

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

Nadine Richter, Marco Ebert und Kerstin Borchers

Institut für Virologie, Fachbereich Tiermedizin, Freie Universität Berlin

Zusammenfassung

In einer klinischen Vergleichsstudie mit 28 augenkranken und 28 klinisch gesunden Pferden wurde die Probenentnahme aus dem Konjunktivalsack des Auges parallel mit Wattetupfern und Cytobrush vorgenommen und in der EHV-2 spezifischen nested Polymerase Kettenreaktion (nPCR) auf Virusgenom getestet. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der EHV-2 Nachweishäufigkeit in den Augentupferproben von augenkranken und symptomfreien Pferden. Das EHV-2-Genom konnte aber signifikant häufiger in Cytobrushproben als in Wattetupferproben nachgewiesen werden. In der zweiten Studie sollte die Nachweishäufigkeit von EHV-5 und die Doppelinfektion mit EHV-2 in Augen-, Nasentupferproben und peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) mittels virusspezifischer nested PCR untersucht werden. Das EHV-5-Genom wurde bei 55/168 (32,7%) Pferden nachgewiesen. Das EHV-5 wurde davon bei 12/28 (42,9%) klinisch gesunden Pferden in neun PBMC, zweimal in Cytobrushproben, einmal in einem Wattetupfer und bei 43/140 (30,7%) klinisch kranken Tieren, davon bei 40/115 (34,8%) augenkranken und bei 3/25 (12,%) Tieren mit unspezifischen Symptomen, wie Leistungsschwäche oder fehlender Losgelassenheit im Rücken, oder Allergien (Nesselfieber, allergisch bedingter Husten), nachgewiesen. Bei den 40 EHV-5 positiven, augenkranken Tieren wurde das EHV-5-Genom überwiegend in Augentupfern (30/104), dabei vor allem in Cytobrushproben (28/92), aber auch in Nasentupfern (2/5) nachgewiesen. EHV-2 war bei 11/168 (6,5%) Probanden nachweisbar, wobei Doppelinfektionen von EHV-2 und EHV-5 bei sieben der 168 Pferde (4,2%) in vier Augentupfern von vier augenkranken Pferden und in zwei PBMC und einem Wattetupfer von drei gesunden Tieren festgestellt wurden.

Schlüsselwörter: Pferd, Equines Herpesvirus Typ 2 (EHV-2), Equines Herpesvirus Typ 5 (EHV-5), Cytobrush, Wattetupfer, Augentupfer, Nasentupfer, PBMC, nested PCR, Prävalenz

Prevalence of EHV-2 and EHV-5 DNA in ocular and nasal swabs as well as peripheral blood mononuclear cells

In a clinical comparative study with 28 horses with ocular disease and 28 clinically healthy horses sampling from the conjunctival fossa was done in parallel with cotton wool swabs and cytobrushes and tested by EHV-2 nested polymerase chain reaction (nPCR). There was no significant difference regarding the EHV-2 prevalence in swabs of clinically diseased and healthy horses. However, EHV-2 was detected significantly more often in samples obtained by cytobrush than by cotton wool swabs. The second study dealt with the incidence of EHV-5 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), eye swab and nasal swab samples and the detection of EHV-2 and EHV-5 double infections in horses. The occurrence EHV-5 was detected in 55/168 (32,7%) horses using nPCR. EHV-5 was present in 43/140 (30,7%) clinically diseased horses, there from in 40/115 (34,8%) horses with ocular diseases and in 3/25 (12,%) animals with unspecific clinical symptoms such as inefficiency or suppleness or allergies (urticaria, cough attributable to allergies). Twelve out of 28 healthy horses were EHV-5 PCR positive (42,9%), thereby EHV-5 was detected nine times in PBMC and two times in cytobrushes and one time in a cotton wool swab. The EHV-5 genome was detected in 40 horses with ocular diseases, thereby predominantly in ocular swabs (30/104) and mainly in cytobrushes (28/92) and also in nasal swabs (2/5). EHV-2 was present in 11/168 (6,5%) horses. Viral double infections of EHV-2 and EHV-5 were detected in 7/168 (4,2%) horses. Both viruses were discovered concurrently in four eye swabs from four eye diseased horses, in two PBMC and one cotton wool swab from three healthy horses.

Keywords: horse, Equine herpesvirus type 2 (EHV-2), Equine herpesvirus type 5 (EHV-5), cytobrush, cotton wool swab, ocular swabs, nasal swab, PBMC, nested PCR, prevalence

Einleitung

Im Jahre 1963 gelang durch *Plummer* und *Waterson* zum ersten Mal der Nachweis eines langsam wachsenden Equinen Herpesvirus, bei dem es sich, wie sich später zeigte, um EHV-2 handelte (*Plummer* und *Waterson* 1963). Dieses genetisch sehr heterogene Virus (*Browning* und *Studdert* 1987, 1989, *Collinson* et al. 1994) konnte seitdem in den verschiedensten Geweben und Sekreten, so auch in Augengeweben (*Studdert* 1971, *Thein* und *Böhm* 1976, *Thein* 1978, *Miller* et al. 1990, *Collinson* et al. 1994, *Borchers* et al. 1998, *Kershaw*

et al. 2001, *Krüdewagen* et al. 2001, *Besthorn* 2002, *Fetsch* et al. 2007), nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe *Agius* und *Studdert* 1994).

EHV-5 wurde weltweit bei Pferden verschiedenen Alters und unterschiedlicher Rassen detektiert. Aus Nasentupfern und PBMC von Pferden in Australien und von einem Pferd, welches aus Großbritannien nach Australien importiert wurde, konnte EHV-5 nachgewiesen werden (*Browning* und *Studdert* 1987). Außerdem wurde EHV-5 in Pferden aus der Schweiz

(Franchini et al. 1997), Neuseeland (Dunowska et al. 1999, 2002), Ungarn, Schweden (Nordengrahn et al. 2002) und Südkalifornien (Bell et al. 2006) aus Nasentupfern und PBMC mit virusspezifischer PCR detektiert. In Deutschland konnte das Vorkommen von EHV-5 in Augentupfern und PBMC in mehreren Studien mittels PCR belegt werden (Krüdwagen et al. 2001, Besthorn 2002, Fetsch 2007), einmal konnte das Virus sogar aus PBMC von einem gesunden Przewalskipferd aus dem Münchener Zoo isoliert werden (Borchers et al. 1999). Als Symptomkomplexe, bei denen EHV-2 und EHV-5 nachgewiesen werden konnten, wurden am häufigsten Erkrankungen des Respirationstraktes (Thein und Härtl 1976, Thein 1978, Palfi et al. 1978, Jolly et al. 1986, Ames et al. 1986, Fu et al. 1986, Lakritz et al. 1993, Schlocker et al. 1995, Murray et al. 1996, Dunowska et al. 1999, 2002, Wang et al. 2007), Konjunktivitis und Keratokonjunktivitis (Studdert 1971, Thein und Böhm 1976, Thein 1978, Collinson et al. 1994, Miller et al. 1990, Kershaw et al. 2001, Krüdwagen et al. 2001, Besthorn 2002, Fetsch et al. 2007) beschrieben. Da aber beide γ -Herpesviren auch häufig in klinisch unauffälligen Tieren nachgewiesen wurden (Kono und Kobayashi 1964, Kemeny und Pearson 1970, Turner et al. 1970, Borchers et al. 1997, Kershaw et al. 2001, Krüdwagen et al. 2001, Fetsch et al. 2007), ist weitere Forschungsarbeit nötig, um zu klären, ob sie eine Rolle als primäre infektiöse Erreger oder als Ko-Faktoren in Mischinfektionen spielen. Dieser Frage sollte anhand einer klinischen Vergleichsstudie in Bezug auf equine Augenerkrankungen nachgegangen werden. Dabei wurde die Häufigkeit des Virusnachweises mittels EHV-2 spezifischer nPCR bei einer augenkranken Testgruppe mit der bei einer gleichstarken, symptomfreien Kontrollgruppe verglichen. Außerdem sollte geprüft werden, ob sich durch eine Optimierung der Probenahme und -bearbeitung die Sensitivität des verwendeten, direkten Nachweisverfahrens für EHV-2 steigern ließe. Daher wurden Cytobrushes (bürstenartige Probenträger) für die Beprobung der Augen verwendet. Die Proben aus dem Auge wurden parallel mit herkömmlichen Wattetupfern und mittels Cytobrushes entnommen, so dass eine Vergleichbarkeit der beiden Probenträger möglich war. Des Weiteren wurde die Prävalenz von EHV-5 und möglichen Doppelinfektionen mit EHV-2 in Augen-, Nasentupferproben und PMBC insbesondere bei ophthalmologischen Erkrankungen mittel nPCR untersucht.

Material und Methoden

Patientengut

Die Testgruppe setzte sich aus 28 Pferden (T1-T28) im Alter von 3-22 Jahren (Durchschnittsalter 10 Jahre) zusammen. Bei der ophthalmologischen Untersuchung der Testgruppe wurden Keratitis punctata, Keratitis maculosa, Keratitis superficialis, Keratitis vasculosa, Keratitis profunda, Konjunktivitis, bullöse Keratopathie und Hornhautabration diagnostiziert. Die Kontrollgruppe bestand aus 28 Pferden (K1-K28), die zwischen 2 und 19 Jahre alt waren (Durchschnittsalter 8,4 Jahre). Die Pferde beider Gruppen wurden mittels Cytobrush und Wattetupfer aus den Konjunktivalsäcken beider Augen beprobt.

Gruppe G bestand aus 28 klinisch gesunden Warmblutpferden (G1-G28; Durchschnittsalter: 7 Jahre). Von diesen 28

Pferden wurden Blutproben und Augentupferproben genommen. Die Gruppe K beinhaltet Daten von 140 klinisch erkrankten Pferden (K1-K140), davon zeigten 115 Tiere ophthalmologische (Keratitis, Keratokonjunktivitis, Hornhaut-ödem) und 25 Pferde unspezifische Symptome wie Leistungsschwäche oder fehlende Losgelassenheit im Rücken oder Allergien (Nesselfieber, allergisch bedingter Husten). Dabei handelte es sich überwiegend um Warmblutpferde mit einem Durchschnittsalter von 11 Jahren, von denen Blut- und Tupferproben (Cytobrush von Auge, Wattetupfer von Auge und Nüster) zur Diagnostik aus verschiedenen Gebieten Deutschlands in das Institut für Virologie (FU-Berlin) eingesendet und molekularbiologisch auf EHV-2 und EHV-5 untersucht wurden. Um eine repräsentative Aussage über die Prävalenz von EHV-5 und Doppelinfektionen von EHV-2 und EHV-5 in Pferden treffen zu können, wurden im Gegensatz zur EHV-2 Studie nicht nur Proben vom Auge, sondern auch Blut- und Nasentupferproben untersucht.

Isolierung viraler DNA aus PBMC und Tupferproben

Die PBMC wurden durch eine Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Citratblutproben von Pferden isoliert. Zur DNA-Isolierung wurden die Zellen mit Proteinase K in Verdaupuffer bei 56° C über Nacht inkubiert (Borchers et al. 1997). Nach thermischer Inaktivierung des Enzyms wurde die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm vermessen und es wurden jeweils 1-2 μ g Gesamt-DNA in der nPCR eingesetzt.

Aus Tupferproben wurde die DNA-Isolation nach der von Kershaw (Kershaw et al. 2001) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Proben wurden in dem Tupferisoliermedium kräftig aufgeschüttelt und dann gründlich im Medium ausgedrückt. Nach einer Zentrifugation bei 15000 g und 4° C für 30 Minuten wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in 50 μ l Proteinase K-Verdaupuffer resuspendiert. Die Proteinase K-Behandlung erfolgte wie oben beschrieben. Es wurden 10 μ l der so aufgearbeiteten Probe in der nPCR eingesetzt. Mit den trockenen Tupferproben wurde identisch verfahren, nur dass diese ohne Zentrifugation, sofort in 50 μ l Proteinase K-Verdaupuffer aufgeschüttelt wurden.

nPCR zum Nachweis von EHV-2 und EHV-5 Genom

Der virale DNA-Nachweis erfolgte mittels 3 verschiedener nPCR, für die keinerlei Kreuzreaktionen beschrieben sind, um virales Genom von EHV-2 und EHV-5 zu detektieren. Für die EHV-2-Studie wurde eine auf dem viralen Interleukin (IL)-10 Gen basierende nPCR verwendet. In der Studie zum Nachweis von EHV-2 und EHV-5 kam eine, für diese beiden Viren spezifische gB (Glykoprotein B)-nPCR, zum Einsatz.

Die aufgearbeiteten Tupferproben wurden zur Detektion des EHV-2 Genoms in der von Borchers (Borchers et al. 1997) beschriebenen nPCR eingesetzt, bei der eine extronische Repeatsequenz und ein Teil des darauf folgenden Offenen Leserahmens für das virale IL-10 amplifiziert wird. Das äußere Primerpaar hat die Sequenzen 5'-GGCACTGAAACCC-CATACTG-3' (Genomposition: 139807) und 5'-AAAAC-CATGC TGTCACCAACCA-3' (Genomposition: 138631). Die Sequenzen des inneren Primerpaares sind 5'-CCAC-

TAACCCCCAACCTT-3' (Genomposition: 139245) und 5'-CCTCTATCC TCACAACAG-3' (Genomposition: 138683).

Für den Nachweis des gB-Gens von EHV-2 wurde die von Borchers (Borchers et al. 2006) etablierte nPCR verwendet. Das äußere Primerpaar hat die Sequenzen 5'-ATCAACCC-CACCAGCGTCAT-3' (Genomposition: 33677) und 5'-TTTTACTTCTTCCTCTCGTC-3' (Genomposition: 34605). Die Sequenzen des inneren Primerpaares sind 5'-CCCAG-GAACGAGATTGTGCT-3' (Genomposition: 33899) und 5'-GCTATGATGAGGACTATGAG-3' (Genomposition: 34391). Der Nachweis des gB-Gens von EHV-5 (Agius et al. 1994) optimiert für einen MWG- Heizblockcycler (Borchers et al. 1999) hat folgende Primer-Sequenzen: Äußeres Primerpaar: 5'-CAGACTATGGTGTGGGG-3' (Genposition: 897) und 5'-GCTGGCCACGTTCACTA-3' (Genposition: 2224), inneres Primerpaar: 5'-GGACCAAGAGAGCGTGTGGT-3' (Genposition: 1681) und 5'-TCCCCCAAGAACTGGAT AAAGC-3' (Genposition: 2172).

Alle nPCR wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Reaktionsansätze bestanden aus jeweils 0,4 µM der beiden Primer, 0,2 µM Desoxyribonukleinsäuretriphosphaten (dNTP), 1,5 Units (U) *Thermus aquaticus* (Taq) –Polymerase (Quiagen, Hilden) und 1x PCR-Reaktionspuffer. Als Template wurden 1-2 µg Gesamt-DNA aus den PBMC und bei Tupferproben 10 µl der aufgearbeiteten Probe eingesetzt. Die nPCR wurden in einem Heizblockcycler (OmniGene, Cambridge, USA) nach folgendem Protokoll durchgeführt: 35 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden Denaturierung bei 94° C, 30 Sekunden Anheftung bei 64° C und einminütiger Verlängerung bei 72° C.

Eine elektrophoretische Größenfraktionierung erfolgte mit einem 15 µl Aliquot aus der 2. Runde auf einem 1,5-prozentigen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde die DNA auf einem Transluminator sichtbar gemacht.

Statistische Auswertung der EHV-2-Studie

Die statistische Auswertung erfolgte mittels χ^2 -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit und mittels McNemar-Test. Der Grenz-

Tab 1 Nachweishäufigkeit von EHV-2 in Cytobrush- und Wattetupferproben mittels nPCR in der Test- und Kontrollgruppe

EHV-2 positiv	Cytobrush n=28	Wattetupfer n=28
Testgruppe	17 (60,7%)	6 (21,4%)
Kontrollgruppe	18 (64,3%)	2 (7,1%)

Tab 2 Nachweishäufigkeit von EHV-2 und EHV-5 in klinisch kranken und gesunden Pferden

Pferde n=168 (100%)	EHV-5 positiv n=55 (32,7%)	EHV-2 positiv n=11 (6,5%)	EHV-2 und -5 positiv n=7 (4,2%)
krank gesamt: n= 140 (83,3%)	n= 43 (30,7%)	n= 8 (5,7%)	n= 4 (2,9%)
davon			
a) augenkrank: n= 115 (82,1%)	n= 40 (34,8%)	n= 8 (7%)	n= 4 (3,5%)
b) unspezifische Symptome: n= 25 (17,9%)	n= 3 (12%)	n= 0	n= 0
gesund gesamt: n= 28 (16,6%)	n= 12 (42,9%)	n= 3 (10,7%)	n= 3 (10,7%)

wert bei dem eine Zufälligkeit der Häufigkeitsverteilung abgelehnt wurde, wurde bei beiden Tests auf $\chi^2 \geq 3,84$ festgelegt, so dass bei festgestellter Signifikanz die Wahrscheinlichkeit für eine Unabhängigkeit der Ergebnisse bei unter 5% liegt.

Ergebnisse

Der EHV-2 Nachweis gelang in Augentupferproben der Testgruppentiere (21,4% der Testtiere) häufiger als in der Kontrollgruppentiere (7,1% der Kontrolltiere) (Tabelle 1). Im χ^2 -Vierfeldertest auf Unabhängigkeit ergab sich aber kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem EHV-2-Virusgenom-Nachweis in Wattetupferproben mittels nPCR und einer Augenerkrankung. Auch in Cytobrushproben war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar (62,7% der Testgruppentiere und 64,3% der Kontrollgruppentiere).

Beim Vergleich der Nachweishäufigkeit von EHV-2 mittels nPCR-Untersuchungen von Cytobrush- und Wattetupferproben ergab der McNemar-Test, dass sowohl in der Testgruppe als auch in der Kontrollgruppe die Cytobrushproben statistisch signifikant häufiger EHV-2-positiv waren als die Wattetupferproben.

Diagnostikproben zum Nachweis von EHV-5 und Doppelinfektionen mit EHV-2 wurden auf Pferdebasis (Tabelle 2) und auf Probenbasis (Tabelle 3) ausgewertet. Insgesamt konnte EHV-5 mit einer Häufigkeit von 32,7% (55/168) per nPCR nachgewiesen werden. Dabei waren 43/140 (30,7%) klinisch kranke Pferde (Gruppe K) und 12/28 (42,9%) klinisch gesunde Pferde (Gruppe G) PCR positiv. Von den 43 klinisch kranken, EHV-5 positiven Pferden zeigten 40 ophthalmologische (40/115) und drei unspezifische Symptome (3/25). Bei den 40 EHV-5 positiven, augenkranken Pferden wurde EHV-5 überwiegend in Augentupfern (30/104), dabei in 28 Cytobrushes (28/92) und in zwei Wattetupfern (2/12), weiterhin in 11 PBMC (11/82) und in zwei Nasentupfern (2/5) nachgewiesen. Im Zusammenhang mit unspezifischen Symptomen konnte EHV-5 in drei Pferden, dabei zweimal in Cytobrushes (2/92) und einmal PBMC (1/82) detektiert werden.

Das EHV-2 wurde in 11/168 (6,5%) Pferden, dabei bei acht augenkranken in acht Augentupfern und drei gesunden Pferden in 2 PBMC und einem Augentupfer detektiert.

Doppelinfektionen von EHV-2 und EHV-5 wurden bei beiden Gruppen mittels nPCR untersucht, so dass insgesamt 168 Tiere miteinbezogen wurden (Tabellen 2 und 3). Von den 168

Tab 3 Nachweis­häufigkeit von EHV-2 und EHV-5 in PBMC, Augen- und Nasentupferproben. AT= Augentupfer, CB= Cytobrush, n= Anzahl, NT= Nasentupfer, PBMC = periphere mononukleäre Zellen des Blutes, WT= Wattetupfer

Proben n=191 (100%)	EHV-5 positiv n=58 (30,4%)	EHV-2 positiv n=11 (5,8%)	EHV-2 und-5 positiv n=7 (3,7%)
PBMC gesamt: n= 82 (42,9%)	n= 21 (25,6%)	n= 2 (2,4%)	n= 2 (2,4%)
krank gesamt: n= 59 (71,9%)	n= 12 (20,3%)	n= 0	n= 0
davon			
a) augenkrank: n= 54 (65,9%)	n= 11 (20,3%)	n= 0	n= 0
b) unspezifische Symptome: n= 5 (6,1%)	n= 1 (20%)	n= 0	n= 0
AT gesamt: n= 104 (54,4%)	n= 35 (33,7%)	n= 9 (8,7%)	n= 5 (4,8%)
CB: n= 92 (88,5%)	n= 32 (34,8%)	n= 7 (7,6%),	n= 3 (3,3%)
WT: n= 12 (11,5%)	n= 3 (25%)	n= 2 (16,7%),	n= 2 (16,7%)
krank gesamt: n= 101 (97,1%)	(30 CB, 2 WT) n= 32 (31,7%)	(7 CB, 1 WT) n= 8 (7,9%)	(3 CB, 1 WT) n= 4 (4,0%)
davon			
a) augenkrank: n= 80 (76,9%)	(28 CB, 2 WT) n= 30 (37,5%)	(7 CB, 1 WT) n= 8 (10%)	(3 CB, 1 WT) n= 4 (5%)
b) unspezifische Symptome: n= 21 (20,2%)	(2 CB) n= 2 (9,5%)	n= 0	n= 0
gesund gesamt: n= 3 (2,9%)	(2 CB, 1 WT) n= 3 (100%)	(1WT) n= 1 (33,3%)	(1 WT) n= 1 (33,3%)
NT gesamt: n= 5 (2,6%)	n= 2 (40%)	n= 0	n= 0
davon			
augenkrank: n= 5 (100%)	n= 2 (40%)	n= 0	n= 0

Pferden waren sieben (4,7%) Pferde gleichzeitig EHV-2 und EHV-5 positiv. EHV-2 und EHV-5 wurden dabei zweimal in PBMC, dreimal in Cytobrushes und zweimal in Wattetupferproben vom Auge detektiert. Zwei positive PBMC-Proben und eine positive Wattetupferprobe vom Auge stammten von unterschiedlichen, klinisch gesunden Pferden, so dass keine Korrelation zwischen den EHV-2 und EHV-5 positiven Probenmaterialien festgestellt werden konnte. Die vier positiven Proben aus dem Augengewebe stammten von vier Pferden mit ophthalmologischen Symptomen.

Diskussion

Wie bei den meisten publizierten Arbeiten (Krüdwagen et al. 2001, Besthorn 2002, Fetsch et al. 2007) zeigte sich auch hier kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem EHV-2-Nachweis in den einzelnen Proben der Test- und Kontrolltiere und einer Augenerkrankung. Ein solcher Zusammenhang wurde beim Vergleich einer augenkranken Testgruppe mit einer symptomfreien Kontrollgruppe nur einmal beschrieben (Kershaw et al. 2001). Kershaw wies in dieser Studie EHV-2 mittels nPCR aus Wattaugentupferproben bei 12/27 (44%) augenkranken und 2/21 (10%) gesunden Pferden nach. Auch in diversen Fallberichten wurden Konjunktividen und/oder Keratitiden auf eine Beteiligung von EHV-2 zurückgeführt (Studdert 1971, Thein und Böhm 1976, Thein et al. 1983, Matthews und Handscombe 1983, Miller et al. 1990, Collinson et al. 1994). Dies legt die Vermutung nahe, dass EHV-2 sporadisch an Augenerkrankungen bei Pferden beteiligt sein kann.

Beim Vergleich der Nachweis­häufigkeit von EHV-2 mittels nPCR aus Cytobrush- und Wattetupferproben erwies sich der Cytobrush signifikant häufiger Test positiv. Dies liegt vermut-

lich in der Tatsache begründet, dass sich aufgrund der büstenartigen Struktur des Cytobrushes durch vorsichtiges Drehen des Probenträgers während der Probenahme auch eine größere Menge Zellmaterials entnehmen lässt, während mit einem Wattetupfer eher Sekrete gewonnen werden können. Die Entnahme von Zellmaterial mittels Cytobrush wird beispielsweise in der Humanmedizin für zytologische Untersuchungen von Zervix- (Trimbos und Arentz 1986) und Konjunktivalabstrichen (Tsubota et al. 1990) genutzt. Bei Pferden wurden Cytobrushproben aus dem Auge für die Diagnostik von Keratomykosen (Bolliger et al. 2000) und für zytologische Untersuchungen (Krüdwagen et al. 2001) verwendet. Da mittels Cytobrush mehr Zellen bei der Beprobung entnommen werden, könnte der statistisch signifikant häufigere Nachweis von EHV-2 in Cytobrush- als in Wattetupferproben ein Indiz dafür sein, dass EHV-2 in der Konjunktiva häufig intrazellulär vorliegt. Der Nachweis von EHV-2-DNA und -Antigenen in Langerhansschen Zellen der Submukosa bestätigt diese Feststellung (Borchers et al. 2006).

Die Entnahme von Wattetupfer- und Cytobrushproben erfolgte unmittelbar nacheinander, um einen direkten Vergleich der beiden Probenträger zu ermöglichen. Daher ist eine stressbedingte Reaktivierung des Virus während der Probenahme, die zu einer gesteigerten Nachweis­häufigkeit in Cytobrushproben führt, auszuschließen.

EHV- 5 konnte in Deutschland sowohl bei klinisch gesunden als auch bei ophthalmologisch kranken Pferden mittels nPCR detektiert werden. In einer Studie von Krüdwagen wurden Augentupferproben augenkranker (Korneatupfer) und augengesunder (Konjunktivalsack­­tupfer) Tiere mittels nPCR auf EHV-5 untersucht, wobei bei 28,6% der 14 Pferde, welche an Keratokonjunktivitis oder Konjunktivitis erkrankt waren und bei 41,7% der 12 augengesunden Tiere EHV-5 nachgewiesen

werden konnte (Krüdewagen et al. 2001). In der hier vorliegenden Studie gelang der EHV-5 Nachweis in 34,8% von 115 augenkranken und in 42,9% von 28 gesunden Pferden nahezu genauso oft wie in der Studie von Krüdewagen. Die Feststellung von Besthorn (Besthorn 2002), dass EHV-5 signifikant häufiger im gesunden Auge (41% [43/104]), als im klinisch kranken Auge (22% [18/81]) mittels PCR nachweisbar ist, konnte mit der vorliegenden aktuellen Studie bestätigt werden, denn hier wurde EHV-5 zu 37,5% (30/80) in Augentupfern von augenkranken Pferden und zu 100% (3/3) in Augentupfern von gesunden Pferden nachgewiesen. Dabei muss erwähnt werden, dass aufgrund der ungleichen Menge an Probanden und Probenmaterialien (28 gesunde Pferde, 140 kranke Pferde) keine statistische Auswertung mit einer Signifikanzangabe möglich war.

Wenn das EHV-5 in kranken Pferden detektiert wurde, dann vor allem bei augenkranken Tieren und somit besteht die Möglichkeit, dass EHV-5 an entzündlichen Augenerkrankungen beteiligt sein könnte. Als Latenzorte sind PBMC für das EHV-5 bekannt (Dunowska et al. 1999, Bell et al. 2006), jedoch lassen die erfolgreichen PCR-Nachweise von EHV-5 in Augentupfern von gesunden Pferden vermuten (3/5), dass das Virus möglicherweise in latenter Form in Konjunktivalgewebe vorkommt.

EHV-2 wurde, wenn auch nicht mit statistischer Signifikanz, häufiger in den Watteaugentupferproben von augenkranken als von gesunden Tieren nachgewiesen. Dies bietet - vor allem in Verbindung mit den häufigen EHV-2-Nachweisen mittels unterschiedlicher Methoden in verschiedenen Proben aus dem Auge von anderen Autoren (Studdert 1971, Thein und Böhm 1976, Thein 1978, Collinson et al. 1994, Miller et al. 1990, Kershaw et al. 2001, Krüdewagen et al. 2001, Besthorn 2002, Fetsch et al. 2007) - einen Anhaltspunkt dafür, dass EHV-2 primär oder als Ko-Faktor an der equinen Keratokonjunktivitis beteiligt sein kann. Es scheinen aber auch andere Ursachen unabhängig von EHV-2 dieses Krankheitsbild hervorrufen zu können, so dass - je nach Ätiologie - Proben aus einem erkrankten Auge EHV-2-positiv oder -negativ ausfallen können. Da der EHV-2-Nachweis allerdings auch in klinisch unauffälligen Augen beschrieben wurde, ist nach wie vor unklar, ob EHV-2 eine Rolle als Primärauslöser, Ko-Faktor oder als zufällig auftretendes Agens spielt.

Bei den Cytobrushproben wurde EHV-2 jeweils etwa zu 60 % bei erkrankten und gesunden Pferden nachgewiesen. Da die regelmäßige Präsenz eines Virus in einem Gewebe sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Tieren als Indikator für Latenz anzusehen ist, könnte dies ein Hinweis sein, dass EHV-2 bei einem hohen Prozentsatz von Pferden in der Konjunktivalschleimhaut latent vorkommt. Daher ist das Virus mit der PCR auch bei klinisch gesunden Tieren nachweisbar. Stressfaktoren wie Impfung, schlechtes Stallklima, Futterumstellung, Turniere aber auch Erkrankungen infektiöser oder nicht infektiöser Genese können zur Reaktivierung des Virus und damit gegebenenfalls auch zum Auftreten von EHV-2-bedingten Symptomen führen. Bei equinen Keratokonjunktividen, deren Ätiologie auf EHV-2 zurückgeführt wurde, kam es bei Fohlen häufig zu Erkrankungen mehrerer Tiere in einer Gruppe (Thein 1978, Collinson 1994). Thein et al. (1983) erwähnt explizit das Auftreten von EHV-2-bedingten Keratokonjunktividen bei 6% von 100 Araber-Saugfohlen, die innerhalb der

ersten 30 Tage post-partum erkrankten. Hierbei muss bedacht werden, dass die Immunabwehr von Araber-Fohlen aus hereditären Gründen als besonders schwach einzuschätzen ist. Es wäre also möglich, dass bei immunsupprimierten oder noch nicht immunkompetenten Tieren - oder Tiergruppen - EHV-2-Infektionen besonders leicht angehen. Da aber Immunsuppressionen bei adulten Pferden eher sporadisch auftreten, würde es zumeist nur bei Einzeltieren zu klinischen Symptomen kommen. Die Immunitätslage scheint also ein wichtiger Aspekt zu sein. So ergab eine kürzliche Untersuchung zum Immunstatus von Pferden mit bzw. ohne equine Keratokonjunktivitis Indizien dafür, dass EHV-2 positive augengesunde Pferde signifikant häufiger verminderte B-Zellzahlen aufwiesen (Fetsch et al. 2007). Denkbar wäre, dass diese Pferde klinische Symptome entwickeln können.

Die hier veröffentlichten Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass ähnliches für das EHV-5 gilt, auch wenn im Vergleich zu EHV-2 weniger über die Pathogenese des EHV-5 bekannt ist. Das EHV-5-Genom wurde sowohl in Augentupferproben von augenkranken Pferden (Fetsch 2007) als auch in augengesunden Pferden, da sogar signifikant häufiger als in augenkranken Pferden mittels PCR nachgewiesen (Besthorn 2002). Somit ist nicht auszuschließen, dass das Virus sowohl primär als auch sekundär an Erkrankungen der Augengewebe beteiligt sein könnte.

Doppelinfectionen konnten bei Krüdewagen et al. (2001) und Fetsch (2007) nur selten nachgewiesen werden. Während Krüdewagen et al. (2001) EHV-2 und EHV-5 gemeinsam zu 6,6 % (1/15) bei einem gesunden Pferd mittels viruspezifischer PCR nachweisen konnten, detektierte Fetsch beide Viren jeweils in einem von 40 kranken bzw. 10 gesunden Augen mittels nPCR (Fetsch 2007). In einer anderen Studie konnten EHV-2 und EHV-5-Doppelinfectionen häufiger in gesunden als in kranken Augen nachgewiesen werden (Besthorn 2002). Das EHV-5 und das EHV-2 wurden gemeinsam bei 12,5% (13/104) der gesunden Augen und bei 3,7% (3/81) der kranken Augen nachgewiesen (Besthorn 2002). Doppelinfectionen von EHV-2 und EHV-5 traten in der hier präsentierten Studie mit 4,2% selten auf. Beide Viren wurden bei vier augenkranken Pferden in Augentupfern und bei drei gesunden Pferden zweimal in PBMC und einmal im Augentupfer nachgewiesen. Damit ergab sich kein Hinweis darauf, dass Doppelinfectionen für die Pathogenese der equinen Keratokonjunktivitis von Bedeutung sind.

Schlussbetrachtung

EHV-5 konnte mit 32,7% häufiger als EHV-2 mit nur 6,5% bei den hier untersuchten 168 Pferden per viruspezifischer nPCR nachgewiesen werden. Dabei war EHV-5 mit 42,9% häufiger in klinisch gesunden als in augenkranken Pferden (34,8%) und zwar vorwiegend in Augentupferproben detektierbar. EHV-2 dagegen kam bei 7% der augenkranken und 10,7% der gesunden Pferde vor. Letztere waren Doppelinfectionen mit beiden Viren. Bei augenkranken wurde EHV-2 und EHV-5 in nur 3,5% der Proben gleichzeitig nachgewiesen.

Die Beteiligung von EHV-2 und EHV-5 bei den verschiedenen Formen der equinen Herpes-Keratitis lässt sich zwar nicht in jedem Fall per PCR bestätigen, das relativ häufige Vorkom-

men scheint aber im kausalen Zusammenhang zu stehen. Für eine optimale Diagnostik und nachfolgende Therapie mit Virostatika ist es daher ratsam eine Cytobrushprobe vor der Behandlung von beiden Augen per nPCR auf EHV-2 und EHV-5 zu untersuchen.

Literatur

- Agius C. T. und Studdert M. J. (1994) Equine herpesviruses 2 and 5: comparisons with other members of the subfamily gammaherpesvirinae. *Adv. Virus Res.* 44, 357-379 Review
- Ames T. R., O'Leary T. P. und Johnson G. R. (1986) Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals with respiratory disease. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 8, 664-670
- Bell S. A., Balasuriya U. B., Nordhausen R. W. und MacLachlan N. J. (2006) Isolation of equine herpesvirus-5 from blood mononuclear cells of a gelding. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18, 472-475
- Besthorn C. (2002) Keratitiden des Pferdes und die Nachweishäufigkeit der DNS der Equinen Herpesviren Typ 2 (EHV 2) und Typ 5 (EHV-5) mittels Polymerasekettenreaktion. *Vet. Med. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität München*
- Bolliger J. O., Ruehli M. B. und Spiess B. M. (2000) Zur Keratomykose beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 16, 465-472
- Borchers K., Wolfinger U., Goltz M., Broll H. und Ludwig H. (1997) Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. *Arch. Virol.* 142, 917-928
- Borchers K., Wolfinger U., Ludwig H., Thein P., Baxi S., Field H. J. und Slater J. D. (1998) Virological and molecular biological investigations into equine herpes virus type 2 (EHV-2) experimental infections. *Virus Res.* 55, 101-106
- Borchers K., Frölich K. und Ludwig H. (1999) Detection of equine herpesvirus types 2 and 5 (EHV-2 and EHV-5) in Przewalski's wild horses. *Arch. Virol.* 144, 771-780
- Borchers K., Ebert M., Fetsch A., Hammond T. und Sterner-Kock A. (2006) Prevalence of Equine Herpesvirus 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs and its cell tropism in equine conjunctiva. *Vet. Med. Microbiol.* 20 118, 260-266
- Browning G. F. und Studdert M. J. (1987) Genomic heterogeneity of equine betaherpesviruses. *J. Gen. Virol.* 68, 1441-1447
- Browning G. F. und Studdert M. J. (1989) Physical mapping of a genome of equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *Arch. Virol.* 104, 77-86
- Collinson P. N., O'Rielly J. L., Ficorilli N. und Studdert M. J. (1994) Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with keratoconjunctivitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 205, 329-331
- Dunowska M., Meers J. und Wilks C. R. (1999) Isolation of equine herpesvirus type 5 in New Zealand. *New Zeal. Vet. J.* 47, 44-46
- Dunowska M., Wilks C. R., Studdert M. J. und Meers J. (2002) Equine respiratory viruses in foals in New Zealand. *New Zeal. Vet. J.* 50, 140-147
- Fetsch A. (2007) Die EHV-2 bedingte equine Keratokonjunktivitis-Evaluierung der Rolle immunologischer Mechanismen sowie viraler und bakterieller Co-Faktoren. *Vet. Med. Diss. Freie Universität Berlin*
- Fetsch A., Huebner J., Langbein I., Mueller E. und Borchers K. (2007) Ermittlung des Immunstatus bei Pferden mit bzw. ohne equine Keratokonjunktivitis unter besonderer Berücksichtigung einer EHV-2-Infektion. *Tierärztl. Prax* 35(G), 356-362
- Franchini M., Akens M., Bracher V. und von Fellenberg R. (1997) Characterisation of gamma herpesviruses in the horse by PCR. *Virology* 238, 8-13
- Fu Z. F., Robinson A. J., Horner G. W., Dickson L. G., Grimmett J. B. und Marshall R. B. (1986) Respiratory disease in foals and the epidemiology of equine herpesvirus type 2 infection. *New Zeal. Vet. J.* 34, 152-155
- Jolly P. D., Fu Z. F. und Robinson A. J. (1986) Viruses associated with respiratory disease of horses in New Zealand: an update. *New Zeal. Vet. J.* 34, 46-50
- Kemeny L. und Pearson J. E. (1970) Isolation of herpesvirus from equine leukocytes: comparison with equine rhinopneumonitis virus. *Can. J. Comp. Med.* 34, 59-65
- Kershaw O., von Oppen T., Glitz F., Deegen E., Ludwig H. und Borchers K. (2001) Detection of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) in horses with keratoconjunctivitis. *Virus Res.* 80, 93-99
- Kono Y. und Kobayashi K. (1964) Cytopathogenic equine orphan (CEO) virus in horse kidney cell culture. Isolation and properties. *Natl. Inst. Anim. Health. Q (Yatabe)* 4, 10-20
- Krüdewagen E. M., Balzer H. J. und Kellner S. J. (2001) Nachweishäufigkeit von Equinen Herpesvirus 2 und 5 am Pferdeauge – Vergleich der Nachweismöglichkeiten mittels exfoliativer Zytologie und Polymerasekettenreaktion. *Pferdeheilkunde* 17, 444-452
- Lakritz J., Wilson W. D., Berry C. R., Schrenzel M. D., Carlson G. P. und Madigan J. E. (1993) Bronchointerstitial pneumonia and respiratory distress in young horses: clinical, clinicopathologic, radiographic, and pathological findings in 23 cases (1984-1989). *J. Vet. Intern. Med.* 7, 277-288
- Matthews A. G. und Handscombe M. C. (1983) Superficial keratitis in the horse: treatment with antiviral drug idoxuridine. *Equine Vet. J. Suppl.* 2, 138-140
- Miller T. R., Gaskin J. M., Whitley R. D. und Wittcoff M. L. (1990) Herpetic keratitis in a horse. *Equine Vet. J. Suppl.* 10, 15-17
- Murray M. J., Eichorn E. S., Dubovi E. J., Ley W. B. und Cavey D. M. (1996) Equine herpesvirus type 2: prevalence and seroepidemiology in foals. *Equine Vet. J.* 28, 432-436
- Nordengrahn A., Merza M., Ros C., Lindholm A., Palf V., Hannant D. und Belak S. (2002) Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type-specific PCR assays. *Vet. Res.* 33, 251-259
- Palf V., Belak S. und Molnar T. (1978) Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals, showing respiratory symptoms. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 25, 165-167
- Plummer G. und Waterson A. P. (1963) Equine herpes viruses. *Virology* 19, 412-416
- Schlöcker N., Gerber-Bretscher R. und von Fellenberg R. (1995) Equine herpesvirus 2 in pulmonary macrophages of horses. *Am. J. Vet. Res.* 56, 749-754
- Studdert M. J. (1971) Equine herpesviruses. 4. Concurrent infection in horses with strangles and conjunctivitis. *Aust. Vet. J.* 47, 434-436
- Thein P. und Böhm D. (1976) Ätiologie und Klinik einer virusbedingten Keratokonjunktivitis beim Fohlen. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 23, 507-519
- Thein P. und Härtl G. (1976) Untersuchungen zur Virusätiologie respiratorischer Erkrankungen beim Pferd. *Prakt. Tierarzt, Colleg. Vet.*, 24-29
- Thein P. (1978) The association of EHV-2-infection with keratoconjunctivitis in horses and research on the occurrence of equine coital exanthema (EHV-3) in Germany. *Equine Infections Diseases*, 4, 33-43
- Thein P., Eßich G. und Schulze Hockenbeck W. (1983) Zur Ätiologie von Fohlenerkrankungen. *Tierärztl. Umsch.* 38, 239-250
- Trimbos J. B. und Arentz N. P. (1986) The efficiency of the Cytobrush versus the cotton swab in the collection of endocervical cells in cervical smears. *Acta Cytol.* 30, 261-263
- Tsubota K., Kajiwara K., Ugajin S. und Hasegawa T. (1990) Conjunctival brush cytology. *Acta Cytol.* 34, 233-235
- Turner A. J., Studdert M. J. und Peterson J. E. (1970) Equine herpes viruses. 2. Persistence of equine herpesviruses in experimentally infected horses and the experimental induction of abortion. *Aust. Vet. J.* 46, 90-98
- Wang L., Raidal S.L., Pizzirani A. und Wilcox G. E. (2007) Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. *Vet. Microbiol.* 121, 18-28

PD Dr. Kerstin Borchers
 Institut für Virologie
 Fachbereich Veterinärmedizin
 FU Berlin
 Philippstr. 13
 10115 Berlin
 borchers@zedat.fu-berlin.de