

## Ermittlung des Immunstatus bei Pferden mit bzw. ohne equine Keratokonjunktivitis unter besonderer Berücksichtigung einer EHV-2-Infektion

A. Fetsch<sup>1</sup>, J. Huebner<sup>2</sup>, I. Langbein<sup>2</sup>, E. Mueller<sup>2</sup>, K. Borchers<sup>1</sup>

Aus dem <sup>1</sup>Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität in Berlin und dem <sup>2</sup>Labor Laboklin, Bad Kissingen

### Schlüsselwörter:

Pferd, Keratokonjunktivitis, equines Herpesvirus Typ 2 (EHV-2), Durchflusszytometrie, B-Zellen, T-Zellen

### Key words:

Horse, keratoconjunctivitis, equine herpes virus type 2 (EHV-2), flow cytometry, B-cells, T-cells

### Zusammenfassung:

**Gegenstand und Ziel:** Die Rolle des in der Pferdepopulation weit verbreiteten EHV-2 als Pathogen ist umstritten, aber eine Beteiligung bei respiratorischen Infektionen und Keratokonjunktivitis mehrfach belegt. Neueste Befunde, die auf einer optimierten Probennahme und der sensitiven PCR-Technik basierten, zeigten jedoch auch bei augengesunden Pferden einen hohen Anteil an EHV-2-positiven Tupferproben. Da serologische Befunde keine diagnostische Aussagekraft bei der EHV-2-bedingten Keratokonjunktivitis haben, wurde nach einem weiteren diagnostisch verwertbaren Parameter gesucht. **Material und Methoden:** EHV-2 liegt in B-Zellen latent vor und hat möglicherweise eine immunsupprimierende Wirkung. Deshalb wurden Blutproben von augengesunden und augenkranken Pferden mittels PCR auf EHV-2 untersucht und zusätzlich die relativen Anteile der B- und T-Lymphozyten im peripheren Blut durchflusszytometrisch bestimmt. Die Testgruppe umfasste 10 EHV-2-positive Pferde, bei denen das Virus per PCR in peripheren Blutleukozyten oder Augentupfern nachgewiesen wurde. Die Kontrollgruppe bestand aus 21 EHV-2-negativen Pferden. Beide Gruppen beinhalteten augenranke und augengesunde Pferde. **Ergebnisse:** Zwischen augenkranken und augengesunden Test- und Kontrolltieren ergaben sich bezüglich der T-Zell-Zahlen im Vergleich zum Referenzbereich keine signifikanten Unterschiede. Dagegen waren bei vier von sechs augengesunden EHV-2-positiven Pferden erniedrigte B-Lymphozyten-Zahlen zu verzeichnen. Die Häufigkeit des Vorkommens von erhöhten B-Lymphozyten-Anteilen differierte dagegen zwischen den vier Gruppen nicht signifikant. **Schlussfolgerungen:** Augengesunde Testtiere wiesen signifikant häufiger verminderte B-Lymphozyten-Zahlen auf als augenranke bzw. augengesunde Kontrolltiere. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs sollten diese Ergebnisse jedoch nur als erste Indizien für einen möglichen Einfluss einer EHV-2-Infektion auf den Immunstatus angesehen werden. **Klinische Relevanz:** Weitere Studien müssen klären, ob die Bestimmung des Immunstatus mittels Durchflusszytometrie ein hilfreicher diagnostischer und möglicherweise prognostischer Parameter bei der EHV-2-induzierten equinen Keratokonjunktivitis darstellt.

### Summary:

**Objective:** EHV-2 is widespread in the horse population. Its role as a pathogen is controversial, but its involvement in infections of the respiratory tract as well as in different forms of keratoconjunctivitis has been documented several times. Recent findings, which were based on optimised sampling techniques and the sensitive PCR method, however, showed a high percentage of EHV-2 positive swabs within the healthy horse population. Since serological data are of no significance for the diagnosis of equine keratoconjunctivitis we searched for another suitable diagnostic parameter. **Material and methods:** Because of EHV-2 being latent in B-cells and its possible immunosuppressive effect we investigated blood samples of horses with and without ocular disease by PCR and additionally measured the relative percentages of B- and T-cells in the peripheral blood by means of flow cytometry. A total of 10 EHV-2 positive horses in which we determined the virus by PCR in PBL or ocular swabs were classified in the test group and 21 EHV-2 negative horses without virus detection were used as controls. Both groups comprised horses with and without ocular disease. **Results:** Regarding their T-cells there was no significant difference between horses with and without ocular disease in the test and control group. In contrast, four of the six healthy EHV-2 positive horses had decreased B-cell numbers. No significant difference in respect to frequency of increased B-cell numbers was observed between the four groups. **Conclusion:** Test animals without ocular disease had significantly more often decreased B-cell numbers than control horses with and without ocular disease, respectively. Because of the small sample number, the results should be regarded only as first indication for a possible influence of an EHV-2 infection on the immune status. **Clinical relevance:** Further studies will have to clarify if the determination of the immune status by flow cytometry represents a helpful diagnostic and probably prognostic parameter for EHV-2 induced equine keratoconjunctivitis cases.

**Evaluation of the immune status of horses with and without equine keratoconjunctivitis in particular consideration of an EHV-2 infection**

Tierärztl Prax 2007; 35 (G): 356-362

## Einleitung

Das equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2) ist ein in der Zellkultur langsam wachsendes, zytopathogenes Gammaherpesvirus (32), das in der Pferdepopulation eine weite Verbreitung und eine Seroprävalenz von nahezu 90% aufweist (3, 7). Bereits Fohlen sind seropositiv (34) und bei 30–70% der Pferde lässt sich EHV-2 mittels PCR in den peripheren Blutleukozyten (PBL) nachweisen (7, 26). Über die ätiopathogenetische Bedeutung von EHV-2 ist bisher noch wenig bekannt, ein Virusnachweis gelang jedoch insbesondere bei respiratorischen Erkrankungen (27). Auch im Zusammenhang mit Pyrexie, Inappetenz, Lymphadenopathie, allgemeiner Leistungsschwäche und Immunsuppression konnte EHV-2 nachgewiesen werden (9). Das Virus wird zudem als Wegbereiter von bakteriellen Sekundärinfektionen angesehen und von verschiedenen Autoren im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen genannt (25, 30). So konnten Nordengrahn et al. (26) die Prävalenz einer *Rhodococcus equi*-Pneumonie nach einer EHV-2-Impfung verringern. Thein und Böhm (33) waren die Ersten, die EHV-2 als mögliches infektiöses Agens bei der Keratokonjunktivitis vermuteten und Virus aus erkrankten Augen isolieren konnten. Weitere Autoren folgten (11, 23). Für eine Beteiligung von EHV-2 spricht auch die Tatsache, dass sich unterschiedliche Keratokonjunktivitisformen erfolgreich mit Virostatika behandeln ließen (21, 23, 36). In jüngster Zeit wurde in zwei Studien mittels PCR ein Zusammenhang zwischen EHV-2 und verschiedenen Formen der Keratokonjunktivitis festgestellt (17, 19), wobei Kershaw et al. (17) EHV-2 in Augentupfern sogar signifikant häufiger bei augenkranken im Vergleich zu augengesunden Pferden detektieren konnten. Besthorn (4) dagegen wies EHV-2 öfter in gesunden als in kranken Pferdeaugen nach. Auffällig ist jedoch bei allen Untersuchungen, wie häufig auch bei gesunden Tieren mittels PCR ein Nachweis von EHV-2 im Auge gelang (4, 17, 35). Neuesten Befunden zufolge ist EHV-2-Genom und -Antigen in Konjunktiven augengesunder Pferde möglicherweise in Langerhans-Zellen präsent (6), was eher auf eine Neuinfektion oder Reaktivierung als auf eine latente Infektion hindeutet.

Serologisch lässt sich keine Korrelation zwischen einer Augenerkrankung und einer EHV-2-Infektion herstellen (17, 36). So sind bis zu 90% der Pferde weltweit seropositiv und damit möglicherweise latente Träger, wobei B-Zellen als Latenzort (13) gelten. EHV-2 kann aber nur bei 30–70% der Pferde in peripheren Blutleukozyten per PCR oder Virusanzucht nachgewiesen werden, und zwar bei klinisch gesunden wie auch bei Pferden mit unterschiedlichen Krankheitsbildern (7), was ebenfalls eher auf eine Neuinfektion oder Reaktivierung schließen lässt. Serumpaaranalysen, wie sie für die Diagnostik von Virusinfektionen üblich sind (14), wurden nur in wenigen Fällen vorgenommen, zeigten aber bei Augenerkrankungen in der Regel keinen signifikanten EHV-2-Titeranstieg (17). Auch dieser Befund könnte ein Indiz für eine Reaktivierung latenter Viren sein. Ergebnisse an experimentell mit EHV-2 infizierten Pferden, die zwar 18 Tage nach intranasaler Infektion einen signifikanten Titeranstieg zeigten, nicht aber nach Reaktivierung (8), untermauern diese Vermutung.

Aufgrund der Latenz des EHV-2 in B-Lymphozyten (13) und seines durch verschiedene Virokine (28) möglicherweise das Immunsystem beeinflussenden Potenzials erschien es naheliegend, die B- und T-Lymphozyten-Zahl bei augenkranken und augengesunden Pferden zu untersuchen, um eventuelle Rückschlüsse auf eine latente Infektion oder auch immunpathologische Mechanismen ziehen zu können. Eine zuverlässige Methode zur differenzierten Darstellung der B- und T-Lymphozyten (synonym B- bzw. T-Zellen) als Träger der spezifischen Immunantwort stellt die Durchflusszytometrie dar, bei der verschiedene monoklonale Antikörper zur Detektion der einzelnen Lymphozytenpopulationen eingesetzt werden (12). Beim Pferd lassen sich so CD21-positive B- und CD5-positive T-Lymphozyten unterscheiden (16).

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu klären, ob bei EHV-2-positiven augenkranken Pferden, bei denen das Virus per PCR in den PBL oder Augentupfern nachgewiesen wurde, eine Beeinflussung des Immunstatus in Form prozentual erhöhter oder erniedrigter B- und T-Lymphozyten-Anteile festgestellt werden kann. Weiterhin sollte überprüft werden, ob sich die Durchflusszytometrie als zusätzliches diagnostisches Untersuchungsverfahren bei augenkranken Pferden eignet und möglicherweise eine Aussage darüber zulässt, ob es sich um eine Neuinfektion oder Reaktivierung von latentem Virus handelt. Die Untersuchung der Augentupfer und PBL mittels EHV-2-spezifischer nested PCR und die durchflusszytometrische Ermittlung der B- und T-Zell-Anteile dienten dabei als methodische Grundlage.

## Material und Methoden

### Patientengut

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum März bis Dezember 2004 zeitgleich im Institut für Virologie der FU Berlin und dem Labor Laboklin in Bad Kissingen durchgeführt. Sie erstreckten sich auf 10 augenkranken Pferde, die ausnahmslos an einer Keratokonjunktivitis, Konjunktivitis bzw. Keratitis erkrankt waren (Durchschnittsalter 8,4 Jahre), sowie 21 augengesunde und auch insgesamt klinisch unauffällige Pferde (Durchschnittsalter 10,6 Jahre). Alle Pferde waren im ELISA EHV-2-seropositiv und damit möglicherweise latente Virussträger.

Das Probenmaterial umfasste bei jedem Pferd 5 ml EDTA-Blut und Tupferproben aus dem Auge. Die Tupferprobenentnahme erfolgte bei augenkranken und -gesunden Pferden in der Regel aus beiden Augen. Demnach wurde bei einseitig augenkranken Pferden sowohl das erkrankte als auch das kontralaterale Auge auf EHV-2 untersucht. Bei einigen wenigen Tieren standen hingegen nur Einzel tupfer für die Untersuchung zur Verfügung, und zwar bei einem augenkranken Pferd (K1) nur aus dem betroffenen Auge und bei fünf gesunden Pferden (T10, K7, K10, K19, K20) aus dem rechten oder linken Auge. Die Tupferproben wurden in einem Fall ohne (bei dem kranken Pferd T4), bei allen anderen Pferden mit Isolationsmedium versandt. Die Probenaufarbeitung und die molekularbiologische Untersuchung erfolgten im Institut für Virologie, während das Labor Laboklin von jeder Blutprobe den Immunstatus mittels Durchflusszytometrie ermittelte.

## Isolierung von peripheren Blutleukozyten (PBL) aus Blutproben und DNA-Isolierung aus PBL und Tupfermaterial

Die Isolierung von PBL aus EDTA-Blutproben mit anschließender DNA-Isolierung entsprach der von Borchers et al. (7) beschriebenen Methode. Die PBL wurden durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und mit phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mehrmals gewaschen. Zur DNA-Isolierung wurden  $10^5$ – $10^6$  Zellen in Proteinase-K-Verdauungspuffer (Endkonzentration der Proteinase K: 0,2 mg/ml) aufgenommen und bei 56 °C über Nacht inkubiert. Nach Inaktivierung der Proteinase K erfolgte eine photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung. Jeweils 1–2 µg Gesamt-DNA wurden in die PCR eingesetzt.

Die DNA-Isolierung aus den Augentupferproben fand nach der von Kershaw et al. (17) beschriebenen Methode statt. Der trocken eingeschickte Tupfer des Pferdes mit der Nummer T4 wurde direkt in 150 µl Verdauungspuffer ausgeschüttelt, während Augentupferproben mit Isolationsmedium zunächst bei 15000 g und 4 °C für 30 min in einer Hochgeschwindigkeits-Tischzentrifuge zentrifugiert und das Pellet anschließend in 75 µl Proteinase-K-Verdauungspuffer resuspendiert wurde. Der enzymatische Verdau mit Proteinase K erfolgte wie oben beschrieben. In die erste Runde der PCR wurden stets 10 µl der Probe eingesetzt.

## PCR zum Nachweis des EHV-2-Genoms

Die PCR zum Nachweis von EHV-2-Genom beruht auf einer EHV-2-spezifischen nested PCR, die eine 947 bzw. 512 bp große Sequenz aus dem Glykoprotein B (gB) von EHV-2 amplifiziert (5). Das äußere Primerpaar hat die Sequenzen 5'-ATCAACCCACCAGCGTCAT-3' (Genomposition: 33677) und 5'-TTTTACTTCTCCTCTCGTC-3' (Genomposition: 34624). Die Sequenzen des inneren Primerpaares sind 5'-CCCAGGAACGAGATTGTGCT-3' (Genomposition: 33899) und 5'-GCTATGATGAGGACTATGAG-3' (Genomposition: 34391). Eine Kreuzreaktivität der eingesetzten Primerpaare gegenüber EHV-1, -4 und -5 besteht nicht und die Sensitivität der PCR beträgt 2 fg gereinigte Virus-DNA.

Beide PCR-Runden wurden in einem Volumen von 50 µl, bestehend aus 0,4 µM jedes Primers, 0,2 mM dNTPs, 1,5 U Taq-Polymerase (Fa. Quiagen, Hilden) und einmal Reaktionspuffer, durchgeführt. In der ersten Runde wurden 1–2 µg Gesamt-DNA aus PBL bzw. 10 µl aus extrahiertem Tupfermaterial eingesetzt. In der zweiten Runde kam jeweils 1 µl der Amplifikate aus der ersten Runde zum Einsatz. Das fehlende Volumen wurde anschließend mit RNA/DNAse-freiem Wasser aufgefüllt, der Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und der PCR-Ansatz in einem Heizblockcycler (Fa. MWG-Biotech, Ebersberg) nach folgendem Protokoll durchgeführt: 35 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 60 °C (erste Runde) bzw. 62 °C (zweite Runde) und einminütiger Elongation bei 72 °C. Schließlich wurde ein 15 µl-Aliquot aus der zweiten Runde der PCR auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

## Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen

Die Bestimmung des Immunstatus erfolgte im Labor Laboklin nach der von Langbein et al. (20) beschriebenen Methode, die jedoch für die Anwendung beim Pferd modifiziert wurde. Fluoreszeinisothiocyanat-(FITC-) und R-Phycoery-

thrin-(RPE-)konjugierte monoklonale Antikörper (Fa. Serotec, Oxford, UK) wurden zur spezifischen Identifizierung der Lymphozytensubpopulationen eingesetzt (Tab. 1). Zur Detektion von CD5-positiven T-Lymphozyten diente eine indirekte Methode, bei der ein nicht konjugierter primärer Antikörper mit einem FITC-konjugierten Anti-mouse-IgG-Sekundärantikörper gefärbt wurde. Der Antikörper zum Nachweis der CD21-positiven B-Lymphozyten war hingegen direkt mit RPE konjugiert.

Zunächst wurden 100 µl EDTA-Blut bei Raumtemperatur für 30 min mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert, anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse (RBC Lysing Buffer, Fa. Serotec) entsprechend Herstelleranleitung mit darauf folgender zweimaliger Waschung mit CellWash-Lösung (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Bei der indirekten Methode wurden die Zellen nach der Inkubation mit dem primären Antikörper zunächst ebenfalls mit CellWash-Lösung gewaschen, anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wie oben beschrieben.

Die Messung fand mit dem Durchflusszytometer FACScalibur der Firma Becton Dickinson statt, wobei pro Messung 10 000 Leukozyten erfasst und mittels der CELLQuest-Software Vers. 4.0.2 (Fa. Becton Dickinson) ausgewertet wurden. Die Festsetzung des Auswertungsfensters („gating“) und die Bestimmung der einzelnen Subpopulationen erfolgten in Anlehnung an die von Langbein et al. (20) bei Hunden und Katzen beschriebene Methode. Während bei Hunden und Katzen die so genannte „Backgating“-Methode unter Zuhilfenahme eines Panleukozyten-Markers angewendet wird, können die Lymphozyten beim Pferd direkt anhand ihrer Größe und Granularität identifiziert werden, da es hier keinen solchen Panleukozyten-Marker gibt (10, 22, 24). Diese „Gating“-Technik kam auch bei der hier vorliegenden Studie zur Anwendung.

Zur Festlegung der Referenzbereiche der Lymphozytensubpopulationen entnahmen Tierärzte des Labors Laboklin EDTA-Blutproben von 60 anamnestisch und adspektorisch gesunden Pferden in kooperierenden Beständen. Von allen Pferden wurde zuerst ein detailliertes Blutbild erstellt: Nur Proben, bei denen keinerlei Normabweichungen feststellbar waren, wurden einer durchflusszytometrischen Untersuchung unterzogen, deren Ergebnis zur Festlegung der Referenzbereiche diente. Eine ophthalmologische Untersuchung der Pferde fand jedoch nicht statt, da die Methode im Vorfeld und unabhängig von der hier beschriebenen Studie etabliert wurde.

## Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software MS Excel Vers. 2002 und die Prüfung auf Signifikanz anhand einer Vierfeldertafel nach dem Verfahren nach Fisher (Fisher-Exact-Test), da der Fisher-Test auch bei geringen Stichprobengrößen noch das geforderte Niveau hält. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  (entspricht einem Signifikanzniveau von 5%) angenommen.

## Ergebnisse

### Virologische Befunde

Augentupfer- und Blutproben von 10 augenkranken und 21 augengesunden Pferden wurden mittels viruspezifischer nested PCR auf EHV-2-Genom untersucht. Dabei ließ sich virale DNA

Antikörper	Klon	Spezifität	Zellpopulation
MCA <sup>1</sup> 1781 PE <sup>2</sup>	CA2.1D6	evtl. CD <sup>3</sup> 21-Homolog	B-Lymphozyten <sup>4</sup>
MCA 1079	CVS5	eCD <sup>5</sup>	T-Lymphozyten <sup>6</sup>

<sup>1</sup> monoclonal antibody (monoklonaler Antikörper); <sup>2</sup> Phycoerythrin; <sup>3</sup> „Cluster of Differentiation“; <sup>4</sup> umfasst die Gesamtheit aller B-Lymphozyten; <sup>5</sup> equine CD; <sup>6</sup> beinhaltet alle T-Lymphozyten-Arten: T-Helferzellen, zytotoxische und Suppressor-T-Zellen

Tab. 1

Verwendete Antikörper zur spezifischen Identifizierung der Lymphozytensubpopulationen

**Tab. 2** Test- und Kontrollgruppe: Korrelation der anamnestischen Daten der Pferde mit EHV-2-nPCR-Ergebnissen bei peripheren Blutleukozyten (PBL) und Augentupfern bzw. dem Immunstatus

Interne Nr. des Pferdes	Auge krank/ gesund	Klinische Diagnose <sup>1</sup>	Akut/chronisch krank <sup>1</sup>	EHV-2-nPCR <sup>2</sup>		Immunstatus <sup>5</sup>	
				PBL <sup>3</sup>	AT <sup>4</sup>	B-Zellen	T-Zellen
<b>Gruppe 1: augenkrank EHV-2-nPCR-positive Pferde</b>							
T 1	krank	KJ <sup>6</sup> follicularis	chronisch	–	+		
T 2	krank	K <sup>7</sup> superficialis rezidiva	chronisch	–	+		
T 3	krank	KKJ <sup>8</sup> mit Gefäßbeinsprossung	chronisch	+	–		
T 4	krank	KKJ mit Gefäßbeinsprossung	chronisch	+	–		
<b>Gruppe 2: augengesunde EHV-2-nPCR-positive Pferde</b>							
T 5	gesund			+	–		
T 6	gesund			–	+		
T 7	gesund			+	–		
T 8	gesund			+	–		
T 9	gesund			–	+		
T 10	gesund			+	–		
<b>Gruppe 3: augenkrank EHV-2-nPCR-negative Pferde</b>							
K 1	krank	K mit Gefäßbeinsprossung	chronisch	–	–		
K 2	krank	K	akut	–	–		
K 3	krank	KKJ punctata	chronisch	–	–		
K 4	krank	K superficialis	chronisch	–	–		
K 5	krank	KJ rezidiva	chronisch	–	–		
K 6	krank	KJ punctata	chronisch	–	–		
<b>Gruppe 4: augengesunde EHV-2-nPCR-negative Pferde</b>							
K 7	gesund			–	–		
K 8	gesund			–	–		
K 9	gesund			–	–		
K 10	gesund			–	–		
K 11	gesund			–	–		
K 12	gesund			–	–		
K 13	gesund			–	–		
K 14	gesund			–	–		
K 15	gesund			–	–		
K 16	gesund			–	–		
K 17	gesund			–	–		
K 18	gesund			–	–		
K 19	gesund			–	–		
K 20	gesund			–	–		
K 21	gesund			–	–		

<sup>1</sup> entfällt bei augengesunden Pferden; <sup>2</sup> Ergebnis der EHV-2-nPCR; <sup>3</sup> periphere Blutleukozyten; <sup>4</sup> Augentupfer; <sup>5</sup> Symbole: Zellzahl innerhalb des Referenzbereichs ( ), über dem Referenzbereich ( ), unter dem Referenzbereich ( ); <sup>6</sup> Konjunktivitis; <sup>7</sup> Keratitis; <sup>8</sup> Keratokonjunktivitis

bei Augenkranken und -gesunden entweder aus Augentupfern oder aus PBL nachweisen (Tab. 2). Insgesamt wurden somit 10 EHV-2-positive Pferde (T1–T10) der Testgruppe zugeordnet, von denen vier Tiere augenkrank (Gruppe 1) und sechs augengesund (Gruppe 2) waren. Die 21 EHV-2-negativen Pferde, davon

sechs augenkrank (Gruppe 3) und 15 augengesunde Tiere (Gruppe 4), bildeten die Kontrollgruppe (K1–K21) (Tab. 2).

Bei den 10 augenkranken Pferden wurde im Vorbericht neunmal die klinische Diagnose einer chronischen Erkrankung des Auges gestellt (in je drei Fällen Keratitis, Konjunktivitis bzw.

Keratokonjunktivitis). Bei einem eine Woche alten Fohlen lautete die Diagnose akute Keratitis (Tab. 2).

## Korrelation der Ergebnisse der Durchflusszytometrie mit dem EHV-2-Nachweis

Zeitgleich zur virologischen Untersuchung wurde bei allen Test- und Kontrolltieren mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der prozentualen Häufigkeitsverteilungen von B- und T-Lymphozyten ein Immunstatus erstellt. Durch den Vergleich der ermittelten Werte mit den Referenzbereichen der relativen Anteile für die B- (6–17,5%) bzw. T-Lymphozyten (54,5–78,5%) an der Gesamtzellpopulation wurde der Anteil der Pferde mit Abweichungen (erhöhter oder erniedrigter Wert) ermittelt.

Tabelle 3 gibt die Anzahl der Pferde pro Gruppe an, die erhöhte bzw. erniedrigte relative B- und T-Lymphozyten-Anteile aufwiesen.

Die Häufigkeit des Vorkommens von erhöhten bzw. verminderten T-Lymphozytenzahlen differierte demnach zwischen den vier Gruppen nur marginal (Tab. 3). Bei den B-Lymphozyten-Zahlen wurden hingegen einige signifikante Unterschiede festgestellt. So zeigten augengesunde Testtiere (Gruppe 2) signifikant häufiger erniedrigte B-Lymphozyten-Zahlen als augenranke (Gruppe 3) oder augengesunde Kontrolltiere (Gruppe 4) ( $p = 0,0303$  bzw.  $0,0307$ ). Die Häufigkeit des Vorkommens von erhöhten B-Lymphozyten-Anteilen war zwischen den vier Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

## Diskussion

Bei der Keratokonjunktivitis des Pferdes vermuteten verschiedene Autoren eine ursächlich beteiligende Wirkung des equinen Herpesvirus Typ 2 (17, 33). Durch sensitivere Nachweismethoden konnten jedoch auch bei augengesunden Tieren hohe Nachweisraten dieses in der Pferdepopulation weit verbreiteten Virus erzielt werden (4, 19, 35). Mehrfach wurden dem EHV-2 auch immunsuppressive Wirkungen zugeschrieben (15), die in der Tatsache begründet sind, dass das Virus in B-Zellen latent vorkommt und verschiedene für Virokine kodierende Gene trägt (13, 28). Aus diesem Grund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, bei EHV-2-positiven bzw. -negativen augenranke und augengesunden Pferden den Immunstatus anhand der relativen B- und T-Lymphozyten-Anteile zu untersuchen.

Weder in Augentupfern noch in den peripheren Blutleukozyten konnten wir signifikante Unterschiede im PCR-Nachweis von EHV-2 zwischen augenranke und augengesunden Pferden feststellen. Diese Ergebnisse sind somit mit den in jüngster Zeit in der Literatur beschriebenen vergleichbar (4, 19). Auffällig ist jedoch, dass im Vergleich mit Resultaten anderer Autoren insgesamt nur bei sehr wenigen Pferden EHV-2-Genom in den Augentupfern (17) bzw. peripheren Blutleukozyten (7) mittels

**Tab. 3** Vergleich der Häufigkeiten von erhöhten bzw. verminderten B- und T-Lymphozyten-Zahlen bei augenranke und augengesunden Test- und Kontrollpferden

Relative Anteile der Zellen	Gruppe 1 <sup>1</sup> (n <sup>5</sup> = 4)	Gruppe 2 <sup>2</sup> (n = 6)	Gruppe 3 <sup>3</sup> (n = 6)	Gruppe 4 <sup>4</sup> (n = 15)
B-Zell-Zahl erhöht	1	0	1	0
B-Zell-Zahl erniedrigt	0	4	0	2
T-Zell-Zahl erhöht	1	2	2	4
T-Zell-Zahl erniedrigt	0	0	0	1

<sup>1</sup> augenranke Pferde mit PCR-Nachweis von EHV-2 in Augentupfern (AT) oder peripheren Blutleukozyten (PBL)  
<sup>2</sup> augengesunde Pferde mit PCR-Nachweis von EHV-2 in AT oder PBL  
<sup>3</sup> augenranke Pferde mit fehlendem PCR-Nachweis von EHV-2 in AT oder PBL  
<sup>4</sup> augengesunde Pferde mit fehlendem PCR-Nachweis von EHV-2 in AT oder PBL  
<sup>5</sup> Gesamtzahl der untersuchten Pferde der jeweiligen Gruppe

der PCR detektierbar war, obwohl serologische Untersuchungen bei allen Tieren einen erfolgten vorausgegangenen Kontakt mit EHV-2 belegten. Da jedoch 9 der 10 augenranke Pferde zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits seit mehreren Wochen klinische Symptome zeigten, wäre es denkbar, dass das Virus nicht mehr zu erfassen war.

Die Korrelation der klinischen und virologischen Befunde mit denen der Durchflusszytometrie ergab, dass die T-Lymphozyten-Zahlen in allen vier untersuchten Gruppen ähnlich häufig erhöht bzw. erniedrigt waren (Tab. 3). Dagegen wiesen augenranke, in der PCR EHV-2-positive Pferde (Gruppe 1) etwas häufiger erhöhte B-Lymphozyten-Zahlen auf als augengesunde EHV-2-negative Pferde (Gruppe 4). Auffällig ist die Verminderung der B-Lymphozyten-Zahl bei 67% der in der PCR EHV-2-positiven augengesunden Pferde (Gruppe 2). Interessanterweise ergab die PCR bei drei von vier Pferden dieser Gruppe (75%) mit erniedrigten B-Lymphozyten-Zahlen einen positiven Befund bei den PBL und nur in einem Fall war der Augentupfer EHV-2-positiv (Tab. 2).

Ob eine EHV-2-Infektion oder -Reaktivierung die B-Zell-Zahl messbar reduzieren kann oder aber andere Faktoren dafür verantwortlich sind, lässt sich anhand der vorliegenden Studie nicht klären. Auch ist nicht bekannt, ob Pferde mit verminderten B-Zell-Zahlen und einer EHV-2-Infektion eher eine Augenerkrankung entwickeln als andere. Es ist aber zu vermuten, dass insbesondere individuelle Unterschiede im Immunsystem, aber auch Alter, Rasse, Gesundheitszustand, Infektionsstatus und rezidivierende Infekte der Pferde auf den Ausbruch einer EHV-2-induzierten Keratokonjunktivitis entscheidend Einfluss nehmen. So vermutet Ackermann (1), dass die komplexe Interaktion von Virus und Wirtszelle bei der Aufrechterhaltung der Latenz, die möglicherweise durch virale Zytokine wie das viruskodierte Interleukin 10 reguliert wird, durch das Scheitern des Immunsystems, diese empfindliche Balance aufrechtzuerhalten, zur Ent-

stehung von Gammaherpesvirusinfektionen-assoziierten Krankheiten beiträgt.

Zu einer Erhöhung der Lymphozytenzahl kommt es unter anderem bei chronischen Entzündungen, wie sie z. B. bei manchen viralen Infektionskrankheiten ausgelöst werden, während akute Virusinfektionen und chronischer Stress eher zu einer erniedrigten Lymphozytenzahl führen (18). Altersabhängige oder rassespezifische Unterschiede könnten in diesem Zusammenhang wiederum eine Rolle spielen. In der Literatur werden auch anderen Viren das Immunsystem beeinflussende Eigenschaften zugeschrieben, unter deren Voraussetzung überhaupt erst eine klinische Symptomatik entstehen kann. So gilt das porcine Circovirus Typ 2 (PCV-2) als Auslöser des bei Absetzferkeln vorkommenden „Post Weaning Multisystemic Wasting“-Syndroms (PMWS), das interessanterweise jedoch nicht in jedem PCV-2-positiven Bestand ausbricht und auch experimentell nicht immer durch alleinige Infektion mit PCV-2 klinisch auslösbar war (2). Vielmehr ließ sich das PMWS ausschließlich dann diagnostizieren, wenn bestimmte Kofaktoren zusammen mit PCV-2 wirkten. Unter anderem wird auch eine durch Aktivierung des Immunsystems hervorgerufene Ausprägung des PMWS in diesem Zusammenhang vermutet (31). Der immunsupprimierende Effekt des Virus soll dabei durch eine geringe antigenpräsentierende Fähigkeit und einem Funktionsverlust von B- und CD4-T-Zellen bedingt sein (29).

## Schlussfolgerungen

Insgesamt betrachtet liefern die Ergebnisse dieser Studie erste Hinweise dafür, dass bei augengesunden EHV-2-positiven Pferden die B-Zell-Zahlen erniedrigt sind. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs sollten diese Ergebnisse jedoch nur als erste Indizien für einen möglichen Einfluss des EHV-2 auf den Immunstatus angesehen werden. In jedem Fall liefert die Durchflusszytometrie zusätzliche, bei der diagnostischen und möglicherweise prognostischen Bewertung der Keratokonjunktivitis hilfreiche Informationen. Gezielte Untersuchungen hinsichtlich der Beeinflussung der B-Lymphozyten-Zahlen wären jedoch sinnvoll und sollten bei einer größeren Anzahl von Pferden mit unterschiedlichen klinischen Symptomen durchgeführt werden. Dabei sollten auch die untersuchten Pferdegruppen gezielter ausgewählt und beispielsweise weniger chronisch kranke und mehr akute, unbehandelte Tiere untersucht werden. Auch langfristige Verlaufskontrollen zur genauen Dokumentation der Zu- und Abnahme der B-Lymphozyten-Zahl in Kombination mit wiederholten klinischen und virologischen Untersuchungen wären sinnvoll. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang wäre zudem die Untersuchung ehemals gesunder, aber EHV-2-positiv getesteter Pferde hinsichtlich der späteren Entwicklung klinischer Symptome.

## Fazit für die Praxis

Bei Pferden mit Keratokonjunktivitis sollte das equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2) als beteiligtes Agens generell in Betracht gezogen werden. Von den vielfältigen diagnostischen Möglichkeiten zur Abklärung ist der Genomnachweis des Erregers aus Tupfermaterial mittels der sensitiven PCR-Technik als Methode der Wahl anzusehen. Eine sinnvolle Ergänzung der diagnostischen Tests könnte in der durchflusszytometrischen Bestimmung der B-Lymphozyten-Zahl zu finden sein, wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen. Detaillierte Untersuchungen diesbezüglich sollten jedoch folgen.

## Literatur

1. Ackermann M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol* 2006; 113: 211–222.
2. Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, et al. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 1999; 121: 1–11.
3. Bagust TJ, Pascoe RR, Harden TJ. Studies on equine herpesviruses 3. The incidence in Queensland of three different equine herpesvirus infections. *Aust Vet J* 1972; 48: 47–53.
4. Besthorn C. Keratitiden des Pferdes und Nachweisfähigkeit der DNS der Equinen Herpesviren Typ 2 (EHV-2) und Typ 5 (EHV-5) mittels Polymerasekettenreaktion. Diss, Ludwig-Maximilians-Universität München 2002.
5. Borchers K, Brackmann J, Kershaw O. The mouse is not permissive for equine herpesvirus 2 (EHV-2), however viral DNA persisted in lung and spleen depending on the inoculation route. *Arch Virol* 2002; 147: 1437–1444.
6. Borchers K, Ebert M, Fetsch A, Hammond T, Sterner-Kock A. Prevalence of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) DNA in ocular swabs and its cell tropism in equine conjunctiva. *Vet Microbiol* 2006; 118: 260–266.
7. Borchers K, Wolfinger U, Goltz M, Broll H, Ludwig H. Distribution and relevance of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) infections. *Arch Virol* 1997; 142: 917–928.
8. Borchers K, Wolfinger U, Ludwig H, Thein P, Baxi S, Field HJ, et al. Virological and molecular biological investigations into equine herpes virus type 2 (EHV-2) experimental infections. *Virus Res* 1998; 55: 101–106.
9. Browning GF, Studdert MJ. Equine herpesvirus 2 (equine cytomegalovirus). *Vet Bull* 1988; 58: 775–790.
10. Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ, Edwards RF, Nevill M, Smith R. Hematologic and immunophenotypic factors associated with development of rhodococcus equi pneumonia of foals at equine breeding farms with endemic infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 100: 33–48.
11. Collinson PN, O’Rielly JL, Ficorilli N, Studdert MJ. Isolation of equine herpesvirus type 2 (equine gammaherpesvirus 2) from foals with keratoconjunctivitis. *J Am Vet Med Assoc* 1994; 205: 329–331.
12. Davis EG, Wilkerson MJ, Rush BR. Flow cytometry: clinical applications in equine medicine. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 404–410.
13. Drummer HE, Reubel GH, Studdert MJ. Equine gammaherpesvirus 2 (EHV-2) is latent in B-lymphocytes. *Arch Virol* 1996; 141: 495–504.
14. Erpenstein C, Siebert M, Failing K, Herbst W. Untersuchungen zum Vorkommen nosokomialer Virusinfektionen bei stationären Patienten mit unterschiedlichem Impfstatus in einer tierärztlichen Klinik für Pferde. *Tierärztl Prax* 2002; 30 (G): 32–38.
15. Fu ZF, Robinson AJ, Horner GW, Dickinson LG, Grimmett JB, Marshall RB. Respiratory disease in foals and the epizootiology of equine herpesvirus type 2 infections. *N Z Vet J* 1986; 34: 152–155.
16. Jungi T, Hrsg. *Klinische Veterinärimmunologie*. Stuttgart: Enke 2000.
17. Kershaw O, Von Oppen T, Glitz F, Deegen E, Ludwig H, Borchers K. Detection of equine herpesvirus 2 (EHV-2) in horses with keratoconjunctivitis. *Virus Res* 2001; 80: 109–115.

Ermittlung des Immunstatus bei Pferden mit bzw. ohne equine Keratokonjunktivitis unter besonderer Berücksichtigung einer EHV-2-Infektion  
A. Fetsch, J. Huebner, I. Langbein, E. Mueller, K. Borchers

18. Kraft W, Dürr U, Hrsg. Klinische Labordiagnostik in der Veterinärmedizin. Stuttgart, New York: Schattauer 2005.
19. Krüdwagen EM, Balzer HJ, Kellner SJ. Nachweishäufigkeit von Equinen Herpesviren 2 und 5 am Pferdeauge – Vergleich der Nachweismöglichkeiten mittels exfoliater Zytologie und Polymerasekettenreaktion. Pferdeheilk 2001; 17: 444–452.
20. Langbein I, Kühnlein P, Schimmer C, Vahlenkamp TW, Huebner J, Mueller E. Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut von Hunden und Katzen. Tierärztl Prax 2003; 31 (K): 537–546.
21. Matthews AG, Handscombe MC. Superficial keratitis in the horse: treatment with the antiviral drug idoxuridine. Equine Vet J Suppl 1983; 138–140.
22. Merant C, Bonnefont C, Debos A, Greenland T, Cadore JL, Monier JC. Cross-species reactivity of seven monoclonal antibodies with equine lymphocytes by flow cytometry. Vet Res 2003; 34: 791–801.
23. Miller TR, Gaskin JM, Whitley RD, Wittcoff ML. Herpetic keratitis in a horse. Equine Vet J Suppl 1990; 15–17.
24. Murakami K, Sentsui H, Shibahara T, Yokoyama T. Reduction of CD4+ and CD8+ t- lymphocytes during febrile periods in horses experimentally infected with equine infectious anemia virus. Vet Immunol Immunopathol 1999; 67: 131–140.
25. Murray MJ, Eichorn ES, Dubovi EJ, Ley WB, Cavey DM. Equine herpesvirus type 2: prevalence and seroepidemiology in foals. Equine Vet J 1996; 28: 432–436.
26. Nordengrahn A, Rusvai M, Merza M, Ekstrom J, Morein B, Belák S. Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for rhodococcus equi pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes. Vet Microbiol 1996; 51: 55–68.
27. Pálfi V, Belák S, Molnar T. Isolation of equine herpesvirus type 2 from foals showing respiratory symptoms. Zentralbl Veterinarmed B 1978; 25: 165–167.
28. Rode HJ, Bugert JJ, Handermann M, Schnitzler P, Kehm R, Janssen W, et al. Molecular characterization and determination of the coding capacity of the genome of equine herpesvirus type 2 between the genome coordinates 0.235 and 0.258 (the EcoRI DNA fragment N; 4.2 kbp). Virus Genes 1994; 9: 61–75.
29. Sarli G, Mandriolo L, Laurenti M, Sidoli L, Cerati C, Rolla G, et al. Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Vet Immunol Immunopathol 2001; 83: 53–67.
30. Schlocker N, Gerber-Bretscher R, Von Fellenberg R. Equine herpesvirus 2 in pulmonary macrophages of horses. Am J Vet Res 1995; 56: 749–754.
31. Segales J, Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. Vet Q 2002; 24: 109–124.
32. Telford EAR, Studdert MJ, Agius CT, Watson MS, Aird HC, Davison AJ. Equine herpesviruses 2 and 5 are gamma-herpesviruses. Virology 1993; 195: 492–499.
33. Thein P, Böhm D. Ätiologie und Klinik einer virusbedingten Keratokonjunktivitis beim Fohlen. Zentralbl Veterinarmed B 1976; 23: 507–519.
34. Turner AJ, Studdert MJ, Peterson JE. Equine herpes viruses. 2. Persistence of equine herpesviruses in experimentally infected horses and the experimental induction of abortion. Aust Vet J 1970; 46: 90–98.
35. Von Borstel M. Erweiterte Diagnostikverfahren bei Keratitiden des Pferdes unter besonderer Berücksichtigung der Nachweishäufigkeit des equinen Herpesvirus Typ 2 (EHV-2). Diss, Tierärztliche Hochschule Hannover 2003.
36. Von Oppen T, Kershaw O, Borchers K, Glitz F, Boevé MH. Keratitiden des Pferdes und Nachweis von equinem Herpesvirus Typ 2 (EHV-2). Tierärztl Prax 2001; 29 (G): 227–233.

PD Dr. Kerstin Borchers  
Institut für Virologie  
Fachbereich Veterinärmedizin  
Freie Universität Berlin  
Philippstraße 13, Haus 18  
10115 Berlin  
E-Mail: borchers@zedat.fu-berlin.de

## REZENSION

### Bild-Text-Atlas zur Anatomie und Klinik des Pferdes. Bewegungsapparat und Lahmheiten

R. J. Riegel, S. E. Hakola, Bd. 1, 2. Aufl.  
272 S., 658 farb. Abb., Hannover: Schlüter-sche 2006, ISBN 3–89993–029–0, € 92,00.  
Der Bild-Text-Atlas zu Bewegungsapparat und Lahmheiten des Pferdes stammt aus dem Amerikanischen und wurde von einem deutschen Team übersetzt und so einem breiten Leserkreis zugänglich gemacht.

Das Buch weist eine ausgesprochen übersichtliche Strukturierung auf, da der Inhalt jeder Textseite auf der gegenüberliegenden Seite sehr anschaulich illustriert ist. Eine umfassende Einleitung führt den Leser didaktisch gekonnt an Anatomie, Biomechanik und diagnostische Verfahren heran. Im Folgenden

werden die einzelnen Anteile der Schulter- und Beckengliedmaße wie auch des Stammes in ihrer Anatomie vorgestellt. Hierauf werden jeweils direkt häufige Erkrankungen des betreffenden Bereichs mit der zugehörigen Diagnosemethodik und Therapie besprochen. Auch Bemerkungen zur Prognose sind enthalten. Ein separates Kapitel widmet sich der Muskellehre, Muskelerkrankungen und physiotherapeutischen Möglichkeiten.

Die Illustrationen bestehen aus beschrifteten farbigen Zeichnungen, die entsprechend durch Röntgenaufnahmen ergänzt werden. Grundsätzlich präsentieren die Autoren pathologische Veränderungen zusammen mit diagnostischen und therapeutischen Verfahren.

Für das weitergehende Literaturstudium finden sich am Ende des Buches

ein ausführliches Literaturverzeichnis sowie Buchempfehlungen. Besondere Erwähnung verdient auch das Glossar mit Definition von Fachbegriffen.

Das Buch versucht, den Bewegungsapparat des Pferdes und seine Erkrankungen gleichermaßen für den interessierten Laien wie auch den Pferdepraktiker zu erklären. Dieses anspruchsvolle Anliegen ist naturgemäß nur mit Einschränkungen zu erfüllen, da dem praktizierenden Pferdetierarzt vieles schon bekannt sein dürfte und daher in dem gebotenen Ausmaß teilweise nicht detailliert genug erscheint. Nichtsdestotrotz bietet das Buch, insbesondere für den weiterdenkenden Studenten sowie Pferdehalter, eine gelungene Kombination von Anatomie und Klinik.

Christiane Pfarrer, Gießen