

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Einleitung**

Die Ergebnisse meiner Dissertation gliedern sich in die folgenden drei Teile:

1. Erstellung eines Immunstatus von augenkranken und -gesunden Pferden mittels Durchflusszytometrie und Differentialblutbildanalyse
2. PCR-Untersuchung von diagnostischen Blut- und Tupferproben augenkranker und augengesunder Pferde auf Doppelinfektionen mit EHV-2 und/oder EHV-5, EAdV-1, Chlamydien und Mykoplasmen
3. Untersuchung des Gewebe- und Zelltropismus von EHV-2/-5 im Auge mittels nested PCR und *In situ*-Hybridisierung

Die ersten beiden Teile dieser Arbeit befassen sich mit EHV-2 und der möglichen Bedeutung viruseigener, immunsupprimierender Mechanismen sowie viraler und bakterieller Co-Faktoren bei Keratitiden, Konjunktivitiden bzw. Keratokonjunktivitiden des Pferdes. Der dritte Teil hingegen geht speziell dem Gewebe- und Zelltropismus von EHV-2 und auch von EHV-5 im Auge nach.

### **4.2 Erstellung eines Immunstatus von augenkranken und -gesunden Pferden**

In der hier vorgestellten Studie wurden zunächst von augenkranken und gesunden Pferden entnommene Cytobrush- bzw. Augentupfer (3.4) und Blutproben (3.5) mittels nPCR auf EHV-2-Genom untersucht (3.6.1). Zusätzlich wurden serologische Untersuchungen durchgeführt (3.8). Parallel zu den virologischen Untersuchungen erstellte das Labor Laboklin in Bad Kissingen von allen Pferden einen Immunstatus, indem die B-, T-, CD4+/-, CD8+/-, CD4+:CD8+-Lymphozytensubpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt (3.7.1) und ein Differentialblutbild (bestehend aus der Gesamtleukozytenanzahl und den prozentualen Anteilen der neutrophilen, basophilen, eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, stabkernigen (jugendlichen) und segmentkernigen (ausgereiften) neutrophilen Granulozyten) erstellt wurde (3.7.2).

Anhand der nPCR-Ergebnisse wurden die Pferde in die Test- und Kontrollgruppe eingeteilt: die „Testgruppe“ beinhaltete alle Pferde, bei denen EHV-2-Genom im Auge oder in den PBL detektiert werden konnte, während die „Kontrollgruppe“ ausschließlich aus PCR-negativen Pferden bestand. In beiden Gruppen befanden sich demnach sowohl augenranke, als auch gesunde Pferde, weshalb eine zusätzliche Gruppierung anhand des Merkmals augenkrank/-gesund vorgenommen wurde (Gruppen 1-4). Durch den Vergleich der Ergebnisse jedes einzelnen Parameters des Immunstatus mit entsprechenden Normwerten (Tab. 7 bzw.

Tab. 8) wurde dann die Anzahl der Pferde in jeder Gruppe bestimmt, die Abweichungen aufwiesen. Die Häufigkeit des Auftretens von Abweichungen in jeder Gruppe wurde schließlich miteinander verglichen und auf signifikante Unterschiede hin untersucht (3.10).

### 4.2.1 Ergebnisse der virologischen Untersuchungen: Einteilung der Test- und Kontrollgruppe

In dieser Studie wurden insgesamt 31 Pferde, von denen zehn an einer Keratitis, Konjunktivitis oder Keratokonjunktivitis erkrankt und 21 klinisch unauffällig waren, untersucht. Die Proben der augenkranken Pferde wurden von verschiedenen Tierärzten und den unterschiedlichsten Standorten zur Untersuchung eingeschickt, während die Proben der klinisch gesunden Pferde überwiegend aus einem mit dem Institut kooperierenden Vollblutgestüt stammten.

Die Gruppe der augenkranken Pferde (LK1-LK10) bestand aus drei Stuten, sechs Wallachen und einem Hengst, die im Durchschnitt 8,4 Jahre alt waren und überwiegend der Rasse Warmblut angehörten (sechs von zehn). Bei diesen Pferden wurde als Augenerkrankung eine Keratitis, Konjunktivitis oder Keratokonjunktivitis von den einsendenden Tierärzten diagnostiziert. Neun der zehn augenkranken Pferde wiesen eine chronische und zum Teil auch rezidivierende Erkrankung des Auges auf, während bei einem einwöchigen Fohlen eine akute Keratitis diagnostiziert wurde. Von den neun chronisch kranken Pferden wiesen je drei Pferde eine Keratitis, Konjunktivitis bzw. Keratokonjunktivitis auf.

Die klinisch gesunden Pferde (LG1-LG21) waren (soweit bekannt) im Durchschnitt 10,8 Jahre alt und gehörten überwiegend der Rasse Vollblut an (zwölf von 21). Diese Gruppe bestand aus 18 Stuten und zwei Wallachen sowie aus einem weiteren Pferd, bei dem das Geschlecht nicht bekannt war.

Die genauen anamnestischen Daten der Pferde beider Gruppen können der Tabelle 1 (a, b) im Anhang entnommen werden.

EHV-2-Genom wurde bei Augenkranken und -gesunden sowohl aus Augentupfern als auch in den PBL nachgewiesen. Die Häufigkeit des Virusnachweises bei augenkranken und augengesunden Pferden ist in Tab. 9 dargestellt. EHV-2-Genom wurde demnach bei je zwei augenkranken Pferden in den PBL bzw. Augentupfern detektiert (Nachweisrate bei augenkranken Pferden: 40%), während bei den klinisch gesunden Pferden in vier Fällen EHV-2-Genom in den PBL und in zwei Fällen im Augentupfer nachgewiesen wurde (Nachweisrate bei gesunden Pferden: 29%). Diese zwischen kranken und gesunden Pferden unterschiedliche Nachweisrate von EHV-2 war nicht signifikant ( $\chi^2 = 0,4$ ). Insgesamt wurde EHV-2-Genom bei allen 31 untersuchten Pferden mit einer Nachweisrate von 32 Prozent detektiert.

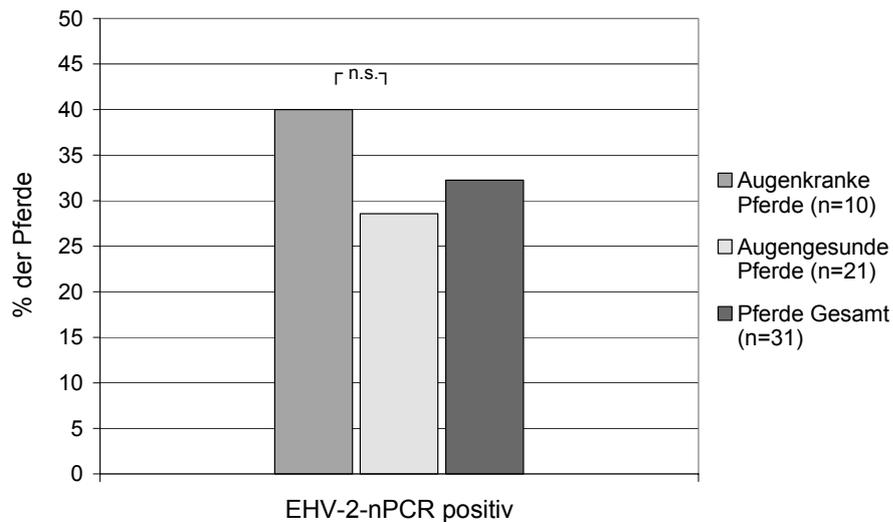
Tab. 9 Ergebnisse der nPCR-Untersuchung auf EHV-2 von peripheren Blutleukozyten (PBL) und Augentupfern der augenkranken und augengesunden Pferde

Positiver Nachweis von EHV-2- Genom in:	Anzahl Augenkranker Pferde n* = 10 [% Pferde]	Anzahl Augengesunder Pferde n* = 21 [% Pferde]	Anzahl Pferde Gesamt n* = 31 [% Pferde]
Peripheren Blutleukozyten (PBL)	2 [20]	4 [19]	6 [19]
Augentupfern	2 [20]	2 [9,5]	4 [13]
PBL und Augentupfern	4 [40]	6 [29]	10 [32]

\* = Gesamtzahl der zur jeweiligen Gruppe zählenden Pferde

In Diagramm 1 ist der Anteil der EHV-2 positiven Pferde unter den Augenkranken und Augengesunden, der mittels nPCR ermittelt wurde, nochmals graphisch dargestellt.

Diagramm 1 Anteil der nPCR-EHV-2 positiven augenkranken und klinisch gesunden Pferde



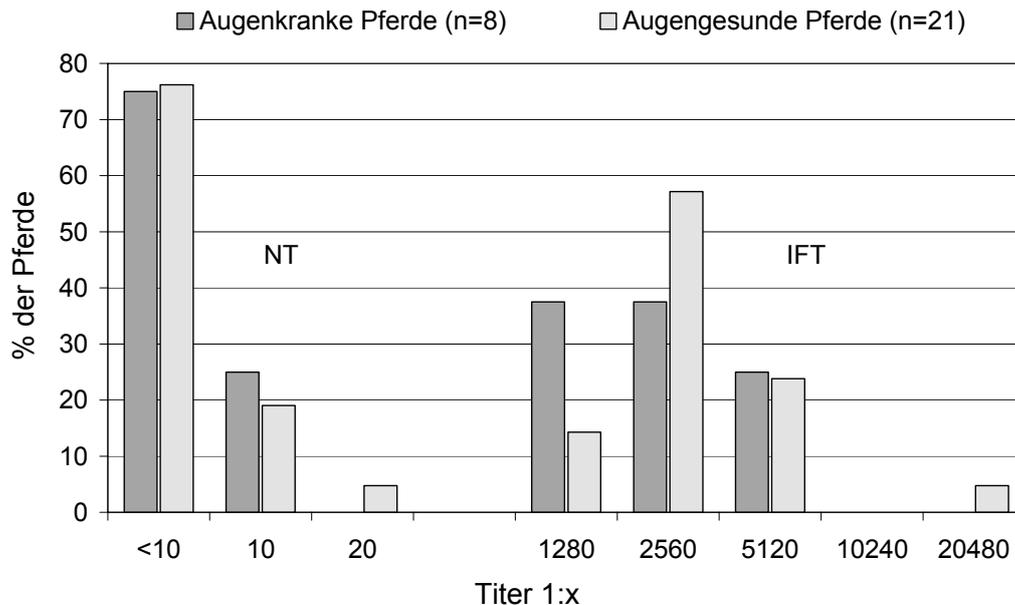
nPCR: mittels nPCR-Untersuchung von Augentupfern und PBL ermittelte Nachweisrate von EHV-2  
n.s.: nicht signifikanter Unterschied zwischen augenkranken und augengesunden Pferden

Mittels der serologischen Untersuchungen konnte ein vorausgegangener Kontakt mit EHV-2 bei allen untersuchten Pferden aufgezeigt werden, da diese Antikörper im IFT oder NT aufwiesen. Demnach waren alle Pferde EHV-2 seropositiv und damit möglicherweise latente Virusträger. Serologisch auffällige, auf eine akute EHV-2 Infektion hinweisende Titer (im NT > 1:10 bzw. IFT  $\geq$  1:5120) wiesen jedoch von den insgesamt 29 untersuchten Pferden (bei zwei augenkranken Pferden konnte aufgrund des limitierten Probenvolumens keine serolo-

gische Untersuchung durchgeführt werden) nur zwei augenkrank sowie sechs gesunde Pferde auf.

In Diagramm 2 ist die prozentuale Verteilung der NT- bzw. IFT-Titer in der Gruppe der augenkranken und der gesunden Pferde graphisch dargestellt.

Diagramm 2 Prozentuale Häufigkeitsverteilung der NT- und IFT-Titer gegen EHV-2 bei augenkranken und gesunden Pferden



NT: Neutralisationstest  
 IFT: Immunfluoreszentest  
 n: Anzahl der untersuchten Pferde

Da bei allen Pferden ein vorausgegangener Kontakt mit EHV-2 mittels der Serologie aufgezeigt wurde, erschien diese Methode nicht zur Unterteilung der Pferde in zwei Gruppen (EHV-2 positiv/negativ) geeignet. Deshalb wurde die Einteilung anhand der Untersuchungsergebnisse der nPCR durchgeführt, so dass insgesamt zehn EHV-2 positive Pferde, bei denen das Virusgenom in den PBL oder Augentupfern detektiert wurde, der Testgruppe zugeordnet wurden, von denen vier Pferde augenkrank (Gruppe 1) und sechs augengesund (Gruppe 2) waren. Die 21 EHV-2-nPCR negativen Pferde, davon sechs augenkrank (Gruppe 3) und 15 augengesunde (Gruppe 4), wurden hingegen der Kontrollgruppe zugerechnet. Eine gruppenweise Auflistung der Pferde einschließlich deren anamnestischer Daten und virologischen Eingruppierungskriterien (Ergebnisse der nPCR) ist in Tabelle 1c im Anhang dargestellt.

### 4.2.2 Korrelation der nPCR-Ergebnisse mit denen der Durchflusszytometrie und des Differentialblutbildes

Um die Frage zu klären, ob bei EHV-2-infizierten Pferden ein abweichender Immunstatus festgestellt werden kann, wurde zunächst für jeden Parameter des Immunstatus die Anzahl der Pferde in jeder der oben beschriebenen vier Gruppen ermittelt, die eine Abweichung von der Norm aufwiesen. Anschließend wurde die Häufigkeit des Auftretens von Normabweichungen in jeder Gruppe miteinander verglichen und auf signifikante Unterschiede hin untersucht.

In Kapitel 4.2.2.1 werden zunächst die Ergebnisse des Gruppenvergleichs der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Parameter beschrieben. In Kapitel 4.2.2.2 folgt dann das Ergebnis des Vergleichs der Parameter des Differentialblutbildes. Die jeweiligen Einzelergebnisse der zehn augenkranken und 21 klinisch gesunden Pferde sind detailliert in der Tabelle 2 (a und b) im Anhang aufgelistet.

#### 4.2.2.1 Ergebnisse der Durchflusszytometrie bei EHV-2-nPCR positiven und negativen kranken und gesunden Pferden

In Tab. 10 ist die jeweilige Anzahl der Pferde pro Gruppe dargestellt, die erhöhte bzw. erniedrigte relative B-, T-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozytenanteile und/oder CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>-Ratio aufwiesen.

In der aus vier Pferden bestehenden Gruppe der augenkranken Testtiere (Gruppe 1) wies demnach ein Pferd erhöhte und kein Pferd erniedrigte B-Zellanteile auf, während die Anteile der T-Zellen bei einem Pferd erhöht und bei keinem Pferd erniedrigt waren. Bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wies kein Pferd einen erhöhten und zwei Pferde einen erniedrigten Anteil auf. Die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wiederum waren bei zwei bzw. einem Pferd(en) dieser Gruppe erhöht bzw. erniedrigt. Eine veränderte CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>-Ratio wurde schließlich bei drei Pferden und nur in Form einer Erniedrigung festgestellt.

In Gruppe 2 wurden bei keinem Pferd erhöhte und bei vier Pferden erniedrigte B-Zellanteile sowie bei zwei Pferden erhöhte Anteile der T-Zellen ermittelt. Ein Pferd wies hingegen erhöhte CD4<sup>+</sup>-Zellanteile auf, während ein erniedrigter Anteil an CD4<sup>+</sup>-Zellen bei keinem Pferd ermittelt wurde. Ebenfalls wies in dieser Gruppe kein Pferd einen erhöhten CD8<sup>+</sup>-Zellanteil auf, wohingegen bei zwei Pferden ein erniedrigter Anteil an CD8<sup>+</sup>-Zellen ermittelt wurde. Die CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>-Ratio schließlich war bei zwei bzw. einem Pferd(en) erhöht bzw. erniedrigt.

Bei den sechs augenkranken Kontrolltieren der Gruppe 3 wies ein Pferd erhöhte B- bzw. zwei Pferde erhöhte T-Lymphozytenanteile auf, während bei keinem Pferd erniedrigte B- und T-Zellanteile festgestellt wurden. Die CD4<sup>+</sup>- und auch die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen waren bei jeweils einem Pferd dieser Gruppe erhöht. Ein erniedrigter CD4<sup>+</sup>-Zellanteil wurde hingegen bei keinem und ein erniedrigter CD8<sup>+</sup>-Zellanteil bei zwei Pferd(en) festgestellt. Abweichungen der

CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>-Ratio wiederum zeigten sich in Form einer Erhöhung bei zwei und in Form einer Erniedrigung bei einem Pferd(en).

In Gruppe 4 schließlich wurden bei keinem Pferd erhöhte und bei zwei Pferden erniedrigte B-Zellanteile ermittelt, während vier bzw. ein Pferd(e) erhöhte bzw. erniedrigte relative Anteile an T-Lymphozyten aufwiesen. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen waren ebenfalls bei vier Pferden erhöht und bei einem Pferd erniedrigt. Bei jeweils zwei Pferden wurde ein erhöhter CD8<sup>+</sup>-T-Zellanteil bzw. eine erniedrigte CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>-Ratio festgestellt, während jeweils sieben Pferde einen erniedrigten CD8<sup>+</sup>-T-Zellanteil bzw. eine erhöhte CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>-Ratio aufwiesen.

Tab. 10 Vergleich der Häufigkeiten von erhöhten bzw. erniedrigten Anteilen der B-, T-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und der CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>-Ratio bei augenkranken und augengesunden Test- und Kontrolltieren

Relativen Anteile der Zellen erhöht bzw. erniedrigt:	Anzahl Pferde Gruppe 1 n = 4	Anzahl Pferde Gruppe 2 n = 6	Anzahl Pferde Gruppe 3 n = 6	Anzahl Pferde Gruppe 4 n = 15
B-Zellen erhöht	1 [25]	0 [0]	1 [17]	0 [0]
B-Zellen erniedrigt	0 [0]	4 [67]	0 [0]	2 [13]
T-Zellen erhöht	1 [25]	2 [33]	2 [33]	4 [27]
T-Zellen erniedrigt	0 [0]	0 [0]	0 [0]	1 [7]
CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen erhöht	0 [0]	1 [17]	1 [17]	4 [27]
CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen erniedrigt	2 [50]	0 [0]	0 [0]	1 [7]
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen erhöht	2 [50]	0 [0]	1 [17]	2 [13]
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen erniedrigt	1 [25]	2 [33]	2 [33]	7 [47]
CD4 <sup>+</sup> :CD8 <sup>+</sup> Ratio erhöht	0 [0]	2 [33]	2 [33]	7 [47]
CD4 <sup>+</sup> :CD8 <sup>+</sup> Ratio erniedrigt	3 [75]	1 [17]	1 [17]	2 [13]

Gruppe 1: beinhaltet augenkranke Pferde, bei denen EHV-2 in Augentupfern (AT) oder peripheren Blutleukozyten (PBL) per nPCR festgestellt wurde

Gruppe 2: beinhaltet augengesunde Pferde, bei denen EHV-2 in AT oder PBL per nPCR festgestellt wurde

Gruppe 3: beinhaltet augenkranke Pferde, bei denen EHV-2 weder in PBL noch in AT per nPCR detektiert werden konnte

Gruppe 4: beinhaltet augengesunde Pferde, bei denen EHV-2 weder in PBL noch in AT per nPCR nachgewiesen wurde

n: Gesamtzahl der untersuchten Pferde der jeweiligen Gruppe

[ ]: Anteil der Pferde der jeweiligen Gruppe mit der entsprechenden Abweichung in Prozent

Die Häufigkeit des Vorkommens von erhöhten bzw. erniedrigten T-, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozytenanteilen war demnach zwischen den vier Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Das gleiche trifft für die Häufigkeit des Auftretens einer erhöhten bzw. erniedrigten CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup>-Ratio zwischen den vier Gruppen zu. Bei den B-Lymphozytenzahlen wurden hingegen einige signifikante Unterschiede festgestellt; so zeigten augengesunde Testtiere (Gruppe 2) signifikant häufiger erniedrigte relative Anteile an B-Lymphozyten als augenkrank (Gruppe 3) bzw. augengesunde Kontrolltiere (Gruppe 4) ( $p = 0,0303$  bzw.  $0,0307$ ). Die Häufigkeit des Vorkommens von erhöhten B-Lymphozytenanteilen war zwischen den vier Gruppen hingegen nicht signifikant unterschiedlich, wenngleich EHV-2-nPCR positive augenkrank (Gruppe 1) etwas häufiger erhöhte B-Lymphozytenzahlen aufwiesen, als EHV-2-nPCR negative gesunde Pferde (Gruppe 4).

#### 4.2.2.2 Ergebnisse des Differentialblutbildes bei EHV-2-nPCR positiven und negativen kranken und gesunden Pferden

Wie in Tab. 11 dargestellt, wurden beim Differentialblutbild insgesamt nur wenige Abweichungen bei den Pferden der vier Gruppen festgestellt. So wiesen alle vier augenkranken EHV-2-nPCR positiven Pferde der Gruppe 1 ein in der Norm liegendes Differentialblutbild auf.

Bei den Pferden der Gruppe 2 wies jeweils ein Pferd eine erhöhte Gesamtleukozytenzahl, einen erhöhten bzw. erniedrigten Anteil an segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, einen erhöhten Lymphozytenanteil sowie eine Basophilie auf. Alle anderen Zellpopulationen lagen im Normbereich.

In Gruppe 3 wies(en) ein Pferd eine erhöhte Gesamtleukozytenzahl, drei Pferde einen erhöhten Anteil an segmentkernigen neutrophilen Granulozyten sowie wiederum ein Pferd eine Eosinophilie auf. Außerdem wurde bei einem Pferd dieser Gruppe ein erniedrigter Lymphozytenanteil festgestellt.

Bei den 15 augengesunden EHV-2-nPCR negativen Pferden (Gruppe 4) wurden die folgenden Abweichungen festgestellt: ein Pferd wies eine Basophilie auf, während jeweils zwei Pferde eine erhöhte Gesamtleukozytenzahl bzw. eine Monozytose aufwiesen. Bei jeweils fünf Pferden war wiederum der Anteil der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten erniedrigt bzw. der Lymphozytenanteil erhöht. Schließlich wiesen drei Pferde eine Eosinophilie auf.

Signifikante Unterschiede bei der Häufigkeit des Auftretens von Abweichungen beim Differentialblutbild wurden zwischen den vier Gruppen nicht festgestellt.

Tab. 11 Vergleich der Häufigkeiten des Vorkommens von erhöhten und erniedrigten Gesamtleukozytenzahlen bzw. Anteilen der einzelnen Zellarten des Differentialblutbildes bei augenkranken und augengesunden Test- und Kontrolltieren

Anteile(*) der Zellen erhöht bzw. erniedrigt:	Anzahl Pferde Gruppe 1 n = 4	Anzahl Pferde Gruppe 2 n = 6	Anzahl Pferde Gruppe 3 n = 6	Anzahl Pferde Gruppe 4 n = 15
Leukozyten erhöht	0	1 [17]	1 [17]	2 [13]
Leukozyten erniedrigt	0	0	0	0
Sgmtk. neutr. Granulos erhöht	0	1 [17]	3 [50]	0
Sgmtk. neutr. Granulos erniedrigt	0	1 [17]	0	5 [33]
Stabk. neutr. Granulos erhöht	0	0	0	0
Stabk. neutr. Granulos erniedrigt	0	0	0	0
Eosinophile erhöht (Eosinophilie)	0	0	1 [17]	3 [20]
Eosinophile erniedrigt	0	0	0	0
Basophile erhöht (Basophilie)	0	1 [17]	0	1 [7]
Basophile erniedrigt	0	0	0	0
Monozyten erhöht (Monozytose)	0	0	0	2 [13]
Monozyten erniedrigt	0	0	0	0
Lymphozyten erhöht	0	1 [17]	0	5 [33]
Lymphozyten erniedrigt	0	0	1 [17]	0

- (\*): bei der Gesamtleukozytenzahl wurde die absolute Zahl berücksichtigt
- Gruppe 1: beinhaltet augenkranke Pferde, bei denen EHV-2 in Augentupfern (AT) oder peripheren Blutleukozyten (PBL) per PCR festgestellt wurde
- Gruppe 2: beinhaltet augengesunde Pferde, bei denen EHV-2 in AT oder PBL per PCR festgestellt wurde
- Gruppe 3: beinhaltet augenkranke Pferde, bei denen EHV-2 weder in PBL noch in AT per PCR detektiert werden konnte
- Gruppe 4: beinhaltet augengesunde Pferde, bei denen EHV-2 weder in PBL noch in AT per PCR nachgewiesen wurde
- n: Gesamtzahl der untersuchten Pferde der jeweiligen Gruppe
- [ ]: Anteil der Pferde der jeweiligen Gruppe mit der entsprechenden Abweichung in Prozent
- sgmtk.: segmentkernige
- neutr.: neutrophile
- Granulos: Granulozyten
- Stabk.: stabkernige

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

Da eine ätiologische Beteiligung von EHV-2 bei diversen Augenentzündungen des Pferdes in mehreren Vorarbeiten des Instituts aufgezeigt werden konnte, wurden im Rahmen der klinischen Diagnostik erneut Tupfer- und Cytobrushproben aus dem Auge sowie aus Blutproben isolierte PBL von erkrankten und gesunden Pferden mittels nested PCR auf EHV-2-Genom untersucht. Zusätzlich wurde eine PCR-Untersuchung bei einigen dieser Proben auf EHV-5 und anhand von Stichproben auch auf EAdV-1, Chlamydien und Mykoplasmen durchgeführt um die Frage zu klären, ob bakterielle und virale Co-Faktoren eine Rolle bei Augenentzündungen des Pferdes spielen.

In Tabelle 3 des Anhangs sind alle Detailergebnisse der verschiedenen nPCRs separat für augenkranke und gesunde Pferde aufgelistet.

##### 4.3.1 Untersuchungen auf EHV-2

Innerhalb des Zeitraums August 2003 bis April 2005 wurden 93 Cytobrush- bzw. Augentupferproben von 68 augenkranken Pferden (T1-T68) sowie von zwölf dieser Pferde zusätzlich Blutproben zur Untersuchung der peripheren Blutleukozyten auf EHV-2 eingeschickt. Vorberichtlich waren die Pferde an einer Keratitis, Konjunktivitis oder Keratokonjunktivitis erkrankt. Die Proben wurden sowohl von akut, als auch von chronisch rezidivierend erkrankten Pferden entnommen, ausführliche anamnestische Daten standen jedoch nicht in jedem Fall zur Verfügung.

Weiterhin wurden 44 Tupfer- bzw. Cytobrushproben aus dem Auge sowie 26 Blutproben von 26 der insgesamt beprobten 32 klinisch gesunden Pferde (K1-K32) auf EHV-2 untersucht. Die Probenentnahme wurde von aus unterschiedlichen Standorten stammenden Pferden, durch verschiedene Tierärzte vorgenommen.

Entsprechend ihres Vorberichtes wurden die Pferde in die folgenden 2 Gruppen eingeteilt:

1. augenkranke Pferde, die zum Zeitpunkt der Probennahme an einer Keratitis, Konjunktivitis oder Keratokonjunktivitis erkrankt waren (T1-T68)
2. klinisch gesunde Pferde (K1-K32)

Eine Übersicht über die Anzahl der positiven EHV-2-nPCR-Nachweise im Auge bzw. in den PBL bei den beiden Gruppen ist in Tab. 12 dargestellt.

Tab. 12 Nachweisrate von EHV2-Genom in Augen- bzw. Cytobrushtupfern und PBL bei augenkranken und klinisch gesunden Pferden

Untersuchte Gruppe	EHV-2 Untersuchung bei [n] Pferden	Anzahl auf EHV-2 untersuchter Tupfer	Anzahl EHV-2-nPCR positiver Tupfer	Anzahl auf EHV-2 untersuchter PBL	Anzahl EHV-2-nPCR positiver PBL
<b>Gruppe 1: Augenkranken Pferde (T1-T68)</b>	68	93	13	12	3
<b>Gruppe 2: Klinisch gesunde Pferde (K1-K32)</b>	26*	44	8	26	5
<b>Summe:</b>	94	137	21	38	8

\* 6 klinisch gesunde Pferde wurden ausschließlich auf EHV-5 untersucht (4.3.2)

Aus Tab. 12 geht hervor, dass insgesamt 137 Tupferproben aus den Augen von 94 Pferden entnommen, entsprechend aufgearbeitet (3.4.1) und auf EHV-2-Genom mittels nPCR untersucht wurden (3.6.1). Bei jeder durchgeführten PCR wurden interne Präparations- und Substanzkontrollen zur Vermeidung falsch positiver/negativer Ergebnisse mitgeführt.

EHV-2 Genom wurde in 21 der 137 Cytobrush- bzw. Augentupferproben detektiert, wobei 13 positive Tupfer von augenkranken und acht positive Tupfer von klinisch gesunden Pferden stammten. Bei den augenkranken Pferden (Gruppe 1) wurde EHV-2-Genom demnach mit einer Nachweisrate von 14% aus 93 untersuchten Cytobrush- bzw. Augentupferproben detektiert, während die Nachweisrate in der 2. Gruppe 18% betrug, da sich acht der 44 untersuchten Tupferproben aus dem Auge als EHV-2-nPCR positiv erwiesen. Diese unterschiedliche Nachweisrate von EHV-2 war zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant ( $\chi^2 = 0,44$ ).

Von 38 der 94 Pferde standen zusätzlich Blutproben zur Isolierung (3.5.1) und EHV-2-nPCR-Untersuchung (Kapitel 3.6.1) der PBL zur Verfügung.

Die Detektion von EHV-2-Genom in den peripheren Blutleukozyten erfolgte bei drei der zwölf untersuchten augenkranken Pferde und bei fünf von 26 untersuchten klinisch gesunden Pferden. Somit betrug die Nachweisrate von EHV-2 in PBL bei augenkranken Pferden (Gruppe 1) 25% und 19% bei den klinisch gesunden Pferden der Gruppe 2. Auch diese unterschiedliche Nachweishäufigkeit von EHV-2 erwies sich als nicht signifikant ( $\chi^2 = 0,16$ ).

Wie aus den Ergebnissen der Untersuchungen auf EHV-2 hervorgeht, wurden zwischen augenkranken und klinisch gesunden Pferden nur marginal unterschiedliche Nachweisraten von EHV-2-Genom im Auge festgestellt. Auch der häufige Virusgenomnachweis im gesun-

den Auge deutet auf eine mehr prädisponierende Wirkung des EHV-2, unter Umständen unter der Beteiligung von Co-Faktoren hin, oder aber EHV-2 wirkt selbst als Co-Faktor anderer Viren und/oder Bakterien. Inwieweit an der Entstehung der equinen Keratokonjunktivitis auch EHV-5, EAdV-1, Chlamydien oder Mykoplasmen beteiligt sind, wurde daher im Folgenden untersucht.

### 4.3.2 Untersuchungen auf Doppelinfektionen von EHV-2 und EHV-5

Aufgrund der engen Verwandtschaft des equinen Herpesvirus Typ 5 mit EHV-2, des zum Teil relativ häufig erfolgten EHV-5-Nachweises im Auge beim Pferd (Krüdwagen *et al.*, 2001; Besthorn, 2002) und der Hinweise von Besthorn (2002) auf Doppelinfektionen von EHV-2 und EHV-5 im Auge wurden 40 der zuvor schon auf EHV-2 untersuchten Cytobrush- bzw. Augentupferproben, die von 33 der 68 augenkranken Pferde stammten, mittels EHV-5-nPCR untersucht (3.6.1). Vergleichend wurden von fünf der 26 zuvor schon auf EHV-2 untersuchten klinisch gesunden Pferde (Tab. 12) zehn aus dem Auge entnommene Tupferproben auf EHV-5-Genom untersucht. Zusätzlich standen von fünf klinisch gesunden Pferden fünf weitere Cytobrushtupfer aus dem Auge zur Verfügung, die ausschließlich auf EHV-5 untersucht wurden.

Schließlich wurden die aus Blutproben isolierten PBL von fünf der 68 augenkranken und von 13 klinisch gesunden Pferden mit der EHV-5-nPCR untersucht. Die Gewinnung und Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in den Kapiteln 3.4 und 3.5 beschrieben.

In Tab. 13 ist eine Übersicht über die Anzahl der positiven EHV-5-nPCR-Nachweise im Auge bzw. in den PBL bei augenkranken und gesunden Pferden dargestellt.

Tab. 13 Anzahl der positiven EHV-5-DNA-nPCR-Nachweise in Augentupfern und PBL bei augenkranken und klinisch gesunden Pferden

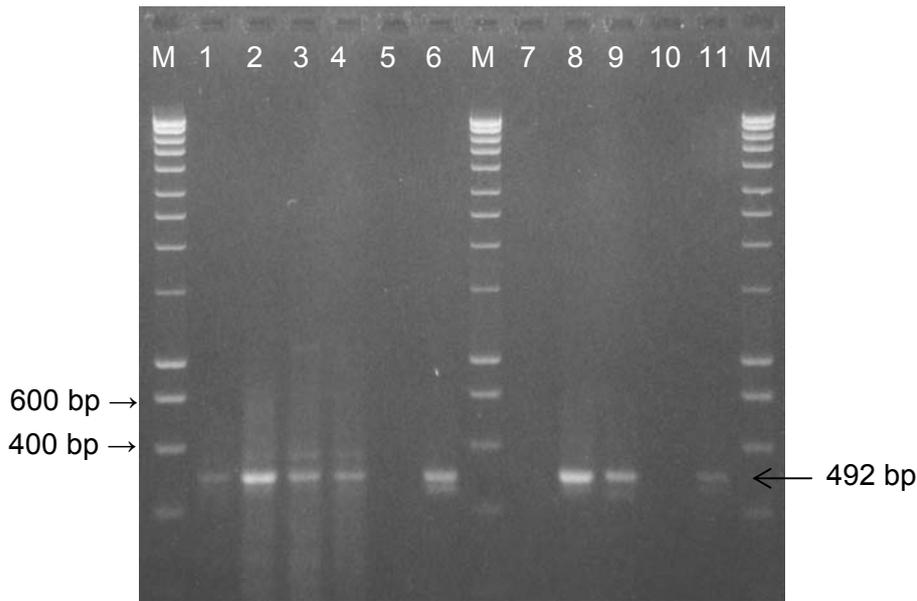
Untersuchte Gruppe	EHV-5 Untersuchung bei [n] Pferden	Anzahl auf EHV-5 untersuchter Tupfer	Anzahl EHV-5-nPCR positiver Tupfer	Anzahl auf EHV-5 untersuchter PBL	Anzahl EHV-5-nPCR positiver PBL
<b>Gruppe 1:</b> <b>Augenranke Pferde (T1-T68)</b>	33	40	10	5	1
<b>Gruppe 2:</b> <b>Klinisch gesunde Pferde (K1-K32)</b>	10	15	3	13	3
<b>Summe:</b>	43	55	13	18	4

Tab. 13 zeigt auf, dass in 13 der 55 aus dem Auge entnommenen Tupferproben EHV-5-Genom detektiert wurde. Bei den Pferden der Gruppe 1 erwiesen sich zehn von 40 Tupfern (Nachweisrate 25%) als EHV-5-nPCR positiv, während in der Gruppe 2 bei drei von 15 Tupfern (Nachweisrate 20%) EHV-5-Genom nachgewiesen wurde.

In den peripheren Blutleukozyten wurde der Nachweis von EHV-5- Genom insgesamt bei vier Pferden geführt: bei einem augenkranken und bei drei klinisch gesunden Pferd(en). In Gruppe 1 betrug der Anteil der PBL EHV-5-nPCR positiven Pferde somit 20% (Nachweis von EHV-5-Genom in PBL bei einem von fünf Pferden) und 23% in Gruppe 2 (drei von 13). In Abb. 2 sind beispielhaft EHV-5-spezifische nPCR-Produkte in PBL und Tupfern bei Pferden der beiden Gruppen dargestellt.

Bei der Anwendung des  $\chi^2$ - Tests (3.10) ergab sich weder bei Cytobrush- bzw. Augentupfern, noch bei den PBL ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Merkmalen „augengesund“ und „augenkrank“ und dem Nachweis von EHV-5-DNA.

Abb. 2 Nachweis von EHV-5 mittels nPCR in Tupfern und PBL von Pferden der Gruppe 1 und 2



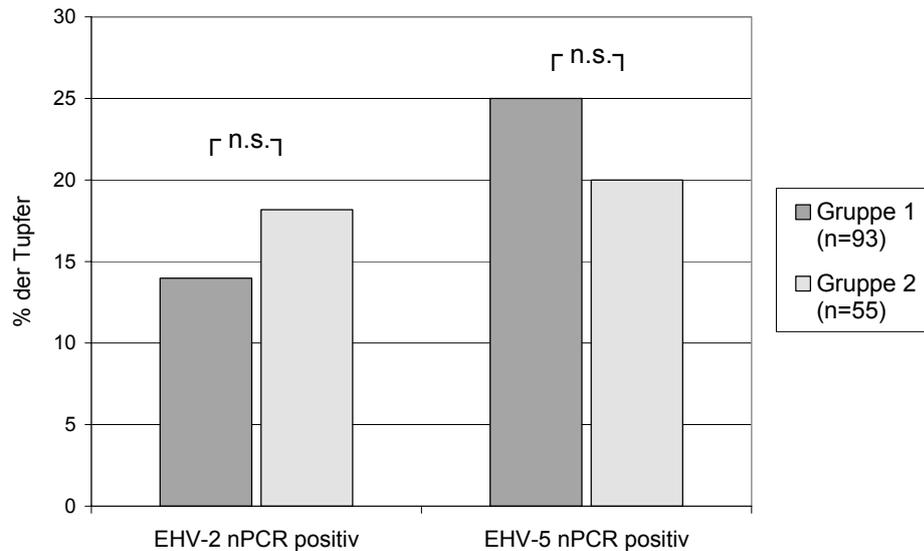
Die Amplifikate der EHV-5-nPCR wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromidzugabe sichtbar gemacht.

Auftragung:

M:	Marker, Hyperladder Bioline	M:	Marker, Hyperladder Bioline
1:	PBL Nr. K 6	7:	Cytobrush links Nr. K 14
2:	PBL Nr. K 10	8:	Cytobrush Nr. K 28
3:	PBL Nr. K 11	9:	Cytobrush Nr. K 29
4:	PBL Nr. T 28	10:	Negativkontrolle
5:	Negativkontrolle	11:	p 48 (EHV-5 Positivkontrolle)
6:	p48 (EHV-5 Positivkontrolle)	M:	Marker, Hyperladder Bioline

Eine vergleichende Darstellung der Nachweisraten von EHV-2 bzw. EHV-5 in Tupfern bei augenkranken und klinisch gesunden Pferden entsprechend der Ergebnisse in den Tab. 12 und Tab. 13 wird nochmals graphisch in Diagramm 3 gezeigt.

Diagramm 3 Nachweisrate von EHV-2 und EHV-5 in Cytobrush- bzw. Augentupfern bei augenkranken und klinisch gesunden Pferden in Prozent



Gruppe 1: augenkranke Pferde

Gruppe 2: augengesunde Pferde

n.s.: nicht signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2

n: Gesamtzahl der in der jeweiligen Gruppe untersuchten Cytobrush- bzw. Augentupfer

Insgesamt wurden 50 aus dem Auge entnommene Tupfer von 35 Pferden mittels nPCR parallel auf EHV-2 und EHV-5 untersucht (s. Tab. 14). In Gruppe 1 wurde nur bei einem von 40 Tupfern (Cytobrush links Nr. T 55) sowohl EHV-2-, als auch EHV-5-Genom detektiert, während eine Doppeldetektion beider Viren bei den Pferden der Gruppe 2 ebenfalls in einem von 10 untersuchten Tupfern (Cytobrush links Nr. K 14) erfolgte.

Bei der Doppeluntersuchung auf EHV-2 und -5 von bei fünf augenkranken und zwölf klinisch gesunden Pferden isolierten PBL (Daten nicht gezeigt) wurden die beiden Viren hingegen nicht gleichzeitig nachgewiesen.

Tab. 14 Anzahl der Cytobrush- bzw. Augentupfer von augenkranken und klinisch gesunden Pferden in denen EHV-2- und EHV-5-Genom detektiert wurde

Untersuchte Gruppe	EHV-2 und EHV-5 Untersuchung bei [n] Pferden	Anzahl auf EHV-2 und EHV-5 untersuchter Cytobrush- bzw. Augentupfer	EHV-2 und EHV-5 Nachweis bei [n] Cytobrush- bzw. Augentupfern
<b>Gruppe 1:</b> Augenranke Pferde (T1-T68)	30	40	1
<b>Gruppe 2:</b> Klinisch gesunde Pferde (K1-K32)	5	10	1
<b>Summe:</b>	35	50	2

#### 4.3.3 Ergebnisse der Untersuchungen von Pferden mit und ohne Augenerkrankung auf EAdV-1

##### 4.3.3.1 Aufbau einer nested PCR zum Nachweis des equinen Adenovirus Typ 1 (EAdV-1)

Die nested PCR zum Nachweis des equinen Adenovirus Typ 1 (EAdV-1) wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Zunächst erfolgte die Primerauswahl anhand der auf der Homepage des „National Center for Biotechnology Information“ gefundenen Genbank mit der Nummer AAB 88062. Dieses so genannte „Hexon-Gen“ des EAdV-1 wurde zuerst von Reubel und Studdert (1997) beschrieben. Anhand des „MacVektor-Programms“ für Macintosh wurden schließlich die in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Externen und Internen Primer ausgewählt. Nach Verdünnen der lyophilisierten Primer und deren photometrischer Vermessung mit anschließendem Ansetzen der Primer-Stocklösungen wurden so lange Versuchsreihen durchgeführt, bis die optimalen PCR-Bedingungen definiert werden konnten (3.6.1). Anschließend wurde von einer photometrisch bestimmten Ausgangskonzentration einer gereinigten Virus-DNA des EAdV-1 eine Verdünnungsreihe angelegt und die Sensitivitätsgrenze der nPCR bestimmt, die bei 2 fg/μl liegt (25 äquivalente Genome des EAdV-1). Da gereinigte Virus-DNA von EHV-1, -2, -4 und -5 in der nPCR nicht amplifiziert wurde, konnte eine Kreuzreaktion der eingesetzten Primer mit diesen equinen Herpesviren ausgeschlossen werden.

##### 4.3.3.2 Untersuchungen auf EAdV-1

Wie in der Einleitung dargestellt, werden beim Menschen Adenoviren für klinische Veränderungen der Hornhaut in Form einer Keratitis punctata verantwortlich gemacht (Sundmacher *et al.*, 2001). Auch wenn bisher beim Pferd Adenoviren eher im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen beschrieben wurden (Rolle und Mayr, 2002), sollte eine mögliche ätiologische Beteiligung dieses Virus bei Pferden mit einer Augenentzündung näher unter-

sucht werden. Aufgrund der limitierten Probenmenge wurden jedoch zunächst nur Stichprobenanalysen vorgenommen. Falls sich daraus Hinweise einer Beteiligung dieses Virus ergeben hätten, sollten diese Untersuchungen auf eine größere Tieranzahl und auch auf klinisch gesunde Kontrolltiere ausgedehnt werden.

Insgesamt wurden von 15 der zuvor schon auf EHV-2 untersuchten augenkranken Pferde der Gruppe 1 (T1-T68) 19 Cytobrush- bzw. Augentupferproben mittels der im Rahmen dieser Arbeit etablierten nested PCR (3.6.1 und 4.3.3.1) auf das Vorkommen von EAdV-1-Genom untersucht. Bei drei der 19 auf EAdV-1 untersuchten Tupfer war zuvor schon EHV-2-Genom detektiert worden. EAdV-1 wurde jedoch mittels nPCR in keinem der Tupfer nachgewiesen (siehe Tabelle 3 (a, b) im Anhang).

Anhaltspunkte, die auf eine mögliche Beteiligung des EAdV-1 an der equinen Keratokonjunktivitis hindeuten würden ergaben sich somit nicht, weshalb auf umfangreichere Untersuchungen verzichtet wurde.

#### 4.3.4 Ergebnisse der Untersuchungen von Augentupfern auf Chlamydien und Mykoplasmen

Ob eine ätiologische Beteiligung von Chlamydien und Mykoplasmen, wie sie bereits beim Menschen, bei der Katze und beim Rind im Zusammenhang mit Augenentzündungen diskutiert und dabei teilweise auch als Doppelinfection mit einem Herpesvirus beschrieben werden (siehe einleitendes Kapitel 1.6.2) auch bei Pferden mit equiner Keratokonjunktivitis besteht, sollte ebenfalls bei augenkranken und klinisch gesunden Pferden untersucht werden.

Aus diesem Grunde wurden in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU Berlin anhand von Stichproben (20 Augen- bzw. Cytobrushtupfer), die wiederum von sechs augenkranken Pferden der Gruppe 1 (T1-T68) und von sechs klinisch gesunden Pferden der Gruppe 2 (K1-K32) stammten, mittels PCR untersucht. EHV-2-Genom war zuvor in zwei der von neun bei Pferden der Gruppe 1 sowie in vier von elf bei Pferden der Gruppe 2 aus dem Auge entnommenen Tupfern nachgewiesen worden.

Hinweise auf eine Beteiligung von Chlamydien und Mykoplasmen bei Augenentzündungen des Pferdes ergaben sich nicht, da die beiden Erreger in keinem der 20 Tupferproben detektiert werden konnten (siehe Tabelle 3 (a, b) im Anhang).

#### 4.4 Ergebnisse der Untersuchungen zum Gewebetropismus von EHV-2 und EHV-5 im Auge

Der Nachweis von EHV-2 gelang bisher nicht nur in Augentupferproben, sondern auch in diversen Augengeweben, die von augengesunden Pferden stammten (Kershaw, 2002; Ebert *et al.*, 2003). Untersuchungen zur Präsenz des EHV-5 im Augengewebe sind in der Literatur hingegen bis dato noch nicht beschrieben. Durch die Kooperation mit einem Pferdeschlachthof in Genthin war es im Rahmen dieser Arbeit möglich geworden, Gewebeproben aus dem Auge von 14 frisch geschlachteten, klinisch gesunden Pferden zu entnehmen und mittels nPCR auf EHV-2- und teilweise auch auf EHV-5-Genom zu untersuchen. Von neun dieser Pferde wurden vor Herausnahme der Gewebe- zusätzlich Cytobrushtupferproben beidseitig aus dem Auge entnommen und untersucht (siehe 4.4.1). Bei EHV-2-nPCR positiven Geweben sollte anschließend der Versuch unternommen werden, eine *In situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten EHV-2-Sonde durchzuführen (3.9.6), um das Virus direkt im Augengewebe nachzuweisen. Diese Studien zum Gewebe- und Zelltropismus beider Viren sollten einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Pathogenese der equinen Keratokonjunktivitis liefern und insbesondere aufzeigen, dass EHV-2 im Augengewebe bei gesunden Pferden vorliegt und dort möglicherweise in Latenz geht.

##### 4.4.1 Ergebnisse der einzelnen Gewebe- und Tupferproben mittels der Polymerasekettenreaktion

Zunächst wurden die Proben entsprechend der Beschreibung im Kapitel 3.5.3 bzw. 3.4.1 aufgearbeitet. Von insgesamt 14 verschiedenen Pferden wurden jeweils die folgenden Gewebe aus beiden Augen entnommen und mittels nested PCR (3.6.1) auf EHV-2 untersucht: 28 Konjunktivalproben, jeweils zehn Korneal- und Retinalproben sowie zehn Proben des Nervus opticus. Zusätzlich wurden 18 Cytobrushtupferproben von neun der 14 Pferde entnommen und analog aufgearbeitet und auf EHV-2-Genom untersucht. Die nPCR-Untersuchung auf EHV-5-Genom erfolgte bei zwölf der 14 Pferde wie folgt: 24 Konjunktivalproben, jeweils sechs Korneal- und Retinalproben, sechs Proben des Nervus opticus sowie 18 Cytobrushtupferproben.

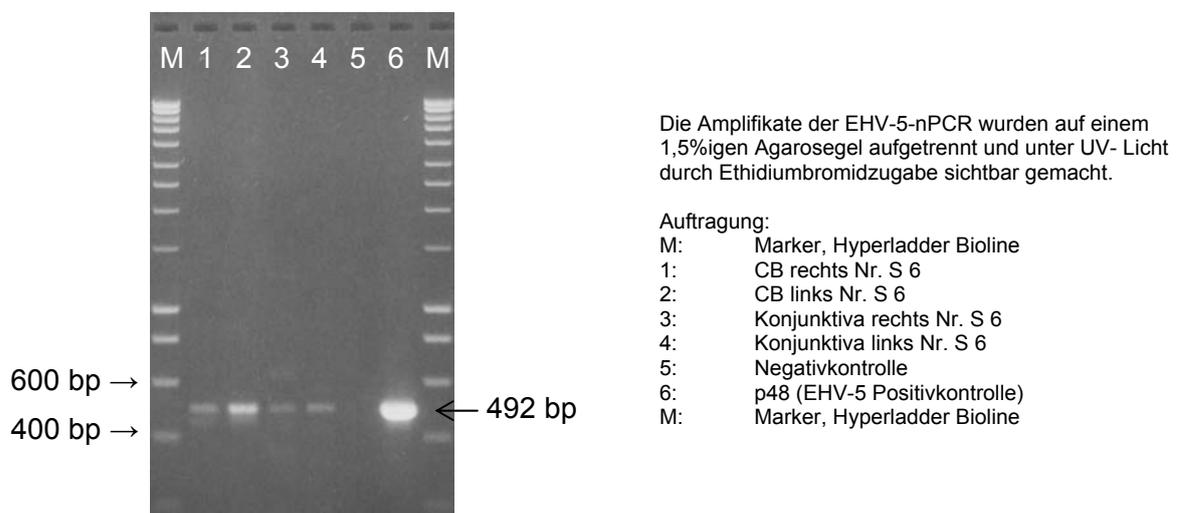
Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse kann Tabelle 4 im Anhang entnommen werden.

Der Nachweis von EHV-2-DNA konnte bei zwei von 28 Konjunktivalgewebeproben, die beide von einem Pferd stammten (S 9) sowie bei zwei von 18 Cytobrushtupferproben eines weiteren Pferdes (S 6) geführt werden. Somit betrug die Nachweisrate von EHV-2-Genom 7,1% im Konjunktivalgewebe respektive 11% in Cytobrushtupfern. Bei allen anderen Proben und Geweben der 14 Pferde konnte EHV-2 hingegen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Auch die Nachweisrate von EHV-5-Genom war gering: In zwei von 18 Cyto Brushtupfern sowie zwei von 24 auf EHV-5 mittels nPCR untersuchten Konjunktivalgeweben wurde Virusgenom beidseitig bei einem Pferd (S 6) detektiert. Dies entsprach einer 11%igen bzw. 8,3%igen Nachweisrate von EHV-5 in Cyto Brushtupfern bzw. Konjunktivalgewebe. Interessanterweise handelte es sich bei diesem Pferd (S 6) um dasselbe Pferd, bei dem sich zuvor schon beide Cyto Brushtupfer als EHV-2-nPCR positiv erwiesen hatten.

In Abb. 3 sind beispielhaft EHV-5-spezifische nPCR-Produkte des Pferdes S 6 auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Abb. 3 Nachweis von EHV-5 mittels nPCR in Cyto Brushtupfern und Konjunktivalgewebe bei dem Schlachthofpferd S 6



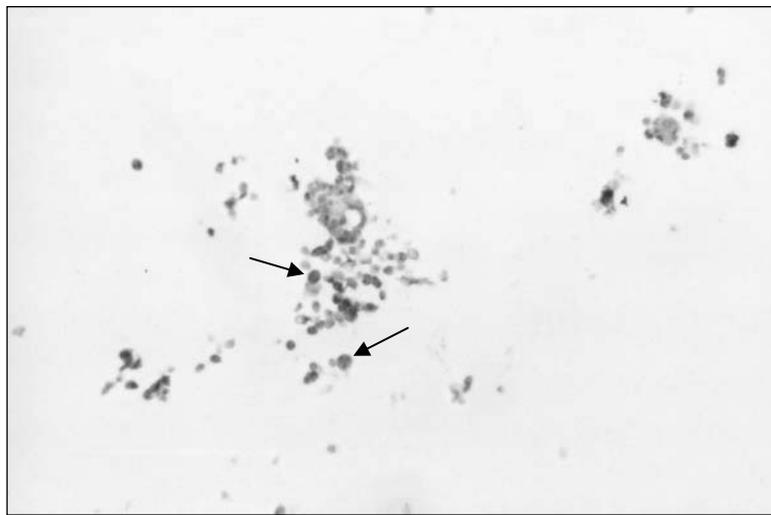
#### 4.4.2 Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte entsprechend der für EHV-1/4 etablierten Methode (Smith und Borchers, 2001) der *In situ*-Hybridisierung eine EHV-2 spezifische Sonde für den direkten Nachweis von EHV-2 im Augengewebe angewendet werden. Hierfür wurden zunächst von den EHV-2-nPCR positiven Gewebeproben der Konjunktiva des Schlachthofpferdes S 9 Paraffinschnitte hergestellt (3.9.1). Weiterhin wurden von den EHV-2-nPCR negativen Konjunktivalgeweben des Pferdes S 7 Paraffinschnitte angefertigt, die als Negativkontrolle dienten. Da auf Objektträger aufgezo gene Gewebe nicht zur Verfügung standen, wurden zusätzlich Negativ- und Positivkontrollen mittels Zyto zentrifugation von nicht-infizierten sowie mit EHV-2-infizierten Zellen präpariert (3.9.3). Schließlich erfolgte noch eine Überprüfung der eingebetteten Gewebeproben mittels  $\beta$ -Aktin-PCR wie im Kapitel 3.6.1 beschrieben (Daten nicht dargestellt), da die eigentliche *In situ*-Hybridisierung nur bei in ausreichender Menge vorhandenem Zellmaterial erfolgreich durchgeführt werden kann. Als Sonde diente eine mit Digoxigenin hergestellte (3.9.4) EHV-2-Gesamtgenomsonde (EHV-2-Stämme T16/T400, 200 ng). Die eigentliche *In situ*-Hybridisierung wurde schließlich wie im Kapitel 3.9.6 beschrieben

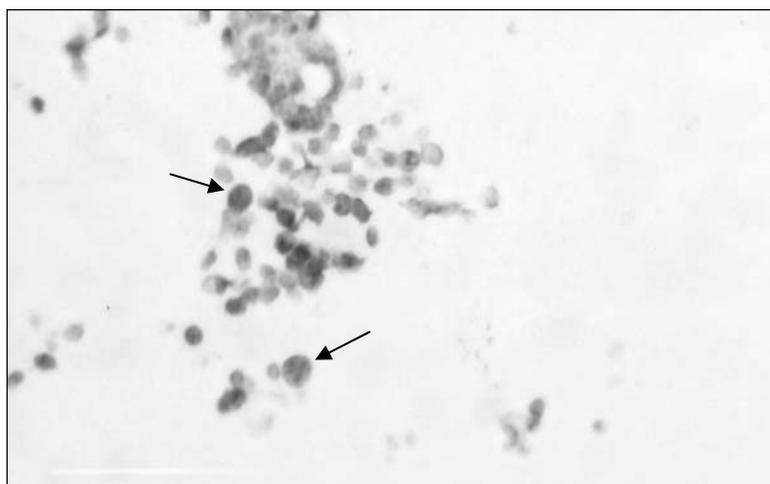
durchgeführt, nachdem zunächst unterschiedliche Versuchsbedingungen (Dauer und Konzentration der Inkubation mit Proteinase K wurden variiert) getestet wurden (Ergebnisse der einzelnen Versuche nicht gezeigt). Die Resultate der *In situ*-Hybridisierung werden im Folgenden in Form von mikroskopischen Aufnahmen dargestellt.

Die Fotos der Abb. 4 zeigen zunächst das Ergebnis des erfolgreich durchgeführten *In situ*-Hybridisierungsversuchs mit der Positivkontrolle.

Abb. 4 *In situ*-Hybridisierung: mit EHV-2 infizierte RK13-Zellen auf Objektträger zytocentrifugiert (Positivkontrolle)  
Vergrößerung 20x10 (a) bzw. 40x10 (b), Sonde: T16/RK13 dig



a)

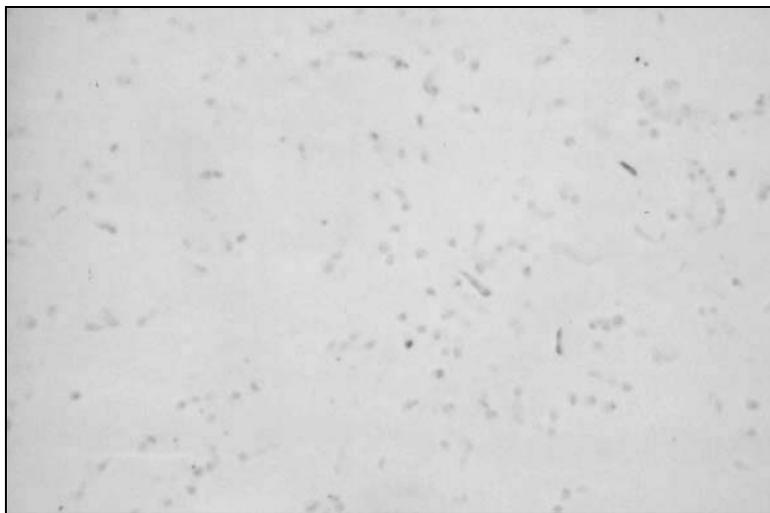


b)

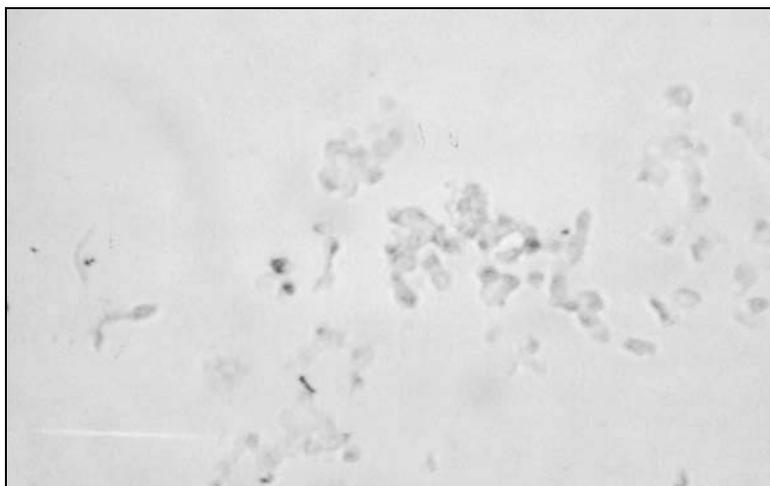
Auf beiden Abbildungen sind überwiegend einzeln liegende Zellen in mäßiger Anzahl und gut abgegrenzt dargestellt. Die Zellen zeigen deutliche, überwiegend vom Zellkern ausgehende positive Signale (exemplarisch mit Pfeilen markiert).

In Abb. 5 sind Aufnahmen der Hybridisierung der Negativkontrolle dargestellt. Im Vergleich mit der Abb. 4 zeigen die ebenfalls gut sichtbaren Zellen keine Signale, da die Zellen mit Ausnahme einzelner unspezifischer Reaktionen nicht angefärbt wurden.

Abb. 5 *In situ*-Hybridisierung: nicht infizierte RK13-Zellen auf Objektträger zytozentrifugiert (Negativkontrolle)  
Vergrößerung 20x10 (a) bzw. 40x10 (b), Sonde: T16/RK13 dig



a)

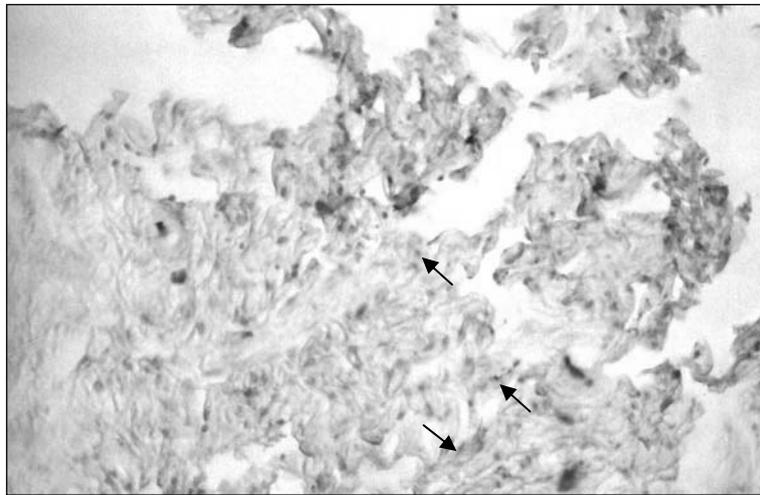


b)

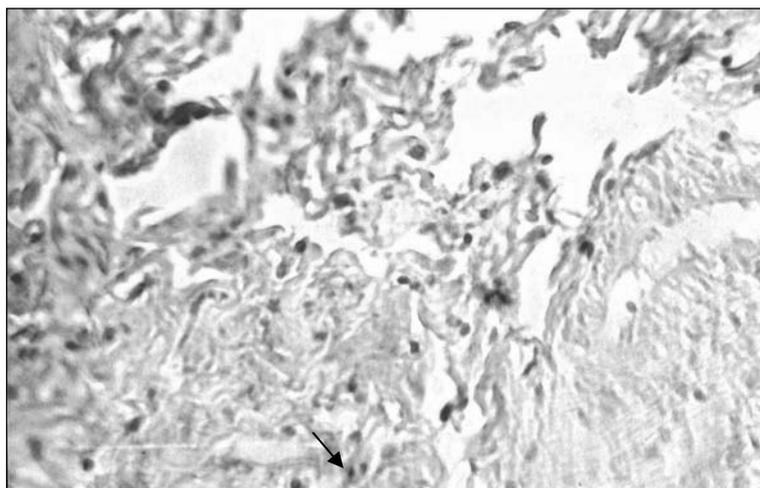
Auf den folgenden Seiten soll nun das Ergebnis der am Konjunktivalgewebe der beiden Pferde S 7 und S 9 durchgeführten *In situ*-Hybridisierung dargestellt werden, deren Interpretation sich am Augengewebe im Vergleich zur Bewertung bei Zellkontrollen deutlich schwieriger gestaltete.

In den drei mikroskopischen Aufnahmen der Abb. 6 ist zunächst der Versuch mit dem in der EHV-2-nPCR positiv getesteten Konjunktivalgewebe des linken Auges von Pferd Nr. S 9 dargestellt, bei dem positive Hybridisierungssignale (in Form von lila gefärbten Zellen) zu erwarten waren.

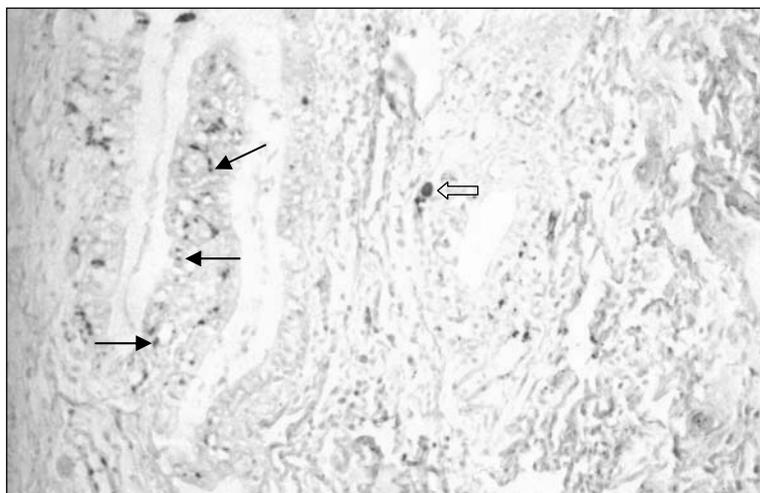
Abb. 6 *In situ*-Hybridisierung Konjunktiva links Pferd S 9 (EHV-2-nPCR positiv)  
Vergrößerung 20x10, Sonde T16/RK13 dig



a)



b)



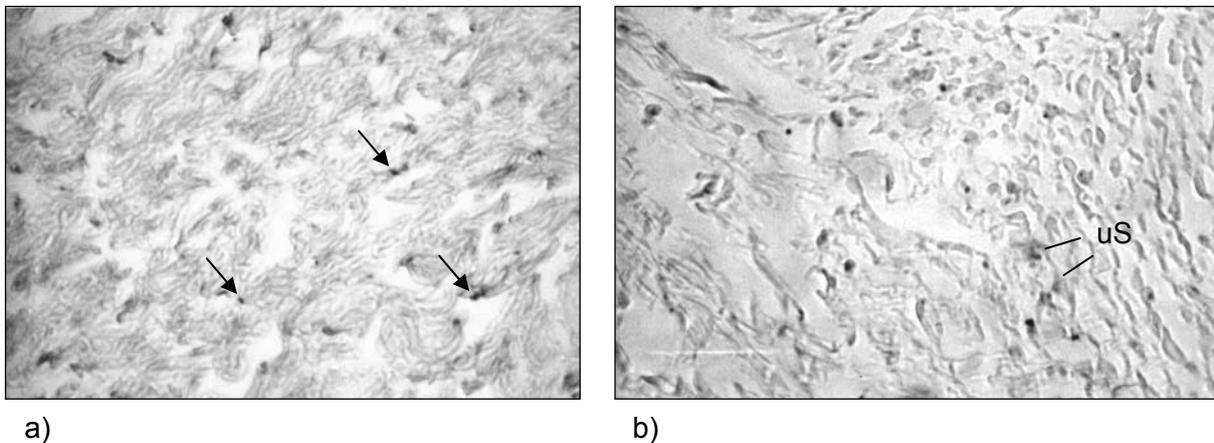
c)

Die Aufnahmen wurden von unterschiedlichen Bereichen der Conjunctiva palpebralis gemacht. Auf allen Bildern ist ein gut angefärbter, deutlich sichtbarer Zellgewebsverband erkennbar, bei dem es sich um die lockere Bindegewebsschicht (Lamina propria) der Conjunctiva palpebralis handelt. Die Pfeile in der Abb. 6 a und b markieren beispielhaft die Bereiche innerhalb dieser Bindegewebsschicht, von denen schwach positive, lilafarbene Signale ausgehen. Um welchen Zelltyp es sich dabei genau handelt, kann ohne die Durchführung von Spezialmethoden (zum Beispiel mittels Immunhistochemie) jedoch nicht ohne weiteres gesagt werden.

In Abb. 6 c hingegen markieren die Pfeile schwarze Verfärbungen innerhalb der Zellen, bei denen es sich möglicherweise um von Melanozyten produzierte Pigmentablagerungen handelt. Zusätzlich ist an einer Stelle eine Zelle mit einem schwach positiven, lilafarbenen Signal erkennbar, die mit einem Blockpfeil gekennzeichnet wurde.

Um das Ergebnis der *In situ*-Hybridisierung von Pferd Nr. S 9 besser bewerten zu können, sind in Abb. 7 Aufnahmen des Hybridisierungsversuches des EHV-2-nPCR negativen Pferdes mit der Nr. S 7 dargestellt.

Abb. 7 *In situ*-Hybridisierung Konjunktiva rechts Pferd S 7 (kein Nachweis von EHV-2-Genom mittels nPCR)  
Vergrößerung 20x10 (a) bzw. 40x10 (b), Sonde: T16/RK13 dig



Auch diese beiden Aufnahmen wurden von der Lamina propria der Conjunctiva palpebralis gemacht, deren Zellgewebsverband gut zu erkennen ist. Außer einigen unspezifischen Signalen überwiegend am Bildrand (in Abb. 7 b mit uS gekennzeichnet) sind erneut die zuvor beschriebenen schwarzen Pigmentablagerungen innerhalb der Zellen (siehe Pfeile in Abb. 7 a) erkennbar. Positive Signale, wie bei Pferd S 9 gezeigt, wurden hingegen wie erwartet nicht nachgewiesen.