

Die Prävalenz von EHV-2 und EHV-5 bei Pferden mit Keratokonjunktivitis und augengesunden Pferden in der Schweiz

Franziska Sonderegger¹, Simon Pot¹, Ladina Walser-Reinhardt¹, Michael Hässig² und Bernhard M. Spiess¹

Department Pferde, Abteilung Ophthalmologie¹ und Department Nutztiere, Bestandesbetreuung², Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, Zürich, Schweiz

Zusammenfassung

Nicht alle als viral betrachteten Keratitiden lassen sich mittels PCR auf EHV-2 oder EHV-5 zurückführen. Ziel der Untersuchung war deshalb der Vergleich der Prävalenz von EHV-2 und EHV-5 mittels PCR bei Pferden mit Keratokonjunktivitis und augengesunden Pferden. Zytologische Hornhautproben von 131 Pferden mit einer vermuteten viralen Keratokonjunktivitis zwischen 2001 und 2010, sowie von 163 augengesunden Pferden von 3 verschiedenen Beständen wurden mittels PCR auf EHV-2 und EHV-5 untersucht. Die Prävalenz von EHV-2 und 5 unterscheidet sich nicht signifikant bei augengesunden Pferden und solchen mit Keratokonjunktivitis. Es konnten keine spezifischen ophthalmologischen Symptome dem einen oder anderen Virustyp zugeordnet werden. Das klinische Bild einer Keratitis punctata, welches als typisch für virale Keratitiden betrachtet wird, wurde bei beiden Virustypen beobachtet. Es scheint als ob Infektionen mit EHV-5 nur milde Symptome verursacht, verglichen mit Infektionen mit EHV-2. Die schwersten klinischen Symptome traten bei Doppelinfektionen mit EHV-2 und 5 auf. In dieser Untersuchung konnte kein signifikanter Prävalenzunterschied von EHV-2 und 5 zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Die Pathogenität von EHV-2 und 5 bleibt unklar, ist jedoch sicher nicht als hochgradig einzustufen.

Schlüsselwörter: Pferd / Keratokonjunktivitis / Ätiologie / Equines Herpesvirus / Prävalenz / Ophthalmologie

The prevalence of DNA of EHV-2 and EHV-5 in horses with keratoconjunctivitis and clinically normal horses in Switzerland

Not all viral keratoconjunctivitis can be detected by PCR as caused by EHV-2 and 5. The authors therefore compared the prevalence of EHV-2 and 5 by PCR in horses with keratoconjunctivitis and healthy horses. Conjunctival cytobrush samples of 131 horses with suspected viral keratoconjunctivitis between 2001 and 2010 and of 163 healthy horses from three different stables were tested by PCR for the presence of EHV-2 and EHV-5. The prevalence of EHV-2 and 5 is not significantly different in healthy horses and horses with keratoconjunctivitis. No specific ophthalmic signs could be attributed to either EHV-2 or EHV-5. The punctate pattern on the corneal surface, which is considered typical for a viral keratitis, was found in horses infected with EHV-2 or EHV-5. It appears, that an EHV-5-infection causes only mild clinical signs compared to horses testing positive for EHV-2. The most severe clinical signs were seen in horse testing positive for EHV-2 and 5. In this investigation the prevalence of EHV-2 and EHV-5 was similar in healthy horses and horses with keratoconjunctivitis. No statistically significant differences were found. The pathogenicity of EHV-2 and 5 is not clear or very weak.

Keywords: horse / keratoconjunctivitis / etiology / equines Herpesvirus / prevalence / ophthalmology

Einleitung

Beim Pferd sind bisher neun verschiedene Herpesviren bekannt (EHV-1 bis 9). Die wichtigsten Krankheitserreger beim Pferd gehören zu den α - und γ -Herpesvirinae (Telford et al. 1993, Davison et al. 2009, Fortier et al. 2009). Die γ -Herpesviren EHV-2 und EHV-5 werden mit Augenerkrankungen in Zusammenhang gebracht (Thein und Bohm 1976, Borchers 1998, Kershaw 2001, Besthorn 2002, von Borstel 2003). Es wurden 4 verschiedene Formen der viralen Keratitis beim Pferd beschrieben, wobei unklar blieb, ob es sich um verschiedene Krankheitsbilder handelt oder um unterschiedliche Stadien derselben Erkrankung (Thein und Bohm 1976, Matthews 1983, Barnett 1998). Die Keratitis punctata wird allgemein als viralen Ursprungs beschrieben (Matthews 1983, Kellner 1990, Miller et al. 1990, Barnett 1998, Besthorn 2002).

Nicht alle als viral betrachteten Keratitiden lassen sich aber mittels PCR auf EHV-2 oder EHV-5 zurückführen. Es galt darum in der vorliegenden Arbeit die Prävalenz von EHV-2 und EHV-5 mittels PCR bei Pferden mit vermuteter viraler Keratokonjunktivitis zu ermitteln und sie der Prävalenz bei augengesunden Pferden gegenüber zu stellen.

Tiere, Material und Methoden

Es wurden 131 Pferde beprobt, welche zwischen März 2001 und Mai 2010 an unserer Klinik mit Symptomen einer vermutlich viralen Keratokonjunktivitis vorgestellt wurden. Ausgeschlossen wurden Pferde mit Verletzungen, Ulzerationen der Hornhaut und solche mit Pilzinfektionen. Diese Patientengruppe bestand aus Pferden zwischen 6 Monaten und 29 Jahren (Durchschnittsalter 11,5 Jahre). Davon waren 53 Stuten, 68 Wallache und 9 Hengste. Bei einem Pferd wurde das Geschlecht nicht festgehalten. Mit 102 Tieren waren Warmblüter in der Patientengruppe übervertreten. Die übrigen Pferde verteilten sich auf 9 Vollblüter, 7 Kaltblüter, 9 Ponys, 3 Traber und ein Pferd unbekannter Rasse.

Die Kontrollgruppe bestand aus 163 augengesunden Pferden des Schweizerischen Nationalgestüts in Avenches, des nationalen Pferdezentrum in Bern und des Kompetenzzentrums für Veterinärdienst und Armeetiere der Kaserne Sand bei Bern. Es handelt sich um 61 Stuten, 81 Wallache und 21 Hengste im Alter zwischen 3 und 27 Jahren (Durchschnittsalter 9,3 Jahre). Davon waren 82 Warmblüter, 52 Kaltblüter, 11 Traber, 10 Halbblüter, 6 Vollblüter und 2 Maultiere.

Alle Pferde wurden in einem abgedunkelten Raum untersucht. Nach der Reflexprüfung wurde auf Blepharospasmus und Augenausfluss geachtet. Die vorderen Augenabschnitte wurden mit einer Handspaltlampe (Kowa- SL-15, Provet, Lyssach, Schweiz) untersucht. Bei Verdacht auf eine Hornhautveränderung wurde eine Fluoreszeinprobe durchgeführt. Der Fundus wurde mit einem direktem Ophthalmoskop (Heine Beta 200, Provet, Lyssach, Schweiz) untersucht. In der Kontrollgruppe wurden Pferde mit Anzeichen von Konjunktivitis, Keratitis, Hornhautveränderungen jeder Art, Katarakten und Verdacht auf Mondblindheit ausgeschlossen.

Die Probenentnahme erfolgte in der Kontrollgruppe jeweils an einem durch einen Zufallsgenerator (Excel) bestimmten Auge, links oder rechts. In der Patientengruppe wurden die veränderten Augen beprobt, nicht aber die gesunden Partneraugen.

Die Gewinnung der Konjunktivalabstriche fand nach vorheriger lokaler Anästhesie der Augenoberfläche durch 0,4% Oxybuprocaine (Novesin®, OmniVision AG, Neuhausen, Schweiz) oder 0,5% Proxymetacaine (Alcaine®, OmniVision AG, Neuhausen, Schweiz) mittels Abstrichbürste (Cytobrush®, Henry Schein Vet GmbH, Hamburg, Deutschland) statt. Hierfür wurde die Abstrichbürste in den Bindehautsack eingeführt und einige Male rotiert. Die Nickhaut befand sich dabei zwischen Zytobürstchen und Hornhaut und verhinderte somit eine Verletzung der Cornea durch die feinen Borsten. Anschließend wurden die Spitzen der Bürstchen in ein steriles Blutröhrchen ohne Zusatz verbracht und bis zum Transport ins Labor kühl gelagert.

Zur Verarbeitung wurden die Proben in das IDEXX VetMed Labor nach Ludwigsburg gesandt. Dort wurden sie in 500 l PBS (Phosphate buffered Saline) ausgeschüttelt und anschließend 200 l dieses Lysats für die DNA-Extraktion mittels QIAmp® DNA Mini Kits (QUIAGEN Hilden) eingesetzt. Das Volumen des Lysats verringerte sich dadurch auf 50 l.

Die darauffolgende Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der viralen DNA erfolgte als nested PCR, wie sie von *Reubel et al.* (1995) beschrieben wurde. Unter einer Monoinfektion wird eine Infektion mit EHV-2 oder EHV-5 verstanden; unter einer Doppelinfektion eine Infektion mit beiden Viren. Zudem wird der Begriff EHV-negativ für Pferde verwendet, bei welchen weder DNA von EHV-2 noch von EHV-5 nachgewiesen wurde.

Die statistischen Vergleiche der einzelnen Gruppen erfolgten mittels 2- und Fisher's-Exact-Test (wenn der Stichprobenumfang $n < 5$ war) und die Analyse kontinuierlicher Daten mittels t-Test. Als signifikant wurden p-Werte $n \leq 0.05$ bezeichnet, als nicht signifikant solche > 0.05 .

Die Resultate wurden nur auf den -Fehler, nicht aber auf den -Fehler (Power) getestet. Es handelt sich hierbei also nur um eindeutige und nicht etwa um uneindeutige Resultate.

Für diese Berechnungen sowie für die Bestimmung des nötigen Stichprobenumfangs der Kontrollgruppe wurde das Statistikprogramm „STATA“ verwendet (StataCorp., 2009; STATA Statistical Software: Release 11.0; College Station, TX, USA: StataCorp LP).

Resultate

Von den 131 Pferden mit Keratokonjunktivitis der Patientengruppe waren 68 (51.9%) EHV-negativ, 6 (4.6%) nur für EHV-2 positiv, 41 (31.3%) nur EHV-5 positiv und 16 (12.2%) waren für beide Viren positiv.

Bei den 163 augengesunden Pferden der Kontrollgruppe waren von 163 Tieren 94 (57.7%) EHV-negativ, 10 (6.1%) EHV-2 positiv, 46 (28.2%) EHV-5 positiv und 13 (8.0%) waren sowohl EHV-2 als auch EHV-5 positiv (Abb. 1).

Bei den erkrankten Pferden konnten keine Symptome identifiziert werden, welche entweder auf EHV-2 oder EHV-5 hinwiesen. Das typische klinische Bild der Keratitis punctata konnte sowohl bei EHV-2, wie auch bei EHV-5 positiven Pferden beobachtet werden.

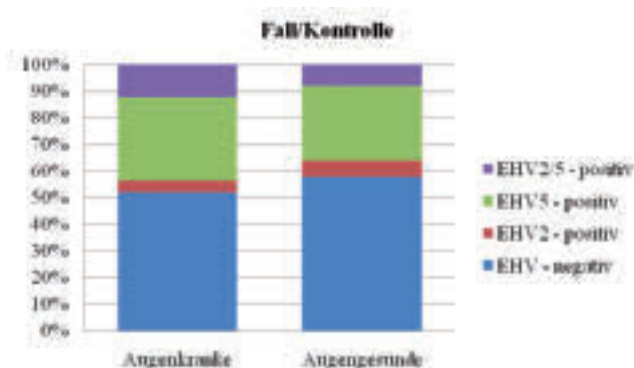


Abb. 1 Vergleich der Prävalenzen von EHV-2 und EHV-5 bei augenkranken (Patientengruppe) und augengesunden (Kontrollgruppe) Pferden.

Comparison of the prevalence of EHV-2 and EHV-5 in horses with keratoconjunctivitis (Augenkrankte) and healthy horses (Augengesunde)

EVH-positive erkrankte Pferde zeigten signifikant mehr Tränenfluss als EHV-negative erkrankte Pferde. EHV-2 positive erkrankte Pferde zeigte signifikant mehr Tränenfluss als EHV-5 positive erkrankte Pferde. Erkrankte Pferde mit Doppelinfektionen zeigten deutlich mehr Blepharospasmus, als erkrankte Pferde welche alleine mit EHV-2 oder EHV-5 infiziert waren.

Diskussion

In dieser Studie wurde eine positive PCR als Nachweis von equinen Herpesviren betrachtet, obschon streng genommen nur die DNA der Viren nachgewiesen wird. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Prävalenz equiner Herpesviren zwischen augengesunden und augenkranken Pferden ($p=0.51$). Es muss also in Betracht gezogen werden, dass es sich beim Nachweis der beiden fraglichen – Herpesviren um einen reinen Zufallsbefund handeln könnte und diese beiden Viren nichts mit der Ätiopathogenese von Keratokonjunktividen beim Pferd zu tun haben. Dies würde die fast identische Verteilung der beiden Viren in der Patienten- und Kontrollgruppe erklären und auch die Resultate früherer Studien bestätigen (*Krüdewagen 2001, Besthorn 2002, von Borstel 2003, Fetsch 2007*). Der Grund, warum DNA dieser beiden

Viren regelmäßig sowohl in augengesunden, als auch in augenkranken Pferden nachgewiesen werden können, bleibt weiterhin unklar. Möglicherweise sind EHV-2 und EHV-5 nicht als Primärerreger von Keratokonjunktivitiden anzusehen, sondern viel mehr als initiale, immunsupprimierende Erreger, die nur zusammen mit anderen belebten oder unbelebten Faktoren zu Horn- und Bindehautentzündungen führen, wie das schon postuliert wurde (Ebert 2006, Fetsch 2007).

Andere Studien von Browning und Suddert (1987), bzw. Bell et al. (2006) vermuten, dass die beiden fraglichen Herpesviren aufgrund ihrer genetischen Heterogenität auch Unterschiede in der Virulenz aufweisen und so je nach Virusstamm entweder zu entzündlichen Augenveränderungen führen können oder eben nicht. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Konjunktiven womöglich als Latenzort von EHV-2 und EHV-5 dienen (Borchers et al. 2006, Ebert 2006, Richter 2008). Dies könnte bedeuten, dass man in den Cytobrush-Proben von den augenkranken sowie den augengesunden Pferden kein aktives, sondern nur latent vorhandenes Virus nachgewiesen hat, da mittels PCR nicht zwischen latentem und aktivem Virus unterschieden werden kann. Vielleicht verursacht die oben erwähnte genetische Heterogenität auch unterschiedliche Präferenzen was den Latenzort anbelangt. Dies würde erklären, weshalb man bei einigen Pferden diese latenten Viren findet und bei anderen nicht.

Die eigene klinische Erfahrung zeigt, dass eine virustatische Behandlung alleine mit Aciclovir, Ganciclovir oder Trifluorothymidin auch bei EVH-positiven Pferden keine Verbesserung der Symptomatik mit sich bringt. Erst der Einsatz von lokalen Entzündungshemmern wie Dexamethason, Prednisolonazetat oder Ciclosporin bringt den gewünschten Erfolg. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass die als typisch viral betrachtete Keratitis punctata beim Pferd eine immunvermittelte Erkrankung ist (Matthews and Gilger 2009).

Finanzielle Unterstützung

Stiftung Forschung für das Pferd, Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich und IDEXX Diavet Labor, Bäch, Schweiz

Literatur

- Barnett K. C., Crispin S. M., Lavach J. D. und Matthews A. G. (1998) Viruseratitis. Augenkrankheiten beim Pferd. Barnett K. C., Crispin S. M., Lavach J. D., Matthews A. G. Hannover, Schlütersche: 111–114
- Bell S. A., Balasuriya U. B. et al. (2006) Temporal detection of equine herpesvirus infections of a cohort of mares and their foals. *Vet Microbiol* 116, 249–257
- Besthorn C. J. (2002) Keratitiden des Pferdes und die Nachweisfähigkeit der DNS der Equinen Herpesviren Typ 2 (EHV 2) und Typ 5 (EHV 5) mittels Polymerasekettenreaktion. Diss. Med. Vet. München
- Borchers K., Ebert M., Fetsch A., Hammond T. und Sterner-Kock A. (2006) Prevalence of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs and its cell tropism in equine conjunctiva. *Vet. Microbiol.* 118, 260–266
- Browning G. F. and Studdert M. J. (1987) Epidemiology of equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *J. Clin. Microbiol.* 25, 13–16
- Davison A. J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G. S., McGeoch D. J., Minson A. C., Pellett P. E., Roizman B., Studdert M. J. und Thiry E. (2009) The order Herpesvirales. *Arch. Virol.* 154, 171–177
- Ebert M. (2006). Das Equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2): Studien zur Prävalenz in Augentupfern und zum Gewebe- und Zelltropismus, insbesondere in Bezug auf die equine Keratokonjunktivitis. Diss. Med. Vet. Berlin
- Fetsch A. (2007) Die EHV-2 bedingte equine Keratokonjunktivitis - Evaluierung der Rolle immunologischer Mechanismen sowie viraler und bakterieller Co-Faktoren. Diss. Med. Vet. Berlin
- Fortier G., Pronost S., Mischak F., Fortier C., Leon A., Richard E., Van Erck E., Thiry E. und Lekeux P. (2009) Identification of equid herpesvirus-5 in respiratory liquids: a retrospective study of 785 samples taken in 2006-2007. *Vet. J.* 182, 346–348
- Kellner S. J. (1990) Hornhauterkrankungen beim Pferd. *Pferdeheilkunde* 6, 163–168
- Krüdewagen E. M., Balzer H.-J. und Kellner S. J. (2001) Nachweisfähigkeit von Equinen Herpesviren 2 und 5 am Pferdeauge – Vergleich der Nachweismöglichkeiten mittels exfoliativer Zytologie und Polymerasekettenreaktion. *Pferdeheilkunde* 17, 444–452
- Matthews A. und Gilger B. C. (2009) Equine immune-mediated keratopathies. *Vet. Ophthalmol.* 12 Suppl 1, 10–16
- Matthews A. G. und Handscombe M. C. (1983) Superficial keratitis in the horse: Treatment with the antiviral drug idoxuridine. *Equine Vet. J. Supplement* 2, 29–31
- 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
- Reubel G. H., Crabb B. S., Crabb B. S. und Studdert M. J. (1995) Diagnosis of equine gammaherpesvirus 2 and 5 infections by polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 140, 1049–1060
- Richter N. (2008) Virologische und molekularbiologische Studien zur Verbreitung und Bedeutung von EHV-5-Infektionen beim Pferd, Diss. Med. Vet. Berlin
- Telford E. A., Studdert M., J. Agius C. T., Watson M. S., Aird H. C. und Davison A. J. (1993) Equine herpesviruses 2 and 5 are gamma-herpesviruses. *Virology* 195, 492–499
- Thein P. und Bohm D. (1976). „Ätiologie und Klinik einer virusbedingten Keratokonjunktivitis beim Fohlen.“ *Zentralbl. Vet. Med. B* 23, 507–519
- von Borstel M. (2003) Erweiterte Diagnostikverfahren bei Keratitiden des Pferdes unter besonderer Berücksichtigung der Nachweisfähigkeit des equinen Herpesvirus Typ 2 (EHV-2). Diss. Med. Vet. Hannover
- Prof. Bernhard M. Spiess
Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich
Department Pferde, Abteilung Ophthalmologie
Winterthurerstraße 260
8057 Zürich, Schweiz
bspiess@vetclinics.uzh.ch