symptomen erkrankt und zwei Pferde klinisch gesund. EHV-2 und EHV-5 wurden bei den zwei gesunden Pferden in PBMC und bei den drei kranken Pferden in Augentupfern (CB) detektiert. Ergebnisse zu Doppelinfektionen der EHV-1- und -4 mit dem EHV-5 konnten nicht formuliert werden.

4.3.2 Ergebnisteil B: Ergebnisse zum Gewebe- und Zelltropismus von EHV-5 in Augen und in PBMC

Wie in der Einleitung erläutert, konnte EHV-5 in verschiedenen Studien in Augentupfer- und PBMC-Proben mittels PCR-Assays sowohl in augengesunden als auch in augenkranken Pferden nachgewiesen werden (Besthorn 2002), (Borchers, Ebert et al. 2006). In einer aktuellen Studie widmete man sich der Prävalenz von EHV-2 in Augentupfern und dem Zelltropismus in equinen Konjunktivengewebe (Borchers, Ebert et al. 2006). Mittels nPCR wurden 22 Augentupfer von augengesunden Pferden und 4 Augentupfer von 48 augenkranken Pferden EHV-2 positiv getestet. Um mehr über den Zelltropismus von EHV-2 zu erfahren, wurde Konjunktivengewebe von drei augengesunden Pferden, welche vorher per nPCR EHV-2 positiv getestet wurden, per *in-situ*-Hybridisierung auf EHV-2 untersucht. Mittels immunhistochemischer Färbung mit einem EHV-2 spezifischen polyklonalen Antikörper detektierte man Langerhanszellen in derselben Region der Konjunktiva palpebralis, wo auch eine positive Hybridisierung auf die EHV-2-DNA-Sonde dargestellt wurde (Borchers, Ebert et al. 2006). Aus diesen Studien heraus und dem Wissen, dass EHV-2 und EHV-5 phänotypisch und genetisch miteinander verwandt sind, entstand das Ziel, mehr über den Gewebe- und Zelltropismus von EHV-5 zu erfahren und das Virus mittels *in-situ*-Hybridisierung in Konjunktivengewebe und PBMC nachzuweisen. Die Methode ist in 3.2.6.6 nachzulesen.

4.3.2.1 Ergebnisse zur Detektion von EHV-5 in Konjunktiven und PBMC mittels *in-situ*-Hybridisierung

Durch den Einsatz einer EHV-5-spezifischen Digoxigenin-markierten-Sonde (Gesamt-DNA 0,5ng/µl) sollte versucht werden, die für EHV-1/-2/-4 etablierte Methode der *in-situ*-Hybridisierung (Smith und Borchers 2001), (Borchers, Ebert et al. 2006) für den direkten Nachweis von EHV-5 in Konjunktivengewebe und PBMC anzuwenden. Hierfür wurden Gruppe F und P der Untersuchungsgruppen herangezogen. Gruppe F beinhaltet zehn Paraffinschnitte des Konjunktivalgewebes, welche im Rahmen der Dissertationen von A. Fetsch (Fetsch 2007), U. Wolfinger (Wolfinger 1998) und M. Ebert (Ebert 2006) in der Arbeitsgruppe Equine Herpesviren des Instituts für Virologie unter der Leitung von PD Dr. K. Borchers, in Kooperation mit dem Institut für Tierpathologie an der Freien Universität Berlin, angefertigt wurden, und hier erneut zum Einsatz kamen. Hierbei wurden die Paraffinschnitte ausgewählt, welche im Vorfeld aus frischen Augengeweben per nPCR EHV-

2 und EHV-5 positiv bzw. negativ getestet wurden, um Vergleichskontrollen für positive und negative Proben zu schaffen (Tabelle 21). Die Gruppe P beinhaltet Blutproben von fünf Pferden, die aus verschiedenen Tierkliniken zur Diagnostik in das Institut für Virologie eingesandt wurden. Diese Blutproben stammten von Pferden, welche im Vorfeld laut Anamnese an ophthalmologischen Symptomen erkrankt waren. Aus diesen Blutproben wurden PBMC isoliert (3.2.2.1) und wie unter (3.2.6.2) beschrieben auf für die *in-situ*-Hybridisierung speziell behandelte Objektträger zytozentrifugiert. Im Anschluss wurden die Konjunktivalgewebeproben und die Stichproben der PBMC einer Beta-Aktin-PCR unterzogen, da die *in-situ*-Hybridisierung nur bei ausreichender DNA-Qualität erfolgreich durchgeführt werden kann. Dazu wurde das Konjunktivengewebe der Paraffinschnitte wie unter 3.2.4.2 beschrieben und die PBMC, wie unter 3.2.2.3 beschrieben, präpariert und dann mittels PCR auf das Zellstrukturen Beta-Aktin getestet. In allen Konjunktiven und in allen Stichproben der PBMC konnte dieses Gen detektiert werden. Die Ergebnisse aller positiven Stichproben sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Konjunktivengewebeproben und die PBMC wurden schließlich mittels nPCR auf EHV-5 untersucht, um EHV-5 schon im Vorfeld zu detektieren. Dies gelang jedoch in keinem von 15 Fällen. In einer EHV-4-Studie wurden *in-situ*-Hybridisierungen bei gleichzeitig negativer, virusspezifischer nPCR beschrieben (Gerst, Borchers et al. 2003). Daher wurden in dieser Arbeit auch alle 15 Proben mittels EHV-5-*in-situ*-Hybridisierung untersucht, bei denen die EHV-5-nPCR im Vorfeld negativ war. Die Ergebnisse der Beta-Aktin-PCR, der EHV2- und EHV-5-nPCR und der *in-situ*-Hybridisierung in Konjunktiven und PBMC sind in Tabelle 15 dargestellt. Anamnestische Daten zu diesen Proben sind detailliert in (Tabelle 20, Tabelle 21, Tabelle 22) erläutert.

Tabelle 15: Ergebnissdarstellung zum Nachweis des Beta-Aktin-Gens mittels Beta-Aktin-PCR, der EHV-5-DNA mittels nPCR und der EHV-5-DNA mittels *in-situ*-Hybridisierung in Konjunktiven und PBMC

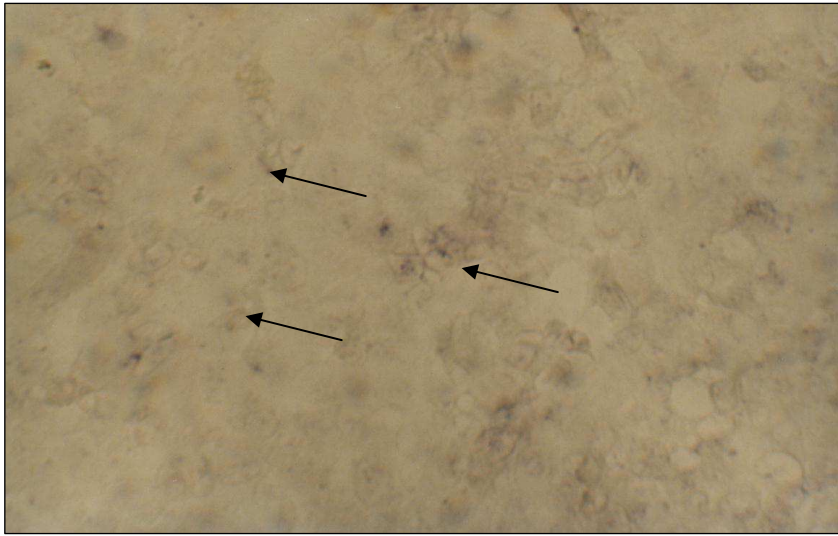
Nr.	Interne Nr.	Gewebe	Beta-Aktin- PCR- Ergebnis mittels Beta-Aktin- PCR	EHV-5- Ergebnis mittels <i>in-situ</i> -Hybridisierung	EHV-5-Ergebnis mittels nPCR
1.	SH 7 7 links	Konjunktiva links	+	+	-
2.	SH 7 7 rechts	Konjunktiva rechts	+	+	-
3.	SH 9 9 rechts	Konjunktiva rechts	+	-	-
4.	SH 10 10 links	Konjunktiva rechts	+	-	-
5.	SH 10 10 rechts	Konjunktiva links	+	-	-
6.	P19 links	Konjunktiva links	+	-	-
7.	P19 rechts	Konjunktiva rechts	+	-	-
8.	P20 links	Konjunktiva links	+	-	-

Fortsetzung Tabelle 15

9.	P20 rechts	Konjunktiva rechts	+	-	-
10.	P 3	Konjunktiva	+	-	-
11.	P1 V07-7- 10	PBMC	+	+	-
12.	P2 V07-7- 6	PBMC	+	-	-
13.	P3 V07-8- 3	PBMC	+	-	-
14.	P4 V07-8- 4	PBMC	+	-	-
15.	P5 V07-8- 21	PBMC	+	+	-

Die eigentliche *in-situ*-Hybridisierung wurde wie in Kapitel 3.2.6.6 beschrieben durchgeführt. Als Sonde diente eine Digoxigenin- d-UTP-markierte EHV-5-Gesamtsonde (EHV-5-Stamm:p48, Gesamt-DNA:0,5ng/μl), (3.2.6.4). Die Resultate der *in-situ*-Hybridisierung werden im Folgenden in Form von mikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Als Positivkontrolle (Abbildung 17) dienten EHV-5 infizierte ED- Zellen, welche bei jeder *in-situ*-Hybridisierung mitgeführt wurden. Als Negativkontrolle (Abbildung 18) wurden nichtinfizierte ED- Zellen bei jeder *in-situ*-Hybridisierung mitgeführt.

Abbildung 17: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Infizierte ED-Zellen dienten als Positivkontrolle.

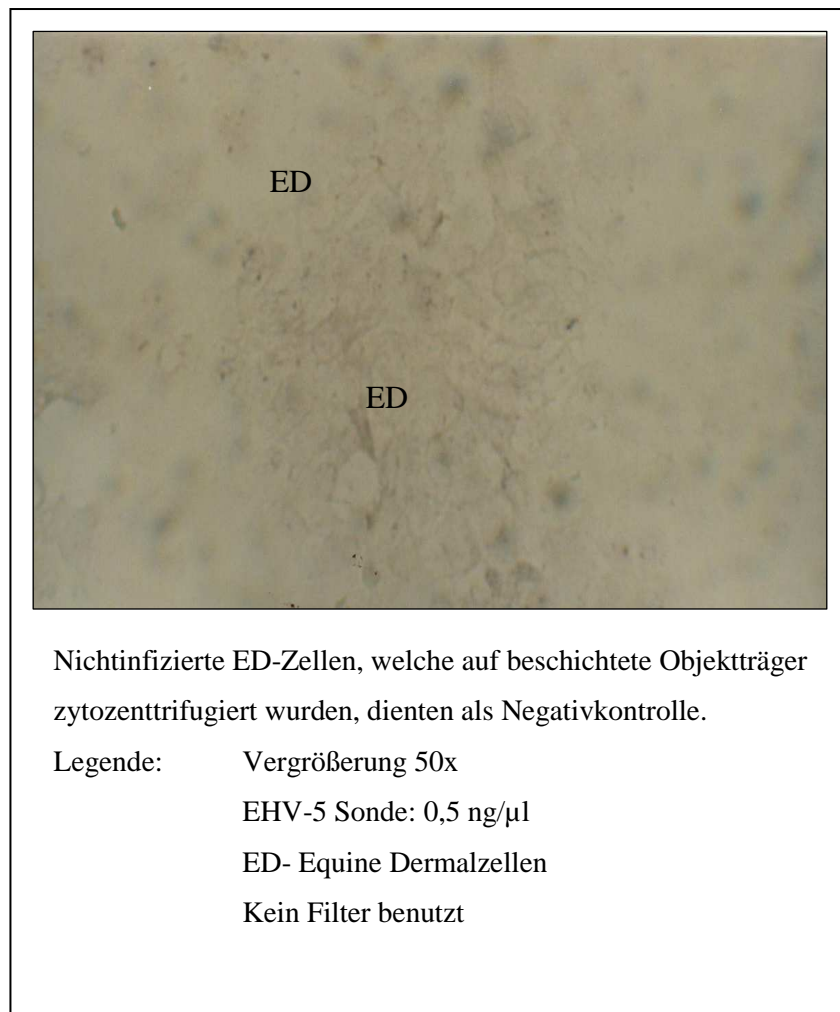


Die Pfeile markieren Hybridisierungsprodukte in EHV-5 infizierten ED-Zellen auf die EHV-5-Sonde.

Infizierte ED-Zellen, welche auf beschichtete Objektträger zytozentrifugiert wurden, dienten als Positivkontrolle.

Legende: Vergrößerung 50x
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/μl
 Kein Filter benutzt

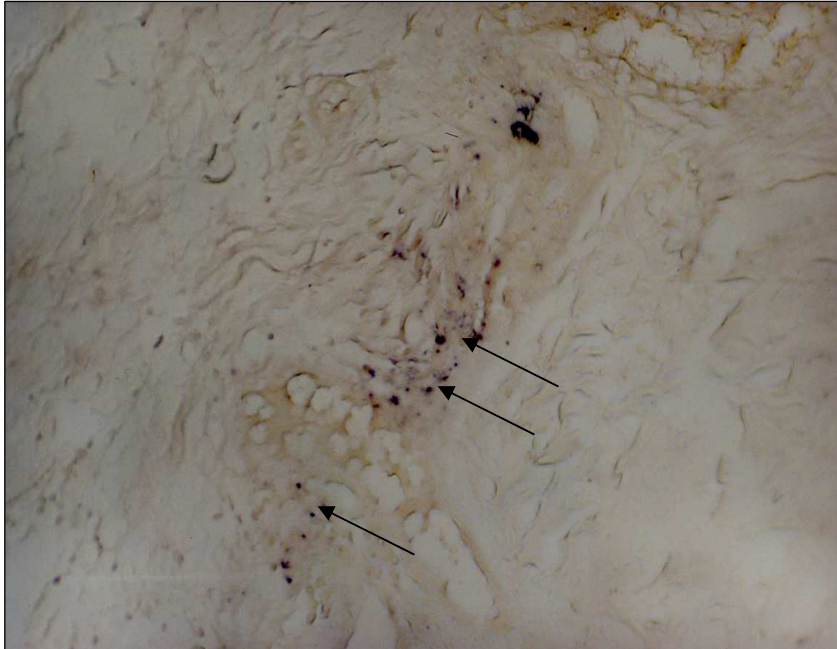
Abbildung 18: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Nichtinfizierte ED-Zellen dienten als Negativkontrolle.



In den Konjunktiven des linken (Abbildung 19, Abbildung 20) und rechten Auges (Abbildung 24), (SH 7) konnten Hybridisierungsprodukte in Form von lila gefärbten Zellen auf die EHV-5-Sonde dargestellt werden. Auf diesen Bildern ist ein gut angefärbter, deutlich sichtbarer Zellgewebsverband erkennbar, bei dem es sich um die lockere Bindegewebsschicht, Lamina propria der Konjunktiva palpebralis, handelt. Um welchen Zelltyp es sich genau handelt, kann ohne die Durchführung von Spezialmethoden (z.B. Immunhistochemie) nicht gesagt werden. Die Konjunktivalgewebe beider Augen waren im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet worden (Tabelle 20). In der Arbeitsgruppe Equine Herpesviren unter der Leitung von PD Dr. K. Borchers waren diese Gewebe mittels nPCR EHV-2 und EHV-5 positiv getestet worden und wurden deshalb auch für diese Dissertation ausgewählt (Tabelle 20). In den Paraffinschnitten Nr. 3-10 der Konjunktivalgewebe konnten keine Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde per *in-situ*-Hybridisierung detektiert werden

(Abbildung 21, Abbildung 22). Um Kreuzreaktionen der EHV-5-Sonde mit dem EHV-2-Genom abzuklären, welche aufgrund der genetischen Verwandtschaft beider Viren nicht auszuschließen wären, müsste man *in-situ*-Hybridisierungen mit einer EHV-2-Sonde und eine virusspezifische PCR durchführen. In den PBMC konnten in P1 (V07-7-10) und in P5 (V07-8-21) Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde per *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden (Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 28). In diesen Abbildungen sieht man einen deutlich angefärbten Zellverband, wobei man nicht sagen kann, um welche Art von Leukozyten es sich handelt. Um Genaueres zu erfahren, müsste man Spezialmethoden, wie z.B. immunhistochemische Untersuchungen, durchführen. Die PBMC-Proben P2, P3 und P4 zeigten keine Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde (Abbildung 27). In den PBMC P1 bis P5 konnte EHV-5 per nPCR nicht nachgewiesen werden.

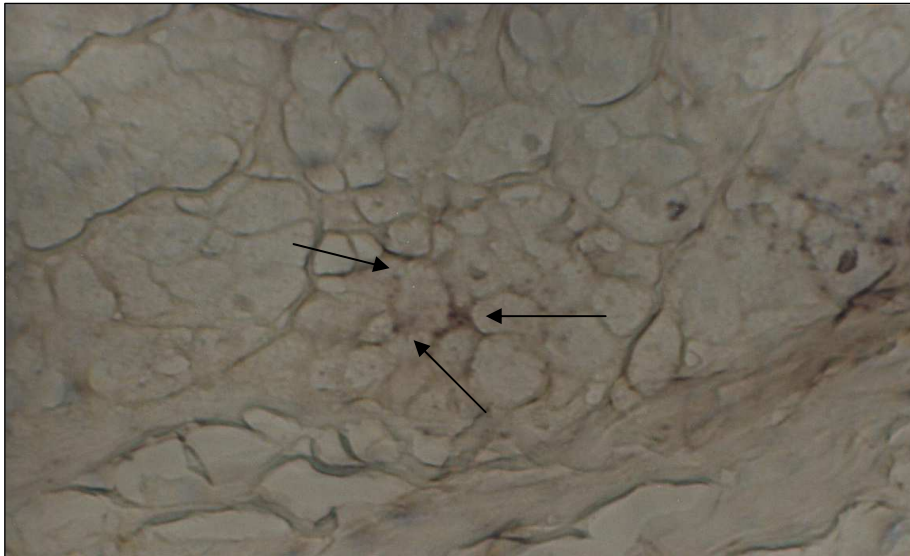
Abbildung 19: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des linken Auges von Pferd SH 7, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.



Die Pfeile markieren Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde in Konjunktivalgewebe.

Legende: Vergrößerung 50x
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/ μ l
 Kein Filter benutzt.

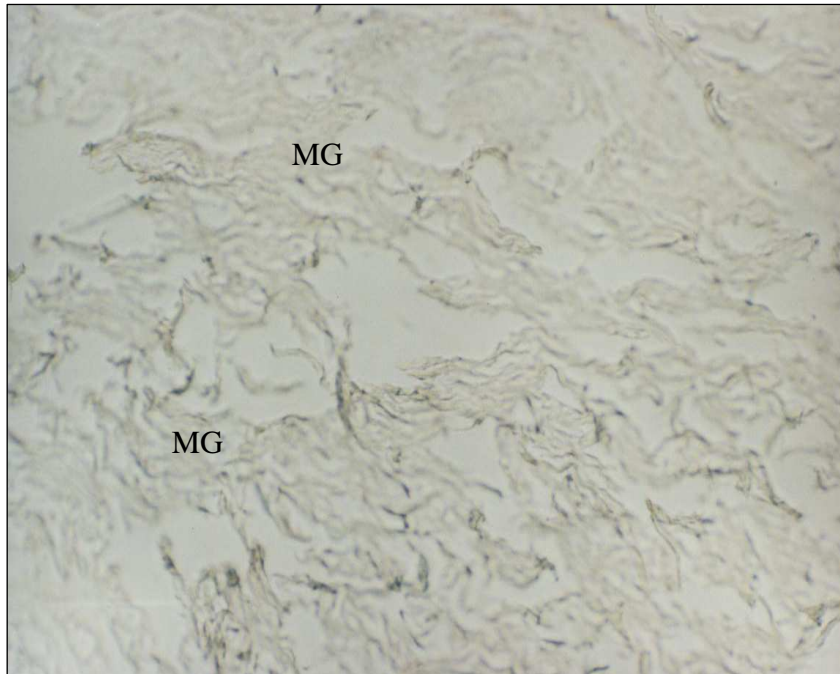
Abbildung 20: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des linken Auges von Pferd SH 7, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.



Die Pfeile markieren Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde in Konjunktivalgewebe.

Legende: Vergrößerung 100x,
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/μl
 Kein Filter benutzt.

Abbildung 21: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des linken Auges von Pferd SH 8, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.



In dieser Abbildung ist Konjunktivalgewebe dargestellt, in dem sich kein Hybridisierungssignal auf die EHV-5-Sonde zeigte.

Legende: MG- Muskelgewebe
 Vergrößerung 50x
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/ μ l
 Es wurde ein Blaufilter benutzt.

Abbildung 22: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis eines Ponys, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.



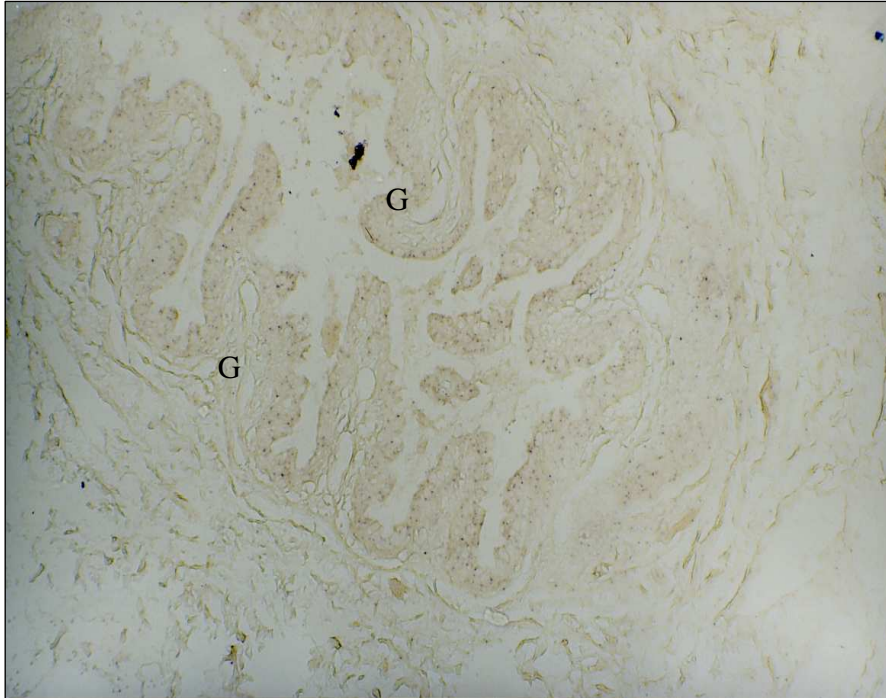
In dieser Abbildung sind keine Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde darzustellen.

Legende: G- Gefäß
 BG- Bindegewebe
 MG- Muskelgewebe
 Vergrößerung 50x,
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/μl
 Es wurde ein Blaufilter benutzt.

4.3.2.2 Ergebnisse zum Nachweis von EHV-5 in Zellen des Konjunktivengewebes und in PBMC per *in-situ*-Hybridisierung

In den Paraffinschnitten der Konjunktivalproben von Pferd SH 7 war auffällig, dass sich Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde paravenös, in der Lamina propria der Konjunktiva palpebralis darstellten. Um welche Zellen es sich dabei handeln könnte, wird in Kapitel (5.2) näher erläutert. Die Blutproben von Pferd P1 (V07-7-10), (Abbildung 25, Abbildung 26) und Pferd P5 (V07-8-21), stellten periphere Blutleukozyten (PBMC) dar, in denen Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde mittels *in-situ*-Hybridisierung detektiert werden konnten. In den PBMC von Pferd P5 zeigten sich zusätzlich Granula ähnliche Gebilde, die möglicherweise Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde darstellten (Abbildung 28). Kreuzreaktionen der EHV-5-Sonde mit dem EHV-2-Genom aufgrund der genetischen Verwandtschaft beider Viren, unspezifische Reaktionen und/oder Artefakte konnten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zur weiteren Aufklärung müsste man *in-situ*-Hybridisierungen mit einer EHV-2-Sonde und virusspezifische PCR durchführen.

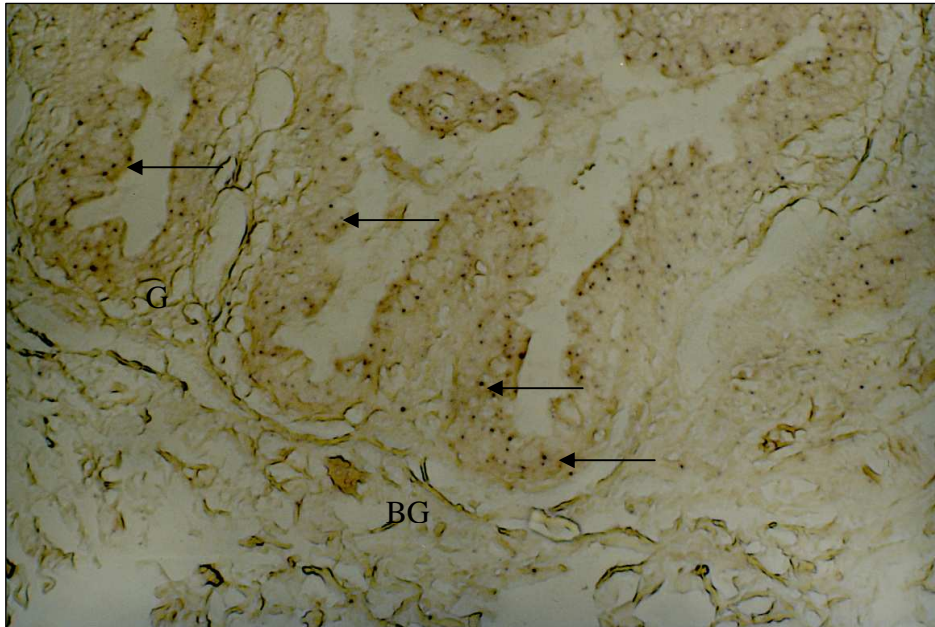
Abbildung 23: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des rechten Auges von Pferd SH 7, welche im Vorfeld mittels nPCR negativ getestet wurde.



Übersichtsaufnahme von einem EHV-5 infiziertem
Konjunktivalgewebe von Pferd SH 7.

Legende: G- Gefäße (Venen)
 Vergrößerung 25x
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/ μ l
 Kein Filter benutzt.

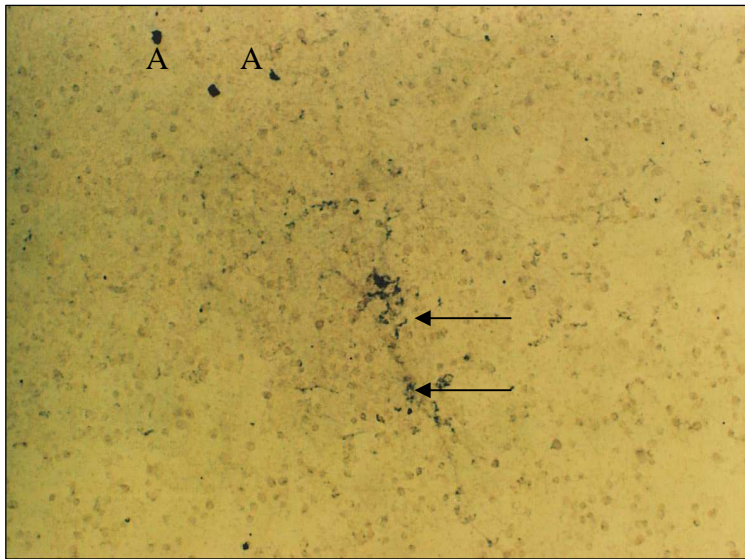
Abbildung 24: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der Konjunktiva palpebralis des rechten Auges von Pferd SH 7, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurde.



Durch die Pfeile werden Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde in Konjunktivalgewebe dargestellt.

Legende: BG- Bindegewebe
 G- Gefäße (Venen)
 Vergrößerung 50x,
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/μl
 Kein Filter benutzt.

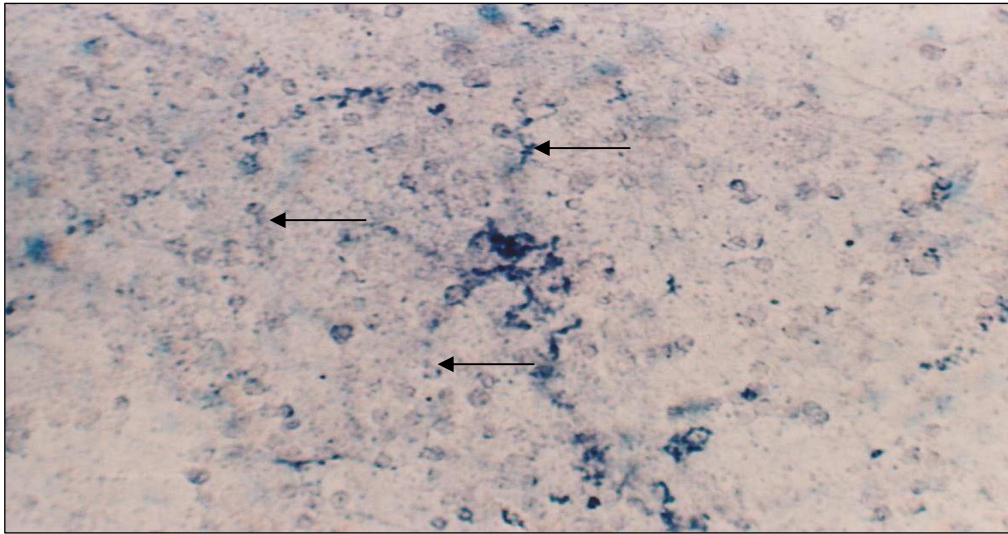
Abbildung 25: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der PBMC von Pferd V07-7-10, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurden.



Die Pfeile markieren Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde in PBMC.

Legende: A- Artefakt
 Vergrößerung 50x,
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/μl
 Kein Filter benutzt.

Abbildung 26: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der PBMC von Pferd V07-7-10, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurden.



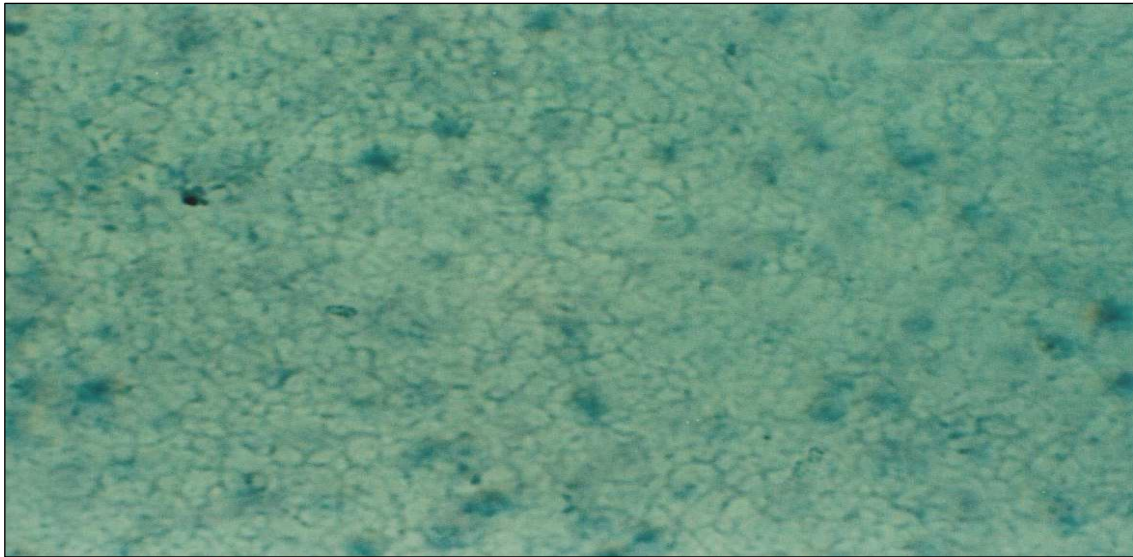
Die Pfeile markieren Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde in PBMC.

Legende: Vergrößerung 100x,

EHV-5 Sonde: 0,5 ng/ μ l

Es wurde ein Blaufilter benutzt.

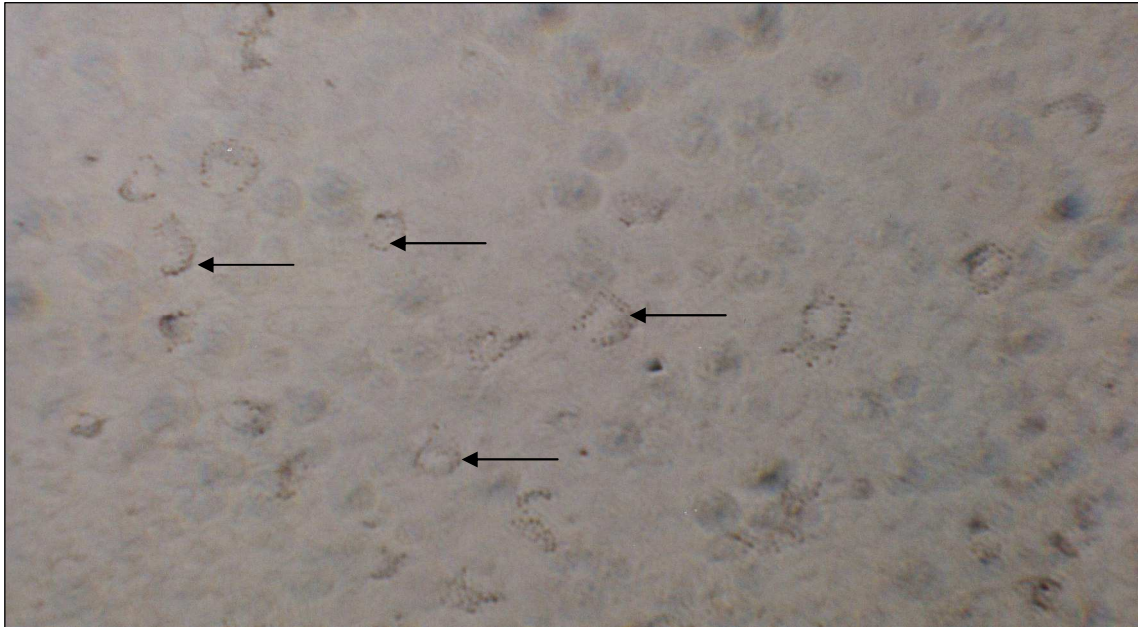
Abbildung 27: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der PBMC von Pferd V07-7-6, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurden.



In dieser Abbildung lassen sich keine Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde nachweisen.

Legende: Vergrößerung 50x,
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/μl
 Es wurde ein Grünfilter benutzt.

Abbildung 28: Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung: Darstellung der PBMC von Pferd V07-8-21, welche im Vorfeld mittels nPCR EHV-5 negativ getestet wurden.



Die Pfeile markieren mögliche Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde in Granula ähnlichen Gebilden, welche sich in PBMC befinden.

Legende: Vergrößerung 50x,
 EHV-5 Sonde: 0,5 ng/ μ l
 Es wurde ein Blaufilter benutzt.

Mittels der Methode der in-situ-Hybridisierung konnten erstmals Hybridisierungsprodukte auf eine EHV-5-Sonde in PBMC dargestellt werden.

5. Diskussion

Der erste Teil der Diskussion beschäftigte sich mit der Verbreitung, Bedeutung des EHV-5 und dem Einfluss von Impfstoff und Immunmodulator auf die Präsenz des EHV-5. Weiterhin wurde auf virale Doppelinfektionen mit dem EHV-1,-2,-4 und dem EHV-5 eingegangen. Hierfür wurden von Pferden der Untersuchungsgruppe 1 mit Ausnahme der Gruppe P, Blutproben, Augen- und Nasentupferproben durch Tierärzte in Deutschland entnommen, diese dem Institut für Virologie zugesandt und per nPCR auf das EHV-2 und das EHV-5 untersucht (5.1). Im zweiten Teil der Diskussion wurde der Zell- und Gewebetropismus des EHV-5 im Auge und in peripheren Blutleukozyten (PBMC) betrachtet. Dafür wurden *post-mortem* Gewebe der Untersuchungsgruppe 2 und PBMC der Gruppe P aus der Untersuchungsgruppe 1 mittels nPCR und mittels der Methode der *in-situ*-Hybridisierung auf EHV-5 untersucht (5.2). Im dritten Teil der Diskussion wurden die Schlussfolgerungen (5.3) aus dieser Arbeit dargestellt und zuletzt ein Ausblick auf weitere Forschungsvorhaben (5.4) gegeben.

5.1 Verbreitung, Bedeutung und der Einfluss von Impfstoff und Immunmodulator auf die Präsenz des EHV-5 sowie der Einfluss viraler Doppelinfektionen mit dem EHV-1,-2,-4 auf das Equine Herpes Virus Typ 5

5.1.1 Verbreitung des Equinen Herpesvirus Typ 5

Wie im Vorfeld erläutert wurde, kommt das EHV-5 weltweit vor. Das Virus wurde in der Schweiz (Franchini, Akens et al. 1997), in Neuseeland (Dunowska, Meers et al. 1999), (Dunowska, Wilks et al. 2002), in Ungarn, in Schweden (Nordengrahn, Merza et al. 2002) und in Südkalifornien (Bell, Balasuriya et al. 2006) mit virusspezifischer PCR nachgewiesen. In dieser Arbeit sollte die Verbreitung des Equinen Herpes Virus Typ 5 mit folgenden Fragestellungen erörtert werden:

„Kommt EHV-5 in Deutschland vor?

Wie häufig kommt es vor?

Kann es in PBMC, Augentupfern und Nasentupfern nachgewiesen werden?“.

Die Gruppe der kranken Pferde und die Gruppe der gesunden Pferde mit Gesamt-n=125 wurden zur Beantwortung der Fragestellungen herangezogen. Von den PBMC-, Augen- und Nasentupferproben wurden PCR-Analysen durchgeführt, um Ergebnisse zur Verbreitung des

EHV-5 zu erlangen. Das Equine Herpes Virus Typ 5 wurde in dieser Arbeit bei 27,2% (34/125) der untersuchten Pferde nachgewiesen. Außerdem wurde EHV-5 in dieser Dissertation häufiger bei klinisch kranken Pferden (28/34), vor allem bei augenkranken Patienten (25/34), als bei klinisch gesunden (6/34) Pferden detektiert. Das unterstützt aktuelle Studien von Fetsch, die das EHV-5 Genom häufiger im kranken als im gesunden Auge mittels nPCR nachweisen konnte (Fetsch 2007). In anderen Studien wurden PBMC und Augentupfer als Probenmaterialien für gesunde und kranke Pferde präferiert (Nordengrahn, Merza et al. 2002), (Borchers, Ebert et al. 2006). Diese Aussage kann mit den Ergebnissen aus dieser Dissertation bestätigt werden, da sich in dieser Arbeit PBMC und Augentupfer als geeignete Probenmaterialien bei gesunden und augenkranken Pferden bewiesen haben. Bei Augentupferproben wurden in dieser Dissertation vermehrt Cytobrushproben (90/101) als Wattetupferproben eingesandt (11/101). Es erscheint sinnvoll bei augenkranken Pferden Cytobrushproben und PBMC als Probenmaterialien zu verwenden. In einer aktuellen Dissertation konnte das EHV-2 signifikant häufiger in Cytobrushproben (17/28) als in Wattetupferproben (6/28) bei 28 augenkranken Pferden nachgewiesen werden (Ebert 2006). Außerdem zeigte der Cytobrush gegenüber dem Wattetupfer eine höhere Sensitivität (Ebert 2006).

Das EHV-2 konnte bei Jährlingen und bei Fohlen mit respiratorischen Erkrankungen in PBMC und Nasentupfern und mit ophthalmolgischen Erkrankungen in Augentupfern in detektiert werden (Thein 1978), (Wang, Raidal et al. 2007). Die Rolle des EHV-5 bei Fohlen und Jährlingen mit respiratorischen und ophthalmologischen Erkrankungen ist dagegen noch nicht geklärt. Da in dieser Dissertation nur adulte Pferde mit einem Durchschnittsalter von 11 Jahren untersucht wurden, können über die Rolle des EHV-2 und des EHV-5 bei ophthalmologischen und respiratorischen Erkrankungen bei Fohlen keine neuen Daten geliefert werden. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde jedoch diskutiert, dass EHV-2 und EHV-5 im späten Fohlenalter in PBMC und Nasentupfern (Nordengrahn, Merza et al. 2002), (Wang, Raidal et al. 2007) bzw. bei jungen Pferden (Wilcox 2001), (Bell, Balasuriya et al. 2006) vermehrt detektiert wurden. Auch Wilcox wies das EHV-2 und das EHV-5 in Fohlen (70/90) und in experimentell infizierten Jährlingen in Nasentupfern (14/14) nach (Wilcox 2001). Warum die Equinen Herpes Viren 2 und 5 häufiger im späten Fohlenalter und bei Jährlingen nachgewiesen werden, könnte damit erklärt werden, dass das Immunsystem von Fohlen und Jährlingen in diesem Entwicklungsstadium noch nicht vollständig ausgebildet ist (Dietz 2006) und in Folge dessen Virusinfektionen sich leichter manifestieren können, da bei Fohlen und Jährlingen vorher noch keinen Antigenkontakt mit dem Virus vorhanden war.

Im Gegensatz dazu, ist bei adulten Tieren das Immunsystem schon vollständig ausgebildet. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die meisten EHV-2 und EHV-5-Infektionen im Zeitraum Januar bis Juni auftraten, wobei im Zeitraum Januar bis März geringfügig mehr EHV-2 und EHV-5-Infektionen nachgewiesen werden konnten, als im Zeitraum April bis Juni (Ergebnisse nicht dargestellt). In der zweiten Hälfte des Jahres hingegen, konnten EHV-2 und EHV-5 im Zeitraum 2005-2007 kaum detektiert werden. Dadurch dass das Immunsystem von Pferden zum Saisonwechsel ohnehin geschwächer ist als in der Saison, durch Fellwechsel, Wetterumschwung, Weideaustrieb und andere Faktoren, können sich EHV-2 und EHV-5-Infektionen in diesem Zeitraum leichter manifestieren als in der Saison. Weiterhin spielt die Pferdehaltung eine wichtige Rolle. Werden Jung- und Alttiere zusammen auf einer Weide gehalten, entsteht ein höherer Infektionsdruck, da sowohl Jungtiere bei Erstkontakt mit dem Virus, als auch Alttiere als Latenzträger des Virus, dieses ausscheiden.

5.1.2 Bedeutung des EHV-5

Im Zusammenhang mit respiratorischen und ophthalmologischen Symptomen wurde das Auftreten von EHV-5 vermehrt diskutiert (Dunowska, Meers et al. 1999), (Krüdwagen 2001). In dieser Dissertation sollte geklärt werden, ob EHV-5 im Zusammenhang mit respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Symptomen auftritt und ob es dabei in PBMC, Augen- und Nasentupfern mittels nPCR nachgewiesen werden kann. Für diese Fragestellung wurde die Gruppe der kranken Pferde (4.2) mit einer Gesamtzahl von 107 Pferden untersucht. Die Proben, wobei es sich um Blut-, Augen- und Nasentupferproben handelte, wurden aufgearbeitet und anschließend mittels nPCR auf EHV-5 untersucht. EHV-5 konnte nicht im Zusammenhang mit respiratorischen Symptomen diagnostiziert werden. Das könnte möglicherweise daran liegen, dass respiratorische Erkrankungen nur bei sechs von 125 Fällen diagnostiziert wurden und somit zu wenige Pferde mit respiratorischen Erkrankungen für eine Auswertung zur Verfügung standen. Außerdem wurden zu wenige Nasentupfer und kein Tracheobronchialsekret als geeignete Probenmaterialien eingesandt. Auch andere Autoren diskutierten den Zusammenhang zwischen respiratorischen Erkrankungen und dem Auftreten von EHV-5. Während Browning das EHV-5 im Zusammenhang mit respiratorischen Symptomen detektiert werden konnte (Browning und Studdert 1987), konnten Dunowska und Wang dies nicht bestätigen (Dunowska, Meers et al. 1999), (Wang, Raidal et al. 2007).

Mit einer Prozentzahl von 76,6 % (82/107) konnten in dieser Dissertation bei den kranken Pferden ophthalmologische Symptome diagnostiziert werden. Das EHV-5 ließ sich mit 30,5

% (25/82) bei diesen augenkranken Patienten nachweisen und wurde dabei vor allem in Cytobrushproben detektiert. Da in dieser Arbeit eine wesentlich sensitivere (Nachweisgrenze: 1fg gereinigte Virus-DNA) nPCR angewandt wurde, als in den Studien von Krüdwagen (Krüdwagen 2001) und Besthorn (Besthorn 2002), geben die Ergebnisse dieser Dissertation Hinweise auf eine Beteiligung des EHV-5 an der Pathogenese von entzündlichen Augenerkrankungen (Fetsch 2007), auch wenn andere Publikationen EHV-5 signifikant ($p < 0,5$) häufiger in gesunden als in Pferden mit Viruskeratitiden detektierten konnten (Besthorn 2002). Im Zusammenhang mit unspezifischen Symptomen konnte das EHV-5 zu 15,7 % (3/19) in Tupferproben detektiert werden. Diese geringe Prozentzahl lässt sich so erklären, dass von 107 klinisch kranken Pferden nur 19 Pferde vorberichtlich unspezifische Symptome zeigten.

5.1.3 Der Einfluss von Impfstoff und Immunmodulator sowie viraler Doppelinfectionen von EHV-1,-2,-4 auf die Präsenz des Equine Herpesvirus Typ 5

Damit das Virus in einem infizierten Wirt persistieren kann, ist die Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz eine sehr wichtige Eigenschaft der Viren. Für die Möglichkeit des Virus einen neuen Wirt zu infizieren, muss es reaktiviert werden. Außerdem ist die Reaktivierung des Virus wichtig, um Reservoir der latent infizierten Zellen in einem chronisch infizierten Wirt zu erhalten (Thorley-Lawson 2001), (Cesarman 2002), (Kuppers 2003), (Grundhoff und Ganem 2004), (Thorley-Lawson und Gross 2004). Verschiedene Gammaherpesviren besitzen unterschiedliche Latenzorte. Während das murine Gammaherpesvirus B- Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen als Latenzorte präferiert (Sunil-Chundra, Efstathiou et al. 1992), (Kuppers 2003), bevorzugt das HCMV myeloide Vorläuferzellen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen (Jarvis und Nelson 2002). Latente EHV-5- Infektionen konnten zu 88% in PBMC in 6-Monate alten Fohlen mittels Co-Kultivation und nPCR detektiert werden (Bell, Balasuriya et al. 2006).

In dieser wissenschaftlichen Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob die Impfung mit Resequin NN Plus[®] und die immunmodulatorische Behandlung mit Zylexis[®] einen Einfluss auf die Präsenz des EHV-5 haben. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden PBMC der 18 gesunden Pferde nPCR-analytisch auf EHV-5 untersucht. Zum ersten Zeitpunkt der Beprobung waren alle Pferde weder mit dem Impfstoff Resequin NN Plus[®] noch mit dem Immunmodulator Zylexis[®] behandelt worden. Das EHV-5 konnte zu diesem Zeitpunkt zu 33,3 % (6/18) in PBMC der untersuchten Pferde detektiert werden. Nach vier Wochen wurden dieselben 18 Pferde unter denselben Bedingungen erneut beprobt. Zu diesem

Zeitpunkt waren die Tiere dreimal mit Zylexis[®] und einmal mit Resequin NN Plus[®] behandelt worden. Dieses Mal ließ sich EHV-5 nur einmal (5,6%) und bei keinem der Pferde, die zuvor auf EHV-5 positiv getestet wurden, detektierten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das EHV-5 bei den anfangs sechs EHV-5 positiv getesteten Tieren eliminiert oder unter die PCR-Nachweisgrenze reduziert wurde. Die mögliche Eliminierung des Virus könnte vermutlich mit einer Aktivierung der unspezifischen Abwehr durch Zylexis[®] einhergegangen sein. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Virus rein zufällig nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Hierzu müsste weitere Forschungsarbeit geleistet werden. Weiterhin sollte erwähnt werden, dass es aus logistischen Gründen nicht möglich war, diesen Versuch an einer Test- und Kontrollgruppe durchzuführen. Es stand nur eine Testgruppe zur Verfügung. Eine andere Dissertation untersuchte die Wirksamkeit des Immunmodulators Zylexis[®] zur Prophylaxe von Lungenabzessen bei Fohlen, wobei 2 Testgruppen mit 45 Fohlen und eine Kontrollgruppe mit 44 Fohlen zur Verfügung stand (Baumann 2006). Hinsichtlich der Erkrankung und dem Schweregrad der Erkrankung ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Fohlen der Test- und der Kontrollgruppe (Baumann 2006). Somit konnte in der Dissertation von Baumann zum einen kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Applikation von Zylexis und der Heilung von Lungenabzessen formuliert und zum anderen auch kein Unterschied zwischen Test- und Kontrollgruppe dargestellt werden (Baumann 2006).

Eine weitere wichtige Fragestellung war, ob virale Doppelinfektionen mit dem EHV-1,-2,-4 einen Einfluss auf die Präsenz des EHV-5 haben. In einer früheren Studie wurde das gemeinsame Vorkommen von EHV-2 und EHV-5 nachgewiesen (Dunowska, Meers et al. 1999). Die meisten der 114 untersuchten Fohlen und adulten Pferde waren mit beiden Viren infiziert (Dunowska, Meers et al. 1999). Nordengrahn beschrieb 2002 eine Coinfektion von EHV-2 und EHV-5, wobei EHV-5 mit einer geringeren Prävalenz auftrat, als EHV-2 (Nordengrahn, Merza et al. 2002). In einer anderen Studie konnten beide Viren mittels nPCR bei 16 von 185 untersuchten Augen augenkranker und augengesunder Pferde nachgewiesen werden. Auffällig war hier, dass beide Viren häufiger im gesunden Auge als im kranken Auge auftraten (Besthorn 2002). In dieser Dissertation wurden beide Stichproben, mit Gesamt-n von 125 auf EHV-2 und EHV-5 per nPCR untersucht. Fünf (4%) von 125 Pferden waren EHV-2 und EHV-5 doppelt infiziert. Von diesen fünf doppelt infizierten Pferden, wiesen drei ophthalmologische Symptome auf und das EHV-2 und das EHV-5 wurden bei den ophthalmologisch erkrankten Pferden in Augentupfern (Cytobrushs) detektiert. Ob die beiden Gammaherpesviren durch gegenseitige Beeinflussung zu ophthalmologischen

Erkrankungen führen, kann nicht ohne Zweifel festgestellt werden, da Doppelinfectionen mit beiden Viren bei augenkranken Pferden nur in drei von 125 Fällen detektiert wurden. Auch Krüdwagen (Krüdwagen 2001) wies das EHV-2 und das EHV-5 gemeinsam nur bei einem von 15 gesunden Pferden nach (Krüdwagen 2001).

PBMC sind als Latenzort für beide Viren beschrieben (Reubel, Crabb et al. 1995), (Dunowska, Meers et al. 1999), (Bell, Balasuriya et al. 2006), worauf es auch in dieser Arbeit Hinweise gibt. So waren zwei von fünf EHV-2 und EHV-5 doppelt infizierten Pferden klinisch gesund und EHV-2 und EHV-5 wurden hier in PBMC nachgewiesen. Für das EHV-2 wurde weiterhin Konjunktivalgewebe als Latenzort erwähnt (Kershaw, von Oppen et al. 2001; Borchers, Ebert et al. 2006). Die erfolgreichen PCR-Nachweise von EHV-5 in Cytobrush lassen vermuten, dass auch EHV-5 in der Konjunktiva möglicherweise in latenter Form vorliegen kann. PBMC und Cytobrush sollten daher als Probenmaterialien bei gesunden und kranken Pferden zur Detektion von EHV-2 und EHV-5 benutzt werden.

Bei keinem der 125 Pferde konnten Doppelinfectionen mit dem EHV-1 und dem EHV-5 sowie dem EHV-4 und dem EHV-5 in PBMC per PCR nachgewiesen werden.

EHV-5 scheint an der Pathogenese von Augenerkrankungen beteiligt zu sein. Wenn es im Zusammenhang mit ophthalmologischen Symptomen nachgewiesen wird, scheinen Augentupferproben, vor allem Cytobrush aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber Wattetupfern (Ebert 2006), aber auch PBMC sowohl bei klinisch kranken als auch bei klinisch gesunden Pferden, da sie einen Latenzort für das EHV-5 darstellen, als Probenmaterialien sinnvoll. Durch die Aktivierung der unspezifischen Abwehr durch den Immunmodulator Zylexis® kann das EHV-5 möglicherweise aus PBMC klinisch gesunder Pferde eliminiert werden.

5.2 Gewebe- und Zelltropismus des Equinen Herpesvirus Typ 5

Der letzte Teil dieser wissenschaftlichen Arbeit sollte mögliche Anhaltspunkte in Bezug auf den Zelltropismus des EHV-5 liefern. PBMC wurden als Latenzorte für EHV-5 beschrieben (Bell, Balasuriya et al. 2006), die Detektion von EHV-5 in Augengewebe beschränkt sich auf PCR- Analysen von Tupferproben (Krüdwagen 2001), (Besthorn 2002). Da man mit dieser Dissertation Daten zum Gewebe-und Zelltropismus von EHV-5 liefern wollte, wählte man die Methode der *in-situ*-Hybridisierung. Einer der bedeutendsten Vorteile der *in-situ*-Hybridisierung ist, dass die gesuchte DNA nicht präpariert werden muss, sondern direkt in den (infizierten) Zellen markiert werden kann. Somit eignet sie sich für histopathologische Studien. Ein Nachteil dieser Methode ist die gegenüber der PCR wesentlich geringere Sensitivität. Der Versuch EHV-5 mittels *in-situ-Hybridisierung* aus Paraffinschnitten von Konjunktivalgewebe zu detektieren, wurde bisher nur einmal beschrieben (Fetsch 2007). Durch die Methode der *in-situ*-Hybridisierung sollte versucht werden, das EHV-5-Virusgenom aus Konjunktivalgewebe und PBMC zu lokalisieren und detektieren. Die Paraffinschnitte wurden anhand ihrer im Vorfeld getesteten EHV-2 und EHV-5 nPCR-Ergebnisse ausgewählt, um positive und negative Kontrollen zu haben. Die Konjunktivalschnitte wurden zuerst mittels Beta-Aktin-PCR und dann mittels nPCR auf EHV-5 untersucht. Das Zellstrukturgewebe Beta-Aktin konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Trotz funktionierender Kontrollen konnte EHV-5 in keiner der getesteten Konjunktivalschnitte mittels nPCR detektiert werden. Das könnte darauf hinweisen, dass möglicherweise vorhandene Virus-DNA während des Fixierungs- und Präparationsprozesses der Paraffinschnitte degradiert wurde und nur noch in kleinen Fragmenten vorliegt (Korinth, Donhuijsen et al. 2004). So gelang Gerst et al. die Detektion von EHV-1 aus jahrealten, in Paraffin eingebetteten, wenigen Plazentageweben mittels *in-situ*-Hybridisierung bei gleichzeitig negativer, virusspezifischer nPCR (Gerst, Borchers et al. 2003). Die von Gerst (Gerst, Borchers et al. 2003) angewandte EHV-1-PCR, die das ICP 0-Gen nachweist, war mit einer Nachweisgrenze von 0,8 fg viraler DNA nur unwesentlich sensitiver als die hier verwendete EHV-5-gb-nPCR (Nachweisgrenze: 1,0 fg gereinigte Virus-DNA), (Borchers, Frölich et al. 1999). Die Größe der Amplifikate der ersten Runde, die entscheidend für einen erfolgreichen Nachweis viraler Sequenzen der kritischen Probenmaterialien ist, betrug dort 388 bp und war bei der hier eingesetzten EHV-5-nPCR mit 1328 bp sogar deutlich größer. Daher sollte man in weiteren Forschungsvorhaben versuchen, für die Detektion von EHV-5

per nPCR virusspezifische Primer zu verwenden, die kleinere Genbereiche amplifizieren. In dieser Arbeit wurde stattdessen versucht per *in-situ*-Hybridisierung mit Oligosonden, die den gesamten viralen Genombereich abdecken, einen Virusgenomnachweis zu führen, auch wenn die Technik weniger sensitiv als die PCR ist. Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte der Konjunktivalgewebe und zytozentrifugierten PBMC-Proben, welche ebenfalls im Vorfeld mittels nPCR auf EHV-5 untersucht wurden, *in-situ*-hybridisiert. Bei jeder *in-situ*-Hybridisierung wurde eine Positivkontrolle mit EHV-5 infizierten ED-Zellen und eine Negativkontrolle mit nichtinfizierten ED-Zellen mitgeführt. Obwohl die Interpretation von *in-situ*-Hybridisierungsversuchen eines erfahrenen Untersuchers bedarf, deuten die Ergebnisse des Pferdes SH 7 darauf hin, dass EHV-5 in den Bindegewebshäuten beider Augen (links und rechts) präsent ist. Hier ließen sich Hybridisierungsprodukte mittels EHV-5-Sonde darstellen. Durch die nPCR konnte EHV-5 in dieser Arbeit aus den Bindegewebshäuten der Konjunktivalschnitte nicht detektiert werden. Ausgewählt wurden die Paraffinschnitte des Pferdes SH7, weil das frische Augengewebe per nPCR im Vorfeld in der Arbeitsgruppe Equine Herpesviren unter der Leitung von PD Dr. K. Borchers, EHV-2 und EHV-5 positiv getestet worden war (Fetsch 2007). Aus der Dissertation von Fetsch (Kapitel 3.2.3) geht hervor, dass die Pferde keinerlei Symptome einer Augenentzündung zeigten. Somit könnte man das Auftreten von EHV-5 durch ein akutes Geschehen ausschließen und vermuten, dass das Virus latent in der Konjunktiva palpebralis vorkommt. Der Infektionsweg des Virus zu diesem Ort könnte folgendermaßen aussehen. Eine Möglichkeit wäre, dass das Virus über den Respirationstrakt in den Organismus gelangt und sich im respiratorischen Epithel vermehrt. Nimmt man in dieser Periode Nasentupfer müsste sich das Virus mittels molekularbiologischer Methoden nachweisen lassen. Dann verbreitet sich das EHV-5 über die Blut- und Lymphbahn im Organismus des Wirtes und gelangt über Endothelzellen des Gefäßsystems oder über dendritische Zellen zum Auge. Eine Alternative wäre, dass das EHV-5 über das Auge in den Organismus eintritt, sich in Konjunktiven und/oder Korneagewebe vermehrt (Nachweis aus Cytobrushtupfern) und über dendritische Zellen, welche als unreife Zellen aus dem Blut in das Augengewebe einwandern und dort ihre Verästelungen bilden (Schütt 2006), über den Tränen-Nasenkanal zum Respirationstrakt transportiert wird. Da die Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde in der Nähe von Gefäßen detektiert wurden, könnte es sich bei den Zellen möglicherweise um Endothelzellen handeln. Es wäre also durchaus denkbar, dass EHV-5 in Endothelzellen persistiert. Verschiedene Gammaherpesviren persistieren in dendritischen Zellen (Flano, Husain et al. 2000). In einer aktuellen Studie wurden EHV-2 spezifische Signale mittels *in-situ*-

Hybridisierung in Langerhans- Zellen detektiert (Borchers, Ebert et al. 2006). Aufgrund der genetischen Verwandtschaft beider Viren ist die Latenz des EHV-5 in dendritischen Zellen und in Kornea, Konjunktival- und respiratorisches Gewebe sehr nahe liegend. Die Methode der *in-situ*-Hybridisierung zur Detektion von EHV-5 in PBMC wurde in dieser Dissertation erstmals durchgeführt. In den PBMC-Proben, von 2 Pferden P1 (V07-7-10) und P5 (V07-8-21) konnten Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde mittels *in-situ*-Hybridisierung dargestellt werden. In den PBMC von Pferd P5 zeigten sich zusätzlich Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Sonde in Granula ähnlichen Gebilden. Da die PBMC-Proben von beiden Pferden mittels nPCR EHV-5 negativ waren, muss nun diskutiert werden, ob es sich bei den Hybridisierungsprodukten auf die EHV-5-Sonde um unspezifische Signale handelt. Da das PBMC-Probenmaterial frisch zur Detektion von EHV-5 eingesetzt wurde, hätte man mit großer Sicherheit EHV-5, sofern es in den PBMC vorhanden gewesen wäre, detektiert. Möglicherweise beruhen die fraglichen Signale auf einer Kreuzreaktion der EHV-5 Gesamtsonde mit homologen Sequenzen im zellulären Genom, wie etwa dem Virokin IL-10 (Telford, Studdert et al. 1993).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die hier vorgelegten Ergebnisse keine eindeutigen Nachweise von EHV-5 in Konjunktiven und PBMC ergaben. Weitere Studien an frischen Augengeweben erkrankter und gesunder Pferde sollten der Frage nach dem Latenzort in Konjunktivalgewebe, Endothel- und dendritische Zellen weiter nachgehen, insbesondere um die Probennahme für die Diagnostik zu optimieren.

5.3 Schlussfolgerungen

EVH-5 konnte sowohl in klinisch kranken als auch in klinisch gesunden Pferden detektiert werden. Wenn EHV-5 im Zusammenhang mit klinischen Symptomen detektiert wurde, dann vor allem bei Pferden mit ophthalmologischen Symptomen und dabei in Cytobrushproben. Damit verstärkt sich die Annahme, dass EHV-5 bei entzündlichen Erkrankungen der Kornea und/oder der Konjunktiven beteiligt sein könnte. Eine postulierte Reaktivierung des EHV-5 durch den Einfluss von Resequin NN Plus[®] und dem Immunmodulator Zylexis[®] konnte in dieser Arbeit nicht dargestellt werden. Die Detektion von EHV-5 mittels *in-situ*-Hybridisierung in Konjunktivalgewebeproben von klinisch gesunden Pferden, verhärtet den Verdacht, dass die Bindegewebshäute auch einen möglichen Latenzort für das EHV-5 darstellen. Abschließend kann gesagt werden, dass diese Dissertation wertvolle Informationen über das Vorkommen und die Bedeutung von EHV-5 in Deutschland liefert, auch wenn es

weiterhin viele offene Fragen gibt, die man mit detaillierten Untersuchungen, wie sie im Anschluss im nächsten Kapitel formuliert werden, versuchen sollte zu beantworten.

5.4 Ein Ausblick auf weitere Forschungsvorhaben

In dieser Dissertation wurden Pferde im mittleren Alter von 11 Jahren untersucht. Somit konnte nicht erörtert werden, ob EHV-5 und EHV-2 vermehrt im späten Fohlenalter auftraten, wie es einige Autoren in verschiedenen Studien beschrieben haben (Nordengrahn, Merza et al. 2002), (Wang, Raidal et al. 2007). In folgenden Forschungsvorhaben könnte man klinisch gesunde Fohlen und Jährlinge mit klinisch gesunden Pferden im Alter von 8-11 Jahren vergleichen bzw. klinisch kranke Fohlen mit klinisch kranken adulten Pferden. Dazu müsste man für alle Tiere die gleichen Bedingungen schaffen (Stall, Futter, Umwelt), was sich gut in Gestüten und Zuchtbetrieben arrangieren ließe. Diese Tiere sollte man dann über einen längeren Zeitraum (Frühjahr bis Herbst; Herbst bis Frühjahr) beobachten, untersuchen und beproben.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die meisten EHV-2 und EHV-5-Infektionen im Zeitraum Januar bis Juni auftraten, wobei im Zeitraum Januar bis März geringfügig mehr EHV-2 und EHV-5-Infektionen nachgewiesen werden konnten als im Zeitraum April bis Juni (Ergebnisse nicht dargestellt). In der zweiten Hälfte des Jahres hingegen, konnten EHV-2 und EHV-5 im Zeitraum 2005-2007 kaum detektiert werden. Demnach sollte man in späteren Forschungsvorhaben die Jahreszeiten mit berücksichtigen. Wenn möglich sollten auch von allen Tieren immer die gleichen Probenmaterialien (Blut, Augen- und/oder Nasentupfer) entnommen werden.

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde EHV-5 in klinisch kranken Pferden häufiger detektiert, als in klinisch gesunden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sollten weitere Vergleiche zwischen klinisch gesunden Pferden und klinisch erkrankten Pferden und dem Nachweis von EHV-5 folgen. Weiterhin konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob EHV-5 im Zusammenhang mit respiratorischen (Dunowska, Wilks et al. 2002) und unspezifischen Symptomen, wie Allergie, steht. Dieser Fragestellung sollte nachgegangen werden. Man müsste dafür explizit Pferde, z.B. aus Tierkliniken, auswählen, welche laut Anamnese respiratorische und unspezifische Symptome aufweisen. Diese Pferde sollten dann mehrmals auf EHV-5 und EHV-2 untersucht werden. Denn EHV-2 wurde von einigen Autoren mehrmals im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen erwähnt (Borchers, Wolfinger et al. 1997), (Wilcox 2001).

Der Einfluss einer Impfung mit Resequin NN Plus[®] und der Verabreichung des Immunmodulators Zylexis[®] auf die Präsenz von EHV-5 wurde in dieser Dissertation erstmals untersucht und gab Hinweise darauf, dass EHV-5 möglicherweise durch die Aktivierung der unspezifischen Immunantwort durch Zylexis[®] eliminiert wird. Wenn man bedenkt, dass Zylexis in der täglichen Praxis zur Stimulation der unspezifischen Immunmechanismen, zur Prophylaxe von infektiösen und/oder stressbedingten Erkrankungen eingesetzt wird und zu einer Reduktion der klinischen Symptomatik und der Virusausscheidung bei respiratorischen Herpes-Virusinfektion beim Pferd führt, dann sollte man dem Einfluss des Immunmodulators auf die Präsenz von EHV-2 und EHV-5 nachgehen und diesem Thema weitere Forschungsarbeiten widmen. Pferde einer Gruppe sollten vor und nach der Applikation des Immunmodulators mehrmals in verschiedenen Zeitabständen untersucht werden. Die Untersuchungen sollten immer an denselben Pferden vorgenommen werden. Außerdem sollten Test- und Kontrollgruppe aus derselben Anzahl von Pferden bestehen. Weiterhin sollte man sich auf ein oder mehrere Probenmaterialien festlegen und diese dann bei jeder Untersuchung unter gleichen Bedingungen entnehmen. In dieser Dissertation wurden nur klinisch gesunde Pferde mit Resequin NN Plus[®] und Zylexis[®] behandelt. Interessant wäre eine Studie an klinisch erkrankten Pferden im Vergleich mit klinisch gesunden Pferden.

Zum Gewebetropismus von EHV-5 konnten wichtige Hinweise mit dieser Arbeit geliefert werden, trotzdem bleiben weiterhin verschiedene Fragen offen:

„Können möglicherweise Endothelzellen und/oder dendritische Zellen als Latenzorte für dieses Virus angenommen werden?“

Daher sollte in weiteren Studien versucht werden, EHV-5 mittels *in-situ*-Hybridisierung aus Konjunktivalgewebe und PBMC zu detektieren bzw. das Virus mittels Co-Kultivierung aus den untersuchten Proben zu isolieren.

6. Zusammenfassung

Virologische und molekularbiologische Studien zur Verbreitung und Bedeutung von EHV-5 Infektionen beim Pferd

Die hier vorliegende Dissertation widmet sich der Bedeutung und Verbreitung des Equinen Herpes Virus Typ 5. Im Vordergrund stand die Frage, ob EHV-5 in Deutschland vorkommt, in welchen Probenmaterialien man das Virus nachweisen kann und ob es an respiratorischen, ophthalmologischen und unspezifischen Symptomen beteiligt ist. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Doppelinfektionen des EHV-5 mit dem EHV-1, dem EHV-2 und dem EHV-4 vorkommen und ob ein Einfluss von Impfstoff und Immunmodulator auf die Präsenz des EHV-5 vorhanden ist.

Zuletzt wurden Untersuchungen zum Gewebe- und Zelltropismus des EHV-5 mittels nPCR und *in-situ*-Hybridisierung vorgenommen.

Zur Untersuchung standen zwei Gruppen zur Verfügung. Zum einen die Gruppe der gesunden Pferde, welche aus 18 Pferden bestand und zum anderen die Gruppe der kranken Pferde, welche sich aus 107 Pferden zusammensetzte. Insgesamt wurden 125 Pferde untersucht. Für die Untersuchungen zum Gewebe- und Zelltropismus wurden *post-mortem* Konjunktivalgewebeparaffinschnitte von sechs verschiedenen Pferden und PBMC von 5 verschiedenen Pferden herangezogen.

EHV-5 konnte bei 34 von insgesamt 125 Pferden detektiert werden. Dabei ließ sich EHV-5 bei 6/18 klinisch gesunden Pferden in PBMC und bei 28/107 klinisch kranken Pferden, davon bei 25/82 augenkranken und bei 3/19 Tieren mit unspezifischen Symptomen nachweisen. Bei den 25 EHV-5 positiven, augenkranken Tieren wurde EHV-5 in 18 Cytobrushproben(18/90), in zwei Wattetupfern (2/11), in sechs PBMC (6/72) und in zwei Nasentupfern (2/6) detektiert. Dass die Anzahl der EHV-5 positiven, augenkranken Pferde nicht mit der Anzahl der EHV-5 positiven Proben übereinstimmt, kann dadurch erklärt werden, dass von einem Pferd zum Teil mehrere Proben (Augen-, Nasentupfer und PBMC) gleichzeitig eingesandt und untersucht wurden. Bei den drei EHV-5 positiven Pferden mit unspezifischen Symptomen wurde EHV-5 in zwei Cytobrushproben (2/90) und einmal in PBMC (1/72) nachgewiesen.

EHV-2 und EHV-5 Doppelinfektionen konnten bei drei augenkranken Pferden (3/82) in drei Cytobrushproben (3/90) und bei zwei klinisch gesunden Pferden (2/18) in zwei PBMC (2/72) nachgewiesen werden.

Das EHV-2 Genom konnte bei 7 klinisch kranken (7/107) davon bei 5 augenkranken Pferden (5/82), in drei Cytobrushproben (3/90) und in vier Wattetupfern (4/11) und bei zwei gesunden Pferden (2/18) in zwei PBMC (2/72) detektiert werden.

Weiterhin konnte diese Arbeit keine Hinweise auf Doppelinfektionen des EHV-5 mit dem EHV-1 und dem EHV-4 liefern.

Nach der einmaligen Behandlung von 18 Pferden aus der Gruppe der klinisch gesunden Probanden mit Resequin NN Plus[®] und der dreimaligen Applikation des Immunmodulators Zylexis[®] wurde festgestellt, dass in vor der Behandlung EHV-5-positiven PBMC nach der Behandlung kein Virusgenom mehr detektiert werden konnte.

EHV-5 konnte in frischem Konjunktivalgewebe von einem von sechs gesunden Schlachtpferden per nPCR detektiert werden. Paraffinschnitte von *post-mortem* Konjunktivalgewebe von allen sechs Pferden wurden per *in-situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten-EHV-5-Genom-Sonde auf das Virus-Genom untersucht. EHV-5 wurde in der Lamina propria der Konjunktiva palpebralis in *post-mortem*-Paraffinschnitten von einem Pferd detektiert. Da alle Pferde per Anamnese klinisch gesund waren, könnte man vermuten, dass EHV-5 in Konjunktiven persistiert.

PBMC von 5 klinisch kranken Pferden, welche alle im Vorfeld per nPCR EHV-5 negativ getestet wurden, zeigten in zwei von fünf Fällen nach *in-situ*-Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten-EHV-5-Genom-Sonde positive Signale. Dabei handelte es sich bei einem der zwei Pferde wahrscheinlich um unspezifische Hybridisierungsprodukte auf die EHV-5-Genom-Sonde in Granula ähnlichen Gebilden, die eventuell Kreuzreaktionen der EHV-5-Genom-Sonde mit homologen Sequenzen im zellulären Genom, wie etwa dem Virokin IL-10 mit zellulären IL-10 Sequenzen, darstellen könnten.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass mit den Resultaten dieser Arbeit Anzeichen für eine Beteiligung von EHV-5 an Augenerkrankungen beim Pferd gegeben werden konnten. Darüber hinaus könnten die Konjunktiven als Latenzort für EHV-5 vermutet werden.

6. Summary

Virological and molecular biological studies for the spreading and the relevance of EHV-5 infections in horses

The current dissertation is dedicated to the spreading and the relevance of the herpes virus type 5. The main question was whether EHV-5 is present in Germany, in which diagnostic materials and whether EHV-5 plays a decisive role in respiratory, ophthalmologic and unspecific symptoms. Furthermore, it was the objective to see, whether double infections with EHV-5 and EHV-1, EHV-2 or EHV-4 occur and whether vaccine and immune modulators have influence on the presence of EHV-5

At last the tissue- and cell tropism of EHV-5 was examined using nPCR and *in-situ*-hybridisation.

There were two investigation groups: One group of clinically healthy horses, which consisted of 18 animals and a second group, which consisted of 107 sick horses. In total 125 horses were examined To study the tissue- and cell tropism nPCR and *in-situ*-hybridisation from *post-mortem* paraffin sections of conjunctival tissues from six different horses and PBMC from five different equines were conducted.

EHV-5 was detected in 34 of 125 horses using nPCR. The virus was present in 6/18 clinically healthy horses in PBMC and in 28/107 clinically sick horses, especially in those with ophthalmologic symptoms (25/82) and in 3/19 horses with unspecific symptoms:

EHV-5 was detected in 25/82 horses with ocular diseases in 18 cytobrushs (18/90), in two cotton wool swabs (2/11), in six PBMC (6/72) and in two nasal swabs (2/6). The number of the EHV-5 positive horses with ocular diseases does not match the number of the EHV-5 positive samples, because one or more samples (eye swabs, nasal swabs, PBMC) per horse were sent at a time and examined. EHV-5 was present in three horses with unspecific symptoms in two cytobrushs (2/90) and in one PBMC (1/72).

Viral double infections of EHV-2 and EHV-5 were detected in three horses with ocular diseases (3/82) in three cytobrushs (3/90) and in two clinically healthy horses (2/18) in two PBMC (2/72).

EHV-2 was detected in seven clinically diseased horses (7/107), thereof five ophthalmic equines (5/82), in three cytobrushes (3/90) and four cotton wool swabs (4/11), and in two clinically sound horses (2/18) in two PBMC (2/72).

This work could not provide any new clues regarding the double infections with EHV-5 and EHV-1 or EHV-4.

After a single treatment with Resequin NN Plus[®] and a triple application of the immune modulator Zylexis[®] none of the 18 clinically healthy horses, which were tested EHV-5 positive in PBMC before the therapy, were tested positive for the virus genome in PBMC.

Fresh conjunctival tissues from six clinically healthy horses from the slaughterhouse were EHV-5-nPCR positive in one case. From all six cases *post-mortem* paraffin sections were tested for localization of the virus-DNA by *in-situ*-hybridisation using an EHV-5-Digoxigenin-labelled-genomic-probe. EHV-5-DNA was detected in cells of the lamina propria in sections of paraffin embedded conjunctiva of one horse. Since all horses were clinically healthy, one can conclude that EHV-5 persists in conjunctiva.

PBMC from five clinically diseased horses were tested negative for EHV-5 using nPCR. Two of these five PBMC samples have shown positive signals after *in-situ*-hybridisation with the Digoxigenin-labelled-EHV-5-probe. Thereby, probably non specific hybridisation products on the EHV-5-genome-probe in granular structures were detected in one of the two horses. These signals could possibly be cross reactions of the EHV-5-genome-probe with homolog sequences in the cell genome, e.g. the Virokin IL-10 with cellular IL-10 sequences.

In summary, it should be kept in mind that the results of this work have shown an indication for an involvement of EHV-5 on ophthalmologic diseases. Furthermore, conjunctival tissues could be assumed as a place of latency for EHV-5.

7. Literaturverzeichnis

- Ackermann, M. (2005). "[Virus in sheep's skin]."
Schweiz Arch Tierheilkd **147**(4): 155-64.
- Ackermann, M. (2006). "Pathogenesis of gammaherpesvirus infections."
Vet Microbiol **113**(3-4): 211-22.
- Ackley, C. D., Yamamoto, J. K., Levy, N., Pedersen, N. C. und Cooper, M. D. (1990).
"Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus."
J Virol **64**(11): 5652-5.
- Agius, C. T., Nagesha, H. S. und Studdert, M. J. (1992). "Equine herpesvirus 5: comparisons with EHV2 (equine cytomegalovirus), cloning und mapping of a new equine herpesvirus with a novel genome structure."
Virology **191**(1): 176-86.
- Agius, C. T. und Studdert, M. J. (1994). "Equine herpesviruses 2 und 5: comparisons with other members of the subfamily gammaherpesvirinae."
Adv Virus Res **44**: 357-79.
- Ahlqvist, J., Fotheringham, J., Akhyani, N., Yao, K., Fogdell-Hahn, A. und Jacobson, S. (2005). "Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants und induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes."
J Neurovirol **11**(4): 384-94.
- Albini, S., Zimmermann, W., Neff, F., Ehlers, B., Hani, H., Li, H., Hussey, D., Engels, M., Ackermann, M. (2003).
"Identification und quantification of ovine gammaherpes 2 DNA in fresh und stored tissues of pigs with symptoms of porcine malignant catarrhal fever"
J Clin Microbiol; **41** (2): 900-4.
- Albrecht, J. C. (2000). "Primary structure of the Herpesvirus ateles genome."
J Virol **74**(2): 1033-7.
- Allen, G. P. und Bryans, J. T. (1986). "Molecular epizootiology, pathogenesis, und prophylaxis of equine herpesvirus 1 infections."
Prog Vet Microbiol Immunol **2**: 78-144.
- Baines, J. D., Wills, E., Jacob, R. J., Pennington, J. und Roizman, B. (2007). "Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane."
J Virol **81**(2): 800-12.

- Baumann, I. D. (2006). "Untersuchung der Wirksamkeit des Paraimmunitätsinducers Zylexis zur Prophylaxe von Lungenabzessen beim Fohlen."
Diss., Fachbereich Veterinärmedizin, Hannover. Tierärztliche Hochschule.
- Belak, S., Palfi, V., Tuboly, S. und Bartha, L. (1980).
"Passive immunization of foals to prevent respiratory disease caused by equine herpesvirus type 2."
Zentralbl Veterinarmed B **27**(9-10): 826-30.
- Bell, S. A., Balasuriya, U. B., Gardner, I. A., Barry, P. A., Wilson, W. D., Ferraro, G. L. und MacLachlan, N. J. (2006). "Temporal detection of equine herpesvirus infections of a cohort of mares und their foals."
Vet Microbiol **116**(4): 249-57.
- Bell, S. A., Balasuriya, U. B., Nordhausen, R. W. und MacLachlan, N. J. (2006). "Isolation of equine herpesvirus-5 from blood mononuclear cells of a gelding."
J Vet Diagn Invest **18**(5): 472-5.
- Ben-Porat, T., Kaplan, A. S., Stehn, B. und Rubenstein, A. S. (1976). "Concatemeric forms of intracellular herpesvirus DNA."
Virology **69**(2): 547-60.
- Besthorn, C. (2002). "Keratitis des Pferde und Nachweishäufigkeit der DNS der Equinen Herpesviren Typ 2 (EHV-2) und Typ 5 (EHV-5) mittels Polymerasekettenreaktion."
Diss., Tiermedizinische Fakultät, München. Ludwig- Maximilians- Universität.
- Bishop, S. A., Williams, N. A., Gruffydd-Jones, T. J., Harbour, D. A. und Stokes, C. R. (1992). "An early defect in primary und secondary T cell responses in asymptomatic cats during acute feline immunodeficiency virus (FIV) infection."
Clin Exp Immunol **90**(3): 491-6.
- Blakeslee, J. R., Jr., Olsen, R. G., McAllister, E. S., Fassbender, J. und Dennis, R. (1975).
"Evidence of respiratory tract infection induced by equine herpesvirus, type 2, in the horse."
Can J Microbiol **21**(12): 1940-6.
- Borchers, K. und Frölich, K. (1997). "Antibodies against equine herpesviruses in free-ranging mountain zebras from Namibia."
J Wildl Dis **33**(4): 812-7.
- Borchers, K., Wolfinger, U., Goltz, M., Broll, H. und Ludwig, H. (1997). "Distribution und relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections."
Arch Virol **142**(5): 917-28.
- Borchers, K., Wolfinger, U., Lawrenz, B., Schellenbach, A. und Ludwig, H. (1997). "Equine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected horses detected by direct in-situ-PCR."
J Gen Virol **78** (5): 1109-14.

- Borchers, K., Wolfinger, U., Ludwig, H., Thein, P., Baxi, S., Field, H. J. und Slater, J. D. (1998). "Virological und molecular biological investigations into equine herpes virus type 2 (EHV-2) experimental infections."
Virus Res **55**(1): 101-6.
- Borchers, K., Frölich, K. und Ludwig, H. (1999a). "Detection of equine herpesvirus types 2 und 5 (EHV-2 und EHV-5) in Przewalski's wild horses."
Arch Virol **144**(4): 771-80.
- Borchers, K., Brackmann, J. und Kershaw, O. (2002). "The mouse is not permissive for equine herpesvirus 2 (EHV-2), however viral DNA persisted in lung und spleen depending on the inoculation route."
Arch Virol **147**(7): 1437-44.
- Borchers, K., Fetsch, A., Ebert, M., Mauel, S., Sterner-Kock, A. (2005a). "Distribution und relevance of Equine Herpesvirus Type 2 und 5."
Annual Veterinary Herpesvirus Satellite Workshop, 30th International Herpesvirus Workshop.
- Borchers, K., Wiik, H., Frölich, K., Ludwig, H. und East, M. L. (2005b). "Antibodies against equine herpesviruses und equine arteritis virus in Burchell's zebras (*Equus burchelli*) from the Serengeti ecosystem."
J Wildl Dis **41**(1): 80-6.
- Borchers, K., Böttner, D., Lieckfeldt, D., Ludwig, A., Frölich, K., Klingeborn, B., Widen, F., Allen, G. und Ludwig, H. (2006). "Characterization of equid herpesvirus 1 (EHV-1) related viruses from captive Grevy's zebra und blackbuck."
J Vet Med Sci **68**(7): 757-60.
- Borchers, K., Ebert, M., Fetsch, A., Hammond, T. und Sterner-Kock, A. (2006b). "Prevalence of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs und its cell tropism in equine conjunctiva."
Vet Microbiol **118**(3-4): 260-6.
- Browning, G. F. und Studdert, M. J. (1987a). "Epidemiology of equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus)."
J Clin Microbiol **25**(1): 13-6.
- Browning, G. F. und Studdert, M. J. (1987b). "Genomic heterogeneity of equine betaherpesviruses."
J Gen Virol **68** (5): 1441-7.
- Browning, G. F. und Studdert, M. J. (1989a). "Physical mapping of the genomic heterogeneity of isolates of equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus)."
Arch Virol **104**(1-2): 87-94.

- Carvalho, R., Oliveira, A. M., Souza, A. M., Passos, L. M. und Martins, A. S. (2000). "Prevalence of equine herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction." Arch Virol **145**(9): 1773-87.
- Cesarman, E. (2002). "The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases." Recent Results Cancer Res **159**: 27-37.
- Chelly, J., Concordet, J. P., Kaplan, J. C. und Kahn, A. (1989). "Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2617-21.
- Chowdhury, S.I., Kubin, G. und Ludwig, H. (1986). "Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induced abortions and paralysis in a Lippizzaner stud: a contribution to the classification of equine herpesviruses." Arch Virol **90** (3-4), 273-88
- Craig, M. I., Barrundeguy, M. E. und Fernandez, F. M. (2005). "Equine herpesvirus 2 (EHV-2) infection in thoroughbred horses in Argentina." BMC Vet Res **1**: 1-9.
- Csire, M., Mikala, G., Jako, J., Masszi, T., Janosi, J., Dolgos, J., Fule, T., Tordai, A., Berencsi, G. und Valyi-Nagy, I. (2007). "Persistent Long-Term Human Herpesvirus 6 (HHV-6) Infection in a Patient with Langerhans Cell Histiocytosis." Pathol Oncol Res **13**(2): 157-60.
- Dietz, O., Huskamp, B. (2006). "Handbuch Pferdepraxis." Enke Verlag **3. Auflage**: 140.
- Drummer, H. E., Reubel, G. H. und Studdert, M. J. (1996). "Equine gammaherpesvirus 2 (EHV2) is latent in B lymphocytes." Arch Virol **141**(3-4): 495-504.
- Dunowska, M., Meers, J. und Wilks, C. R. (1999). "Isolation of equine herpesvirus type 5 in New Zealand." N Z Vet J **47**(2): 44-6.
- Dunowska, M., Holloway, S. A., Wilks, C. R. und Meers, J. (2000). "Genomic variability of equine herpesvirus-5." Arch Virol **145**(7): 1359-71.
- Dunowska, M., Wilks, C. R., Studdert, M. J. und Meers, J. (2002). "Equine respiratory viruses in foals in New Zealand." N Z Vet J **50**(4): 140-7.
- Dutta, S. K. und Campbell, D. L. (1978). "Pathogenicity of equine herpesvirus: in vivo persistence in equine tissue macrophages of herpesvirus type 2 detected in monolayer macrophage cell culture." Am J Vet Res **39**(9): 1422-7.

- Ebeling, A., Keil, G. M., Knust, E. und Koszinowski, U. H. (1983). "Molecular cloning und physical mapping of murine cytomegalovirus DNA."
J Virol **47**(3): 421-33.
- Ebert, M. (2006). "Das Equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2): Studien zur Prävalenz in Augentupfern und zum Gewebe- und Zelltropismus, insbesondere in Bezug auf die equine Keratokonjunktivitis."
Diss., Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin. Journal-Nr.: 3078
- Edington, N., Wright, J. A., Patel, J. R., Edwards, G. B. und Griffiths, L. (1984).
"Equine adenovirus 1 isolated from cauda equina neuritis."
Res Vet Sci **37**(2): 252-4.
- Edington, N., Bridges, C. G. und Patel, J. R. (1986). "Endothelial cell infection und thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke."
Arch Virol **90**(1-2): 111-24.
- Engels, M. und M. Ackermann (1996). "Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections."
Vet Microbiol **53**(1-2): 3-15.
- England, J. J., McChesney, A. E. und Chow, T. L. (1973). "Characterization of an equine adenovirus."
Am J Vet Res **34**(12): 1587-90.
- Engst, R.; Pätzold, C., Stecher, J., Tshisuaka, B. I.; Witzel, S. (2002).
"Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch."
Walter de Gruyter **259. Auflage**: 781.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, C. A. (2005). "Virus Taxonomy 8 th Reports of the International Kommittee on Taxonomy of Viruses."
Academic Press, Elsevier Verlag: 1162.
- Fetsch, A. (2007). "Die EHV-2 bedingte equine Keratokonjunktivitis- Evaluierung der Rolle der immunologischer Mechanismen sowie viraler und bakterieller Co-Faktoren."
Diss., Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin. Journal-Nr.:3122
- Flano, E., Husain, S. M., Sample, J. T., Woodland, D. L. und Blackman, M. A. (2000).
"Latent murine gamma-herpesvirus infection is established in activated B cells, dendritic cells, und macrophages."
J Immunol **165**(2): 1074-81.
- Flano, E., Kayhan, B., Woodland, D. L. und Blackman, M. A. (2005). "Infection of dendritic cells by a gamma-2-herpesvirus induces functional modulation."
J Immunol **175**(5): 3225-34.
- Fleckenstein, B., Desrosiers, RC. (1982). "Herpesvirus saimiri und herpesvirus ateles."
In: The herpesviruses, Roizman B. (Ed.), 1, Plenum Press, New York.

- Fleming, S. B., McCaughan, C. A., Andrews, A. E., Nash, A. D. und Mercer, A. A. (1997). "A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus." J Virol **71**(6): 4857-61.
- Franchini, M., Akens, M., Bracher, V. und von Fellenberg, R. (1997). "Characterisation of gamma herpesviruses in the horse by PCR." Virology **238**(1): 8-13.
- Fraser, N. W., Block, T. M. und Spivack, J. G. (1992). "The latency-associated transcripts of herpes simplex virus: RNA in search of function." Virology **191**(1): 1-8.
- Fu, Z. F., Robinson, A. J., Horner, G. W., Dickinson, L. G., Grimmett, J. B. und Marshall, R. B. (1986). "Respiratory disease in foals und the epizootiology of equine herpesvirus type 2 infection." N Z Vet J **34**(9): 152-5.
- Fukushi, H., Tomita, T., Taniguchi, A., Ochiai, Y., Kirisawa, R., Matsumura, T., Yanai, T., Masegi, T., Yamaguchi, T. und Hirai, K. (1997). "Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1." Virology **227**(1): 34-44.
- Galosi, C. M., de la Paz, V. C., Fernandez, L. C., Martinez, J. P., Craig, M. I., Barrundeguy, M. und Etcheverrigaray, M. E. (2005). "Isolation of equine herpesvirus-2 from the lung of an aborted fetus." J Vet Diagn Invest **17**(5): 500-2.
- Garcia-Blanco, M. A. und Cullen, B. R. (1991). "Molecular basis of latency in pathogenic human viruses." Science **254**(5033): 815-20.
- Gerst, S., Borchers, K., Gower, S. M. und Smith, K. C. (2003). "Detection of EHV-1 und EHV-4 in placental sections of naturally occurring EHV-1- und EHV-4-related abortions in the UK: use of the placenta in diagnosis." Equine Vet J **35**(5): 430-3.
- Gibson, J. S., Slater, J. D., Awan, A. R. und Field, H. J. (1992). "Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary und secondary infections und reactivation." Arch Virol **123**(3-4): 351-66.

- Gilkerson, J. R., Love, D. N. und Whalley, J. M. (1998). "Epidemiology of equine herpesvirus abortion: searching for clues to the future."
Aust Vet J **76**(10): 675-6.
- Gilkerson, J. R., Whalley, J. M., Drummer, H. E., Studdert, M. J. und Love, D. N. (1999). "Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 und 1997."
Vet Microbiol **68**(1-2): 15-25.
- Gleeson, L. J., Studdert, M. J. und Sullivan, N. D. (1978). "Pathogenicity und immunologic studies of equine adenovirus in specific-pathogen-free foals."
Am J Vet Res **39**(10): 1636-42.
- Gleeson, L. J. und Coggins, L. (1985). "Equine herpesvirus type 2: cell-virus relationship during persistent cell-associated viremia."
Am J Vet Res **46**(1): 19-23.
- Gompels, U. A., Nicholas, J., Lawrence, G., Jones, M., Thomson, B. J., Martin, M. E., Efstathiou, S., Craxton, M. und Macaulay, H. A. (1995). "The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, und genome evolution."
Virology **209**(1): 29-51.
- Grundhoff, A. und Ganem, D. (2004). "Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis."
J Clin Invest **113**(1): 124-36.
- Harden, T. J., Bagust, T. J., Pascoe, R. R. und Spradbrow, P. B. (1974). "Studies on equine herpesviruses. 5. Isolation und characterisation of slowly cytopathic equine herpesviruses in Queensland."
Aust Vet J **50**(11): 483-8.
- Hellums, E. K., Markert, J. M., Parker, J. N., He, B., Perbal, B., Roizman, B., Whitley, R. J., Langford, C. P., Bharara, S. und Gillespie, G. Y. (2005). "Increased efficacy of an interleukin-12-secreting herpes simplex virus in a syngeneic intracranial murine glioma model."
Neuro Oncol **7**(3): 213-24.
- Holloway, S. A., Lindquenter, G. J., Studdert, M. J. und Drummer, H. E. (1999). "Identification, sequence analysis und characterisation of equine herpesvirus 5 glycoprotein B."
Arch Virol **144**(2): 287-307.
- Holloway, S. A., Lindquenter, G. J., Studdert, M. J. und Drummer, H. E. (2000). "Analysis of equine herpesvirus 2 strain variation using monoclonal antibodies to glycoprotein B." Arch Virol **145**(8): 1699-713.

- Hüssey, D., Stäuber, N., Leutenegger, C. M., Rieder, S., Ackermann, M. (2001). "Quantitative fluorescent PCR assay measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep." Clin Diagn Lab Immunol **8**: 123-128.
- Hussey, S. B., Clark, R., Lunn, K. F., Breathnach, C., Soboll, G., Whalley, J. M. und Lunn, D. P. (2006). "Detection und quantification of equine herpesvirus-1 viremia und nasal shedding by real-time polymerase chain reaction." J Vet Diagn Invest **18**(4): 335-42.
- Iqbal, J. und Edington, N. (2002). "Equid herpesvirus 1 is neurotropic in mice, but latency from which infectious virus can be reactivated does not occur." Acta Vet Hung **50**(1): 117-29.
- Ibelgaufts, H. (1993). "Gentechnologie von A bis Z." Wiley-VCH: 1. korrigierter Nachdruck: 118
- Iwakiri, D. (2006). "[Mechanisms of EBV-mediated carcinogenesis]." Nippon Rinsho **64** (3): 598-602.
- Jackson, T. A., Osburn, B. I., Cordy, D. R. und Kendrick, J. W. (1977). "Equine herpesvirus 1 infection of horses: studies on the experimentally induced neurologic disease." Am J Vet Res **38**(6): 709-19.
- Jarvis, M. A. und Nelson, J. A. (2002). "Human cytomegalovirus persistence und latency in endothelial cells und macrophages." Curr Opin Microbiol **5**(4): 403-7.
- Jarvis, M. A. und Nelson, J. A. (2007). "Human cytomegalovirus tropism for endothelial cells: not all endothelial cells are created equal." J Virol **81**(5): 2095-101.
- Jensen-Waern, M., Persson, S. G., Nordengrahn, A., Merza, M. und Fossum, C. (1998). "Temporary suppression of cell-mediated immunity in Standardbred horses with decreased athletic capacity." Acta Vet Scand **39**(1): 25-33.
- Karlin, S., Mocarski, E. S. und Schachtel, G. A. (1994). "Molecular evolution of herpesviruses: genomic und protein sequence comparisons." J Virol **68**(3): 1886-902.
- Kemeny, L. und Pearson, J. E. (1970). "Isolation of herpesvirus from equine leukocytes: comparison with equine rhinopneumonitis virus." Can J Comp Med **34**(1): 59-65.
- Kershaw, O., von Oppen, T., Glitz, F., Deegen, E., Ludwig, H. und Borchers, K. (2001). "Detection of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) in horses with keratoconjunctivitis." Virus Res **80**(1-2): 93-9.

- Kershaw, O. (2001). "Das equine Herpesvirus Typ 2: Pathogenese-, Gewebetropismus- und Latenzstudien unter besonderer Berücksichtigung der Keratokonjunktivitis beim Pferd."
Diss., Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin.Journal-Nr.:2567
- Kieff, E. (1996). "Epstein- Barr Virus an its Replication."
In: Fields Virology, Fields BN, Knipe DM, Howley PM. (Eds.) 3, Lippincott- Raven, Philadelphia: 2343-96.
- Knopf, C. W. (2000). "Molecular mechanisms of replication of herpes simplex virus 1." Acta Virol **44**(5): 289-307.
- Korinth, D., Donhuijsen, K., Bockmuhl, U. und Petersen, I. (2004). "PHOTOPROBE biotin: an alternative method for labeling archival DNA for comparative genomic hybridization." Cell Oncol **26**(5-6): 329-34.
- Kotenko, S. V., Saccani, S., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V. und Pestka, S. (2000). "Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10)."
Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1695-700.
- Krüdewagen, E. M. Balzer, H. -J. und Kellner, S. J. (2001). "Nachweishäufigkeit von Equinen Herpesviren 2 und 5 am Pferdeauge - Vergleich der Nachweismöglichkeiten mittels exfoliater Zytologie und Polymerasekettenreaktion."
Pferdeheilkunde **17**(5): 444- 452.
- Kuppers, R. (2003). "B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus." Nat Rev Immunol **3**(10): 801-12.
- Lakritz, J., Wilson, W. D., Berry, C. R., Schrenzel, M. D., Carlson, G. P. und Madigan, J. E. (1993). "Bronchointerstitial pneumonia und respiratory distress in young horses: clinical, clinicopathologic, radiographic, and pathological findings in 23 cases (1984-1989)." J Vet Intern Med **7**(5): 277-88.
- Lindner, A., von Wittke, P., Thein, P. und Strube, W. (1993). "Effect of a paramunity inducer on the incidence of diseases und the plasma cortisol content in Thoroughbred foals before und after weaning."
Tierarztl Prax **21**(1): 47-50.
- Matsumura,T., Sugiura, T., Imagawa, H., Fukunaga, Y. und Kamada, M. (1992). "Epizootiological aspects of type 1 und type 4 equine herpesvirus infections among horse populations."
J Vet Med Sci **54**(2): 207-11.
- Mayo, M. A. (1995). "A listing of virus families und genera with some discriminatory features."
Archives of Virology **140** (7): 1337-1341.
- McAllister, E. S. und Blakeslee, J. R. (1977). "Clinical observations of pharyngitis in the horse."
J Am Vet Med Assoc **170**(7): 739-41.

- McChesney, A. E., England, J. J., Whiteman, C. E., Adcock, J. L., Rich, L. J. und Chow, T. L. (1974). "Experimental transmission of equine adenovirus in Arabian und non-Arabian foals."
Am J Vet Res **35**(8): 1015-23.
- Meinl, E., Fickenscher, H., Thome, M., Tschopp, J. und Fleckenstein, B. (1998). "Anti-apoptotic strategies of lymphotropic viruses."
Immunol Today **19**(10): 474-9.
- Meyer, H., Thein, P. und Hubert, P. (1987). "Characterization of two equine herpesvirus (EHV) isolates associated with neurological disorders in horses."
Zentralbl Veterinarmed B **34**(7): 545-8.
- Mocarski, E. S. und Roizman, B. (1982). "Structure und role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization und generation of virion DNA."
Cell **31**(1): 89-97.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. und O'Garra, A. (2001). "Interleukin-10 und the interleukin-10 receptor."
Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- Mühlhardt, C. (2006). "Der Experimentator Molekularbiologie/ Genomics."
Elsevier, Spektrum, Akademischer Verlag **5. Auflage**: 81- 95.
- Mulcahy, G. und Quinn, P. J. (1986). "A review of immunomodulators und their application in veterinary medicine."
J Vet Pharmacol Ther **9**(2): 119-39.
- Murray, M. J., Eichorn, E. S., Dubovi, E. J., Ley, W. B und Cavey, D. M. (1996). "Equine herpesvirus type 2: prevalence und seroepidemiology in foals."
Equine Vet J **28**(6): 432-6.
- Murray, M. J., del Piero, F., Jeffrey, S. C., Davis, M. S., Furr, M. O., Dubovi, E. J. und Mayo, J. A. (1998). "Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm."
J Vet Intern Med **12**(1): 36-41.
- Nash, A. A., Dutia, B. M., Stewart, J. P. und Davison, A. J. (2001). "Natural history of murine gamma-herpesvirus infection."
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**(1408): 569-79.
- Neipel, F., Albrecht, J. C. und Fleckenstein, B. (1998). "Human herpesvirus 8- the first human Rhadinovirus."
J Natl Cancer Inst Monogr(23): 73-7.
- Nordengrahn, A., Rusvai, M., Merza, M., Ekstrom, J., Morein, B. und Belak, S. (1996). "Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for Rhodococcus equi pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes."
Vet Microbiol **51**(1-2): 55-68.

- Nordengrahn, A., Merza, M., Ros, C., Lindholm, A., Palfi, V., Hannant, D. und Belak, S. (2002). "Prevalence of equine herpesvirus types 2 und 5 in horse populations by using type-specific PCR assays."
Vet Res **33**(3): 251-9.
- Novotney, C., English, R. V., Housman, J., Davidson, M. G., Nasisse, M. P., Jeng, C. R., Davis, W. C. und Tompkins M. B. (1990). "Lymphocyte population changes in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus."
Aids **4**(12): 1213-8.
- Osorio, F. A., Rock, D. L. und Reed, D. E. (1985). "Studies on the pathogenesis of a bovine cytomegalo-like virus in an experimental host."
J Gen Virol **66** (9): 1941-51.
- Ostlund, E. N. (1993). "The equine herpesviruses."
Vet Clin North Am Equine Pract **9**(2): 283-94.
- Palfi, V., Belak, S. und Molnar, T. (1978). "Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals, showing respiratory symptoms."
Zentralbl Veterinarmed B **25**(2): 165-7.
- Pascoe, R. R. und Bagust, T. J. (1975). "Coital exanthema in stallions."
J Reprod Fertil Suppl(23): 147-50.
- Petzoldt, K., U. Luttmann, J. Pohlenz und U. Teichert (1972). "Virological studies of the central nervous system of horse fetuses und findings in mares suffering from central nervous system disease following abortion caused by equine herpesvirus 1."
Schweiz Arch Tierheilkd **114**(2): 129-39.
- Petzoldt, K. und Bisping, W. (1972). "[Forensic veterinary evaluation of infection with equine herpes virus 1]."
Berl Munch Tierarztl Wochenschr **85**(5): 81-4.
- Petzoldt, K., M. Rosenbruch, P. Thein, H. Merkt und J. Schulze-Spuntrup (1982). "Cases of Paresis und Paralysis in a German Thoroughbred Stud (author's transl)."
Berl Munch Tierarztl Wochenschr **95**(5): 81-5.
- Plummer, G. und Waterson, A. P. (1963). "Equine herpes viruses." Virology **19**: 412-6.
- Plummer, G., Goodheart, C. R. und Studdert, M. J. (1973). "Equine herpesviruses: antigenic relationships und deoxyribonucleic acid densities."
Infect Immun **8**(4): 621-7.
- PN, C. O., O'Rielly, J. L., Ficorilli, N. und Studdert, M. J. (1994). "Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with keratoconjunctivitis."
J Am Vet Med Assoc **205**(2): 329-31.

- Rajcani, J. und Kudelova, M. (2003). "Gamma herpesviruses: pathogenesis of infection und cell signaling."
Folia Microbiol (Praha) **48**(3): 291-318.
- Rajcani, J. und Kudelova, M. (2005). "Murine herpesvirus pathogenesis: a model for the analysis of molecular mechanisms of human gamma herpesvirus infections."
Acta Microbiol Immunol Hung **52**(1): 41-71.
- Renne, R., Blackbourn, D., Whitby, D., Levy, J., Ganem, D. (1998). "Limited transmission of Kaposi saroma- associated herpesvirus in cultered cells."
J. Virol. **72**: 5182-5188.
- Reubel, G. H., Crabb, B. S. und Studdert, M. J. (1995). "Diagnosis of equine gammaherpesvirus 2 und 5 infections by polymerase chain reaction."
Arch Virol **140**(6): 1049-60.
- Rizvi, S. M., Slater, J. D., Wolfinger, U., Borchers, K., Field, H. J. und Slade, A. J. (1997). "Detection und distribution of equine herpesvirus 2 DNA in the central und peripheral nervous systems of ponies."
J Gen Virol **78** (5): 1115-8.
- Robertson, E. S., T. Ooka und E. D. Kieff (1996). "Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes."
Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11334-40.
- Rode, H. J., Bugert, J. J., Hundermann, M., Schnitzler, P., Kehm, R., Janssen, W., Delius, H. und Darai, G. (1994).
"Molecular characterization und determination of the coding capacity of the genome of equine herpesvirus type 2 between the genome coordinates 0.235 und 0.258 (the EcoRI DNA fragment N; 4.2 kbp)."
Virus Genes **9**(1): 61-75.
- Roeder, P. L. und Scott, G. R. (1975). "The prevalence of equid herpes virus 2 infections."
Vet Rec **96**(18): 404-5.
- Roizman, B. (1974). "Herpesviruses, latency und cancer: a biochemical approach."
J Reticuloendothel Soc **15**(4): 312-21.
- Roizman, B. a. F. (1974). "The replication of herpesviruses."
Comprehensive virology. Plenum P ss, Inc., New York, NY: 229-403.
- Roizman, B. a. S., E. M. (1990). "Herpes simplex viruses und their replication."
Virology **2** Raven Press, Ltd., New York: 1795- 1841.
- Roizmann, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A. C. und Studdert, M. J. (1992). "The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses."
Arch Virol **123**(3-4): 425-49.

- Roizman, B. (1996). "Herpesviridae."
Field's Virology: 2221- 30.
- Rolle, M., Mayr, A. (2002). "Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre."
Enke Verlag, Stuttgart **7. Auflage**: 82-94
- Rose, M. A., Hopes, R., Rossdale, P. D. und Beveridge, W. I. (1974). "Virus infections of horses at Newmarket, 1972 und 1973."
Vet Rec **95**(21): 484-8.
- Rowe, M., Lear, A. L., Croom-Carter, D., Davies, A. H. und Rickinson, A. B. (1992). "Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes."
J Virol **66**(1): 122-31.
- Schlocker, N., Gerber-Bretscher, R. und von Fellenberg, R. (1995). "Equine herpesvirus 2 in pulmonary macrophages of horses."
Am J Vet Res **56**(6): 749-54.
- Schulz, T. F. (2000). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology und pathogenesis."
J Antimicrob Chemother **45** T3: 15-27.
- Schütt, C., Bröker, B. (2006). "Grundwissen Immunologie."
Elsevier, Spektrum, Akademischer Verlag **1. Auflage**: 58
- Seki, Y., Seimiya, Y. M., Yaegashi, G., Kumagai, S., Sentsui, H., Nishimori, T. und Ishihara, R. (2004). "Occurrence of equine coital exanthema in pastured draft horses und isolation of equine herpesvirus 3 from progenital lesions."
J Vet Med Sci **66**(12): 1503-8.
- Shankar, V., Kao, M., Hamir, A. N., Sheng, H., Koprowski, H. und Dietzschold, B. (1992).
"Kinetics of virus spread und changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus."
J Virol **66**(2): 992-8.
- Sherman, J., Thorsen, J., Barnum, D. A., Mitchell, W. R. und Ingram, D. G. (1977).
"Infectious causes of equine respiratory disease on Ontario Standardbred racetracks."
J Clin Microbiol **5**(3): 285-9.
- Skaliter, R., Makhov, A. M., Griffith, J. D. und Lehman, I. R. (1996). "Rolling circle DNA replication by extracts of herpes simplex virus type 1-infected human cells."
J Virol **70**(2): 1132-6.
- Slater, J. D., Borchers, K., Thackray, A. M. und Field, H. J. (1994). "The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency und reactivation in the horse."
J Gen Virol **75** (8): 2007-16.

- Smith, K. C. und Borchers, K. (2001). "A study of the pathogenesis of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion by DNA in-situ hybridization."
J Comp Pathol **125**(4): 304-10.
- Soderberg-Naucler, C. (2006). "Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases und cancer?"
J Intern Med **259**(3): 219-46.
- Steed, A., Buch, T., Waisman, A. und Virgin, H. W. t. (2007). "Gamma interferon blocks gammaherpesvirus reactivation from latency in a cell type-specific manner."
J Virol **81**(11): 6134-40.
- Steven, A. C. a. S., P. G. (1997). "Herpesvirus capsid assembly und envelopment."
Structural biology of viruses: 312-351.
- Stewart, J. P., Usherwood, E. J., Ross, A., Dyson, H. und Nash, T. (1998). "Lung epithelial cells are a major site of murine gammaherpesvirus persistence."
J Exp Med **187**(12): 1941-51.
- Stuart, A. D., Stewart, J. P., Arrund, J. R. und Mackett, M. (1995). "The Epstein-Barr virus encoded cytokine viral interleukin-10 enhances transformation of human B lymphocytes." Oncogene **11**(9): 1711-9.
- Studdert, M. J., Turner, A. J. und Peterson, J. E. (1970). "Equine herpesviruses. I. Isolation und characterisation of equine rhinopneumonitis virus und other equine herpesviruses from horses."
Aust Vet J **46**(3): 83-9.
- Studdert, M. J. (1971). "Equine herpesviruses 4. Concurrent infection in horses with strangles und conjunctivitis."
Aust Vet J **47**(9): 434-6.
- Studdert, M. J., Simpson, T. und Roizman, B. (1981). "Differentiation of respiratory und abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases."
Science **214**(4520): 562-4.
- Studdert, M. J., Crabb, B. S. und Ficorilli, N. (1992). "The molecular epidemiology of equine herpesvirus 1 (equine abortion virus) in Australasia 1975 to 1989."
Aust Vet J **69**(5): 104-11.
- Sullivan, D. C., Atherton, S. S., Staczek, J. und O'Callaghan, D. J. (1984). "Structure of the genome of equine herpesvirus type 3."
Virology **132**(2): 352-67.
- Sunil-Chundra, N. P., Efstathiou, S., Arno, J. und Nash, A. A. (1992). "Virological und pathological features of mice infected with murine gamma-herpesvirus 68."
J Gen Virol **73** (9): 2347-56.

- Taouji, S., Collobert, C., Gicquel, B., Sailleau, C., Brisseau, N., Moussu, C., Breuil, M. F., Pronost, S., Borchers, K. und Zientara, S. (2002). "Detection und isolation of equine herpesviruses 1 und 4 from horses in Normundy: an autopsy study of tissue distribution in relation to vaccination status."
J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **49**(8): 394-9.
- Teifke, J. P., Lohr, C. V. , Marschang, R. E., Osterrieder, N. und Posthaus, H. (2000). "Detection of chelonid herpesvirus DNA by nonradioactive in situ hybridization in tissues from tortoises suffering from stomatitis-rhinitis complex in Europe und North America." Vet Pathol **37**(5): 377-85.
- Telford, E. A., Studdert, M. J., Agius, C. T., Watson, M. S., Aird, H. C. und Davison, A. J. (1993). "Equine herpesviruses 2 und 5 are gamma-herpesviruses."
Virology **195**(2): 492-9.
- Telford, E. A., Watson, M. S., Aird, H. C., Perry, J. und Davison, A. J. (1995). "The DNA sequence of equine herpesvirus 2." J Mol Biol **249**(3): 520-8.
- Thein, P. und Hartl, G. (1976). "[Isolation of a reovirus from a horse with respiratory disease]."
Zentralbl Veterinarmed B **23**(8): 698-701.
- Thein, P. (1978a). "The association of EHV-2 infection with keratokonjunktivitis in horses und research on the occurrence of equine coital exanthema (EHV-3) in Germany."
Princeton, New Jersey: Veterinary Publications.
- Thein, P. und Epp, C. (1978). "[Serologic studies on the occurrence of human reovirus infections]."
MMW Munch Med Wochenschr **120**(42): 1385-6.
- Thein, P., Eßlich G., Schulze Hockenbeck W. (1983).
"Zur Ätiologie von Fohleenerkrankungen."
Tierärztl. Umsch. 1983 **38**:239- 50.
- Thein, P. (1996). "Herpesvirusinfektionen des Pferdes."
Handbuch der tierärztlichen Praxis Enke Verlag, Stuttgart: 349.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001). "Epstein-Barr virus: exploiting the immune system."
Nat Rev Immunol **1**(1): 75-82.
- Thorley-Lawson, D. A. und Gross, A. (2004). "Persistence of the Epstein-Barr virus und the origins of associated lymphomas."
N Engl J Med **350**(13): 1328-37.
- Turner, A. J. und Studdert, M. J. (1970). "Equine herpesviruses. 3. Isolation und epizootiology of slowly cytopathic viruses und the serological incidence of equine rhinopneumonitis."
Aust Vet J **46**(12): 581-6.

- Turner, A. J., Studdert, M. J. und Peterson, J. E. (1970). "Equine herpes viruses. 2. Persistence of equine herpesviruses in experimentally infected horses und the experimental induction of abortion."
Aust Vet J **46**(3): 90-8.
- Uppal, P. K., Yadav, M. P., Singh, B. K. und Prasad, S. (1989). "Equine coital exanthema (EHV-3 virus) infection in India."
Zentralbl Veterinarmed B **36**(10): 786-8.
- von Borstel, M. (2003). "Erweiterte Diagnostikverfahren bei Keratitiden des Pferdes unter besonderer Berücksichtigung der Nachweishäufigkeit des equinen Herpesvirus Typ 2 (EHV-2)."
Diss., Fachbereich Veterinärmedizin, Klinik für Pferde, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Vossen, R. C., van Dam-Mieras, M. C. und Bruggeman, C. A. (1996). "Cytomegalovirus infection und vessel wall pathology."
Intervirology **39**(3): 213-21.
- Wang, L. (2003).
"An investigation of the association between herpesviruses und respiratory disease in racehorses in Western Australia."
Diss., Fachbereich Philosophie, Murdoch Universität
- Wang, L., Raidal, S. L., Pizzirani, A. und Wilcox, G. E. (2007). "Detection of respiratory herpesviruses in foals und adult horses determined by nested multiplex PCR."
Vet Microbiol **121**(1-2): 18-28.
- Weber, O., Siegling, A., Friebe, A., Limmer, A., Schlapp, T., Knolle, P., Mercer, A., Schaller, H. und Volk, H. D. (2003). "Inactivated parapoxvirus ovis (Orf virus) has antiviral activity against hepatitis B virus und herpes simplex virus."
J Gen Virol **84**(7): 1843-52.
- Weck, K. E., Kim, S. S., Virgin, H. I. und Speck, S. H. (1999a). "Macrophages are the major reservoir of latent murine gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells."
J Virol **73**(4): 3273-83.
- Weck, K. E., Kim, S. S., Virgin, H. I. und Speck, S. H. (1999b). "B cells regulate murine gammaherpesvirus 68 latency."
J Virol **73**(6): 4651-61.
- Weiss, C. (2005). "Basiswissen Medizinische Statistik."
Springer Medizin Verlag **3. Auflage**: 238- 239.
- Welch, H. M., Bridges, C. G., Lyon, A. M., Griffiths, L. und Edington, N. (1992).
"Latent equid herpesviruses 1 und 4: detection und distinction using the polymerase chain reaction und co-cultivation from lymphoid tissues."
J Gen Virol **73** (2): 261-8.
- White DO, F. F. (1994). "Herpesviridae." Medical Virology, Academic Press, San Diego **20**.

- Whitwell, K. E. und Blunden, A. S. (1992). "Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) infection." Equine Vet J **24**(1): 13-9.
- Wilcox, G., Raidal, S. (2001). "Equine herpesvirus (EHV) 2 in young horses." RIRDC Web Publication No W01/06.
- Wilks, C. R. und Studdert, M. J. (1974). "Equine herpesviruses. 5. Epizootiology of slowly cytopathic viruses in foals." Aust Vet J **50**(10): 438-42.
- Wilson, W. D. (1997). "Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy." Vet Clin North Am Equine Pract **13**(1): 53-72.
- Wolfinger, U. (1998). "Verbreitung und Bedeutung von Infektionen mit equinen Herpesviren von Typ 1,2 und 4 (EHV-1,-2,-4)." Diss., Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin. Journal-Nr.: 2133
- Ziebell, K. L., Kretzdorn, D., Auer, S., Failing, K. und Schmeer, N. (1997). "The use of Baypamun N in crowding-associated infectious respiratory disease: efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 2-week-old veal calves." Zentralbl Veterinarmed B **44**(7): 415-24.

8. Anhang

8.1 Detaillierte Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse

Tabelle 16: Gruppe 1.1: Ergebnisse der nPCR-Untersuchungen auf EHV-2 und EHV-5 an PBMC von 18 gesunden Pferden (A1-A18)

Nr.	Tag/ Ort der Blutentnahme	Rasse/Alter in Jahren	Geschlecht	Impfung	IM	EHV-5	EHV-2
A 1	26.09.06 Pausin	WB/11	w	-	-	-	-
A 2		KB/10	w	-	-	-	-
A 3		WB/10	w	-	-	+	-
A 4		WB/11	w	-	-	+	-
A 5		WB/12	w	-	-	+	-
A 6		WB/9	w	-	-	-	-
A 7		KB/10	w	-	-	-	-
A 8		WB/11	m	-	-	+	+
A 9		WB/10	w	-	-	+	+
A10		WB/11	m	-	-	+	-
A11		WB/11	w	-	-	-	-
A12		WB/12	w	-	-	-	-
A13		WB/10	w	-	-	-	-
A 14		WB/11	w	-	-	-	-
A 15		WB/12	w	-	-	-	-
A 16		WB/10	m	-	-	-	-
A 17		WB/11	w	-	-	-	-
A 18		WB/11	w	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 16

A 1	26.10.06 Pausin	WB/11	w	+	+	-	-
A 2		KB/10	w	+	+	-	-
A 3		WB/10	w	+	+	-	-
A 4		WB/11	w	+	+	-	-
A 5		WB/12	w	+	+	-	-
A 6		WB/9	w	+	+	-	-
A 7		KB/10	w	+	+	-	-
A 8		WB/11	m	+	+	-	-
A 9		WB/10	w	+	+	-	-
A 10		WB/11	m	+	+	-	-
A 11		WB/11	w	+	+	-	-
A 12		WB/12	w	+	+	-	-
A 13		WB/10	w	+	+	-	-
A 14		WB/11	w	+	+	-	-
A 15		WB/12	w	+	+	-	-
A 16		WB/10	m	+	+	-	-
A 17		WB/11	w	+	+	-	-
A 18		WB/11	w	+	+	+	-

Legende: w- weiblich
 m- männlich
 IM- Immunmodulator
 WB- Warmblut
 KB- Kaltblut

Tabelle 17: Gruppe 1.2: Ergebnisse der nPCR-Untersuchungen auf EHV-2 und EHV-5 und der serologischen Untersuchungen (Nt; IFT) auf EHV-1 und EHV-4 an 107 kranken Pferden (D1-D107)

Nr.	Interne Nummer	Name	Rasse Alter Symptome	Probenmaterial	EHV-5	EHV-2	EHV1/ EHV-4
D 1	V06-8-13	Renomee	WB 10 Jahre Keratitis	PBMC AT (WT)	- -	- -	-
D 2	V06-8-23	Lukas	WB 6 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	+ -	- -	-
D 3	V06-8-31	Shadow	Unbekannt 12 Jahre unspezifisch	AT (CB)	+	-	n.g.
D 4	V06-8-24	Novelina	WB 10 Jahre Keratitis	AT (CB)	+	+	n.g.
D 5	V06-9-02	Blue	WB Unbekannt Husten, Keratitis, Allergie	AT (WT)	-	-	n.g.
D 6	V06-9-18	Star	WB Unbekannt Keratitis	AT (WT)	-	-	n.g.
D 7	V06-9-11	Schocclett	WB 3 Jahre Hornhauttrübung	PBMC AT (CB)	- -	- -	Nt: >1:10 IFT: 1:10204
D 8	V06-9-23	San Marino	Unbekannt Unbekannt Keratitis	AT (WT)	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 17

D 9	V06-10-2	Bijou	WB Unbekannt Hornhauttrübung	PBMC AT (WT)	- -	- +	-
D 10	V06-10-18	Lysander	TB 12 Jahre Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 11	V06-10-12	Felina	WB 7 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 12	V06-10-20	Iliano Boy	WB Jahre Hornhauttrübung	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 13	V06-4-2	Charlie	WB 8 Jahre Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 14	V06-4-10	Habib	WB 6 Jahre Hornhauttrübung	AT (CB)	+	+	n.g.
D 15	V06-4-11	Cavalino	WB 5 Jahre Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 16	V06-5-22	Equipage	WB 16 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	Nt: 1:20 IFT: 1:10240
D 17	V06-5-28	Naughty Nimrod	WB 14 Jahre Keratitis	AT (CB)	+	-	n.g.
D 18	V06-5-27	Jappa	WB 15 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-

Fortsetzung Tabelle 17

D 19	V06-5-37	Cäsar	WB 14 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	Nt: 1:40 IFT: 1:20480
D 20	V06-6-10	Kein Name	Unbekannt Unbekannt Keratitis	AT (CB)	+	+	n.g.
D 21	V06-6-1	Upsala	WB Unbekannt Keratitis	AT (WT)	-	+	n.g.
D 22	V06-6-13	Von Conello	Holsteiner 2 Jahre Husten	PBMC	-	-	Nt: 1:20 IFT: 1:20480
D 23	V06-6-33	Kein Name	WB 2 Jahre Perakute Pneumonie	PBMC AT (WT)	- -	- +	-
D 24	V06-7-8	Whisky	Haflinger Unbekannt Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 25	V06-7-11	Malaquina	WB 11 Jahre Hornhautulcera	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 26	V06-7-13	Martha	WB Unbekannt Konjunktivitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 27	V06-7-25	Frosty	WB Unbekannt Unspezifisch	AT (CB)	-	-	n.g.
D 28	V06-7-24	Jaspar	WB Unbekannt Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.

Fortsetzung Tabelle 17

D 29	Keine	Etty	WB 9 Jahre Konjunktivitis	AT	-	-	n.g.
D 30	V05-12-27	Cascaya	WB 11 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 31	V06-1-11	Walero	WB Unbekannt Unspezifisch	AT (CB)	-	-	n.g.
D 32	V06-1-33	Mynta	TB 18 Jahre Unspezifisch	AT (WT)	-	+	n.g.
D 33	V06-6-32	Remember	WB 5 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 34	V06-1-37	Lisa	WB 14 Jahre Hornhauttrübung	AT (CB)	-	-	n.g.
D 35	V06-1-45	Rivar	Aegidienberger 3 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 36	V06-1-43	Shadow	WB 4 Jahre Hornhauttrübung	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 37	V06-1-44	Sledge Hammer	Oldenburger 13 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 38	V06-2-13	Rudi	WB Unbekannt Allergie	AT (CB)	-	-	n.g.
D 39	V06-2-15	Justinian	WB Unbekannt Allergie	NT	-	-	n.g.

Fortsetzung Tabelle 17

D 40	V06-2-27	Remember	WB 8 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	Nt: 1:20 IFT: 1:10240
D 41	V06-2-32	Shadow H	WB 4 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 42	V06-2-24	Ollig	WB 8 Jahre Reitprobleme	AT (CB)	-	-	n.g.
D 43	V06-3-38	Raffaella	WB 3 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 44	V06-3-11	Alvaro	WB Unbekannt Husten, Allergie	AT (CB)	-	-	n.g.
D 45	V06-3-46	Cavalliono	WB 5 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 46	V06-3-39	Martini	WB 12 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 47	V06-3-55	Malaquina	WB 12 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 48	V06-3-54	La Irano	WB 12 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 49	V06-3-48	Remember Rio	WB 10 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-

Fortsetzung Tabelle 17

D 50	V06-3-61	Paddy	WB 10 Jahre Konjunktivitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 51	V06-10-25	Cassandro	WB Unbekannt Hornhauttrübung	AT (CB)	-	-	n.g.
D 52	V06-10-26	Micky	Pony Unbekannt Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 53	V06-11-17	Charon	WB 8 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 54	V06-11-18	Merlin	WB 9 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 55	V06-11-20	Tequila	TB 7 Jahre Hornhautulcera	AT (CB)	-	-	n.g.
D 56	V06-11-25	Whopsy	Hannoveraner Unbekannt Hornhauttrübung	AT (CB)	-	-	n.g.
D 57	V06-11-26	Moritz	Haflinger 12 Jahre Konjunktivitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 58	V06-11-28	Ferdinand	Isländer 10 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 59	V06-11-32	Lharid	Mecklenburger 12 Jahre Keratokonjunktivitis	AT (CB)	-	-	n.g.

Fortsetzung Tabelle 17

D 60	V06-11-39	Lord	TB 7 Jahre Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 61	V06-11-40	Louberger	WB Unbekannt Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 62	V06-11-41	Pepper	WB Unbekannt Unspezifisch	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 63	V06-12-5	Donnerstein	WB 10 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 64	V06-12-24	Bylut	WB Unbekannt Allergie	AT (CB)	-	-	n.g.
D 65	V06-12-27	Rosie	WB Unbekannt Reitprobleme	AT (CB)	-	-	n.g.
D 66	V07-1-2	Stirling	TBX 16 Jahre Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 67	V07-1-1	Duke	Rheinländer 9 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 68	V07-1-3	Celina	WB 16 Jahre Hornhauttrübung	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 69	V06-12-27	Kein Name	Pony Unbekannt Unspezifisch	PBMC	-	-	-
D 70	V07-1-5	King	Welsh B-Mix 23 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-

Fortsetzung Tabelle 17

D 71	V07-1-7	Di Venta	WB 9 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 72	V07-1-25	Ehrenfried	WB 13 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 73	V07-1-32	Billy	Quarter Horse 1 Jahr Hornhauttrübung	AT (CB)	-	-	n.g.
D 74	V07-1-33	Lord	WB 6 Jahre Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 75	V07-1-39	Eldjarn	WB Unbekannt Allergie	AT (CB)	-	-	n.g.
D 76	V07-1-42	One for you	WB 8 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	+ -	- -	-
D 77	V07-2-4	Winterwald	WB 11 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	+ -	- -	-
D 78	V07-2-7	Osakr	Brandenburger 5 Jahre Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 79	V07-2-11	Frohsinn	WB Unbekannt Keratitis	PBMC AT (CB)	+ +	- -	-
D 80	V07-2-12	Mona Lisa	WB Unbekannt Allergie	AT (CB)	-	-	n.g.
D 81	V07-2-25	Pies	WB Unbekannt Unspezifisch	AT (CB)	-	-	n.g.

Fortsetzung Tabelle 17

D 82	V07-2-27	Six Pack	WB 9 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 83	V07-2-28	Ducky	Traber 20 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 84	V07-2-23	Kein Name	WB Unbekannt Unspezifisch	AT (CB)	-	-	n.g.
D 85	V07-3-14	Lasalle	WB Unbekannt Unspezifisch	AT (CB)	-	-	n.g.
D 86	V07-3- 23/24	Arne	Knappstrupper 8 Jahre Husten, Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	n.g.
D 87	V07-3-30	Paracifica	WB Unbekannt Allergie	PBMC AT (CB)	+ -	- -	-
D 88	V07-3-30	Silava	WB Unbekannt Allergie	PBMC	-	-	-
D 89	V07-3-33	Folino	WB Unbekannt Allergie	AT (CB)	+	-	n.g.
D 90	V07-3-37	Fidelia	WB 14 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	+ -	- -	-
D 91	V07-3-38	Billy	Quarterhorse 1 Jahr Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 92	V07-4-3	Ordage Siepers	WB 7 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	+ -	- -	n.g.

Fortsetzung Tabelle 17

D 93	V07-4-15	Filon	WB Unbekannt Hornhautödem	AT (CB)	-	-	n.g.
D 94	V07-4-17	Louberger	WB 6 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 95	V07-4-37	Flor	WB Unbekannt Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 96	V07-4-45	Wagine	WB Unbekannt Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 97	V07-4-18	Pink Floyd	WB 8 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 98	V07-4-52	Asterix	WB Unbekannt Keratitis	AT (WT) NT (WT)	+ +	- -	n.g.
D 99	V07-5-3	Desperado	WB Unbekannt Keratitis	PBMC AT (WT) NT (WT)	- - -	- - -	-
D 100	V07-5-6	Joice	Quarterhorse 12 Jahre Konjunktivitis	AT (CB)	-	-	n.g.
D 101	V07-5-8	Dyleen	WB Unbekannt Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 102	V07-5-11	Nepomuk	Reitpony Unbekannt Keratitis	PBMC	-	-	-
D 103	V07-5-16	Valeno	WB Unbekannt Keratitis	AT (CB) NT	- -	- -	n.g.

Fortsetzung Tabelle 17

D 104	V07-5-51	Miro	WB Unbekannt Husten	PBMC NT	- -	- -	-
D 105	V07-5-52	World Classic	WB Unbekannt Keratitis	PBMC AT (CB)	- -	- -	-
D 106	V07-5-54	Filou	WB Unbekannt Keratitis	AT (WT) NT (WT)	+ +	- -	n.g.
D 107	V07-5-56	Donna	WB 13 Jahre Keratitis	AT (CB)	-	-	n.g.

Legende: WB- Warmblut
 TB- Englisches Vollblut
 AT- Augentupfer
 NT- Nasentupfer
 PBMC- Periphere , mononukleäre Zellen des Blutes
 Nt- Neutralisationstest
 IFT- Immunfluoreszenstest
 n.g.- nicht gemacht

Tabelle 18: Gruppe 1.1: Ergebnisse der positiven nPCR-Untersuchungen auf EHV-2 und EHV-5 an 6 gesunden Pferden (A1-A6)

Nr.	Interne Nr./ Name	Tag/ Ort Blutentnahme	Rasse	Geschlecht	EHV-5	EHV-2
A 1	A 3/ Lilly	26.9.2006/ Pausin	Warmblut	w	+	-
A 2	A 4/ Goldlady B	26.9.2006/ Pausin	Warmblut	w	+	-
A 3	A 5/ Willaya	26.9.2006/ Pausin	Warmblut	w	+	-
A 4	A 8/ Goldtänzer B	26.9.2006/ Pausin	Warmblut	m	+	+
A 5	A 9/ Daylight B	26.9.2006/ Pausin	Warmblut	w	+	+
A 6	A 10/ Gustav	26.9.2006/ Pausin	Warmblut	m	+	-

Legende: w- weiblich
m- männlich

Tabelle 19: Gruppe 1.2: Ergebnisse der positiven nPCR-Untersuchungen auf EHV-2 und EHV-5 und der serologischen Untersuchungen (Nt; IFT) auf EHV-1 und EHV-4 an 28 kranken Pferden (D1-D28)

Nr.	Interne Nummer	Name	Rasse Alter Symptome	Probenmaterial	EHV-5 PCR	EHV-2 PCR	EHV-1/EHV-4 Serologie
D 1	D2/ V06-8-23	Lukas	WB 6 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT	+ -	- -	-
D 2	D3/ V06-8-31	Shadow	Unbekannt 12 Jahre unspezifisch	AT (CB)	+	-	n.g.
D 3	D4/ V06-8-24	Novelina	WB 10 Jahre Keratitis	AT (CB)	+	+	n.g.
D 4	D14/ V06-4-10	Habib	WB 6 Jahre Hornhauttrübung	AT (CB)	+	+	n.g.
D 5	D17/ V06-5-28	Naughty Nimrod	WB 14 Jahre Keratitis	AT (CB)	+	-	n.g.
D 6	D20/ V06-6-10	Kein Name	Unbekannt Unbekannt Keratitis	AT (CB)	+	+	n.g.
D 7	D30/ V05-12-27	Cascaya	WB 11 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 8	D33/ V06-6-32	Remember	WB 5 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 9	D35/ V06-1-45	Rivar	Aegidienberger 3 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-

Fortsetzung Tabelle 19

D 10	D36/ V06-1-43	Shadow	WB 4 Jahre Hornhauttrübung	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 11	D37/ V06-1-44	Sledge Hammer	Oldenburger 13 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 12	D40/ V06-2-27	Remember	WB 8 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	Nt: 1:20 IFT: 1:10240
D 13	D43/ V06-3-38	Raffaella	WB 3 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 14	D45/ V06-3-46	Cavalliono	WB 5 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 15	D46/ V06-3-39	Martini	WB 12 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 16	D47/ V06-3-55	Malaquina	WB 12 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 17	D48/ V06-3-54	La Irano	WB 12 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 18	D49/ V06-3-48	Remember Rio	WB 10 Jahre Konjunktivitis	PBMC AT (CB)	- +	- -	-
D 19	D71/ V07-1-7	Di Venta	WB 9 Jahre Keratitis	PBMC AT (Cb)	- +	- -	-
D 20	D76/ V07-1-42	One for you	WB 8 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	+ -	- -	-
D 21	D77/ V07-2-4	Winterwald	WB 11 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	+ -	- -	-

Fortsetzung Tabelle 19

D 22	D79/ V07-2-11	Frohsinn	WB Unbekannt Keratitis	PBMC AT (CB)	+	-	-
D 23	D87/ V07-3-30	Paracifica	WB Unbekannt Allergie	PBMC AT (CB)	+	-	-
D 24	D89/ V07-3-33	Folino	WB Unbekannt Allergie	AT (CB)	+	-	n.g.
D 25	D90/ V07-3-37	Fidelia	WB 14 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	+	-	-
D 26	D92/ V07-4-3	Ordage Siepers	WB 7 Jahre Keratitis	PBMC AT (CB)	+	-	n.g.
D 27	D98/ V07-4-52	Asterix	WB Unbekannt Keratitis	AT (WT) NT(WT)	+	-	n.g.
D 28	D106/ V07-5-54	Filou	WB Unbekannt Keratitis	AT (WT) NT (WT)	+	-	

Legende: WB- Warmblut
 AT- Augentupfer
 CB- Cytobrush
 WT- Wattetupfer
 NT- Nasentupfer
 PBMC- Periphere, mononukleäre Zellen des Blutes
 Nt- Neutralisationstest
 IFT- Immunfluoreszenstest
 n.g.- nicht gemacht

Tabelle 20: Gruppe E: Ergebnisse der nPCR-Untersuchungen auf EHV-5 an Konjunktivalgeweben von 14 Schlachtpferden (E1-E14)

Nr.	Interne Nr.	Dissertation Richter (2008)		Dissertation Fetsch (2007)	
		EHV-5-nPCR Untersuchungen an Konjunktivengewebe		EHV-5-nPCR Untersuchungen an Konjunktivengewebe	
		Konjunktiva Rechts (re)	Konjunktiva Links (li)	Konjunktiva Rechts (re)	Konjunktiva Links (li)
E 1	SH 1	-	-	-	-
E 2	SH 2	-	-	-	-
E 3	SH 3	-	-	-	-
E 4	SH 4	-	-	-	-
E 5	SH 5	-	-	-	-
E 6	SH 6	-	-	-	-
E 7	SH 7	-	-	+	+
E 8	SH 8	-	-	-	-
E 9	SH 9	-	-	-	-
E 10	SH 10	-	-	-	-
E 11	SH 11	-	-	-	-
E 12	SH 12	-	-	-	-
E 13	SH 13	-	-	-	-
E 14	SH 14	-	-	-	-

Legende re- rechts

li- links

Tabelle 21: Gruppe F: Ergebnisse der nPCR- und *in-situ*-Untersuchungen auf EHV-5 an Konjunktivalgewebe von 3 Schlachtpferden und 3 klinisch kranken Pferden (F1-F10)

Nr.	Interne Nr.	Gewebe/ Herkunft	Vorbericht/Materialherkunft	EHV-5 nPCR	EHV-5- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
F 1	SH 7 Li Au.	Konjunktiva, Diss. A. Fetsch (Anhang, Tabelle 4)	- Klinisch unauffällig - Schlachthofherkunft	-	+
F 2	SH 7 Re. Au.	Konjunktiva, Diss. A. Fetsch (Anhang, Tabelle 4)	- Klinisch unauffällig - Schlachthofherkunft	-	+
F 3	SH 9 Re. Au.	Konjunktiva, Diss. A. Fetsch (Anhang, Tabelle 4)	- Klinisch unauffällig - Schlachthofherkunft	-	-
F 4	SH 10 li. Au.	Konjunktiva, Diss. A. Fetsch (Anhang, Tabelle 4)	- Klinisch unauffällig - Schlachthofherkunft	-	-
F 5	SH 10 Re. Au.	Konjunktiva, Diss. A. Fetsch (Anhang, Tabelle 4)	- Klinisch unauffällig, - Schlachthofherkunft	-	-
F 6	P 19 li. Au.	Konjunktiva, Diss. M. Ebert (Anhang, Tabelle 2)	- Tod durch Posthepatische Cholestase - Institut für Pathologie FU Berlin	-	-
F 7	P 19 Re. Au.	Konjunktiva, Diss. M. Ebert (Anhang, Tabelle 2)	- Tod durch Posthepatische Cholestase - Institut für Pathologie FU Berlin	-	-
F 8	P 20 li. Au.	Konjunktiva, Diss. M. Ebert (Anhang, Tabelle 2)	- Tod durch Torsio Coli - Institut für Pathologie FU Berlin	-	-

Fortsetzung Tabelle 21

F 9	P 20 Re. Au.	Konjunktiva, Diss. M. Ebert (Anhang, Tabelle 2)	- Tod durch Torsio Coli - Institut für Pathologie FU Berlin	-	-
F 10	P 3 Au.	Konjunktiva Diss. U. Wolfinger	- Klinisch unauffällig, EHV-2 seropositiv - natürlicher Tod	-	-

Legende: re- rechts

li- links

Au- Auge

Tabelle 22: Gruppe P: Ergebnisse der nPCR- und *in-situ*-Untersuchungen auf EHV-5 an PBMC von 5 kranken Pferden (P1-P5)

Nr.	Interne Nr.	Name	Vorbericht	Zellzählung	EHV-5 nPCR	EHV-5- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
P 1	V07-7-10	Cinderella	w; Hornhauttrübung	10 ⁶ Zellen pro ml PBS	-	+
P 2	V07-7-6	Grimm	m; Hornhautulcera/ Keratokonjunktivitis	10 ⁶ Zellen pro ml PBS	-	-
P 3	V07-8-3	Sammy	m; ohne Vorbericht	10 ⁶ Zellen pro ml PBS	-	-
P 4	V07-8-4	Hesa	w; ohne Vorbericht	10 ⁶ Zellen pro ml PBS	-	-
P 5	V07-8-21	Montserrat	w; Hornhauttrübung/ Konjunktivitis	10 ⁶ Zellen pro ml PBS	-	+

Legende: w- weiblich
 m- männlich

8.2 *Liste der eigenen Veröffentlichungen*

Teile der hier vorgelegten Ergebnisse wurden bereits an anderer Stelle präsentiert oder sind veröffentlicht:

Richter, N., Ebert, M., Borchers, K., (2008).

„Prävalenz von EHV-2 und EHV-5-DNA in Augen- und Nasentupferproben sowie in peripheren mononukleären Zellen des Blutes.“

Pferdeheilkunde, gedruckt (2008)

8.3 *Danksagung*

Diese Dissertation wurde am Institut für Virologie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Osterrieder angefertigt. Ihm möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Kerstin Borchers für die Überlassung des Themas. Sie hat mich die ganze Zeit über engagiert unterstützt und war mir mit Ihrer konstruktiven Kritik stets eine große Hilfe. Insbesondere gebührt Ihr mein großer Dank für Ihre schnelle, präzise Korrektur der Dissertation und Ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Virologie möchte ich mich bei Frau Annelie Büchel, Frau Tine Leiskau, Frau Rosi Romeis und bei Frau Ann Leum für Ihre Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Annelie Büchel und Frau Ann Leum, die mich hervorragend in die Laborarbeit eingewiesen und mich zu jeder Zeit unterstützt haben.

Frau Dr. Arndt und dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung danke ich für die statistische Auswertung meiner Daten.

Konstantin Henschen, Daniela Heinemann, Antje Lichtenstein, Marco Ebert und Miriam Steinborn danke ich für Ihre Unterstützung, Ihre Geduld und Ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Weiterhin möchte ich mich namentlich bei folgenden Personen für Ihre Unterstützung bedanken, Markus Barth, Dr. B. Ehlers, Diana Heintze, Dr. Bernd Hensch, Thomas Kleßen, Olivia Kershaw, Dr. M. Köhler, Tom Lichtenstein, Prof. Dr. Lusky, Kunhandan Nair, Harry und Ursula Richter, Frau Speck und Robert Stark.

Herzlichen Dank gebührt Frau Ute Schmidt für das Korrekturlesen meiner Dissertation.

Meinen Eltern Usha und Werner Richter danke ich von ganzem Herzen. Sie haben mich zu dem gemacht, was ich bin, mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich danke Ihnen und meinem Bruder, Paul-Ajoy Richter für Ihre Liebe und bin stolz solch eine Familie zu haben.

8.4 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 18.06.2008

Nadine Richter