

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Die COB des Pferdes
im Zusammenhang mit viralen Infektionen und
im Vergleich mit dem allergischen Asthma des Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
SABINE RÄTHEL
Tierärztin aus Neuss

Berlin 2007

Journal- Nr.: 3159

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Roland Rudolph
Zweiter Gutachter: PD Dr. Kerstin Borchers
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Arthur Grabner

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Respiratory Diseases, Horses, Equid Herpesvirus 2, Equine Rhinovirus, Interleukin 10, Interleukin 4, Interleukins, Interferon, Viral Diseases, Asthma, Human Diseases, Comparisons

Tag der Promotion: 24.04.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-523-3

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

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin - 030-45494866
verlag@menschundbuch.de - www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Literaturübersicht	6
2.1	COB beim Pferd	6
2.2	Histopathologische Befunde	7
2.3	Bedeutung ausgewählter Zytokine	7
2.4	COB beim Pferd im Vergleich mit dem allergischen Asthma beim Menschen.....	9
2.5	Virale Infektionen und COB	11
2.6	Zielsetzung	12
3	Eigene Untersuchungen	13
3.1	Material und Methoden	13
3.1.1	Materialnachweis	13
3.1.2	Geräte	13
3.2	Tiere	14
3.2.1	Gewinnung und Vorbereitung des Probenmaterials.....	14
3.3	Untersuchungstechniken	14
3.3.1	Anfertigung und Färbung der HE-Schnitte	14
3.3.2	DNA-Präparation aus Gewebeproben.....	15
3.3.3	RNA-Präparation aus Gewebeproben	16
3.3.4	Reverse Transkriptase (RT).....	17
3.3.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	18
3.3.6	Gelelektrophorese.....	22
4	Ergebnisse	24
4.1	Histologische Untersuchungen der HE-Schnitte.....	24
4.2	Ergebnisse aus der Reverse-Transkriptase- und Polymerase-Ketten-Reaktion	34
4.2.1	β-Aktin-PCR zur DNA-Qualitätsbestimmung und Untersuchung auf.....	34
	DNA-Kontamination	34
4.2.2	Nachweis von ERV- 1, ERV- 2 und EHV-2	34
4.2.3	Nachweis von IL-4 und IL-5, Zytokine der Th1-Zellen	35
4.2.4	Nachweis von IL-10 und IFN-γ, antiinflammatorische Zytokine, Th2- Zellen.....	37
4.2.5	Nachweis von IL-11 und GM-CSF, proinflammatorische Zytokine	39
5	Diskussion	43
5.1	Auswahl der Pferde und Gewebeproben	43
5.2	Virennachweis	44
5.3	Zytokinexpression	45

6	Zusammenfassung	48
7	Summary	51
8	Literaturverzeichnis	53
9	Anhang	61
9.1	Abkürzungsverzeichnis	61
9.2	Untersuchungsergebnisse Probenmaterial.....	64
9.2.1	Tab. 12: Befundbogen - klinische Untersuchung	64
9.2.2	Tab. 13: Histologische Befunde und histologische Diagnose.....	65
9.2.3	Tab. 14: Ergebnisse aus der DNA-Präparation, pro Ansatz wurden.....	73
9.2.4	Tab. 15: Ergebnisse aus der RNA-Präparation, pro Ansatz wurden.....	74
9.2.5	Tab. 16: PCR-Ergebnisse – ein Überblick.....	75
9.2.6	Tab. 17: Ergebnistabellen – nach histologischen Diagnosen sortiert.....	78
9.3	Danksagung	81
9.4	Lebenslauf	82
9.5	Selbstständigkeitserklärung.....	83

1 Einleitung

Da das Pferd in unserer heutigen Gesellschaft nicht mehr als Nutztier im ursprünglichen Sinne gesehen wird, sondern mehr Sportpartner und Freizeit-/ Hobbytier ist, hat auch die Bedeutung von Atemwegserkrankungen beim Pferd erheblich zugenommen. Innerhalb der respiratorischen Erkrankungen nimmt die chronisch obstruktive Bronchitis (COB) eine herausragende Position ein

COB ist eine bei Pferden weit verbreitete, schlecht therapierbare Lungenerkrankung, deren Entstehung auf immunologischer Ebene erst ungenügend erforscht ist. Der progressive Verlauf dieser Erkrankung führt bei den betroffenen Tieren zu Leistungseinbußen bis hin zur Unnutzbarkeit.

COB ist eine spezifische Reaktion auf bestimmte Allergene, geht im Freien und bei geringer Allergenbelastung in Remission und ist daher eher mit dem allergischen Asthma beim Menschen vergleichbar als mit der gleichnamigen Erkrankung (Fabbri et al., 1998). Als weitere Ursachen spielen genetische Disposition (Marti et al., 1991), physikalisch reizende Stäube und Gase (Collins and Algers, 1986) und Infektionskrankheiten (Gerber, 1973) eine Rolle.

Beim Menschen können respiratorische Viren das allergische Asthma vor allem über die Induktion von Zytokinen auslösen und verstärken (Folkerts et al., 1998). Beim Pferd wird diesbezüglich ein Zusammenhang vermutet (Robinson et al., 1996), ist aber noch wenig untersucht.

In Anlehnung an die Gemeinsamkeiten von COB beim Pferd und dem allergischen Asthma des Menschen soll der Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit auf dem möglichen Zusammenhang zwischen viralen Infektionen und der Entstehung der COB liegen. Zusätzlich sollen pathoimmunologische Vorgänge bei respiratorischen Erkrankungen des Pferdes untersucht werden. Zentraler Untersuchungsgegenstand ist dabei Lungengewebe von Pferden mit respiratorischen Erkrankungen und gesunden Kontrolltieren. Klinische und histologische Untersuchungen dienen der Einteilung der Pferde bzw. Proben in Schweregrad und Erkrankungsstufen. Molekularbiologische Techniken (DNA/RNA-Isolierung, RT-PCR) sollen zum Nachweis einer Virusinfektion und der damit einhergehenden Zytokinexpression herangezogen werden.

2 Literaturübersicht

2.1 COB beim Pferd

Zu den am häufigsten beim erwachsenem Pferd auftretenden Erkrankungen des Respirationstraktes gehört das Krankheitsbild der chronisch obstruktiven Bronchitis (COB). Die Inzidenz der Erkrankung reicht je nach Studie von z.B. 54% (Bracher et al., 1991) bzw. 37% (Winder et al., 1991) der Schweizer Pferde bis hin zu 12% im Norden der USA (Larson und Busch, 1985). Es sind vor allem Pferde der nördlichen Hemisphäre betroffen, da kälteres Klima und feuchte Sommermonate eine längere Einstallung und schlechtere Heu- und Strohqualität bedingen.

Synonym werden viele weitere Bezeichnungen gebraucht, u.a. *Dämpfigkeit*, *heaves*, *chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*, *chronic obstructive lung disease (COLD)*, *small airway disease* und *recurrent airway obstruction (RAO)*. Mit der Umbenennung in RAO wurde versucht, eine begriffliche Abgrenzung des Krankheitsbildes von der COB des Menschen zu erreichen (Robinson, 2001), da die Erkrankung eher dem allergischen Asthma als der COB ähnlich ist. Bei jungen Pferden gibt es noch das Syndrom der unspezifischen Erkrankung der tiefen Atemwege, bekannt unter dem Namen *inflammatory airway disease (IAD)*. Die Beziehung zur COB ist noch unbekannt, aber es wird vermutet, dass sich diese später beim erwachsenen Pferd aus der IAD entwickeln könnte (Robinson, 2001). Eine ähnliche Erkrankung ist im heißen und feuchten Südosten der USA bei Weidepferden als *summer pasture associated obstructive pulmonary disease (SPAOPD)* bekannt (Seahorn und Beadle, 1993). Diese Erkrankung wird auf eine Reaktion auf Schimmelpilzsporen im Weidegras zurückgeführt.

Die klinischen Symptome variieren mit dem Grad und der Dauer der Erkrankung. Sie reichen von chronischem Husten bei fehlenden Auskultations- und Bronchoskopiebefunden (leichte / subklinische COB) über deutliche Atemgeräusche bis hin zu Rasseln und Giemen mit stark vermehrten Tracheobronchialsekret in schweren Fällen. Die Tiere sind leistungsinsuffizient, zeigen zeitweilig mukösen bis purulenten Nasenausfluss, haben eine erhöhte Atemfrequenz mit gesteigerter Atemtiefe bei vermehrt abdominalem Atemtyp. In hochgradigen Fällen sind eine zweiphasige Expiration, eine Ruhedyspnoe mit Nüsternblähen und Afteratmung sowie die Ausbildung einer Dampf Rinne durch Hypertrophie des äußeren schiefen Bauchmuskels und eine Hypertrophie der Interkostalmuskulatur zu beobachten. Bei Perkussion des

Lungenfeldes kann eine Erweiterung desselben nach kaudal feststellbar sein (Cook und Rosdale, 1963; Gerber, 1973; Derksen, 1993; Beech, 1989a).

2.2 Histopathologische Befunde

Im histologischen Bild zeigt sich, dass es sich trotz der hierzulande üblichen Bezeichnung chronisch obstruktive Bronchitis, um eine Bronchiolitis und Peribronchiolitis mit peribronchiolärer und perivaskulärer Ansammlung von mononukleären Zellen und intraluminaler Ansammlung von hauptsächlich neutrophilen Granulozyten handelt (Gerber, 1973; Winder et al., 1991). Primär gehen die Veränderungen von den Bronchiolen insbesondere den CLARA-Zellen des Epithels aus. Diese Zellen scheinen der Hauptangriffspunkt für Antigen und verschiedene Entzündungsmediatoren zu sein (Kaup et al., 1990 b) und reagieren mit Granulaverlust. Es kommt zur reaktiven Ausbreitung der Veränderungen in die angrenzenden Alveolen mit vermehrten Kohnschen Poren, alveolarer Fibrose, Nekrose der Typ I Pneumozyten und Ersatz durch Typ II Pneumozyten. Die später auftretenden Veränderungen in Trachea und Bronchien mit Becherzellmetaplasie, Verlust des Flimmerepithels und Ersatz durch undifferenzierte Zellen, Hypertrophie der glatten Muskulatur, des Epithels und der Submukosa sind als sekundäre Veränderungen zu betrachten (Kaup et al., 1990 a).

Folglich kommt es zur Dyskrinie, Bronchospasmen sowie lumeneinengenden Bronchialwandveränderungen. Die Lunge verliert an Elastizität und es kommt zur Ausbildung von Emphysemen und Atelektasen.

2.3 Bedeutung ausgewählter Zytokine

Interleukine (IL), Chemokine, Interferone (IF) und Growth factors werden im allgemeinen unter dem Begriff Zytokine zusammengefasst. Zytokine sind sezernierte Proteine und spielen eine wichtige Rolle in der Koordination und Kommunikation zwischen Entzündungszellen. Sie bestimmen unter anderen Dauer und Intensität der Immun- und Entzündungsreaktionen (Barnes et al., 1998).

Die Zytokine des Menschen können nach ihrer Wirkungsweise unterteilt werden:

IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-11, Tumor Nekrosefaktor alpha (TNF- α) und Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) werden als proinflammatorische Zytokine bezeichnet (Chung und Barnes, 1999). IL-1 β beispielsweise verursacht Fieber, die Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark und stimuliert die Produktion anderer Zytokine durch eine Vielzahl von Zellen. TNF- α zeigt synergistische Effekte zu IL-1 β und erhöht zusätzlich die Freisetzung von antigen-präsentierenden Zellen. GM-CSF induziert die Synthese und Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen durch Makrophagen und verlängert die Überlebenszeit von Eosinophilen in der Kultur (Park et al., 1998). IL-11 wird in der Lunge von vielen strukturellen Zellen und eosinophilen Granulozyten produziert, stimuliert unter anderem auch durch den Einfluss von Viren (Zheng, 2001). Folge sind die Bildung von interstitiellem Kollagen, Fibrosen, Hyperplasien von Myozyten und Myofibroblasten (Zhu et al., 2001) und damit scheint IL-11 in die chronischen strukturellen Veränderungen der Lunge bei Asthma involviert zu sein (Minshall et al., 2000). Gleichzeitig vermindert IL-11 die Synthese von IL-1 und TNF- α in Monozyten und Makrophagen (Trepicchio et al., 1996).

Als antiinflammatorische Zytokine werden IL-10, IFN- γ , IL-12 und IL-18 bezeichnet (Chung und Barnes, 1999). IL-10 beispielsweise wird unter anderem auch von Lungenepithelzellen sezerniert und verringert die Synthese von IL-1, IL-6 und eosinophilen Granulozyten (Busse und Gern, 2005). Zusätzlich wirkt es immunsuppressiv durch Hemmung der Monozyten- und Makrophagenfunktion. IFN- γ ist ein relativ spezifischer Inhibitor der IL-4 induzierten Ig-E und Ig-G Synthese durch B-Zellen.

Eine weitere Gruppe bilden die Lymphokine, dazu gehören unter anderem IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17 (Chung und Barnes, 1999). Lymphokine sind von aktivierten T-Zellen sezernierte Zytokine. Es werden zwischen zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Helferzellen (Th) anhand ihrer spezifischen Rezeptoren unterschieden. Th-Zellen lassen sich weiterhin anhand eines vorliegenden Zytokinprofils unterscheiden. Th1-Zellen können durch das Vorliegen von IL-2 und IFN- γ nachgewiesen werden. IL-4, IL-5 und IL-13 werden von Th2-Zellen produziert. IL-4 veranlasst, gesteigert durch IL-13, die Umstellung der Antikörperproduktion in B-Zellen auf Ig-E (Shirakawa et al., 2000). IL-5 führt hingegen zur Aktivierung und Einwanderung von eosinophilen Granulozyten (Janeway und Travers, 1997). Von IL-17 wird vermutet, dass es indirekt die Reifung, Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten fördert (Debrue et al., 2005).

Als weitere Gruppe der Zytokine seien in diesem Zusammenhang noch die Chemokine genannt, zu denen unter anderem das IL-8 gehört. IL-8 wird von aktivierten Makrophagen sezerniert und ist verantwortlich für die Aktivierung und Anlockung von neutrophilen Granulozyten (Franchini et al., 1998).

Viele equine Zytokine sind bereits kloniert und sequenziert worden (Steinbach et al., 2002).

2.4 COB beim Pferd im Vergleich mit dem allergischen Asthma beim Menschen

Man unterscheidet zwischen dem allergisch und dem nicht-allergisch bedingtem Asthma (Romanent-Manent et al., 2002).

Allergisches Asthma beim *Menschen* wird zur Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I oder auch Überempfindlichkeit vom Soforttyp gerechnet. Dadurch kommt es zur Degranulation von Mastzellen und Basophilen, die durch deren Vernetzung durch Ig-E vermittelt wird. So wird bei Asthmatikern im Vergleich zu Gesunden ein höherer Ig-E Spiegel im Serum gemessen (Hizawa et al., 2001).

Die genauen pathogenetischen Zusammenhänge der Hyperreaktivität der Atemwege sind nach wie vor unklar, dabei scheint das Ig-E keine unwesentliche Rolle zu spielen (Martin, 2001). Das charakteristische Zytokinprofil bei einer allergischen Reaktion ist geprägt durch IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF und TNF- α . Insbesondere konnte für die Zytokine IL-4 und IL-13 ein Zusammenhang mit der exzessiven Allergen bedingten Mukosproduktion in den Bronchien dargestellt werden. Beide Zytokine können über einen spezifischen Rezeptor die Mukosbildung durch CLARA-Zellen induzieren (Kuperman et al., 2005). Des weiteren lässt das Vorliegen von IL-4, IL-5 und IL-13 den Rückschluss zu, dass es sich um eine dominierende Th2-Zellen vermittelte Immunantwort handelt, da die wichtigen Vertreter der Th1-Antwort wie IL-2 und IFN- γ fehlen (Jeffery, 1999). Weiterhin konnte die Bedeutung der Zytokine IL-5, IL-11 TNF- α und GM-CSF für die Entstehung der Hyperreaktivität nachgewiesen werden (Chung und Barnes, 1999).

Von mehreren respiratorischen Viren ist bekannt, dass sie allergisches Asthma sowohl auslösen als auch verstärken können (Gern, 2003). Die wichtigsten Erreger sind dabei das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) und Parainfluenzavirus (PIV) bei Kindern sowie das Humane Rhinovirus (HRV) bei Erwachsenen (Nicholson et al., 1993; Johnston et al., 1995). In aktuellen Studien gelang in über 80% der Fälle der Nachweis von Rhinoviren in

Lungenepithelzellen (Friedlander et al., 2005). Dabei soll die Infektion der Epithelzellen in Addition / synergistisch mit dem Allergen (Tan, 2005) und die dadurch ausgelöste Zytokinproduktion und Sekretion zur Hyperreaktivität der Atemwege, Eosinophilie und Ig-E Synthese führen (Folkerts et al., 1998; Chung und Barnes, 1999). Hierbei sind zwei verschiedene Muster in der Immunantwort zu sehen. Im Zusammenhang mit einer Rhinovirusinfektion tritt immer eine Neutrophilie im Sputum und eine vermehrte Expression von IL-10 mRNA auf (Busse und Gern, 2005). Bei akuten asthmatischen Schüben ohne Beteiligung von Viren zeigt sich nur das klassische Bild einer allergischen Reaktion mit einer ausgeprägten Eosinophilie. Dies bezüglich wird vermutet, dass IL-10 die Produktion von eosinophilen Granulozyten reduziert, aber eine Hypersensibilität verstärkt und eventuell als Indikator für die Beteiligung von Viren bei asthmatischen Schüben genutzt werden kann (Busse und Gern, 2005).

Vergleicht man nun die COB beim *Pferd* mit dem Asthma beim Menschen, so findet man ebenfalls eine Hyperreaktivität der Atemwege, die zu Bronchospasmen, Hypertrophie der glatten Muskulatur und zur Hyperplasie des Epithels führen (Couetil et al., 2006). Allerdings tritt die für das allergische Asthma beim Menschen typische Eosinophilie beim Pferd nur selten auf. Dagegen wird in der bronchoalveolaren Lavageflüssigkeit (BALF) und im Trachealsekret (TBS) ein erhöhter Anteil an neutrophilen Granulozyten gefunden, der auf eine vermehrte Produktion chemotaktischer Substanzen wie IL-8 (Ainsworth et al., 2006), IL-17 (Debrue et al., 2005) und Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2) zurückzuführen ist (Franchini et al., 1998). Aber auch beim Menschen ist eine Neutrophilie im Sputum zu finden, gerade wenn virale Infektionen als Auslöser nachgewiesen werden konnten (Fahey et al., 1995; Busse und Gern, 2005).

Die Zugehörigkeit von COB zu einem bestimmten Allergietyp ist umstritten. Einige Untersucher konnten im Serum bzw. in der BALF COB-erkrankter Pferde erhöhte Spiegel von Ig-E nachweisen (Halliwell et al., 1993; Eder et al., 2000). Die Bestimmung des Ig-E Spiegels beim Pferd wird allerdings dadurch erschwert, dass gegenwärtig noch keine monoklonalen Antikörper für equines Ig-E zur Verfügung stehen.

Hauptallergene bei COB scheinen bestimmte Proteine von *Aspergillus fumigatus* und *Alternaria alternata* zu sein (Robinson et al., 1996), die auch beim Menschen mit Stauballergien eine Rolle spielen (Cramer, 1998). Die natürliche Exposition ruft beim Pferd eine stärkere Reaktion hervor als die Belastung mit einem einzelnen Allergen (McGorum et al., 1993 a) und geht im Freien oder geringerer Allergenbelastung in Remission.

Hinsichtlich der dominierenden Lymphozyten-Subpopulation gibt es verschiedene Ergebnisse. Einerseits wird in der BALF an COB erkrankter Pferde nach einer Allergenexposition ein erhöhter Anstieg von CD4⁺-Zellen dargestellt (McGorum et al., 1993 a), dies konnte aber von anderen Untersuchern nicht bestätigt werden (Berendonk, 2000). Mit Hilfe der in situ-Hybridisierung gelang der Nachweis einer erhöhten Expression von IL-4 und IL-5 mRNA und einer erniedrigten Expression IFN- γ mRNA in der BALF kranker Pferde im Vergleich zu gesunden Pferden (Lavoie et al., 2001; Cordeau et al., 2004). Diese Ergebnisse lassen auf eine Th2-Zellen vermittelte Immunantwort schließen, die auch bei Asthma beim Menschen zu finden ist. Mittels RT-PCR konnte in der BALF an SPAOPD erkrankter Pferde während der Zeit klinischer Symptome eine erhöhte Expression von IL-4 und IL-13 mRNA, nicht aber für IL-5 mRNA gemessen werden (Bowles et al., 2002). Einige Autoren sprechen auch von einer gemischten Immunantwort, abhängig von Zeitpunkt und Stadium der Erkrankung, da es im weiteren Verlauf auch zu einem Anstieg von IFN- γ kommt (Horohov et al., 2006; Ainsworth et al., 2003).

2.5 Virale Infektionen und COB

Der Zusammenhang einer Infektion mit respiratorischen Viren und COB ist beim Pferd bisher nur ungenügend untersucht. Für die equinen Herpesviren Typ 2 und Typ 4 (EHV-2, EHV-4) wird ein Zusammenhang vermutet (Robinson et al., 1996).

Im Gegensatz zu EHV-1 und EHV-4 ist die Bedeutung von Infektionen der Pferde mit EHV-2 noch unklar. EHV-2 wird bei Pferden mit respiratorischen Erkrankungen auffällig häufig gefunden (Palfi et al., 1978; Muray et al., 1996; Wolfinger, 1998). Das Virus konnte auch bereits in den Lungenmakrophagen von Pferden mit COB nachgewiesen werden (Schlocker et al., 1995).

Equine Rhinoviren (ERV) werden mit milden Erkrankungen des oberen Respirationstraktes in Verbindung gebracht (Plummer, 1962; Steck et al., 1978). Allerdings wird ihnen wenig Bedeutung zugemessen, da sie mittel konventioneller Methoden schwierig zu isolieren sind. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch ihre weite Verbreitung und lange Persistenzzeit (Li et al., 1997).

In vitro- Untersuchungen zu viralen Infektionen des Trachealepithels des Pferdes unter anderem mit EHV-2 und ERV zeigen eine deutliche Zytokinexpression für IL-11 und

untermauern die bislang unterschätzte Bedeutung für die Pathogenese respiratorischer Erkrankungen (Gustat, 2003).

Über die Zytokininduktion in den tiefen Atemwegen nach viraler Infektion wurden beim Pferd bislang keine Untersuchungen durchgeführt.

2.6 Zielsetzung

Es soll die Rolle von Viren, hier insbesondere EHV-2 und equinen Rhinoviren im Zusammenhang mit der COB des Pferdes untersucht und diesbezüglich eine PCR für den Nachweis von ERV etabliert werden. Zentrales Untersuchungsmaterial werden Lungengewebeprobe von Pferden sein, die sich in unterschiedlichen Stadien respiratorischer Erkrankungen befinden oder gesund sind. Von Interesse ist weiterhin die Frage, welcher Art das vorliegende Zytokinmuster ist, um einen besseren Vergleich mit dem allergischen Asthma beim Menschen zu ermöglichen.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Materialnachweis

AGOWA GmbH, Berlin: Sequenzier-Service, Sequenzierung von PCR-Fragmenten

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim: Expand Reverse Transcriptase Kit

Qiagen GmbH, Hilden: DNeasy Tissue Kit, Hot Star Taq DNA Polymerase Kit, RNeasy Mini Kit,

Promega GmbH, Mannheim: Agarose LE Analytical Grade, Nuclease freies Wasser, Random Hexam Primer, RNasin Ribonuclease Inhibitor,

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot: Gene Ruler 50bp DNA Ladder, dNTP Set, 6xLoading Dye Solution

Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim: β -Mercaptoethanol, Ethidiumbromid

Roth, Karlsruhe: Ethanol absolut

Metabion GmbH, Martinsried: Primer Stocklösungen (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, GM-CSF, EHV-2, ERV-1, ERV-2)

Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf: Safe Seal Tips 10ul, 200ul, 1000ul, Reaktionsgefäße – silikonisiert 0,6 ml

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien von Merck (Darmstadt) sowie steriles Einwegmaterial von Eppendorf (Hamburg) und Brandt (Wertheim) verwendet.

3.1.2 Geräte

Agargel Standard G 45/1

Cycler: Tpersonal Kombi Block

UNO-Thermoblock

Mastercycler personal

Bio Photometer

UV-Transilluminator TI 3

Zentrifugen: EBA 8

S 4173

Labofuge 400 R

Minifuge T

Schwingmühle mit Zubehör, Typ MM 200

Mikroskop mit Kamera, Typ MC 80

Polaroid-Kamera, Typ CU 5

Laborwaage, Typ 2024 MP

Magnetrührwerk, Typ MR 3001

Wasserbad, Typ 3044

Vortex Genie™

Heizblöcke, Typ BT130-1

Biometra, Göttingen

Biometra, Göttingen

Biometra, Göttingen

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Biometra, Göttingen

Hettich, Tuttlingen

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Berlin

Heraeus, Berlin

Retsch, Haan

Zeiss

Polaroid, Offenbach

Sartorius

Heidolph, Kelheim

Köttermann, Uetze-Hänigsen

Bender & Hobein AG, Zürich

HLC, Bovenden

3.2 Tiere

In die Untersuchung wurden Proben von insgesamt 36 frisch getöteten Pferden unabhängig von Alter und Haltungsbedingungen aufgenommen, die zwischen Mai 2002 und August 2003 in einem Schlachthof in Brandenburg zur Schlachtung kamen oder zur Sektion in das Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin eingeliefert wurden.

3.2.1 Gewinnung und Vorbereitung des Probenmaterials

Die Entnahme der Proben erfolgte an vier unterschiedlichen Lokalisationen:

- Meatus nasi ventralis
- Trachea, Nahe der Bifurkation
- Lobi pulmonales craniales dextri et sinistri
- Lobi pulmonales caudales dextri et sinistri

Die Lokalisation der Lungenproben befand sich jeweils am Übergang von den Bronchien in die Bronchiolen.

Pro Lokalisation wurden 2 Exzidate in der Größe von 1x 1 cm entnommen. Davon wurde ein Exzidat zur sofortigen Fixierung in ein mit 4% Formalin gefülltes Sammelröhrchen überführt, zur späteren Anfertigung der histologischen Schnitte. Das zweite Exzidat wurde in einem sterilen Sammelröhrchen für den Transport auf Eis gelagert und im Institut bei – 80 °C eingefroren, zur späteren RNA- und DNA-Präparation.

3.3 Untersuchungstechniken

3.3.1 Anfertigung und Färbung der HE-Schnitte

Aus den für mindestens 24 h in 4% Formalin gelagerten Exzidaten wurden 2 Gewebeschnitte in Biopatkapseln verbracht und von Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Pathologie der FU Berlin in Paraffin eingebettet, 4 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Hämatoxylin färbt Zellkerne, Bakterien und Kalk blau an; durch die Gegenfärbung mit Eosin kommt es zur Rotfärbung von Zytoplasma, Eiweiß und Bindegewebsfasern.

3.3.2 DNA-Präparation aus Gewebeproben

Die DNA-Präparation erfolgte bei Raumtemperatur mit Hilfe des Dneasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden).

Material, Lösungen, Reagenzien:

DNeasy Tissue Kit: 2 Lysis-Puffer (ATL- und AL-Puffer)
 Proteinase K
 2 Waschpuffer (AW1- und AW2- Puffer)
 AE-Puffer (Eluierung)
 Absorptionssäule „Dneasy mini columns“
 2,0 ml Sammelgefäß

Ethanol absolut
 1,5 ml Sammelgefäß

Vor Benutzung eines neuen Kits wurden zum AW1- und AW2-Puffer adäquate Volumina Ethanol absolut zur Herstellung einer gebrauchsfähigen Lösung hinzugegeben.

Zu Beginn der Präparation wurde ein Wasserbad (Typ 3044 Köttermann, Uetze-Hänigsen) auf 55°C erwärmt.

Aus den bei -80°C gelagerten Exzidaten wurden mit sterilen Instrumenten 25 mg Gewebe pro Präparationsansatz entnommen, wobei von der Trachea nur die Schleimhaut verwendet wurde. Die digital abgewogenen Gewebeproben wurden direkt in mit 180µl ATL-Puffer gefüllte 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verbracht und zusätzlich mit 20 µl Proteinase K versetzt und zur vollständigen Lyse bei 55° C im Wasserbad inkubiert. Nach Hinzugabe von 200 µl des zweiten Lysis-Puffers (AL-Puffer) erfolgte eine zweite Inkubation im Wasserbad bei 70°C für 10 min. Nach diesen beiden Inkubationsschritten erfolgte die Zugabe von 200 µl Ethanol absolut pro Probe. Zwischen diesen einzelnen Schritten wurden die Proben mit Hilfe eines Vortexers (Puls von 5- 10 s) gründlich gemischt. Im nächsten Schritt wurden 600µl des so gewonnenen Lysats auf die DNA-bindende Säule gegeben und bei 8000 U/min für 1 min zentrifugiert. Der so gewonnene Durchfluss wurde verworfen und es folgte ein Waschvorgang der Säule in zwei Schritten. Zu erst wurden 500µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben und bei 8000 U/min für 1 min. zentrifugiert. Vor dem zweiten Schritt wurde die Säule in ein neues 2ml Röhrchen gesetzt, 500µl AW2-Puffer aufgegeben und bei max. Geschwindigkeit für 3 min zentrifugiert. Zur Eluierung der DNA wurde die Säule erneut in ein 2 ml Röhrchen gesetzt, 200µl AE-Puffer aufgetragen und für 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend bei 8000 U/min bei 1 min zentrifugiert. Zur vollständigen Eluierung wurde dieser Schritt wiederholt. Zum Schluss erfolgte die Konzentrationsbestimmung im Photometer (Eppendorf Bio Photometer) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dafür wurde ein

Teil der eluierten DNA in 100µl Nuklease freiem Wasser 1:20 verdünnt. Zusätzlich wurde zur Qualitätsbestimmung der DNA der 260/280 nm Wert mit erfasst, der regelmäßig im gewünschten Bereich von 1,7 bis 1,9 lag (Anhang, Tab. 14)

Die so gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Bearbeitung im Kühlschrank gelagert.

Pro PCR-Ansatz kamen 1µg DNA zum Einsatz.

3.3.3 RNA-Präparation aus Gewebeproben

Die RNA-Präparation erfolgte bei Raumtemperatur mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden).

Material, Lösungen, Reagenzien:

RNeasy Mini Kit: Lysis-Puffer (RLT-Puffer)
 Waschpuffer RW 1
 Waschpuffer RPE
 Nuklease freies Wasser
 Absorptionssäule "Rneasy mini spin columns"
 1,5ml Sammelgefäß
 2,0ml Sammelgefäß

Ethanol absolut

14,3 M β-Mercaptoethanol (β-ME)

70% Ethanol, verdünnt mit Nuklease freiem Wasser

Vor Benutzung eines neuen Kits wurden zum RPE-Puffer vier Volumen Ethanol absolut zur Herstellung einer gebrauchsfähigen Lösung hinzugegeben.

Zu Beginn der Präparation wurde die erforderliche Menge RLT-Puffer in ein RNase freies Eppendorf-Röhrchen pipettiert und mit 10µl β-ME auf 1ml RLT-Puffer vermischt.

Aus den bei – 80°C gelagerten Exzidaten wurden mit sterilen Instrumenten 30 mg Gewebe pro Präparationsansatz entnommen, wobei von der Trachea nur die Schleimhaut verwendet wurde. Die digital abgewogenen Gewebeproben wurden direkt in mit 600µl Lysis-Puffer (RLT-Puffer mit β-ME) und 2 sterilen Metallkugelchen gefüllte 2 ml Eppendorf-Gefäße verbracht und mittels Schwingmühle bei einer Frequenz von 20000 Hz für 4 min. homogenisiert. RLT-Puffer enthält Guanidinisothiocyanat zur sofortigen Inaktivierung von RNasen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 3 min. bei max. Geschwindigkeit (Eppendorf Centrifuge).

600µl des gewonnenen Lysats wurden in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überpipetiert und mit der gleichen Menge Ethanol (70%) homogenisiert. Im nächsten Schritt wurden 700µl des Lysat-Ethanol-Gemisches auf die im Kit enthaltende RNA-bindende Säule (mit Silicon-Gel-

Membran) übertragen und für 20 s bei 11000 U/min. zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen und 700µl RW 1 Waschpuffer auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 20 s bei 11000 U/min. wurde die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß umgesetzt und zweimal mit 500µl RPE Waschpuffer bei 11000 U/min. zentrifugiert: Beim ersten Schritt für 20 s und beim zweiten Schritt für 2 min. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Sammelgefäß gesetzt und die RNA mit 35µl Nuklease freiem Wasser mittels Zentrifugation für 1 min. bei 11000 U/min. eluiert. Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der so gewonnenen RNA erfolgte wie bei der DNA-Präparation, wobei die 260/280nm –Werte im gewünschten Bereich von 1,7 – 2,1 lagen (Anhang, Tab. 15). Die gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

3.3.4 Reverse Transkriptase (RT)

Material, Lösungen, Reagenzien:

Expand Reverse Transcriptase Kit: Expand RT: MMLV/H- (Moloney MäuseLeukämie-Virus mit Punktmutationen der RNase H-)
 5x Expand RT Puffer
 Dithiothreitollösung (DTT)

Random Hexam Primer 50 µM
 RNasin Ribonuclease Inhibitor
 dNTP Set, bestehend aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP, jedes á 100 mM
 Nuklease freies Wasser

Zur Herstellung einer gebrauchsfertigen dNTP-Lösung wurden 4µl jeden Anteils des Sets in 100 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen.

Pro Ansatz wurden 1 µg RNA und 1 µl Random Hexam Primer in 0,6 ml siliconisierte Röhrchen gegeben und ggf. das Volumen mit Nuklease freiem Wasser auf 10,5 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde bei 75° C für 5 min. inkubiert und dann bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt.

Im weiteren Arbeitsschritt erfolgte die Zusammenstellung des RT-Gemisches.

RT-Gemisch pro Ansatz: 4 µl 5x RT-Puffer
 2 µl DTT (10 mM)
 0,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
 2 µl dNTPs (400 µM each)
1 µl Expand RT (50 U/µl)
 9,5µl insgesamt

9,5µl des RT-Gemisches wurden pro Ansatz zu dem RNA-Primer-Gemisch dazupipettiert und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert mit anschließender Inkubation für 45-60min. bei 42° C.

Zum Stoppen der Reaktion wurde die Temperatur zum Schluss für 5 min. auf 95° C erhöht. Die entstandene komplementäre DNA (cDNA) wurde bis zur Weiterbearbeitung in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) bei –20° C gelagert.

Pro PCR-Ansatz wurden 2µl cDNA eingesetzt.

3.3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Stichprobenartig wurde eine β-Actin-PCR zur Überprüfung der cDNA-Qualität durchgeführt. Das Zellstruktur-Protein β-Aktin kommt in allen eukaryoten Zellen vor und sollte deshalb in jeder DNA-Präparation aus Geweben oder Zellen nachweisbar sein. Die Primersequenzen und „Annealing“-Temperaturen dieser PCR sind in Tabelle 1 angegeben.

Tab. 1: β-Actin-PCR: Verwendete Primersequenzen, „Annealing“ –Temperatur, Größe des entstehenden Produktes in Basenpaaren.

Primer	Sequenz 5` → 3`	Temperatur	Produkt
β-Actin s β-Actin as	GTGTGGTGCCAAATCTTCTCC GCGCTCGTCGTCGACAACGG	56 °C	248bp

s:strang (sense) as:antistrang (antisense) bp:Basenpaare

Die Interleukine (IL) wurden mit Hilfe der Computersoftware MacVector (Oxford Molecular Group Sequences Analysis Software) ausgewählt. Dabei diente die GenBank als Quelle für die Sequenzen (außer IL-11, persönl. Mitteilung, Steinbach).

Angaben hierzu finden sich in Tabelle 2.

Tab. 2: Zytokin-PCR: Verwendete Primersequenzen, „Annealing“ -Temperaturen, Größe der entstehenden Produkte in Basenpaaren, Position der Primer im codierenden Bereich der Zytokinsequenz.

Primer	Sequenz 5` → 3`	Temperatur	Produkt	Position
IFN-γ s as	CAGAGCCAAATCGTCTCCTTCTAC TCTTCCGCTTCCTCAGGTTAGC	58 °C	256 bp	205 439
IL-4 s as	GCATGTACCAGCAACTTCATCCAG TTCCATCTGTGTTCTTCGGGC	57 °C	157 bp	46 182

Primer	Sequenz 5' → 3'	Temperatur	Produkt	Position
IL-5 s as	CGATGGGAACCTGATGATTCCTAC TCAGCCTTCTATTGTCCACTCAGTG	53,7 °C	268 bp	138 381
IL-10 s as	GCATCCTAGGGAACGAAGC TAAATATTCAGGAGAGAGGTACCAC	52,8 °C	146 bp	539 660
IL-11 s as	GACAAATTCAGCCGACG GTCGAGCGTCAGGTGCAGTC	63 °C	375 bp	184 539
GM-CSF s as	CTTCTTCTGGGCACTGTGGTTTAC TCCAGCAGTTAAACGGGATCTC	58 °C	400 bp	19 397

s:strang (sense) as:antistrang (antisense) bp:Basenpaare

Als Positivkontrolle für den Nachweis der Zytokine mittels RT-PCR wurden equine mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PMBCs) nach Stimulierung mit Concanavalin A (ConA) eingesetzt, die mir freundlicherweise von Frau Mauel aus dem Institut für Virologie, FU Berlin, FB Veterinärmedizin zur Verfügung gestellt wurden.

Die PCR für den Nachweis von EHV-2 wurde im Rahmen einer Arbeit von Frau Wolfinger (1998) am Institut für Virologie, FU Berlin, FB Veterinärmedizin etabliert und hier übernommen.

Die PCR für den Nachweis von ERV-1 und ERV-2 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert und die gewonnenen PCR-Fragmente zur Bestätigung und Sequenzanalyse an die AGOWA GmbH in Berlin geschickt.

Die verwendeten Viren (Tab. 3), sowie die für die Etablierung und die Positivkontrollen benötigten infizierten Zelllinien wurden mir freundlicherweise vom Institut für Virologie, FU Berlin, FB Veterinärmedizin zur Verfügung gestellt, dabei handelt es sich bei den Zelllinien um equine Trachealzellen.

Tab. 3: Verwendete Virusstämme

Virus	Stamm	Referenz
EHV- 2	LK4	Plummer & Waterson, 1963
ERV- 1	Perv (ERAV) 350/72 (ERAV)	P. Thein
ERV- 2	P 1436/73 (ERBV)	P. Thein

Die virusspezifischen Primer (Tab. 4 u. 5) für den Nachweis von EHV-2, ERV-1 und ERV-2 wurden mit Hilfe der Computersoftware „Oligo“ Version 4.0 für Macintosh ausgesucht und die Reaktionsbedingungen optimiert.

Tab. 4: EHV-2-PCR: Verwendete Primersequenzen, „Annealing“ – Temperatur, Größe der entstehenden Produkte in Basenpaaren, Position der Primer im kodierenden Bereich der Virussequenz.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Temperatur	Produkt	Position
EHV-2 1s 1as	GGCCTCGGGCATCCTGCCCTGTCT GGTTGAGCCTTAGTTTCCTGTAGCTG	64 °C	1. Runde 593 bp	2070 2662
EHV-2 2s 2as	AGATAGCCGAGACGGTCACCTTCC CTTGGTGGTCTCCTGCACGAACCT	64 °C	2. Runde 407 bp	2070 2502

Tab. 5: ERV-PCR: Verwendete Primersequenzen, „Annealing“ – Temperatur, Größe der entstehenden Produkte in Basenpaaren, Position der Primer im kodierenden Bereich der Virussequenz.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Temperatur	Produkt	Position
ERV-1 1s 1as	ACAAGATGGAACAGGACACCGC TTCGCCCACTTGAAAAGGTG	57 °C	1. Runde 579 bp	6555 7112
ERV-1 2s 2as	TTCGCCCACTTGAAAAGGTG ACCGAGTCCAATCCACATCTGG	56 °C	2. Runde 177 bp	6732 6887
ERV-2 1s 1as	GACACTTACTACGAATGTGAAGGGG TACTCCAGCGGTCCAAGATGAACC	57 °C	1. Runde 458 bp	8113 8547
ERV-2 2s 2as	TGTGCTAATCAGCCACTGCCTC CCATCACTGGTTTGAACAGGAATG	54 °C	2. Runde 184 bp	8281 8441

Um die Sensitivität und Spezifität der Nachweismethode für die Virus-DNA zu erhöhen, wurden für jeden Virusnachweis nacheinander zwei PCR-Runden mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt, die sogenannte nested PCR (nPCR). Dabei wurde nach der ersten Runde ein Aliquot (1 µl) aus dem Reaktionsansatz in die zweite Runde überführt. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass das erste Primerpaar (äußere Primerpaar) die vom zweiten Primerpaar (innere Primerpaar) amplifizierte Sequenz einschloss. Somit konnte das Reaktionsprodukt der ersten PCR-Runde spezifiziert und die Sensitivität der PCR um ein Vielfaches erhöht werden.

Primerverdünnung:

Die Primer für die Interleukine und Viren lagen in Stocklösungen mit einer Konzentration von 20 µmol vor. Zur Herstellung der gewünschten Endkonzentration wurde die jeweilige Stocklösung mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt.

Für die PCR-Reaktionen wurde das Hot Star Taq DNA Polymerase Kit (Quiagen) verwendet.

Material, Lösungen, Reagenzien:

Hot Star Taq Polymerase Kit: Hot Star Taq DNA Polymerase 5 units/µl
 10x PCR Puffer
 5x Q-Solution
 dNTPs, bestehend aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP, jedes á 100 mM
 Nuklease freies Wasser

Zur Herstellung einer gebrauchsfertigen Lösung wurden je 10 µl dNTP in 100 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen.

Die Amplifikation wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt.

Als Matritze dienten 2 µl (Expand RT) bzw. 1 µg (DNA-Präp.) der cDNA

Pro PCR-Ansatz: 10 µl Q-Solution (Endkonzentration 1x)
 5 µl PCR Puffer (1x)
 1 µl dNTPs (á 200 µM)
 1 µl Primer sense 20 µM (0,4 µM)
 1 µl Primer antisense 20 µM (0,4 µM)
0,5 µl Hot Star Taq DNA Polymerase (1,5 Einheiten)
 ad 48 µl (Expand RT) bzw. nach Bedarf in µl (DNA-Präp) mit
 Nuklease freiem Wasser

Der Ansatz wurde in 0,2 ml Röhrchen gefüllt und die cDNA dazu pipettiert. Für jede Reaktion wurde zusätzlich eine Positiv- und eine Negativ-(Substanzen-)Kontrolle angesetzt.

Für die Reaktion wurden Heizblockcycler mit beheizbarem Deckel (Biometra T personal Kombi Block, Biometra UNO-Thermoblock, Eppendorf Mastercycler personal) und folgendem Programmablauf verwendet:

Schritt 1:	95° C, 15 min.	Initiale Denaturierung der DNA und Aktivierung der DNA-Polymerase
Schritt 2:	95° C, 30 sec.	Denaturierung
Schritt 3:° C, 30 sec.	Annealing bei primerspez. Temperatur
Schritt 4:	72° C, 1 min.	Synthese
Schritt 5:		primerspez. Zyklenanzahl beginnend bei Schritt 2
Schritt 6:	72° C, 10 min.	Finale Extension

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben bis zum Auftragen auf Agarose-Gel bei 4° C aufbewahrt.

3.3.6 Gelelektrophorese

Material, Lösungen, Reagenzien:

Agarose

TAE-Puffer, 50-fach:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	121,25 g
	Na-Acetat	10,33 g
	EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	9,25 g
	Mit HCl auf pH 8 einstellen	
	Aqua dest	ad 500 ml

TAE-Puffer, 1-fach:

Zur Herstellung wurden in einem 500 ml Messzylinder 10 ml TAE-Puffer, 50-fach auf 500 ml mit Aqua-bidest aufgefüllt und 5 min. mittels Magnetrührer vermischt.

Ethidiumbromid-Lösung 1%

Laufpuffer: TAE 1-fach

Ladepuffer: 6x Loading Dye Solution

Marker: 50 bp DNA-Leiter, λ -DNA-*Hind* III

Die horizontale Gelelektrophorese dient der Auftrennung der DNA-Fragmente.

Je kleiner die aufzutrennenden Fragmente sind, desto weiter und schneller bewegen sie sich im elektrischen Feld

Dafür wurde Agarose in einer Konzentration von 1,5 % in 1x Ladepuffer gelöst und in einer Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ca. 60° C wurden 100ml der Agaroselösung mit

Ethidiumbromid (Endkonzentration 2ng/ml) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Festwerden wurde das Gel mit Laufpuffer überschichtet.

Die Proben (à 10 µl) wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit je 2µl Ladepuffer versetzt. Zusätzlich wurde ein DNA-Marker aufgetragen, entsprechend der zu erwartenden DNA-Größe.

Die Elektrophorese wurde mit einem Biometra Agargel Standard Gerät bei ca. 70 V durchgeführt. Nach Beendigung der Laufzeit von ca. 60 min wurden die Banden mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Biometra, TI 3) bei 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.

4 Ergebnisse

Für die Untersuchungen stand Material von insgesamt 36 Pferden zur Verfügung. Die Materialvielseitigkeit variiert allerdings aufgrund der Beschaffungsmöglichkeiten und der Herkunft von den getöteten Tieren. So konnten nicht von allen Tieren aus den vier unterschiedlichen Lokalisationen Proben entnommen werden. Bei 10 Tieren von den insgesamt 24 Schlachttieren erfolgte zusätzlich ein Tag vor der Schlachtung mit Hilfe eines Befundbogens (Anhang, Tab. 12) eine klinische Allgemeinuntersuchung mit Schwerpunkt des Atmungsapparates, wobei die Lungenauskultation aufgrund der örtlichen Gegebenheiten nur in Ruhe durchgeführt werden konnte. Ebenso wurde nur bei einem der 12 Sektionspferde eine klinische Untersuchung vorgenommen, ansonsten stand bei diesen Tieren ein Vorbericht anhand eines Auftragsberichtes für die pathologisch-anatomische bzw. -histologische Untersuchung zur Verfügung.

Die Bewertung und Erstellung einer Gesamtdiagnose (Tab. 7) für die untersuchten Tiere erfolgte unter Berücksichtigung der histologischen Diagnose (Tab. 6) und wenn vorhanden des Vorberichts, sowie der Ergebnisse der klinischen Untersuchung.

4.1 Histologische Untersuchungen der HE-Schnitte

Die Auswertung der Präparate erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 100-400 facher Vergrößerung. Die histologische Untersuchung ermöglichte eine Einteilung des Materials in verschiedene Erkrankungsstadien. Die Beurteilung und Festlegung einer histologischen Diagnose erfolgte anhand der pathologischen Veränderungen (Tab. 6) des pro Tier vorhandenen Probenmaterials (Anhang, Tab. 13) und ist wesentlicher Bestandteil der Gesamtdiagnose (Tab. 7).

Tab. 6: Histologische Untersuchungen – Beurteilungskriterien und Einteilung

Gewebe	Histologische Befunde	Histologische Diagnose
Lunge	keine Veränderungen oder nur einzelne Entzündungszellen	gesund
	Hyperämie, diffuse / fokale monozytäre Infiltrate* zwischen den Bronchialepithelzellen UND / ODER peribronchiär/-bronchiolär, überwiegend neutrophile Granulozyten	akute Bronchitis/ Bronchiolitis/ Peribronchitis/ bronchiolitis -
	diffuse / fokal lymphoplasmazytäre /-histiozytäre Infiltrate* im Bronchialepithel UND/ODER peribronchiär / -bronchiolär, zusätzlich Fibrosen, Mukos mit Entzündungszellen im Lumen, Becherzellhyperplasie, Bronchiektasien, teilweise Atelektasen und Emphyse	chronische Bronchitis/ Bronchiolitis/ Peribronchitis/ bronchiolitis -
	chronische Peribronchitis UND Bronchiolitis, alveoläres Emphysem, Bronchialepithelhyperplasie (Becherzellhyperplasie und -metaplasie), Hyperplasie der Bronchialmuskulatur, Mukos in Bronchien, Bronchiolen und Alveolen angereichert mit neutrophilen Granulozyten, Atelektasen, teilweise auch eosinophile Granulozyten	COB
	Hyperämie, interstitielles Ödem, interstitielle / alveoläre diffuse lymphohistiozytäre Infiltrate*, teils Alveolarwandfibrosen und Desquamation von Alveolarepithel, Exsudat in Alveolen	interstitielle ODER alveoläre Pneumonie
	interstitielle / alveoläre fokale -diffuse lymphohistiozytäre Infiltrate*; Exsudat in Alveolen, Bronchiolen u. Bronchien, Dilatation der Lymphgefäße, Ödematisierung / Fibrosierung der Alveolarsepten	Bronchopneumonie
Trachea	fokale - diffuse lymphohistiozytäre Infiltrate*, Desquamation des Flimmerepithels	Tracheitis
	Mukos im Lumen mit mononukleären Zellen	Begleiterscheinung Lungenerkrankung
Nase	Hyperämie, Ödematisierung, fokale - diffuse monozytäre Infiltrate*,	akute Rhinitis
	fokale - diffuse lymphoplasmazytäre /- histiozytäre Infiltrate*, subepitheliale Fibrosierung	chronische Rhinitis

*mononukleäre Entzündungszellen → akute Phase: Monozyten, Granulozyten

→ subakute Phase: Lymphozyten, Plasmazellen

Tab. 7: Proband, Vorbericht, histologische Diagnose und Gesamtdiagnose

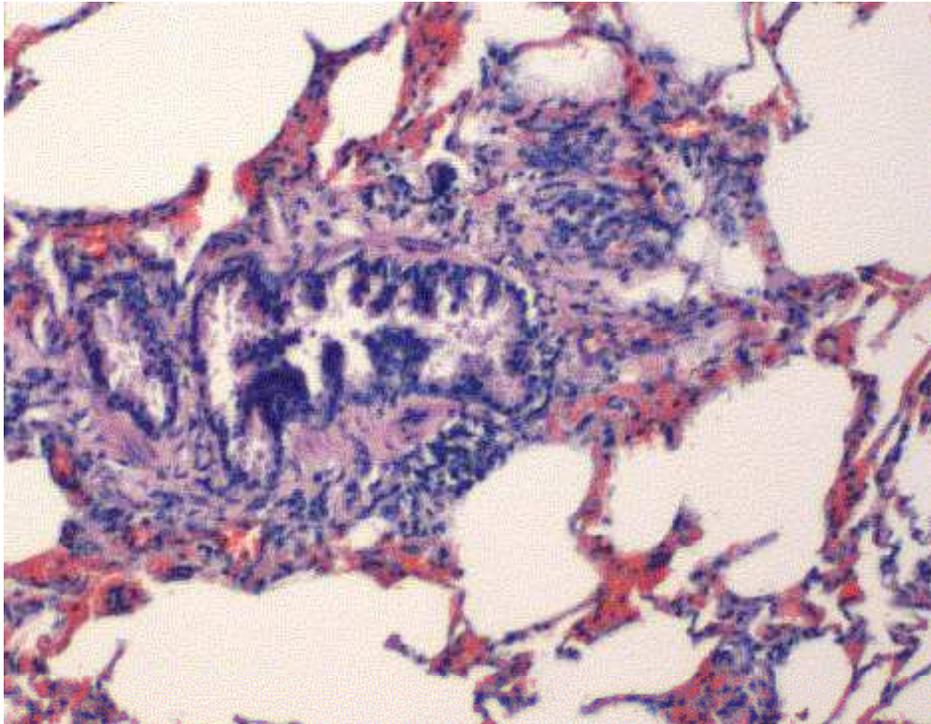
lfd Nr.	Proband	Vorbericht bzw. klinische Untersuchung	Histologische Diagnose	Gesamtdiagnose Atmungstrakt
1	Schlachtpferd, Haflinger, ca. 5 Jahre	vermehrt abdominale Atmung, verschärft vesikulär, Lungenfeld erweitert um 2 ICR	COB	COB
2	Schlachtpferd, Warmblut, > 15 Jahre	Lnn. mandibulares beidseits vergrößert, sonst o.b.B.	ggrd. chronische Bronchitis, sonst o.b.B.	gesund
3	Schlachtpferd, Fjordpferd, ca. 10 Jahre	einseitig, seröser Nasenausfluss, spontaner trockener Husten, Lungenfeld erweitert um 1ICR, verschärft vesikuläres Atemgeräusch	COB	COB
4	Schlachtpferd, Pony, > 20 Jahre	Sommerekzem, sonst o.b.B.	fokale chronische Bronchiolitis + Peribronchiolitis	gesund
5	Schlachtpferd, Kaltblut, ca. 10 Jahre	bösartig, adspektorisch o.b.B.	chronische Peribronchiolitis, beginnende COB	COB
6	Schlachtpferd, Haflinger, ca. 8 Jahre	einseitiger seröser Nasenausfluss, li. Ln. mandibularis vergrößert, sonst o.b.B.	COB	COB
7	Schlachtpferd, Haflinger, ca. 6 Jahre	klinisch o.b.B.	akute Peribronchiolitis	akute Peribronchiolitis
8	Schlachtpferd, Haflinger, > 15 Jahre	vermehrt abdominale Atmung, deutlich verlängerte Ausatmung, Lungenfeld erweitert um > 2 ICR, giemendes Atemgeräusch, erhöhte Atemfrequenz	COB	COB
9	Schlachtpferd, Warmblut, ca. 9 Jahre	einseitiger seröser Nasenausfluss, re. Ln. mandibularis vergrößert, sonst o.b.B.	ggrd. chronische Peribronchiolitis	chronische Peribronchiolitis

Ifd. Nr.	Proband	Vorbericht bzw. klinische Untersuchung	Histologische Diagnose	Gesamtdiagnose Atmungsstrakt
10	Schlachtetpferd, Deutsches Reitpony, ca. 9 Jahre	deutlich erhöhte Atemfrequenz, gemischte Dyspnoe, deutlich verlängerte Ausatmung, Lungenfeld erweitert um > 2 ICR, giemendes Lungen- + Tracheageräusch	COB	COB im finalen Stadium
11	Sektionspferd, Welsch, 27 Jahre	Cushing, re. purulenter Nasenausfluss, Zahnproblematik, Euthanasie	chronische Peribronchiolitis	chronische Peribronchiolitis
12	Sektionspferd, Warmblut, 12 Jahre	Bauchbruch nach Kolik-Op, Kehlkopfsteifer, COB, ödematöse Gliedmaßenschwellung hi. bds., Euthanasie	COB	COB
13	Schlachtetpferd	nicht vorhanden	akute Peribronchiolitis	akute Peribronchiolitis
14	Schlachtetpferd	nicht vorhanden	COB mit akutem Schub einer Bronchopneumonie	COB
15	Schlachtetpferd	nicht vorhanden	COB	COB
16	Sektionspferd, Warmblut, 1 Jahr	Fohlenspätlähme, Durchfall, Kachexie, gestorben	Lungenödem, ggrd. katarrhalische Bronchitis + Peribronchitis	katarrhalische Peri- + Bronchitis
17	Sektionspferd, Engl. Vollblut, 16 Jahre	Kolik-Op, Granulome in Blinddarmspitze, Euthanasie	akute Stauung, sonst o.b.B.	gesund
18	Sektionspferd, Dülm. Wildpferd, 9 Jahre	Caecumruptur, Euthanasie	o.b.B.	gesund
19	Sektionspferd, Araber, 19 Jahre	hgrd. Bronchopneumonie, Aortenklappeninsuffizienz, Euthanasie	Rhinitis, Tracheitis, COB + mukopurulente Bronchopneumonie	COB
20	Sektionspferd, Warmblut, 9 Jahre	Kolik-Op, paralytischer Ileus post op, Euthanasie	o.b.B.	gesund

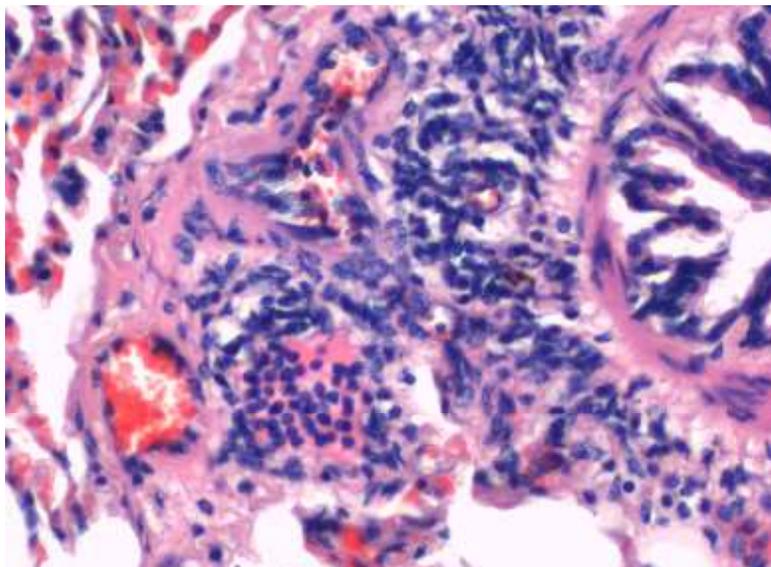
lfd. Nr.	Proband	Vorbericht bzw. klinische Untersuchung	Histologische Diagnose	Gesamtdiagnose Atmungstrakt
21	Schlachtpferd	nicht vorhanden	o.b.B.	gesund
22	Schlachtpferd	nicht vorhanden	chronische Tracheitis, COB	COB
23	Schlachtpferd	nicht vorhanden	COB	COB
24	Schlachtpferd	nicht vorhanden	COB	COB
25	Sektionspferd, Warmblutfohlen, 3 Tage	Enterocolitis, Septikämie, gestorben	interstitielle Pneumonie	interstitielle Pneumonie
26	Sektionspferd, Kleinpferd, ca. 29 Jahre	progressiver Gewichtsverlust, Verdacht Nierentumor	chronische Peribronchitis	chronische Peribronchitis
27	Sektionspferd, Warmblutfohlen, 2Monate	Festlieger, verstorben	ggd. interstitielle Pneumonie	interstitielle Pneumonie
28	Sektionspferd, Warmblut, 16 Jahre	Verdacht auf Nephropathie, Euthanasie	ggd. chronische Peribronchiolitis, Pleurafibrose	chronische Peribronchiolitis
29	Sektionspferd, Warmblut, 10 Jahre	Torsio colon ascendens dorsalis, Euthanasie	subakute Tracheitis, Stauung, akutes Ödem	gesund
30	Schlachtpferd	nicht vorhanden	chronische Tracheitis, COB	COB
31	Schlachtpferd	nicht vorhanden	COB	COB
32	Schlachtpferd	nicht vorhanden	o.b.B.	gesund
33	Schlachtpferd	nicht vorhanden	o.b.B.	gesund
34	Schlachtpferd	nicht vorhanden	ggd. subakute Bronchiolitis + Peribronchiolitis	subakute Bronchiolitis + Peribronchiolitis
35	Schlachtpferd	nicht vorhanden	o.b.B.	gesund
36	Schlachtpferd	nicht vorhanden	subakute Tracheitis, sonst o.b.B.	subakute Tracheitis

Bei 15 (42 %) der insgesamt 36 Pferde konnte eine COB (Abb. 1a/b) festgestellt werden, davon lag bei 8 Tieren auch ein Vorbericht vor, wovon 2 klinisch unauffällig waren. 1 Tier wies eine COB mit einem akutem Schub einer Bronchopneumonie auf (Abb. 2 a/b).

Abb. 1: COB; Pferd Nr. 12, Lobus pulmonalis caudalis, Färbung HE

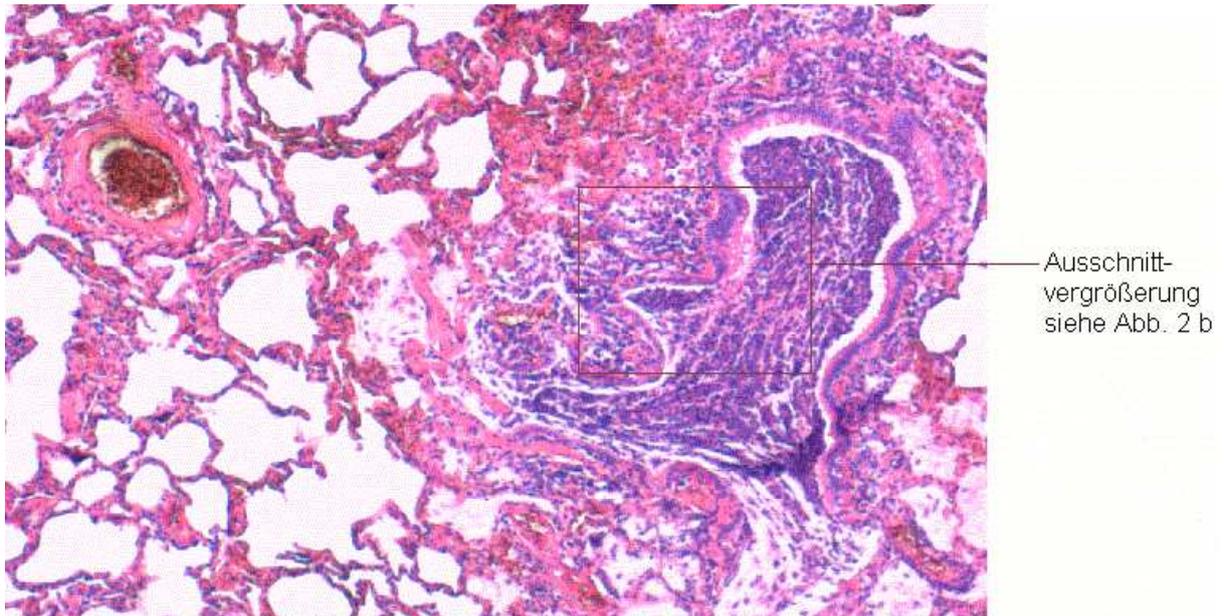


- a) Vergr. 100 fach: Bronchiolus spastisch verengt, Muskelhypertrophie, Mukos im Lumen, Alveolaresepten verdickt, Hyperämie, peribronchioläre Zellinfiltrate

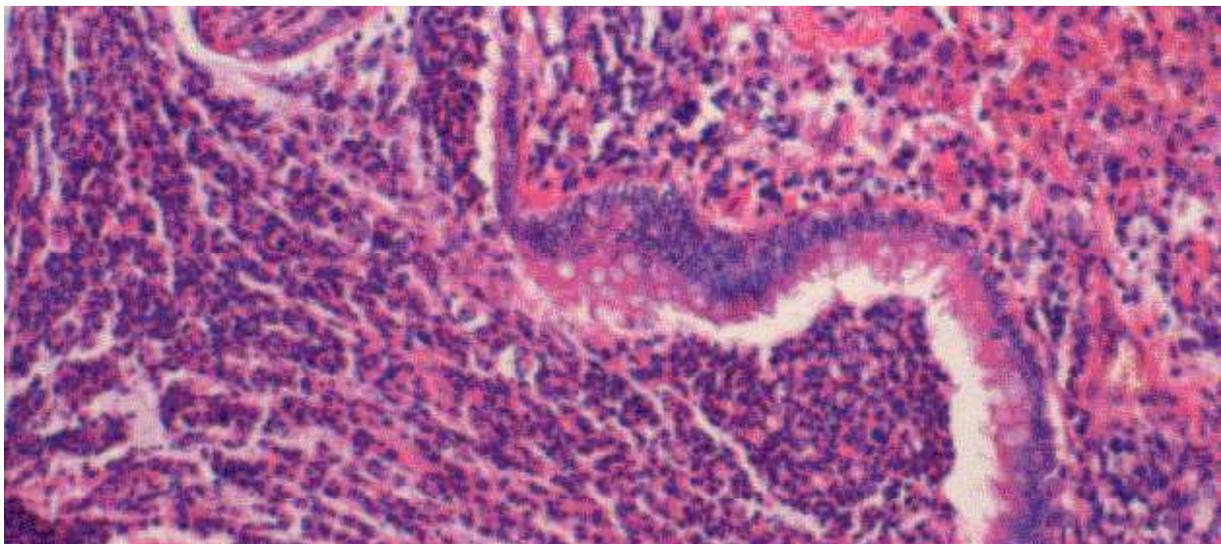


- b) Vergr. 200 fach: peribronchioläre lymphozytäre Infiltration, teils Fibrosierung

Abb. 2: COB und Bronchopneumonie; Pferd Nr. 19, Lobus pulmonalis caudalis, Färbung HE



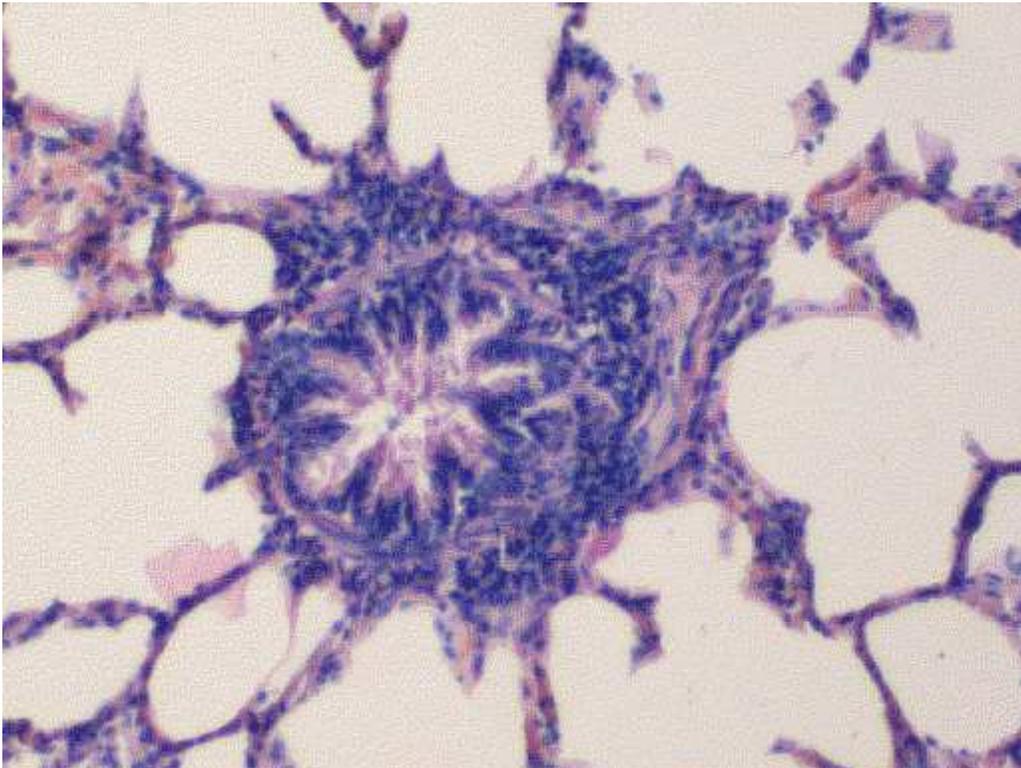
a) Vergr. 40 fach: massive Ansammlung von Entzündungszellen im Lumen des Bronchiolus sowie teilweise peribronchiolär und interstitiell, Bronchiektasie, interstitielles Ödem, Alveolarsepten verdickt, Gefäßmediahypertrophie



b) Ausschnitt von Abb. 2 a, Vergr. 100 fach: massive Ansammlung von neutrophilen Granulozyten im Lumen des Bronchiolus, Becherzellhyper- und -metaplasie

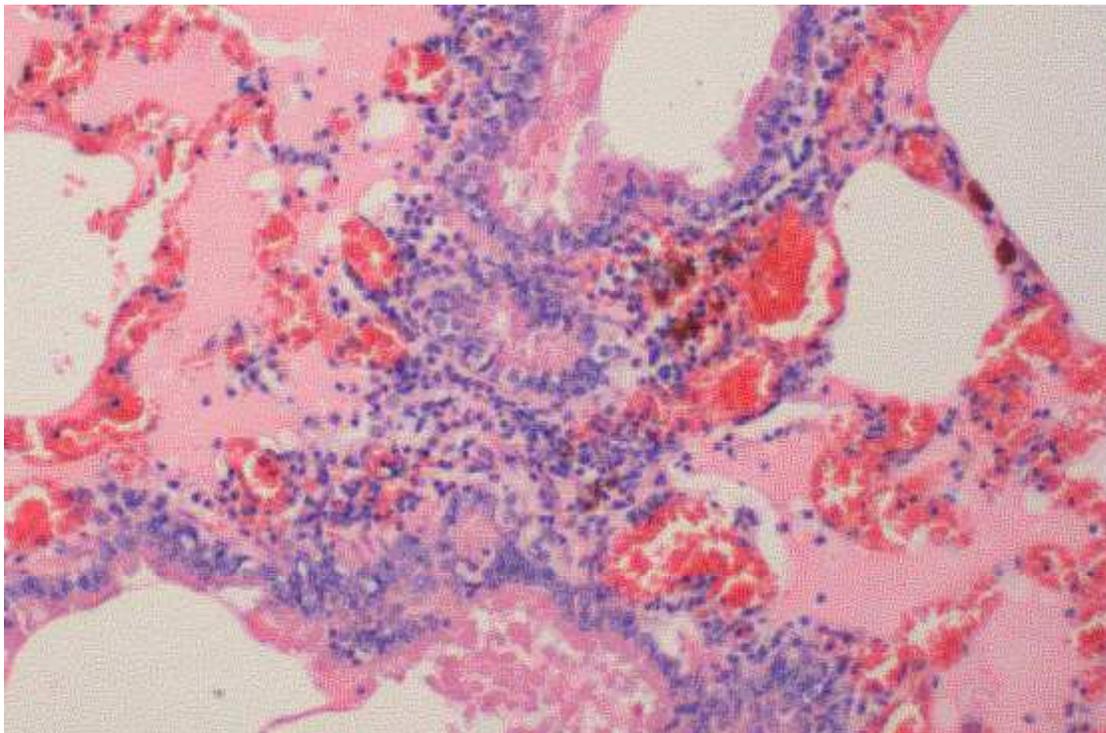
4 Tiere (11%) wiesen bereits eine chronische Peribronchiolitis bzw. -bronchitis (Abb. 3) auf ohne dabei klinisch auffällig zu sein. Bei 4 Tieren (11%) konnte eine akute bzw. subakute Peribronchiolitis und Bronchiolitis (Abb. 4) festgestellt werden.

Abb. 3: Chronische Peribronchiolitis; Pferd Nr. 11, Lobus pulmonalis caudalis, Färbung HE



Vergr. 100 fach: Alveolarsepten tw. verdickt, peribronchioläre lymphozytäre Infiltrate und ggrd. Fibrosierung

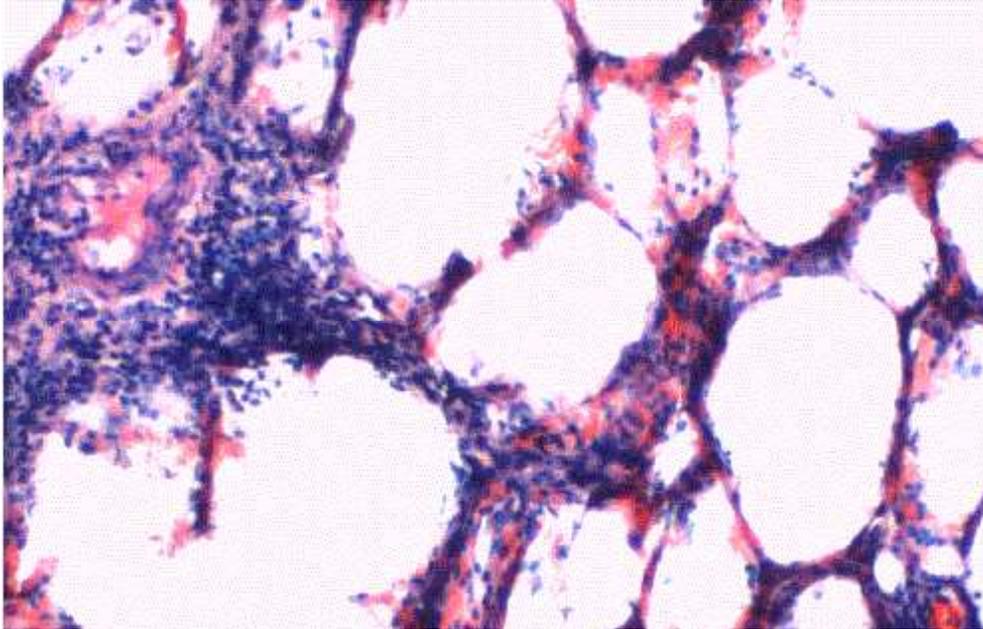
Abb. 4: akute Peribronchiolitis; Pferd Nr. 13, Lobus pulmonalis cranialis, Färbung HE



Vergr. 100 fach: Hyperämie, Lungenödem, peribronchioläre Infiltration mit überwiegend neutrophilen Granulozyten, Mukos

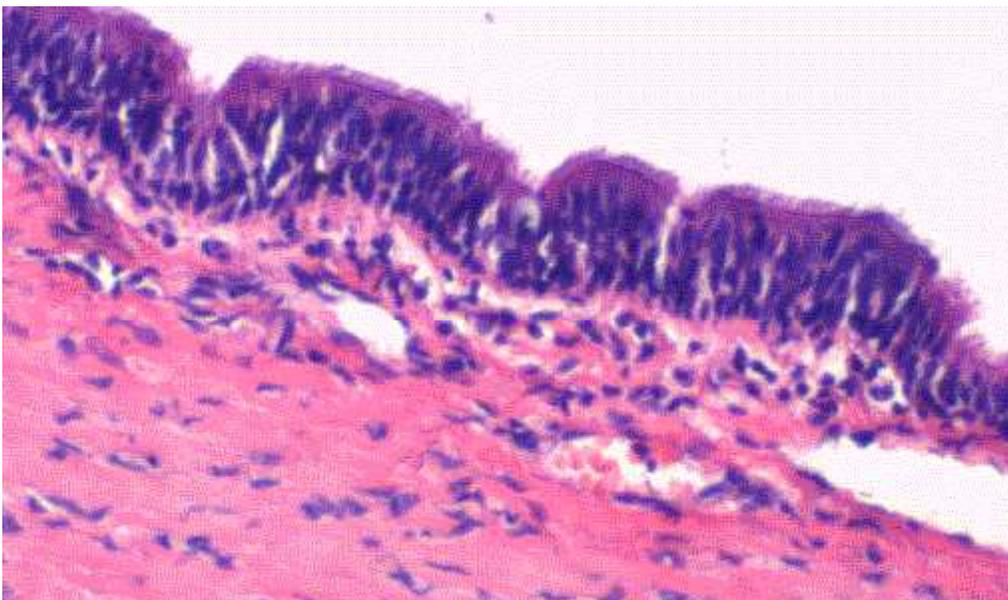
2 Tiere (6%) zeigten das histologische Bild einer interstitiellen Pneumonie (Abb. 5) und bei einem Tier (3%) konnte nur eine subakute Tracheitis (Abb. 6) festgestellt werden.

Abb. 5: Interstitielle Pneumonie; Pferd Nr. 27, Lobus pulmonalis caudalis, Färbung HE



Vergr. 100 fach: Hyperämie, interstitielle mononukleäre Infiltration

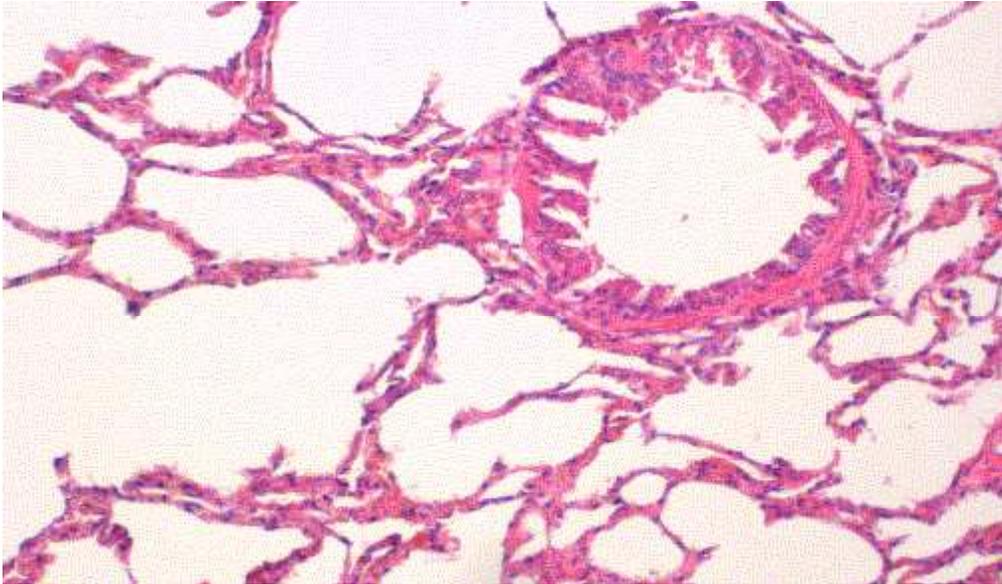
Abb. 6: Subakute Tracheitis; Pferd Nr. 36, Trachea, Färbung HE



Vergr. 100 fach: ggrd. subepitheliale Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen

10 Tiere (28%) waren komplett ohne besonderen Befund (Abb. 7).

Abb. 7: ohne besonderen Befund; Pferd Nr. 20, Lobus pulmonalis caudalis, Färbung HE



Vergr. 100 fach: Bronchiolus, Lungenalveolen

4.2 Ergebnisse aus der Reverse-Transkriptase- und Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Produktion von messenger-RNA (mRNA) der equinen Rhinoviren und der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IFN- γ und GM-CSF untersucht (Anhang, Tab. 16), um Hinweise über die Immunpathogenese der COB im Vergleich zu anderen akuten und chronischen Respirationstrakterkrankungen des Pferdes und auch gesunden Tieren zu erhalten. Der Nachweis von EHV-2 erfolgte direkt mit der PCR nach vorangegangener DNA-Präparation. Bewertet wurde die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate unter dem UV-Licht. Die Stärke der Bande blieb weitgehend unberücksichtigt, da es sich hier lediglich um einen qualitativen Nachweis handelt.

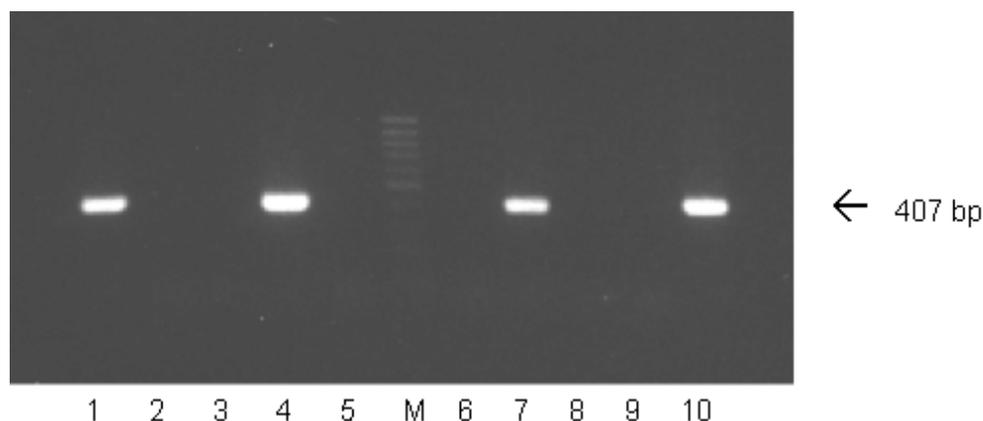
4.2.1 β -Aktin-PCR zur DNA-Qualitätsbestimmung und Untersuchung auf DNA-Kontamination

Das Strukturprotein β -Aktin konnte bei allen Stichproben aus der DNA-Präparation nachgewiesen werden. Die stichprobenartige Untersuchung der RNA-Präparation fiel negativ aus, somit kann eine DNA-Kontamination ausgeschlossen werden.

4.2.2 Nachweis von ERV- 1, ERV- 2 und EHV-2

Für Rhinoviren konnte in keinem Fall eine mRNA-Expression nachgewiesen werden. EHV- 2 konnte dagegen bei 20 Pferden (56%) nachgewiesen werden (Abb. 8; Anhang, Tab. 16 u. 17). Davon wiesen 18 Pferde (90%) pathologische Veränderungen im histologischen Bild auf, die von einer interstitiellen Pneumonie bis zur COB reichen und sich nicht auf eine Veränderung festlegen lassen. Auch die Lokalisation ergibt kein einheitliches Bild, so konnte bei 7 Pferden (35%) das Virus sowohl im kranialen und im kaudalen Lungenlappen nachgewiesen werden. Bei jeweils 5 Pferden (25%) gelang der Nachweis nur im kranialen oder im kaudalen Lungenlappen. Bei 5 Pferden konnte das Virus zusätzlich in der Trachea und bei 3 Pferden zusätzlich im ventralen Nasengang nachgewiesen werden.

Abb. 8: Nachweis von DNA für EHV- 2 mittels nPCR



elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate im Ethidiumbromidgel

Reihe 1: Pferd 23 L.p.c.; Reihe 2: Pferd 23 L.p.cr.; Reihe 3: Pferd 24 L.p.c.; Reihe 4: Pferd 24 L.p.cr.;
 Reihe 5: Pferd 25 L.p.c.; Reihe 6: Pferd 25 L.p.cr.; Reihe 7: Pferd 26 L.p.c.; Reihe 8: Pferd 26 L.p.cr.;
 Reihe 9: Negativkontrolle; Reihe 10: Positivkontrolle; Reihe M: Marker, Gene Ruler 50bp DNA Ladder

Tiere (16 Pferde) mit negativem EHV-2 Nachweis sind im histologischen Bild ebenso unterschiedlich wie die Tiere mit positivem Befund. Nur der Anteil der gesunden Tiere ist mit 6 Tieren (37,5%) deutlich höher. Dabei muss auch beachtet werden, dass nicht für alle Tiere das komplette Untersuchungsmaterial vorlag und z.B. von 4 Tieren mit negativem Nachweis jeweils nur Proben aus den Lobi pulmonales caudales vorlagen, somit diese Tiere trotzdem positiv sein können.

4.2.3 Nachweis von IL-4 und IL-5, Zytokine der Th1-Zellen

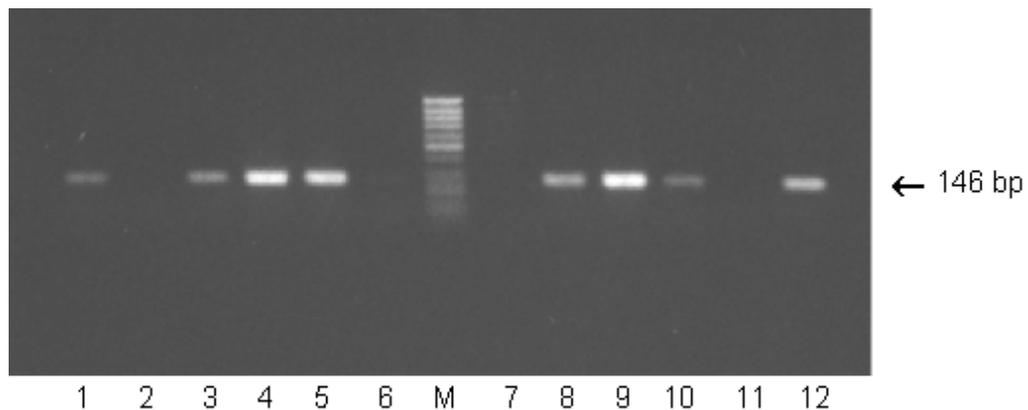
IL-4 konnte bei allen 36 Pferden in der Lunge nachgewiesen werden (Abb. 9, S. 36 u. Abb.12, S.41). Bei 2 dieser untersuchten Tiere konnte es einmal nur in den Lobi pulmonales craniales bzw. caudales nachgewiesen werden. Das histologische Bild variiert von o.b.B. bis zu einer ausgeprägten COB (Anhang, Tab. 16).

IL-5 konnte nur bei insgesamt 5 Tieren (14 %) von 36 Untersuchten nachgewiesen werden (Abb. 9). 2 Tiere litten an einer COPD, 1 Tier zeigte das Bild einer katarrhalischen Bronchitis u. Peribronchitis, 2 Tiere waren ohne besonderen Befund (Tab. 8).

4.2.4 Nachweis von IL-10 und IFN- γ , antiinflammatorische Zytokine, Th2- Zellen

IL-10 konnte bei 34 Tieren (94%) in allen Lokalisationen nachgewiesen werden (Abb. 10). Bei den 2 Tieren mit negativem Resultat lagen nur Proben aus den Lobi pulmonales craniales vor, dass diese zwei Tiere in der Endbewertung zu vernachlässigen sind (Anhang, Tab. 16).

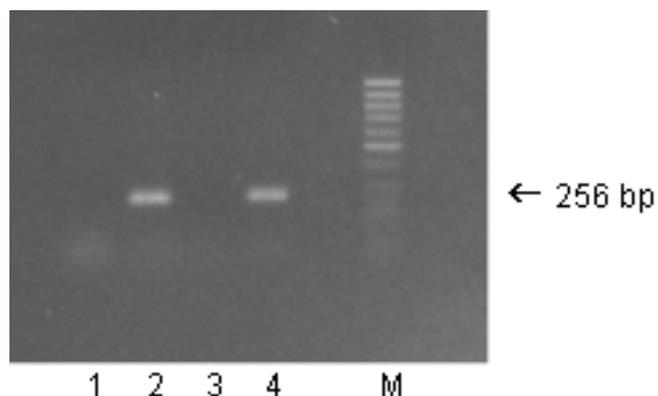
Abb. 10: Nachweis von mRNA für IL- 10 mittels RT-PCR



elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate im Ethidiumbromidgel

Reihe 1: Pferd 22 Trachea; Reihe 2: Pferd 33 L.p.cr.; Reihe 3: Pferd 24 Trachea; Reihe 4: Pferd 25 Trachea; Reihe 5: Pferd 25 M.n.v.; Reihe 6: Pferd 34 L.p.cr.; Reihe 7: Pferd 35 L.p.cr.; Reihe 8: Pferd 27 Trachea; Reihe 9: Pferd 27 L.p.cr.; Reihe 10: Pferd 27 L.p.c.; Reihe 11: Negativkontrolle; Reihe 12: Positivkontrolle IL-10; Reihe M: Marker, λ -DNA *Hind*III

IFN- γ konnte in den Lobi pulmonales von 22 Tieren (63%) nachgewiesen werden (Abb. 11). 13 der positiven Tiere (59%) litten an einer COB, 6 (27%) zeigten das histologische Bild einer Peribronchiolitis bzw. -bronchitis, ein Pferd wies eine interstitielle Pneumonie auf, ein Tier wies histologisch nur eine akute Stauung auf und ein Tier war o.b.B. Bei einem an COB erkranktem Pferd konnte das Zytokin nur in der Trachea nachgewiesen werden (Tab. 9).

Abb. 11: Nachweis von mRNA für IFN- γ mittels RT-PCR

elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate im Ethidiumbromidgel
 Reihe 1: Pferd 2 L.p.c.; Reihe 2: Pferd 4 L.p.c., Reihe 3: Negativkontrolle;
 Reihe 4: Positivkontrolle IFN- γ ; Reihe M: Marker, λ -DNA *HindIII*

Tab. 9: Nachweis von IFN- γ im Gewebe

Pfd-Nr., Probe	Gesamtdiagnose	IFN- γ	IL- 4	IL- 10	IL-11	EHV- 2
1, L.p.c.	COB	+	+	+	—	—
3, L.p.c.	COB	+	+	+	—	—
4, L.p.c.	gesund	+	+	+	—	—
5, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	—	—
6, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	—	+
8, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	+	+
9, L.p.c.	chronische Peribronchiolitis	+	+	+	+	—
10, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	+	—
12, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	—	—
12, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	+	+
13, L.p.c.	akute Peribronchiolitis	+	+	+	—	+
14, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	—	+
14, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	—	+
15, L.p.cr.	COB	+	+	+	—	+

Pfd-Nr., Probe	Gesamtdiagnose	IFN- γ	IL-4	IL-10	IL-11	EHV-2
16, L.p.cr. L.p.c.	katarrhalische Bronchitis u. Peribronchitis	+	+	+	—	+
23, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	+	—
24, Trachea	COB	+	—	+	+	—
27, M.n.v. L.p.cr. L.p.c.	interstitielle Pneumonie	+	+	+	+	+
28, Trachea L.p.cr. L.p.c.	chronische Peribronchiolitis	+	+	+	—	+
29, L.p.cr. L.p.c.	gesund	+	+	+	+	—
30, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	+	+
31, L.p.c.	COB	+	+	+	—	—
32, L.p.c.	gesund	+	+	+	+	—
34, Trachea L.p.cr.	subakute Bronchiolitis u. Peribronchiolitis	+	+	+	+	—

M.n.v. = Meatus nasi ventralis; L.p.cr. = Lobi pulmonales craniales;

L.p.c. = Lobi pulmonales caudales ;

+ = positiv, mRNA / DNA nachweisbar; — = negativ, keine mRNA / DNA nachweisbar

4.2.5 Nachweis von IL-11 und GM-CSF, proinflammatorische Zytokine

IL-11 konnte bei 21 Tieren (58%) nachgewiesen werden (Abb. 12). 7 dieser Tieren (33%) gehörten zu der COB-Gruppe, 6 Tiere (29%) zeigten nur eine Veränderung an den Bronchiolen und Bronchien. Bei beiden an interstitieller Pneumonie erkrankten Pferden konnte IL-11 nachgewiesen werden. 5 Tiere (24%) waren o.b.B. (Tab. 10).

Tab. 10: Nachweis von IL- 11 im Gewebe

Pfd-Nr., Probe	Gesamtdiagnose	IL- 11	IL- 4	IL- 10	IFN- γ	EHV- 2
7, L.p.cr.	akute Peribronchiolitis	+	+	+	—	+
8, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	+	+
9, L.p.cr. L.p.cr.	chronische Peribronchiolitis	+	—	+	—	—
10, L.p.cr.	COB	+	+	+	+	—
12, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	+	—
16, L.p.c.	Bronchitis u. Peribronchitis	+	+	—	+	—
17, L.p.cr. L.p.c.	gesund	+	+	+	—	—
18, L.p.cr.	gesund	+	+	+	—	—
20, M.n.v.	gesund	+	—	+	—	+
21, L.p.cr. L.p.c.	gesund	+	+	+	—	+
22, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	—	—
23, L.p.cr.	COB	+	+	+	+	—
24, Trachea L.p.cr. L.p.c.	COB	+	—	+	+	—
25, M.n.v. Trachea L.p.cr. L.p.c.	interstitielle Pneumonie	+	+	+	—	—
26, Trachea	chronische Peribronchitis	+	+	+	—	+
27, M.n.v. Trachea	interstitielle Pneumonie	+	+	+	+	+
28, Trachea	chronische Peribronchiolitis	+	+	+	+	+
29, Trachea L.p.cr. L.p.c.	gesund	+	+	+	—	—

Pfd-Nr., Probe	Gesamtdiagnose	IL- 11	IL- 4	IL- 10	IFN- γ	EHV- 2
30, L.p.cr. L.p.c.	COB	+	+	+	+	+
32, L.p.c.	gesund	+	+	+	+	—
34, Trachea L.p.cr.	subakute Bronchiolitis u. Peribronchiolitis	+	+	+	+	—

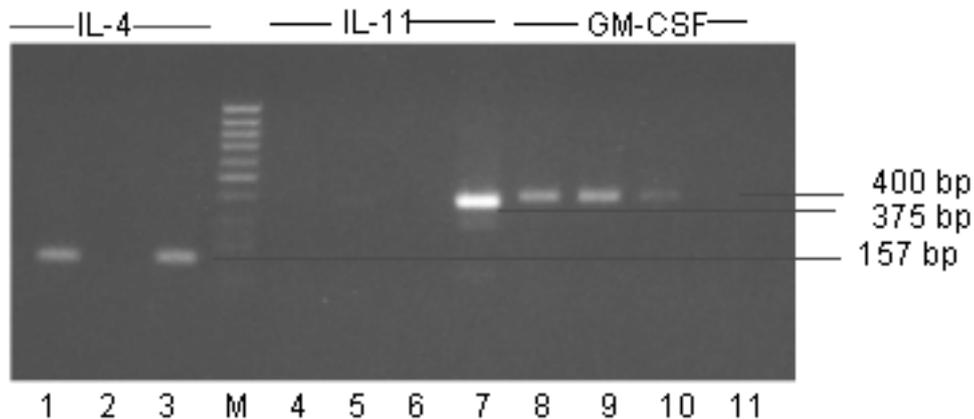
M.n.v. = Meatus nasi ventralis; L.p.cr. = Lobi pulmonales craniales;

L.p.c. = Lobi pulmonales caudales ;

+ = positiv, mRNA / DNA nachweisbar; — = negativ, keine mRNA / DNA nachweisbar

Der Nachweis von GM-CSF erfolgte nur stichprobenartig bei 4 Tieren (Tab. 11). Kriterium hierfür war der Vergleich zwischen COB, interstitieller Pneumonie und Lungen ohne Befund. Bei einem COB-Pferd und dem o.b.B.-Pferd erfolgte ein positiver Nachweis (Abb. 12).

Abb. 12: Nachweis von mRNA für IL- 4, IL-11 und GM-CSF mittels RT-PCR



elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate in Ethidiumbromidgel

Reihe 1: Pferd 11 L.p.cr.; Reihe 2: Negativkontrolle; Reihe 3: Positivkontrolle IL-4;

Reihe 4: Pferd 1 L.p.c.; Reihe 5: Pferd 17 L.p.c.; Reihe 6 Negativkontrolle;

Reihe 7: Positivkontrolle IL-11; Reihe 8: Pferd 1 L.p.c.; Reihe 9: Pferd 17 L.p.c.;

Reihe 10: Positivkontrolle GM-CSF; Reihe 11: Negativkontrolle

sehr schwache Bande für den positiven Nachweis Reihe 5

Tab. 11: Nachweis von GM-CSF im Gewebe

Pfd-Nr., Probe	Gesamt- Diagnose	GM-CSF	IL- 4	IL- 10	IL- 11	IFN- γ	EHV- 2
1, L.p.c.	COB	+	+	+	—	+	—
17, L.p.c.	gesund	+	+	+	+	—	—
25, M.n.v.	Interstitielle Pneumonie	+	—	+	+	—	—
30,Trachea	COPD	—	—	+	—	—	—

M.n.v. = Meatus nasi ventralis; L.p.cr. = Lobi pulmonales craniales;

L.p.c. = Lobi pulmonales caudales ;

+ = positiv, mRNA / DNA nachweisbar; — = negativ, keine mRNA / DNA nachweisbar

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Einblick in die pathoimmunologischen Vorgänge bei respiratorischen Erkrankungen des Pferdes zu bekommen. Grundgedanke ist dabei der mögliche Zusammenhang zwischen viralen Infektionen und COB beim Pferd und die Gemeinsamkeiten mit dem allergischen Asthma des Menschen.

Hierzu wurden Gewebeproben von insgesamt 36 Pferden genommen. Diese wurden histologisch beurteilt und in die verschiedenen Erkrankungsstadien eingeteilt. Anschließend erfolgte mit Hilfe der DNA-/ RNA-Isolierung und RT-PCR der Versuch des Virusnachweises von ERV-1 u. -2 sowie EHV-2. Zur Beurteilung pathoimmunologischer Vorgänge wurde die Zytokinexpression von IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IFN- γ und teilweise GM-CSF bestimmt.

5.1 Auswahl der Pferde und Gewebeproben

Um ein möglichst umfangreiches und im Krankheitsbild unterschiedliches Untersuchungsmaterial zusammenzubekommen, wurden Proben von 24 Schlachtpferden und 12 Sektionspferden gesammelt. Besondere Auswahlkriterien wurden für diese Arbeit nicht berücksichtigt, da es sonst nicht möglich gewesen wäre eine gewisse Anzahl von Tieren in einem abgegrenzten Zeitraum zusammenzubekommen. Somit liegt auch nicht für jedes Tier die gleiche Anzahl an Probenmaterial vor. Trotz dieser Einschränkungen konnte bei dem überwiegenden Teil der untersuchten Pferde eine COB diagnostiziert werden, was die Bedeutung und Verbreitung dieser Erkrankung beim Pferd unterstreicht. Einige dieser Tiere befanden sich bereits im Finalstadium. $\frac{1}{4}$ der insgesamt 36 untersuchten Tiere wiesen bereits erste Anzeichen in Form einer Peribronchiolitis / Bronchiolitis, Peribronchitis / Bronchitis auf und sind als Vorstufe der COB zu betrachten (Kaup et al., 1990 b). Nur bei 3 Pferden mit der Diagnose COB / Peribronchitis konnten im histologischen Bild eosinophile Granulozyten nachgewiesen werden, meist handelte es sich um eine peribronchioläre und intraluminale Ansammlung von neutrophilen Granulozyten, wie es bereits vielfach in der Literatur beschrieben wurde (Gerber, 1973; Winder et al., 1991).

5.2 Virennachweis

In der Humanmedizin ist der Zusammenhang zwischen einer Virusinfektion und dem allergischen Asthma bereits bekannt (Nicholson et al., 1993). Insbesondere die Infektion mit dem respiratorischen Synzytialvirus und dem Parainfluenzavirus bei Kindern (Gern, 2003), sowie dem humanen Rhinovirus bei Erwachsenen kann Asthma auslösen oder verstärken (Friedlander et al., 2005; Tan, 2005; Malmstrom et al., 2006). Busse und Gern (2005) konnten in ihrer Arbeit den Zusammenhang einer Virusinfektion und Asthma mit dem Auftreten einer ausgeprägten Neutrophilie im Sputum erbringen. Vergleichend dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die Proben auf eine mögliche Infektion mit equinen Rhino und EHV-2 Viren untersucht. Rhinoviren konnten bei keinem Pferd mittels PCR nachgewiesen werden. Dies schließt einen Zusammenhang aber nicht ursächlich aus. Bisher konnte der Nachweis mittels PCR aus nasopharyngealen Tupferproben nur in der akuten Phase der Infektion erfolgen (Feng LI et al., 1997), auch konnte in einer aktuellen Arbeit equine Trachealzellen in vitro mit equinen Rhinoviren infiziert und eine Zytokinexpression nachgewiesen werden (Gustat, 2003).

Dies könnte eine Bestätigung dafür sein, dass diese Viren nur in Verbindung mit milden Infektionen der oberen Atemwege zu sehen sind (Plummer, 1962; Steck et al., 1978; Li et al., 1997; Carman et al., 1997) und die Bedeutung im Zusammenhang mit COB zu vernachlässigen ist, möglicherweise ist aber auch bei chronischen Veränderung kein Virus mehr nachweisbar, trotz vorangegangener Infektion und die Virus-induzierte Zytokinexpression, insbesondere IL-10 (Busse und Gern, 2005) übt einen negativen Einfluss auf die Lungenphysiologie insbesondere das Epithel aus, wie bereits in der Humanmedizin im Zusammenhang mit Asthma bewiesen wurde (Kuperman et al., 2005; Papadopoulos et al., 2000; Gern and Busse, 1999). Genauere Untersuchungen im Tiermodell und Langzeitstudien könnten hier hilfreich sein und die Thesen untermauern bzw. überprüfen.

Im Gegensatz dazu fiel der Nachweis für EHV-2 überwiegend positiv aus. Interessanterweise konnte bei 73% der an COB erkrankten Pferden EHV-2 nachgewiesen werden und bestätigt den in der Literatur bereits vermuteten Zusammenhang (Robinson et al., 1996). 50 % der Tiere mit nachgewiesenen Veränderungen an den Bronchiolen und Bronchien waren ebenfalls positiv. Die lange Persistenz der Viren im Tier nach erfolgter Infektion und Reaktivierung wurde in der Literatur bereits beschrieben (Drummer et al., 1995).

Dies lässt schlussfolgern, dass die Bedeutung und Folge einer EHV-2 Infektion bislang unterschätzt wurde und könnte wie beim Menschen die Neutrophilie in der BALF und im histologischen Bild erklären. Dies bezüglich sollten weitere Untersuchungen folgen.

5.3 Zytokinexpression

IL-4 und IL-10 sind die Zytokine, die bei allen untersuchten Pferden in den Gewebeproben nachgewiesen werden konnten. 2 Tiere fielen in der Untersuchung auf IL-10 negativ aus, sind aber in diesem Zusammenhang zu vernachlässigen, da bei diesen Tieren nur Gewebeproben aus den Lobi pulmonales craniales vorlagen. IL-4 und IL-10 zählen wie auch IL-5, IL-9, IL-13 und GM-CSF zu den durch Th2-Zellen sezernierten Lymphokinen (Barnes et al., 1998). IL-4 veranlasst B-Zellen zur Ig-E Produktion und ist insbesondere im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen zu sehen (Shirahawa et al., 2000; Anderson and Morison, 1998). Des Weiteren ist es beim Menschen zusammen mit IL-13 an der Allergen-induzierten Mukosproduktion beteiligt (Kuperman et al., 2005). Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit eine Expression von m-RNA für IL-4 und IL-10 bei gesunden, COB-kranken und sonstig erkrankten Pferden festgestellt wurde, macht eine Quantifizierung zur Beurteilung einer erhöhten Expression im Lungengewebe im Zusammenhang mit COB notwendig und konnte hier nicht durchgeführt werden. Dennoch ist eine erhöhte Expression zu erwarten, konnte diese doch bereits in der BALF und im Serum im Vergleich zum gesunden Pferd für IL-4 festgestellt werden (Lavoie et al., 2001; Bowls et al., 2002; Horohov et al., 2005).

IL-10 gehört mit zu den antiinflammatorischen Zytokinen (Chung und Barnes, 1999), verringert z.B. die Synthese der Zytokine der Th1-Zellen wie IL-1 und IL-6 und zeigt eine immunsuppressive Wirkung durch Funktionshemmung der Monozyten und Makrophagen, wodurch gleichzeitig die Immunantwort in Richtung Th2-Zellen gelenkt und verstärkt wird und soll im Zusammenhang mit einer Virusinfektion bei Asthma die Produktion von eosinophilen Granulozyten unterdrücken (Busse und Gern, 2005). Durch die lokale Unterdrückung der Immunabwehr könnte sogar eine leichte Virusinfektion mit milder bis subklinischer Verlaufsform unterstützt werden mit den daraus resultierenden Folgen der Hyperreaktivität, Zytokinproduktion und -sekretion durch die Epithelzellen, wie es bereits beim Menschen im Zusammenhang mit Asthma beschrieben wurde (Folkerts et al., 1998; Chung und Barnes, 1999).

IL-11 ist ein weiteres Zytokin der proinflammatorischen Reihe und wird in der Lunge von vielen strukturellen Zellen (Fibroblasten, Muskelzellen) und eosinophilen Granulozyten produziert (Barnes et al., 1998). Eosinophile Granulozyten konnten in der vorliegenden Arbeit nur bei 3 Pferden nachgewiesen werden, somit bleiben hier nur Stromazellen, glatte Muskelzellen und Epithelzellen als Hauptproduktionsort für IL-11. In der vorliegenden Arbeit konnte bei 57 % der untersuchten Pferde IL-11 nachgewiesen werden. Davon wiesen 65 % strukturelle Veränderungen im histologischen Bild auf in Form einer ausgeprägten COB oder bronchiären und bronchiolären Entzündungsreaktionen. 5 Tiere erschienen gesund, davon konnte bei 2 Tieren EHV-2 nachgewiesen werden. Beim Menschen konnte IL-11 bereits im nasopharyngealen Sekret von Kindern nach einer Virusinfektion mit dem respiratorischen Synzytialvirus und Influenza A-Virus nachgewiesen werden (Oh et al., 2002). Zwar konnte bei keinem Pferd eine Infektion mit den equinen Rhinoviren nachgewiesen werden, trotzdem ist ein Zusammenhang der IL-11 Expression und einer vorangegangenen Virusinfektion nicht auszuschließen und im Hinblick darauf sollten weitere Arbeiten evtl. auch bezüglich Influenza-Viren folgen .

Als weiteres in der vorliegenden Arbeit auffälliges Zytokin ist das IFN- γ zu nennen. IFN- γ gehört wie das IL-10 zu den antiinflammatorischen Zytokinen und ist in der Regel ein Nachweis für Th1-Zellen (Chung und Barnes, 1999). IFN- γ übt einen inhibitorischen Effekt auf Th2-Zellen aus (Romagniani et al., 1990), inhibiert die IL-10 Produktion durch Monozyten sowie allergisch bedingte Entzündungsvorgänge und die Ig-E Synthese (Chomorat et al., 1993). Ungeklärt ist der proinflammatorische Effekt durch Aktivierung der Lungenepithelzellen zur Zytokinfreisetzung und Expression von Adhäsionsmolekülen (Look et al., 1992). Ebenfalls stellten Leonard et al. (1997) fest, dass IFN- γ die Produktion von T-Zellen bei Asthmatikern reduziert. Im Tiermodell (Maus) konnten sogar durch exogen zugefügtes IFN- γ eine Eosinophilie und Hyperreaktion der Atemwege nach erfolgter Allergenexposition verhindert werden (Iwamoto et al., 1993; Lock et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte bei 63 % der untersuchten Pferde IFN- γ nachgewiesen werden, davon waren 59 % an COB erkrankt, 27 % wiesen bereits histologische Veränderungen an den Bronchien und Bronchiolen auf. Nur ein Pferd konnte histologisch als gesund eingestuft werden. Aufgrund dieses Nachweises und der gleichzeitigen Expression von m-RNA für IL-4 und IL-10, teilweise auch IL-11, deutet sich bei 80 % der an COB erkrankten Pferde, sowie bei 66% der an Bronchitis / Bronchiolitis erkrankten Pferde eine gemischte Th1-/ Th2-Immunantwort an, wie sie auch in der BALF COB-kranker Pferde zu finden ist (Berendonk, 2000) und auch die Arbeit von Horohov et al. (2005) bestätigen würde, die mittels

quantitativer PCR einen Anstieg von IL-4, IL-13 und IFN- γ im Serum und in der BALF von COB- kranken Pferden nach Allergen-Exposition messen konnten. Damit unterscheidet sich das Bild der COB beim Pferd recht deutlich von der durch eine Th2-Zytokin dominierende Immunantwort beim Asthma des Menschen (Robinson et al., 1992).

Ein weiteres wichtiges Merkmal im Zusammenhang mit Asthma beim Menschen sind das dominante Auftreten von IL-5, GM-CSF und eine ausgeprägte Eosinophilie (Chung und Barnes, 1999). Hauptaufgabe des sezernierten Zytokine bei Allergen induzierter Luftwegsentzündung und bronchialer Hyperreaktion ist die Stimulierung, Proliferation und Differenzierung von eosinophilen Granulozyten und deren Einwanderung ins Gewebe (Baumann et al., 1992; Coffmann et al., 1989; Janeway und Travers, 1997). Die eosinophilen Granulozyten stellen eine Schlüsselfunktion dar und weisen durch Freisetzung von Proteinen und Peroxiden eine toxische Wirkung auf die Lungenepithelien auf (Anderson und Morison, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte IL-5 nur bei 14% der untersuchten Pferde nachgewiesen werden und davon auch nur einmal im Zusammenhang mit einer Eosinophilie bei einer COB, dies entspricht weitestgehend den Untersuchungen von Bowles et al. (2002) und Horohov et al. (2005), bei denen in der BALF nur bei einer klinischen Symptomatik die Expression von mRNA für IL-4 erhöht war, nicht aber für IL-5. Generell konnte bisher keine ausgeprägte Eosinophilie beim Pferd im Zusammenhang mit COB festgestellt werden, was mit einem entscheidenden Unterschied zum Asthma des Menschen darstellt.

GM-CSF ist in der vorliegenden Arbeit nur stichprobenartig untersucht worden. Dieses Zytokin ist ebenso wie IL-5 verantwortlich für die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten (Park et al., 1998). Bei den hier 4 untersuchten Pferden, konnte das Zytokin 3mal nachgewiesen werden. Dabei war ein Pferd COB-krank, 1 Pferd gesund und ein Pferd litt an einer interstitiellen Pneumonie. Bei dem COB-kranken Pferd konnten gleichzeitig auch eosinophile Granulozyten im histologischen Bild nachgewiesen werden, was einen Zusammenhang vermuten lässt. Dieses Ergebnis lässt sicherlich keine Rückschlüsse auf die Bedeutung des Zytokins im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen zu, sollte aber in weiteren Arbeiten bezüglich einer quantitativen Bestimmung der Th2-Zytokine Berücksichtigung finden.

6 Zusammenfassung

Im Hinblick darauf, dass die Bedeutung von Atemwegserkrankungen, insbesondere die chronisch obstruktiven Bronchitis (COB) beim Pferd erheblich zugenommen hat, wurden in der vorliegenden Arbeit die Zusammenhänge viraler Infektionen, insbesondere den equinen Herpesviren Typ 2 (EHV-2) und erstmalig den equinen Rhinoviren (ERV) mit der Entstehung von COB untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Teildarstellung pathoimmunologischer Vorgänge bei respiratorischen Erkrankungen beim Pferd bezüglich bestehender Gemeinsamkeiten mit dem allergischen Asthma des Menschen.

Zu diesem Zweck wurden Lungengewebebeobachtungen von 36 Schlacht- und Sektionspferden ohne Berücksichtigung von Alter, Haltungs- oder Nutzungsform und Gesundheitszustand histologisch untersucht und diagnostisch eingeteilt. 42% der Tiere waren COB krank, 22% der 36 Pferde zeigten bereits chronische Veränderungen an den Bronchien und Bronchioli, weiterhin litten 6 % an einer interstitiellen Pneumonie und 28 % konnten als lungengesund eingestuft werden.

In weiteren Arbeitsschritten erfolgte die Aufarbeitung der Proben für den Virus- und Zytokinnachweis mittels RNA- und DNA-Präparation und anschließender RT-PCR. Es wurden die spezifischen Primer für das equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2), die equinen Rhinoviren Perv, 350/72 (equines Rhinitis 1 Virus: ERV-1) und 1436/73 (equines Rhinitis 2 Virus, ERV-2) eingesetzt und die PCR für ERV etabliert. Als zytokinspezifische Primer kamen zum Einsatz: IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IFN- γ und GM-CSF.

Es konnten bei keinem der Pferde Rhinoviren nachgewiesen werden, dafür waren 73 % der COB-kranken Pferde EHV-2 positiv, ebenso konnte bei 67% der Tiere mit (Peri-)Bronchitis / (Peri-) Bronchiolitis das Virus nachgewiesen werden, sowie bei einem Pferd mit einer interstitiellen Pneumonie und bei 22 % der Tiere ohne besondere klinische und histologische Befunde.

Der Nachweis für IL-4 und IL-10 gelang bei allen 36 untersuchten Pferden. IL-11 konnte bei 47% der COB-kranken Pferde, bei 75% mit (Peri-)Bronchitis / (Peri-)Bronchiolitis, 100% mit Pneumonie (2 Pferde) und bei 60% der gesunden Pferde festgestellt werden.

Bei IFN- γ lag der meiste Anteil bei den Pferden mit bronchialen Veränderungen (63%) bis hin zu COB (87%). Nur bei einem Pferd ohne Befund konnte ein positiver Nachweis auf IFN- γ erfolgen.

IL-5 konnte nur bei insgesamt 5 von 36 untersuchten Pferden nachgewiesen werden, dies Ergebnis verteilt sich auf 2 COB-krank (13%), 2 gesunde (22%) und 1 Pferd (11%) mit katarrhalischer Bronchitis.

Das Zytokin GM-CSF wurde nur stichprobenartig mit überwiegend positivem Ergebnis untersucht und sollte in weiteren Arbeiten stärker berücksichtigt werden.

Anhand der Ergebnisse wird die Verbreitung respiratorischer Veränderungen / Erkrankungen beim Pferd deutlich. Der Zusammenhang viraler Infektionen mit COB konnte bestätigt werden, wie es bereits von Robinson et al. (1996) vermutet wurde. Insbesondere die bislang unterschätzte Bedeutung von EHV-2 Infektionen wird in der vorliegenden Arbeit eindeutig untermauert und bestätigt die Ergebnisse von Wolfinger (1998). Der negative Nachweis für die equinen Rhinoviren schließt den Zusammenhang einer Infektion mit der COB, wie es beim Menschen im Zusammenhang mit Asthma erkennbar ist (Nicholson et al., 1993; Johnston et al., 1995), nicht grundsätzlich aus und sollte in weiteren Forschungsarbeiten mit berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse der Zytokinexpression mit dem Bild einer gemischten Th1- und Th2 – Immunantwort bestätigen die Untersuchungen von Berendonk (2000) und Horohov et al. (2005) und stimmen somit nicht mit dem Bild einer dominanten Th2 – Immunantwort beim allergischen Asthma des Menschen (Chung und Barnes, 1999) überein. Weitere Gemeinsamkeiten mit der Erkrankungen beim Menschen wie eine ausgeprägte Eosinophilie und eine m-RNA Expression für IL-5 konnten in der vorliegenden Arbeit beim Pferd nicht bestätigt werden.

Inwieweit Virusinfektionen des Atmungsapparates für die Entstehung der COB auslösend sein können, konnte mit der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Um die Zusammenhänge viraler Infektionen mit der COB weiter zu hinterfragen, sollten diesbezüglich weitere Untersuchungen folgen. Konnte Gustat (2003) in ihrer Arbeit erstmals zeigen, dass virale Infektionen des equinen Trachealepithels zu einer veränderten Zytokinexpression führen, ist dies bezüglich des Lungenepithels noch unklar. Dabei sollten auch andere Viren (z.B. Influenza) in die Untersuchungen mit einbezogen werden und zusätzlich eine Lokalisation in der Gewebestruktur erfolgen. Das Zytokinspektrum sollte im Zusammenhang mit der Neutrophilie um z. B. IL-8 und IL-17 erweitert werden oder auch bezüglich der Unterscheidung der Th-Antwort um IL-13. Interessant wäre auch eine Quantifizierung der Zytokinexpression im Lungengewebe im Vergleich der verschiedenen Erkrankungsstadien.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durchaus ein Zusammenhang viraler Infektionen mit der COB besteht, ähnlich der Pathogenese beim Asthma des Menschen. Des Weiteren kann EHV-2 große Bedeutung für die Pathogenese respiratorischer Erkrankungen beim Pferd zugeschrieben werden und im Hinblick darauf sollten weitere Forschungsarbeiten folgen.

**COPD in horses
in context to virus infections
and in comparison with allergic asthma in humans**

7 Summary

With regard to the increasing importance of airway diseases, mainly chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in horses, the present study examined the correlation between virus infections, especially equine herpesvirus type 2 (EHV-2) and equine rhinovirus (ERV) and the origin of COPD. Additionally, there followed a representation of pathoimmunological processes during respiratory diseases in horses with regard to existing similarities with allergic asthma in humans.

For this purpose lung samples were taken from 36 horses from the slaughterhouse and from the pathology institute without consideration of age, state of health, way of keeping or using. These samples were examined on the histological diagnoses. 42 % have shown the signs of COPD, 22 % of these 36 examined horses have already shown chronic changes of the bronchi and bronchioli, also 6 % suffered from an interstitial pneumonia and 28 % had no lung diseases.

In further steps followed the preparation of the samples for the proof of the viruses and cytokines with RNA- and DNA- preparation and finally RT-PCR. For this came to use the specific primer of EHV-2, the equine rhinoviruses PERV, 350/72 (equine rhinitis 1 virus: ERV-1) and 1436/73 (equine rhinitis 2 virus: ERV-2) and further more the PCR for ERV have been established. As cytokine specific primer came to use the interleukines: IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IFN- γ and GM-CSF.

Rhinoviruses could not be found in the samples at all, instead 73 % of the COPD infected horses were EHV-2 positive, further more in one horse with an interstitial pneumonia and 22 % of the horses without any clinical and histological signs.

The detection for IL-4 and IL-19 was possible in all 36 examined horses. IL-11 could be found in 47 % of horses with COPD, 75 % of horses with (peri-)bronchitis / (peri-)bronchiolitis, 100 % with pneumonia (2 horses) and 60 % of the healthy horses.

The main part of IFN- γ was found in the horses with bronchial discharges (63 %) up to horses with COPD (87 %). Only one healthy horse could be detected positive for IFN- γ .

IL-5 could only be found in 5 of the 36 examined horses, these distributed on 2 horses with COPD (13%), 2 healthy horses (22%) and one horse (11 %) with a catarrhalic bronchitis.

The cytokine GM-CSF was only examined in a spot check with a mainly positive result and should be considered in further studies.

By means of the results a context can be confirmed for the virus infections and COPD, like it has been already supposed by Robinson et al. (1996). Especially the underestimated meaning of EHV-2 infections can be underlined with this study and confirms the results from Wolfinger (1998). The negative result of equine rhinoviruses does not mainly exclude a relation between an infection and COPD like it is shown by asthma in humans (Nicholson et al., 1993; Johnston et al., 1995) and should be considered in further studies.

The results of the cytokine-expression with the picture of a mixed Th1- and Th2- response correlate with the studies by Berendonk (2000) and Horohov et al. (2005) and do not correspond with the dominant Th2-response of allergic asthma in humans (Chung and Barnes, 1999). The further similarities with the diseases of humans, a marked eosinophilia and a mRNA-expression of IL-5, could not be detected in horses in the present study.

The present study could not clear up completely to what extent the induce of COPD is caused by virus infections of the respiratory tract. In order to get a better knowledge about the correlation between virus infections and COPD, further studies should follow. As Gustat (2003) was able to show, that a virus infection of equine tracheal epithelium causes a changed cytokine expression, is this for lung epithelium still unclear. Therefore other viruses (for example Influenza) should get involved, also with the attempt to localize the infection in the tissue structure.

The variety of cytokines should be extended to IL-8 and IL-17 in relation with neutrophilia or also IL-13 concerning the difference of the Th-response. The quantification of the cytokine-expression in the lung tissue could also be interesting to the different stages of the diseases.

The present study shows, that there is absolutely a context between virus infections and COPD similar to the pathogenises of asthma in humans. Further, the infection with EHV-2 plays a significant role in the pathogenises of respiratory diseases in horses, especially COPD. The correlation between virus infections and COPD should be an object to further studies.

8 Literaturverzeichnis

- Ainsworth, D. M., Grunig, G., Matychak, M.B., Young, J., Wagner, B., Erb, H.N., Antczak, D.F. (2003)
 Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells.
Vet Immunol Immunopathol. **96**, 83-91.
- Ainsworth, D.M., Wagner, B., Franchini, M., Grunig, G., Erb, H.N., Ran, J.Y., (2006)
 Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction.
Am J Vet Res. **67**, 669-77.
- Anderson, G.G. & Morrison, J.F.F. (1998)
 Molecular biology and genetics of allergy and asthma.
Arch Dis Child **78**, 488-496.
- Barnes, P.J., Chung, K.F. & Page, C.P. (1998)
 Inflammatory Mediators of Asthma : An Update.
Pharmacological Reviews **50**, 515-596.
- Beech, J., VMD (1989a)
 Diagnosing chronic obstructive pulmonary disease.
Vet Med, June, Symp equ resp disease, 614-9.
- Belak, S., Palfi, V., Tuboly, S. & Bartha, L. (1980)
 Passive immunization of foals to prevent respiratory disease caused by equine herpesvirus type 2.
Zbl Vet Med, Reihe B. **27**, 826-30.
- Berendonk, M. (2000)
 Untersuchungen verschiedener Lymphozytensubpopulationen, entsprechender regulatorischer Zytokine und Immunglobulinisotypen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit bei Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COB).
Dissertation TiHo Hannover.
- Blakeslee, J.B., Olsen, R.G., McAllister, R.S., Fassbender, J. & Dennis, R. (1975)
 Evidence of respiratory tract infection induced by equine herpesvirus, type 2, in the horse.
Canad J Microbiol **21**, 1940-6.
- Bowles, K.S., Beadle, R.E., Mouch, S., Pourciau, S.S., Littlefield-Chabaud, M.A., LeBlanc, C., Mistic, L., Fermaglich, D. & Horohov, D.W. (2002)
 A novel model for equine recurrent airway obstruction.
Vet Immunol and Immunopathology **87**, 385-9.
- Bracher, V., von Fellenberg, R., Winder, C.N., Gruenig, G. & Hermann, M. (1991)
 An investigation of the incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in random populations of Swiss horses.
Equine Vet J **23**, 136-41.
- Busse, W.W., Gern, J.E. (2005)
 Is Interleukin-10 a „10“ in Virus-provoked Asthma?
Am J of Resp and Critical Care Medicine **172**, 405-6.

- Carman, S., Rosendal, S., Huber, L., Gyles, C., McKee, S., Willoughby, R.A., Dubovi, E., Thorsen, J. & Lein, D. (1997)
Infectious agents in acute respiratory disease in horses in Ontario.
J of Vet Diagnostic Investigation **9**, 17-23.
- Chomarar, P., Risoan, M.c., Banchereau, J. & Miossec, P. (1993)
Interferon γ inhibits interleukin 10 production by monocytes.
J Exp Med **177**, 523-7.
- Chung, K.F. & Barnes, P.J. (1999)
Cytokines in asthma.
Thorax **54**, 825-57.
- Coffman, R.L. et al. (1989)
Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice.
Science **245**, 308-10.
- Collins, M. & Algers, B. (1986)
Effects of stable dust on farm animals.
Vet Res Commun Nov **10**, 415-28.
- Cook, W.R. & Rossdale, P.D. (1963)
The syndrome of "Broken wind" in the horse.
Proc Royal Soc Med **56**, 972-7.
- Cordeau, M.E., Joubert, P., Dewachi, O., Hamid, Q., Lavoie, J.P. (2004)
IL-4, IL-5, and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves.
Vet Immunol Immunopathol. **97**, 87-96.
- Couetil, L.L., Art, T., de Moffarts, B., Becker, M., Melotte, D., Jaspard, F., Bureau, F., Lekeux, P. (2006)
DNA binding activity of transcription factors in bronchial cells of horses with recurrent airway obstruction.
Vet Immunol Immunopathol. **113**, 11-20.
- Cramer, R. (1998)
Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications.
Int Arch Allergy Immunol **115**, 99-114.
- Debrue, M., Hamilton, E., Joubert, P., Lajoie-Kadoch, S., Lavoie, J.P. (2005)
Chronic exacerbation of equine heaves is associated with an increased expression of interleukin-17 mRNA in bronchoalveolar lavage cells.
Vet Immunol Immunopathol. **105**, 25-31.
- Derksen, F.J. (1993)
Chronic obstructive pulmonary disease (heaves) as an inflammatory condition.
Equine Vet J **25**, 257-8.
- Dewachi, O., Joubert, P., Hamid, Q., Lavoie, J.P. (2006)
Expression of interleukin (IL)-5 and IL-9 receptors on neutrophils of horses with heaves.
Vet Immunol Immunopathol. **109**, 31-6.

- Drummer, H.E., Reubel, G.H. & Studdert, M.J. (1996)
Equine gammaherpesvirus 2 (EHV-2) is latent in B lymphocytes.
Arch Virol **141**, 495-504.
- Eder, C., Cramer, R., Mayer, C., Eicher, R., Straub, R., Gerber, H., Lazary, S. & Marti, E. (2000)
Allergen-specific IgE levels against crude mould allergens and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis.
Vet Immunol Immunopathol **73**, 241-53.
- Einarsson, O., Geba, G.P., Zhu, Z., Landry, M. & Elias, J.A. (1996)
Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airway hyperresponsiveness.
J Clin Invest **97**, 915-24.
- Fabbri, L., Beghe, B., Caramori, G., Papi, A. & Saetta, M. (1998)
Similarities and discrepancies between exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.
Thorax **53**, 803-8.
- Fahy, J.V., Kim, K.W., Liu, J. & Boushey, H.A. (1995)
Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation.
J Allergy Clin Immunol **4**, 843-52.
- Folkerts, G., Busse, W.W., Nijkamp, F.P., Sorkness, R. & Gern, J. (1998)
Virus-induced Airway Hyperresponsiveness and Asthma.
Am J Res Crit Care Med **157**, 1708-20.
- Franchini, M., Gilli, U., Akens, M.K., Fellenberg, R.V. & Bracher, V. (1998)
The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD).
Vet Immunol Immunopathol **66**, 53-65.
- Friedlander, S.L., Busse, W.W. (2005)
The role of rhinovirus in asthma exacerbations.
J Allergy Clin Immunol **116**, 267-73.
- Gendelman, H.E. & Morahan, P.S. (1992)
Macrophages in viral infections.
The macrophage (Hrsg.: Lewis, C.E. & McGee, J.O'D.), 157-213.
- Gerber, H. (1973)
Chronic pulmonary disease in the horse.
Equine Vet J **5**, 26-33.
- Gern, J.E. (2003)
Mechanisms of virus-induced asthma.
J Pediatr. **142**, 9-13.
- Gern, J.E. & Busse, W.W. (1999)
Association of Rhinovirus Infections with Asthma.
Clin Microbiol Rev **12**, 9-18.

- Giguere, S., Viel, L., Lee, E., McKay, R.J., Hernandez, J. & Franchini, M. (2002)
Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate.
Vet Immunol Immunopathol **85**, 147-58.
- Gustat, S. (2003)
In vitro- und ex vivo-Untersuchungen zur Zytokinexpression im equinen Trachealepithel.
Dissertation FU Berlin.
- Halliwell, R.E.W., McGorum, B.C., Irving, P. & Dixon, P.M. (1993)
Local and systemic antibody production in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease.
Vet Immunol Immunopathol **38**, 201-15.
- Hizawa, N., Yamaguchi, E., Jinushi, E., Konno, S., Kawakami, Y. & Nishimura, M. (2001)
Increased total serum IgE levels in patients with asthma and promotor polymorphisms at CTLA4 and FCER1B.
J Allergy Clin Immunol **108**, 74-9.
- Holgate, S.T., Lackie, P.M., Davies, D.E., Roche, W.R. & Walls, A.F. (1999)
The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodelling in asthma.
Clin Exp Allergy **29**, 90-5.
- Horohov, D.W., Beadle, R.E., Mouch, S., Pourciau, S.S. (2005)
Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine airway obstruction.
Vet Immunol Immunopathol **108**, 237-45.
- Huang, J., Ficorilli, N., Hartley, C.A., Wilcox, R., Weiss, M. & Studdert, M.J. (2001)
Equine rhinitis B virus: a new serotype.
J General Virol **82**, 2641-5.
- Iwamoto, I., Nakajima, H., Endo, H. & Yoshida, S. (1993)
Interferon γ regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4⁺ T cells.
J Exp Med **177**, 573-6.
- Janeway & Travers (1997)
Immunologie, 2. Auflage.
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Jeffery, P.K. (1999)
Differences and similarities between chronic obstructive pulmonary disease and asthma.
Clin Exp Allergy **29**, 14-26.
- Johnston, S.L., Pattemore, P.K., Sanderson, G., Smith, S., Lampe, F., Josephs, L., Symington, P., O'Toole, S., Myint, S.H., Tyrell, D.A. & Holgate, S.T. (1995)
Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children.
BMJ **310**, 1225-9.
- Kaup, F.J., Drommer, W. & Deegen, E. (1990a)
Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). I: Alteration of the larger conducting airways.
Equine Vet J **22**, 343-8.

- Kaup, F.J., Drommer, W. & Deegen, E. (1990b)
Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).
II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region.
Equine Vet J **22**, 349-55.
- Kleiber, C., McGorum, B.C., Horohov, D.W., Pirie, R.S., Zurbriggen, A., Straub, R. (2005)
Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T-lymphocytes in horses
with recurrent airway obstruction.
Vet Immunol Immunopathol. **104**, 91-7.
- Kuperman, D.A., Huang, X., Nguyenvu, L., Hölscher, C., Brombacher, F., Erle, D.J. (2005)
IL-4 Receptor Signaling in Clara Cells Is Required for Allergen-Induced Mucus Production.
J of Immunology **175**, 3746-52.
- Laan, T.T., Bull, S., Pirie, R., Fink-Gremmels, J. (2006)
The role of alveolar macrophages in the pathogenesis of recurrent airway obstruction.
J Vet Intern Med. **20**, 167-74.
- Larson, V.L. & Busch, R.H. (1985)
Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary
histopathologic findings.
Am J Vet Res **46**, 144-6.
- Lavoie, J.P., Maghni, K., Desnoyers, M., Taha, R., Martin, J.G. & Hamid, Q.A. (2001)
Neutrophilic Airway Inflammation in Horses with Heaves is Characterized by a Th2-type
Cytokine Profile.
Am J Res Crit Care Med **164**, 1410-13.
- Li; F., Drummer, H.E., Ficorilli, N., Studdert, M.J. & Crabb, B.S. (1997)
Identification of noncytopathic equine rhinovirus 1 as a cause of acute febrile respiratory
disease in horses.
J Clin Microbiol **35**, 937-43.
- Look, D.C. , Rapp, S.R. , Keller, B.T & Holzman, M.J. (1992)
Selective induction of intracellular adhesion molecule-1 by interferon- γ in human airway
epithelial cells.
Am J Physiol **263**, L79-L87.
- Ludwig, H., Thein, P. & Chowdhury, S.I. (1988)
Herpesvirus infection of equine animals.
In: Darai G. (Ed), Virus disease in laboratory and captive animals.
Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 283-97.
- Malmstrom, K., Pitkaranta, A., Carpen, O., Pelkonen, A., Malmberg, L.P., Turpeinen, M.,
Kajosaari, M., Sarna, S., Lindahl, H., Haahtela, T., Makela, M.J. (2006)
Human rhinovirus in bronchial epithelium of infants with recurrent respiratory symptoms.
J Allergy Clin Immunol **118**, 591-6.
- Matera, M.G., Calzetta, L., Peli, A., Seagliarini, A., Matera, C., Cazzola, M. (2005)
Immune sensitization of equine bronchus: glutathione, IL-1 β expression and
tissue responsiveness.
Respir Res. **6**, 104.

- Marti, E., Gerber, H., Essich, G., Oulehla, J. & Lazary, S. (1991)
The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis.
Equine Vet J **23**, 457-60.
- Martin, J. (2001)
Human asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Int. Workshop
Of Equine Chronic Airway Disease, Michigan State University.
Equine et J **33**, 5-19.
- McGorum, B.C., Dixon, P.M., Halliwell, R.E.W. & Irving, P. (1993a)
Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid
harvested from different segments of the equine lung.
Res Vet Sci **55**, 57-9.
- Minshall, E., Chakir, J., Laviolette, M., Molet, S., Zhu, Z., Olivenstein, R.,
Elias, J.A. & Hamid, Q.A. (2000)
IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and
eosinophils.
J Allergy Clin Immunol **105**, 232-8.
- Murray, M.J., Eichhorn, E.S., Dubovi, E.J., Ley, W.B. & Cavey, D.M. (1996)
Equine herpesvirus type 2: prevalence and seroepidemiology in foals.
Equine Vet J **28**, 432-6.
- Nicholson, K.G., Kent, J. & Ireland, D.C. (1993)
Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults.
BMJ **307**, 982-6.
- Oh, J.W., Lee, H.B., Park, I.K. & Kang, J.Q. (2002)
Interleukin-6, interleukin-8, interleukin-11 and interferon- γ levels in nasopharyngeal aspirates
from wheezing children with respiratory syncytial virus or influenza A virus infection.
Pediatr Allergy Immunol **13**, 350-6.
- Oliver, B.G.G., Johnston, S.L., Baraket, M., Burgess, J.K., King, N.J.C. Roth, M.,
Lim, S., Black, J.L. (2006)
Increased proinflammatory responses from asthmatic human airway smooth muscle cells
in response to rhinovirus infection.
Respir Res. **7**, 71.
- Palfi, V., Belak, S. & Molnar, T. (1978)
Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals, showing respiratory symptoms.
Zbl Vet Med, Reihe B **25**, 165-7.
- Papadopoulos, N.G., Bates, B.J., Bardin, P.G., Papi, A., Leir, S.H., Fraenkel, D.J.,
Meyer, J., Lackie, P.M., Sanderson, G., Holgate, S.T. & Johnston, S.L. (2000)
Rhinoviruses Infect the Lower Airways.
J Inf Dis **181**, 1875-84.
- Park, C.S., Choi, Y.S. & Ki, S.Y. (1998)
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is the main cytokine enhancing survival
of eosinophils in asthmatic airways.
Eur Res J **12**, 872-8.

- Plummer, G. (1962)
An equine respiratory virus with enterovirus properties.
Nature **195**, 519-20.
- Robinson, N., Derksen, F.J., Olszewski, M.A., Buechner-Maxwell, V.A. (1996)
The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses.
Br Vet J **152**, 283-306.
- Robinson, N.E. (2001)
International Workshop on Equine Chronic Airway Disease
Michigan State University 16-18 June 2000.
Equine Vet J **33**, 5-19.
- Romagniani, S. (1990)
Regulation and deregulation of human IgE synthesis.
Immunol Today **11**, 316-21.
- Romanet-Manent, S., Charpin, D., Magnan, A. & Lanteaume, A. (2002)
Allergic vs nonallergic asthma: what makes the difference?
Allergy **57**, 607-13.
- Schlocker, N., Gerber-Bretschner, R. & von Fellenberg, R. (1995)
Equine herpesvirus 2 in pulmonary macrophages of horses.
Am J Vet Res **56**, 749-54.
- Schoon, H.-A. & Deegen, E. (1983)
Histopathologie der chronisch obstruktiven Bronchitis bei klinisch manifest erkrankten Pferden.
Tierärztl Praxis **11**, 213-21.
- Seahorn, T.L. & Beadle, R.E. (1993)
Summer pasture-associated obstructive pulmonary disease in horses: 21 cases (1983-1991).
J Am Vet Med Ass **202**, 779-82.
- Shirakawa, I., Deichmann, K.A., Izuhara Mao I., Adra, C.N. & Hopkin, J.M. (2000)
Atopy and asthma: Genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling.
Immunol Today **21**, 60-4.
- Steck, F., Hofer, B., Schaeren, B., Nicolet, J. & Gerber, H. (1978)
Equine rhinoviruses: new serotypes.
Proceedings of the 4th International Conference on Equine Infectious Diseases, 312-28.
- Steinbach, F., Deeg, C., Mauel, S. & Wagner, B. (2002)
Equine immunology: offspring of the serum horse.
J Immunol **23**, 223-5.
- Studdert, M.J. (1974)
Comparative aspects of equine herpesviruses.
Cornell Vet **64**, 94-122.
- Tan, W.C. (2005)
Viruses in asthma exacerbations.
Curr Opin Pulm Med. **11**, 21-6.

- Trepicchio, W.L. & Bnozzaet, M. (1996)
Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production.
J Immunol **157**, 3627-34.
- Winder, N.C., Grünig, G., Hermann, H. & von Fellenberg, R. (1991)
Comparison of bronchoalveolar lavage and respiratory secretion cytology in horses with histologically diagnosed pulmonary disease.
Schweizer Archiv für Tierheilkunde **133**, 123-30.
- Wolfinger, U. (1998)
Verbreitung und Bedeutung von Infektionen mit equinen Herpesviren vom Typ 1, 2 und 4 (EHV-1,-2 und -4) beim Pferd.
Dissertation FU Berlin.
- Wutz, G., Auer, H., Nowotny, N., Grosse, B., Skern, T. & Kuechler, E. (1996)
Equine rhinovirus serotypes 1 and 2: relationship to each other and to aphthoviruses and cardioviruses.
J General Virol **77**, 1719-30.
- Zheng, T., Zhu, Z., Wang, J., Homer, R.J. & Elias, J.A. (2001)
IL-11: insights in asthma from overexpressing transgenic modeling.
J Allergy Clin Immunol **108**, 489-96.
- Zhu, Z., Lee, C.G., Zheng, T., Chupp, G., Wang, J., Homer, R.J., Noble, P.W., Hamid, Q. & Elias, J.A. (2001)
Airway inflammation and remodeling in asthma. Lessons from interleukin 11 and interleukin 13 transgenic mice.
Am J Res Crit Care Med **164**, 67-70.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser (aqua destillata)
as	Antistrang (antisense)
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD4+	cluster of differentiation 4+
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Zentimeter
COB	chronisch obstruktive Bronchitis
COLD	chronic obstructive lung disease
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
dATP	Desoxy Adenosin-5`-Triphosphat
dCTP	Desoxy Cytidin-5`-Triphosphat
dGTP	Desoxy Guanosin-5`-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitolösung
dTTP	Desoxy Thymidin-5`-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHV	Equines Herpesvirus
ERV	Equines Rhinovirus
evtl.	eventuell
FU	Freie Universität
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
ggrd.	geringgradig
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRV	Humane Rhinovirus
Hz	Hertz

IAD	inflammatory airway disease
ICR	Intercostalraum
IF	Interferon
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
L.p.c.	Lobi pulmonales caudales
L.p.cr.	Lobi pulmonales craniales
M.n.v.	Meatus nasi ventralis
max.	maximal
mg	Milligramm
min.	Minuten
MIP-2	Makrophagen-inflammatorisches Protein 2
ml	Milliliter
mm	Mikrometer
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
nPCR	nested Polymerase-Kettenreaktion
o.b.B.	ohne besonderen Befund
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIV	Parainfluenzavirus
RAO	recurrent airway obstruction
RNA	Ribonukleinsäure
RNasin	Ribonuclease Inhibitor
RSV	Respiratorische Synzytialvirus
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
s	Strang (sense)
SPAOPD	summer pasture associated obstructive pulmonary disease
Tab.	Tabelle
TAE	Tris, Acetat, EDTA-Puffer
TBS	Tracheobronchialsekret
Th	T-Helferzellen
TNF- α	Tumor Nekrosefaktor alpha
u.a.	unter anderem

U/min.	Umdrehung pro Minute
U/ μ l	Units pro Mikroliter
UV	Ultraviolett
Vergr.	Vergößerung
z.B.	zum Beispiel
α	alpha
β	beta
β -ME	14,3 M beta-Mercaptoethanol
μ	mikro
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar

9.2 Untersuchungsergebnisse Probenmaterial

9.2.1 Tab. 12: Befundbogen - klinische Untersuchung

Probennr.: _____ Datum: _____

Rasse: _____ Alter: _____ Geschlecht: _____

Anamnese:

Impfstatus:

Atemfrequenz: _____ / min. Pulsfrequenz: _____ / min rektale Körpertemp.: _____ °C

Nasenausfluss: nein einseitig beidseitig serös seromukös mukös purulent

Husten: spontan nicht auslösbar auslösbar trocken feucht

Lnn. mandibulares: o.b.B. vergrößert schmerzhaft einseitig beidseitig

Ruhedyspnoe: nein ja

Atemtyp: costo-abdominal vermehrt abdominal gemischte Dyspnoe
 ggrd. verlängerte Ausatmung dtl. verlängerte Ausatmung

Lungenperkussion: o.b.B.
 Erweiterung 1 ICR Erweiterung 2 ICR Erweiterung >2ICR
 Dämpfung

Lungenauskultation: o.b.B. verschärft vesikulär Giemen
 Rasseln Knistern

Tracheaaukultation: o.b.B. Rasseln

9.2.2 Tab. 13: Histologische Befunde und histologische Diagnose

ifd Nr.	Meatus nasi ventralis	Trachea	Lobi pulmonales craniales	Lobi pulmonales caudales	Histologische Diagnose
1	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	fokale Atelektasen, Emphyseme, Becherzellhyper + -metaplasie, Muskelzellhypertrophie, Bronchiektasien + Mukos im Lumen, peribronchioläre + peribronchiäre + interstitielle lymphozytäre Infiltrate, tw. eosinophile Granulozyten, tw. Fibrosierung der Gefäßwände	COB
2	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	fokale Atelektasen + Emphyseme, ggnd. Mukos in Bronchien, fokale interstitielle Fibrose	o.b.B.
3	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	fokale Atelektasen + lobuläre Emphyseme, tw. ödematöse Alveolarsepten, Hyperämie, Becherzellhypertrophie, massiv Mukos, Muskelhypertrophie, fokale Fibrose, peribronchioläre z. T. interstitielle Zellinfiltrate mit Lymphozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, hyaline Membranen	COB
4	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	ggnd. Ödematisierung der Alveolarsepten, vereinzelt Bronchiektasien, ggnd. fokale Fibrose, vereinzelt peribronchioläre und epitheliale Infiltrate (neutrophile Granulozyten)	ggnd. fokale chronische Bronchiolitis + Peribronchiolitis o.b.B.

lfd Nr.	Meatus nasi ventralis	Trachea	Lobi pulmonales craniales	Lobi pulmonales caudales	histologische Diagnose
5	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	tw. pleuranah Atelektasen, vereinzelt Emphyseme, vereinzelt Bronchiektasien+Mukos, ggrd. peribronchioläre Infiltrate mit Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, vereinzelt interstitiell eosinophile Granulozyten	passive Hyperämie, vereinzelt Bronchiektasien, tw. bronchioläre Muskelhypertrophie, peribronchioläre lymphozytäre Infiltrate	chronische Peribronchiolitis, beginnende COB
6	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	passive Hyperämie, tw. Bronchiektasien, tw. bronchioläre Muskelhypertrophie, tw. peribronchioläre lymphozytäre Infiltrate	tw. interstitielle Ödematisierung, Hyperämie, Becherzellhyper + -metaplasie, Bronchiektasie + Mukos, peribronchioläre + tw. interstitielle Infiltrate mit Lymphozyten und Plasmazellen	COB
7	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	tw. interstitielle Ödematisierung, Hyperämie, Mukos in Bronchioli, peribronchioläre noduläre lymphozytäre Infiltrate	Becherzellhyperplasie, Mukos, peribronchioläre Infiltrate mit Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten	akute Peribronchiolitis
8	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	massive Emphyseme, straßenförmige Fibrosen, peribronchiale + -bronchioläre + interstitielle Infiltrate mit überwiegend neutrophilen Granulozyten	Ödematisierte Alveolarsepten, Emphyseme, Becherzellhyperplasie + -metaplasie, Bronchiektasien + Mukos, Muskelhypertrophie, straßenförmige Fibrosen, peribronchiale + bronchiale + interstitielle Infiltrate mit Lymphozyten und massiv neutrophilen Granulozyten	COB

lfd Nr.	Meatus nasi ventralis	Trachea	Lobi pulmonales craniales	Lobi pulmonales caudales	histologische Diagnose
9	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	fokal vereinzelt Atelektasen + Emphysem	fokal vereinzelt Atelektasen + Emphysem, vereinzelt peribronchioläre lymphozytäre Infiltrate, tw. Neutrophile Granulozyten, ggrd. interstitielle Fibrose	ggrd. chronische Peribronchiolitis
10	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	massive Atelektasen und Emphysem, interstitielle Ödematisierung, Bronchiektasien, Muskelhypertrophie, massive über alle Lungenstrukturen verteilte Infiltrationen mit Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten	COB im finalen Stadium
11	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	Atelektase, Emphysem, Septen ödematös, passive Hyperämie, Becherzellhypo - + aplasie, straßenförmige Fibrose, fokale interstitielle Infiltration mit neutrophilen Granulozyten	Alveorsepten ödematös, passive Hyperämie, ggrd. peribronchioläre + interstitielle Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten	chronische Peribronchiolitis
12	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	Atelektase + Emphysem, Becherzellmetaplasie, Mukos, Muskelhypertrophie, interstitielle Fibrose, peribronchiale lymphozytäre Infiltration	massive Atelektase + Emphyseme, Becherzellmetaplasie, Bronchiektasie, Mukos mit vielen neutrophilen Granulozyten, fokale pleuranahe und peribronchiale Fibrose, Muskelhypertrophie, peribronchiale lymphozytäre Infiltration	COB

lfd Nr.	Meatus nasi ventralis	Trachea	Lobi pulmonales craniales	Lobi pulmonales caudales	histologische Diagnose
13	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	Atelektase, Emphysem, ggrd. Becherzellhyperplasie, Bronchiektasie+ Mukos, peribronchioläre tw. interstitielle lymphozytäre Infiltration	fokal Atelektase + Emphysem, peribronchioläre noduläre lymphozytäre Infiltration	akute Peribronchiolitis
14	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	Emphysem, tw. intersti. Ödematisierung, ggrd. Hyperämie, Becherzellhyperplasie, zellreicher Mukos, Muskelhypertrophie, peribronchioläre +- bronchioläre + subpleurale Infiltration mit Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen	Emphysem, tw. interstitielle Ödematisierung, Becherzellhyperplasie, Bronchiektasie + zellreichem Mukos, Muskelhypertrophie, massive Fibrose, hyaline Membranen, peribronchioläre + - bronchioläre, interstitielle, perivaskuläre monozytäre Infiltration	COB mit akutem Schub einer Broncho-pneumonie
15	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	Bronchiektasie, Muskelhypertrophie, peribronchioläre + perivaskuläre lymphozytäre Infiltration	ggrd. Emphysem, Becherzellhyperplasie z.T. Metaplasie, massive Bronchiektasie (Bronchospasmus), Muskelhypertrophie, peribronchioläre + -bronchioläre Infiltration mit Lymphozyten + Plasmazellen	COB
16	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	interstitielle Ödematisierung, akute Stauung, Becherzell- +Epithelverlust, intersti. lymphozytäre Infiltration, Gefäßwandödem	akute Stauung mit Gefäßruptur und alveolären + interstitiellen Blutungen, Becherzell- + Epithelverlust, ggrd. peribronchioläre lymphozytäre Infiltration, Gefäßwandödem	Lungenödem, ggrd. katarrhalische Bronchitis + Peribronchitis

lfd Nr.	Meatus nasi ventralis	Trachea	Lobi pulmonales craniales	Lobi pulmonales caudales	histologische Diagnose
17	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	ggrd. Ödematisierung der Alveolarsepten, ggrd. Stauung	Stauung, Ödematisierung der Alveolarsepten, tw. ggrd. Becherzellhyperplasie, tw. ggrd. peribronchioläre lymphozytäre Infiltration	akute Stauung, sonst o.b.B.
18	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	passive Stauung, intraalveolares Ödem	passive Stauung, intraalveolares Ödem	o.b.B.
19	tw. sub - + intraepitheliale Infiltration mit neutrophilen Granulozyten + Lymphozyten	Drüsenhyperplasie, subepitheliale lymphozytäre Infiltration	aktive Hyperämie, ggrd. Becherzellhyperplasie, Bronchiektasie + Mukos, ggrd. interstitielle + peribronchioläre Fibrose, interstitielle + alveoläre + bronchiäre Infiltration mit Lymphozyten und massiv neutrophilen Granulozyten	fokal Atelektase, aktive Hyperämie, Becherzellhyperplasie, Bronchiektasie + Mukos, ausgeprägte interstitielle + peribronchioläre Fibrose, interstitielle + alveoläre + bronchiäre Infiltration mit Lymphozyten + massiv neutrophilen Granulozyten, Gefäßmedienhyperplasie	Rhinitis, Tracheitis, COB + mukopurulente Bronchopneumonie
20	o.b.B.	o.b.B.	passive Hyperämie, Epithelverlust	o.b.B.	o.b.B.
21	nicht bereitgestellt	o.b.B.	ggrd. Emphysem	Emphysem, interstitielles Ödem	o.b.B.
22	nicht bereitgestellt	ggrd. subepitheliale monozytäre Infiltration, vermehrt Mukos	Atelektase, Emphysem, interstitielles Ödem, Hyperämie, Becherzellhyperplasie, Bronchiektasie + Mukos, Muskelhypertrophie, peribronchioläre Fibrose, peribronchioläre monozytäre Infiltration	Atelektase, Emphysem, interstitielles Ödem, Hyperämie, Becherzellhyperplasie, Bronchiektasie + Mukos, Muskelhypertrophie, peribronchioläre Fibrose, peribronchioläre monozytäre Infiltration	chronische Tracheitis, COB

lfd Nr.	Meatus nasi ventralis	Trachea	Lobi pulmonales craniales	Lobi pulmonales caudales	histologische Diagnose
23	nicht bereitgestellt	tw. hyperplastisches Epithel, sonst o.b.B.	Atelektase, Emphysem, tw. interstitielles Ödem, Muskelhypertrophie, Becherzellhyperplasie, Mukos, Septenfibrose, z.T. peribronchioläre + perivaskuläre Infiltration mit Plasmazellen + Lymphozyten + Makrophagen	Atelektase, Emphysem, Becherzellhyperplasie, Bronchiektasie + Mukos, Septenfibrose, peribronchioläre Infiltration mit Plasmazellen + Lymphozyten + Makrophagen	COB
24	nicht bereitgestellt	Flimmerepithelverlust	Atelektase, Emphysem, interstitielles Ödem, Hyperämie, Bronchiektasie+ Mukos, Muskelhypertrophie, interstitielle Fibrose, massive peribronchioläre + bronchiäre monozytäre Infiltration, Pneumozyten Typ II – Hyperplasie	Atelektase, Emphysem, interstitielles Ödem, Hyperämie, Bronchiektasie + Mukos, Muskelhypertrophie, interstitielle Fibrose, massive peribronchioläre + bronchiäre monozytäre Infiltration, Pneumozyten Typ II – Hyperplasie	COB
25	o.b.B.	o.b.B.	Emphysem, interstitielles Ödem, Hyperämie	Atelektase, interstitielles Ödem, Hyperämie, alveolare Blutungen, massive interstitielle Infiltration mit Bakterien + neutrophilen Granulozyten, Makrophagen	interstitielle Pneumonie im Zusammenhang mit einer Septikämie
26	nicht bereitgestellt	Epithelzellhypertrophie + -metaplasie	Emphysem, interstitielle Fibrose, peribronchiäre + z.T. interstitielle + perivaskuläre Infiltration mit Monozyten	Emphysem, Mukos, interstitielle Fibrose, peribronchiäre + interstitielle monozytäre Infiltration	chronische Peribronchitis

lfd Nr.	Meatus nasi ventralis	Trachea	Lobi pulmonales craniales	Lobi pulmonales caudales	histologische Diagnose
27	o.b.B.	o.b.B.	z.T. alveoläres Ödem, passive Hyperämie, Becherzell-desquamation Mukos, straßenförmige Fibrose, ggrd. interstitielle monozytäre Infiltration	passive Hyperämie, Becherzell-desquamation, ggrd. interstitielle monozytäre Infiltration	ggrd. interstitielle Pneumonie
28	nicht bereitgestellt	o.b.B.	Atelektase, Emphysem, alveolares Ödem, Becherzellhypoplasie, peribronchiäre Fibrose, peribronchioläre monozytäre Infiltration	Atelektase, alveoläres Ödem, passive Hyperämie, Becherzellhypoplasie, subpleurale straßenförmige Fibrose, ggrd. peribronchioläre + perivaskuläre Infiltration mit Lymphozyten + Plasmazellen	ggrd. chronische Peribronchiolitis, Pleurafibrose
29	nicht bereitgestellt	tw. subepitheliale lymphozytäre Infiltration	Atelektase, Hyperämie, alveoläres Ödem	Hyperämie, vereinzelt peribronchioläre lymphozytäre Infiltration	subakute Tracheitis, Stauung, akutes Ödem
30	nicht bereitgestellt	mittel – hochgradige Infiltration mit Lymphozyten + Plasmazellen und einzelnen eosinophilen Granulozyten	Atelektase, Hyperämie, ggrd. Becherzellhyperplasie, Bronchiektasie + Mukos, Muskelhypertrophie, ggrd. interstitielle Fibrose, peribronchioläre + bronchiäre + tw. perivaskuläre Infiltration mit Lymphozyten + Plasmazellen	Atelektase, Hyperämie, ggrd. Becherzellhyperplasie, Bronchiektasie + Mukos, Muskelhypertrophie, ggrd. interstitielle Fibrose, peribronchioläre + bronchiäre + tw. perivaskuläre Infiltration mit Lymphozyten + Plasmazellen	chronische Tracheitis, COB

lfd Nr.	Meatus nasi ventralis	Trachea	Lobi pulmonales craniales	Lobi pulmonales caudales	histologische Diagnose
31	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	Atelektase, Emphysem, interstitielles Ödem, Becherzellhyperplasie + -metaplasie, Bronchiektasie + Mukos, strausenförmige Fibrose, peribronchioläre Mukos, strausenförmige Fibrose, peribronchioläre +- bronchiäre Infiltration mit Granulozyten, Pneumozyten Typ II - Hyperplasie	Atelektase, Emphysem, interstitielles Ödem, Becherzellhyperplasie + -metaplasie, Bronchiektasie + Mukos, strausenförmige Fibrose, peribronchioläre +-bronchiäre Infiltration mit Granulozyten, Pneumozyten Typ II – Hyperplasie	COB
32	nicht bereitgestellt	Epithelhyperplasie	nicht bereitgestellt	Atelektase, passive Hyperämie	o.b.B.
33	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	passive Hyperämie, tw. interstitielle monozytäre Infiltration	nicht bereitgestellt	o.b.B.
34	nicht bereitgestellt	Epithelhyperplasie	Atelektase, Hyperämie, Becherzellhyperplasie, Mukos, peribronchioläre + bronchioläre monozytäre Infiltration	Atelektase, Hyperämie, Becherzellhyperplasie, Mukos, peribronchioläre + bronchioläre monozytäre Infiltration	ggrd. subakute Bronchiolitis + Peribronchiolitis
35	nicht bereitgestellt	nicht bereitgestellt	Atelektase, vereinzelt nodulär peribronchioläre lymphozytäre Infiltration	nicht bereitgestellt	o.b.B.
36	nicht bereitgestellt	ggrd. subepitheliale Infiltration mit Lymphozyten + Plasmazellen	vereinzelt nodulär peribronchioläre monozytäre Infiltration	Hyperämie	subakute Tracheitis, sonst o.b.B.

9.2.3 Tab. 14: Ergebnisse aus der DNA-Präparation, pro Ansatz wurden 25 mg Gewebe eingesetzt

Proband-Nr.	Lokalisation	µg DNA/ml	260/280	Proband-Nr.	Lokalisation	µg DNA/ml	260/280
1	L.p.c.	60,1	1,77	22	Trachea	130,9	1,63
2	L.p.c.	58,0	1,58	22	L.p.cr.	144,5	1,34
3	L.p.c.	42,4	1,47	22	L.p.c.	130,2	1,35
4	L.p.c.	59,5	1,53	23	Trachea	41,6	1,48
5	L.p.cr.	77,6	1,58	23	L.p.cr.	99,0	1,34
5	L.p.c.	44,4	1,52	23	L.p.c.	72,4	1,62
6	L.p.cr.	66,5	1,36	24	Trachea	129,3	1,49
6	L.p.c.	56,7	1,39	24	L.p.cr.	172,7	1,58
7	L.p.cr.	65,2	1,47	24	L.p.c.	116,6	1,59
7	L.p.c.	51,3	1,51	25	M.n.v.	130,4	1,46
8	L.p.cr.	79,0	1,69	25	Trachea	144,9	1,46
8	L.p.c.	73,7	1,92	25	L.p.cr.	114,4	1,57
9	L.p.cr.	63,2	1,40	25	L.p.c.	95,2	1,70
9	L.p.c.	58,0	1,55	26	Trachea	126,9	1,48
10	L.p.cr.	127,7	1,51	26	L.p.cr.	62,3	1,62
10	L.p.c.	79,7	1,46	26	L.p.c.	49,6	1,60
11	L.p.cr.	96,2	1,42	27	M.n.v.	212,5	1,59
11	L.p.c.	76,6	1,37	27	Trachea	148,5	1,41
12	L.p.cr.	65,3	1,67	27	L.p.cr.	96,7	1,51
12	L.p.c.	47,4	1,83	27	L.p.c.	77,6	1,69
13	L.p.cr.	107,7	1,46	28	Trachea	121,7	1,36
13	L.p.c.	121,8	1,42	28	L.p.cr.	104,8	1,53
14	L.p.cr.	58,6	1,64	28	L.p.c.	77,2	1,44
14	L.p.c.	52,3	1,67	29	Trachea	165,9	1,17
15	L.p.cr.	87,1	1,36	29	L.p.cr.	35,8	1,45
15	L.p.c.	53,2	1,70	29	L.p.c.	23,4	1,73
16	L.p.cr.	85,4	1,28	30	Trachea	55,4	1,60
16	L.p.c.	92,8	1,32	30	L.p.cr.	56,1	1,64
17	L.p.cr.	72,1	1,47	30	L.p.c.	43,4	1,78
17	L.p.c.	85,7	1,52	31	L.p.cr.	50,9	1,62
18	L.p.cr.	107,9	1,36	31	L.p.c.	76,7	1,38
18	L.p.c.	85,5	1,36	32	Trachea	60,3	1,80
19	M.n.v.	157,4	1,76	32	L.p.c.	75,7	1,37
19	Trachea	131,1	1,47	33	L.p.cr.	75,3	1,40
19	L.p.cr.	119,2	1,41	34	Trachea	65,6	1,48
19	L.p.c.	117,7	1,41	34	L.p.cr.	57,3	1,61
20	M.n.v.	164,7	1,74	34	L.p.c.	141,6	1,29
20	Trachea	97,5	1,59	35	L.p.cr.	49,0	1,38
20	L.p.cr.	96,0	1,70	36	Trachea	87,1	1,41
20	L.p.c.	39,2	1,52	36	L.p.cr.	76,0	1,39
21	Trachea	167,1	1,67	36	L.p.c.	88,8	1,39
21	L.p.cr.	97,6	1,44				
21	L.p.c.	95,8	1,44				

9.2.4 Tab. 15: Ergebnisse aus der RNA-Präparation, pro Ansatz wurden 30 mg Gewebe eingesetzt.

Proband-Nr.	Lokalisation	µg RNA/ml	260/280	Proband-Nr.	Lokalisation	µg RNA/ml	260/280
1	L.p.c.	367,5	1,98	22	Trachea	133,6	1,75
2	L.p.c.	327,0	2,03	22	L.p.cr.	443,2	2,05
3	L.p.c.	239,3	1,96	22	L.p.c.	537,4	2,06
4	L.p.c.	472,2	1,97	23	Trachea	106,6	1,86
5	L.p.cr.	397,5	2,00	23	L.p.cr.	359,2	2,04
5	L.p.c.	267,0	1,90	23	L.p.c.	147,1	1,97
6	L.p.cr.	280,7	1,97	24	Trachea	282,6	1,88
6	L.p.c.	427,1	1,97	24	L.p.cr.	307,6	1,86
7	L.p.cr.	456,7	1,97	24	L.p.c.	402,4	1,98
7	L.p.c.	308,1	1,98	25	M.n.v.	603,3	1,83
8	L.p.cr.	434,3	1,94	25	Trachea	214,4	1,70
8	L.p.c.	555,3	1,95	25	L.p.cr.	861,6	1,92
9	L.p.cr.	302,0	1,53	25	L.p.c.	714,2	1,96
9	L.p.c.	360,1	1,95	26	Trachea	304,0	1,63
10	L.p.cr.	307,4	1,86	26	L.p.cr.	211,5	1,59
10	L.p.c.	395,2	1,86	26	L.p.c.	91,8	1,60
11	L.p.cr.	213,9	1,79	27	M.n.v.	557,1	1,94
11	L.p.c.	111,2	2,04	27	Trachea	195,9	1,93
12	L.p.cr.	401,7	2,00	27	L.p.cr.	208,0	1,99
12	L.p.c.	389,7	1,98	27	L.p.c.	93,1	1,89
13	L.p.cr.	183,2	1,73	28	Trachea	158,2	1,71
13	L.p.c.	391,9	1,89	28	L.p.cr.	261,9	1,80
14	L.p.cr.	476,5	1,86	28	L.p.c.	226,7	1,80
14	L.p.c.	332,8	1,80	29	Trachea	105,3	1,25
15	L.p.cr.	293,5	1,80	29	L.p.cr.	249,0	1,60
15	L.p.c.	267,6	1,76	29	L.p.c.	91,5	1,58
16	L.p.cr.	233,0	1,91	30	Trachea	310,5	1,88
16	L.p.c.	205,7	1,73	30	L.p.cr.	303,8	1,86
17	L.p.cr.	83,0	1,59	30	L.p.c.	267,0	1,90
17	L.p.c.	210,2	1,80	31	L.p.cr.	87,1	1,56
18	L.p.cr.	183,9	1,50	31	L.p.c.	77,2	1,97
18	L.p.c.	159,5	1,72	32	Trachea	364,0	1,56
19	M.n.v.	446,9	1,93	32	L.p.c.	427,8	2,01
19	Trachea	213,7	1,87	33	L.p.cr.	452,3	2,03
19	L.p.cr.	567,5	2,02	34	Trachea	216,4	1,63
19	L.p.c.	317,5	1,96	34	L.p.cr.	238,3	1,70
20	M.n.v.	409,3	1,87	34	L.p.c.	459,3	1,85
20	Trachea	271,1	1,81	35	L.p.cr.	500,00	1,99
20	L.p.cr.	624,6	1,46	36	Trachea	402,2	1,97
20	L.p.c.	473,2	1,92	36	L.p.cr.	641,5	1,75
21	Trachea	100,8	2,17	36	L.p.c.	497,4	1,78
21	L.p.cr.	423,4	2,06				
21	L.p.c.	262,9	2,07				

9.2.5 Tab. 16: PCR-Ergebnisse – ein Überblick

Pferd Ifd.-Nr.	Gesamtdiagnose	Proben- lokalisation	EHV-2	IL- 4	IL- 10	IL- 11	IFN- γ
1	COB	L.p.c.	—	+	+	—	+
2	gesund	L.p.c.	—	+	+	—	—
3	COB	L.p.c.	—	+	+	—	+
4	gesund	L.p.c.	—	+	+	—	+
5	COB	L.p.cr. L.p.c.	+ +	+ +	+ +	— —	+ +
6	COB	L.p.cr. L.p.c.	— +	+ +	+ +	— —	+ +
7	akute Peribronchiolitis	L.p.cr. L.p.c.	+ —	+ +	+ +	+ —	— —
8	COB	L.p.cr. L.p.c.	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
9	chronische Peribronchitis	L.p.cr. L.p.c.	— —	— +	+ +	+ +	— +
10	COB	L.p.cr. L.p.c.	— —	+ +	+ +	+ —	+ +
11	chronische Peribronchiolitis	L.p.cr. L.p.c.	+ +	+ +	+ +	— —	— —
12	COB	L.p.cr. L.p.c.	— +	+ +	+ +	+ +	+ +
13	akute Peribronchiolitis	L.p.cr. L.p.c.	+ +	+ +	+ +	— —	— +
14	akute Bronchopneumonie u. COB	L.p.cr. L.p.c.	+ +	+ +	+ +	— —	+ +
15	COB	L.p.cr. L.p.c.	+ +	+ +	+ +	— —	+ —
16	katarrhalische Bronchitis u. Peribronchitis	L.p.cr. L.p.c.	+ +	+ +	+ —	— +	+ +
17	gesund	L.p.cr. L.p.c.	— —	+ +	+ +	+ +	— —
18	gesund	L.p.cr. L.p.c.	— —	+ —	+ +	+ —	— —

Pferd Ifd.-Nr.	Gesamtdiagnose	Proben- lokalisation	EHV-2	IL-4	IL-10	IL-11	IFN- γ
19	chron. purulente Rhinotracheitis, mukopurulente Bronchopneumonie, COB	M.n.v. Trachea L.p.cr. L.p.c.	+ — + —	+ + + +	+ + + +	— — — —	— — — —
20	gesund	M.n.v. Trachea L.p.cr. L.p.c.	+ — + —	— + + +	+ + + +	+ — — —	— — — —
21	gesund	Trachea L.p.cr. L.p.c.	+ + —	— + +	+ + +	— + +	— — —
22	COB	Trachea L.p.cr. L.p.c.	+ — +	+ + +	+ + +	— + +	— — —
23	COB	Trachea L.p.cr. L.p.c.	— — +	+ + +	+ + +	— + —	— + +
24	COB	Trachea L.p.cr. L.p.c.	— + —	— + +	+ + +	+ + +	+ — —
25	interstitielle Pneumonie	M.n.v. Trachea L.p.cr. L.p.c.	— — — —	+ + + +	+ + + +	+ + + +	— — — —
26	chronische Peribronchitis	Trachea L.p.cr. L.p.c.	+ — +	+ + +	+ + +	+ — —	— — —
27	interstitielle Pneumonie	M.n.v. Trachea L.p.cr. L.p.c.	+ + — +	+ + + +	+ + + +	+ + — —	+ — + +
28	chronische Peribronchiolitis	Trachea L.p.cr. L.p.c.	+ — +	+ + +	+ + +	+ — —	+ + +
29	gesund	Trachea L.p.cr. L.p.c.	— — —	+ + +	+ + +	+ + +	— + +

Pferd Ifd.-Nr.	Gesamtdiagnose	Proben- lokalisation	EHV-2	IL-4	IL-10	IL-11	IFN- γ
30	COB	Trachea	—	+	+	—	—
		L.p.cr.	+	+	+	+	+
		L.p.c.	—	+	+	+	+
31	COB	L.p.cr.	—	+	—	—	—
		L.p.c.	—	+	+	—	+
32	gesund	Trachea	—	+	+	—	—
		L.p.c.	—	+	+	+	+
33	gesund	L.p.cr.	—	+	—	—	—
34	subakute Bronchiolitis u. Peribronhiolitis	Trachea	—	+	+	+	+
		L.p.cr.	—	+	+	+	+
		L.p.c.	—	+	—	—	—
35	gesund	L.p.cr.	—	+	—	—	—
36	subakute Tracheitis	Trachea	—	+	—	—	—
		L.p.cr.	—	+	+	—	—
		L.p.c.	—	+	+	—	—

M.n.v. = Meatus nasi ventralis; L.p.cr. = Lobi pulmonales craniales;

L.p.c. = Lobi pulmonales caudales;

— = negativ, keine mRNA nachweisbar; + = positiv, mRNA nachweisbar;

9.2.6 Tab. 17: Ergebnistabellen – nach histologischen Diagnosen sortiert

15 x COPD

Proband Ifd. Nr.	Lokalisation	EHV-2	IL – 4	IL – 10	IL – 11	IFN – γ
1	L.p.c.	—	+	+	—	+
3	L.p.c.	—	+	+	—	+
5	L.p.cr.	—	+	+	—	+
	L.p.c.	+	+	+	—	+
6	L.p.cr.	—	+	+	—	+
	L.p.c.	+	+	+	—	+
8	L.p.cr.	+	+	+	+	+
	L.p.c.	+	+	+	+	+
10	L.p.cr.	—	+	+	+	+
	L.p.c.	—	+	+	—	+
12	L.p.cr.	—	+	+	+	+
	L.p.c.	+	+	+	+	+
14	L.p.cr.	+	+	+	—	+
	L.p.c.	+	+	+	—	+
15	L.p.cr.	+	+	+	—	+
	L.p.c.	+	+	+	—	—
19	M.n.v.	+	+	+	—	—
	Trachea	—	+	+	—	—
	L.p.cr.	+	+	+	—	—
	L.p.c.	—	+	+	—	—
22	Trachea	+	+	+	—	—
	L.p.cr.	—	+	+	+	—
	L.p.c.	+	+	+	+	—
23	Trachea	—	+	+	—	—
	L.p.cr.	—	+	+	+	+
	L.p.c.	+	+	+	—	+
24	Trachea	—	—	+	+	+
	L.p.cr.	+	+	+	+	—
	L.p.c.	—	+	+	+	—
30	Trachea	—	+	+	—	—
	L.p.cr.	+	+	+	+	+
	L.p.c.	—	+	+	+	+
31	L.p.cr.	—	+	—	—	—
	L.p.c.	—	+	+	—	+

8 x Peribronchiolitis / Bronchiolitis / Peribronchitis / Bronchitis

Proband Ifd. Nr.	Lokalisation	EHV – 2	IL – 4	IL – 10	IL – 11	IFN – γ
7, akut	L.p.cr.	—	+	+	+	—
	L.p.c.	—	+	+	—	—
9, chron.	L.p.cr.	—	—	+	+	—
	L.p.c.	—	+	+	+	+
11, chron.	L.p.cr.	+	+	+	—	—
	L.p.c.	+	+	+	—	—
13, akut	L.p.cr.	+	+	+	—	—
	L.p.c.	+	+	+	—	+
16, akut	L.p.cr.	+	+	+	—	+
	L.p.c.	+	+	—	+	+
26, chron.	Trachea	+	+	+	+	—
	L.p.cr.	—	+	+	—	—
	L.p.c.	+	+	+	—	—
28, chron.	Trachea	+	+	+	+	+
	L.p.cr.	+	+	+	—	+
	L.p.c.	+	+	+	—	+
34, subakut	Trachea	—	+	+	+	+
	L.p.cr.	—	+	+	+	+
	L.p.c.	—	+	—	—	—

3 x sonstiges ; Pneumonie, subakute Tracheitis

Proband Ifd. Nr., Diagnose	Lokalisation	EHV – 2	IL – 4	IL – 10	IL – 11	IFN - γ
25, interst. Pneu- monie	M.n.v.	—	+	+	+	—
	Trachea	—	+	+	+	—
	L.p.cr.	—	+	+	+	—
	L.p.c.	—	+	+	+	—
27, interst. Pneu- monie	M.n.v.	+	+	+	+	+
	Trachea	+	+	+	+	—
	L.p.cr.	—	+	+	—	+
	L.p.c.	+	+	+	—	+
36, sub- akute Tracheitis	Trachea	—	+	—	—	—
	L.p.cr.	—	+	+	—	—
	L.p.c.	—	+	+	—	—

10 x ohne besonderen Befund bzw. gesund

Proband Ifd. Nr.	Lokalisation	EHV – 2	IL – 4	IL – 10	IL – 11	IFN – γ
2	L.p.c.	—	+	+	—	—
4	L.p.c.	—	+	+	—	+
17	L.p.cr.	—	+	+	+	—
	L.p.c.	—	+	+	+	—
18	L.p.cr.	—	+	+	+	—
	L.p.c.	—	—	+	—	—
20	M.n.v.	+	—	+	+	—
	Trachea	—	+	+	—	—
	L.p.cr.	+	+	+	—	—
	L.p.c.	—	+	+	—	—
21	Trachea	+	—	+	—	—
	L.p.cr.	+	+	+	+	—
	L.p.c.	—	+	+	+	—
29	Trachea	—	+	+	+	—
	L.p.cr.	—	+	+	+	+
	L.p.c.	—	+	+	+	+
32	Trachea	—	+	+	—	—
	L.p.c.	—	+	+	+	+
33	L.p.cr.	—	+	—	—	—
35	L.p.cr.	—	+	—	—	—

9.3 Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Roland Rudolph, Institut für Veterinär-Pathologie FU Berlin danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung während der Durchführung meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Uta Wolfinger, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und insbesondere durch kritische Anmerkungen und Diskussionen damit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Pferdeimmunologie, insbesondere Herrn Dr. Falko Steinbach, danke ich für die nützlichen Anregungen und die Bereitstellung von Ergebnissen aus früheren Untersuchungen. Frau Dr. Susanne Mauel sei für die Anfertigung und Überlassung von Positivkontrollen für die PCR gedankt.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Mitarbeitern der Veterinär-Pathologie, die meine Arbeit durch die Gewinnung, Anfertigung und Färbung histologischer Schnitte unterstützt haben.

Bei Prof. Dr. P.S. Glatzel möchte ich mich für die Möglichkeit der Nutzung von Laborräumen und Geräten in der Tierklinik für Fortpflanzung, FU Berlin, FB Veterinärmedizin bedanken.

Herrn Mario Walter und den Angestellten des Schlachthofes Genthin möchte ich für die Bereitstellung von Probenmaterial danken.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mich immer in all meinen Entscheidungen unterstützt haben, meinem Bruder Thomas Räthel, der mich in so mancher Computernot gerettet hat, sowie meinem Lebensgefährten Lasisi Lanini und meiner Freundin Anja Becker, die mich immer wieder ermuntert haben und mit viel Geduld an die Vollendung dieser Arbeit geglaubt haben und ohne sie es auch nicht möglich gewesen wäre.

9.4 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenrechtlichen Gründen
in der Online-Version der Arbeit gelöscht.

9.5 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Wingst, den 29.06.07