

## 1 Einleitung

### 1.1 Allgemeiner Überblick über die Familie der Herpesviren

Die Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*) gehört zu den am weitesten verbreiteten und heterogensten Viren überhaupt und nahezu jede Spezies kann von dieser Virusart infiziert werden (siehe Roizman (1995) zur Übersicht). Doch trotz ihrer weiten Verbreitung und Heterogenität zeichnen sich alle Vertreter durch die folgenden Gemeinsamkeiten aus:

#### *Genomgröße und -form*

Das Genom aller Vertreter der *Herpesviridae* ist mit einer Größenordnung von 120–230 Kilobasenpaaren relativ groß und gehört mit zu den größten überhaupt vorkommenden Virusgenomen. Es besteht aus einem unsegmentierten, linear angeordneten DNA-Doppelstrang.

#### *Morphologische Struktur*

Die doppelsträngige DNA befindet sich im so genannten Innenkörper (Core), der von 162 symmetrisch angeordneten Kapsomeren in Ikosaederform (dem so genannten „Kapsid“) umgeben ist. Core und Kapsid haben zusammen einen Durchmesser von 100 nm. Außen befindet sich die Virushülle, die mit zahlreichen viralen Glykoproteinen besetzt ist. Der Raum zwischen Hülle und Kapsid wird von amorphem Tegument ausgefüllt.

#### *Biologische Eigenschaften*

Herpesviren vermehren sich im Kern der Wirtszelle, den nur die DNA sowie einige Proteine des Virus erreichen, da alle die DNA umgebenden Strukturen (wie Virushülle, Tegument und Kapsid) auf dem Weg durch die Wirtszelle verloren gehen. Auch der Zusammenbau der Kapside (so genanntes „Assembly“) findet im Zellkern statt, wohingegen die Einhüllung des Virus vor allem während der Ausschleusung aus diesem an der inneren Kernmembran erfolgt, zum Teil werden aber auch zytoplasmatische Vakuolen und Vesikel, oder die Plasmamembran zu diesem so genannten „Budding“ genutzt. Am Ende des viralen Replikationszyklus steht die Ausschleusung der Viruspartikel aus der Wirtszelle, die dabei in der Regel zerstört wird.

#### *Fähigkeit der Latenz*

Ein besonderes charakteristisches Merkmal der Herpesviren ist ihre Fähigkeit, in Folge einer akuten Infektion in die so genannte „Latenz“ überzugehen und diesen Zustand unter Umständen lebenslang aufrechtzuerhalten. Mit „Latenz“ wird dabei eine „reversible, nichtproduktive Infektion einer Zelle durch ein replikationskompetentes Virus“ (Garcia-Blanco und Cullen, 1991) bezeichnet. Allerdings kann dieser Zustand durch verschiedene Stimuli (zum Beispiel durch Stress) auch wieder in eine produktive Phase mit Virusvermehrung inklusive Zerstö-

rung der Wirtszelle übergehen (so genannte „Reaktivierung“). Während der Latenz ist oftmals nur eine geringe virale Proteinproduktion nachweisbar, manche Viren stellen diese sogar gänzlich ein und produzieren nur Latenz-assoziierte Transkripte (LAT) (Fraser *et al.*, 1992).

Herpesviren werden aufgrund ihres biologischen Verhaltens und ihrer pathologischen Eigenschaften seit 1981 in drei Subfamilien unterteilt, die so genannten *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaherpesvirinae* ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Herpesviren):

### *Alphaherpesviren*

Vertreter dieser Subfamilie zeichnen sich *in vitro* durch einen kurzen Replikationszyklus sowie ihre schnelle Ausbreitung in der Zellkultur aus. *In vivo* ist ihr relativ breites Wirtsspektrum und die Latenz in neuralem Gewebe (Ganglienzellen) charakteristisch.

Die bekanntesten Herpesviren beim Pferd, EHV-1/ -3 und -4, gehören zu den Alphaherpesviren.

### *Betaherpesviren*

Diese Viren infizieren *in vivo* oft ein engeres Wirtsspektrum als die Alphaherpesviren und verursachen meist mild verlaufende, lang anhaltende Krankheiten. Sie liegen latent vor allem in lymphoretikulärem Gewebe, oder in sekretorischem Drüsen- bzw. Nierengewebe vor. Kennzeichnend für ihren *in vitro*-Vermehrungszyklus ist die langsame Ausbreitung in der Kultur mit einhergehender Riesenzellbildung (so genannte „Cytomegalie“, daher auch die Bezeichnung „Cytomegalovirus“).

Beim Pferd sind bisher keinerlei Vertreter dieser Subfamilie gefunden worden.

### *Gammaherpesviren*

Typischerweise gehen diese Vertreter der Herpesviren in B- oder T-Zellen des Immunsystems in Latenz, können sich aber im lytischen Zyklus auch in Epithelzellen oder Fibroblasten replizieren. Besonders charakteristisch für Gammaherpesviren ist ihre Fähigkeit, infizierte Zellen zu transformieren. Dies führt dazu, dass zelluläre Signale nicht mehr richtig erkannt werden, wodurch der Wirt die Autonomie über diese Zellen verliert, die sich in der Folge neoplastisch-proliferativ vermehren (Meinl *et al.*, 1998). Weiterhin sind sie durch einen langsamen Replikationszyklus *in vitro* und ein eingeschränktes Wirtsspektrum *in vivo* gekennzeichnet.

Das im Mittelpunkt dieser Arbeit stehende Equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2), aber auch das mit diesem eng verwandte EHV-5 gehört zur Unterfamilie der Gammaherpesviren.

Die beiden Alpha-Herpesviren EHV-1 und EHV-4 gehören zu den klinisch relevantesten Herpesviren die weltweit Infektionen mit bedeutendem Ausmaß beim Pferd hervorrufen. Zu-

nächst ging man aufgrund der engen biologischen und immunologischen Verwandtschaft von einem einzigen Typ aus, bis Restriktionsenzymanalysen die endgültige Aufteilung in EHV-1 und -4 bewirkten (Sabine *et al.*, 1981; Studdert *et al.*, 1981; Turtinen *et al.*, 1981; Studdert, 1983; Chowdhury *et al.*, 1986). Mittlerweile ist trotz der hohen antigenetischen Verwandtschaft auch eine serologische Differenzierung der beiden Typen mittels spezifischer ELISA-Methodik (Holloway *et al.*, 1999; Holloway *et al.*, 2000) möglich.

Auch wenn beide Typen grundsätzlich die gleichen Krankheitsbilder hervorrufen können, ist EHV-1 in erster Linie Verursacher von Aborten (daher die Bezeichnung „Equines Abortvirus“ für EHV-1), während EHV-4 respiratorische Erkrankungen hervorruft und als so genanntes „Rhinopneumonitisvirus“ bezeichnet wird (Ludwig *et al.*, 1987; Thein und Brown, 1988; Carrigan *et al.*, 1991; Ostlund, 1993). Die Infektion mit EHV-1 ist dabei eine der Hauptursachen für infektiösen Abort überhaupt und verursacht oftmals schwere wirtschaftliche Verluste (Chowdhury *et al.*, 1986; Matsumara *et al.*, 1992). Dieser so genannte „Stutenabort“ (Spätabort) erfolgt meistens im letzten Drittel der Trächtigkeit, also zwischen dem siebten und zehnten Trächtigungsmonat, auch die Geburt lebensschwacher Fohlen kann vorkommen.

Eine konsequente Impfprophylaxe, wie sie zum Beispiel für Vollblutpferde vorgeschrieben ist, kann die Infektion mit den beiden Viren zwar nicht verhindern, die Krankheitssymptome sind dadurch jedoch deutlich reduziert. Auch die Anzahl der in einem Bestand auftretenden „Stutenaborte“ wird durch die Impfung minimiert, seuchenhafte Aborte werden in der Regel gänzlich verhindert.

EHV-1 und EHV-4 werden noch mit einem weiteren Krankheitsbild in Verbindung gebracht, der so genannten „paretisch-paralytischen“ Verlaufsform der Infektion, die durch neurologische Ausfallserscheinungen gekennzeichnet ist (Ludwig *et al.*, 1987; Thein und Brown, 1988; Thein *et al.*, 1993) und über Paresen und Ataxien zum Festliegen der Tiere führt (Chowdhury *et al.*, 1986). Ein neuester Übersichts-Artikel zu dieser Thematik wurde von Borchers *et al.* (2006b) verfasst.

Ein weiteres Alphaherpesvirus, das Equine Herpesvirus Typ 3 (EHV-3), verursacht lokal begrenzte Deckinfektionen in Form von Bläschenausschlag an der Genitalschleimhaut von Hengsten und Stuten und wird in Anlehnung an das hervorgerufene klinische Bild auch als „Koitalexanthemvirus“ bezeichnet (Thein, 1996). Neben den Veränderungen an der Genitalschleimhaut sind auch Effloreszenzen an Lippen, Nüstern, Nasenschleimhaut und Konjunktiva festgestellt worden (Studdert, 1996). Eine Heilung tritt meist spontan nach zwei bis drei Wochen ein, allerdings können bakterielle Sekundärinfektionen den klinischen Verlauf komplizieren.

## 1.2 Gammaherpesviren und deren wichtigste Vertreter bei den verschiedenen Spezies

Gammaherpesviren zeichnen sich durch eine auffallende genomische Heterogenität mit in verschiedene Abschnitte unterteilten kodierenden Genombereichen aus, in denen sowohl weitgehend konservierte, aber auch variable Gene vorkommen. Selbst konservierte Genombereiche, die für wichtige biologische Eigenschaften (beispielsweise Genregulation und Latenzmechanismen) codieren, sind von dieser Variabilität betroffen (Karlin *et al.*, 1994; McGeoch und Davison, 1999).

Die Gammaherpesviren werden aufgrund ihres Genomaufbaus in zwei Genera unterteilt: das Genus *Lymphocryptovirus* (oder  $\gamma^1$ -Herpesvirus) und das Genus *Rhadinovirus* (bzw.  $\gamma^2$ -Herpesvirus), die antigenetisch nicht miteinander verwandt sind. Bekanntester Vertreter des ersten Genus ist das Epstein-Barr-Virus (EBV), Prototyp des Genus Rhadinovirus ist das Herpesvirus Saimiri (HVS). Beide Genera können aufgrund der Fähigkeit zur Zelltransformation in ihren natürlichen und experimentellen Wirten verschiedene neoplastische, meist lymphoproliferative Erkrankungen auslösen. Weitere Vertreter der beiden Genera mit ihren Wirten sind beispielhaft in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1 Gammaherpesviren: Vertreter der beiden Genera mit ihrem jeweiligen Wirt

Genus: <i>Lymphocryptovirus</i> ( $\gamma^1$ -Herpesvirus)	Wirt	Genus: <i>Rhadinovirus</i> ( $\gamma^2$ -Herpesvirus)	Wirt
Epstein-Barr-Virus (EBV)	Mensch	Herpesvirus Saimiri (HVS)	Neuweltaffe
Lymphotropic Virus of Old World Primates	Primat	Murines Gammaherpesvirus 68 (MHV-68)	Maus
		Humanes Herpesvirus 8 bzw. Karposi Sarkom assoziiertes Herpesvirus (HHV-8 bzw. KSHV)	Mensch
		Rhesus Rhadinovirus (RRV)	Rhesusaffe
		Bovines Herpesvirus Typ 4 (BHV-4)	Rind
		Equines Herpesvirus Typ 2 (EHV-2)	Pferd
		Equines Herpesvirus Typ 5 (EHV-5)	Pferd
		Asinines Herpesvirus Typ 2 (AHV-2)	Esel

Wie aus der Tabelle ersichtlich, werden die beiden equinen Gammaherpesviren EHV-2 und EHV-5 zum Genus Rhadinovirus gerechnet. Neuere Untersuchungen (Telford *et al.*, 1993; Telford *et al.*, 1995) schlagen gar ein drittes Genus vor ( $\gamma^3$ -Herpesvirus) und ordnen EHV-2 und -5 hier ein. Von den meisten Vertretern der  $\gamma^2$ -Herpesviren liegen bereits Sequenz-

analysen vor, aufgrund derer phylogenetische Analysen einzelner Gene durchgeführt wurden. Diese lassen den Schluss zu, dass die evolutionäre Trennung früh erfolgt sein muss, so dass sich jedes einzelne Virus spezifisch an seinen jeweiligen Wirt anpassen konnte, wodurch es zur Entwicklung einer homologen Überlebensstrategie gekommen ist.

Ein besonderes Charakteristikum der Gammaherpesviren ist ihre ausgeprägte Fähigkeit zur „Piraterie“ wirtszelleigener, immunmodulierender und immunregulierender Gene, die vor allem durch die genomische Struktur der Viren begünstigt wird. Denn aufgrund der hohen Anzahl repetitiver, nicht-codierender Sequenzen können Gammaherpesviren zusätzliche DNA-Sequenzen aufnehmen, ohne dabei eigene genomische Information zu verlieren (Albrecht *et al.*, 1998). Da  $\gamma$ -Herpesviren außerdem bevorzugt lymphatische Zellen latent infizieren, in denen ja besonders viele Gene für Zytokine, Membranrezeptoren etc. transkribiert werden, wird diese Fähigkeit noch begünstigt. Als Latenzorte wurden diverse lymphatische Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen (bei MVH-68), Monozyten (bei BHV-4) oder T-Zellpopulationen (bei Herpesvirus saimiri und ateles) ermittelt, wohingegen EBV und KSHV sowohl epitheliale, als auch B-Zellen latent infizieren können (Kieff, 1996; Rickinson und Kieff, 1996; Schulz, 2000). Während der Latenzphase werden in diesen Zellen Gene exprimiert, die vor allem für zellhomologe Proteine codieren und das Immunsystem auf unterschiedlichste Weise beeinflussen: Komplementfaktoren, Zytokine und Membranrezeptoren dienen in erster Linie jedoch dem Überleben des Virus (Ward und Roizman, 1998). Teilweise werden aber auch funktionelle virale Proteine synthetisiert, wie zum Beispiel bei HHV-8 das die episodale Replikation steuernde Protein „LANA“ (Friborg *et al.*, 1999).

Ungeklärt ist jedoch, welche Mechanismen zum Übergang des latenten in den lytischen und somit produktiven Zyklus führen. Während es einen geringen Zellanteil gibt, der stets produktiv infiziert zu sein scheint, wird die Reaktivierung aus dem latenten Zustand offensichtlich bei einem immunsupprimierten Wirt begünstigt. Demnach führen Stress oder Glukokortikoidgaben dazu, dass infektiöses Virus erneut extrazellulär auftritt und es dadurch zur Manifestation klinischer Symptome kommen kann. Für *in vitro* Methoden besteht hingegen die Möglichkeit, den lytischen Zyklus in latent infizierten Zellen mittels Butyraten und Phorbolestern auszulösen (zur Hausen *et al.*, 1978; Tenney und Morahan, 1987).

Obwohl Gamma-Herpesviren sehr weit verbreitet sind und eine Wirtsinfektion in der Regel sehr früh im Leben erfolgt, kommt es nur sehr selten zur Ausprägung eines Krankheitsbildes und die meisten Infizierten sind asymptomatische Virusträger.

Beim Menschen spielt vor allem das  $\gamma^1$ -Herpesvirus EBV eine bedeutende Rolle und es ruft drei verschiedene Krankheitsbilder hervor: Burkitt's Lymphoma (BL), Nasopharyngeales

Karzinom (NPC) und das wohl bekannteste Bild der infektiösen Mononucleosis („Pfeiffersches Drüsenfieber“) (Klein, 1976). Während BL in Afrika endemisch und meist mit Malariainfektionen assoziiert ist, kommt NPC hauptsächlich im Südosten Asiens vor, mit einer hohen Prävalenz bei Menschen mit chinesischer Abstammung. Das „Pfeiffersche Drüsenfieber“ ist das am häufigsten mit einer EBV-Infektion assoziierte Krankheitsbild, mit einer Inkubationszeit von 30 bis 50 Tagen und der Ausbildung von zunächst relativ milden Symptomen wie Kopfschmerz, Müdigkeit und Unwohlsein. Ein schmerzhafter Rachenraum mit hyperämischen und hyperplastischen Lymphknoten in diesem Bereich, grau belegte Tonsillen sowie bis zu zehn Tage andauerndes Fieber (39,5°C und höher) kommen hinzu. Allmählich entwickeln die infizierten Personen eine generelle Lymphadenopathie und bis zu 50% der Patienten bilden eine Milzschwellung aus. Bei zehn Prozent der Infizierten tritt außerdem eine Lebervergrößerung auf (Miller, 1990). Auch zentralnervöse Störungen wurden beobachtet (Schiff *et al.*, 1982).

Das Bovine (Gamma)Herpesvirus Typ 4 (BHV-4) wurde sowohl bei klinisch gesunden Tieren, als auch bei Rindern mit äußerst variablen klinischen Symptomen und unter anderem aus den folgenden Organsystemen isoliert: Respirationstrakt, Magen-Darmbereich, Haut und Augen. Bei experimentell mit unterschiedlichen BHV-4-Isolaten infizierten Kälbern konnte nur ein bestimmter BHV-4-Strang (85/BH 16TV) mild verlaufende, grippeähnliche Symptome bei den infizierten Tieren hervorrufen, der Nachweis infektiösen Virus aus dem Zentralen Nervengewebe der Tiere gelang hingegen bei mehreren Strängen (Castrucci *et al.*, 1987). Auch mit der Auslösung von Aborten beim Rind wird BHV-4 in Verbindung gebracht (Smith, 1997).

### **1.3 Die equinen Gammaherpesviren EHV-2 und EHV-5**

#### **1.3.1 Taxonomische Stellung, biologische Eigenschaften und Epidemiologie**

Die beiden Gammaherpesviren des Pferdes, EHV-2 und EHV-5, wurden erst im Jahre 1987 als voneinander unabhängige Viren definiert (Browning und Studdert, 1987b), nachdem man bis dato aufgrund ihrer hohen genetischen und antigenetischen Varianz von einem identischen Virus ausging. Browning und Studdert (1987b) konnten jedoch mittels Restriktionsenzymanalysen und anschließender Hybridisierungsversuche diverser Isolate zeigen, dass es sich um zwei verschiedene Virustypen handelt. Beide Viren wurden auch zunächst zur Familie der Betaherpesviren gezählt, da sie in der Zellkultur ein sehr langsames Wachstum zeigten. Später erfolgte jedoch eine Reklassifizierung von EHV-2 und EHV-5 in die Familie der Gammaherpesviren, wo sie dem Genus Rhadinovirus zugeordnet wurden (Telford *et al.*, 1993; Telford *et al.*, 1995). Die größte genomische Ähnlichkeit innerhalb der Gammaherpesviren besitzt EHV-2 mit HHV-8, wohingegen es sich von EBV und HVS-2 deutlicher unter-

scheidet. Vermutlich sind EHV-2 und EHV-5, ebenso wie HVS-2, auch gleich weitläufig mit EBV verwandt (Browning und Studdert, 1989a; Agius *et al.*, 1992).

Die Genomstruktur von EHV-2 bzw. EHV-5 weist ein lineares, doppelsträngiges, als einzelnes Isomer vorliegendes 192 respektive 179 kbp langes DNA-Molekül auf (Browning und Studdert, 1989a; Colacino *et al.*, 1989; Agius *et al.*, 1992; Telford *et al.*, 1995). Während bei EHV-2 jedoch zahlreiche komplexe, kurze, indirekte Wiederholungen in das durchgängige Genom eingefügt sind, die von 18 kbp langen, direkten Wiederholungen an den Enden begrenzt werden (Browning und Studdert, 1989a), besitzt EHV-5 solche Wiederholungssequenzen nicht (Agius *et al.*, 1992). Aufgrund seines durchgängigen Genoms mit den intern integrierten, indirekten Wiederholungssequenzen wird EHV-2 auch in die Genomgruppe A (weitere Einteilungsmöglichkeit der Herpesviren anhand der Lokalisation und Orientierung ihrer unigenen und repetitiven Genssequenzen im Genom) eingeordnet, wohingegen EHV-5 zur Genomgruppe F zählt, da es diese repetitiven Sequenzen nicht hat.

Beide Viren weisen eine sechzig prozentige Homologie in ihrem Aminosäuremuster sowie in ihrer DNA-Sequenz bezogen auf die konservierten Regionen des Genoms auf (Agius und Studdert, 1994). Unterschiede zwischen EHV-2 und -5 in hochkonservierten Genregionen, wie zum Beispiel beim Glykoprotein B, äußern sich meistens sogar nur in der Substitution bzw. dem Fehlen von zwei bis drei Aminosäuren (Holloway *et al.*, 1999). Aufgrund dieser großen Ähnlichkeit von EHV-2 und -5 erscheint es auch nahe liegend, dass nicht eingehender charakterisierte Isolate in der Vergangenheit fälschlicherweise als EHV-2 identifiziert wurden, obwohl es sich dabei eigentlich um ein EHV-5-Isolat gehandelt hat.

EHV-2 ist in der Pferdepopulation sehr weit verbreitet, wie die hohe Nachweisrate des Virus in den peripheren Blutleukozyten (PBL) mittels Kokultivierung zeigt: bei je 89% von 71 Pferden aus den USA (Kemeny und Pearson, 1970) respektive 19 Pferden aus England (Roeder und Scott, 1975), 77% von 13 Pferden in der Schweiz (Schlocker *et al.*, 1995) sowie 31% von 172 klinisch gesunden und kranken Pferden in Deutschland (Borchers *et al.*, 1997) wurde EHV-2 erfolgreich isoliert. Mittels der Polymerasekettenreaktion wurden bei 51% von 172 Pferden EHV-2 positive Lymphozyten nachgewiesen (Borchers *et al.*, 1997). Über das Vorkommen von EHV-5 in der Pferdepopulation ist hingegen weit weniger bekannt. In 13 von 70 Pferden wiesen Reubel *et al.* (1995) EHV-5 in den PBL mittels PCR nach und bei 38 von 114 Pferden in Neuseeland konnten aus Lymphozyten oder Nasentupfern gewonnene Isolate mittels PCR als EHV-5 identifiziert werden (Dunowska *et al.*, 1999). In neueren Untersuchungen wurden Fohlen und adulte Pferde aus den unterschiedlichsten Ländern auf das Vorhandensein von EHV-2 und -5 in den PBL und in Nasentupfern mittels PCR untersucht: bei adulten Tieren erwiesen sich bis zu 71% von 21 Pferden in England als EHV-2-PBL

positiv, während EHV-5 bei bis zu 24% dieser Pferde in den PBL nachgewiesen wurde. Die im Vergleich zu EHV-2 deutlich geringere Detektionsrate von EHV-5 in den PBL beim Fohlen lässt den Schluss zu, dass die Infektion mit EHV-5 erst im späteren Fohlenalter erfolgt (Nordengrahn *et al.*, 2002). Ruszczuk *et al.* (2004) kokultivierten wiederum aus den PBL von 139 klinisch gesunden und kranken Pferden in Polen insgesamt 34 Isolate und identifizierten diese mittels der PCR als EHV-2. Mit 79,7% wurde auch in Argentinien eine hohe Seroprävalenz des EHV-2 in einer 153 Tiere umfassenden Vollblutpferdegruppe ermittelt, bei zwei von 22 Pferden mit respiratorischen Symptomen gelang zudem die Isolation des Virus aus Nasentupfern (Craig *et al.*, 2005).

Das Vorkommen beider Viren ist nicht nur auf die Hauspferdepopulation beschränkt, da bei 19 von 20 Zebras in Namibia (Borchers *et al.*, 2005b) und bei 93% von 55 Wildpferden und Zebras in deutschen Zoos Antikörper gegen EHV-2 und EHV-5 nachgewiesen wurden (Borchers *et al.*, 1999). Bei 51 Burchell's Zebras des Serengeti National Park wurden hingegen keine Antikörper gegen EHV-2 gefunden (Borchers *et al.*, 2005b). Denkbar wäre, dass bei Wildequiden - ähnlich wie bei EHV-1 (Montali *et al.*, 1985 ; Wolff *et al.*, 1986) - eigene Virus-Varianten von EHV-2 und EHV-5 vorkommen, die sich in ihrem antigenetischen und genomischen Profil von den bei Hauspferden existierenden Virussträngen unterscheiden.

Außer aus den PBL gelang der Nachweis von EHV-2 und -5 auch aus Nasen-, Augen- und Vaginalsekret, wohingegen eine vertikale Infektion durch EHV-2 nicht stattfindet, da das Virus bei neugeborenen Fohlen und auch bei Feten nicht nachzuweisen ist (Harden *et al.*, 1974; Studdert, 1974). Vielmehr erfolgt die Infektion der Fohlen horizontal innerhalb der ersten zwei bis sechs Lebensmonate (Turner *et al.*, 1970; Fu *et al.*, 1986; Nordengrahn *et al.*, 2002), die Fohlen verbreiten die Infektion dann untereinander weiter. Eine Infektion der Fohlen mit EHV-5 erfolgt dabei zu einem späteren Zeitraum, als bei EHV-2 (Dunowska *et al.*, 2002; Nordengrahn *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2006). Üblicherweise sind auch die von Fohlen und ihrem Muttertier ausgeschiedenen EHV-2-Stämme bei ganz jungen Fohlen im Alter von einem Monat identisch, während diese bei älteren Fohlen differieren (Bell *et al.*, 2006). Mayr und Thein (1984) hingegen gehen aufgrund wiederholter Isolierungen von EHV-2 aus fetalen Organen davon aus, dass eine Übertragung des EHV-2 auch intrauterin erfolgen kann. Durch den Geburtsstress soll dann die Aktivierung der latenten Infektion ausgelöst werden, in deren Folge es beim Fohlen in der peri- und postnatalen Phase zur klinischen Manifestation kommt (Mayr und Thein, 1984). Auch Galosi *et al.* (2005) zeigten die Möglichkeit einer transplazentaren Übertragung auf, indem sie EHV-2 in der Lunge eines abortierten Feten nachwiesen, ohne jedoch darin einen ätiologischen Zusammenhang zu sehen.



Aufgrund der hohen genetischen und antigenetischen Variabilität von EHV-2, in einem für Herpesviren ungewöhnlichen Ausmaß (Browning und Studdert, 1989b; Borchers *et al.*, 1997; Holloway *et al.*, 2000) sind innerhalb der Bestände auch zahlreiche Re- und Superinfektionen möglich. Die bei der Kokultivierung von EHV-2 aus den peripheren Blutleukozyten von augenkranken und augengesunden Pferden gewonnenen Isolate mit individuellen Restriktionsenzymprofilen (Kershaw *et al.*, 2001) können als weitere Bestätigung dieser genomischen Variabilität von EHV-2 angesehen werden. Borchers *et al.* (1998) vermuten in diesem Zusammenhang einen stammspezifischen Gewebetropismus mit möglicher pathogener oder apathogener Kapazität von EHV-2. Auch von EHV-5 wurden aus dem Nasentupfer eines Pferdes mindestens zwei unterschiedliche Genotypen angezüchtet (Dunowska *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Latenzverhalten und Gewebetropismus

Eine Primärinfektion mit EHV-2 führt wie bei allen anderen Herpesviren auch zu einer lebenslangen Latenz. Der Gewebe- und Zelltropismus von EHV-2 ist dabei ausgesprochen vielfältig, so konnte EHV-2 in respiratorischen, nervalen und lymphatischen Geweben gefunden werden (Borchers *et al.*, 1998). Da EHV-2 in den zirkulierenden Blutleukozyten bei nahezu 90% von 80 respektive 19 adulten Pferden mittels Virsanzucht isoliert (Kemeny und Pearson, 1970; Roeder und Scott, 1975), bzw. bei 31% von 172 Pferden mit den unterschiedlichsten klinischen Symptomen kokultiviert werden konnte (Borchers *et al.*, 1997), werden diese lymphatischen Zellen auch als Latenzorte von EHV-2 favorisiert. Drummer *et al.* (1996) vermuten, dass EHV-2, wie andere Mitglieder der Gammaherpesviren auch, in den B-Lymphozyten latent vorliegt, da das Virus in diesen Zellen nur mittels Kokultivierung nachgewiesen werden konnte, während freies infektiöses Virus nicht vorhanden war. Auch aus Makrophagen konnte EHV-2 kokultiviert werden (Dutta und Campbell, 1978; Schlocker *et al.*, 1995). Aufgrund des PCR-Nachweises von EHV-2 vermuten andere Autoren wiederum nervele Gewebe wie das Trigemininalganglion (Rizvi *et al.*, 1997; Borchers *et al.*, 1998) als möglichen Latenzort. Auch das Ganglion ciliare wird in diesem Zusammenhang aufgeführt (Thein, 1976; Thein, 1978). Nach natürlicher Infektion wurde EHV-2 aus den folgenden Geweben isoliert: Knochenmark, Milz, Milch- und Speicheldrüse, Niere sowie Uterus (Browning und Studdert, 1987a). Im Augengewebe gelang die Kultivierung von EHV-2 in Kornea und Konjunktiva (Thein und Böhm, 1976; Thein und Hartl, 1976b; Thein, 1978). Rizvi *et al.* (1997) und Wolfinger (1998) wiederum konnten auch im zentralen und peripheren Nervengewebe (Choroid Plexus Region im Gehirn, Bulbus olfactorius, Trigemininalganglion) EHV-2 mittels PCR detektieren. In welchen Geweben EHV-5 in Latenz geht, wurde hingegen bis dato noch nicht näher untersucht.

Über die Latenz-Mechanismen von EHV-2 ist noch wenig bekannt. Interessanterweise besitzt EHV-2 im Gegensatz zu anderen Gammaherpesviren wie dem humanen EBV in seinem Genom keine für Latenz codierenden Gene. Möglicherweise spielt aber das virale Interleukin-10-Gen (vIL-10) von EHV-2, das eine 84%ige DNA- und Aminosäuren-Homologie gegenüber zellulärem und EBV IL-10 aufweist (Rode *et al.*, 1994), eine Rolle bei der Latenz-Etablierung und -Aufrechterhaltung des Virus. Auch EHV-5 besitzt ein solches vIL-10-Gen (Telford *et al.*, 1993). Zelluläres IL-10 (cIL-10) ist ein von aktivierten T-Zellen und Monozyten produziertes und in erster Linie antiinflammatorisch wirkendes Cytokin, das eine bedeutende regulatorische Funktion in den späteren Phasen der Immunantwort einnimmt und diverse Effekte auf die meisten hämatopoetischen Zelltypen ausübt. Neben der prinzipiellen antiinflammatorischen Wirkung reguliert cIL-10 unter anderem auch das Wachstum und die Differenzierung von natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten (Moore *et al.*, 2001). So stimuliert cIL-10 die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und steigert die Lebensfähigkeit von B-Zellen *in vitro* (Rousset *et al.*, 1992). Außerdem beeinflusst cIL-10 die T-Lymphozyten, in dem es die Makrophagen-vermittelte T-Zellaktivierung inhibiert (Delves und Roitt, 1998).

Denkbar wäre, dass virales IL-10 einen Einfluss auf die Immunantwort der mit EHV-2 infizierten Pferde hat. Möglicherweise rufen diese das Wirtsabwehrsystem unterlaufenden Mechanismen von EHV-2 so direkt klinisch feststellbare Erkrankungen hervor, oder aber sie begünstigen Sekundärinfektionen. So wurde EHV-2 von verschiedenen Autoren (Schlocker *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 1996) im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen beim Fohlen genannt. Nordengrahn *et al.* (1996) vermuteten einen Zusammenhang zwischen EHV-2 und einer Infektion mit *Rhodococcus equi* bei Fohlen, da die Prävalenz einer *Rhodococcus equi* Pneumonie nach einer EHV-2-Impfung verringert werden konnte.

### 1.3.3 Klinische Bedeutung

Die exakte ätiopathogenetische Bedeutung von EHV-2 ist noch weitgehend ungeklärt, nach Meinung von Studdert (1974) finden viele Infektionen sogar ohne offensichtliche Krankheitserscheinungen statt, da bei den meisten Pferden Antikörper nachgewiesen werden können. Der prozentuale Anteil serologisch positiver Pferde schwankt dabei zwischen 50 und 100 Prozent (Bagust *et al.*, 1972; McGuire *et al.*, 1974; Rose *et al.*, 1974; Pálfi *et al.*, 1978; Belak *et al.*, 1980; Borchers *et al.*, 1997; Kershaw *et al.*, 2001), wobei mittels der angewendeten ELISA- (Enzym-linked-immunosorbent-Assay) bzw. NT- (Neutralisationstest) Methodik keine Unterscheidung zwischen EHV-2 und -5 möglich ist. Dennoch wird EHV-2 auch mit zahlreichen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht: Fieber, Inappetenz, Lymphadenopathie, allgemeine Leistungsschwäche und Immunsuppression (Pálfi *et al.*, 1978; Belak *et al.*, 1980; Fu *et al.*, 1986; Browning und Studdert, 1988) sowie Keratokonjunktivitis superficialis (Thein

und Böhm, 1976; Miller *et al.*, 1990). Außerdem ist EHV-2 mit relativer Sicherheit an respiratorischen Erkrankungen (vor allem der oberen Luftwege) beteiligt. Auch EHV-5 wurde von Pferden mit respiratorischen Symptomen isoliert (Browning und Studdert, 1987a).

Eine Beteiligung von EHV-2 an respiratorischen Erkrankungen, entweder als auslösendes oder als wegbereitendes Agens, wurde von mehreren Autoren vor allem beim Fohlen diskutiert (Plummer und Waterson, 1963; Studdert *et al.*, 1970; Studdert, 1971; Roberts *et al.*, 1974; Rose *et al.*, 1974; Thein und Hartl, 1976a; Belak *et al.*, 1980; Borchers *et al.*, 1997). So stellten Murray *et al.* (1996) einen signifikanten Unterschied in der Nachweishäufigkeit von EHV-2 im Trachealsekret von 50 respiratorisch kranken und klinisch gesunden Fohlen fest: in nur einem von 20 gesunden, aber 20 von 30 erkrankten Tieren wurde EHV-2 isoliert, ein Nachweis von EHV-2 in den PBL gelang hingegen bei nahezu allen Tieren. Eine mehr wegbereitende Rolle des EHV-2 wurde hingegen bei Fohlen im Alter von drei bis zwölf Wochen postuliert: nachdem die Tiere anfänglich durch leichtes Fieber, Apathie und serösen Nasenausfluss in Korrelation mit einem signifikanten Anstieg der Antikörper gegen EHV-2 im Serum aufgefallen waren, entwickelten diese eine schwere Pneumonie mit hohem Fieber, an der viele Fohlen starben und die durch eine bakterielle Sekundärinfektion mit *Rhodococcus equi* verursacht worden war (Pálfi *et al.*, 1978). Indizien für die Bedeutung von EHV-2 als Wegbereiter bei bakteriellen Infektionen des Respirationstraktes, allen voran für *Rhodococcus equi*, konnten auch Nordengrahn *et al.* (1996) aufzeigen: in der im Abstand von vier Wochen wiederholt mit einer aus selektiven Glykoproteinen des EHV-2 zusammengesetzten so genannten „subunit“-Vakzine immunisierten Fohlengruppe war das Auftreten verlustreicher Atemwegserkrankungen im Vergleich zur einmalig bzw. nicht immunisierten Kontrollgruppe deutlich verringert. Durch Thein *et al.* (1994) und Varga *et al.* (1997) wurden diese Ergebnisse bestätigt. Auch Belak *et al.* (1980) gelang es, Fohlen vor der Entwicklung respiratorischer Symptome durch die wiederholte Verbreichung eines EHV-2-Hyperimmunserums zu schützen. Fu *et al.* (1986) diskutierten eine mögliche immunsupprimierende Wirkung von EHV-2, durch die respiratorische Erkrankungen bei Fohlen hervorgerufen wurden.

Beim so genannten „poor performance“-Syndrom wird ein deutlicher Leistungsabfall bei jungen, im Training stehenden Rennpferden beobachtet, für den neben nichtinfektösen, auch infektiöse Ursachen wie Herpes- oder Rhinoviren in Frage kommen (Burrows, 1970). So wurde zwar bei verschiedenen Rennpferden, bei denen ein Konditionsverlust mit intermittierendem Fieber, milder Pharyngitis und Lymphangitis festgestellt wurde, kein spezifischer ursächlicher Erreger isoliert und die Pferde wiesen auch lediglich eine zeitlich begrenzte, reduzierte Lymphozytenfunktion auf. Auffällig war jedoch der Titeranstieg der virusneutralisierenden Antikörper gegen EHV-2 und Rhinoviren im ELISA respektive NT der bei zwei, im

Abstand von fünf Wochen durchgeführten Beprobungen festgestellt wurde. Als einziges Virus konnte EHV-2 dabei auch aus den zirkulierenden Lymphozyten zweier Pferde mittels Kokultivierung isoliert werden (Jensen-Waern *et al.*, 1998).

Wie schwierig jedoch die Zuordnung eines eindeutigen Krankheitsbildes zu einer EHV-2-Infektion ist, zeigt die Untersuchung von 172 Pferden mit oberen Atemwegserkrankungen, Ataxien bzw. Aborten, bei der zwar nahezu alle Pferde seropositiv für EHV-2 im Immunfluoreszenztest waren und das Virus auch in den PBL von 51% der Tiere mittels PCR nachgewiesen werden konnte, aber dennoch keine Beziehung zwischen den Erkrankungen und dem Virusnachweis gefunden wurde (Borchers *et al.*, 1997). Interessanterweise wurde EHV-2 auch relativ häufig in Kombination mit EHV-1/-4 isoliert, weshalb man einen direkten Einfluss von EHV-2 auf die Reaktivierung der beiden Alphaherpesviren vermutet (Edington *et al.*, 1994). Die klinischen Symptome von Pferden mit einer EHV-2- bzw. EHV-5-Infektion weisen somit insgesamt auffällige Parallelen zu den durch andere Gammaherpesviren, wie dem humanen Epstein-Barr-Virus (EBV) oder dem bovinen Herpesvirus Typ 4 (BHV-4), hervorgerufenen Krankheitsbildern auf (Agius und Studdert, 1994).

Die Bedeutung des EHV-2 bei entzündlichen Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva des Pferdes soll im folgenden Kapitel (1.4) näher beschrieben werden.

### **1.4 EHV-2 und seine Rolle bei der Keratokonjunktivitis des Pferdes**

Dass entzündliche Erkrankungen der Konjunktiva (Bindehaut) und Kornea (Hornhaut) des Pferdes durch die verschiedensten nicht-infektiösen und infektiösen Ursachen ausgelöst sein können, erscheint naheliegend: insbesondere traumatische Verletzungen, äußere Reize wie Staub oder ähnliche, Bakterien, Parasiten, Pilze und auch autoimmunvermittelte Erkrankungen müssen hierbei genannt werden (zur Übersicht siehe Nasisse und Nelms (1992)). Oftmals bereiten dabei äußere Reize auch den Weg für ein infektiöses Agens (Stades *et al.*, 1998). Ursächlich kommen zusätzlich auch virale Erreger, wie equine Adeno- und Influenzaviren (Gleeson *et al.*, 1978), das Equine Infektiöse Anämievirus (EIAV), das Equine Arteritis Virus (EAV) und EHV-1/4 in Frage. Prinzipiell können Horn- und Bindehaut gemeinsam, oder auch unabhängig voneinander betroffen sein, wobei die Veränderungen ihre Ursache primär direkt im Auge haben, oder aber im Zusammenhang mit einer systemischen Erkrankung entstehen (Lavach, 1990; Stiles, 1999).

Einen ersten Zusammenhang zwischen einer klassischen Keratokonjunktivitis superficialis beim Pferd und EHV-2 stellten Thein und Böhm (1976) auf, denen die Kultivierung des EHV-2-Isolates T16 aus der Korneabiopsie eines an Keratokonjunktivitis erkrankten vier Wochen

alten Warmblutfohlens gelang, das aus einem Bestand mit gehäuftem Auftreten von Keratokonjunktivitis bei gleichzeitigem Anstieg der EHV-2-Neutralisationstiter stammte. Auch in experimentellen Infektionsstudien mit EHV-2 gelang es Thein (1976; 1978) eine Keratokonjunktivitis superficialis bei Pferden auszulösen. Borchers *et al.* (1998) vermuten eine stamm-spezifische Beteiligung von EHV-2 an der Konjunktivitis des Pferdes, da *post mortem* bei zwei experimentell mit den beiden EHV-2-Stämmen LK4 und T16 infizierten Ponys eine unterschiedliche Verteilung der Stämme im Gewebe festgestellt wurde: Dabei wurde der von Thein (1976) isolierte Stamm T16 ausschließlich in der Konjunktiva detektiert. Aufgrund der Tatsache, dass sich unterschiedliche Keratokonjunktivitisfälle mit dem gegen DNA-Viren wirksamen Nukleosidanalogen Idoxuridine therapieren ließen (Matthews und Handscombe, 1983; von Oppen *et al.*, 2001), deutet vieles auf eine Virusgenese bei der Erkrankung hin. Auch in den USA wurde der Fall einer an Keratitis erkrankten Vollblutzuchtstute bekannt, bei der EHV-2 aus Konjunktivalgeschabsel isoliert und die erfolgreich mit dem Nukleosidanalogen Trifluridine behandelt werden konnte (Miller *et al.*, 1990). Schließlich zeigten Collinson *et al.* (1994) einen enzootischen Ausbruch mit Konjunktivitis, Keratopathie, Epiphora und teilweise auch mit eitrigem Augenausfluss bei 35 von 80 Fohlen eines Bestandes, in dem auch respiratorische Erkrankungen zuvor gehäuft auftraten. Ihnen gelang ebenfalls die Isolierung von EHV-2 aus Augen- und Nasentupfern und auch hier zeigte sich Idoxuridine als in den meisten Fällen wirksames antivirales Medikament.

In neueren Studien wurden 29 an einer Keratokonjunktivitis oder Keratitis erkrankte Pferde und 21 gesunde Pferde auf das Vorhandensein von EHV-2 in Augen-, Nasen- und/oder Tracheobronchialsekretproben hin untersucht (Kershaw *et al.*, 2001; von Oppen *et al.*, 2001) und es zeigte sich, dass EHV-2 bei zwölf der erkrankten, aber nur bei zwei der gesunden Pferde mittels nested PCR detektiert werden konnte. Somit ließ sich EHV-2 bei den augenkranken Pferden signifikant häufiger nachweisen, als bei den augengesunden Pferden. Die erfolgreiche Therapie von neun von 16 augenkranken Pferden mit Trifluridin konnte die ätiologische Beteiligung von EHV-2 ebenfalls bestätigen. Krüdwagen *et al.* (2001) konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Häufigkeit des Vorkommens von EHV-2 bei 14 augenkranken und zwölf augengesunden Pferden feststellen und wiesen insgesamt bei neun Pferden auch EHV-5 im Auge nach. Interessant ist hierbei insbesondere der häufige Nachweis von EHV-2 im gesunden Auge. So erwiesen sich in der Studie von Besthorn (2002) gesunde im Vergleich mit kranken Augen häufiger als EHV-2-PCR positiv (20% von 104 gesunden, aber nur 14% von 81 kranken Augen). EHV-5 wurde dabei sogar signifikant häufiger im gesunden, als im kranken Auge per PCR nachgewiesen: in 41% der gesunden, aber nur 22% der kranken Augen. Weiterhin wurden in 13 gesunden und drei kranken Augen Doppelinfektionen mit EHV-2 und -5 festgestellt. McMullen (2003) wies EHV-2-Genom mit

einer 30%igen Nachweisrate in 13 von 46 Augen nach, allerdings fehlte hier die Untersuchung einer Kontrollgruppe.

Durch neuere Tupferprobenentnahmetechniken mittels so genannter „Cytobrush-Tupfer“, die sich als wesentlich sensitiver gegenüber herkömmlichen Wattetupfern erwiesen haben, konnte die Nachweishäufigkeit von EHV-2 aus dem Auge noch gesteigert werden (Ebert *et al.*, 2003; von Borstel, 2003). Allerdings zeigte sich hier, dass beim Vergleich von augenkranken mit augengesunden Pferden weder in den Cytobrushproben, noch in den Wattetupfern ein signifikanter Unterschied im Nachweis von EHV-2 bestand. Als mögliche Ursache hierfür wird die mittels des Cytobrush-Tupfers von der Konjunktiva gewonnene, und im Vergleich zum Wattetupfer wesentlich höhere Zellzahl diskutiert, durch die möglicherweise in der Konjunktiva latent vorliegendes Virus nachgewiesen wird (Ebert *et al.*, 2003).

Serologisch lässt sich keine Korrelation zwischen einer Augenerkrankung und einer EHV-2 Infektion herstellen (Kershaw *et al.*, 2001; von Oppen *et al.*, 2001). So sind bis zu 90% der Pferde weltweit seropositiv und damit möglicherweise latente Virusträger, wobei B-Lymphozyten als Latenzort gelten (Drummer *et al.*, 1996). EHV-2 lässt sich aber nur bei 30-70% der Pferde in peripheren Blutleukozyten per PCR oder Virusanzucht nachweisen und zwar bei klinisch gesunden, wie auch bei Pferden mit unterschiedlichen Krankheitsbildern (Borchers *et al.*, 1997), was eher auf eine Neuinfektion bzw. Reaktivierung schließen lässt. Serumpaaranalysen, wie sie für die Diagnostik von Virusinfektionen üblich sind (Erpenstein *et al.*, 2002), wurden nur in wenigen Fällen vorgenommen, zeigten aber bei Augenerkrankungen in der Regel keinen signifikanten EHV-2 Titeranstieg (Kershaw *et al.*, 2001). Auch dieser Befund könnte ein Indiz für eine Reaktivierung latenter Viren sein. Ergebnisse an experimentell mit EHV-2 infizierten Pferden, die zwar 18 Tage nach intranasaler Infektion einen signifikanten Titeranstieg zeigten, nicht aber nach Reaktivierung (Borchers *et al.*, 1998), untermauern diese Vermutung.

Insgesamt ist die klinische Bedeutung von EHV-2 im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva fraglich, zumindest unklar, da bis dato lediglich einmal ein Zusammenhang zwischen EHV-2 und dem Merkmal „augenkrank“ bei der vergleichenden Untersuchung von Tupferproben von augenkranken und gesunden Pferden mittels nested PCR festgestellt werden konnte (Kershaw *et al.*, 2001). Zudem konnten weder mittels Kokultivierung bzw. PCR Untersuchung der PBL, noch mittels Serologie signifikante Unterschiede zwischen augenkranken und gesunden Pferden erzielt werden.

Bisher ungeklärt ist auch, weshalb EHV-2 und EHV-5 so häufig in Augen-, Nasentupfern und unterschiedlichen Gewebeproben von klinisch gesunden Pferden detektiert werden können. So wiesen Ebert *et al.* (2003) in verschiedenen Augengeweben von 13 pathologisch unter-

suchten augengesunden Pferden EHV-2 mittels nPCR bei 62% der Pferde in der Konjunktiva, außerdem bei 31% in den Tränendrüsen und bei 15% im Nervus opticus nach. Insbesondere die hohe Detektionsrate des EHV-2 in der Konjunktiva könnte dabei auf eine mögliche Latenz des Virus in diesem Gewebe hindeuten (Ebert, 2003). Von experimentellen Infektionsstudien mit Mäusen ist bekannt, dass EHV-2-Genom, in Abwesenheit klinischer Symptome und infektiösen Virus, bis zu 30 Tage post infectionem in der Lunge, der Milz und dem Augapfel präsent ist, was auf eine abortive Infektion hindeuten könnte (Borchers *et al.*, 2002). Bei gesunden, natürlich mit EHV-2 infizierten Pferden wurde die Präsenz des Virus hingegen als subklinische Erkrankung, oder auch als latente Infektion interpretiert, die nach Reaktivierung des Virus in einer klinischen Symptomatik resultieren kann (Rizvi *et al.*, 1997). Wie von Borchers *et al.* (2006a) diskutiert wäre es denkbar, dass Häufigkeit und Koinzidenz des EHV-2-Nachweises in PBL, Nasen- und Augentupfern auf die als Virusreservoir fungierenden, zirkulierenden Leukozyten zurückzuführen sind. Die Übertragung des Virus auf konjunktivale und respiratorische Epithelzellen durch latent infizierte B-Lymphozyten (Drummer *et al.*, 1996) könnte so zu einer persistierenden Infektion, mit fluktuierender Ausscheidung des EHV-2 mit dem Mucus führen. Diese Hypothese sollte mittels der im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit durchgeführten *In situ*-Hybridisierung von Konjunktivalgeweben, bei der virale Nukleinsäure direkt im Gewebe detektiert wird, bestätigt werden.

### **1.5 Bedeutung von immunsupprimierenden Mechanismen und immunpathologischen Prozessen bei der Entstehung von entzündlichen Augenerkrankungen**

Dass Herpesviren generell vielfältige Reaktionen des Immunsystems hervorrufen und dieses in seiner Wirksamkeit beeinflussen können, ist schon lange bekannt. So haben Herpesviren, neben der Fähigkeit zur Latenz, zusätzliche Strategien in Folge ihrer Co-Evolution mit dem Wirt entwickelt, mit denen sie das Abwehrsystem des Wirtes unterlaufen können (Carr *et al.*, 2001). Beispielsweise werden EHV-2 unter anderem auch immunsupprimierende Wirkungen zugeschrieben (Fu *et al.*, 1986). Pathologische Reaktionen des Immunsystems auf eine Infektion des Auges mit dem humanen Herpes Simplex Virus Typ 1 wiederum sollen im Zusammenhang mit der Pathogenese der stromalen Keratitis stehen (Hendricks, 1999).

#### **1.5.1 Aufbau und Funktion des Immunsystems einschließlich der auf virale Infektionen erfolgenden Immunantwort**

Das Immunsystem ist ein kompliziertes Abwehrsystem bestehend aus den verschiedenartigsten, miteinander in Wechselwirkung tretenden zellulären und humoralen Komponenten, das die Aufgabe hat, Krankheitserreger zu bekämpfen (Jungi, 2000). Man definiert zwei funktionelle Untereinheiten, einerseits das unspezifische *angeborene* (natürliche) und andererseits das Antigen-spezifische *erworbene* (sekundäre) Immunsystem, deren Unterscheidung jedoch nur dem besseren Verständnis dient, da beide Formen im Zuge der Infektionsbe-

kämpfung und -verhinderung untrennbar miteinander verbunden sind. Hauptfunktionen des angeborenen Immunsystems sind einerseits die schnelle Erkennung und Eliminierung von Antigenen und andererseits die Aktivierung der Zellen des erworbenen Immunsystems (Matzinger, 1994). Bei einer viralen Infektion reagiert der Organismus zum Beispiel zunächst mit der Produktion von antiviralen Zytokinen (Interferone, Chemokine und Interleukine), das sind vielfältige, die Immunantwort initiiierende und koordinierende Faktoren. Interleukine wiederum bewirken ihrerseits eine Aktivierung bestimmter Zellen des angeborenen und auch des erworbenen Immunsystems (Goodbourn *et al.*, 2000; Grandvaux *et al.*, 2002). Die Zellen des angeborenen Immunsystems können somit direkt auf fremde Bestandteile reagieren, während das erworbene Immunsystem von Interaktionen mit dem angeborenen Immunsystem abhängig ist und beim ersten Kontakt mit einer fremden Substanz zunächst von diesem in den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten) aktiviert werden muss.

Die bei der *angeborenen* Immunität einbezogenen Mechanismen stimmen weitgehend mit denen überein, die für die unspezifischen Reaktionen mit Auslösung von Entzündungen bei Gewebeschädigungen verantwortlich sind (Playfair und Baron 1995) und bilden die Grundlage für die Zerstörung infektiöser Mikroorganismen (Staines *et al.*, 1999). Vermittler dieser Mechanismen sind zum Beispiel die im Knochenmark lebenslang aus der pluripotenten Stammzelle neu gebildeten Monozyten, die als Gewebsmakrophagen (so genannte „Dendritische Zellen“, DCs) zur Phagozytose befähigt sind. Auch neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten besitzen eine hohe Phagozytosefähigkeit, während natürliche Killerzellen (NK-Zellen) als lymphozytenähnliche Zellen direkt zur Abtötung einiger Zielzellen, besonders von virusinfizierten Zellen, befähigt sind. DCs als wichtigste antigenpräsentierende Zellen (APCs) induzieren wiederum eine primäre Immunantwort, indem sie als unreife DCs zunächst Antigene im Gewebe aufnehmen, anschließend in lymphoide Organe migrieren, wo sie die Antigene naiven T-Zellen präsentieren, was zur Initiierung der Immunantwort führt (Banchereau und Steinman, 1998).

Die *erworbene* Immunität basiert auf der besonderen Fähigkeit der B- und T-Lymphozyten, selektiv auf unterschiedliche Fremdmaterialien oder Antigene reagieren zu können (Staines *et al.*, 1999). Hauptelemente der spezifischen Immunantwort sind die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs, CD (Cluster of differentiation)8<sup>+</sup>), die virale Antigene, präsentiert von MHC (Major histocompatibility complex)-Klasse-I Komplexen, auf der Oberfläche anderer Zellen mit Hilfe spezifischer T-Zell-Rezeptoren erkennen, dadurch aktiviert werden und infizierte Zellen lysieren. T-Helferzellen (Th-Zellen, CD4<sup>+</sup>) wiederum sind nach Antigen-Kontakt an der Proliferation und Differenzierung der CD8<sup>+</sup>-Zellen zu CTL sowie der B-Lymphozyten zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle beteiligt. Weiterhin aktivieren die Th-Zellen Zyto-



kine, die ihrerseits für die Aktivierung natürlicher Killerzellen und Makrophagen verantwortlich sind. Die von Plasmazellen sezernierten Antikörper bewirken hingegen eine Antigen-spezifische Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten sowie eine Aktivierung der natürlichen Killerzellen. So wird das natürliche Immunsystem durch die Interaktionen der erworbenen Abwehr ebenfalls stimuliert (Janeway und Travers, 1994).

Die Gesamtheit der Zellen der Immunabwehr machen die so genannten „Leukozyten“ (von leukos=weiss) aus, deren Gehalt im Blut Auskunft über die Reaktionslage des Abwehrsystems gibt und die mittels verschiedener Methoden in die einzelnen Leukozytenarten unterteilt werden können.

### 1.5.2 Diagnostische Möglichkeiten und Verhältnisse beim Pferd

Für die Erfassung der zellulären Komponenten des Immunsystems, von denen insbesondere die CTL nach Slater und Hannant (2000) eine entscheidene Rolle bei der Kontrolle latenter Infektionen des Pferdes zum Beispiel mit Herpesviren spielen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde einerseits die „Differentialblutbilduntersuchung“ und andererseits die Methode der „Durchflusszytometrie“ angewendet.

Bei der Differentialblutbilduntersuchung werden die Bluteleukozyten (daher auch die Bezeichnung „weißes Blutbild“) erfasst und differenziert in die relativen Anteile der einzelnen Leukozytenarten (neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten sowie Lymphozyten) dargestellt. Zusätzlich wird noch zwischen (jugendlichen) stabkernigen und (ausgereiften) segmentkernigen Granulozyten unterschieden. Das Differentialblutbild gibt somit Auskunft über die prozentualen Anteile der einzelnen Leukozytenarten. Bei einer Gesamtleukozytenzahl von  $5-10 \times 10^9$  pro Liter Blut werden die folgenden Referenzbereiche der relativen Anteile der einzelnen Leukozytenarten beim Differentialblutbild des Pferdes nach Kraft und Dürr (2005) angegeben: segmentkernige neutrophile Granulozyten (G.) 45-70 Prozent, stabkernige neutrophile G. 0-6 Prozent, basophile G. 0-2 Prozent, eosinophile G. 0-4 Prozent, Monozyten 0-5 Prozent und Lymphozyten 20-45 Prozent. Das Pferd weist demnach, genauso wie der Mensch, ein granulozytäres Blutbild auf, das heisst die Anzahl der Granulozyten ist hier deutlich größer, als die der Lymphozyten.

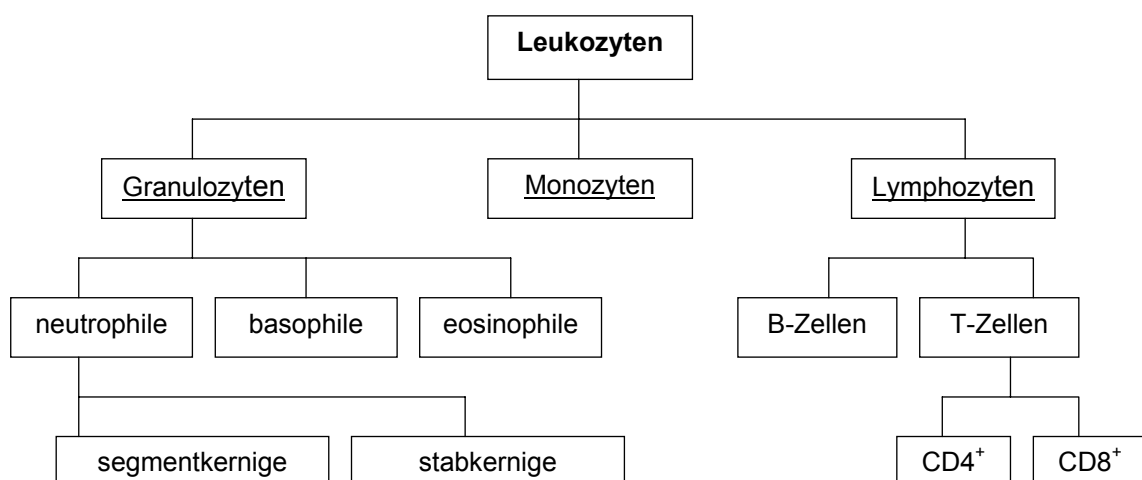
Die Methode der "Durchflusszytometrie" wird hingegen unter anderem zur Erfassung und Zählung der einzelnen Lymphozyten-subpopulationen (B-, T-,  $CD4^+$ -,  $CD8^+$ -Zellen) angewendet, indem das Blut durch Fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper (mAK) immunphänotypisiert wird. Dabei werden nur mAKs eingesetzt, die gegen relativ konstant exprimierte zelluläre Antigene gerichtet sind und dadurch selektiv bestimmte Zelloberflächenantigene der Lymphozyten erkennen (Davis *et al.*, 2002). Zusätzlich wird rechnerisch noch die so

genannte CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>-Ratio ermittelt, das heisst das Verhältnis der CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen zu den CD8<sup>+</sup>-CTL, dass zum Beispiel bei mit dem feline Immunschwächevirus (FIV) infizierten Katzen mit zunehmender Immunsuppression zugunsten der CD8<sup>+</sup>-Zellen verschoben ist (Hofmann-Lehmann *et al.*, 1997). Standardisierte Referenzbereiche für die einzelnen Lymphozytensubpopulationen gibt es im Gegensatz zum Differentialblutbild jedoch nicht, da jedes Labor seine eigenen, validierten Normwerte festlegt, die nur für das vom jeweiligen Labor verwendete Gerät gelten. Bei verschiedenen Erkrankungen lassen sich dennoch mögliche Veränderungen der Anteile der Lymphozytensubpopulationen zueinander mittels dieser Methode identifizieren, durch die Rückschlüsse auf den „Immunstatus“ des Patienten, das heisst den „Ist“-Status der zellulären Immunabwehr, möglich sind (Chabanne *et al.*, 2000).

Die Parameter beider Methoden (Differentialblutbild und Durchflusszytometrie) - hier zusammengefasst als „Immunstatus“ der Pferde bezeichnet - sind somit gut geeignet, um wesentliche Normveränderungen im Bereich der Leukozyten aufzuzeigen, die zum Beispiel infolge einer viralen Infektion aufgetreten sind. Auch Slater und Hannant (2000) bzw. Lunn *et al.* (2001) gehen davon aus, dass Defekte des Immunsystems die Folge einer durch ein infektiöses Agens (zum Beispiel EHV-1) auftretenden Immunsuppression sein können, durch die das infizierte Pferd für bakterielle Sekundärinfektionen, gegebenenfalls verbunden mit pathologischen Veränderungen, prädisponiert wird. Witonsky *et al.* (2003) sehen es daher als erforderlich an, den Immunstatus der betroffenen Pferde zu bestimmen, um so zum Beispiel eine adäquatere Therapie einleiten zu können.

Die Zusammenhänge der beim Immunstatus erfassten Leukozytenarten sind in Abb. 1 als Übersicht dargestellt.

Abb. 1 Schematische Darstellung der Zusammenhänge der einzelnen Leukozytenarten



### 1.5.3 Immunpathologische Prozesse bei okulären Infektionen mit Herpesviren

Bei verschiedenen, durch Herpesviren hervorgerufenen Augenerkrankungen liegen der klinischen Symptomatik so genannte „immunpathologische“ Prozesse zugrunde, das heisst die eigentliche Schädigung des Gewebes (zum Beispiel infolge einer leukozytären Infiltration) wird nicht durch das Antigen selbst, sondern durch Reaktionen des Immunsystems auf den nicht zu beseitigenden Antigenreiz hervorgerufen (Zierhut und Wohlrab, 1997). Ein Beispiel hierfür ist die HSK- (Herpetic Stromal Keratitis) Erkrankung des Menschen, deren Pathogenese zwar noch nicht vollständig geklärt ist, bei der man jedoch davon ausgeht, dass es sich um eine durch das humane Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) induzierte und durch T-Lymphozyten vermittelte Autoimmunreaktion gegen das Korneagewebe handelt (Metcalf und Kaufman, 1976). Dabei kommt es nach einer zunächst unspezifischen Entzündungsreaktion im frühen Stadium der Erkrankung, zu einer hochspezifischen zellulären Immunreaktion bei der fortschreitenden Keratitis (Hendricks *et al.*, 1989). Insbesondere CD4-positive-Th-Zellen sollen die prinzipiellen Mediatoren der HSK sein (Newell *et al.*, 1989; Doymaz und Rouse, 1992; Avery *et al.*, 1995), während CD8-positive CTL nur in einem sehr geringen Ausmaß an der Immunreaktion beteiligt sind (Hendricks *et al.*, 1992). Die Rezeptoren der Th-Zellen erkennen zunächst das durch antigenpräsentierende Zellen „markierte“ virale Antigen (NiemiAltowski und Rouse, 1992). Die sich daran anschließende Phase der Immunreaktion und die daraus resultierende Klinik der Erkrankung wird daraufhin durch die Sezernierung proinflammatorischer Zytokine (unter anderem IL-2, IFN- $\gamma$ ) durch die Th-Zellen charakterisiert, die sich stimulierend auf die Th-Zellen und die CTL (Pleyer, 1997) sowie chemotaktisch auf die polymorphkernigen Leukozyten (PMKL) in den Limbusgefäßen auswirken (Heiligenhaus und Foster, 1994). Weitere, auf die Gefäßendothelzellen wirkenden Botenstoffe bewirken schließlich einen Austritt der polymorphkernigen Leukozyten aus den Limbusgefäßen in das periphere Hornhautstroma (Tang und Hendricks, 1996). Bis zu 90% der Entzündungszellen können die PMKL ausmachen. Die Bedeutung und Rolle nachgewiesener weiterer Botenstoffe (unter anderem IL-10) in dem Prozess sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt (Stumpf *et al.*, 2002).

Ein weiteres Indiz für die ursächliche Beteiligung immunpathologischer Prozesse bei der HSK liefern Studien mit experimentell infizierten Tieren und Menschen, bei denen sich der Einsatz der beiden antiinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10 und Interferon-Alpha (IFN- $\alpha$ ) als äußerst effektive Maßnahme zur Prävention und Behandlung der Erkrankung erwiesen hat (Hendricks *et al.*, 1991; Tumpey *et al.*, 1994). Praktisch nicht vor kommt die HSK hingegen bei Patienten mit T-Zell-Defekten, da diese nicht in der Lage sind, eine zellulär betonte Immunreaktion zu etablieren (Pepose, 1991).

Immunpathologische Prozesse sollen auch bei der eosinophilen Keratitis der Katze, einer infiltrativen und progressiv verlaufenden Keratopathie, die durch eine oberflächliche, proliferative, von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten dominierte Entzündungsreaktion charakterisiert ist, eine Rolle spielen. Die eigentliche schädigende Wirkung des Gewebes soll dabei laut Prasse *et al.* (1996) unter anderem durch eine auf einen vorherigen Kontakt mit einem Antigen hervorgerufene zellvermittelte allergische Reaktion vom verzögerten Typ (Hypersensibilitätsreaktion Typ 4) erfolgen die, ähnlich der HSK, durch eine T-Lymphozyten-abhängige Rekrutierung von Makrophagen und eosinophilen Granulozyten charakterisiert ist. Als zugrunde liegendes Antigen wird das feline Herpesvirus Typ 1 (FHV-1) diskutiert (Nasisse *et al.*, 1998). Dass FHV-1 eine durch eosinophile und neutrophile Granulozyten dominierte Hautreaktion vom verzögerten Typ induzieren kann, zeigten auch die von Tham und Studdert (1987) erzielten Ergebnisse bei intradermalen Hauttests mit Katzen. Eine der eosinophilen Keratitis ähnliche Ätiopathogenese wird auch bei der eosinophilen Konjunktivitis der Katze diskutiert (Pentlarge, 1991; Allgoewer *et al.*, 2001).

### 1.5.4 Immunsupprimierende Mechanismen bei Herpes- und anderen Viren

Viren können durch die Infektion von Immunzellen (zum Beispiel infiziert das humane Immunschwächevirus (HIV) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Makrophagen (Ackley *et al.*, 1990; Novotney *et al.*, 1990; Bishop *et al.*, 1992)) zu einer Suppression, das heisst Unterdrückung und damit Schwächung des Immunsystems führen. Auch Viren, die eine Neoplasie des lymphatischen Systems bewirken (zum Beispiel Leukämieviren, EBV) führen zu einer Immunsuppression (Jungi, 2000). Die der Immunsuppression zugrunde liegenden Mechanismen sind dabei äußerst vielfältig: Infektion und Umbau von Lymphozyten bzw. Makrophagen, Produktion löslicher Suppressor-Faktoren sowie die Induktion von Suppressorzellen sind einige Beispiele hierfür (Horohov und Rouse, 1986). Manche Viren haben jedoch zusätzliche Taktiken entwickelt, mit denen sie das Immunsystem beeinflussen um so den Abwehrstrategien des Wirtes entgegenzutreten zu können: vor allem im Genom von Gammaherpesviren wurden so genannte „zellhomologe Gene“ nachgewiesen die für Proteine codieren, welche die Apoptose regulieren, die Komplementaktivität hemmen, mit der Antigenpräsentation interferieren oder zellulären Zytokinen oder Zytokinrezeptoren homolog sind. Auch die humorale Immunantwort kann durch Inhibition von Komplementfaktoren wie zum Beispiel bei MHV-68 direkt supprimiert werden (zur Übersicht siehe Davis-Poynter und Farrell (1996) und Spriggs (1996). Die Existenz dieser wirtshomologen Gene lässt vermuten, dass die Viren diese von ihrem jeweiligen Wirt „gestohlen“ und anschließend zu ihrem eigenen Vorteil modifiziert haben (Alcami und Koszinowski, 2000).

EHV-2 besitzt in seinem Genom insgesamt sechs Gene, die für zellhomologe Proteine codieren. Zwei dieser Gene codieren für Apoptose-hemmende Proteine: das virale fllice inhibitory protein (v-FLIP) und das virale caspase-recruiting domain-like apoptotic protein (v-CLAP). Drei Gene codieren für so genannte „Glykoprotein-gekoppelte Rezeptoren“, EHV-2-ORF-E6, EHV-2-ORF-74, EHV-2-ORF-E1, die eine immunmodulierende Rolle bei der Durchbrechung der Entzündungsreaktion auf die Virusinfektion spielen sollen (Davis-Poynter und Farrell, 1996). Schließlich codiert das Gen ORF E7 für ein Peptid, bei dem es sich um ein Analogon des zellulären Zytokins IL-10 handelt (Telford *et al.*, 1995).

Insbesondere aufgrund der immunsupprimierenden Wirkungen dieses viralen Interleukin-10 (vIL-10), dass außer bei EHV-2 und EHV-5 auch bei EBV (EBV-IL-10, BCRF-1), dem Parapoxvirus Orf (Orf-Virus-IL-10), dem humanen Cytomegalovirus (HCMV-IL-10) sowie dem Rhesusaffen Cytomegalovirus (RhCMV-IL-10) nachgewiesen wurde, gehen die meisten Autoren von einer Beeinflussung der Virusinfektion aus. So wird *in vitro* bei einer EBV-Infektion unter anderem die CD4<sup>+</sup>-T-Zell-spezifische antivirale Immunantwort durch die Fähigkeit des EBV-IL-10, die Proliferation von Makrophagen bzw. Monozyten sowie die Produktion von IFN- $\gamma$  zu hemmen, unterdrückt (de Waal Malefyt *et al.*, 1991). Daher kann EBV-IL-10 sowohl die Replikation, als auch die Latenzetablierung des Virus unterstützen. Die Latenzetablierung von EBV soll außerdem durch eine vIL-10-induzierte Unterdrückung der zytotoxischen T-Lymphozyten ermöglicht werden (Zeidler *et al.*, 1997). Schließlich soll die Eigenschaft des EBV-IL-10, das Wachstum und die Differenzierung von B-Lymphozyten zu stimulieren, bedingen, dass eine größere Anzahl dieses Zelltyps für die akute und die latente Infektion durch EBV vorhanden ist (Go *et al.*, 1990).

Aufgrund des oben beschriebenen Vorkommens von wirtsverwandten Chemokinrezeptoren und Cytokinen im EHV-2-Genom, die auf vielfältige Strategien zur Suppression und Umgehung der Immunantwort schließen lassen, könnten diese das Wirtsabwehrsystem unterlaufenden Mechanismen einerseits direkt klinisch feststellbare Erkrankungen hervorrufen und zum Beispiel die Pathogenese entzündlicher Erkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva entscheidend beeinflussen. Andererseits könnten diese Mechanismen auch Sekundärinfektionen begünstigen. So wurde EHV-2 von verschiedenen Autoren (Schlocker *et al.*, 1995; Murray *et al.*, 1996) im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen beim Fohlen genannt. Nordengrahn *et al.* (1996) vermuteten einen Zusammenhang zwischen EHV-2 und einer Infektion mit *Rhodococcus equi* bei Fohlen, da die Prävalenz einer *Rhodococcus equi* Pneumonie nach einer EHV-2-Impfung verringert werden konnte. Denkbar wäre auch, dass EHV-2 ähnliche immunpathologische Prozesse, wie bei der HSV-1-induzierten HSK des Menschen bzw. der durch FHV-1-bedingten eosinophilen Keratitis bzw. Konjunktivitis diskutiert, hervorruft.

## **1.6 Rolle von viralen und bakteriellen Co-Faktoren bei entzündlichen Augenerkrankungen der Kornea und/oder Konjunktiva**

Neben EHV-2 wurde auch EHV-5 (Krüdwagen *et al.*, 2001) bzw. das equine Adenovirus Typ 1 (EAdV-1) (Gleeson *et al.*, 1978) als Ursache von viral-bedingten Keratokonjunktivitiden in Betracht gezogen. Für Doppelinfectionen mit Herpesviren und Bakterien bei augenkranken Tieren unterschiedlicher Spezies gibt es in der Literatur mehrere Beispiele: so sind bei der Katze neben FHV-1 Chlamydien aus dem Auge isoliert worden (Nasisse *et al.*, 1993), während beim Rind BVH-1 mit Mykoplasmen vergesellschaftet ist. Im Folgenden soll daher auf die Möglichkeit opportunistischer bakterieller bzw. viraler Doppelinfectionen mit Chlamydien, Mykoplasmen, EHV-5 und/oder EAdV-1 bei der Entstehung der equinen Keratokonjunktivitis näher eingegangen werden.

### 1.6.1 Viral bedingte Kerato- und/oder Konjunktivitiden

#### *Das Equine Herpesvirus Typ 5 (EHV-5) und seine Bedeutung im Zusammenhang mit der Keratokonjunktivitis des Pferdes*

Bis heute ist es noch nicht gelungen, eine Erkrankung nachweislich mit EHV-5 in Verbindung zu bringen. Das Virus wurde aus Nasentupfern von respiratorisch erkrankten Pferden in Australien und aus den PBL isoliert (Browning und Studdert, 1987a) sowie seine DNA in den peripheren Blutleukozyten mittels PCR bei 13 von 70 Pferden nachgewiesen (Reubel *et al.*, 1995). Dunowska *et al.* (1999) fanden EHV-5-DNA im Nasensekret bzw. den PBL bei 38 von 114 gesunden und kranken Pferden in Neuseeland ebenfalls per PCR, ein tatsächlicher Zusammenhang zwischen dem EHV-5-Nachweis und einer Atemwegserkrankung gelang im Gegensatz zu EHV-2 (Murray *et al.*, 1996) hingegen nicht. Wilcox und Raidal (2001), die EHV-5 bei 78% von 90 respiratorisch erkrankten und gesunden Fohlen mittels PCR und/oder Virusisolation in den PBL bzw. im Nasensekret detektierten, konnten ebenfalls keine Korrelation zwischen der Detektion von EHV-5 und dem Auftreten einer Erkrankung feststellen.

Eine mögliche Beteiligung von EHV-5 an der Keratokonjunktivitis des Pferdes untersuchten erstmalig Krüdwagen *et al.* (2001). Dabei wurde EHV-5-DNA mittels nested PCR in Augentupfern augenkranker und -gesunder Tiere nachgewiesen: bei 28,6% der 14 an Keratokonjunktivitis oder Konjunktivitis erkrankten Pferde und 41,7% der augengesunden Pferde fiel der Virusnachweis positiv aus. Auch Besthorn (2002) wies EHV-5 häufiger im gesunden als im kranken Auge mit der PCR nach. Interessanterweise konnten hier bei 16 von 185 untersuchten kranken und gesunden Augen EHV-2- und EHV-5-Genom gleichzeitig detektiert werden (Besthorn, 2002). Auffällig auch hierbei ist jedoch, dass beide Viren häufiger im gesunden, denn im kranken Auge nachgewiesen wurden. McMullen (2003) schließlich konnte

EHV-5-DNA in Tupfermaterial aus 14 von 48 Augen (Nachweisrate 30%) mit diagnostizierter Keratitis detektieren, dabei in sieben der 46 Augen gleichzeitig mit EHV-2-Genom.

Doppelinfectionen mit EHV-2 und EHV-5 sind in der Literatur demnach bereits beschrieben. Dass beide Viren vermutlich auch ähnliche pathogenetische Eigenschaften aufweisen und sich so möglicherweise gegenseitig beeinflussen könnten, erscheint hierbei einerseits aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen EHV-2 und EHV-5 und andererseits aufgrund deren nahezu identischem Gewebe- und Zelltropismus nahe liegend.

### *Das Equine Adenovirus Typ 1 und die Bedeutung von Adenoviren bei entzündlichen Erkrankungen des Auges*

Das equine Adenovirus Typ 1 (EAdV-1) ist ein doppelsträngiges DNA-Virus des Genus Mastadenovirus, das beim Pferd bisher eher mit respiratorischen Symptomen in Zusammenhang gebracht worden ist und vor allem aber aus klinisch gesunden Tieren isoliert wurde (Rolle und Mayr, 2002). Bei Araberfohlen, die mit einer genetisch bedingten B- und T-Zellimmundefizienz belastet sind (so genannte „Severe Combined Immune Deficiency“), werden schwerwiegende Infektionen des Respirationstraktes mit hohen Mortalitätsraten beschrieben (McChesney *et al.*, 1974). Auch bei Pferden mit Cauda Equina Neuritis (CEN) wurde EAdV-1 isoliert (Edington *et al.*, 1984). Ein zweites, aus dem Kot von durchfallkranken Fohlen isoliertes equines Adenovirus (EAdV-2) wurde erstmals im Jahre 1982 beschrieben (Studdert und Blackney, 1982).

Im Zusammenhang mit Augenerkrankungen werden Adenoviren vor allem beim Menschen genannt: Hier ist die Adenovirus-bedingte Keratokonjunktivitis die am häufigsten vorkommende entzündliche Augenerkrankung (Sundmacher *et al.*, 2001). Von den Humanen Adenoviren (HAdV) 1-5, 7 und 10 ist bekannt, dass diese Konjunktivitis verursachen. Auch Doppelinfectionen mit dem Alphaherpesvirus HSV-1 sind vereinzelt beschrieben worden (Deutsch, 1989; Elnifro *et al.*, 2000). In Augenkliniken kommen vor allem epidemische Adenovirus-Keratokonjunktivitiden unter Beteiligung von HAdV-8, -19 und -37 vor (Cooper *et al.*, 1999). Beim Tier gibt es hingegen bisher nur wenige Untersuchungen über eine Beteiligung des Virus bei Erkrankungen des Auges. In einer australischen Studie wurden Adenoviren bei Rindern mit Konjunktivitis und Keratokonjunktivitis isoliert (Wilcox, 1969).

Bei Pferden kann es im Rahmen einer systemischen Infektion mit dem equinen Adenovirus auch zu einer okulären Manifestation des Virus kommen (Gleeson *et al.*, 1978). Auch bei Fohlen mit respiratorischen Erkrankungen (Todd, 1969; Thompson *et al.*, 1976) bzw. im Training befindlichen Vollblutrennpferden (Rose *et al.*, 1974) sowie bei klinisch gesunden Fohlen (Wilks und Studdert, 1972) wurden equine Adenoviren aus Konjunktivaltupferproben mittels Anzucht isoliert. Kershaw *et al.* (2001) diskutierten erstmals eine mögliche Beteiligung

des EAdV an der equinen Keratokonjunktivitis. McMullen (2003) untersuchte daraufhin Augentupferproben von 47 augenkranken und 36 gesunden Pferden mittels PCR auf EAdV-1 und -2: EAdV-1-Genom wurde dabei beidseitig im gesunden Auge eines Pferdes detektiert, während EAdV-2-Genom nicht nachgewiesen werden konnte.

#### 1.6.2 Bakteriell bedingte Kerato- und/oder Konjunktivitiden

##### *Mykoplasmen im Zusammenhang mit entzündlichen Augenerkrankungen*

Mykoplasmen sind zellwandlose prokaryote Bakterien der Klasse Mollicutes, Ordnung *Mycoplasmatales*, die höchste Nährbodenansprüche stellen und sich durch ein sehr langsames Wachstum und häufige Therapieresistenz auszeichnen (Rolle und Mayr, 2002). Im Gegensatz zu anderen Bakterien sind die Mykoplasmen nach außen von einer dreischichtigen Membran begrenzt, eine echte Zellwand und Vorstufen einer solchen fehlen. Aufgrund der gleichzeitigen Anwesenheit von DNA und RNA werden sie dennoch zu den Bakterien gezählt (Horsch, 1984).

Mykoplasmeninfektionen kommen bei vielen Tierarten sowie beim Mensch vor und werden durch unterschiedliche *Mycoplasma spp.* hervorgerufen. So gehört *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* zu den häufigsten und wichtigsten bakteriellen Erregern beim Schwein, der oft enzootisch verlaufende Pneumonien in den Beständen auslöst. *M. bovis* wiederum ruft schwerwiegende und therapieresistente Mastitiden beim Rind hervor (Rolle und Mayr, 2002).

Bei Rindern bzw. Katzen wurden Mykoplasmen aber auch im Zusammenhang mit entzündlichen Augenerkrankungen, und hier zum Teil auch als Doppelinfectionen mit Viren beschrieben. So gelang die Isolierung von *M. bovoculi* und *M. bovis* wiederholt aus Konjunktivaltupfern, die bei Kälbern mit Keratokonjunktivitis entnommen wurden (Jack und Moring, 1977; Kirby und Nicholas, 1996; Levisohn *et al.*, 2004), dabei wird auch ein Synergismus mit *Moraxella bovis* bei der Entstehung der so genannten „Infektiösen Bovinen Keratokonjunktivitis“ („Pink eye“) vermutet (Rosenbusch und Knudtson, 1980; Rosenbusch und Ostle, 1986). Ebenfalls bei Kälbern mit Symptomen des „Pink eye“ isolierten Naglic *et al.* (1996) *M. bovis genitalium*, *M. bovirhinis* und das bovine Alphaherpesvirus IBRV (infektiöses Rhinotracheitis Virus) aus Konjunktivaltupfern, während eine *Moraxella bovis* Infektion hier nicht nachgewiesen werden konnte. Brown *et al.* (1998) diskutierten, dass Mykoplasmen und IBRV den Krankheitsprozess der durch *Moraxella bovis* bedingten Infektiösen Bovinen Keratokonjunktivitis beschleunigen können. Bei Katzen mit Konjunktivitis wird hingegen eine durch Viren hervorgerufene Potenzierung der Pathogenität von *M. felis* vermutet; grundsätzlich kommen Mykoplasmen bei dieser Spezies sowohl als Primär-, als auch als Sekundärerreger auf den Schleimhäuten des Respirationstraktes und dem Auge vor (Haesebrouck *et al.*, 1991).



### *Chlamydien im Zusammenhang mit entzündlichen Augenerkrankungen*

Eine Sonderstellung unter den Bakterien nehmen die Chlamydien ein, da diese als obligat intrazelluläre Erreger Parallelen mit Viren aufweisen. Aufgrund der Ausbildung einer Zellwand, des Vorkommens von DNA und RNA in einer Zelle, ihrer Stoffwechselaktivität, Antibiotikaempfindlichkeit und Zweiteilung zählen sie jedoch eindeutig zu den Bakterien. Chlamydien sind unbewegliche, gramnegative Bakterien mit pathogener Bedeutung für Menschen, Säugetiere und Vögel. Die beiden medizinisch bedeutsamen Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila* werden zur Familie der *Chlamydiaceae* gezählt. Vor allem die aviären Chlamydieninfektionen, die als Psittakose (bei Papageienvögeln) bzw. Ornithose (übrige Vögel) bezeichnet werden, sind aufgrund ihres zoonotischen Potentials bedeutsam (Rolle und Mayr, 2002).

Bei Katzen wird die feline infektiöse Konjunktivitis sowohl durch *Chlamydophila (C.) felis*, als auch durch das Feline (Alpha)Herpesvirus-1 (FHV-1) verursacht. Beide Pathogene sind in der Lage, die intakte Augenoberfläche zu infizieren und aufgrund ihrer Fähigkeit zur Latenz, chronische oder rezidivierende Erkrankungen auszulösen (Glaze, 2002). Mehrmals gelang bisher eine Doppeldetektion beider Erreger bei kranken Katzen: Cai *et al.* (2002) detektierten FHV-1 und *C. felis* gleichzeitig aus Augentupfern mittels PCR mit einer Nachweisrate von 10,6% bei sieben von 66 Katzen mit Konjunktivitis bzw. Erkrankungen des oberen Respirationstraktes. Helps *et al.* (2003) detektierten FHV-1 und *C. felis* gleichzeitig in 16 von 538 (Nachweisrate 2,9%) Konjunktivaltupfern mittels Real-time Multiplex-PCR. Eine äußerst geringe Doppeldetektionsrate von FHV-1 und *C. felis* bei chronisch kranken Katzen mit Konjunktivitis wiesen hingegen Mard *et al.* (1993) mit 0,6% nach. Auch Nasisse *et al.* (1993) konnten beide Erreger mittels Immunfluoreszenztest nur bei einer von 91 Katzen nachweisen, wohingegen *C. felis* und FHV-1 von Rampazzo *et al.* (2003) parallel mit der PCR bei fünf von 70 Katzen (Nachweisrate 7,1%) mit Konjunktivitis detektiert wurden. Auch beim Menschen wurde *Chlamydia trachomatis*, der Erreger des so genannten „Trachoms“, einer chronischen, oftmals schwerwiegend verlaufenden und bis zur Erblindung führenden Form der Keratokonjunktivitis, gleichzeitig mit HSV-1 isoliert (Mantell *et al.*, 1988).