

# Nachweishäufigkeit von Equinen Herpesviren 2 und 5 am Pferdeauge – Vergleich der Nachweismöglichkeiten mittels exfoliativer Zytologie und Polymerasekettenreaktion

Eva Maria Krüdwagen<sup>1</sup>, H.-J. Balzer<sup>2</sup> und S. J. Kellner<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Tierklinik Binger Wald, Waldalgesheim; <sup>2</sup> Institut für klinische Prüfung Vet Med Labor, Ludwigsburg; <sup>3</sup> Kleintier- und Augenpraxis Dr. Kellner, Frauenfeld, Schweiz

## Zusammenfassung

Bei 15 Pferden mit einer Keratokonjunktivitis oder einer Konjunktivitis und bei 15 augengesunden Pferden wurde in Augentupfern eine Polymerasekettenreaktion (nPCR) zur Untersuchung auf das equine Herpesvirus 2 (EHV2) und das equine Herpesvirus 5 (EHV5) und außerdem eine exfoliative Zytologie zur Untersuchung auf das Vorkommen von intranukleären Einschlusskörperchen durchgeführt. In der Gruppe der erkrankten Pferde waren 3 (20%) EHV2, 4 (28,6%) EHV5 und 4 (26,7%) Einschlusskörperchen positiv, während es in der Kontrollgruppe 1 (6,7%), 5 (41,7%) und 2 (13,3%) waren. Dies stellt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Häufigkeit des Vorkommens von EHV2 und EHV5 und von Einschlusskörperchen zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der erkrankten Pferde dar. Auch war keine Korrelation zwischen dem Nachweis von EHV2 und EHV5 und dem Vorkommen von Einschlusskörperchen feststellbar.

**Schlüsselwörter:** Pferd, Auge, Keratokonjunktivitis, Konjunktivitis, Equines Herpesvirus 2 (EHV2), Equines Herpesvirus 5 (EHV5), Einschlusskörperchen, Polymerasekettenreaktion (nPCR)

## Prevalence of EHV2- and EHV5-DNA in horses showing keratoconjunctivitis or conjunctivitis – comparing test results obtained by cytology and nested polymerase chain reaction (nPCR)

In 15 horses showing a keratoconjunctivitis or conjunctivitis and in 15 horses with no ocular disease ocular swabs were tested by means of a nested polymerase chain reaction (nPCR) for the presence of equine herpesvirus 2 (EHV2) and equine herpesvirus 5 (EHV5). Besides, a cytology of conjunctival or corneal scrapings was performed to search for intranuclear inclusion bodies. In the group of horses with ocular disease 3 (20%) were positive for EHV2, 4 (28,6%) for EHV5 and 4 (26,7%) showed intranuclear inclusion bodies. In the control group there were 1 (6,7%) positive for EHV2 and 5 (41,7%) positive for EHV5, while 2 (13,3%) showed intranuclear inclusion bodies. The frequency distribution between the two groups did not differ significantly. No correlation could be found between the results obtained with the nPCR and the presence of intranuclear inclusion bodies.

**Keywords:** Horse, Eye, Keratoconjunctivitis, Conjunctivitis, Equine herpesvirus 2 (EHV2), Equine herpesvirus 5 (EHV5), Inclusion bodies, Polymerase chain reaction (nPCR)

## Einleitung

Die Bedeutung von Herpesvirusinfektionen am Auge des Pferdes wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Während bei anderen Spezies das Vorkommen einer Herpesviruskeratitis als gesichert angesehen wird (Mensch: Herpes corneae simplex, Katze: Feline Rhinotracheitis, Rind: Infektiöse Bovine Rhinotracheitis, Schwein: Aujeszky'sche Krankheit), wird dies beim Pferd nur durch einige Autoren beschrieben.

Am Pferdeauge sollen durch Herpesviren verschiedene Krankheitsbilder ausgelöst werden. In den meisten Fällen wird der Infektion mit Herpesviren das klinische Bild einer Keratokonjunktivitis superficialis in verschiedenen Formen zugeordnet: Keratitis punctata superficialis, ulzerative Keratitis und Keratitis maculosa (Thein 1976, Thein und Böhm 1976, Thein 1978, Matthews und Handscombe 1983, Kellner 1990, Miller et al. 1990, Collinson et al. 1994, Barnett et al. 1995, van Oppen 2000). Auch werden unterschiedliche Herpesvirus-Typen als auslösende Ursache beschrieben. Während in einigen Fällen das equine Herpesvirus 1 (EHV1) isoliert werden konnte (Riis 1981), wiesen die meisten Untersucher (Thein 1976, Thein und Böhm 1976, Thein 1978, Matthews und Handscombe 1983, Miller et al. 1990, Collinson et al. 1994,

van Oppen 2000) das equine Herpesvirus 2 (EHV2) nach. Allerdings wurde auch die Isolation des equinen Herpesvirus 3 (EHV3) bei einem Fohlen mit Uveitis beschrieben (Cullinane et al. 1994). Im Gegensatz dazu kann dem equinen Herpesvirus 5 (EHV5), welches zusammen mit dem verwandten EHV2 der Gruppe der  $\gamma$ -Herpesviren angehört, noch kein Krankheitsbild zugeordnet werden (Agius et al. 1992, Telford et al. 1993, Agius et al. 1994, Reubel et al. 1995, Browning und Agius 1996, Borchers et al. 1999).

Der Nachweis der Herpesviren kann auf verschiedene Arten erfolgen: Die Virusisolierung durch Anzüchtung in der Zellkultur weist in den meisten Fällen nach 12–16tägiger Inkubation zytopathische Erscheinungen mit Bildung nukleärer Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry A auf (Thein 1976, Thein und Böhm 1976, Thein 1978, Miller et al. 1990, Rolle und Mayr 1993, Collinson et al. 1994, Browning und Agius 1996). Auch der indirekte Nachweis über die serologische Untersuchung mit Bestimmung des Antikörpertiters im Blut wird häufig durchgeführt (Thein 1976, Thein und Böhm 1976, Thein 1978, Borchers et al. 1997, Borchers et al. 1999).

Der neuerdings zur Verfügung stehende Nested-Polymerase-Kettenreaktion-Test (nPCR) für das EHV2 und EHV5 erlaubt einen 1000fach sensitiveren Nachweis im Vergleich zur Virusisolierung in der Zellkultur (Reubel et al. 1995). Im Gegensatz dazu stellt der Nachweis von typischen nukleären Einschluss-körperchen in von Herpesvirus befallenen Zellen im Ausstrichpräparat nur ein indirektes Verfahren dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei Pferden mit Keratokonjunktividen in unserem Patientengut die ätiologische Diagnose einer möglichen Herpesvirusinfektion mittels exfoliativer Zytologie an Abstrichen mit denen durch den nPCR-Nachweis von EHV2 und EHV5 zu vergleichen.

## Material und Methode

Zur Untersuchung standen Patienten aus dem Patientengut unserer Klinik im Zeitraum von April bis Dezember 2000 zur Verfügung. Die Probenentnahme erfolgte an 15 klinisch kranken Pferden (Gruppe 1) und an 15 klinisch gesunden Pferden als Kontrollgruppe (Gruppe 2). In die Gruppe der erkrankten Pferde wurden Pferde mit folgender klinischer Diagnose geordnet: Zum einen Pferde mit rezidivierender, therapieresistenter seromuköser Konjunktivitis, zum anderen Pferde mit einer Keratokonjunktivitis superficialis, welche entweder der von Barnett et al. 1995 beschriebenen Keratitis punctata superficialis oder der Keratitis maculosa ähnelten (Abbildung 1). Die klinischen Sym-

ptome sind in Tabelle 1 dargestellt. Die 15 Pferde waren zwischen 4 und 19 Jahre alt (Durchschnitt 10,5 Jahre), gehörten verschiedenen Rassen an (93% Warmblüter) und kamen aus verschiedenen Beständen.

Die 15 Pferde in der Kontrollgruppe waren bei der ophthalmoskopischen Untersuchung ohne krankhafte Befunde. Sie waren zwischen 2 und 23 Jahren alt (Durchschnitt 11,3 Jahre) und gehörten verschiedenen Beständen und Rassen (100% Warmblüter) an.

Die Pferde wurden einer klinischen Allgemeinuntersuchung, einer kurzen neurologischen Untersuchung der Kopfnerven und einer anschließenden ophthalmoskopischen Untersuchung unterzogen. Die Probenentnahme erfolgte entweder am sedierten oder mit einer Nasenbremse fixierten Pferd. Nach Einträufeln des Lokalanästhetikums Oxybuprocainhydrochlorid (Benoxinat SE Thilo<sup>®</sup>, Dr. Thilo GmbH, Freiburg) wurde mindestens 3 Minuten bis zum Wirkungseintritt gewartet. Mittels eines sterilen Tupfers wurden entweder aus dem Bereich des ventralen Konjunktivalsackes oder von dem betroffenen Korneabereich Abstriche für die nPCR entnommen. Die Tupfer wurden in sterile Röhrchen (Venoject blood collection tubes, Fa. Terumo, Belgien) verpackt und kühl (unter 9 Grad Celsius) versandt. Für die zytologische Diagnostik wurden an denselben Stellen mit Abstrichbürsten (Cyto-Brush, Fa. Santop, Wiesbaden) Material entnommen, auf Objektträgern abgerollt, luftgetrocknet und in diesem Zustand versandt.

Die Untersuchung der zytologischen Präparate wurde von Dr. med. vet. S. J. Kellner, Frauenfeld, Schweiz, durchgeführt. Die

**Tab. 1:** Darstellung der klinischen Symptome bei den erkrankten Pferden (Gruppe 1)

*Clinical signs in the group of horses with ocular disease (group 1)*

Nr.	Klinische Diagnose	Lokalisation	Rezidiv	Abwehr-trias	Fluoreszein-Probe	Hornhaut-trübung	Oberflächliche Gefäßeinsprossung	Epitheliale Bläschen
1	Keratokonjunktivitis beidseitig	ventrotemporal	+	+	-	+	+	-
2	Keratokonjunktivitis einseitig	dorsotemporal	+	+	-	+	+	+
3	Keratokonjunktivitis einseitig	dorsotemporal	+	+	-	+	+	+
4	Keratokonjunktivitis beidseitig	ventrotemporal	+	+	-	+	+	+
5	Keratokonjunktivitis einseitig	ventrotemporal	+	+	-	+	-	-
6	Keratokonjunktivitis einseitig	ventrotemporal	-	+	-	+	-	-
7	Keratokonjunktivitis einseitig	ventrotemporal	+	+	-	+	+	-
8	Keratokonjunktivitis einseitig	dorsal	+	+	-	+	+	-
9	Konjunktivitis beidseitig		+	+				
10	Konjunktivitis beidseitig		+	+				
11	Konjunktivitis beidseitig		+	+				
12	Konjunktivitis einseitig		+	+				
13	Konjunktivitis beidseitig		+	+				
14	Konjunktivitis beidseitig		+	+				
15	Konjunktivitis beidseitig		+	+				

Ausstriche wurden nach Giemsa gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Dabei wurde besonders auf das Vorhandensein von intranukleären Einschlusskörperchen und auf die Häufigkeit des Auftretens von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten



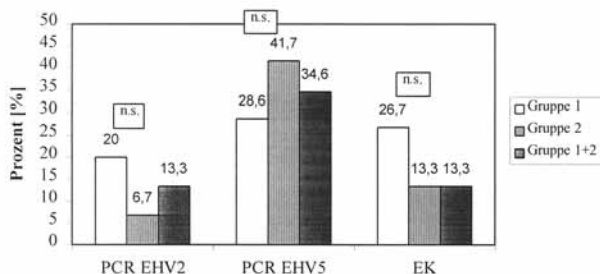
**Abb. 1:** Hornhautveränderungen bei Patient Nr. 1.  
*Corneal alterations in horse No.1*

geachtet. Die Häufigkeit wurde semiquantitativ in die Gruppen „keine“, „wenig“, „viele“ und „sehr viele“ eingestuft. Die Untersuchung auf das Equine Herpesvirus 2 und 5 mittels Polymerasekettenreaktion erfolgte im Vet Med Labor, Ludwigsburg nach der von *Reubel et al. 1995* beschriebenen Methode mittels nested PCR.

Die Nachweisfähigkeiten von EHV2 und EHV5 und Einschlusskörperchen in der gesunden und kranken Gruppe wurden mittels des Fisher-Exact-Testes statistisch verglichen. Die Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm „C-Stat for Windows 1,0“ (Cherwell Scientific Publishing, Oxford, 1992). Folgende Signifikanzniveaus wurden verwendet:

n.s. =  $p > 0,05 > 5\%$  Irrtumswahrscheinlichkeit nicht signifikant  
\* =  $p \leq 0,05 \leq 5\%$  Irrtumswahrscheinlichkeit signifikant

**Nachweisfähigkeit von EHV2- und EHV5-Nukleinsäure und Einschlusskörperchen in Prozent**



**Abb. 2:** Nachweisfähigkeit von EHV2- und EHV5-Nukleinsäure und Einschlusskörperchen in Prozent [%]

*Prevalence of EHV2- and EHV5-DNA and intranuclear inclusion bodies*

Gruppe 1 = kranke Gruppe  
Gruppe 2 = gesunde Gruppe  
PCR = Polymerase Chain Reaction  
EHV2 = Equines Herpesvirus 2  
EHV5 = Equines Herpesvirus 5  
EK = intranukleäre Einschlusskörperchen  
n.s. = nicht signifikant

**Ergebnisse**

Die zusammenfassende Darstellung der Untersuchungsergebnisse in der kranken und gesunden Gruppe erfolgt in Tabelle 2, 3, 4 und 5 und Abbildung 2.

**Tab. 2:** Nachweisfähigkeiten von EHV2- und EHV5-Nukleinsäure und Einschlusskörperchen

*Frequencies of EHV2- and EHV5-DNA and intranuclear inclusion bodies*

	Gruppe 1 [n = 15]	Gruppe 2 [n = 15]	Beide Gruppen [n = 30]
PCR EHV2	3 (20%) [n=15]	1 (6,7%) [n=15]	4 (13,3%) [n=30]
PCR EHV5	4 (28,6%) [n=14]	5 (41,7%) [n=12]	9 (34,6%) [n=26]
Einschlusskörperchen	4 (26,7%) [n=15]	2 (13,3%) [n=15]	4 (13,3%) [n=30]

Gruppe 1 = kranke Gruppe  
Gruppe 2 = gesunde Gruppe  
PCR = Polymerase Chain Reaction  
EHV2 = Equines Herpesvirus 2  
EHV5 = Equines Herpesvirus 5

Insgesamt wurde bei 13,3% der dreißig Pferde EHV2-Nukleinsäure und bei 31,6% der Pferde EHV5-Nukleinsäure mittels PCR nachgewiesen, während im Ausstrichpräparat 13,3% der Pferde Einschlusskörperchen aufwiesen.

In der Gruppe der erkrankten Pferde waren vier Pferde Einschlusskörperchen-positiv, das entspricht einem Prozentsatz von 26,7%. Der EHV2-Nachweis mittels PCR ergab drei positive Pferde (20%), während vier Pferde (28,6%) EHV5-positiv waren. Dabei waren jeweils unterschiedliche Pferde positiv, das heißt es lag mit Ausnahme von Pferd Nr. 15 keine Korrelation zwischen dem EHV2- und EHV5-Nachweis mittels PCR und dem Nachweis von Einschlusskörperchen vor.

Auch in der Gruppe der gesunden Pferde waren bei zwei Pferden (13,3%) Einschlusskörperchen nachzuweisen, wobei dies keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Gruppe der erkrankten Pferde darstellt ( $p=0,24$ ). Mittels PCR wurden bei einem Pferd (6,7%) EHV2-Nukleinsäuren und bei fünf Pferden (41,7%) EHV5-Nukleinsäuren nachgewiesen. Diese Befunde stellen keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Gruppe der erkrankten Pferde dar ( $p=0,25$  und  $p=0,25$ ).

Bei den Einschlusskörperchen-positiven Pferden wurden sowohl in der Gruppe der erkrankten als auch in der Gruppe der gesunden Pferde im Durchschnitt semiquantitativ mehr Lymphozyten nachgewiesen als bei den EHV2- und EHV5-positiven Pferden (Tabelle 5). Dies ist aber statistisch nicht signifikant.

**Diskussion**

Die klinische Bedeutung von Herpesvirusinfektionen des Pferdeauges bleibt, trotz verschiedener Untersuchungen (*Thein 1976*,

**Tab. 3:** Darstellung der Untersuchungsergebnisse bei den erkrankten Pferden (Gruppe 1)

Test results in the group of horses with ocular disease (group 1)

	PCR	PCR	Ausstrich	Ausstrich	Austrich		
Nr.	EHV2	EHV5	EK	Lymphozyten	Neutrophile	Therapie	Verlauf
1	-	-	-	3	1		
2	-	-	+	2	1	Virostatikum + Kortison	Heilung nach 5 Wochen
3	-	-	+	1	1	Virostatikum + Kortison	Heilung nach 7 Wochen, Rezidiv 6 Wochen später
4	-	-	-	0	1		
5	-	+	-	0	1		
6	-	-	+	3	1		Spontanheilung nach 5 Tagen
7	+	-	-	1	1	Virostatikum + Kortison	Heilung nach 4 Wochen
8	-	-	-	1	1		
9	-	+	-	0	0		
10	-	-	-	2	1		
11	+	-	-	2	1	Virostatikum + Kortison	4 Wochen später: EK positiv, keine Besserung nach 6 Wochen
12	-	-	-	3	1		
13	+	n.b.	-	0	3	Virostatikum + Kortison	Keine Besserung nach 5 Wochen
14	-	+	-	1	3		
15	-	+	+	2	2	Virostatikum	Heilung nach 5 Wochen

PCR = Polymerase Chain Reaction; EHV2 = Equines Herpesvirus 2; EHV5 = Equines Herpesvirus 5; n.b. = nicht bestimmt  
 EK = intranukleäre Einschlusskörperchen; Neutrophile = neutrophile Granulozyten; 0 = keine, 1 = wenig, 2 = viele, 3 = sehr viele

Thein und Böhm 1976, Thein 1978, Riis 1981, Miller et al. 1990, Collinson et al. 1994, Cullinane et al. 1994), nicht vollständig geklärt. Es werden in der Literatur verschiedene klinische Bilder, verschiedene auslösende Herpestypen und verschiedene Nachweismethoden genannt. Als durch Herpesviren ausgelöste Krankheitsbilder werden die Keratitis punctata superficialis, die ulzerative Viruskeratitis und die Keratitis maculosa (Thein 1976, Thein und Böhm 1976, Thein 1978, Matthews und Handscombe 1983, Kellner 1990, Miller et al. 1990, Collinson et al. 1994, Barnett et al. 1995, von Oppen 2000) angesehen, wobei die Beschreibungen der klinischen Bilder unterschiedlich sind. Dabei ist nicht geklärt, ob es sich um verschiedene Krankheiten oder nur um verschiedene Phasen einer Krankheit handelt. Von Oppen (2000) konnte den EHV2-positiven Pferden kein spezifisches klinisches Bild einer Keratitis zuordnen. Bei den in unserem Patientengut

zum Zeitpunkt der Untersuchung vorliegenden Formen handelte es sich um eine Keratitis punctata superficialis, welche allerdings oft Gefäßneovassungen aufwies, um eine Keratitis maculosa und um intraepitheliale Bläschenbildungen. Bei zwei der Patienten (Nr. 2 und 11) lag zwischenzeitlich eine ulzerative Form vor. Ein weiteres klinisches Bild der Herpesvirusinfektion ist eine Konjunktivitis ohne Korneabeteiligung, wobei diese meist im Zusammenhang mit einer systemischen Infektion steht (Gleeson und Studdert 1977, Collinson et al. 1994, Cullinane et al. 1994, Barnett 1995). Bei den in unserer Untersuchung vorliegenden Fällen von Konjunktivitis waren beide Augen betroffen, ohne dass erkennbare Anzeichen einer systemischen Infektion vorlagen. Bei zwei der sieben Pferde mit Konjunktivitis konnte mittels PCR EHV2 nachgewiesen werden, in drei Fällen EHV5 und in einem Fall Einschlusskörperchen.

**Tab. 4:** Darstellung der Untersuchungsergebnisse bei den gesunden Pferden (Gruppe 2)

Test results in the group of horses with no ocular disease (group 2)

	PCR	PCR	Aus- strich	Aus- strich	Aus- strich	
Nr.	EHV2	EHV5	EK	Lympho- zyten	Neutro- phile	Kommentar
1	-	n.b.	-	0	1	
2	-	+	-	1	0	
3	-	-	-	0	0	
4	-	-	-	0	1	
5	-	+	-	1	0	
6	-	+	-	0	1	
7	-	-	+	1	1	Subklinischer Herpesinfekt?
8	-	-	-	0	1	
9	-	-	+	1	1	Subklinischer Herpesinfekt?
10	+	+	-	0	1	
11	-	-	-	0	1	
12	-	-	-	0	1	
13	-	+	-	0	1	
14	-	n.b.	-	1	1	
15	-	n.b.	-	0	1	

PCR = Polymerase Chain Reaction

EHV2 = Equines Herpesvirus 2

EHV5 = Equines Herpesvirus 5

n.b. = nicht bestimmt

EK = intranukleäre Einschlusskörperchen

Neutrophile = neutrophile Granulozyten

0 = keine, 1 = wenig, 2 = viele, 3 = sehr viele

Der Nachweis von Herpesviren bei Keratokonjunktivitiden wurde meist nur in Einzelfällen von verschiedenen Autoren beschrieben. *Thein (1976)* wies bei einem Fohlen mit Keratitis in Korneabiopsien EHV2 mittels Virusanzüchtung in der Zellkultur und mittels positivem Antikörpertiter im Blut nach. Bei zwölf Pferden mit Keratokonjunktivitis konnte *Thein (1978)* in zwei Fällen aus Korneabiopsien und Tränenflüssigkeit EHV2 in der Zellkultur anzüchten und in allen Fällen im Blut höhere Antikörpertiter als bei gesunden Pferden feststellen. *Miller et al. (1990)* wiesen EHV2 bei einem Pferd mit Keratitis aus einem Hornhautgeschabsel mittels Anzüchtung in der Zellkultur nach, konnten in einem zytologischen Präparat aber keine Einschlusskörperchen nachweisen. *Collinson et al. (1994)* wiesen bei drei von fünf Fohlen mit Keratokonjunktivitis aus Korneabstrichen EHV2 in der Zellkultur nach, konnten aber keine Einschluss-

körperchen feststellen. Die PCR als Nachweismethode wurde von *Von Oppen (2000)* bei einer Gruppe von fünfzig Pferden verwendet. Bei der Untersuchung von Augentupfern aus dem Konjunktivalsack stellte er bei 41,4% der erkrankten Pferde ( $n = 29$ ), aber nur bei 9,5% der gesunden Kontrollgruppe ( $n = 21$ ) EHV2-Nukleinsäure fest, welches einen statistisch signifikanten Unterschied darstellte. Antikörpertiter gegen EHV2 waren bei allen Tieren im Blut vorhanden, aber nicht statistisch signifikant verschieden zwischen den gesunden und kranken Tieren. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Thein (1978)*, der bei 12 augenkranken Pferden im Blut höhere Antikörpertiter als bei gesunden Pferden feststellen konnte.

Allerdings ist EHV2 in einem großen Anteil gesunder Pferde nachweisbar. Von 19 gesunden Pferden konnten bei allen positive Antikörpertiter nachgewiesen werden und in Blutleukozyten waren 11% bzw. 16% mit der PCR bzw. Kultur positiv (*Borchers et al. 1997*). Auch bei *Von Oppen (2000)* wiesen 47,6% der gesunden Pferde ( $n = 21$ ) EHV2-Nukleinsäure in Blutleukozyten auf und 100% waren Antikörper-positiv. Auch *Edington et al. (1994)* konnten in fast allen von vierzig Schlachtpferden EHV2-Nukleinsäure in verschiedenen Körperlymphknoten, Milz, Trigeminalganglion und Lungenmakrophagen mittels PCR nachweisen. *Rolle und Mayr (1993)* sprechen von einem Durchseuchungsgrad zwischen 45 und 85%.

Epidemiologische Daten über das Vorkommen von EHV5 und seine klinische Bedeutung sind rar (*Browning und Agius 1996*). Der Nachweis des mit dem EHV2 genetisch verwandten EHV5 gelang *Reubel et al. (1995)* mittels nPCR in Blutleukozyten bei 38 gesunden Pferden. Dabei waren 16% der Proben EHV5-positiv und 8% sowohl EHV2- und EHV5-positiv. *Borchers et al. (1999)* wiesen bei 55 Wildequiden in 93% der Blutproben sowohl EHV2- als auch EHV5-Antikörper nach und in den Blutleukozyten von 16 Proben konnte mittels PCR EHV2 nachgewiesen werden. Aus den Blutleukozyten von 7 Proben wurde EHV2 und in einem Fall auch EHV5 kultiviert. In den von uns untersuchten Augentupfern konnte bei den erkrankten Pferden in 28,6% und bei den gesunden Pferden in 41,7% aller Fälle mittels nPCR EHV5-Nukleinsäure nachgewiesen werden, wobei im Gegensatz zu *Borchers et al. (1999)* kein gleichzeitiger Nachweis von EHV2 gelang. Insgesamt waren in unserer Un-

**Tab. 5:** Durchschnittliche Nachweishäufigkeit der semiquantitativ bestimmten Lymphozytenmenge bei den PCR- und Einschlusskörperchen-positiven Pferden

Mean prevalence of the semiquantitative amount of lymphocytes in horses positive for EHV2- and EHV5-DNA and positive for intranuclear inclusion bodies

	PCR EHV2 positiv	PCR EHV5 positiv	Einschlusskörperchen positiv
Gruppe 1	1	0,75	2
Gruppe 2	0	0,4	1

Gruppe 1 = kranke Gruppe

0 = keine 1 = wenig

Gruppe 2 = gesunde Gruppe

2 = viele 3 = sehr viele

tersuchung mehr Proben EHV5-positiv (34,6% aller getesteten Pferde) als EHV2-positiv (13,3%).

Der direkte Virusnachweis in der Zellkultur stellt mit 7–14tägiger Dauer eine sehr zeitintensive Nachweismethode dar, während der PCR zum Nachweis von Virusnukleinsäure innerhalb von 2 Tagen zu einem Ergebnis führt. Die exfoliative Zytologie zum Nachweis von Herpeseinschlusskörperchen kann hingegen zur schnellen Diagnostik herangezogen werden. Im gesunden Ausstrich finden sich Konjunktival- und Kornealzellen, wenig Bakterien und keine oder wenig Lymphozyten, Neutrophile, Monozyten und Plasmazellen. Als Herpesviruseinschlusskörperchen bezeichnet man eosinophile, von der Umgebung gut abgesetzte und mit dem Lichtmikroskop gut sichtbare, 1 bis 20 µm große zellfremde Bezirke im Zellkern (Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry A), die nach Fixierung und Färbung deutlich werden (Cowdry 1934, Posbischil 1981, Freeman et al. 1985). Sie bestehen aus Viruspartikeln, Virusmatrix, virusspezifischer Nukleinsäure und Proteinen und neugebildetem Zellmaterial. Durch die histologischen Verfahren entsteht durch Schrumpfung der Zellmatrix ein leerer Hof (Halo) um das Einschlusskörperchen (Rolle und Mayr 1993). In Zellkulturen treten meist nach 10–14tägiger Inkubation mit Herpesviren zytopathische Effekte mit Bildung nukleärer Einschlusskörperchen auf (Rolle und Mayr 1984, Browning und Studdert 1988, Collinson et al. 1994). In den von uns untersuchten Proben waren sowohl 4 der erkrankten Pferde als auch 2 der gesunden Pferde Einschlusskörperchen-positiv, wobei dies keinen statistisch signifikanten Unterschied darstellte. Des Weiteren bestand mit Ausnahme von einem Pferd auch keine Korrelation zwischen Einschlusskörperchen-positiven und EHV2- und EHV5-positiven Pferden. Im Ausstrichpräparat sind außerdem neben Einschlusskörperchen in virusbefallenen Zellen auch eine vermehrte Anzahl von Lymphozyten, bei sekundärer bakterieller Infektion auch vermehrt Neutrophile zu finden. In unseren Untersuchungen konnten bei den erkrankten und gesunden Pferden mit Einschlusskörperchen im Durchschnitt semiquantitativ mehr Lymphozyten nachgewiesen werden als bei den EHV2- und EHV5-positiven Pferden, was aber nicht statistisch signifikant war. Der Nachweis von Lymphozyten im Ausstrich kann daher bei der Entscheidung behilflich sein, ob es sich bei den mittels PCR nachgewiesenen Herpesviren um einen klinisch relevanten Nachweis handelt oder nur um einen Zufallsbefund.

Ein möglicher Grund für die Diskrepanzen zwischen PCR-positiven aber Einschlusskörperchen-negativen Proben könnte in der Latenzzeit liegen, bevor Einschlusskörperchen im Ausstrich erkennbar sind (Rolle und Mayr 1984, Browning und Studdert 1988, Collinson et al. 1994). Ein weiterer möglicher Grund ist in der Viruslatenz zu sehen. Als mögliche Orte der Viruslatenz werden Leukozyten (Browning und Studdert 1987, Reubel et al. 1995, Borchers et al. 1997), Lungenmakrophagen, B-Lymphozyten (Drummer et al. 1996) und das Ziliarganglion und Trigeminalganglion (Edington et al. 1994, Borchers et al. 1997, Rizvi et al. 1997) angesehen, von denen aus das Virus durch Immunsuppression reaktiviert zu werden scheint. In dieser Zeit ist zwar Virusgenom nachweisbar, aber es liegen keine klinischen Erscheinungen vor. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass das EHV2 in der Pferdepopulation weit verbreitet ist. Bei den PCR-negativen, aber Einschlusskörperchen-positiven Fällen sind

mögliche Fehlinterpretationen durch Invaginationen des Zytoplasmas in den Zellkern oder durch hyaline Areale im Zytoplasma denkbar (Rolle und Mayr 1995), wie aber auch die Möglichkeit, dass noch andere Viren als die getesteten EHV2 und EHV5 an dem klinischen Bild beteiligt sein können. Auch könnte eine zu geringe Sensitivität der PCR eine Rolle spielen (Reubel et al. 1995).

Die in der Literatur beschriebenen Therapieerfolge sind sehr widersprüchlich. Thein (1976) beschreibt eine deutliche Besserung nach 8–14 Tagen mit desoxyuridinhaltiger Augensalbe und eine Heilung nach weiteren 2–4 Wochen, während die Gabe von Dexamethason-Augensalben die Bereitschaft von Rezidiven steigerte. Auch Collinson et al. (1994) konnten eine Heilung mit Idoxuridin-Augensalbe innerhalb von 14 Tagen erreichen. Im Gegensatz dazu konnten Miller et al. (1990) nach 14 Tagen mit Trifluridin-Augensalbe keine Besserung feststellen. Auch Von Oppen (2000) stellte nach 3–4 Wochen keine signifikant positiven Therapieerfolge sowohl mit Trifluridin als auch mit Idoxuridin fest, wobei häufig keine Besserung der klinischen Befunde auftrat und auch der Virusnachweis weiterhin positiv war. Auch bei unseren Patienten waren Therapieerfolge mit Trifluridin-Augensalbe erst nach mindestens 4 Wochen festzustellen, wobei bei zwei Pferden (Nr. 11 und 13) keine Besserung festgestellt werden konnte. Als mögliche Ursache für ein Therapieversagen ist eine Superinfektion einer vorhandenen Herpesvirusinfektion mit Bakterien denkbar. Es könnte sich aber auch um eine Keratitis superficialis mit unbekannter Ätiologie (Barnett et al. 1990) handeln, bei der zusätzlich noch Herpesviren entweder als Krankheitserreger oder nur als sekundäre Kontaminanten eine Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass noch viele Fragen bezüglich der Beteiligung von EHV2 und EHV5 an der Keratitis und Keratokonjunktivitis geklärt werden müssen. Wahrscheinlich aufgrund des starken Durchseuchungsgrades mit EHV2 und EHV5 konnten weder der PCR noch die exfoliative Zytologie in dieser Arbeit eine sichere Diagnose ermöglichen. Der Komplex, der durch Herpesviren ausgelösten Keratokonjunktivitiden bedarf demnach noch weiterer Erforschung.

#### Danksagung

Ich möchte hiermit Herrn Dr. Balzer und Herrn Dr. Kellner für ihre unermüdliche Hilfe ganz herzlich danken.

#### Literatur

- Agius, C.T., H.S. Nagesha and M.J. Studdert (1992): Equine Herpesvirus 5: Comparisons with EHV2 (equine cytomegalovirus), cloning, and mapping of a new equine herpesvirus with a novel genome structure. *Virology* 191, 176–186
- Agius, C.T., B.S. Crabb, E.A.R. Telford, A.J. Davison and M.J. Studdert (1994): Comparative studies of the structural proteins and glycoproteins of equine herpesvirus 2 and 5. *J. Gen. Virol.* 75, 2707–2717
- Barnett, K.C., S.M. Crispin, J.D. Lavach and A.G. Matthews (1995): Color atlas and text of equine ophthalmology. Verlag Mosby-Wolfe, London, Baltimore, 86–88, 111–114
- Borchers, K., U. Wolfinger, M. Goltz, H. Broll and H. Ludwig (1997): Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. *Arch. Virol.* 142, 917–928

- Borchers, K., K. Frölich and H. Ludwig (1999): Detection of equine herpesvirus types 2 and 5 (EHV-2 and EHV-5) in Przewalski's wild horses. *Arch. Virol.* 144, 771–780
- Browning, G.F. and M.J. Studdert (1987): Epidemiology of equine Herpesvirus 2 (Equine Cytomegalovirus). *J. Clin. Microbiol.* 25, 13–16
- Browning, G.F. and M.J. Studdert (1988): Equine Herpesvirus 2 (Equine Cytomegalovirus). *Veterinary Bulletin* 58, 775–790
- Browning, F. and C.T. Agius (1996): Equine herpesviruses 2 and 5 (equine gammaherpesviruses) and asine herpesvirus 2 infections. In: "Virus infections of vertebrates, Volume 6: Virus infections of equines", Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, 47–60
- Collinson, P.N., J.L. O'Reilly, N.F. Ficorilli and M.J. Studdert (1994): Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with keratokonjunctivitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205, 329–331
- Cowdry, E.V. (1934): The problem of intranuclear inclusions in virus diseases. *Arch. Path.* 18, 527–542
- Cullinane, A., B. McGing and C. Naughton (1994): The use of acyclovir in the treatment of coital exanthema and ocular disease caused by equid herpesvirus-3. In: "Equine infectious diseases VII", Eds. Bryan, J.T. and H. Gerber, Veterinary Publishing Inc., Princeton, NJ, 355
- Drummer, H.E., G.H. Reubel and M.J. Studdert (1996): Equine gammaherpesvirus 2 (EHV2) is latent in B lymphocytes. *Arch. Virol.* 141, 495–504
- Edington, N., H.M. Welch and L. Griffiths (1994): The prevalence of latent equid Herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Vet. J.* 26, 140–142
- Freeman, K.P., Roszel, J.F. and S.H. Slusher (1985): Inclusions in equine cytologic specimens. *JAVMA* 186, 359–364
- Gleeson, L.J. and M.J. Studdert (1977): Equine herpesvirus – Experimental infection of o foetus with type 2. *Austr. Vet. J.* 53, 360–362
- Kellner, S.J. (1990): Hornhauterkrankungen beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 6, 163–168
- Matthews, A.G. (1993): The cornea. In: "Current therapy in equine medicine IV" Ed. Robinson, N.E., Verlag W.B. Saunders, Philadelphia, PA, 347
- Matthews, A.G. and M.C. Handscombe (1983): Superficial keratitis in the horse: treatment with the antiviral drug idoxuridine. *Equine Vet. J.* 2, Suppl., 29–31
- Miller, T.R., J.M. Gaskin, R.D. Whitley and M.L. Wittcoff (1990): Herpetic keratitis in a horse. *Equine Vet. J.* 10, Suppl., 15–17
- Pospischil, A. (1981): Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Darstellung virusbedingter Einschlusskörper. *Zbl. Vet. Med. B* 28, 789–807
- Reubel, G.H., B.S. Crabb and M.J. Studdert (1995): Diagnosis of equine gammaherpesvirus 2 and 5 infections by polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 140, 1049–1060
- Riis, R.C. (1981): Equine ophthalmology. In: "Veterinary ophthalmology" Ed. Gelatt, K.N., Verlag Lea & Febiger, Philadelphia, PA, 569–605
- Rizvi, S.M., J.D. Slater, U. Wolfinger, K. Borchers, H.J. Field and A.J. Slade (1997): Detection and distribution of equine herpesvirus 2 DNA in the central and peripheral nervous system of ponies. *J. Gen. Virol.* 78, 115–1118
- Rolle, M. u. A. Mayr (1993): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 6. Auflage, Verlag F. Enke, Stuttgart, 319–320
- Telford, E.A.R., M.J. Studdert, C.T. Agius, M.S. Watson, H.C. Aird and A.J. Davison (1993): Equine herpesviruses 2 and 5 are  $\gamma$ -herpesviruses. *Virology* 195, 492–499
- Thein, P. (1976): Virusbedingte Keratitis beim Pferd. *Fortschritte der Veterinärmedizin* 25, 235–240
- Thein, P. (1978): The association of EHV-2 infection with keratitis and research on the occurrence of equine coital exanthema (EHV-3) of horses in Germany. In: „Equine infectious diseases IV“. Eds. Bryans, J.T. u. H. Gerber, Veterinary Publishing Inc., Princeton, NJ, 33–41
- Thein, P., u. D. Böhm (1976): Ätiologie und Klinik einer virusbedingten Keratokonjunktivitis beim Fohlen. *Zbl. Vet. Med. B* 23, 507–519
- Von Oppen, T. (2000): Nachweis von equinem Herpesvirus Typ 2 (EHV-2) bei Keratitiden des Pferdes. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

Dr. Eva Maria Krüdwagen

Tierklinik Binger Wald  
Hofgut Kreling  
554245 Waldalgesheim

Tel.: (06721) 94 24 0  
Fax: (06721) 94 24 94