

**Die Immunantwort von regelmäßig geimpften Maultieren
und Pferden nach intranasaler Verabreichung eines
attenuierten Equiden Herpesvirus-1**

von Carl August Christoph Dumrath

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Die Immunantwort von regelmäßig geimpften Maultieren
und Pferden nach intranasaler Verabreichung eines
attenuierten Equiden Herpesvirus-1**

von Carl August Christoph Dumrath

aus Hamburg

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München Lehrstuhl für Innere
Medizin und Reproduktion des Pferdes

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Lutz Göhring

Mitbetreuung durch

Priv.-Doz. Dr. Claus Peter Bartmann

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Lutz Göhring

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter
Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Kennst du den Berg und seinen Wolkensteg?

Das Maultier sucht im Nebel seinen Weg.

Johann Wolfgang von Goethe

Meiner Familie

Den Equiden im Dienste der Menschheit

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1.	Herpesviren.....	3
1.1.	Taxonomie.....	3
1.2.	Morphologie	4
1.3.	Lyrische und latente Infektion.....	5
2.	Equide und Asinine Herpesviren.....	7
3.	Equides Herpesvirus-1.....	8
3.1.	Epidemiologie	8
3.2.	Pathogenese	12
3.2.1.	Respirationstrakt.....	12
3.2.2.	Virämie	13
3.2.3.	Uterus und Fetus.....	15
3.2.4.	Zentrales Nervensystem (ZNS).....	16
3.2.5.	Auge	17
3.2.6.	Hoden	17
3.2.7.	Virulenz.....	18
3.3.	Immunologie	20
3.4.	Klinische Befunde	28
3.5.	Diagnose	31
3.6.	Therapie.....	35
3.7.	Kontrolle eines EHV-1-Ausbruches.....	40
3.8.	Impfung und prophylaktische Möglichkeiten während eines EHV-1- Ausbruches	42
4.	Maultiere und EHV-1	47
III.	MATERIAL UND METHODEN	51
1.	Tiere	51
2.	Versuchsaufbau	53
2.1.	Intramuskuläre (IM) Impfung mit einem inaktivierten EHV-1 und -4 Vakzin (Experiment 1).....	55

2.2.	Verabreichung eines modifizierten EHV-1 Lebendimpfstoffes (Experiment 2).....	56
3.	Erfassung klinischer Daten	57
4.	Probengewinnung.....	58
4.1.	Blutproben.....	58
4.2.	Nasentupfer	59
5.	Laboranalyse.....	60
5.1.	Virusneutralisationstest (VN-T).....	60
5.2.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	63
5.3.	Komplementbindungstest (CFA)	65
5.4.	Serum Amyloid A - Latex Agglutination Turbometric Immunoassay	66
5.5.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	66
5.6.	Nachweis mukosaler Antikörper/Immunglobuline mittels einer Luminox® Kügelchenfluor-basierten EHV-1-Multiplexanalyse	70
5.7.	Nachweis mukosaler Zytokine mittels eines Luminox® Multiplex Capture Sandwich Immunoassay	72
6.	Statistik.....	73
IV.	ERGEBNISSE	75
1.	Pilotstudie.....	75
2.	Die intramuskuläre Impfung mit inaktiviertem EHV-1, -4 Antigen...76	
2.1.	Klinisch Befunde	76
2.2.	Serum Amyloid A	78
2.3.	Virusneutralisierende Antikörpertiter	79
3.	Die Verabreichung eines modifizierten EHV-1 Lebendimpfstoffes84	
3.1.	Klinisch Befunde	84
3.2.	Polymerase Kettenreaktion	85
3.3.	Virusneutralisierende Antikörper	87
3.4.	Komplementfixierende Antikörper im CFA	89
3.5.	Mukosale Immunglobuline Anti- gB, -gC, -gD	90
3.5.1.	EHV-1-anti- gB	90
3.5.2.	EHV-1-anti- gC	94
3.5.3.	EHV-1-anti- gD	98
3.6.	Mukosale Zytokine IFN- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, und IL-17.....	104

V.	DISKUSSION	105
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	120
VII.	SUMMARY.....	124
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	129
IX.	ANHANG	155
X.	DANKSAGUNG	172

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
a.m.	Ante mortem
AsHV	Asinines Herpesvirus
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	Beziehungsweise
CF	Komplementfixierende Antikörper
CFA	Komplementfixierende Antikörper Assay
cm	Zentimeter
CPE	Zytopathischer Effekt
Ct	Cycle threshold
CTL	Zytotoxische T-Zellen
CTLp	Vorläufer Zytotoxischer T-Lymphozyten
D	Polyasparaginsäure
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Early gene
EAZ 230	Einsatz- und Ausbildungszentrum für Tragtierwesen 230
EC ₅₀	Reduktion der Plaqueformation in equiden embryonalen Lungenzellen um 50%
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHM	Equide herpesvirusassoziierte Myeloenzephalopathie
EHV	Equides Herpesvirus
ELA	Equines Leukozyten Antigen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EREC	Equine respiratorische Epithelzellkultur
FI	Fluoreszierende Intensität
Fig	Schaubild
G	Guanin
g	Gramm
GAG	Glykosaminoklykan
gB	Glykoprotein B
gC	Glykoprotein C

gD	Glykoprotein D
gE	Glykoprotein E
Ggr./ggr.	Geringgradig
gI	Glykoprotein I
H	Haffinger
h	Stunde
Hgr./hgr.	Hochgradig
HSV	Herpes Simplexvirus
i.e.	Id est/ das heißt
i.v.	Intravenös
IAD	Infektiöse Atemwegserkrankung
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IE	Immediate early gene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Intramuskulär
IN	Intranasal
IR	Invertierte Repeatsequenz
IU	Internationale Einheiten
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
L	Liter
LAT	Latenz assoziiertes Transkript
LWMH	Niedrigmolekulares Heparin
M	Maultier
MEM	Minimal essential medium
MFI	Median der fluoreszierenden Intensität
mg	Milligramm
Mgr./mgr.	Mittelgradig
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minuten
mL	Milliliter
MLV	Modifiziertes Lebendvakzin

mm	Millimeter
mol	Mol
mRNA	Messenger-RNA
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
Neg	Negativkontrolle
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	Nicht signifikant
NSAID	Nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente
obB	Ohne besonderen Befund
OD	Optische Dichte
OD _{corr}	Korrigierte optische Dichte
OIE	Welt-Organisation für Tiergesundheit
ORF	Open reading frame
ORT	Oberer Respirationstrakt
p.i.	Post infectionem
p.m.	Post mortem
p.o.	Per os
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-gepufferter Lösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
Pos	Positivkontrolle
PRR	Pattern recognition receptors
qPCR	Quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion
RK-13	Kaninchennierenzellen
RNA	Ribonukleinsäure
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
SAA	Serum-Amyloid A
SIR	Systemische inflammatorische Reaktion
TAP	Antigenpeptid-Transporter

TCID ₅₀	Infektionsdosis bei der 50% des Gewebes infiziert werden
TF	Gewebefaktor
Th	T-Helferzelle
TierSchVersV	Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren
TLR	Toll like Rezeptoren
TMR	Tumornekrosefaktor
TR	Terminale Repeatsequenz
UFH	Unfraktioniertes Heparin
UL	Unique long
ULR	Unique long region
USR	Unique short region
v. Chr.	Vor Christus
VN	Virusneutralisierende Antikörper
VN-T	Virusneutralisationstest
VTM	Virustransportmedium
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
<i>x g</i>	Zentrifugalkraft
µL	Mikroliter

I. EINLEITUNG

Infektionen mit den in der Natur weit verbreiteten Herpesviren werden in einigen Lebewesen mit hoher Morbiditäts- und Mortalitätsrate assoziiert und führen zu ökonomischen und emotionalen Verlusten bei Tierhaltern (KYDD, et al. 2006b). Ins Gewicht fallen sie insbesondere bei Austern, Karpfenarten, Elefanten, Geflügel, Katzen, Hunden, Schweinen, Rindern, Equiden und Menschen (PAILLOT, et al. 2008, DAVISON, et al. 2009, OSTERRIEDER 2011, GOTESMAN, et al. 2013, SEGARRA, et al. 2014, FUERY, et al. 2016).

Neun bisher charakterisierte equide Herpesspezies infizieren weltweit sowohl domestizierte, als auch wilde Einhufer (SLATER 2013). Relevant für die Pferdehaltung und also am besten untersucht sind die Equiden Herpesviren (EHV) -1 und -4. Während letzteres sich im Regelfall auf den oberen Respirationstrakt, die Eintrittspforte des Virus, beschränkt, verursacht EHV-1 zusätzlich Aborte, Chorioretinopathien, vermehrt sich im Hoden und kann eine als Equide Herpesvirus-assoziierte Myeloenzephalopathie (EHM) bezeichnete neurologische Erkrankung zur Folge haben (OSTLUND 1993, HUSSEY, et al. 2013). Impfungen mit inaktiviertem EHV-1-Antigen und modifizierten Lebendimpfstoffen (MLV) können das Risiko eines EHV-1-Ausbruches in der Herde zwar reduzieren, liefern bisher allerdings keinen zuverlässigen, individuellen Schutz vor einer Erkrankung (KYDD, et al. 2006b).

Zuletzt wurden Erkrankungen mit EHV-1 auch häufiger bei Eseln und Maultieren beschrieben (PUSTERLA, et al. 2012b, NEGUSSIE, et al. 2015). Untersuchungen von Ausbrüchen bei Maultieren und Pferden in den USA ließen zunächst die Hypothese aufkommen, Maultieren könnte eine Rolle als symptomlose Ausscheider und in gemischten Equidenherden möglicherweise als Überträger von EHV-1 zuzuschreiben sein (PUSTERLA, et al. 2012b). Jüngst sind in Äthiopien allerdings auch erste Fälle mit schwerer neurologischer Symptomatik in Maultieren dokumentiert worden (NEGUSSIE, et al. 2015). Ungeachtet der akkumulierenden Hinweise, dass sich die Immunantwort auf EHV-1 zwischen den Equidenarten unterscheidet, muss in Ermangelung wissenschaftlicher Erkenntnisse bei der Immunprophylaxe in Maultieren bisher auf das Wissen zurückgegriffen werden, welches in Studien mit Pferden generiert wurde. Esel,

Pferde und Maultiere leisten in zahlreichen globalen Regionen insbesondere in Entwicklungsländern einen entscheidenden Beitrag zur Wirtschaftskraft. Folglich besteht weltweit ein epidemiologisch, ökonomisch und wissenschaftlich begründetes Interesse, die Immunantwort auf EHV-1 sowohl in Pferden als auch in anderen Equidenarten weiter zu untersuchen. Dem wird in dieser Arbeit Rechnung getragen.

Kernziel der Studie war der Vergleich der mukosalen Immunantwort bei Maultieren und Pferden nach intranasaler (IN) Applikation eines attenuierten, gleichzeitig aber replikationsfähigen EHV-1-Antigens, in der Form eines kommerziell erhältlichen Lebendimpfstoffes (MLV) (Rac-H, Prevaccinol[®], MSD, Deutschland). Der Versuchsaufbau umfasste ein Pilotprojekt und einen Hauptversuch aufgeteilt in zwei aufeinanderfolgende Telexperimente. In der Pilotstudie wurde die Replikationskinetik des MLV nach intranasaler Applikation sowie das mögliche Auftreten klinischer Symptome bei zwei Haflingern und zwei Maultieren untersucht; darüber hinaus die spezifische Immunglobulin- und Zytokinsekretion in den Nasengängen beurteilt. In Experiment 1 wurde dann die Entwicklung der humoralen Immunantwort anhand virusneutralisierender Antikörper im Serum (VN) auf die Impfung mit einem handelsüblichen, regelmäßig in der Herde eingesetzten, inaktivierten EHV-1-Impfstoffes (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) analysiert. Vier Monate später wurde denselben Tieren MLV IN verabreicht und anschließend ausgewählte Teile der (un)spezifischen, lokalen, mukosalen Immunität in den Nasengängen sowie die VN-Titer-Entwicklung untersucht (Experiment 2).

Die Arbeitshypothese dieser Studie war somit, dass sich im Tierartenvergleich die humorale Immunantwort sowohl nach einer intramuskulären (IM) Impfung als auch die humorale und mukosale Immunantwort nach IN Applikation eines attenuierten EHV-1 bei Maultieren und Pferden unterscheidet. Die IN Verabreichung eines EHV-1-MLV kann darüber hinaus zu einer rapiden, zeitlich begrenzten Initiation der spezifischen und unspezifischen mukosalen Abwehr in beiden Tierarten führen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Herpesviren

1.1. Taxonomie

Das Wort Herpes stammt aus dem Griechischen. „Herpein“ bedeutet dort „kriechen“ und beschreibt den infolge einer persistierenden Infektion chronisch-rezidivierenden Verlauf der Erkrankungen, die mit Herpesviren in Verbindung gebracht werden (OSTERRIEDER 2011). Unter Berücksichtigung der Koevolutionstheorie und auf der Grundlage der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzierung ist wahrscheinlich, dass Herpesviren auf der Erde seit mindestens einer halben Milliarde Jahre existieren (GROSE 2012). Sie entstanden demnach zunächst in Abalonen und Austern, bevor sie vor etwa 400 Millionen Jahren auch erstmals Vertebraten befielen.

Die Möglichkeit, Unterschiede zwischen den verschiedenen Herpesviren genauer herauszuarbeiten und eine Einteilung in höhere Taxa vorzunehmen verbesserte sich in den letzten Jahrzehnten zunächst durch die Verbreitung der Elektronenmikroskopie und wurde dann durch den Einsatz von Nukleinsäuresequenzierung ab den 1980er Jahren revolutioniert (MCGEOCH, et al. 1988, DAVISON 2010). Nachdem seit 1971 mehrere Versuche einer Taxonomie der Herpesviren vorgenommen wurden (DAVISON 2010), konnte die Ordnung der Herpesvirales 2009 neu definiert werden und ist seitdem in drei Familien aufgeteilt (DAVISON, et al. 2009). Die älteste Familie die Malacoherpesviridae beherbergt den Erreger der Muscheln. Die Alloherpesviridae infizieren Frösche und Fische. Die Erreger der Herpesviridae verursachen Erkrankungen bei Vögeln, Reptilien und Säugetieren (DAVISON, et al. 2009).

Die Herpesviridae können weiter in die drei Subfamilien, die Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae und Gammaherpesvirinae unterteilt werden (OSTERRIEDER 2011). Nach bisheriger Kenntnis kommen nur Alpha- und Gammaherpesvirinae, nicht aber Betaherpesvirinae in Equiden vor. Neun für die Gattung der Equiden infektiöse Herpespezies konnten bisher charakterisiert werden (SLATER 2013). Sie werden, da sie bis auf wenige Ausnahmen einzig Equiden infizieren als EHV-1 bis -9 bezeichnet. Dabei gehören die EHV-1, -3, -4, -6, -8 und -9 zu der

Subfamilie der Alphaherpesvirinae, während EHV-2, -5 und -7 den Gammaherpesvirinae zuzuordnen sind.

Durch die Gruppierung der Spezies in Geni innerhalb der Subfamilien, zählen die EHV-Vertreter der Alphaherpesvirinae zu dem Genus *Varicellovirus* (Bezeichnung von *Varicella* – Windpocken) (DAVISON 1991) und die der Gammaherpesvirinae zu den *Percaviren* (Bezeichnung zusammengesetzt aus *Perissodactyla* und *Carnivore*) (DAVISON, et al. 2009). Allerdings ist der Genus von EHV-7 bisher unbestimmt (DAVISON, et al. 2009).

1.2. Morphologie

Mit ca. 180 - 250 nm Durchmesser gehören die Herpesviren zu den größten Viren, welche Haustiere infizieren können. Sie besitzen eine lineare doppelsträngige DNA, die je nach Virustyp aus 125 000 - 290 000 Basenpaaren besteht (CARTER und SAUNDERS 2013) und von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben wird, das aus 12 pentavalenten und 150 hexavalenten Kapsomeren besteht (DAVISON 2010). Dieses liegt eingebettet in ein aus Proteinen zusammengesetztes Tegument, welches wiederum von einer Hülle aus einer mit 16 verschiedenen Proteinen, überwiegend Glykoproteinen (CARTER und SAUNDERS 2013), besetzten Lipiddoppelschicht (CAMPBELL und REECE 2006) umgeben wird (DAVISON 2010). Die Glykoproteine sind unter anderem für den Eintritt in die Zelle und für die Ausbreitung von Zelle zu Zelle verantwortlich (OSTERRIEDER 2011). Auch die Bindung der Antikörper des Wirtes zur Virusneutralisation findet an den Epitopen der Hüllen-Glykoproteine statt (CRABB und STUDDERT 1993). Die durch eine Vielfalt an Umwelteinflüssen angreifbare Hülle, sorgt somit für die geringe Widerstandsfähigkeit der Herpesviren außerhalb des Wirtes. UV-Licht, Austrocknen, Einfrieren, wieder Auftauen und jegliche Detergenzien – auch milde – inaktivieren sie bereits nach kurzer Zeit (OSTERRIEDER 2011).

Das doppelsträngige DNA-Genom ist in invertierte (IR) und terminale (TR) Repeatsequenzen sowie zentrale, spezifische Sequenzen unterteilt (TELFORD, et al. 1992). Letztere werden als *Unique Long* Regionen (ULR) oder *Unique Short* Regionen (USR) bezeichnet. Im Gegensatz zu ihnen kommen die Repeatsequenzen in gespiegelter Form auf dem Genom ein zweites Mal vor. Das

heißt eine TR entspricht der gespiegelten Form einer IR (SLATER 2013). Die Regionen bestehen aus *Open Reading Frames* (ORF), die für verschiedene Proteine kodieren. ORFs bestehen wiederum aus über Wasserstoffbrücken verbundenen Nukleotiden-Basenpaaren.

Das EHV-1 besitzt 76 ORFs, von denen 63 in einer ULR liegen, 9 in einer USR und jeweils 4 in den IR und TR (SLATER 2013). Letztere fassen dabei die USR ein. Insgesamt befinden sich rund 150 000 Basenpaare in einem EHV-1 DNA-Genom (MA, et al. 2013).

1.3. Lytische und latente Infektion

Das Herpesvirus bindet mittels der Glykoproteine auf seiner Hülle zunächst an Heparansulfate und dann an spezifische Rezeptormoleküle der Wirtszellmembran (CAMPBELL und REECE 2006, CARTER und SAUNDERS 2013). Anschließend dringt es je nach Zelltyp entweder nach Fusion mit der Plasmamembran oder über Endozytose in die Wirtszelle ein und streift seine Hülle und einen Teil des Tegument ab (CARTER und SAUNDERS 2013). Diese abgestreiften Tegumentproteine werden an verschiedene Orte in der Zelle transportiert, an denen sie für die *Downregulation* von DNA, Ribonukleinsäure (RNA) und Proteinsynthese der Zelle verantwortlich sind (CARTER und SAUNDERS 2013). Entlang der Mikrotubuli wandert das Virus in einem energiefordernden Prozess zu den Kernporen. Hier öffnet sich eine Hexone und entlässt unter Druck die virale DNA in den Zellkern (OSTERRIEDER 2011). Innerhalb des Wirtszellkerns ziehen sich Virusproteine und DNA in *Compartments* zurück, in denen die Replikation stattfindet. Diese *Compartments* sind im Elektronenmikroskop als Einschlusskörperchen sichtbar (ROY und WOLMAN 1969). Die Initiation der Replikation erfolgt durch die von dem Virus sehr früh exprimierten *Immediate Early Genes* (IE). Initiationsassoziierte Komponenten werden aus dem Wirtszellkern rekrutiert. Die Transkription der IE folgt. Daraus resultiert die Aktivierung der frühen *Early Genes* (E), welche Bedingung für die DNA-Replikation des Virus ist. Letztere, nimmt man an, läuft zunächst als Theta-Replikation ab und geht anschließend in einen Rolling-Circle-Mechanismus über (CARTER und SAUNDERS 2013). Das heißt, dass zunächst an einem oder mehreren so genannten spezifischen lytischen

Replikationsursprüngen der Doppelstrang gespalten wird und die Replikation an den entstandenen Einzelsträngen in entgegengesetzte Richtungen startet (Theta-Replikation) (BOEHMER und NIMONKAR 2003). Daraufhin findet auf bisher ungeklärte Art und Weise ein Wechsel des Mechanismus statt und die Replikation verläuft nur noch von 3' nach 5' (Rolling-Circle-Mechanismus) (BOEHMER und NIMONKAR 2003). Die neu synthetisierte DNA wird in das Nukleokapsid verpackt, welches einige im Kern synthetisierte Tegumentproteine bindet. Anschließend tritt das Nukleokapsid unter Empfang einer temporären Hülle zunächst in die Peripherie des Nukleus ein. Die temporäre Hülle ermöglicht eine Fusion mit der Kernmembran und den daraus folgenden Eintritt ins Zytoplasma. Hier erhält es zunächst die fehlenden, durch Translation außerhalb des Zellkerns entstandenen Tegumentproteine, bevor es am Golgi-Apparat von der Hülle umgeben wird, welche die im rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Hüllenproteine enthält. Von dort erfolgt der Transport in einem Vesikel durch das Zytoplasma an die Zellmembran, über welche die neue Virionen aus der Zelle entlassen werden (CARTER und SAUNDERS 2013). Dieser Mechanismus wird als lytischer Infektionszyklus bezeichnet, da die Zelle hierbei zugrunde geht.

Alternativ kann ein Herpesvirus auch in den latenten Infektionszyklus eintreten. Bis einschließlich der Injektion der DNA in den Wirtszellkern laufen beide Zyklen gleich ab. Zwar ist in der Latenz die gesamte DNA des Virus im Zellkern vorhanden, die Synthese bleibt aber auf wenige Strangabschnitte beschränkt (CARTER und SAUNDERS 2013). Im Falle von EHV-1 wird vermutet, dass wie beim Herpes simplex Virus-1, ein vom Virus exprimiertes latenz-assoziiertes Transkript (LAT) die vollständige Transkription und Translation der Virus DNA verhindert. Allein die Transkription einer Region antisense zum IE findet statt (SLATER 2013). Die Latenz des EHV-1 wird am häufigsten in den Neuronen der trigeminalen Ganglien (PUSTERLA, et al. 2012a) gefolgt von zirkulierenden Lymphozyten, überwiegend CD 8⁺ T-Lymphozyten (SLATER 2013) und Atemwegsapparat-assoziiertem lymphatischen Gewebe, hier hauptsächlich im *Lymphonodus mandibularis*, den retropharyngealen und bronchialen Lymphknoten ausgebildet (PUSTERLA, et al. 2012a). Erhöhte Strapazierung des Immunsystems jeglicher Ursache kann zur Reaktivierung des Virus aus der Latenz führen. Dabei koppeln sich Botenstoffe an die latent infizierten Zellen und setzen vermutlich eine Signalkaskade in Gang (SMITH, et al. 1998). Aus den T-

Lymphozyten wird das Herpesvirus daraufhin in die Blutbahn entlassen und es kommt zu einer Virämie. Die Reaktivierung von latenten Herpesviren im *Ganglion trigeminale*, resultiert in retrogradem, axonalen Transport infektiösen Viruses in die oberen Atemwege, dem Punkt primärer Infektion (PUSTERLA, et al. 2012a). Dort wird hiernach Virus ausgeschieden (Rekrudescenz) und möglicherweise übertragen, weshalb Latenz, Reaktivierung und Rekrudescenz von großer epidemiologischer Bedeutung sind (PUSTERLA, et al. 2010). Gleichzeitig wird vermutet, dass eine Reaktivierung wahrscheinlich nur sehr selten von einer klinischen Erkrankung begleitet wird (SLATER, et al. 1994, ALEMAN, et al. 2012).

2. Equide und Asinine Herpesviren

Von den oben bereits taxonomisch definierten neun Equiden Herpesviren infizieren EHV-1 bis -5 überwiegend die domestizierten Pferderassen, während wilde Equiden, wie z. B. Zebras von EHV-6 bis -9 betroffen sind (SLATER 2013). Aufgrund der Symptomatik wird das EHV-1 auch als „Equides Abortvirus“ bezeichnet, spricht man beim EHV-3 auch vom „Coital Exanthema Virus“ und das EHV-4 wird ferner „Equides Rhinopneumonitis Virus“ genannt (PAILLOT, et al. 2008, DAVISON, et al. 2009). Der Name „Equides Rhinopneumonitis“ Virus, vormals auch für EHV-1 verwendet, ist allerdings nicht ganz unumstritten, da das klinische Bild nur sehr selten eine Pneumonie beinhaltet. Auch mit den anderen EHV Typen wurden bestimmte klinische Erkrankungen in Verbindung gebracht. So gelang in einem Infektionsexperiment mit EHV-2 die Provokation einer subklinischen infektiösen Atemwegserkrankung (IAD). Daraus ergibt sich, dass das Virus möglicherweise zur Beeinträchtigung der Leistung bei Sportpferden führen kann (FORTIER, et al. 2013). Allerdings bleibt die pathogene Rolle des in der Equidenpopulation weitverbreiteten EHV-2 weiter unklar (FORTIER, et al. 2013). Ebenso bleibt die häufig genannte Assoziierung des EHV-2 mit Keratokonjunktivis anfechtbar (BORCHERS, et al. 2006). EHV-5 kann bei Pferden unter noch nicht geklärten Umständen eine multinodulare pulmonare Fibrose verursachen (WILLIAMS, et al. 2007, WILLIAMS, et al. 2013). EHV-9, mit dem EHV-1 genetisch enger verwandt ist als mit EHV-4, hat eine breite Wirtsspezifität. Erstmals in einer Thomson's

Gazelle mit Enzephalitis nachgewiesen (FUKUSHI, et al. 1997), wurde es zunächst als Gazelle Herpesvirus 1 deklariert, zeigte aber Kreuzreaktivität mit EHV-1 im Virus Neutralisationstest (FUKUSHI, et al. 2012). Auch bei Eisbär und Giraffe führte EHV-9 zu Enzephalitiden (KASEM, et al. 2008, DONOVAN, et al. 2009).

Aus Eseln konnten bisher 6 Herpesviren isoliert werden, die als Asinine Herpesviren (AsHV) -1 bis -6 bezeichnet werden. Dabei entspricht das AsHV-1, welches von einem Eselfohlen mit vesikulären und erosiven Läsionen am Maul isoliert wurde (KLEIBOEKER, et al. 2002), interessanterweise dem EHV-6 (DAVISON, et al. 2009), wogegen diese Symptome bei EHV-Infektion dem EHV-3 zugeschrieben werden. AsHV-2, das aus Leukozyten eines gesunden Esels isoliert wurde (BROWNING, et al. 1988), korrespondiert mit dem EHV-7 und AsHV-3, welches in einem gesunden Esel nach starker Cortison-Gabe nachgewiesen wurde, stimmt mit dem EHV-8 überein (DAVISON, et al. 2009). AsHV-4 bis -6 wurden aus Eseln isoliert, die in der Pathologie eine interstitielle Pneumonie mit Synzytiumzellformation aufwiesen (KLEIBOEKER, et al. 2002, KLEIBOEKER, et al. 2004). Alle drei Virustypen sind der Subfamilie der Gammaherpesvirinae zuzuordnen (KLEIBOEKER, et al. 2004). Jüngst wurde der Abort eines Zwergeselstutens im Mittelmeerraum mit einem Virus assoziiert, welches Synzytiumzellformation in der Plazenta verursachte und dessen Nukleotidsequenz zu 97% mit EHV-7 übereinstimmte (LECUYER, et al. 2015). Am Ontario Veterinary College in Kanada wurde außerdem ein weiteres Gammaherpesvirus aus einer Eselstute, die neurologisch erkrankt war, isoliert (VENGUST, et al. 2008).

3. Equides Herpesvirus 1

Von den Doktores W. W. Dimock und P. R. Edwards 1933 erstmals beschrieben, war EHV-1 aufgrund der mit ihm assoziierten Komplikationen Ursache zahlreicher Studien und ist das bis heute am besten untersuchte und für die Equidenpopulation bedeutendste Equide Herpesvirus (KYDD, et al. 2006b).

3.1. Epidemiologie

In der Außenwelt kaum überlebensfähig, wird EHV-1 in erster Linie über direkten

Kontakt, Tröpfchen- oder Schmierinfektion im Bereich des oberen Respirationstraktes, z. B. durch das Berühren der Nüstern zweier Pferde, bei der Kontaktaufnahme, aber auch über kurze Distanz durch sowohl belebte (z. B. Personen), als auch unbelebte Vektoren (z. B. Eimer, Zaum- und Sattelzeug) übertragen (SHERMAN, et al. 1979, REED und TORIBIO 2004, OSTERRIEDER 2011). Insbesondere stellen aber Nachgeburten und in Folge einer EHV-1-Infektion abortierte Feten aufgrund ihrer hohen Virusbelastung eine gefährliche Infektionsquelle dar (REED und TORIBIO 2004). Pferde mit latenter Infektion, die erhöhten Belastungen ausgesetzt sind und in denen das Virus reaktiviert wird, nehmen wie oben beschrieben entweder als klinisch auffällige oder aber häufig als symptomlose Ausscheider eine entscheidende Rolle bei der Übertragung von EHV-1 ein.

Bedingt durch die Kreuzreaktivität der humoralen Antikörper von EHV-1 und -4 war es lange Zeit nicht möglich mittels serologischer Untersuchungen zwischen den beiden Typen zu unterscheiden. Erst Crabb et al. und Lang et al. entwickelten praktikable typspezifische *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) Verfahren (CRABB, et al. 1995, LANG, et al. 2013). Seitdem ersterer kommerziell erhältlich ist, können Populationen einfacher auf die Seroprävalenz des jeweiligen EHV-Typs untersucht werden (CRABB, et al. 1995).

Seitdem wurden weltweit einige serologische Studien zu Erhebung der Prävalenz von EHV-1 und -4 durchgeführt. Demnach tritt das Virus überwiegend in Europa und den USA auf, aber auch in Südamerika in Vorder-, Zentral und Ostasien, Nord- und Südafrika sowie Australien (GILKERSON, et al. 1999a, TSUJIMURA, et al. 2011, NEGUSSIE, et al. 2015, SCHULMAN, et al. 2015, YILDIRIM, et al. 2015). So waren 1995 in 271 Proben von Australischen Vollblütern 30% EHV-1 seropositiv, während in 100% der getesteten Population hohe EHV-4 Antikörper nachgewiesen werden konnten (CRABB, et al. 1995). Im Hunter Valley in New South Wales wurden 1999 229 Stuten und ihre Fohlen in 99% der Fälle EHV-4 seropositiv und jeweils 26% beziehungsweise 11% EHV-1 seropositiv getestet (GILKERSON, et al. 1999b). In der Türkei wurde in Pferden eine Seroprävalenz von 15% für EHV-1 und 82% für EHV-4 ermittelt (ATASEVEN, et al. 2009). Eine weitere Studie im Nordosten der Türkei testete 52% der 666 Proben, die von Eseln und Pferden genommen wurden, EHV-1 und 77% EHV-4 positiv und weist außerdem auf die wahrscheinliche Ausbreitung nach Georgien und Armenien

aufgrund eines unkontrollierten Grenzverkehrs mit Equiden hin (YILDIRIM, et al. 2015). Akhmedzhanov et al. ermittelten eine Seroprävalenz von 87% für EHV-1 in 221 Stuten ansässig im Norden und Osten Kirgisistans, die im Vorjahr in der späten Trächtigkeitsphase abortiert hatten (AKHMEDZHANOV, et al. 2017). Allerdings konnte nur in einem Fall EHV-1 aus dem Abortmaterial isoliert werden. In 289 Pferden in Deutschland, wurden in 82% der Fälle EHV-1 und bei 95% Antikörper gegen EHV-4 im Peptid basierten ELISA detektiert. Der hohe Wert für EHV-1 in letzterem Falle ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in den Beständen aus denen die Probanden stammten, die Pferde regelmäßig gegen beide Equiden Herpesviren geimpft worden waren (LANG, et al. 2013).

Interessanterweise ist die Equidenpopulation Islands bis heute ausnahmslos serologisch negativ auf EHV-1 getestet worden (OIE 2013).

In den USA wählten Pusterla et al. für eine epidemiologische Studie zu EHV-1 und EHV-4 den Ansatz anhand von Nekropsien die Prävalenz der latent infizierten Pferde in einer *polymerase chain reaction* (PCR) zu ermitteln. In 70 Vollblütern wurden bei 26% EHV-1- und bei 83% EHV-4 DNA nachgewiesen (PUSTERLA, et al. 2012a).

Die Häufigkeit des Auftretens klinischer Ausbrüche von EHM ist dabei möglicherweise von der Jahreszeit abhängig. In einer Studie zu EHM, in den Niederlanden, in der über vier Jahre neun Ausbrüche untersucht wurden, traten diese stets in den Monaten November bis Mai, nicht aber im Sommer auf (GOEHRING, et al. 2006).

Dieselbe Studie beschreibt auch eine Prädisposition der verschiedenen Rassen, des Alters und des Geschlechts, eine neurologische Erkrankung zu entwickeln. So waren Traber und Kaltblüter sehr viel häufiger betroffen als ursprüngliche Rassen, während bei Fjordpferden, Isländern und Haflingern keine Symptomatik auffällig wurde. Gleichzeitig konnte ein schwerer Verlauf eher älteren Pferden und Stuten zugeschrieben werden. Pferde jünger als drei Jahre erkrankten nicht (GOEHRING, et al. 2006). Allerdings war die Anzahl der untersuchten Tiere gering. Auch Allen beschrieb ein erhöhtes Risiko bei Pferden älter als 20 Jahre EHM zu entwickeln, verglichen mit Probanden jünger als 15 Jahre (ALLEN 2008). Aufgrund dieser Studie hat sich das ‚*Old Horse Model*‘ etabliert, das

nahelegt, ältere Stuten in den Studien zur Untersuchung von EHM einzusetzen. Insgesamt ist die Anzahl der Meldungen EHV-1-assoziiert neurologischer Erkrankungen in den letzten Jahren angestiegen wobei die Ursache dafür noch nicht ganz geklärt ist (PUSTERLA und HUSSEY 2014). Wahrscheinlich liegt diese Zunahme aber darin begründet, dass das Melden eines Ausbruchs über soziale Medien und professionelle Foren erheblich vereinfacht worden ist und darüber hinaus in einigen Staaten der USA mittlerweile eine Meldepflicht für EHM-Ausbrüche besteht (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE 2017). 2011 wurde in Nordamerika der größte EHM Ausbruch aller Zeiten gemeldet. Den Ursprung hatte er auf einer Pferdegroßveranstaltung an der ca. 1000 Tiere teilnahmen. Von 52 bestätigten EHV-1-Fällen erkrankten 32 Pferde an EHM, von denen 12 eingeschläfert werden mussten (TRAUB-DARGATZ, et al. 2013).

Ab welchem Alter Pferde mit EHV-1 und EHV-4 infiziert werden können untersuchten Gilkerson et al. in einer Studie mit 229 Stuten und 229 saugenden Fohlen in Australien (GILKERSON, et al. 1999b). Während 26% der Stuten EHV-1 seropositiv waren, konnten nur in 11% der Fohlen Antikörper gegen das Virus nachgewiesen werden. Die serologisch EHV-1-positiven Fohlen waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Schnitt 126 Tage alt und noch nicht abgesetzt, das jüngste war 61 Tage alt. Die infizierten Fohlen stammten sowohl von seronegativen als auch von seropositiven Muttertieren. Die Studie zeigte somit, dass die Probanden sich sowohl bei den Mutterstuten, als auch untereinander angesteckt hatten. Außerdem folgerten die Autoren, dass Fohlen bereits mit 30 Lebenstagen infiziert werden können, wenn der maternale Schutz, den der Nachwuchs durch Antikörper über das Kolostrum erhalten hat, zurückgegangen ist (GILKERSON, et al. 1999b).

Seit 1988, als ein Herpesvirus, welches von EHV-1 nicht zu unterscheiden war, aus Alpakas und einem Lama mit Enzephalitis und Retinitis isoliert wurde (REBHUN, et al. 1988), traten mehrfach Fälle auf, in denen EHV-1 in anderen Tierarten als Equiden mit Erkrankungen in Verbindung gebracht wurde. So starben 2011 in einem zoologischen Garten vier amerikanische Schwarzbären (*Ursus americanus*) an neurologischer Erkrankung. In einem weiteren Zoo erkrankten unabhängig davon zwei Thomson's Gazellen (*Eudorcas thomsoni*) und 18 Meerschweinchen (*Cavia porcellus*) ebenfalls neurologisch. In allen Fällen

wurde *post mortem* (p.m.) über Virusisolation und PCR EHV-1 nachgewiesen (WOHLSEIN, et al. 2011).

3.2. Pathogenese

3.2.1. Respirationstrakt

Die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes (ORT) sind die Eintrittspforte des EHV-1. Hier findet eine erste Virusvermehrung statt, die nach lytischer Replikation des Virus den Tod von Epithelzellen verursacht (SLATER 2013). Infolgedessen kommt es zu Erosionen des Epithels und zur Virusausscheidung, die wahrscheinlich bis mindestens 14 Tage nach Eintreten klinischer Symptome in einem Bestand anhalten kann (BURGESS, et al. 2012). Auf diese Weise kann sich das EHV-1 in der Herde verbreiten und sichert also seine Persistenz in der Equidenpopulation (GRYSPEERDT, et al. 2010).

Die Replikation läuft unter Bildung virusinduzierter Plaques im Epithel der Nasengänge und des Nasopharynx ab. Welche Voraussetzungen unbedingt gegeben sein müssen, damit EHV-1 in die Epithelzellen eintreten kann, ist allerdings noch nicht geklärt (PAILLOT, et al. 2008, GRYSPEERDT, et al. 2010). EHV-1 nutzt aber wie andere α -Herpesviren die Rezeptoren gB, gC, gD und gM für den Zelleintritt (PAILLOT, et al. 2008). Frampton et al. kamen bei dem Versuch, den EHV-1 spezifischen Rezeptor für den Eintritt zu ermitteln zu dem Ergebnis, dass *in vitro* für den Eintritt des EHV-1 in gegen das Herpes simplexvirus 1 (HSV 1) resistente Zellen die Expression des Glykoprotein D (gD) essentiell ist. Der Eintritt wird dabei durch die Präsenz von Glykosaminoglykanen (GAG) deutlich erleichtert (FRAMPTON, et al. 2005). Wenig später konnte dann gezeigt werden, dass EHV-1 auch über Endozytose oder Phagozytose und direkte Fusion mit der Plasmamembran in die Wirtszelle eintreten kann, allerdings für den Eintritt die Protein-Kinase ROCK1, welche in zahlreichen Geweben exprimiert wird, essentiell ist (FRAMPTON, et al. 2007). Außerdem wurde der *Major Histocompatibility Complex* (MHC) *Class I* von Kurtz et al. *in vitro* als Eintrittsrezeptor für EHV-1 ermittelt (KURTZ, et al. 2010). Virusinfizierte Zellen können unter experimentellen Bedingungen bereits nach einer Stunde anhand exprimierter Virusproteine detektiert werden

(GRYSPEERDT, et al. 2012). In infizierten Zellen des nasopharyngealen Epithels findet eine Verbreitung des Virus von Zelle zu Zelle statt, wobei eine daraus resultierende Plaqueformation *in vitro* in einem Explantat equider respiratorischer Mukosa nur bis an die Basalmembran heranreichte (VANDEKERCKHOVE, et al. 2010). Die Verbreitung von Zelle zu Zelle findet unter Verwendung der Rezeptoren gB, gD, gE, gI, gK und gM statt (PAILLOT, et al. 2008). Die Basalmembran wird dann mit Hilfe von CD172a⁺ Monozyten, CD5⁺ T-Lymphozyten und möglicherweise auch noch von anderen Immunzellen der nasopharyngealen Mukosa wahrscheinlich im antigenpräsentierenden Prozess überquert. Auf diesem Wege wird das EHV-1 allem Anschein nach auch weiter durch das Bindegewebe bis zu den Blut- und Lymphgefäßen transportiert, in denen es nach zwei bis vier Tagen nachweisbar ist (VANDEKERCKHOVE, et al. 2010). Im Falle einer Infektion der CD172a⁺ Monozyten konnte jüngst gezeigt werden, dass EHV-1 die Replikation in seinen Zielzellen verzögert, um dem Immunsystem zu entgehen, wahrscheinlich um sich möglichst unerkant im Organismus zu verteilen (LAVAL, et al. 2015). Im assoziierten Lymphgewebe des Respirationstraktes ist das Virus bereits nach zwölf Stunden nachweisbar (KYDD, et al. 1994). Nach experimenteller Infektion konnte EHV-1 auch an verschiedenen Tagen *post infectionem* (p.i.) in den Tonsillen des Nasopharynx und der *Tuba auditiva*, den Mandibularlymphknoten, dem Siebbein, dem kranialen Tracheaabschnitt (GRYSPEERDT, et al. 2010), sowie aus den tieferen Abschnitten des Respirationstraktes isoliert werden (SLATER 2013). Abhängig von Infektionsdosis, Strangtyp, Immunität des Wirtes und weiteren bisher ungeklärten Faktoren, bleibt die Infektion entweder auf den Respirationstrakt beschränkt, erstreckt sich möglicherweise nur bis in das assoziierte Lymphgewebe oder aber es kommt zur Ausbildung einer Virämie (GOEHRING und SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN 2001).

3.2.2. Virämie

Die Präsenz des Virus im Blut, die als Virämie bezeichnet wird, ist beim EHV-1 streng zellassoziiert und es ist nur selten freies Virus im Blut nachweisbar (SLATER 2013). In erster Linie bewegt das EHV-1 sich in von ihm infizierten mononuklearen Blutzellen, den *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC).

Wilsterman et al. untersuchten in ihrer Studie die Prävalenz des EHV-1 in vier PBMC Untergruppen (CD4⁺ T-Lymphozyten, CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten) *in vivo* nach experimenteller Infektion. In allen Untergruppen war das Virus mittels PCR nachweisbar. Die höchsten Virusmengen wurden in CD8⁺ T-Lymphozyten, in B-Lymphozyten und in Monozyten nachgewiesen, während die CD4⁺ T-Lymphozyten am wenigsten Virus enthielten (WILSTERMAN, et al. 2011). In der Folge infiziert das EHV-1 Endothelzellen und verursacht vaskuläre Läsionen, welche zu Thrombus-assoziiertes Ischämie und daraus resultierenden Schäden im Gewebe führen können (EDINGTON, et al. 1986). Diese treten vor allem in den Gefäßen der Blutversorgung des trächtigen Uterus und des kaudalen Rückenmarkes auf. Der Virustransfer aus den Leukozyten in die Endothelzellen kommt bei engem Kontakt der Leukozyten mit der Gefäßwand zustande, möglicherweise, weil sowohl die Leukozyten, als auch die Endothelzellen Adhäsionsmoleküle präsentieren (SMITH, et al. 2002). Goehring et al. beschrieben die Infektion von Gehirn-Endothelzellen und Endothelzellen der *Arteria carotis in vitro* als kontaktmedierten Prozess (GOEHRING, et al. 2011). Außerdem postulierten Yeo et al., dass virusinfizierte Monozyten die Expression des Gewebefaktors (TF) stimulieren, welcher die Gerinnungskaskade aktiviert. Somit könnte das EHV-1 auch auf diesem Wege das Bild der klinischen Thrombose induzieren (YEO, et al. 2013). Die Hypothese der Aktivierung der Gerinnungskaskade unterstützte auch eine Studie von Goehring et al., welche das Auftreten von D-Dimeren untersuchte und erhöhte Werte ausschließlich während der Virämie feststellte. D-Dimere sind das Abbauprodukt des Fibrin und ein wichtiger Bestandteil der Gerinnungskaskade (GOEHRING, et al. 2013). In einem weiteren Experiment untersuchten Stokol et al. die Möglichkeit einer Blutplättchenaktivierung bei Exposition mit EHV-1 *ex vivo* (STOKOL, et al. 2015). Die EHV-1-Stränge RacL11 und Ab4 aktivierten innerhalb kürzester Zeit Thrombozyten. Zum einen präsentierte dabei wahrscheinlich sowohl freies, als auch an Thrombozyten gebundenes Virus den TF auf seiner Hülle, aktivierte dadurch den Faktor X der Gerinnungskaskade und generierte somit Thrombin, das wiederum zur Freisetzung von α -Granula und damit zur Expression des proinflammatorischen Mediators P-Selectin führte. Zum anderen kam es durch die Bindung von EHV-1 an die Thrombozyten zur Mikrovesikulation und in der Folge zur Freisetzung kleiner membrangebundener Partikel, welche ihrerseits stark

koagulationsfördernde Phosphatidylserine exprimierten. Gleichzeitig sorgte eine Thrombin-unabhängige Komponente ebenfalls für Mikrovesikulation. Die Aktivierung ist demzufolge möglicherweise ein Prozess der angeborenen Immunabwehr, welcher der Beseitigung des Virus dient. Gleichzeitig ist sie aber wahrscheinlich auch an der EHV-1-assoziierten Thromboinfarzierung des neuronalen Gewebes und des Uterus beteiligt, da Mikrovesikulation zu TF-Aktivierung und Thrombingeneration führen und P-Selectin die Plättchenadhäsion an Endothelzellen und folglich Vaskulitis verursachen kann (STOKOL, et al. 2015).

Infolge einer Virämie konnte das Virus in zahlreichen Organen anhand PCR nachgewiesen werden. Diese Organe werden als Organe sekundärer Replikation bezeichnet (SLATER 2013). Es ist allerdings wahrscheinlich, dass das EHV-1 über aus den Gefäßen emigrierte PBMCs in diese Organe gelangte und als „unbeteiligter Dritter“ angesehen werden kann, der in der Regel nicht zu klinisch sichtbaren Dysfunktionen führt.

3.2.3. Uterus und Fetus

Eine Virämie ist die Voraussetzung für einen EHV-1 induzierten Abort oder lebensschwach geborene Fohlen, die in der Regel kurz nach der Geburt sterben. Aborte können einzeln oder als sogenannte „Abortstürme“ ab dem fünften Trächtigenmonat auftreten, ereignen sich aber in der Regel ab dem achten Monat als plötzliches Vorkommen (KYDD, et al. 2006b). Der Transport des Virus in EHV-1 infizierten Leukozyten zum trächtigen Uterus kann sowohl im Rahmen einer Erstinfektion, als auch einer Reaktivierung des Virus aus der Latenz geschehen (PATEL und HELDENS 2005). Das Virus nimmt dabei in späteren Phasen der Trächtigkeit möglicherweise größeren Einfluss auf die Blutversorgung des Uterus. In einer Studie, die thromboischämische Schäden und Veränderungen im Endothel untersuchte, wurde bei tragenden Stuten ab dem neunten Trächtigenmonat eine deutlich höhere Anzahl vaskulärer Läsionen im Vergleich zum dritten und fünften Trächtigenmonat beschrieben (SMITH, et al. 1996). Allerdings handelte es sich weder um dieselben Tiere noch um dasselbe Virus und die Anzahl der Probanden war gering. Zu EHV-1 induzierten Aborten kommt es in der Regel im letzten Drittel der Trächtigkeit (SLATER 2013). Der

Grund dafür könnte ein kontinuierlicher Anstieg der Gerinnungsfaktoren Fibrinogen, Faktor VIII und von Willebrand-Faktor sein, der ab Mitte der Trächtigkeit bis zum Abfohlen im Plasma der Stuten messbar ist (SMITH, et al. 1996). In einer Studie, die den Mechanismus des EHV-1 zur Infektion des Fetus untersuchte, konnte das Virus in Zellablagerungen innerhalb der Drüsen des Endometriums, sowie innerhalb nekrotischer Ablagerungen infarzierter Mikrokotyledonen nachgewiesen werden (SMITH und BORCHERS 2001). Die Autoren folgern daraus, dass das Virus über die Infarkte unter Umgehung der Abwehr des Wirtes, sowie durch Entleerung der Drüsen auf das Epithel des Trophoblasten und möglicherweise über Zell-zu-Zell-Verbreitung aus Kapillaren innerhalb der Kotyledonen auf den Fetus übertragen wird. In diesem Falle spricht man von einem „typischen EHV-1 induzierten Abort“. Kommt es zu großflächigen vaskulären Veränderungen, abortiert die Stute möglicherweise bevor das Virus auf den Fetus übertragen wurde und in der ausgestoßenen Frucht ist kein EHV-1 nachweisbar. In diesem Falle spricht man von einem „atypischen EHV-1 induzierten Abort“ (SLATER 2013). Langzeitschäden aufgrund eines EHV-1 induzierten Abortes sind ungewöhnlich und die meisten Stuten bringen im Folgejahr ein gesundes Fohlen zur Welt (PUSTERLA und HUSSEY 2014).

3.2.4. Zentrales Nervensystem (ZNS)

Wie dem Abort, geht auch der EHM eine Virämie voraus und die Pathogenese ist ähnlich. EHM ist allerdings ein multifaktorielles Geschehen, bei dem Immunstatus, Alter, Rasse und Geschlecht eine Rolle spielen, weshalb nur ein Bruchteil der virämischen Tiere eine EHM entwickelt (PUSTERLA und HUSSEY 2014). Wie im Kapitel zu Virämie beschrieben, verursachen Vaskulitis, perivaskuläre Entzündungen und Thromboischämie infolge einer Endothelinfektion Schäden an neuronalem Gewebe, die von einem neurologischen Gangbild bis hin zu Lähmungserscheinungen führen können. Selten wurde EHV-1 aus dem ZNS isoliert und es gibt nahezu keine Hinweise auf eine lytische Infektion in den Neuronen (SLATER 2013). In der Regel treten die Symptome neun bis 13 Tage nach der Infektion auf und folgen auf den zweiten Fieberschub, der mit der Virämie assoziiert wird (GOEHRING, et al. 2013, PUSTERLA und HUSSEY 2014). Aufgrund der klinischen Symptome spricht

man je nach betroffenem Bereich des ZNS in der Regel von einer Myelopathie. In seltenen Fällen können sich die Schäden auch über den Hirnstamm ausbreiten, in welchem Falle die Komplikationen dann als Myeloenzephalopathie bezeichnet werden. Interessanterweise scheinen Equiden nur einmal in ihrem Leben eine EHV-1-assoziierte EHM entwickeln zu können, jedenfalls sind Fälle in denen Individuen wiederholt neurologische Symptomatik infolge einer EHV-1-Infektion zeigten, nicht dokumentiert (SLATER 2013). Dies ist wahrscheinlich auf einen infolge der Erkrankung anhaltenden immunologischen Schutz zurückzuführen.

3.2.5. Auge

Im Jahr 1988 wurde erstmals eine EHV-1-assoziierte Chorioretinopathie in Alpakas diagnostiziert (REBHUN, et al. 1988). Seitdem weiß man, dass die Pathogenese des Virus auch mikrovaskuläre Schäden in der Chorioretina verursachen kann, welche zu fokalen oder multifokalen aufgrund ihres Erscheinungsbildes sogenannten „Shot-Gun-Läsionen“ führen (PUSTERLA und HUSSEY 2014). Im Rahmen der Weiterentwicklung von Modellen zur Untersuchung der EHM-Pathogenese untersuchten Hussey et al. 2013 die EHV-1 assoziierte Chorioretinopathie in einem Infektionsversuch (HUSSEY, et al. 2013). Dabei entwickelten in zwei Experimenten jeweils 50% und 90% der Tiere chorioretinale Läsionen, die zwischen drei Wochen und drei Monaten nach der Infektion auftraten. Die Autoren gehen davon aus, dass die Virämie auch im Chorion zu ischämischen Phasen führt, die wiederum ein Absterben des Pigmentepithels der Retina in den darüber liegenden Gebieten zur Folge haben können. Klinische Erkrankung zeigten die Tiere nicht. Anscheinend spiegelt die Pathogenese in Chorion und Retina also die der Vaskulopathie im ZNS wieder und eignet sich möglicherweise als Versuchsmodell zur Untersuchung desselben (BURGESS, et al. 2012).

3.2.6. Hoden

Tearle et al. beschrieben erstmals die venerische Ausscheidung von EHV-1 in Ponys sowie die Replikation des Virus in Hoden und Epididymis nach experimenteller Infektion (TEARLE, et al. 1996). Weiter konnte Carvalho et al.

bei drei Hengsten, die keine klinischen Symptome zeigten, EHV-1 mittels PCR im Samen nachweisen (CARVALHO, et al. 2000). Daraufhin untersuchte Hebia-Fellah et al. das Vorkommen der EHV-1 und -4 im Samen von 390 Hengsten. Die Autoren konnten in 51 Hengsten DNA des EHV-1 detektieren, allerdings in keinem der Probanden EHV-4. Dabei waren die Hengste, die gegen EHV-1 geimpft waren seltener positiv (15%), als die ungeimpften Tiere (25%) (HEBIA-FELLAH, et al. 2009). Gleichzeitig schien vorhandenes Virus keinen Einfluss auf die Fertilität zu haben. Fritsche und Borchers wiesen im Samen eines klinisch gesunden Hengstes EHV-1 nach, der von einem Gestüt stammte, auf dem es zu einem Ausbruch mit Aborten und neurologischen Fällen gekommen war (FRITSCHKE und BORCHERS 2011). Walter et al. untersuchten die venerische Virusausscheidung während eines EHV-1-Ausbruches (WALTER, et al. 2012). Zwei von drei Hengsten, die regelmäßig geimpft worden waren, schieden über jeweils 18 und 20 Tage nach Auftreten eines Fiebers Virus über das Sperma aus (WALTER, et al. 2012). Die oben genannten Studien postulieren eine mögliche Organaffinität des EHV-1 neben trächtiger Gebärmutter und den versorgenden Blutgefäßen des zentralen Nervensystems auch zu den Hoden (HEBIA-FELLAH, et al. 2009). Es bedarf weiterer Studien, um die venerische Übertragung des Virus und mögliche Folgen des Virus für den Hengsthoden zu untersuchen (WALTER, et al. 2012). Sicher ist jedoch, dass eine Impfung nicht vor der Ausbreitung des EHV-1 in den Hoden schützen kann (HEBIA-FELLAH, et al. 2009, WALTER, et al. 2012).

3.2.7. Virulenz

Von den im Kapitel Epidemiologie genannten Faktoren abgesehen, wird die Schwere des Krankheitsverlaufes durch EHV-1-Infektion auch der genetischen Variation einzelner EHV-1-Stränge zugeschrieben. Unterschieden wird zwischen einerseits virulenten Strängen, die Virämie und in der Folge entweder Abort oder EHM oder auch beides verursachen können und andererseits weniger virulenten Stämmen, die auf den ORT beschränkt bleiben (SLATER 2013). Hohes pathogenes Potential haben unter anderen die Stränge Army 183, Ab4 oder OH03; weniger virulent sind dagegen V592 und Mar87 (FRITSCHKE und BORCHERS 2011). Einige wurden in Stranganalysen und Infektionsexperimenten genauer

untersucht. Einen bedeutenden Schritt taten Nugent et al., die bei der Analyse von 131 Feldsträngen, die während Ausbrüchen in einem Zeitraum von 30 Jahren isoliert und für welche teilweise auch Anzeichen von EHM dokumentiert wurden, den pathogenen Phänotypen an dem Polymorphismus eines einzigen Nukleotids im ORF 30 ausmachten. 86% der Isolate, welche von EHM-Ausbrüchen stammten, kodierten G_{2,254} (Guanin), welches mit der Aminosäure D₇₅₂ (Polyasparaginsäure) korrespondiert, während 95% der nicht mit EHM assoziierten Isolate A_{2,254} (Adenin) kodierten, welches der Aminosäure N₇₅₂ (Asparagin) entspricht (NUGENT, et al. 2006). Diese Isolate wurden dann in der Folge je nach Phänotyp als neuropathogener (D₇₅₂) beziehungsweise als nicht neuropathogener (N₇₅₂) Strang bezeichnet. Zu den Strängen, die G_{2,254} kodieren gehört neben den oben genannten mit hohem pathogenen Potential auch der attenuierte Rac-H, der in den modifizierten Lebendvakzinen Prevacinol[®] (MSD, Deutschland) und Rhinomune[®] (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., USA) auf dem Markt ist. Neurologische Erkrankungen im Zusammenhang mit diesem Strang sind allerdings nicht bekannt. Dies ist möglicherweise dem in diesem Strang einzigartigen Polymorphismus an der Aminosäureposition 753 (Serin statt Thyrosin) der viralen Polymerase zuzuschreiben (NUGENT, et al. 2006). Im Vergleich mit Herpesviren anderer Spezies fanden Nugent et al. heraus, dass in beinahe allen Typen die DNA Polymerase Position 752 als Säurerest konserviert und mit D besetzt ist. Dies führte zu der Hypothese, dass EHV-1 wahrscheinlich ursprünglich D₇₅₂ kodierte und N₇₅₂ später und aufgrund eines selektiven Vorteils entstand. Da Ausbrüche mit neuropathogenen Strängen seltener auftreten als die mit nicht neuropathogenen, könnten D₇₅₂-Stränge möglicherweise spontan entstehen, aber grundsätzlich einen selektiven Nachteil gegenüber den N₇₅₂ haben (NUGENT, et al. 2006). Dagegen folgert eine Studie von Smith et al., dass neuropathogene Stränge einen selektiven Vorteil gegenüber nicht neuropathogenen Strängen haben könnten. Sie hatten EHV-1-assoziierte Aborte zwischen 1950 und 2006 analysiert und festgestellt, dass G_{2,254}-Stränge zwar nur in 9% der Fälle vorkamen, während in 89% A_{2,254} detektiert wurde, allerdings existiert G_{2,254} seit spätestens 1950 in der Zuchtstutenpopulation Kentuckys und die Präsenz zwischen den 1960ern und 1990ern hat nachweisbar zugenommen (SMITH, et al. 2010). Die Untersuchung von 66 Strängen aus Deutschland, die mit Aborten in Verbindung gebracht wurden wies in 11% (7 Stuten) den Strangtyp G_{2,254} nach, von denen zwei neurologisch erkrankten (FRITSCHKE und

BORCHERS 2011).

Das abortogene Potential von OH03 und Ab4, beides G_{2,254} Stränge, wurde in einem Infektionsexperiment untersucht. Eine von sieben Stuten, die mit OH03 infiziert worden waren, abortierte, während fünf von sieben mit Ab4 infizierten Stuten abortierten. Darüber hinaus entwickelte eine OH03 Stute vorübergehend milde neurologische Symptome (GARDINER, et al. 2012). Einen möglichen Grund für das neuropathogene Potential von EHV-1 G_{2,254} stellt die höhere und längere Virämie des neuropathogenen Strangs gegenüber dem A_{2,254} dar (ALLEN 2008). Sicher ist, dass nicht jeder G_{2,254}-Strang zu einem neurologischen Verlauf führt, tatsächlich ist es nur ein kleiner Teil, und nicht jede Infektion mit EHV-1 A_{2,254} garantiert einen milden Verlauf ohne Entwicklung von EHM. Im Raum München kam es im Herbst 2015 zu einem EHV-1-Ausbruch der von einem N₇₅₂ verursacht wurde und bei dem mehrere Pferde neurologisch erkrankten (eigene Beobachtung). Auch Cuxson et al. konnten nur einen von fünf EHM-Fällen einem neuropathogenen EHV-1 zuordnen (CUXSON, et al. 2014). Alle Studien, welche die Pathogenität der verschiedenen Stränge untersuchten, weisen darauf hin, dass bisher unerforschte genetische Variationen in anderen ORFs als dem ORF30 Schwere und Verlauf der Krankheit beeinflussen könnten, weshalb die Maßnahmen bei Infektionen im Bestand nicht von dem Strangtypen abhängig gemacht werden dürfen (NUGENT, et al. 2006, SMITH, et al. 2010, FRITSCHKE und BORCHERS 2011, GARDINER, et al. 2012, CUXSON, et al. 2014). Dies insbesondere auch, weil die Entwicklung von Abort und EHM von vielen Faktoren, darunter individuellen Wirts- und Umweltfaktoren, abhängt.

3.3. Immunologie

Die Immunantwort auf EHV-1 ist äußerst komplex (SLATER 2013). Obwohl bisher viele Anläufe unternommen wurden die Mechanismen aufzudecken, welche infolge einer Infektion mit EHV-1 einen wirksamen immunologischen Schutz vor klinischer Erkrankung und Virusausscheidung sicherstellen, sind viele Faktoren bisher ungeklärt. Eine Infektion mit EHV-1 führt zu einer Immunität, die drei bis sechs Monate anhalten kann, weshalb das Virus wiederholt in derselben Herde ausbrechen kann (KYDD, et al. 2006b).

Wissenschaftliche Studien zielen darauf ab, Wissen zu generieren, um mit Vakzinen einen langfristigen Schutz gegen Infektion, Erkrankung und Ausbreitung zu entwickeln.

Das Abwehrsystem oder die Immunantwort in Wirbeltieren lässt sich in das angeborene und in das adaptive Immunsystem einteilen. Das angeborene Immunsystem wird auch unspezifisches Immunsystem genannt, da es sich nicht an ein Pathogen anpasst und auch bei wiederholter Infektion immer gleich reagiert (ABBAS, et al. 2015). Gleichzeitig ist es aber nach Antigenkontakt sofort aktiv. Die beiden Systeme arbeiten eng zusammen, weshalb grundsätzlich eine Aufgabe der unspezifischen Antwort die Stimulation der adaptiven oder spezifischen Antwort ist (IWASAKI und MEDZHITOV 2015). Umgekehrt verstärkt das aktivierte spezifische System die unspezifische Antwort, woraufhin die Bekämpfung fremder Mikroben Seite an Seite erfolgt (ABBAS, et al. 2015). Zwar werden die Systeme, insbesondere bei wiederholter Infektion teilweise unabhängig voneinander und mehr oder weniger gleichzeitig aktiviert, allerdings kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass das unspezifische System das Antigen zunächst erkennt und dann eine Aktivierung beider Systeme durch Sekretion von Zytokinen erfolgt (ABBAS, et al. 2015, IWASAKI und MEDZHITOV 2015). Diese Erkennung der Pathogene kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Zum einen aufgrund von Strukturen, die mit Pathogenen assoziiert werden, sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMP), mittels Wirtszelleigenen Rezeptoren, die als *pattern recognition receptors* (PRR) bezeichnet werden, ein Mechanismus, der bereits vor der Infektion der Zelle funktioniert. Zum anderen bei Eintreten des Erregers in die Zelle durch intrazelluläre Zytosolsensoren. Im Falle von Viren werden virale Nukleinsäuren von den Zytosolsensoren erkannt. Darüber hinaus dienen auch Virulenzfaktoren und die enzymatische Aktivität der Pathogene als Erkennungsmerkmale. Ein wichtiger Bestandteil, insbesondere bei intrazellulären Mikroorganismen, wie z. B. der Viren, ist die Unterscheidung zwischen körpereigenen und „nicht-körpereigenen“ Strukturen. Als „nicht-körpereigen“ werden auch solche eingeordnet, die virusinfiziert oder geschädigt sind. Häufig wird ein Pathogen auch im Zusammenspiel mehrerer Aufklärungskompetenzen erkannt (IWASAKI und MEDZHITOV 2015).

Das spezifische Immunsystem hat die besondere Eigenschaft, sich nach

Erstinfektion auf den jeweiligen Mikroorganismus zu spezialisieren. Grundsätzlich unterteilt man diese adaptive Immunität in die zelluläre und die humorale Immunantwort. Die humorale Immunantwort, welche aus Antikörpern besteht, die von B-Lymphozyten produziert werden, bekämpft extrazelluläre Mikroben, während die T-Lymphozyten-vermittelte zelluläre Immunantwort hauptsächlich intrazelluläre Pathogene eliminiert, aber auch extrazellulär aktiv ist. Antikörper binden an Antigene und neutralisieren so die Mikroben oder markieren sie, damit sie durch sogenannte Effektorzellen eliminiert werden können. Die zelluläre Komponente besteht aus B-Zellen, die infolge eines Kontaktes mit Antigen oder Botenstoffen Antikörper produzieren, T-Helferzellen, die nach Stimulation durch das Antigen Zytokine produzieren und so die spezifische und unspezifische Immunantwort steuern und zytotoxischen T-Lymphozyten (Effektorzellen), die Zellen zerstören, welche fremde Antigene exprimieren. Die antigenen Strukturen, an welche die Lymphozyten binden, werden Epitope genannt. T-Lymphozyten binden allerdings nicht an Epitope freier Pathogene, sondern ausschließlich an vom MHC I wiedergegebene Peptide fremder Strukturen. Der MHC I ist eine molekulare Struktur, die auf den meisten kernhaltigen Zellen zu finden ist, und bei Infektion einer Zelle die Peptide des Eindringlings präsentiert. Weitere Bestandteile der zellulären Immunantwort sind antigen-präsentierende Zellen, die Pathogene einfangen und den T-Lymphozyten sowie diversen anderen Effektorzellen präsentieren (ABBAS, et al. 2015).

Im Zusammenspiel der Verteidigungsmechanismen des Wirtes trifft das EHV-1 an der Eintrittspforte, der nasopharyngealen Mukosa, demnach zunächst auf die angeborene Immunantwort. Epithelzellen sind von Natur aus auf Pathogenerkennung spezialisiert und bilden mit den antigenpräsentierenden dendritischen Zellen in sogenannten *tight junctions* hauptsächlich die Oberfläche des mukosalen Epithels (IWASAKI und MEDZHITOV 2015). Beide haben PRR und erkennen die PAMPs der Mikroorganismen, die über die Atemluft auf das respiratorische Epithel gelangen, so auch des EHV-1. Die Erkennung erfolgt bereits vor der Infektion der Zelle und der Kontakt des EHV-1 mit dem Epithel setzt eine Signalkaskade ein, die in der Produktion von Zytokinen und Chemokinen resultiert (QUINTANA, et al. 2011). Hierdurch werden sowohl das unspezifische als auch das adaptive Immunsystem aktiviert (ABBAS, et al. 2015, IWASAKI und MEDZHITOV 2015). Nach Eintreten in die Zelle wird EHV-1

dann außerdem von Zytosolsensoren anhand seiner DNA erkannt und die Abwehr auch auf diesem Wege aktiviert (IWASAKI und MEDZHITOV 2015).

Als klassische PRRs sind Toll-Like-Rezeptoren (TLR) beschrieben. Dreizehn dieser TLRs wurden bislang bei Säugetieren entdeckt, von denen Pferde die TLRs 2-4 und 7-9 besitzen (QUINTANA, et al. 2011). Von diesen sind TLR 3 und TLR 9 in der Abwehr intrazellulärer Mikroorganismen, also auch des EHV-1 von Bedeutung (IWASAKI und MEDZHITOV 2015). Hussey et al. untersuchten an einem Luftstrom-Oberflächen- oder *Fluid-Air Interface* System einer equinen respiratorischen Epithelzellkultur (EREC) erstmals die angeborene Immunantwort in Folge einer Infektion des Atemwegepithels mit EHV-1. Das Experiment ist das bisher einzige, welches die angeborene Immunantwort im *in vitro* Experiment an der ersten Verteidigungslinie des Wirtes gegen EHV-1 darstellt. Nach 24 Stunden war die Expressionsrate der TLR 3 und 9 signifikant höher in Zellen, die mit dem Ab4 EHV-1 Strang infiziert worden waren, gegenüber denen mit *Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12* pseudoinokulierten Zellen (SOBOLL HUSSEY, et al. 2014). Ein signifikanter Anstieg der Messenger-RNA (mRNA) Expression diverser proinflammatorischer Zytokine 24 Stunden nach der Inokulation von EHV-1-Ab4 konnte auch in den infizierten Zellen verglichen mit den ausschließlich mit Medium behandelten ERECs beobachtet werden. Erhöht waren die Interleukine (IL) 1 β und 6, Interferon (IFN) α , sowie der Tumornekrosefaktor (TNF) α . Dagegen war die Produktion des IFN γ in den ERECs, die mit EHV-1-Ab4 inokuliert worden waren, signifikant gegenüber den pseudoinokulierten EREC Zellen vermindert. Außerdem beobachteten die Autoren, dass Monozyten, die mit Überständen infizierter ERECs inkubiert worden waren, signifikant erhöhte Chemotaxis gegenüber den EHV-1-Ab4-freien ERECs aufwiesen (SOBOLL HUSSEY, et al. 2014). Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass die erhöhte Sekretion von Zytokinen in den infizierten Epithelzellen die Immunzellen anzog (SOBOLL HUSSEY, et al. 2014, ABBAS, et al. 2015, IWASAKI und MEDZHITOV 2015).

Im selben Experiment konnte auch eine verminderte Expressionsrate des MHC I und des MHC II in Ab4 infizierten Zellen gegenüber den pseudoinokulierten Zellen beobachtet werden. Die MHCs präsentieren die möglicherweise intrazellulär verarbeiteten viralen Antigene auf der Zelloberfläche und können damit von zytotoxischen T-Zellen (CTL) oder B-Lymphozyten erkannt werden.

Diese Erkennung eines MHC durch eine CTL führt zur Lyse der infizierten Zelle und stimuliert bei B-Lymphozyten die Antikörperproduktion (SOBOLL HUSSEY, et al. 2014).

Auch wenn hohe EHV-1 spezifische Antikörper-Titer wenig über die Immunität gegen das Virus aussagen, ist ihnen doch eine nicht unbedeutende Rolle in der Erregerabwehr zuzuschreiben. In der Zirkulation können sie die Verbreitung des bei der Zelllyse freigesetzten Virus eindämmen und an der Nasenschleimhaut bilden sie eine erste Verteidigungslinie (BREATHNACH, et al. 2001, GOODMAN, et al. 2012).

Die frühe humorale Immunantwort erfolgt durch eine Immunglobulin (Ig) vermittelte Aktivierung des Komplement Systems, weshalb die früh auftretenden Ig auch Komplement fixierende Antikörper (*Complement fixation antibodies/CF*) genannt werden. Verschiedene Ig-Typen können das Komplementsystem aktivieren, die kurzlebigen IgM besitzen jedoch die höchste Effizienz, um die für die Aktivierung nötige Bindung mit dem Proteinkomplex C1 einzugehen (ABBAS, et al. 2015). Komplement bindende Antikörper haben eine kurze Lebensdauer von ≤ 3 Monaten p.i. und können mit dem Komplementbindungstest (*Complement fixation assay/CFA*) im Labor nachgewiesen werden (KYDD, et al. 2006b). Die Lebensdauer der durch den Virusneutralisationstest (VN-T) im Serum nachzuweisenden Virus neutralisierenden Antikörper (VN) vom Typ IgG beträgt dagegen bis zu einem Jahr nach der Infektion (KYDD, et al. 2006b). Elf Ig-Isotypen sind bisher in Equiden definiert worden (KEGGAN, et al. 2013). Bei EHV-1 Infektionen werden in erster Linie IgGa, IgGb und IgGc produziert (SLATER 2013). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass IgGb und möglicherweise IgGa vor verschiedenen intrazellulären Infektionen schützen. IgGc kommt im Blut gesunder Pferde wahrscheinlich nur in sehr geringen Mengen vor. Dabei entspricht nach neuer Nomenklatur IgGa dem IgG1, IgGb dem IgG4/7 und IgGc dem IgG6 (KEGGAN, et al. 2013). In einem Infektionsexperiment mit Ab4 und einem Ab4 ORF1/2 Deletionsmutanten-Virus konnte ein Anstieg aller 3 Isotypen ab Tag sechs p.i. bis Tag 74 p.i. beobachtet werden, wobei die Konzentrationen an Tag 21 p.i. am höchsten waren (SOBOLL HUSSEY, et al. 2011). Der vorherrschende IgG-Isotyp ist IgGb, welcher auch nach der Infektion den stärksten Anstieg zu verzeichnen hat (SOBOLL HUSSEY, et al. 2011, GOODMAN, et al. 2012). Allerdings konnten hohe VN-Titer vor

einer EHV-1 Infektion in der Vergangenheit weder mit einem geringeren Risiko der Ausbildung einer Virämie, noch mit dem Schutz vor EHM und Abort in Verbindung gebracht werden (KYDD, et al. 2006b, ALLEN 2008). Breathnach et al. untersuchten die IN humorale Immunantwort in fünf Gruppen. Davon war eine experimentell mehrfach infiziert worden, zwei Gruppen mit zweimal je einem Impfstoff präimmunisiert, eine weitere mit zwei unterschiedlichen Vakzinen geimpft und eine letzte Kontrollgruppe vor dem Infektionsversuch nicht mit EHV-1 konfrontiert worden. In den nasalen Spülungen wurde IgA als dominanter Isotyp isoliert. Die Spülproben mit dem höchsten IgA Gehalt zeigten dabei die stärkste virusneutralisierende Aktivität und die zugehörigen Probanden schieden die geringsten Virusmengen aus. Auch IgG wurde isoliert, allerdings fielen die Werte dieses Isotyps bereits kurz nach der Infektion ab, was auf die entzündungsabhängige Ausscheidung von virusspezifischen Antikörpern zurückgeführt werden kann, die infolge des Heilungsprozesses der Schleimhaut zurückgeht. Die Autoren konnten mit der Studie demonstrieren, dass im Gegensatz zu VN-Titern hohe IgA-Level auf der nasopharyngealen Mukosa aufgrund ihrer virusneutralisierenden Aktivität zu einer geringeren Virusausscheidung und einer Verminderung des Risikos der Ausbildung einer mit EHV-1 assoziierten klinischen Erkrankung führen (BREATHNACH, et al. 2001).

Da humorale Antikörper freies Virus in der Blutbahn allerdings nur in sehr kleinen Zeitfenstern neutralisieren können, ist die $CD8^+$ vermittelte zelluläre Immunantwort bei einer systemischen Infektion ein essentieller Teil der Abwehr. Aufgrund der Antigenpräsentation durch das Epitop MHC I erkennen $CD8^+$ T-Lymphozyten infizierte Viruszellen und werden zu $CD8^+$ CTL differenziert, woraufhin sie an die MHC I der infizierten Zelle binden und diese zerstören (MA, et al. 2013). Wie die Proteine des Virus auf den infizierten Zellen präsentiert werden, wurde in drei Studien untersucht (SOBOLL, et al. 2003, KYDD, et al. 2006a, KYDD, et al. 2014). Equiden, welche die haploiden Genotypen oder Haplotypen des MHC I ELA (Equines Leukoyten Antigen) -A2 und ELA-A3 tragen, nutzen Peptide des IE-Protein 64, das als erstes Gen im Replikationszyklus des EHV-1 exprimiert wird, zur Antigen-Präsentation. Darüberhinaus produzieren die CTL $IFN-\gamma$, das wiederum Phagozyten aktiviert und also den antiviralen Effekt unterstützt (ABBAS, et al. 2015). Die bedeutende Rolle der zellulären Immunantwort wird sekundiert durch die Erkenntnis, dass die Anzahl der CTL

und deren Vorläufer (CTLprecursor/CTLp) nach einer Infektion mit EHV-1 ansteigt (KYDD, et al. 2006b). Wie oben beschrieben, infiziert EHV-1 häufig CD8⁺ T-Lymphozyten in der virämischen Phase (WILSTERMAN, et al. 2011). Die Proliferation in den infizierten CD8⁺ T-Lymphozyten bleibt aus und damit die Möglichkeit, ihre bedeutende Rolle in der Eliminierung des Virus zu erfüllen (KYDD, et al. 2006b). Eine hohe Anzahl EHV-1 spezifischer CTLp in der Zirkulation, generiert durch eine frühere Infektion, senkt allerdings das Risiko, eine Virämie und damit auch EHM zu entwickeln, wie Allen in einem Experiment zeigte: Von allen infizierten Pferden, erkrankten die mit hohem EHV-1 spezifischen CTLp Anteil sehr viel seltener neurologisch, als jene mit geringen Mengen (ALLEN 2008). Darüberhinaus werden große Mengen an CTLp im Blut mit einer geringeren Ausbildung klinischer und virologischer Symptome, wie Fieber und Virusausscheidung über die Nase, in Verbindung gebracht (O'NEILL, et al. 1999). In einem EHV-1 Infektionsexperiment (Strang Ab4/8) mit neun zuvor weder geimpften, noch infizierten gegenüber fünf geimpften, sowie drei zuvor infizierten tragenden Stuten, konnte außerdem gezeigt werden, dass hohe CTLp Konzentrationen vor der Infektion das Abortrisiko deutlich verringern. Jedenfalls brachten die Stuten mit einer großen Anzahl zirkulierender EHV-1 spezifischer CTL häufiger gesunde Fohlen zur Welt, als jene mit niedrigeren Mengen. Mit zunehmendem Alter wird bei Pferden eine Ablösung der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen durch den Phänotyp CD8⁻ beobachtet, in dessen Folge die Anzahl EHV-1 spezifischer CTL abnimmt Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, weshalb ältere Pferde sehr viel häufiger schwer an EHV-1 erkranken, als Fohlen oder junge Pferde (PERKINS und WAGNER 2015). Hohe Werte EHV-1 spezifischer CTL nähern sich in der Regel innerhalb von sechs Monaten dem Wert vor der Infektion, bleibt eine weitere Antigenstimulation aus (KYDD, et al. 2003).

Wie alle Herpesviren hat auch EHV-1 Strategien entwickelt der Immunabwehr seines Wirtes zu entgehen (PAILLOT, et al. 2008). Die Immunevasion des Virus zielt darauf ab diese Antigenpräsentation und folglich die Eliminierung durch Effektorzellen zu verhindern (GRIFFIN, et al. 2010). Da wie oben beschrieben die Effektorzellen die Antigenpräsentation der infizierten Zellen durch MHC I benötigen, hat EHV-1 wohl über Generationen die Fähigkeit generiert die MHC I-Expression in den infizierten Wirtszellen herunterzuregulieren. Mittlerweile

wurden diverse Proteine identifiziert, welche für diese Herunterregulation verantwortlich sind (KOPPERS-LALIC, et al. 2008, MA, et al. 2012, HUANG, et al. 2014, HUANG, et al. 2015). Koppers-Lalic et al. untersuchten das Protein UL 49.5 (pUL 49.5) der Varicelloviren und zeigten, dass EHV-1 den mit der Antigenpräsentation assoziierten Transporter TAP inhibiert, der Peptide über die Membran des endoplasmatischen Retikulums transportiert. Die dazu nötige Energie generiert er aus der Adenosintriphosphat (ATP)-Hydrolyse. Das Protein pUL 49.5 beeinträchtigt diese essentielle Bindung von ATP an TAP (KOPPERS-LALIC, et al. 2008). Ma et al. beobachteten, dass die Infektion mit unterschiedlichen EHV-1-Strängen in unterschiedlichem Umfang eine Herunterregulation von MHC I verursacht und kamen so zu dem Schluss, dass mindestens noch ein weiteres virales Protein in diesem Prozess der Immunevasion involviert sein muss. Sie identifizierten das Protein UL 56 (pUL 56), ein früh exprimiertes Protein, das überwiegend im Golgiapparat vorkommt. Sie zeigten außerdem, dass pUL 49.5 die Menge der MHC I auf der Zelloberfläche zumindest nicht im frühen Stadium der Infektion beeinflusst (MA, et al. 2012). Der Mechanismus von pUL 56 wurde in einer weitere Studie untersucht. Deren Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die Internalisierung der MHC I auf der Zelloberfläche auf dem Wege der dynaminabhängigen Endozytose stattfindet, die Eliminierung des pUL 56 aber gleichzeitig die MHC I Inhibierung nicht aufhebt (HUANG, et al. 2014). Weitere Untersuchungen führten zu der Entdeckung eines in der MHC I Downregulation mit pUL 56 kollaborierenden viralen Proteins, dem pUL 43 (HUANG, et al. 2015). Darüber hinaus ist bekannt, dass EHV-1 zwar die Anzahl der präsentierten MHC I Moleküle reduziert, jedoch nicht alle unterdrückt. Beim Menschen sind die infizierten Zellen dann zwar noch bedingt für CTLs angreifbar, entgehen aber dem Effekt der natürlichen Killerzellen (NK), welche eine Zelle ohne MHC I als „nicht-körpereigen“ erkennen und eliminieren würde (MA, et al. 2012, IWASAKI und MEDZHITOV 2015). Ob NK eine Rolle im equinen Immunsystem spielen und wenn ja welche das ist, konnte noch nicht geklärt werden. Studien zu der Aktivität der NK bei der Eliminierung von EHV-1 blieben jedenfalls bisher ohne Ergebnis oder waren von geringer Bedeutung (KYDD, et al. 2006b). In einer anderen Studie zeigten Laval et al. *in vitro*, dass EHV-1 nach dem Eintritt in CD172a⁺ Monozyten das IE-Protein sehr viel später exprimiert als in den RK-13-Kontrollzellen, seine frühe Replikation also verzögert und so die Antigenexpression damit gedrosselt wird (LAVAL, et al.

2015). Wahrscheinlich erfolgt diese Drosselung mittels Histon-Deacetylierung wodurch die virale DNA nicht zur Ablesung zur Verfügung steht. Grundsätzlich kondensiert die für die Histon-Deacetylierung verantwortliche Histon-Deacetylase das Chromatin um zelluläre und oder virale Transkription zu unterdrücken (LAVAL, et al. 2015). Sarkar et al. zeigten außerdem, dass der EHV-1-Strang T953, der aus den Nasengängen eines an EHM erkrankten Pferdes isoliert wurde, die Produktion IFN- β in der späteren Phase der Replikation in equiden Endothelzellen unterdrückt (SARKAR, et al. 2015). IFN- β ist Teil des angeborenen Immunsystems und induziert in allen Zellen den antiviralen Zustand, aktiviert Effektorzellen und erhöhte MHC I-Expression (ABBAS, et al. 2015). Inwiefern diese Fähigkeit EHV-1-Strang unabhängig ist, beziehungsweise sich auf weitere Zelltypen erstreckt, muss allerdings weiter untersucht werden.

Auch der humoralen Immunantwort kann sich das Virus auf verschiedenen Wegen entziehen indem keine viralen Hüllenproteine auf infizierten PBMCs exprimiert werden. Darüberhinaus greift das EHV-1 mit dem Glykoprotein C (gC) in die Komplementkaskade ein, indem es über Komplement an die C3 Komponente bindet; außerdem kann sein Heterodimer gE-gI möglicherweise als Fc-Rezeptor für IgG eintreten und damit eine C1q-Bindung durch Antikörper an die infizierte Zelle verhindern (MA, et al. 2013).

Auf die Immunität gegen EHV-1 im Zusammenhang mit Impfungen wird in Kapitel 3.8 näher eingegangen.

3.4. Klinische Befunde

EHV-1 kennzeichnet eine Vielseitigkeit klinischer Bilder. Symptome wie die Erkrankung des Respirationstraktes werden teilweise primär durch das Virus verursacht. Andere, wie neurologische Erkrankung und Aborte sind mit einer Exposition des EHV-1 assoziiert, sind aber nur Folge der Replikation des Virus in den versorgenden Gefäßen von Zielorganen. Faktoren, welche die Verlaufsrichtung vorgeben, sind weitgehend ungeklärt, überwiegend verlaufen EHV-1-Infektionen tatsächlich symptomlos oder kommen sehr selten vor (DUNOWSKA 2014). Bedeutend für das klinische Bild ist, ob es sich um eine Infektion handelt oder um eine Reaktivierung aus der Latenz. Letztere geht zwar

mit Virusausscheidung, aber wahrscheinlich meist ohne klinisch Erkrankung einher (SLATER 2013). Darüber hinaus ist möglicherweise von Belang, ob das betroffene Tier erstmals oder wiederholt infiziert wurde. Außerdem spielen auf Seiten der Tiere Spezies, Geschlecht, Alter, Immun- und Impfstatus, sowie die Haltungsbedingungen eine Rolle. Von Seiten des Virus hat der Strangtyp Einfluss auf den klinischen Verlauf der Infektion (CHIAM, et al. 2006, GOEHRING, et al. 2006, SLATER 2013).

EHV-1 verursacht regelmäßig selbst-limitierende Erkrankungen des ORT, die durch Nasenausfluss, Fieber, Mattigkeit, Appetitlosigkeit und fortschreitende Lymphadenopathie gekennzeichnet sind und nach etwa zwei Wochen wieder abklingen (DUNOWSKA 2014). Die Inkubationszeit beträgt unter experimentellen Bedingungen ein bis drei Tage und im Felde bis zu zehn Tage. Fieber tritt üblicher Weise ab dem ersten Tag nach der Infektion auf. In Fohlen wurde es über einen Zeitraum von acht bis zehn Tagen und in erwachsenen Pferden über ein bis acht Tage gemessen. Dabei sind in infizierten Herden typischerweise biphasische Fieberschübe innerhalb der ersten 11 Tage nach der Infektion zu beobachten. Hierbei korrespondiert das meist höhere Fieber in Phase zwei mit der Virämie. Neben Nasenausfluss tritt bei Fohlen auch Konjunktivitis und seröser Augenausfluss im Zusammenhang mit EHV-1 auf (SLATER 2013, WALTER, et al. 2013). Die Beschaffenheit des Nasenausflusses ist sowohl bei jungen, als auch bei älteren Pferden serös bis seromukös und wird bei Auftreten bakterieller Sekundärinfektionen mukopurulent. Das Blutbild zeigt anfangs Leukopenie und Lymphopenie, die nach sieben bis neun Tagen von einer Leukozytose abgelöst werden. Letztere hält in der Regel bis zu Tag 21 p.i. an (BALASURIYA, et al. 2015). Selten sind bei Fohlen die tieferen Atemwege betroffen und es kommt zu Tracheobronchitis oder Bronchopneumonie, die möglicherweise durch Sekundärinfektionen akzentuiert werden (DUNOWSKA 2014).

EHV-1 ist neben der Equinen Virus Arteritis die Hauptursache für den viralen Abort. Dabei treten EHV-1-assoziierte Aborte überwiegend im letzten Drittel der Trächtigkeit auf. Betroffen sind meist Einzeltiere. In einem Bestand in engem zeitlichen Rahmen zahlreich auftretende Aborte, sogenannte „*abortion storms*“, sind in reinen Zuchtbetrieben selten geworden (SLATER 2013). Der Fruchtverlust läuft in der Regel im Stehen und ohne Vorankündigung durch andere klinische

Symptome ab; insbesondere bei Einzelfällen, wenn die Ursache für die Virämie ein Hochfahren des EHV-1 aus der Latenz ist. Die Amnionhülle ist häufig unbeschädigt und auch die Chorioallantoismembran kann intakt ausgestoßen worden sein, ist nicht invertiert, weshalb das tiefrote, samt-ähnliche Chorion direkt sichtbar ist. Dieses Erscheinungsbild wird im englischsprachigen Raum deshalb als *red bag presentation* bezeichnet. Selten wird ein Fohlen lebend geboren und stirbt kurz nach der Geburt an einem pulmonalen Ödem. Langzeitschäden für die Stute sind ungewöhnlich und in der Regel kann sie im zweiten Östrus nach dem Abort wieder erfolgreich besamt werden (DUNOWSKA 2014).

Selten kommt es zu einer zeitlich eng mit der Geburt des Fohlens verwobenen Infektion *in utero*. Bisweilen wird das Fohlen dann noch lebend, allerdings bereits krank geboren und verendet unweigerlich innerhalb von 48 Stunden. In sehr seltenen Fällen erfolgt eine Infektion durch Nachgeburt oder Mutterstute während des Geburtsvorganges beziehungsweise innerhalb von zwei Tagen nach der Geburt. Symptome sind Erkrankungen der tiefen Atemwege mit Tachypnoe, Dyspnoe und bisweilen sekundärer bakterieller Bronchopneumonie (SLATER 2013). Maternale Antikörper, die über das Kolostrum aufgenommen wurden, können eine klinische Erkrankung verhindern, allerdings kommt es in Folge der Infektion nach fünf bis sieben Tagen zur Virusausscheidung über die Nase (KYDD, et al. 2006b, GARDINER, et al. 2012).

Neurologische Symptome treten wie ein Abort im Zusammenhang mit einer Virämie auf. Allerdings werden sie nicht immer durch Fieber im Vorfeld angekündigt oder ein Fieber wird schlichtweg nicht erkannt. Die Inkubationszeit ist schwer zu ermitteln und wird in verschiedenen Studien und Untersuchungen von Ausbrüchen zwischen einem und zehn Tagen angegeben (PRONOST, et al. 2012, WALTER, et al. 2013). Betroffene Tiere zeigen aufgrund multifokaler Pathologie im Rückenmark und selten auch in den übrigen Teilen des ZNS, wobei sowohl graue, als auch weiße Substanz, sowohl oberes als auch unteres Motoneuron geschädigt werden können, Symptome, die von geringgradiger Ataxie der Hinterhand mit Parese bis zum Festliegen aufgrund einer Tetraplegie reichen können (PUSTERLA und HUSSEY 2014). Weitere Symptome sind Ataxie der Vorhand, Schleifen der Zehe, Überköten der Hinterhand, verminderter Tonus an Anus und Schweif, Harninkontinenz, Blasendysfunktion und Dysurie

aufgrund einer Sphinkterdysfunktion, welche ihre Ursache in einer Störung des spinalen Urinhaltereфлекses oder möglicherweise eines der zentralen Miktionszentren hat (HENNINGER, et al. 2007, WALTER, et al. 2013, DUNOWSKA 2014). Tritt der seltene Fall auf, dass der Hirnstamm betroffen ist, wird meist eine Beeinträchtigung des *Nucleus vestibularis* gesehen, wobei das Pferd ein Schiefhalten des Kopfes sowie häufig auch eine einseitige Gleichgewichtsstörung zeigt (Goehring, persönliches Gespräch). EHM tritt in der Regel nur bei einigen wenigen Tieren in einem von einem EHV-1-Ausbruch betroffenen Bestand auf, da die Entwicklung neurologischer Symptome multifaktoriell von Alter, Rasse Geschlecht abhängig und die Ausbildung einer Virämie Vorbedingung ist (GOEHRING, et al. 2006). Gleichzeitig erkrankt in der Regel nur ein kleiner Teil der virämischen Tiere an EHM (PUSTERLA und HUSSEY 2014). Allerdings können bisweilen auch Großteile einer Herde betroffen sein. Von den milden neurologischen Symptomen erholen sich die Tiere meist gut und erlangen ihre früherer Leistungsfähigkeit zurück, wohingegen Tetraplegie beinahe immer in der Euthanasie endet (HENNINGER, et al. 2007, PRONOST, et al. 2012). Aber es ist auch dokumentiert, dass Pferde nach Tetraplegie bei umfassender und kostenintensiver Versorgung und Pflege zu alter Form zurückfanden (WALTER, et al. 2013, PUSTERLA und HUSSEY 2014).

3.5. Diagnose

Aufgrund klinischer Symptome, kann lediglich der Verdacht einer Erkrankung durch EHV-1 geäußert, endgültig kann die Diagnose EHV-1 aber nur im Labor gestellt werden (SLATER 2013). Balasuriya et al. haben in einem Review ausführlich die Methoden der EHV-1-Diagnostik diskutiert. Demnach ist zunächst von großer Bedeutung, dass eine sinnvolle Probenentnahme erfolgt. Die Virusausscheidung bei einer lytischen Infektion hält über sieben und bis zu 20 Tage nach Initialinfektion an (GOEHRING, L. S., persönliches Gespräch). Sie kann intermittierend auftreten und Virusmengen im Nasopharynx sind normalerweise zwischen Tag eins und Tag fünf am höchsten (BALASURIYA, et al. 2015). Deshalb sollten Probenentnahmen so früh wie möglich durchgeführt werden. Darüber hinaus ist es wichtig auch die Tiere im Bestand mit einzubeziehen, die zwar keine klinischen Symptome zeigen, aber mit den klinisch

erkrankten Pferden in Kontakt standen. Dies ist insbesondere von Bedeutung, um das Risiko einer EHM rechtzeitig zu erkennen, welche überwiegend zum Ende der Virämie auftritt, wenn die Virusausscheidung möglicherweise schon zurückgegangen ist und mittels Nasentupfer nicht mehr nachgewiesen werden kann (BALASURIYA, et al. 2015).

Die Diagnose einer Infektion mit EHV-1 kann im Labor entweder direkt über den Antigennachweis oder indirekt über den Antikörpernachweis beziehungsweise die Analyse weißer Blutkörperchen oder des *Liquor cerebrospinalis* gestellt werden (BALASURIYA, et al. 2015).

Der direkte Nachweis von EHV-1-Antigen wird mittels Virusisolation oder der Detektion von Virus-DNA in der PCR in Nasentupfern oder im Falle einer Virämie im Vollblut durchgeführt. Tupfer von der nasopharyngealen Schleimhaut werden in Virustransportmedium mit Antibiotika bei 4°C ins Labor geschickt oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für die Diagnose von EHV-1 in Vollblut wird dieses in Röhrchen mit dem Gerinnungshemmer Ethylendiamintetraacetat (EDTA) asserviert. EDTA zu verwenden ist insofern wichtig, da andere Gerinnungshemmer teilweise die PCR stören können. Weiter sind die Plazenta, Lunge, Leber, Milz und Thymus eines infolge einer EHV-1-Infektion abortierten Fetus wertvolles Material für den direkten Nachweis von EHV-1-Antigen. Als „Goldstandard“ wird die Virusisolation und Anzucht in verschiedenen Zelltypen bezeichnet, die von Nasentupfern und Abortmaterial sowie aus PBMC und dem Rückenmark von an EHM erkrankten Tieren erfolgen kann. Sie hat den besonderen Vorteil, dass zwischen infektiösem und nicht infektiösem EHV-1 unterschieden werden kann. Nachteil ist die geringe Sensitivität und die Dauer von in der Regel fünf bis sieben Tagen bis ein Ergebnis vorliegt (BALASURIYA, et al. 2015). Bei einem EHV-1 Ausbruch muss zur Koordinierung von Quarantäne- und Sicherheitsmaßnahmen das Ergebnis allerdings grundsätzlich zeitnah vorliegen. Somit erwies sich die Kombination der Virusisolation mit der PCR als besserer Weg für die Diagnosestellung des EHV-1 bei einem Ausbruch, falls zwischen infektiösem und nicht infektiösem Virus unterschieden werden soll (LUNN, et al. 2009). Grundsätzlich wird die Virusisolation und Anzucht allerdings kaum noch durchgeführt, da sie durch praktischere Nachweismethoden ersetzt wurde. Schneller, sensitiver und hochspezifisch ist die PCR. Bei ihr reicht die Virus-DNA für den Nachweis aus,

das Virus muss nicht infektiös sein. Allerdings kann sie auch nicht zwischen infektiösem und nicht infektiösem EHV-1 unterscheiden. Auf die gleichen Medien anwendbar wie die Virusisolation, geht ihr eine DNA-Extraktion aus Nasentupfern, Blut oder Gewebe voraus. Für die Detektion von EHV-1 wurden die Genomabschnitte der Glykoproteine gB und gD ausgewählt. Diese Abschnitte sind gut über alle EHV-1-Stränge konserviert und können zuverlässig EHV-1 von EHV-4 differenzieren (HUSSEY, et al. 2006). Die quantitative *real-time*-PCR (qPCR) detektiert die Anzahl der gB beziehungsweise der gD Kopien des Virusgenoms indem sie diese mit einer Standardkurve vergleicht, die sich eines *Escherichia coli*-Stranges, welche das Zielgen in einem Plasmid enthält, bedient, vergleicht (BALASURIYA, et al. 2015). Die Sensitivität bei der Detektion von gB-DNA-Kopien war bei Hussey et al. so hoch, dass sechs gB-DNA-Kopien in der Probe ausreichten um ein positives Ergebnis zu erzielen (HUSSEY, et al. 2006). Smith et al. entwickelten auf der Grundlage von Allen et al. eine effektive *real-time*-PCR, deren Primer und Sonden den ORF 30 detektieren, womit sie nicht nur ein positives oder negatives Ergebnis lieferten, sondern auch gleich den EHV-1-Strang A_{2,254} von dem G_{2,254} unterscheiden konnten und darüber hinaus anzeigten, wenn beide Stränge in einer Probe vorkamen (ALLEN 2007, SMITH, et al. 2012). Dieser Test hat allerdings eine niedrigere Sensitivität als die qPCR, die gB und gD detektiert (PUSTERLA, et al. 2009b).

Für den Indirekten Nachweis mittels EHV-1-spezifischer Antikörper wird aus venösem Blut Serum gewonnen, welches bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert werden kann. Grundsätzlich kann eine akute Infektion mit EHV-1 im indirekten Nachweis über den CFA diagnostiziert werden (HARTLEY, et al. 2005). Das Immunsystem der Equiden bildet gegen EHV-1 im frühen Infektionsstadium kurzlebige IgM und IgG, die über das Komplementsystem an die Antigene des Virus binden. Im Test wird das wirtseigene Komplement inaktiviert und über eine definierte Menge Komplement und durch Zugabe des Zielantigens und eines Indikators der Titer der frühen humoralen Antwort bestimmt (THOMSON, et al. 1976). Da die kurzlebigen Immunoglobuline bereits vier bis fünf Tage nach der Infektion auftreten, ihren maximalen Titer nach 20 bis 30 Tagen erreichen und nach 80 Tagen wieder zu ihrem Ursprungswert zurückkehren, gibt eine einzige Probe, die hohe Komplement bindende Antikörper-Titer enthält bereits über eine akute oder kurz zuvor aufgetretene

EHV-1-Infektion Auskunft. Zwei Proben in einem Abstand von 14 bis 28 Tagen mit vierfachem Titeranstieg liefern eine zuverlässige Diagnose. Auch der CFA kommt allerdings nach vier bis fünf Tagen mit Blick auf das Management eines EHV-1-Ausbruches etwas zu spät, wenn man bedenkt, dass große Virusmengen besonders in den ersten Tagen ausgeschieden werden (BALASURIYA, et al. 2015). Deshalb eignet er sich eher rückblickend oder als zusätzliche Probe kombiniert mit der direkten qPCR, da in den ersten Tagen nach der Infektion noch kein Anstieg der Antikörpertiter messbar ist. Ein weiterer indirekter Nachweis, der VN-T, misst die EHV-1-spezifischen und EHV-4 IgG Antikörpertiter. Der durch Infektion mit EHV-1 induzierte IgG-Titer-Anstieg ist nach ca. zwei Wochen nachweisbar und hält bis zu einem Jahr an (KYDD, et al. 2006b). Somit eignet sich der VN-T im Gegensatz zum CFA gut für epidemiologische Studien, bei denen der Zeitpunkt einer möglichen Exposition der Probanden mit EHV-1 unbestimmt ist. Ein vierfacher Anstieg der Antikörpertiter weist eine Infektion innerhalb der Periode der Probenentnahme nach. Dies bedeutet, dass nur Proben von Tieren, bei denen das akute mit dem rekonvaleszenten Stadium verglichen wird, eine Diagnose ergeben können (BALASURIYA, et al. 2015). Sinnvoll ist der Test auch, um zu ermitteln welche mit erkrankten Tieren in Kontakt getretene Equiden während eines Ausbruchs dem Virus ausgesetzt waren (LUNN, et al. 2009). Allerdings können weder der VN-T, noch der CFA zuverlässig zwischen EHV-1 und EHV-4 unterscheiden (HARTLEY, et al. 2005). Die Differenzierung im indirekten Nachweis wurde erstmals durch Crabb et al. möglich, deren ELISA, welcher auf der Grundlage Typ-spezifischer Epitope am C-Terminus des gG beider EHV-Typen basierte, allerdings eine geringe Spezifität aufwies und nicht kommerzialisiert wurde (CRABB, et al. 1995, LUNN, et al. 2009, LANG, et al. 2013). Lang et al. entwickelten dann ihrerseits einen ELISA, der auf den Peptiden 1 des EHV-1 gE und 4 des EHV-4 gG basiert und Infektionen mit den zwei Typen, sowie typspezifische Serokonversionen zuverlässig unterscheiden kann (LANG, et al. 2013).

Die Analyse weißer Blutkörperchen alleine ist wenig EHV-1-spezifisch, da ähnliche Werte auch bei anderen Virusinfektionen gemessen werden (SLATER 2013). Weiter kann der *Liquor cerebrospinalis* zur Diagnostik herangezogen werden. Er wird bei der Gewinnung in EDTA-Röhrchen gesammelt und muss innerhalb weniger Stunden im Labor verarbeitet werden (GOEHRING, et al.

2010b). Xanthochromie bei Fehlen einer Liquorpleozytose und Anstieg des Gesamtproteins im *Liquor cerebrospinalis* können ein Hinweis auf EHM sein, allerdings ist auch diese Diagnose weder sehr sensitiv noch spezifisch (GOEHRING, et al. 2010a).

Mehrfach wurden Versuche unternommen die latente EHV-1 Infektion ante mortem zu ermitteln. Der Nachweis der Expression des LAT anhand einer PCR erwies sich als technisch anspruchsvoll und besitzt den limitierenden Faktor, dass das LAT nicht in allen Zellen, die latentes Virus tragen gleichzeitig exprimiert wird (BALASURIYA, et al. 2015).

Zusammengefasst: Die qPCR ist aufgrund ihrer Sensitivität die Methode der Wahl. CFAs können über eine akute oder eine jüngst aufgetretene Infektion in einem Bestand Auskunft geben und VN-T sowie der peptidbasierte ELISA eignen sich für serologische Studien und Ermittlungen des Immunstatus bezüglich EHV-1 und 4 in Equiden. Nachteil der PCR ist allerdings, dass es keine standardisierte Methode zwischen den Laboren gibt, weshalb Ergebnisse, die in verschiedenen Laboren untersucht wurden nicht einfach in einen Zusammenhang gebracht werden können (BALASURIYA, et al. 2015).

3.6. Therapie

Die von EHV-1 verursachten Erkrankungen des oberen Respirationstraktes sind in der Regel selbstlimitierend und klingen nach 14 Tagen wieder ab (SLATER 2013). Die Tiere sollten die Anzahl der Tage, an denen eine Rektaltemperatur $>39,0^{\circ}\text{C}$ gemessen wurde, in Wochen nicht gearbeitet werden. Diese Rechnung entstand auf der Grundlage von Erfahrungswerten und wird von den Trainern im Galopprennsport weltweit umgesetzt (GOEHRING, L. S., persönliches Gespräch). Breitbandantibiotika können bei starker Symptomatik zur Prävention sekundärer bakterieller Infektionen verabreicht werden, ebenso Beta-2 Sympathomimetika, um die mukoziliäre *Clearance* zu unterstützen (SLATER 2013). Gleichzeitig enthält der Nasenausfluss der an EHV-1 erkrankten Tiere hohe Mengen an Virus. Folglich sind die Tiere hochkontagiös und müssen schnellstmöglich von anderen Equiden isoliert werden (PUSTERLA und HUSSEY 2014). Aborte treten ohne Vorwarnung auf und Möglichkeiten, sie anhand medikamentöser Behandlung zu

verhindern, sind nicht bekannt. Das Abortmaterial enthält hohe Virusmengen und Vorkehrungen müssen unverzüglich getroffen werden, um eine Ausbreitung von EHV-1 ausgehend von Fetus und fetalen Membranen zu verhindern. Es muss außerdem sicher gestellt werden, dass die Nachgeburt vollständig aus der Stute abgegangen ist (SLATER 2013). Bei Entwicklung einer EHM sollte das Tier in einer gut eingestreuten Box aufgestellt werden, um Traumata bei Hinfällen oder vergeblichen Aufstehversuchen vorzubeugen. Bei Pferden, die nicht aufstehen, aber sich auf allen Vieren halten können, besteht eventuell die Möglichkeit der Unterstützung durch Gurte oder Geschirre (SLATER 2013). Dies ist allerdings häufig nur zeitlich begrenzt und mit hohem Arbeitsaufwand realisierbar, da sich der Zustand des Patienten besonders anfangs mal verbessert aber auch mal verschlechtert. Grundsätzlich ist die Prognose bei EHM günstig, solange es nicht zum Festliegen des Patienten kommt (PUSTERLA und HUSSEY 2014). Uneingeschränkter Zugang zu Wasser und die Aufnahme energiereichen Futters müssen sichergestellt werden (SLATER 2013). Darüber hinaus sollten Laxantien gefüttert werden, um einer Kolik vorzubeugen. Bei Harn- und seltenen Kotabsatzschwierigkeiten muss gegebenenfalls eine manuelle Evakuierung von Rektum und Blase erfolgen (PUSTERLA und HUSSEY 2014). Zur regelmäßigen Entleerung der Blase kann ein Katheter gelegt werden (SLATER 2013, PUSTERLA und HUSSEY 2014). Bei Ausfall der Blasenfunktion und Katheterisierung besteht das Risiko einer Zystitis, weshalb in einem solchen Falle prophylaktisch Breitbandantibiotika verabreicht werden sollten (SLATER 2013, PUSTERLA und HUSSEY 2014). Empirische Erfolge bei Ausbrüchen lieferten nicht steroidale antiinflammatorische Medikamente (NSAID) wie Flunixin Meglumin. Ebenfalls empirisch eingesetzt wurde Dimethylsulfoxid (DMSO). Diesem Wirkstoff wird nachgesagt, dass er einen antiphlogistischen Effekt erzielt und Entzündungen des Endothels und somit thrombotischen Schäden und in der Folge möglicherweise neurologischer Symptomatik entgegenwirken kann (SLATER 2013). Der Einsatz von Kortikosteroiden wie Prednisolonacetat oder Dexamethason ist umstritten, da, obwohl nicht wissenschaftlich belegt, befürchtet wird, dass sich die Virusreplikation fortsetzt beziehungsweise latentes Virus reaktiviert wird; gleichwohl ist eine Kurzzeittherapie von zwei bis drei Tagen bei Tieren zu empfehlen, die starke Symptomatik zeigen (SLATER 2013, PUSTERLA und HUSSEY 2014). Acetylsalicylsäure in Kombination mit Vitamin E wird eine Thrombenprophylaxe und eine Wirkung als Radikalfänger

im CSF zugeschrieben, wenn es bei EHM-Verdachtsfällen zu Beginn der Fieberperiode verabreicht wird (DUNOWSKA 2014). Zu beachten ist, dass zu den bisher genannten medikamentösen Therapiemaßnahmen fundierte wissenschaftliche Untersuchungen fehlen, ihre Wirksamkeit in der Regel auf Erfahrungen von Pferdemedizinern basiert und demnach als theoretisch angesehen werden muss. Goehring et al. untersuchten, angelehnt an die frühere Erkenntnis, dass die EHV-1-Infektion von ZNS-versorgenden Blutgefäßen auf den Kontakt infizierter PBMC mit Endothelzellen zurückzuführen ist (GOEHRING, et al. 2011), in welchem Umfang die Anwendung antiinflammatorischer Medikamente die Infektion von Endothelzellen der Carotis-Arterie und primärer Endothelzellen von Gehirngefäßen beeinflusst (GOEHRING, et al. 2016). In dem Experiment wurde in einem etablierten Assay *in vitro* die Kontaktaufnahme von Zelleinzelschichten beider Zelltypen mit EHV-1-OH03-infizierten PBMC analysiert. Dabei wurden mit COX-1- und COX-2-Hemmern sowie mit Lidocainhydrochlorid und Dexamethason behandelte Zelleinzelschichten und PBMC mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Indikator für eine EHV-1-Infektion war Plaque-Formation in den Zelleinzelschichten. Alle Medikamente konnten die Plaqueformation in Carotis-Endothelzellen gleichermaßen signifikant reduzieren, wenn Endothelzellen und infizierte PBMC behandelt worden waren. Außerdem konnten der COX-2-Hemmer, Lidocainhydrochlorid und Dexamethason die Kontaktaufnahme behandelter EHV-1-infizierter PBMC und behandelter Gehirnendothelzellen signifikant gegenüber unbehandelten Zellkulturen verringern. Im Falle von Dexamethason reichte sogar die alleinige Behandlung von PBMC, um die Infektion signifikant zu reduzieren. Vorbehaltlich notwendiger umfangreicher *in vivo* Studien empfehlen die Autoren den Einsatz von COX-1- und COX-2-Hemmern im febrilen frühen Stadium einer EHV-1-Infektion, um einer Ausbreitung auf die ZNS-Endothelgefäße und damit einer EHM vorzubeugen. Darüber hinaus wird die Anwendung von Dexamethason und Lidocainhydrochlorid als sinnvoll erachtet (GOEHRING, et al. 2016). Dexamethason sollte allerdings nur bei Eintritt neurologischer Symptome gegeben werden, da es wie bereits oben diskutiert, die Immunabwehr des Patienten und damit die körpereigene Beseitigung des Virus beeinträchtigen kann. Gleiches gilt für Lidocainhydrochlorid, das, systemisch verabreicht, schwierig für den individuellen Patienten zu dosieren ist und deshalb nur in schweren Fällen zum Einsatz kommen sollte.

Angelehnt an die bereits in Kapitel 3.2.2. beschriebene Erkenntnis, dass EHV-1 Thrombozyten aktivieren kann und dies möglicherweise die Ursache für EHV-1-assoziierte Aborte und EHM sein könnte (STOKOL, et al. 2015), wurde die medikamentöse Unterdrückung der EHV-1-induzierten Blutplättchenaktivierung in zwei Studien *ex vivo* untersucht. Nachdem die Blutplättchen-Inhibitoren Theophyllin, Pentoxiphyllin, Clopidogrel und Acetylsalizylsäure die EHV-1-induzierte Thrombozytenaktivierung nicht beeinflusst hatten (HERNANDEZ, et al. 2016), analysierten Stokol et al. den Effekt von unfraktioniertem (UFH) und niedrigmolekularem Heparin (LMWH), sowie zwei Phosphodiesterasehemmern (PDE-Hemmer) (STOKOL, et al. 2016). Sowohl UFH, als auch LMWH konnten die EHV-1-induzierte Thrombozytenaktivierung inhibieren, wobei UFH effektiver war. Die Autoren vermuten, dass Heparin wahrscheinlich mit EHV-1 um die heparinähnlichen Glykosaminoglykane auf den Blutplättchen konkurriert, so die Thrombingeneration verhindert und UFH dabei möglicherweise aufgrund seiner stärkeren Ladung eine höhere Bindungskraft als LMWH hat. Der nicht-selektive PDE-Hemmer 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) und der selektive PDE3-Hemmer Cilostazol verhinderten ebenfalls die Aktivierung der Blutplättchen. IBMX hatte zwar eine etwas stärkere Wirkung, ist aber im Gegensatz zu Cilostazol in der Humanmedizin ausschließlich *ex vivo* oder *in vitro* getestet worden. Die Autoren postulierten folglich, dass sowohl Heparin, als auch der PDE3-Hemmer Cilostazol sich als Pro- oder Metaphylaxe bei EHV-1-Infektion eignen könnten, um das Risiko von Aborten oder EHM zu reduzieren (STOKOL, et al. 2016).

Die Untersuchungen zu steroidal und nicht-steroidal Entzündungshemmern *in vitro*, sowie von Thrombozyteninhibitoren *ex vivo*, sind möglicherweise ein erster Schritt in Richtung EHV-1-Abortprophylaxe und Therapieerfolg bei EHM. Umfangreiche *in vivo* Studien sind allerdings nötig, um die Wirkung bei klinischer Erkrankung, mögliche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten und eine effektive Dosis zu ermitteln. Einen ersten Versuch, Heparin bei EHM einzusetzen unternahm kürzlich Walter et al. In einem Fallbericht zu einem EHV-1-Ausbruch mit neurologisch erkrankten Tieren wurden 30 Patienten, die unterschiedlich, aber nicht mit Heparin behandelt wurden, mit 31 Tieren, denen Heparin verabreicht wurde, verglichen (WALTER, et al. 2016). In der unbehandelten Gruppe entwickelten sieben Tiere eine EHM, während in der

behandelten Gruppe nur eine Stute neurologisch erkrankte. Somit erkrankten mit Heparin behandelte Tiere zwar signifikant seltener als unbehandelte. Abschließende Folgerungen können allerdings aufgrund limitierender Faktoren in der Studie nicht getroffen werden. So fällt insbesondere ins Gewicht, dass sich der Untersuchungszeitpunkt der unbehandelten Kontrollgruppe (Fieber ein bis neun Tage nach dem Indexfall) von dem der behandelten Tiere (Fieber zehn bis 26 Tage nach dem Indexfall) unterscheidet. Außerdem handelte es sich weder um eine randomisierte, noch um eine verblindete Studie.

Verschiedene Studien wurden durchgeführt, die sich mit dem Einsatz von Virostatika bei EHV-1-Infektion befassen. Garré et al. untersuchten zunächst verschiedene Nukleosid-Analoga *in vitro*, die in der Humanmedizin gegen Herpesinfektionen eingesetzt werden. Ziel war es die Menge an Wirkstoff, welche die Plaqueformation in equiden embryonalen Lungenzellen um 50% reduzierte (EC_{50}), zu ermitteln. Ganciclovir erwies sich dabei im Vergleich zu Aciclovir als effektiver (GARRE, et al. 2007b). Da Aciclovir allerdings aufgrund seines niedrigen Preises von Pferdebesitzern besser angenommen wird, wurde in einem weiteren Experiment die Verabreichung von Aciclovir i.v. mit der oralen Gabe (p.o.) von dem Aciclovir-Vorläuferwirkstoff Valaciclovir verglichen. Hier konnten anhand der wesentlich praktischeren Anwendung von Valaciclovir p.o. mit einer Dosis von dreimal täglich 40 mg/kg Körpergewicht (KGW) konstante EC_{50} erzielt werden (GARRE, et al. 2007a). Maxwell et al. entwickelten eine Valaciclovir-Therapie über sieben Tage, bei der innerhalb von 48 Stunden eine effektive Dosis Aciclovir im Serum erzeugt werden konnte (MAXWELL, et al. 2008). Dabei mussten 27 mg/kg alle 8 h über 48 h gegeben werden, woraufhin anschließend mit einer Gabe von 18 mg/kg alle 24 h die Serumkonzentration aufrechterhalten werden konnte. Mit Penciclovir und seinem Vorläuferwirkstoff wurden ähnliche Werte erreicht, wie mit Valaciclovir, während in einer nach gleichem Muster aufgebauten Studie zu Ganciclovir und seinem Vorläuferwirkstoff allein die intravenöse (i.v.) Gabe (2,5 mg/kg KGW innerhalb der 24 h 3 Mal und an den folgenden Tagen 2 Mal täglich) die vormals *in vitro* gemessenen EC_{50} erreichen konnte (TSUJIMURA, et al. 2010, CARMICHAEL, et al. 2013). Einen anderen Therapieansatz untersuchten Ons et al.. Mittels eines Immunmodulators, der inaktiviertes *Parapoxvirus ovis* enthält wurde auf die Stärkung der angeborenen Immunantwort abgezielt. In einem

Infektionsexperiment mit EHV-1 konnten in der mit dem Präparat behandelten Gruppe höhere Werte der IFN- γ und - β sowie der IL-15 und -18 gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden. Außerdem waren sowohl die klinischen Symptome, als auch die Menge des über die Nasenschleimhaut ausgeschiedenen Virus in der behandelten Gruppe niedriger (ONS, et al. 2014). Allerdings lief die Infektion des Bestandes kontrolliert ab und die behandelte Gruppe erhielt die erste Dosis des Immunmodulators zwei Tage vor dem Kontakt mit EHV-1. Außerdem wurde die Versuchsgruppe im Zeitraum des Experiments unkontrolliert mit *Streptococcus equi* infiziert. Somit ist auf Grundlage der Studie nicht abschließend zu beurteilen, ob im Falle eines Behandlungsbeginns nach einer natürlichen Infektion mit EHV-1 vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können. Dennoch ist der Einsatz des *Parapoxvirus ovis* Immunmodulators in einem betroffenen Bestand in jedem Falle bei den Tieren sinnvoll, die, wenngleich zunächst negativ getestet, ansteckungsgefährdet sind. Auch wurde die Gabe von Zink und dem dadurch verringerten Risiko einer EHM diskutiert (TRAUB-DARGATZ, et al. 2013). Allerdings waren in der Studie die Fallzahlen zu gering, um dies abschließend zu beurteilen.

Als Spätfolge bei EHM mit Blasenlähmung kann es außerdem aufgrund des unkontrollierten Harnabsatzes zu Verunreinigungen des Perineums und der Hinterhand kommen, denen mit regelmäßigem Waschen und Einreiben mit wasserabweisender Salbe, sowie Einbandagieren des Schweifes entgegengewirkt werden kann (PUSTERLA und HUSSEY 2014).

3.7. Kontrolle eines EHV-1-Ausbruches

In Deutschland existieren keine rechtlichen Vorschriften zum Vorgehen bei einem EHV-1 Ausbruch. Gleichwohl ist die Kontrolle der Infektion innerhalb des Bestandes sowie jede Einschränkung des Risikos einer Ausbreitung über die Bestandsgrenzen hinaus von Bedeutung, um das Ausmaß wirtschaftlicher und emotionaler Verluste einzugrenzen. Da der größere Anteil der Pferdepopulation latent infiziert ist und die Diagnose des latenten Virus im Pferd *ante mortem* (a.m.) nicht sicher zu stellen ist (s.o.), kann die Einschleppung in einen Bestand nicht ganz verhindert werden. Gleichwohl kann man das Risiko eines Ausbruches und eine Ausbreitung des Virus mit einigen Maßnahmen reduzieren. Innerhalb

eines Betriebes sollten die Gruppen so klein wie möglich gehalten und Alters- und Risikogruppen nicht vermischt werden. Insbesondere Stuten im riskanten letzten Trimester der Trächtigkeit sollten getrennt von anderen Tieren gehalten werden (SLATER 2013, DUNOWSKA 2014). Kommen neue Tiere in die Herde, sollten diese bereits vor der Ankunft geimpft worden sein und eine Quarantäne von mindestens 21 Tagen ist zu empfehlen. Neun von zehn EHM-Ausbrüchen sind auf ein Tier zurückzuführen, das entweder selbst als Indextier von auswärts in die Herde kam oder vorher z. B. auf einem Turnier oder einer Auktion Kontakt zu einem Indextier, jedenfalls aber eine Transporthistorie hatte (GOEHRING, et al. 2006). Tragende Stuten sollten aufgrund des stressreichen Transportes spätestens ab dem 28. Tag vor dem Stichtag nicht mehr transportiert werden; ein Herdenwechsel in der späten Trächtigkeitsphase ist allgemein zu vermeiden (SLATER 2013, GONZALEZ-MEDINA und NEWTON 2015). Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen ist ein Ausbruch nie ganz zu verhindern. Kommt es schlussendlich dazu, so sollten als erste Maßnahme die erkrankten Tiere isoliert werden, idealerweise luftdicht von dem Rest des Bestandes und nur über eine Hygieneschleuse für Personen zu erreichen sein. Der Aufenthalt im Isolationsbereich ist auf das Nötigste zu beschränken und zutrittsberechtigtes Personal sollte mit dem Quarantänenmanagement vertraut sein. Overalls, Einmalhandschuhe und Überziehschuhe sollten vor Betreten angelegt werden. Diese sollten entweder für den einmaligen Gebrauch vorgesehen sein oder gewaschen und desinfiziert werden, bevor ein Kontakt mit nicht infizierten Tieren möglich ist. Gleiches gilt für in den Isolationsbereich eingebrachtes Gerät, Futter und Einstreu. Beim Verlassen des Quarantänebereiches müssen Hände gewaschen und desinfiziert werden. Um frühestmöglich weitere Erkrankungen im Bestand zu erkennen sollte zweimal täglich bei allen Tieren Temperatur gemessen werden. Besonders sollte auf das Auftreten klinischer Symptome, die auf EHV-1 hinweisen können, geachtet und idealerweise in kurzen Abständen, am besten täglich Nasentupfer genommen und auf EHV-1 untersucht werden (GOEHRING, et al. 2010a). Allerdings ist dies selten praxistauglich. Sinnvoll ist für das Quarantänenmanagement nach Abklingen der Fieberfälle in regelmäßigem Abstand Proben zu nehmen und bei drei aufeinander folgenden negativen Nasentupfern aller Tiere, sowie anschließenden 14 Tagen Wartezeit die Quarantäne aufzuheben (GOEHRING, et al. 2010a).

Bis dahin müssen sämtliche Ausscheidungen eines erkrankten Tieres, insbesondere Nasenausfluss, sofort beseitigt und die Umgebung desinfiziert werden. Mist ist ebenfalls zu desinfizieren. Alle Gegenstände, Ausrüstung sowie Transportfahrzeuge, die zeitnah zu der Erkrankung mit dem Tier in Kontakt waren sind gründlich zu reinigen zu desinfizieren (SLATER 2013). Abortmaterial oder totgeborene Fohlen sind hochkontagiös und sollten in bruch- und reißfesten, luftdichten Behältnissen zügig sicher entsorgt und der Bereich desinfiziert werden (GONZALEZ-MEDINA und NEWTON 2015). Der Tierverkehr auf und von dem Betrieb ist zu unterbinden. Ein Tier sollte solange als ansteckend eingestuft bleiben, bis der Laborbefund zu einem gegenteiligen Ergebnis kommt (s.o.).

Stuten können in der Regel im zweiten Östrus nach dem Verlust des Fohlens durch EHV-1 wieder besamt werden (SLATER 2013).

3.8. Impfung und prophylaktische Möglichkeiten während eines EHV-1-Ausbruches

Neben den oben beschriebenen Maßnahmen zur Prävention und Kontrolle von EHV-1-Ausbrüchen in Equidenbeständen ist die Impfung die wichtigste Maßnahme um einer Infektion mit EHV-1 und einer Folgeerkrankung in Einhufern vorzubeugen. Bei Kydd et al. ist die Entwicklung der EHV-1-Impfung von seinen Anfängen in den 1940er Jahren bis in die Gegenwart ausführlich beschrieben (KYDD, et al. 2006b). Dieses Kapitel verschafft Einblick in einige wichtige Fortschritte, die seit der Jahrtausendwende erzielt wurden.

Erste Erfolge in der Bekämpfung der EHV-1-Aborte mit Vakzinen konnten in den 1960er Jahren verzeichnet werden. 1966 wurde auch der EHV-1-Strang Rac-H von einem abortierten Fetus isoliert, auf dessen Derivat das derzeit in Europa lizenzierte modifizierte Lebendvakzin (MLV) Prevaccinol[®] (MSD, Deutschland) basiert. Seitdem wurden zahlreiche Untersuchungen zu der Effektivität verschiedener Impfstoffe durchgeführt, allerdings aus Gründen der Praktikabilität meist nur auf der Grundlage von VN-Titern, welche lediglich einen Teil der Immunantwort wiedergeben (KYDD, et al. 2006a). Überwiegend liefern die Impfstoffe weltweit einen Schutz gegen EHV-1-induzierte respiratorische Erkrankungen. Impfstoffe mit hoher Antigenkonzentration nehmen teilweise auch

für sich in Anspruch, einen Schutz gegen den EHV-1 induzierten Abort zu liefern (HELDENS, et al. 2001). Es existiert einstweilen allerdings noch kein Vakzin, das vor EHM schützt und aktuell gibt es keine Möglichkeit Equiden individuell gegen EHV-1 zu schützen (WAGNER, et al. 2015).

Heldens et al. impften fünf Stuten dreimal in den Trächtigenmonaten fünf, sieben und acht beziehungsweise neun, sowie 20 Fohlen unterschiedlicher Rassen zweimal in einem Abstand von vier Wochen mit einem in Europa handelsüblichen inaktivierten Vakzin (Duvaxyn[®] EHV-1,4) gegen EHV-1 und -4. Die Tiere wurden in einem Infektionsexperiment mit EHV-1 und -4 jeweils vier ungeimpften tragenden Stuten beziehungsweise zehn ungeimpften Fohlen gegenübergestellt. Alle tragenden Stuten und zehn geimpfte, sowie fünf ungeimpfte Fohlen wurden mit dem hochpathogenen EHV-1-Strang Ab4 infiziert. Die restlichen Fohlen wurden EHV-4 ausgesetzt. In den geimpften Fohlen stiegen in der Folge der EHV-1-, sowie der EHV-4-Infektion die VN- und CF-Konzentrationen deutlich schneller an als in den Kontrollgruppen, die nicht geimpft wurden. Außerdem korrelierten hohe VN-Titer mit kurzer Virusausscheidung. In den Stuten konnte nach drei Impfungen keine Serokonversion beobachtet werden. Gleichwohl schieden die geimpften Tiere weniger Virus aus als die Kontrolltiere. Ein bedeutendes Untersuchungsergebnis war, dass die Abortrate in den ungeimpften Stuten bei 100% lag, während nur eine von fünf geimpften Stuten abortierte. Damit war die Abortrate der Kontrolltiere signifikant höher als die der Vakzin-Gruppe. Die Autoren folgerten daraus, dass das inaktivierte EHV-1 und -4 Vakzin EHV-1 induzierten Aborten bei dem Großteil einer geimpften Herde vorbeugt (HELDENS, et al. 2001). Die Studie von Patel et al. evaluierte, ob ein MLV der Klon (C147) eines deutschen abortogenen EHV-1-Stranges (M8) als einzelne IN Impfung vor Aborten nach experimenteller Infektion mit EHV-1 schützen konnte. Sechs Stuten wurden zwischen dem dritten und fünften Trächtigenmonat und sechs weitere Stuten im sechsten Trächtigenmonat IN mit C147 geimpft. Sechs weitere tragende Stuten fungierten als ungeimpfte Kontrollen. Alle 18 Tiere wurden im neunten Trächtigenmonat mit EHV-1 infiziert. Dauer und Menge der Virusausscheidung waren in beiden Vakzin-Gruppen deutlich vermindert gegenüber den Kontrolltieren. Während alle ungeimpften Tiere abortierten, wobei in allen Plazentae und in fünf von sechs auch im Fetus EHV-1 nachgewiesen werden

konnte, brachten vier von sechs in der frühen Trächtigkeitsphase geimpfte Stuten und fünf von sechs im sechsten Trächtigkeitsmonat geimpfte Stuten lebende Fohlen zur Welt (eine Stute hatte bereits vor der EHV-1-Infektion abortiert). Von den abortierten Fohlen der Stuten in der Vakzin-Gruppe war eines EHV-1 positiv und eines EHV-1 negativ. Somit waren sämtliche geimpfte Tiere signifikant gegenüber der Kontrollgruppe vor EHV-1 induziertem Abort geschützt und darüber hinaus auch gegen klinische Erkrankung und Virämie. Allerdings führte die Verabreichung von C147 selbst zu einer Virämie und der Impfstoff kam nie zum Einsatz (PATEL, et al. 2003a). Goehring et al. untersuchten im direkten Vergleich die Wirksamkeit eines auf dem Rac-H-Strang basierenden MLV und eines für Abort-Prävention lizenzierten inaktivierten Vakzins. Insgesamt umfasste die Studie 24 Tiere, von denen je acht mit einem der beiden Impfstoffe dreimal innerhalb von 97 Tagen geimpft wurden. Weitere acht fungierten als ungeimpfte Kontrollen. Beide Impfgruppen zeigten bereits nach der ersten Impfung signifikant erhöhte VN-Konzentrationen gegenüber den Kontrollen, wobei nach der ersten und zweiten Impfung die VN-Titer der Tiere, die mit dem inaktivierten Vakzin geimpft worden waren, auch deutlich gegenüber der MLV-Gruppe erhöht waren. Infolge der dritten Impfung waren die Werte der VN in beiden Vakzingroupen vergleichbar. Anschließend erfolgte die Infektion mit einem EHV-1-Strang der Variante D₇₅₂ (OH03). Die klinische Erkrankung verlief in beiden Vakzingroupen deutlich milder gegenüber den ungeimpften Tieren, wobei die Tiere, denen das MLV verabreicht worden war, die schwächste klinische Symptomatik aufwiesen. Eine deutliche Reduktion im Auftreten von Virämie wurde in den Tieren nachgewiesen, die mit dem inaktivierten Impfstoff geimpft worden waren. Leider konnte auch hier die zelluläre Immunantwort nicht gemessen werden (GOEHRING, et al. 2010c). CTL hätten in dem von Allen et al. entwickelten *chromium release assay* und CTLp in dem von O'Neill et al. entwickelten *limiting dilution assay* bestimmt werden können (ALLEN, et al. 1995, O'NEILL, et al. 1999). Allerdings sind diese Tests technisch anspruchsvoll und zeitaufwändig und konnten für die große Anzahl an Proben der Studie nicht realisiert werden (KYDD, et al. 2006b, GOEHRING, et al. 2010c). Angelehnt an die Erfolge bei Impfungen gegen Influenza, untersuchten Soboll et al. die Wirksamkeit von DNA-Impfstoffen gegen EHV-1. Die Autoren erwarteten besonders hinsichtlich einer Stimulation der zellulären Immunantwort Erfolge im Gegensatz zu den bis dato getesteten inaktivierten Impfstoffen und MLV. Fünf

Ponys wurden mit einem auf den für die Glykoproteine gB, gC und gD kodierenden Genen basierenden Impfstoff geimpft. Fünf weiteren wurde ein auf dem IE und dem frühen Protein UL 5 basierendes DNA Vakzin verabreicht. Vier Impfungen wurden innerhalb von 126 Tagen appliziert. Als Kontrollen waren fünf ungeimpfte Ponies eingesetzt. Allerdings fiel sowohl die humorale, als auch die zelluläre Immunantwort infolge der Impfung nur schwach aus und das Vakzin schützte weder gegen klinische Erkrankung noch gegen Virämie, wie die experimentelle Infektion mit dem EHV-1-Strang A138 27 Tage nach der letzten Impfung, zeigte (SOBOLL, et al. 2006).

Neben der Antigen- beziehungsweise Virusbeschaffenheit des Impfstoffes spielen die Faktoren Antigenmenge, Adjuvans und Impfschema eine bedeutende Rolle für die Effektivität des Vakzins (HOLMES, et al. 2006). Die Hersteller der in Europa lizenzierten Impfstoffe geben einen immunologischen Schutz für einen Zeitraum von sechs Monaten an. Bei einer Grundimmunisierung mit dem inaktivierten Vakzin, die aufgrund maternaler Antikörper frühestens ab dem dritten Lebensmonat durchgeführt werden kann, erfolgt eine zweite Impfung vier bis sechs Wochen später. Im Falle einer Trächtigkeit wird nach Grundimmunisierung im fünften, siebten und neunten Monat geimpft. Das MLV kann laut Herstellerangaben frühestens ab dem sechsten Lebensmonat verabreicht werden und eine zweite Dosis wird drei bis vier Monate später appliziert (MSD TIERGESUNDHEIT 2009, ZOETIS DEUTSCHLAND 2017). Die EHV-1 induzierte Immunantwort und damit auch die Immunantwort auf die EHV-1-Impfung variiert allerdings auch zwischen den Altersgruppen und Rassen sowie zwischen Individuen. Wagner et al. untersuchten in 15 Islandpferd-Stuten, die nachweislich niemals zuvor EHV-1 ausgesetzt waren, ein Impfschema von vier Impfungen innerhalb von acht Monaten mit Abständen von 20, 60, 90 und wieder 60 Tagen, also 20 Tage, drei, sechs und acht Monate nach der ersten Impfung. Dabei wurde sowohl die humorale (*Fluorescent bead-based EHV-1 multiplex assay*/Kügelchenfluorophor-basierte EHV-1 Multiplexanalyse) als auch die zelluläre Immunantwort (*Flow cytometric analysis*/Durchfluss-zytometrische Analyse) gemessen. Die Studie ergab, dass keinesfalls jede Impfung zu einem Anstieg der VN-titer führte. So stiegen die EHV-1-spezifischen Antikörpertiter nach der ersten und zweiten Impfung an, fielen aber nach der dritten Impfung weiter ab, wobei sie bis zur vierten, immer noch doppelt so hoch waren wie vor der ersten

Impfung sechs Monate zuvor. Nach der vierten und fünften Impfung wurde dann wieder eine Zunahme detektiert. Die auf einer *in vitro* Stimulation der PBMC durch EHV-1 basierende Messung der Zytokine ergab einen Anstieg des von CD4⁺ T-Zellen produzierten IFN- γ nach der ersten, dritten und fünften, wogegen die Werte nach der zweiten und vierten Impfung abfielen. Konzentrationen des von CD8⁺ T-Zellen produzierten IFN- γ blieben niedrig. Die Autoren zeigten somit, dass nicht jede EHV-1-Impfung zu einer Induktion der spezifischen Immunantwort führt. Darüber hinaus, dass lediglich die auf der T-Helferzelle (Th) 1 basierende zelluläre Immunantwort stimuliert wurde (WAGNER, et al. 2015). In der Studie wurde ein inaktiviertes Vakzin untersucht, das einen Schutz allein vor EHV-1 induzierter Erkrankung der oberen Atemwege liefert. Es wird allerdings empfohlen, um schweren Folgen einer EHV-1-Infektion wie Abort oder EHM vorzubeugen, unter inaktivierten Vakzinen solche zu bevorzugen, die für Abortprävention lizenziert sind (GOEHRING, et al. 2010c). Diese scheinen eine Virämie verhindern zu können, welche die Grundvoraussetzung eines Abortes oder einer EHM ist.

Traub-Dargatz et al. untersuchten einen EHV-1-Ausbruch in Odgen, Utah, USA, bei dem 19 von 33 EHV-1-infizierten Pferden an EHM erkrankt waren. Eine Impfung innerhalb der letzten fünf Wochen vor dem Ausbruch wurde dabei mit einem erhöhten Risiko assoziiert, an einer EHM zu erkranken (TRAUB-DARGATZ, et al. 2013). Allerdings sind die Fallzahlen (19) niedrig, außerdem wurden nicht alle Tiere im Bestand geimpft und keine Angaben zu den applizierten Impfstoffen gemacht. Wahrscheinlich wurden die in den USA handelsüblichen multivalenten Impfstoffe eingesetzt. Gleichwohl ist diese Erkenntnis interessant, aber es sind weitere Untersuchungen zu der Kausalität zwischen einer Impfung in letzter Zeit und der Ausbildung einer EHM erforderlich.

Untersuchungen zur Ermittlung der Impfschemata für sowohl die Impfstoffe als auch für jedes Individuum sind notwendig, um die Steuerung eines effektiven Impfschutzes zu gewährleisten. Sogenannte „*low responder*“, Individuen, die auf das kommerzielle Impfschema weder mit VN-Titer-Anstieg, noch mit einer Induktion der zellulären Immunantwort reagieren, müssen identifiziert werden (WAGNER, et al. 2015). Nicht alle Tiere reagieren mit einem VN-Titeranstieg auf eine Impfung, wie auch die Impfstudie von Holmes et al. zeigte. Die Autoren

diskutierten dieses Ergebnis unter anderem dahingehend, dass bei den Tieren aufgrund ihrer Impfgeschichte oder früherer Exposition mit EHV-1 deshalb bereits EHV-1-spezifische VN-Titer vorhanden waren (HOLMES, et al. 2006). Für „*low responder*“ müssen gegebenenfalls individuelle Impfprogramme entwickelt werden. Dies ist nicht zuletzt wichtig, um Equidenhalter von der Notwendigkeit zu überzeugen, eine Impfung gegen EHV-1 durchzuführen. Zur Zeit impfen gerade einmal 15% der Pferdebesitzer in Deutschland ihre Tiere gegen EHV-1 (AZAB und OSTERRIEDER 2016). Grund dafür sind allerdings auch Berichte über Nebenwirkungen wie Schwellung der Infektionsstelle und Fieber infolge der Applikation des in Mitteleuropa regelmäßig angewendeten inaktivierten Vakzins Equip[®] EHV-1, 4 (ZOETIS DEUTSCHLAND 2017). Zurückzuführen sind die impfassozierten Symptome möglicherweise auf das dem Antigen beigemischte Carbomer[®] Carbopol 934P. Der Wirkmechanismus dieses Adjuvans ist noch nicht ganz geklärt, sodass es schwer ist, seine Wirkung gegenüber den Tierhaltern zu rechtfertigen. Allerdings konnte in einer Studie zu einem Impfstoff gegen das *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* gezeigt werden, dass die Beimischung eines Carbomer-Adjuvans die zelluläre Immunantwort deutlich früher induzierte, als das gleiche Vakzin ohne Adjuvans (MAIR, et al. 2015).

Weiterhin sollte die Entwicklung der Impfstoffe vorangetrieben werden. Neue Vakzine sollten hohe nasale Antikörper- und VN-Titer induzieren, welche dann an der Eintrittspforte und im Falle einer Virämie in der Zirkulation freigesetztes Virus neutralisieren können. Hohe CD8⁺-Gedächtnis-CTL sollten nach der Immunisierung vorhanden sein, um virusinfizierte Zellen zu zerstören und somit die Ausbreitung des EHV-1 im Organismus zu verhindern (KYDD, et al. 2006b).

4. Maultiere und EHV-1

Der genaue zeitliche und geographische Ursprung der Pferdehaltung ist bisher unbekannt. Der Esel wird mindestens seit Mitte des 4. Jahrtausends vor Christus (v. Chr.) als Haustier gehalten. Maultiere wurden wahrscheinlich erstmals im 3. Jahrtausend v. Chr. im heutigen Westsyrien gezüchtet und eingesetzt (VON DEN

DRIESCH und PETERS 2003). Sie entstehen als Arthybriden aus der Kreuzung eines Eselhengstes mit einer Pferdestute und sind morphologisch pferdeähnlicher (PIETTA und BARTMANN 2012). Maultiere können das Stockmaß ihrer Elterntiere überschreiten und in der Regel schwerere Lasten tragen, als ein Pferd gleicher Größe und gleichen Gewichts (TRAVIS 1990). Die Hengste sind immer und die Stuten bis auf wenige Ausnahmen unfruchtbar (CHANDLEY, et al. 1974, RYDER, et al. 1985). Dies ist neben der seit 100 Jahren bekannten chromosomal bedingten Störung im Ablauf der Meiose der Keimzellen, bei der Maultierstute darüber hinaus möglicherweise auch auf eine endometriale Fehldifferenzierung und die nicht abgestimmte Steroidhormon-Expression zurückzuführen (RASS 2011).

Weltweit existieren schätzungsweise 10 Millionen Maultiere (FAO 2014). In der dritten Welt werden sie in erster Linie als Arbeitstiere eingesetzt, wobei ein großer Teil der landwirtschaftlichen Betriebe im gesamten Aufgabenbereich von ihnen abhängig ist (MA 2006, FAO und BROOKE 2009). Dagegen werden von den etwa 200.000 Maultieren in Europa (FAO 2014) viele als Freizeit- und Beistelltiere gehalten. Das bekannteste Beispiel dafür liefert wohl die *Donkey Sanctuary* in Großbritannien und der Republik Irland, welche 2015 knapp 6000 Esel und Maultiere auf eigenen Betrieben hielt oder innerhalb der Hoheitsgebiete beider Länder in Patenhand abgegeben hat (COOK 2015). Darüber hinaus finden Maultiere als militärische Tragtiere in der Deutschen Bundeswehr und in der Schweizer Armee nach wie vor Verwendung. Das Einsatz- und Ausbildungszentrum für Tragtierwesen 230 im oberbayerischen Bad Reichenhall hält unter anderem etwa 40 Maultiere und besitzt damit den einzigen Großbestand innerhalb der Bundesrepublik.

Viele Bereiche, in denen bereits umfangreiche wissenschaftliche Erkenntnisse zu Pferden vorliegen, sind bezüglich des Maultieres bisher nicht gründlich erschlossen (BURNHAM 2002). In der veterinärmedizinischen Praxis wird folglich häufig das Wissen über Pferde auf Maultiere übertragen. Dies geschieht ungeachtet der Tatsache, dass Maultiere sich anatomisch, physiologisch, ethologisch und pharmakokinetisch von Pferden unterscheiden (BURNHAM 2002, LATZEL 2008, PROOPS, et al. 2009, PIETTA und BARTMANN 2012). Ähnlich Eseln, sind Maultiere bezüglich ihrer Schmerzäußerungen im Vergleich zu Pferden eher reduziert und introvertiert. Infolgedessen können auch ernste Beschwerden bisweilen nicht rechtzeitig erkannt oder unterschätzt werden

(TAYLOR und MATTHEWS 2002, PIETTA und BARTMANN 2012). Auch die uneingeschränkte Übernahme von für das Pferd bewährten Medikamentendosierungen muss kritisch gesehen werden. Latzel fand heraus, dass zusätzlich zur abweichenden Pharmakodynamik und -kinetik die klinische Wirkung des α_2 -Agonisten Xylazin bei Maultieren im Vergleich zu Pferden kürzer und die Sedierungstiefe signifikant verringert ist. Die Autorin errechnete, dass die Dosis Xylazin für ein Maultier um 50% gegenüber dem Pferd erhöht werden müsse, um eine vergleichbare klinische Wirkung zu erzielen (LATZEL 2008). Peck et al. stellten außerdem fest, dass Sulfamethoxazol und Trimethoprim langsamer in Maultieren verstoffwechselt werden, als in Pferden oder Eseln (PECK, et al. 2002). Allerdings war die Anzahl der Probanden in der Studie gering.

Proops et al. untersuchten das soziale Verhältnis von Eseln, Maultieren und Pferden in gemischten Herden und schlussfolgerten, dass Maultiere sich selten dominant gegenüber Pferden verhalten, allerdings häufig in der Rangordnung über den Eseln stehen (PROOPS, et al. 2012). Die Versuchsgruppe war hier jedoch ebenfalls klein.

Auch hinsichtlich EHV-1 gibt es bei Pferd und Maultier tierartige Unterschiede. Pusterla et al. untersuchten einen EHV-1-Ausbruch mit EHM-Fällen in Kalifornien von dem eine aus 141 Maultieren und Pferden bestehende Herde, betroffen war. Die Autoren beobachteten, dass nur Pferde an EHM erkrankten nicht aber Maultiere, obwohl eine gleiche Anzahl beider Arten EHV-1 ausgesetzt war. Außerdem schieden die Maultiere Virusmengen über die Nase aus, die mit denen der an EHM erkrankten Pferde vergleichbar und zehn Mal höher waren, als die, welche in den Pferden nachgewiesen wurden, die keine Symptomatik zeigten. Die Autoren konkludierten, dass Pathogenese, virale Kinetik und klinische Erscheinung in Folge einer EHV-1-Infektion sich zwischen Pferd und Maultier unterscheiden. Das legt insbesondere die fehlende Evidenz der Entwicklung neurologischer Symptome bei Maultieren im Zusammenhang mit EHV-1 nahe. Ferner weisen Sie daraufhin, dass aufgrund der häufig gemischten Haltungsform diese Beobachtungen und deren Ursache weiter untersucht werden müssen, um Strategien zur Prävention und Kontrolle von EHV-1-Ausbrüchen zu entwickeln (PUSTERLA, et al. 2012b). Untersuchungen aus den Entwicklungsländern fehlten bis *dato*. Solche wurden dann kürzlich beschrieben (NEGUSSIE, et al. 2015). Die Autoren untersuchten erstmals Ausbrüche neurologischer Erkrankungen in

Äthiopien und kamen zu folgendem Ergebnis. Zwischen 2011 und 2013 wurden 91 Fälle neurologischer Erkrankungen auf EHV-1 zurückgeführt und als EHM diagnostiziert. Zweiundachtzig davon waren Esel, sechs Pferde und drei Maultiere. Damit erkrankten Esel häufiger klinisch als Pferde oder Maultiere (NEGUSSIE, et al. 2015). Die Entwicklung einer EHM beschränkt sich also nicht länger allein auf Pferde, sondern eine EHV-1-Infektion kann auch bei anderen domestizierten Equiden schwerwiegende Folgen haben. Maultieren ist damit hinsichtlich EHV-1 nicht mehr allein eine Rolle als epidemiologischer Faktor zuzuschreiben. Der oben bereits beschriebene unkontrollierte Grenzverkehr mit Equiden (YILDIRIM, et al. 2015) ist ein Phänomen, das den überwiegenden Teil aller Länder weltweit betrifft. Möglicherweise ist EHV-1 auch in Regionen verbreitet, in denen in diesem Zusammenhang bisher keine klinische Erkrankung auftrat. Weitere Untersuchungen in Maultieren und Eseln zu der EHV-1-Virusdynamik und darüber hinaus die Entwicklung von Impfprogrammen sind notwendig. Nach eigener Erkenntnis existieren bislang keine Studien, welche die Wirksamkeit von Impfungen in Maultieren und Eseln untersuchen..

III. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

1. Tiere

Insgesamt waren 31 Tiere Teil dieser Studie (Tabelle 1). Hiervon waren zwei Haflinger- und zwei Maultier-Wallache in der Pilotstudie eingesetzt.

Zwölf Haflinger-Wallache im Alter von vier bis 18 Jahren (Median 11,5) und 12 Maultiere, darunter neun Wallache und sechs Stuten im Alter von neun bis 17 Jahren (Median 14), waren Teil des ersten Experimentes der Hauptstudie. Diese 24 Tiere sowie drei weitere Maultier-Wallache (Kontrolltiere) kamen in Experiment 2 zum Einsatz, sodass sich dann Zusammensetzung und Median des Alters (12) etwas verschoben (Tabelle 1).

Alle 31 Probanden waren Diensttiere des Einsatz- und Ausbildungszentrums für Tragtierwesen 230 (EAZ 230) der Bundeswehr in Bad Reichenhall. Dies ist eine veterinärmedizinisch geführte Einheit der Bundeswehr. Die Tragtiere des EAZ 230 werden als Trag-, Zug- und Reittiere der Gebirgsjägertruppe im Rahmen von militärischen, in Ausnahmefällen auch zivilen Aufträgen insbesondere im Gebirge oder in schwierigem Gelände eingesetzt. Der Haupteinsatzzeitraum beginnt mit der Trainingsphase im Frühjahr, der Schwerpunkt liegt in den Sommermonaten. Im Spätherbst bzw. Frühwinter bis Ende März folgt, in Abhängigkeit von Aufträgen und Übungseinsätzen, eine Phase mit reduzierter Aktivität für die Tiere. In dieser Zeit absolvieren die Maultiere, um ein gewisses Leistungsniveau zu halten und eine artgerechte Bewegung sicherzustellen, überwiegend Bewegungsmärsche ohne große Lasten.

Die Probanden wurden aus einer Herde von insgesamt 50 Tieren (15 Pferde, 35 Maultiere) ausgewählt und waren gleichen Haltungs- und Trainingsbedingungen ausgesetzt. Die Tiere wurden innerhalb eines militärischen Sicherheitsbereiches artgerecht entsprechend der *Leitlinien zur Beurteilung von Pferdehaltung unter Tierschutzgesichtspunkten* (Stand 2009) des Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft nach Spezies getrennt in geräumigen Stallungen sowie in großzügigen, mit Witterungsschutz versehenen Freiläufen in Gruppenauslaufhaltung betreut (ZEITLER-FEICHT, et al. 2009). Die Futterration bestand bedarfsgerecht aus qualitativ gutem Heu, Hafer oder pelletiertem Ergänzungsfutter sowie vitaminisiertem Mineralfutter. Wasser war *ad libitum*

verfügbar. Für die tägliche Überwachung und Pflege der Tragtiere sorgten hierfür speziell zum Tragtierführer ausgebildete Soldaten. Die Hufpflege, sowie der erforderliche regelmäßige, als auch der orthopädische Hufbeschlag wurden in einer eigenen Schmiede durch staatlich geprüfte Militärhufschmiede durchgeführt. Neben einer Impfprophylaxe wurden die Tiere bezüglich Endo- und Ektoparasiten überprüft und behandelt. Die Impfprophylaxe umfasste die Immunisierungen gegen Tetanus (nach Grundimmunisierung alle 2 Jahre), Tollwut (nach Grundimmunisierung alle 2 Jahre), Equine Influenza (nach Grundimmunisierung halbjährlich bei Pferden und jährlich bei Maultieren) und EHV-1 und -4 (nach Grundimmunisierung halbjährlich). Grundsätzlich wurde die Impfung gegen EHV-1 und -4 immer in einem mindestens zweiwöchigen Abstand zu den anderen Immunisierungen durchgeführt. Soweit verfügbar wurde der Impfstoff Equip[®] EHV-1, 4 (ZOETIS DEUTSCHLAND 2017) eingesetzt.

Eine regelmäßige tierärztliche Überwachung und tiermedizinische Betreuung erfolgte durch die Veterinäroffiziere der Dienststelle in eigenen Untersuchungs- und Behandlungsräumen mit Kranken- und Quarantänestellungen.

Tabelle 1

Die Anzahl und das Alter der Tiere in den jeweiligen Abschnitten der Studie

		Stuten	Wallache	Alter	Alter (Median)
Pilot	Pferde	0	2	13 u. 19	-
	Maultiere	0	2	13 u. 14	-
Teil 1	Pferde	0	12	4-18	11,5
	Maultiere	6	6	9-17	14
Teil 2	Pferde	0	12	4-18	11,5
	Maultiere	6	9*	9-17	12

* 3 Kontrolltiere ohne IN Verabreichung des EHV-1-MLV

Die Durchführung des Tierversuches wurde entsprechend der *Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren* (TierSchVersV) bei dem im Bereich der BW zuständigen *Kommando Sanitätsdienst der Bundeswehr in Koblenz* angezeigt. Alle Eingriffe erfolgten im Einvernehmen mit dem *Tierschutzgesetz* und der zum Zeitpunkt der Anzeige geltenden TierSchVersV der Bundesrepublik Deutschland.

2. Versuchsaufbau

Zunächst wurde eine Pilotstudie an zwei Haflinger- und zwei Maultierwallachen durchgeführt. Zweck dieses Vorversuches war die Sicherheit der IN Applikation eines EHV-1-MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) zu dokumentieren. Dies war zum einen Auflage der Dienststelle, bei welcher der Versuch angezeigt worden war, und ermöglichte zum anderen, den Aufbau im Hauptversuch zu optimieren. Zur Sicherheit wurde deshalb über die vier Probanden für den gesamten Zeitraum der Pilotstudie eine Quarantäne verhängt. Diese beinhaltete ein Tierverkehrsverbot im Bereich des Quarantänestalles, sowie stark begrenzten Personenzugang. Gleichzeitig war letzterer nur durch eine Personen-Hygienschleuse möglich, in der Wechselkleidung angelegt werden musste. Vor dem Kontakt mit einem der Tiere wurden Kittel beziehungsweise Overall, Einmalhandschuhe und Kopfbedeckung angelegt. Weitere Auflage war ein Duschgang vor Verlassen des Stalles. Gerätschaften wie Schubkarren oder Mistgabeln wurden vor Verlassen des Bereiches desinfiziert. Die Vorräume der Stallungen konnten nur über Desinfektionsmatten betreten oder verlassen werden. Die Quarantäne wurde aufgehoben, als bei allen vier Tieren drei Tage in Folge kein EHV-1-Antigen mittels PCR in Nasentupfern nachgewiesen werden konnte. Das applizierte EHV-1 bestand aus einer Dosis (TCID₅₀ [Infektionsdosis bei der 50% des Gewebes infiziert werden] 10⁷ Rac-H [gefriergetrocknetes Pellet] in 5mL Phosphat-gepufferter Lösung [PBS]^{*}) des EHV-1-MLVs, welches mittels eines einfachen Absaugkatheters (ArgyleTM Aero-Flo Suction Catheter, Kendall Healthcare/Covidien, Ireland/Minesota, 48 cm x 4,7 mm) in den rechten ventralen Nasengang appliziert wurde. Zeitpunkt der Applikation wurde als pD0 bezeichnet. Diese Methode ist bereits früher in einem Infektionsexperiment erfolgreich eingesetzt worden (SOBOLL, et al. 2006). Zusätzlich zu einer Probe vor pD0, pD-2 erfolgte der EHV-1-Nachweis mit Nasentupfern, einen (pD1), drei (pD3), fünf (pD5) und sieben (pD7) Tage danach. In den Nasentupfern wurden darüber hinaus die Antikörper gC und gD sowie die Zytokine IFN- α , - γ , IL-4, -10 und -17 der nasopharyngealen Mukosa bestimmt.

* Medium vom Hersteller bereitgestellt

Abb. 1

Nasentupferentnahme während des Pilotversuches bei einem Maultier in Quarantäne

Außerdem wurden in Serumproben, genommen an pD-2, pD7 sowie 14 (pD14) und 21 (pD21) Tage nach pD0, VN-Titer analysiert. Die Tiere wurden während der Dauer der Quarantäne (sieben Tage) alle 24 Stunden von einem Veterinär klinisch untersucht. Die einzelnen Methoden der Probenentnahmen und Untersuchungen sind für den Hauptversuch im Detail beschrieben (siehe Kapitel 3 bis 5).

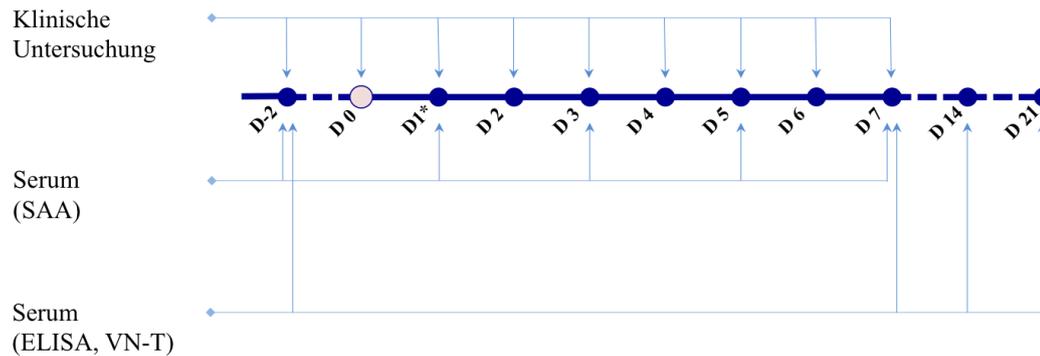
Der Hauptversuch gliederte sich in zwei Experimente:

Experiment 1, die Untersuchung der Immunantwort auf ein inaktiviertes EHV-1 und 4 Vakzin, war zeitlich um den Tag der Routineimpfung (D0) mit einem inaktivierten Impfstoff gegen EHV-1 und 4 angelegt. Probenentnahmen erfolgten zwei Tage vor der Routineimpfung (D-2), sowie an D1, D3, D5, D7, D14 und D21. Eine klinische Untersuchung der involvierten Tiere erfolgte an D-2, sowie von D0 bis D7 alle 24 Stunden (siehe Abb. 2).

Experiment 2, die Untersuchung der Immunologie nach IN Administration eines EHV-1-MLV, war um den Tag der Administration des MLV, 125 Tage nach der Routineimpfung (D'0) terminiert. Hier wurden Proben zwei Tage vor (D'-2),

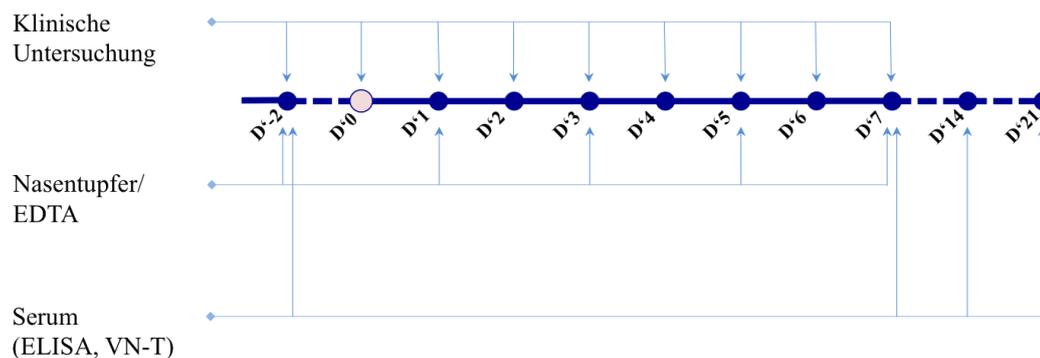
sowie einen (D'1), drei (D'3), fünf (D'5), sieben (D'7), 14 (D'14) und 21 (D'21) Tage nach der Administration des MLV entnommen. Eine klinische Untersuchung aller Probanden erfolgte an D'-2 und von D'0 bis D'7 alle 24 Stunden (siehe Abb. 3).

Abb. 2



*Versuchsaufbau Experiment 1: D'0: Tag der intramuskulären Impfung gegen EHV-1 und -4; *zusätzliche Gewinnung von SAA bei febrilen Tieren*

Abb. 3



Versuchsaufbau Experiment 2 mit D'0: Tag der IN EHV-1-MLV-Applikation

2.1. Intramuskuläre (IM) Impfung mit einem inaktivierten EHV-1 und 4 Vakzin (Experiment 1)

An D0 der Studie wurde jedem Tier des gesamten Bestandes je eine Dosis eines inaktivierten Impfstoffes (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) in den linken *Musculus pectoralis* injiziert. Der Impfstoff ist zugelassen für das Pferd,

kommerziell erhältlich, hat eine hohe Antigenkonzentration und enthält das Carbomer[®] Adjuvans Carbopol 934P.

2.2. Verabreichung eines modifizierten EHV-1 Lebendimpfstoffes (Experiment 2)

An Tag D'0 der Studie wurden 24 Dosen ($TCID_{50} 10^7$ Rac-H [gefriergetrocknetes Pellet] in 5mL PBS^{*}) eines EHV-1 MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) mit 5 mL 0,9% Natriumchlorid (NaCl)-Lösung in einer 10mL Spritze aufgezogen. EHV-1-Rac-H wurde ursprünglich aus einem abortierten Foetus isoliert. Es folgten eine *in vivo* Passage und Attenuierung in Hamstern, 80 Passagen in Nierenzellen von Schweinen und 176 Passagen in Nierenzellen von Kaninchen; in dem Strang ist ein Teil des Genoms in der USR herausgeschnitten (KYDD, et al. 2006b).

Anschließend erhielt jedes der ausgewählten 12 Haflinger und 12 Maultiere je 10 mL des verdünnten Impfstoffes durch die rechte und linke Nasenöffnung (je 5mL) auf die nasopharyngeale Mukosa. Um die Lösung möglichst großflächig zu verteilen wurde eine CH12 Redon-Drainage (4 mm x 500 mm) (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) über eine abgestumpfte Kanüle (1,6 x 10 mm) mit einer 20 mL Spritze verbunden (siehe Abb. 4), die im kaudalen Bereich des ventralen Nasenganges einen 'Rasensprenger-Effekt' erzeugte.

Drei weitere Maultiere fungierten als Kontrollen. Ihnen wurde PBS^{*} in 0,9% NaCl-Lösung ohne EHV-1-Rac-H nach derselben Methode verabreicht.

* Medium vom Hersteller bereitgestellt

Abb. 4

Apparatur zur Verabreichung des MLV; Links: CH12 Redon-Drainage, Mitte: abgestumpfte Kaniüle (1,6 x 10 mm), rechts: Spritze (20 mL)

3. Erfassung klinischer Daten

Die klinische Untersuchung beinhaltete die Messung der Rektaltemperatur, die Erfassung des Auftretens von Nasen- und Augenausfluss, sowie dessen Charakter, die Aufzeichnung der möglichen Ausbildung einer Konjunktivitis und die Protokollierung der Vergrößerung der Mandibularlymphknoten, sowie deren Schmerzhaftigkeit bei Palpation. Eine rektal gemessene Temperatur $>38^{\circ}\text{C}$ wurde als Fieber festgelegt. Ein Score für die klinischen Befunde wurde für die Untersuchung der Immunantwort auf das inaktivierte EHV-1 und 4 Vakzin in Abschnitt eins erstellt, beschrieben in Tabelle 2. Für die klinischen Befunde bei der Untersuchung der Immunologie nach IN Administration des EHV-1 MLV in Abschnitt zwei wurde der Score (Tabelle 2) verwendet, welcher vormals für ein EHV-1-Infektionsexperiment beschrieben worden war (GOEHRING, et al. 2010c).

Tabelle 2

Klinischer Score für Teil 1 und Teil 2 der Studie (GOEHRING, et al. 2010c)

Klinische Symptome	Beschreibung	Score
Fieber	Rektaltemperatur >38,0°C	2 oder 1*
Depression	Verminderte Reaktion im Umgang	1
Anorexie	Keine Futteraufnahme	1
Husten	Kein Husten	0
	Husten einmal bei Palpation der Trachea	0,5
	Husten < 3x spontan	1
	Husten ≥ 3x spontan	2
Nasenausfluss	Kein Nasenausfluss	0
	Seröser Nasenausfluss	0,5
	Mukopurulenter Nasenausfluss	1
	Hgr. mukopurulenter Nasenausfluss	2
Lokale Reaktion	Injektionsstelle obB	0
	Injektionsstelle sichtbar	1
	Injektionsstelle Ø Tischtennisball	2
	Injektionsstelle Ø Tennisball	3
Mandibularlymphknoten	Keine Veränderung	0
	Vergrößerung ≥2x	0,5
	Vergrößerung ≥3x	1
	Vergrößerung ≥4x	1,5
Dyspnoe	Keine Dyspnoe (≤36/Min)	0
	Ggr. Dyspnoe (>36/Min)	0,5
	Hgr. Dyspnoe (>36/Min + weitere Symptome)	1

* Der Score für Fieber betrug "2" in Experiment 1 und "1" in Experiment 2 der Studie

4. Probengewinnung

4.1. Blutproben

Alle Blutproben wurden entweder der rechten oder der linken *Vena jugularis* mittels einer 20 Gauge (0,9 x 38 mm) Kanüle (BD Vacutainer® Precisionglide™) entnommen. Probennahmen von 12 Haflingern und 12 Maultieren in 10 mL Vakuum-Serumröhrchen (BD Vacutainer®) erfolgten an D-2, D3, D5, D7, D14 und D21 nach der Impfung mit dem inaktivierten Impfstoff (Abb. 2). Letzteres zur Messung des Serum-Amyloid A (SAA) und der Bestimmung von VN-Titern zum

jeweiligen Zeitpunkt. An D1 zeigten vier Pferde und ein Maultier eine Rektaltemperatur von $>38^{\circ}\text{C}$. Von diesen Tieren wurde daraufhin am selben Tag zur Bestimmung der SAA-Konzentrationen zusätzlich Serum gewonnen. Die Blutproben wurden zur Gerinnung eine Stunde bei 18°C - 22°C inkubiert, anschließend zentrifugiert und das Serum in drei 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert, die bis zur Analyse im Labor bei -80°C aufbewahrt wurden. Analog dazu wurde in 10 mL K_2EDTA -Vakuurröhrchen (BD Vacutainer[®], BD Deutschland, Heidelberg, Deutschland) Vollblut zwischen D-2 und D7 genommen und als Backup bei -80°C gelagert. Gleichmaßen wurde Serum im zweiten Experiment, ca. vier Monate nach D0 in Experiment 1, an D'-2, sowie D'1, D'3, D'5, D'7, D'14 und D'21 von den 12 Haffingern und 12 Maultieren sowie den drei Kontroll-Maultieren gewonnen. K_2EDTA -Vollblut-Gewinnung erfolgte analog zwischen D'-2 und D'7 (Abb. 3). Nach der Entnahme wurde mit den Blutproben ebenso verfahren, wie für D-2 bis D21 beschrieben.

4.2. Nasentupfer

Nasentupfer wurden an D'-2, D'1, D'3, D'5 und D'7 bei 12 Haffingern und 15 Maultieren entnommen (Abb. 3). Dazu wurden jeweils zwei sterile Polyestertupfer (Fitzco Inc., Mineapolis, USA) 10-15 cm entweder in die rechte oder linke Nasenöffnung eingeführt und über fünf Sekunden mit mäßigem Druck an der Schleimhaut des Nasenseptums schnell nach kaudal und rostral gerieben. Anschließend wurde jeweils einer der beiden Tupfer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, das 1 mL Zellkulturmedium-basiertes Virustransportmedium (VTM) bestehend aus dem *minimal essential medium* (MEM) RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) mit fetalem bovinem Serum (5%) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland), Penicillin (100 IU/mL) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und Streptomycin (100 mg/L) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) enthielt, und bei -80°C bis zur PCR-Analyse gelagert. Das Duplikat wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1,5 mL PBS bei 4°C direkt ins Labor transportiert, bei Ankunft für drei Min auf einem Rüttler platziert und anschließend über fünf Min bei $700 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80°C bis zur Analyse der mukosalen

Antikörper und Zytokine im Labor gelagert.

5. Laboranalyse

5.1. Virusneutralisationstest (VN-T)

Der Virusneutralisationstest, beschrieben bei (THOMSON, et al. 1976, HARTLEY, et al. 2005), wurde im hauseigenen Labor, dem Labor der Klinik für Pferde, Innere Medizin und Reproduktion der Ludwig-Maximilians-Universität in München vom Verfasser der Arbeit durchgeführt. Mit geringen Abweichungen stimmte das Protokoll mit dem des *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016* der *World Organisation of Animal Health* (OIE 2016) überein.

Zunächst wurden die tiefgefrorenen Test- und Kontrollsera aufgetaut und anschließend über 30 Min bei 56°C auf dem Heizblock (Eppendorf ThermoMixer®, Eppendorf AG, Deutschland) inaktiviert. Parallel dazu wurden die 96-Well-Platten vorbereitet, indem in alle 96 Kavitäten 25 µL MEM pipettiert wurde. Außerdem wurde die Anordnung auf den Deckeln der Platte eingezeichnet (Abb. 5). Diese war so angelegt, dass nach Abschluss der Inaktivierung auf dem Heizblock in die ersten beiden Spalten (1 und 2) der ersten Zeile (A) der Platte die Positivkontrolle und in die ersten beiden Spalten (1 und 2) der zweiten Zeile (B) die Negativ-Kontrolle dazugegeben wurde, zu jeweils 25µL pro Well. In den darauffolgenden vier Zeilen (C bis F) wurde in die ersten beiden Spalten (1 und 2) über jeweils zwei Zeilen ein Testserum in Duplikaten zu je 25 µL pro Kavität hinzugefügt. Die erste Spalte war dabei bei sowohl den Positiv- und Negativkontrollen, als auch bei den Testsera zur Überprüfung der Zelltoxizität der Sera vorgesehen. In den letzten beiden Zeilen (G und H) wurde über die ersten vier Spalten eine Verdünnungsreihe angelegt, in der die Infektiosität des eingesetzten Arbeitsvirus (100 TCID₅₀/Kavität) kontrolliert (erste Spalte: 0), sowie die Menge des für die VN-Titerbestimmung verwendeten Virus überprüft wurde (zweite Spalte: -1, dritte Spalte: -2, vierte Spalte: -3). Dazu wurde im Vorfeld EHV-1 mit bekanntem TCID₅₀ so in serumfreiem MEM verdünnt, dass die Viruskonzentration im Arbeitsvirus nach Zugabe von 25 µL 100 TCID₅₀/Kavität betragen würde. Für die Verdünnungsreihe wurden

Konzentrationen des Arbeitsvirus von 1:10 (-1), 1:100 (-2) und 1:1000 (-3) in serumfreiem MEM vorbereitet, welche dann in die entsprechenden Kavitäten gegeben wurden. Die freigebliebenen Wells (Spalten 5 bis 12) der letzten beiden Zeilen (G und H) waren als Kontrollen für das Zellwachstum vorgesehen. Dann wurde ab Spalte 2 bis Spalte 12, für alle Sera eine Verdünnungsreihe erstellt, indem Spalte 2, Zeile A bis F je Kavität 25 μL entnommen und mit den 25 μL serumfreiem MEM der benachbarten Wells vermischt wurden. Spalte 3, Zeile A bis F wurden dann wiederum je 25 μL entnommen und mit dem serumfreien MEM der Kavitäten in Spalte 4, Zeile A bis F vermengt. Dieser Schritt wurde bis Spalte 12 fortgesetzt, sodass nach Erfüllung des Protokolls eine Verdünnungsreihe von 1:4 bis 1:2048 Serumkonzentration in serumfreiem MEM stehen würde. Als nächster Schritt erfolgte die Zugabe von 25 μL Arbeitsvirus zu allen Kavitäten der Spalten 2 bis 12 in den Zeilen A bis F. Anschließend wurden die Platten in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Luftgehalt für eine Stunde inkubiert. Dann wurden 25 μL einer Zellsuspension aus Kaninchennieren-Zellen 13 (RK-13) in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland), welches außerdem fetales bovines Serum (5%) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland), Penicillin (100 UI/mL) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und Streptomycin (100 mg/L) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) enthielt allen Wells der Platte hinzugefügt. Darauf folgte eine Inkubation von vier bis fünf Tagen bei 37°C und 5% CO₂-Luftgehalt.

In dieser Zeit erzielte das Virus in allen Kavitäten, in denen die Konzentration an spezifischen VN das EHV-1 nicht neutralisieren konnte, einen zytopathischen Effekt (CPE) in den RK-13-Zellen, indem es deren Absterben bewirkte und damit die Anhaftung der RK-13 an den Boden der Kavitäten verhinderte. In den Wells mit einer ausreichenden VN-Konzentration, konnten während der Inkubationszeit RK-13-Zellmonoschichten auf den Wellböden entstehen. Der VN-titer wurde dann bestimmt, indem für jedes Serum die Spalte notiert wurde, in der kein CPE sichtbar war. Für die Testsera, die in Duplikaten über zwei Zeilen liefen, galt die Spalte, in der beide Zeilen ohne CPE waren.

Um die Abwesenheit des CPE besser sichtbar zu machen wurden die Zellen fixiert und angefärbt. Dazu wurden zunächst alle Wells bis zum Rand mit 3% Formaldehyd-Lösung gefüllt und für 20 Min bei 18-25°C inkubiert. Anschließend wurde die Fixationslösung verworfen und so viel Kristallviolett-Lösung in die

Wells gegeben, dass die Böden gerade bedeckt waren. Die Platten wurden so 30 Min bei 18-25°C inkubiert und dann gründlich mit Wasser ausgespült. Danach wurden sie zum Trocknen ein bis zwei Tage bei 18-25°C offen stehen gelassen und anschließend ausgelesen. Die Kavitäten ohne CPE zeigten einen blauen Boden, während die Wells, in denen die VN-Konzentrationen nicht ausreichend hoch waren um das Virus zu neutralisieren, durchsichtig blieben.

Im Teil 1 wurden alle Proben eines Tages im selben Durchlauf verarbeitet. In Teil 2 wurden dagegen alle Proben eines Tieres im selben Durchlauf verarbeitet. Die Proben im zweiten Teil wurden zeitlich unabhängig von Teil 1 analysiert. Allerdings wurden sowohl die gleichen Zellen, als auch dasselbe Virus verwendet.

Abb. 5

		SERTOX	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
POS	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
			-1	-2	-3	Zellkontrolle							

96-Well-Platte, wie im VN-T bestückt; NEG: Negativkontrolle (EHV-1-VN-freies Serum+Virus+Zellen); POS: Positivkontrolle (Hohes EHV-1-VN-Titer Serum+Virus+Zellen); SERTOX: Serum Toxizität (Serum+Zellen); 1, 2: Verdünnungsreihen zweier Serumproben (1:2 - 1:2048) in Duplikaten (Testserum+Virus+Zellen); 0: Arbeitsvirus (AV) +Zellen; -1: AV 1:10 +Zellen; -2: AV 1:100 +Zellen; -3: AV 1:1000 +Zellen; Zellkontrolle (nur Zellen)

5.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Einschränkung des indirekten Nachweises von EHV-1 anhand spezifischer Antikörper war lange, dass EHV-1 und EHV-4 in diesen Verfahren nicht differenziert werden konnten. Crabb et al. entwickelten erstmals einen ELISA, der auf zwei stark zwischen den beiden EHV-Typen variierenden Epitopen basierte (CRABB, et al. 1995). Zuvor hatten sie den C-Terminus des Glykoprotein G (gG), der als Fusionsprotein im *Escherichia coli* exprimiert wird, identifiziert (CRABB und STUDDERT 1993). Lang et al. konnten mit einem auf Peptiden basierten ELISA, zwar ebenfalls eine zuverlässige und simple Methode präsentieren (LANG, et al. 2013), allerdings ist dieser Test noch nicht kommerziell erhältlich. Mit einem auf dem Analyseverfahren von Crabb et al. basierenden kommerziellen Testkit (Svanovir[®] EHV-1/EHV-4-Ab, Boehringer Ingelheim Svanova, Uppsala, Schweden) wurde der ELISA im hauseigenen Labor durchgeführt.

Dazu wurden zunächst die Reagenzien vorbereitet. Für Waschungen 500 mL PBS-Tween-Puffer pro Platte, indem PBS-Tween-Lösung 20 x im Verhältnis 1:20 in destilliertem Wasser verdünnt wurde. Weiter wurde das Konzentrat der mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten anti-Pferd IgG aus Kaninchen in dem jeweils im Kit angegebenen Verhältnis in Probe/Konjugat Dilutions-Puffer verdünnt. Die Serumproben wurden schließlich mit dem Probe/Konjugat Verdünnungs-Puffer im Verhältnis 1:100 versetzt.

Dann wurde, nachdem zu Beginn der Analyse sichergestellt worden war, dass alle Reagenzien auf 18-25°C kalibriert waren, die Platten mit Kontrollseren und den verdünnten Serumproben der Tiere wie in Tabelle 3 beschrieben bestückt. Alle Proben von D-2 bis D-21 eines Tieres wurden auf einer Platte prozessiert. Die Wells einer jeden Spalte waren entweder mit EHV-1-, mit EHV-4- oder mit Kontrollantigen bedeckt.

Nach Hinzugabe der Seren wurden die Platten mit Folie bedeckt, damit die Reagenzien nicht verdunsten und zwei Stunden bei 18-25°C inkubiert. Es folgten vier Waschgänge mit dem oben beschriebenen verdünnten PBS-Tween-Puffer, wobei jeweils 200 µL der Lösung hineingegeben und manuell durch Umdrehen der Platte wieder ausgeschüttet wurden. Beim letzten Waschgang wurde die Platte zur besonders gründlichen Leerung auf Zellstoff ausgeklopft. 100 µL des oben beschriebenen Meerrettich-Peroxidase-Konjugates wurden in jedes Well pipettiert und die Platten für eine Stunde bei 18-25°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von

100 μL Substrat (Tetramethylbenzidin in Substratpuffer, welcher Wasserstoffperoxid enthält) und eine anschließende Inkubation bei 18-25°C über 10 Min. In jedes Well wurden daraufhin 50 μL Stop-Lösung pipettiert und schließlich die optische Dichte (OD) eines jeden Wells in einem Mikroplatten-Fotometer (Tecan Sunrise™ TC/TS Microplate Absorbance Reader, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) mit Hilfe einer Software (Magellan™ Analysis Software, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bei 450 nm ausgelesen.

Anschließend erfolgte die Berechnung der korrigierten optischen Dichte (OD_{corr}). Die Werte in den entsprechenden Spalten wurden dazu in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{OD}_{\text{EHV-1}} - \text{OD}_{\text{Kontroll Ag}} = \text{OD}_{\text{corr EHV-1}}$$

Tabelle 3

Schema einer 96-Well-Platte im gG-ELISA

			Tier 1			Tier 2			Tier 3			
	EHV-1 Ag	EHV-4 Ag	Kontr- Ag									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EHV-	1/4	pos.	←	D-2	→	←	D-2	→	←	D-2	→
B	EHV-	1/4	pos.	←	D7	→	←	D7	→	←	D7	→
C	EHV-	1/4	neg.	←	D14	→	←	D14	→	←	D14	→
D	EHV-	1/4	neg.	←	D21	→	←	D21	→	←	D21	→
E	EHV-	4	pos.	←	D'-2	→	←	D'-2	→	←	D'-2	→
F	EHV-	4	pos.	←	D'7	→	←	D'7	→	←	D'7	→
G	-	-	-	←	D'14	→	←	D'14	→	←	D'14	→
H	-	-	-	←	D'21	→	←	D'21	→	←	D'21	→

Aufteilung einer antigenbeschichteten 96-Well-Platte im gG-ELISA; Alle Testsera eines Tieres auf einer Platte; Rosa Spalte: EHV-1-Antigen; blaue Spalte: EHV-4-Antigen, gelbe Spalte: Kontrollantigen; Kontrollsera in Spalten 1-3: neg.: negativ; pos.: positiv

5.3. Komplementbindungstest (CFA)

Mit Erhalt der ersten Ergebnisse der Laboranalyse ergab sich die Notwendigkeit die Serumproben aller Tiere, die an D'-2 genommen worden waren, in einem CFA auf komplementbindende EHV-1-spezifische Antikörper zu untersuchen. Die Analyse wurde im Labor des Irish Equine Centre, County Kildare, Irland durchgeführt. Erstmals wurde der CFA für EHV-1 bei Thomson et al. 1976 beschrieben (THOMSON, et al. 1976). Die in dem Test nachgewiesenen komplementbindenden Antikörper kennzeichnet das frühe Auftreten nach der Infektion mit EHV-1 (BALASURIYA, et al. 2015). Das Prinzip des Verfahrens beruht auf einer Antigen-Antikörperbindung, welche, kommt sie zustande, eine definierte Menge Komplement verbraucht. Das Antigen ist in diesem Falle ebenfalls Konstante in der Reaktionslösung und die Antikörper sind Determinante. Anzeigt wird die Komplementbindung zwischen Antigen und Antikörpern durch hinzugegebene Schaferythrozyten, an die, bei Präsenz nicht gebundenen Komplements, der Reaktionsmischung ebenfalls hinzugefügte Kaninchenantikörper binden. Eine solche Bindung verursacht die Hämolyse der Schaferythrozyten und die Reaktionslösung färbt sich rosa. Ist hingegen das Komplement verbraucht, lassen sich die Schaferythrozyten an den Boden der Wells zentrifugieren und die Flüssigkeit bleibt klar (THOMSON, et al. 1976, HARTLEY, et al. 2005, BALASURIYA, et al. 2015).

Das Protokoll folgte dem beschrieben bei Hartley et al. 2005. Kurz zusammengefasst: Die Serumproben wurden verdünnt und hitzeinaktiviert. Anschließend wurde auf einer 96-Well-Platte eine Verdünnungsreihe erstellt. Dann wurden vier Einheiten EHV-1 und EHV-4 Antigen, sowie drei Einheiten CH₅₀ Komplement aus Meerschweinchenserum hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Das hämolytische System bestehend aus Schaferythrozyten und Anti-Schaferythrozyten-Kaninchenserum wurde nach einstündiger Inkubation bei 37°C in die 96-Well-Platten pipettiert. Außerdem war der Test von einer Komplementkontrolle in Form sowohl einer 100% Hämolyse-, als auch eine Null-Hämolyse-Kontrolle unterstützt. Es folgte eine Inkubation der Platten über 30 Min bei 37°C. Anschließend wurden die Platten zentrifugiert (1000 x g über 5 Min) und die Lichtabsorption in 80 µL Überstand eines jeden Wells bei 414 nm gemessen. Die Werte wurden, nachdem der Wert der Null-Hämolyse-Kontrolle subtrahiert worden war, als Prozentteil der 100%-Hämolyse-

Kontrolle festgelegt. Der Titer eines jeden Testserums war die Lichtabsorption der Verdünnung, die dem Wert am nächsten war, der bei 50% Hämolyse errechnet wurde (HARTLEY, et al. 2005).

5.4. Serum Amyloid A - Latex Agglutination Turbidimetric Immunoassay

Ein Parameter für eine systemische inflammatorische Reaktion (SIR) in Pferden ist das Akute-Phase-Protein SAA (HOOIJBERG, et al. 2014). Sera für die Messung der SAA-Konzentrationen vor und nach der Impfung wurden in einem kommerziellen Labor (IDEXX-Laboratories, Ludwigsburg, Deutschland) analysiert. Verwendet wurde ein zuvor für Pferdesera validiertes (CHRISTENSEN, et al. 2012), automatisiertes *Latex Agglutination Turbidimetric Immunoassay* ('Eiken' SAA latex agglutination test, Mast, Merseyside UK; ADVIA[®]1800, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland). Das Prinzip basiert auf der optischen Messung der Trübung einer Lösung. Dazu werden an Latexpartikel gekoppelte Pferde-SAA-Antikörper mit den Testsera vermischt. Die Antikörper auf den Latexpartikeln verbinden sich mit den SAA-Molekülen und die Lösung wird trübe. Die Intensität der Trübung ist Proportional zu der Höhe der SAA-Konzentration im Testserum. Sie wird optisch gemessen und anschließend zur Ermittlung des Wertes in der Einheit mg/L in Relation zu einer Standardkurve gesetzt, die mit monoklonalen Human-SAA-Antikörpern erstellt wurde.

5.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für den quantitativen Nachweis von EHV-1-DNA im Nasensekret wurde eine TaqMan[®] qPCR durchgeführt, welche die Anzahl einer bestimmten EHV-1-DNA-Sequenz, die des Glykoprotein B (gB), bestimmte. Für die EHV-1-Diagnostik wurde die PCR von Hussey et al., Allen und Pusterla et al. für verschiedene Probenarten entwickelt (HUSSEY, et al. 2006, ALLEN 2007, PUSTERLA, et al. 2009a). Auf diesen Validierungen basiert auch der in dieser Studie angewendete Test.

Das Prinzip des *real-time* TaqMan[®] PCR wurde durch Arya et al. 2005

ausführlich revidiert (ARYA, et al. 2005). Demnach zielt es auf die Amplifikation der Ziel-DNA, in diesem Falle gB, welche dann durch ein Fluoreszenz-Signal angezeigt wird, ab. Im Verfahren werden in jedem Zyklus die DNA-Doppelstränge des gB zunächst durch Erhitzen gespalten. Zugegebene korrespondierende Teilsequenzen der DNA, die *Primer*, legen sich bei sinkender Temperatur an die 3'-Enden der DNA-Einzelstränge. Gleichmaßen bindet eine fluorogene nicht prolongierbare Sonde von einem jeden *Primer* betrachtet etwas weiter in Richtung 5'-Ende an den DNA-Einzelstrang. Sie enthält einen Reporter-Fluorophor, dessen fluoreszierender Effekt durch einen Auslöcher neutralisiert wird. Während der Verlängerung des *Primers* am Strang trifft das beteiligte Enzym, die thermostabile DNA-Polymerase *Thermus aquaticus*, auf die Sonde, trennt sie vom Strang und spaltet sie. Damit erlischt die Wirkung des Auslösers und der Reporter-Fluorophor emittiert ein fluoreszierendes Signal. Dies wird dann vom *Thermocycler* gemessen. Mit jedem Zyklus nimmt die Intensität der Fluoreszenzemission zu. So ergibt sich eine exponentielle Kurve. Zunächst ist das Signal so schwach, dass der *Thermocycler* es nicht detektieren kann (*Baseline*). Die Computersoftware des *Thermocycler* legt einen beliebigen Grenzwert (*Threshold*) fest, der auf der Variabilität der *Baseline* basiert. Wird dieser überschritten, notiert die Software die Anzahl der absolvierten Zyklen bis das Gerät die Fluoreszenzemission detektieren kann. Daraus ergibt sich ein Wert, der *cycle threshold* (Ct) genannt wird (ARYA, et al. 2005). Je mehr DNA in der Probe und damit bei Beginn des ersten Zyklus' vorhanden war, desto weniger Zyklen benötigt der *Thermocycler* bis er das Signal detektieren kann und desto niedriger ist also der Ct-Wert. Demnach ist der Ct-Wert umgekehrt proportional zu der ursprünglich vorhandenen DNA-Konzentration in der dem Tier entnommenen Probe.

Die DNA wurde zunächst mittels eines kommerziellen DNA-Extraktionskits (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) aus den Nasentupfern extrahiert. Dabei musste das Protokoll des Herstellers in wenigen Punkten an diesen Versuch adaptiert werden. So wurden im ersten Schritt die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den Nasentupfern in VTM für eine Min auf einem Rüttler (Vortex-Genie[®] 2, Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Deutschland) bei höchster Rüttelstufe platziert. Dann wurden 200 µL in ein neues 2mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und 20 µL Proteinkinase K hinzugefügt. Im

zweiten Schritt kamen jeweils 200 μL Ethanol und Puffer (*Buffer AL*) dazu. Dann wurde die Mischung in einen Spin-Zylinder (*DNeasy Mini spin column* QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) gegeben, dessen Boden durch eine Membran gebildet wurde und der sich hinter der Membran zu einem Trichter verjüngte. Dieser Spin-Zylinder war in ein Sammelröhrchen (2 mL) gesteckt. Dann wurde die Mischung bei einer Temperatur von 10°C bei $\geq 6000 \times g$ für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss im Sammelröhrchen wurde mit diesem verworfen und der Spin-Zylinder in ein neues Sammelröhrchen gesteckt. Es folgte die Zugabe von 500 μL eines Puffers (*Buffer AW1*) und die Zentrifugierung bei gleicher Einstellung wie zuvor. Das Sammelröhrchen mit dem Überstand wurde abermals verworfen und der Spin-Zylinder in ein weiteres Sammelröhrchen gesteckt. Dann wurden 500 μL eines Puffers (*Buffer AW2*) hinzugegeben und Spin-Zylinder und Sammelröhrchen bei 10°C und $20000 \times g$ über drei Minuten zentrifugiert. Wieder wurde das Sammelröhrchen verworfen. Der Spin-Zylinder wurde jetzt in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und 200 μL eines Puffers (*Buffer AE*) in die Mitte der Membran gegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 10°C für eine Minute und dann eine Zentrifugierung bei gleicher Temperatur und $\geq 6000 \times g$ über eine Minute. Der erhaltene Durchfluss war die DNA, die in der PCR verwendet wurde.

Unser Verfahren folgte dem Protokoll des Instituts für Virologie der Freien Universität Berlin, Professor Klaus Osterrieder. 5 μL der DNA wurden zu einem 15 μL Mastermix gegeben, der aus folgenden Reagenzien zusammengesetzt war: 3 μL nukleasefreiem Wasser, 10 μL Mastermix 2x (SensiFAST™ Probe Lo-Rox Kit, Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland), 450 nM Primer EHV-1 gX FW 5'-CAT ACG TCC CTG TCC GAC AGA T-3', 450 nM Primer EHV-1 gX RV 5'-GGT ACT CGG CCT TTG ACG AA-3' (Osterrieder, Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Deutschland) und 100 nM EHV-1 gX Sonde 6FAM-TGA GAC CGA AGA TCT CCT CCA CCG A-BHQ1 (SensiFAST™ Probe Lo-Rox Kit, Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland). Amplifikation und Berechnung erfolgte dann in einem kommerziellen *Thermocycler* (7500 Fast & 7500 Real-Time PCR System).

Die Proben wurden in Duplikaten mit einer positiven und einer negativen Kontrolle analysiert. Die Ergebnisse waren negativ, bei einem Wert von $\geq 40\text{Ct}$ /kein Ct und positiv bei $\leq 32\text{Ct}$. Werte $>35 \text{ Ct}$ und $<40 \text{ Ct}$ müssen als

zweifelhaft gelten und sollten wiederholt werden. In dieser Studie flossen alle Proben, die nach einer Wiederholung <37 Ct betragen, in die Bewertung mit ein.

Zur Errechnung der gB-DNA-Moleküle in dem DNA-Extrakt des Referenzstranges für die Standardkurve wurde eine Standardformel angewendet:

$$\text{Anzahl der gB-Moleküle} = \frac{X \text{ ng/}\mu\text{L} \times 6,0221 \times 10^{23} \text{ Moleküle/mol}}{N \times 660 \text{ g/mol} \times 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Dabei war X= Menge der zu amplifizierenden Fragmente (Amplikons), N= Länge eines einzelnen doppelsträngigen Amplikons in Basenpaaren (auch Plasmid-Länge in Basenpaaren). 660 g/mol ist schließlich das durchschnittliche Gewicht eines Basenpaares in einer doppelsträngigen DNA.

Das Referenz-Plasmid (1/97 Ab4 BAC, bereitgestellt durch Professor Klaus Osterrieder, FU Berlin) hatte eine Länge (N) von 157736 Basenpaaren und die Menge (X) der Amplikons betrug 40 ng/μL.

$$\text{Anzahl der gB-Moleküle} = \frac{40 \text{ ng/}\mu\text{L} \times 6,0221 \times 10^{23} \text{ Moleküle/mol}}{157736 \times 660 \text{ g/mol} \times 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Das Plasmid enthielt also $2,3 \times 10^8$ g-B-Moleküle/μL. Da in der PCR 5 μL Plasmid verwendet wurden waren es allerdings $1,2 \times 10^9$ Moleküle/5μL. Zur Ermittlung der gB-Molekülkonzentrationen in den DNA-Extrakten der Nasentupfer wurde folgende Standardkurve erstellt:

$$\begin{array}{l} 1,2 \times 10^9 \\ 1,2 \times 10^8 \\ 1,2 \times 10^7 \\ 1,2 \times 10^6 \\ 1,2 \times 10^5 \\ 1,2 \times 10^4 \\ 1,2 \times 10^3 \\ 1,2 \times 10^2 \\ 1,2 \times 10^1 \end{array} \text{ Moleküle/} \\ \text{5}\mu\text{L}$$

Die Ermittlung der Ct-Werte der DNA-Extrakte aus den Nasentupfern mit Hilfe der Standardkurve, erfolgte durch die Software des *Thermocycler*.

5.6. Nachweis mukosaler Antikörper/Immunglobuline mittels einer Luminex[®] Kügelchenfluorophor-basierten EHV-1 Multiplexanalyse

Für die Bestimmung der mukosalen anti-gB (IgB), anti-gC (IgC) und anti-gD (IgD) Antikörper, wurde der aus den Nasentupfern in PBS generierte Überstand im Universitätslabor (Wagner Laboratory of Immunology, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, USA) in einem Multiplexanalyseverfahren untersucht. Multiplex bedeutet, dass mehrere Analyten in einer Probe gleichzeitig nachgewiesen werden können (ANGELONI, et al. 2016). Es handelt sich um ein allgemeines Analyseverfahren, das von der Luminex[®] Corporation (Austin, Texas, USA) entwickelt und von Wagner, Goodman et al. 2015 für EHV-1 validiert wurde. Das Analyseprinzip basiert auf einer Antigen-Antikörperbindung. Die Antigene sind dabei an fluoreszierende Perlen gekoppelt, die für jeden Antigentyp eine eigene Farbe haben. Die Antikörper, welchen in diesem Verfahren die Rolle des Analyten zufällt, binden an die mit den Kügelchen verbundenen Antigene. Weiter wird ein biotinylierter anti-Spezies Antikörper hinzugegeben, in diesem Falle ein anti-Pferde-Antikörper, der an die Analyten bindet. An diese biotinylierten Antikörper kann dann wiederum ein lichtemittierender Farbstoff binden, der eine quantitative Analyse der in der Probe vorhandenen Analyten ermöglicht. Der computergesteuerte Immunoassay kann also anhand einer kombinierten Messung einerseits der Lichtemission der Perlen und andererseits des mit dem Farbstoff verbundenen Antikörpers sowohl Qualität als auch Quantität des Analyten bestimmen (WAGNER, et al. 2015, ANGELONI, et al. 2016).

Das Verfahren folgte dem Protokoll beschrieben bei Wagner et al. 2015 (WAGNER, et al. 2015). Dazu wurden zunächst die EHV-1 spezifischen Antigene gB, gC und gD an fluoreszierende Perlen (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA) gekoppelt. Das hierbei erforderliche Protokoll ist bei Wagner und Freer 2009 beschrieben. Die Methodik wurde bei 18 -25°C und alle Schritte in der Zentrifuge bei 14000 \times g durchgeführt. Resuspension erfolgte stets für 20 Sekunden auf einem Rüttler mit Beschallung. 5 \times 10⁶ Perlen wurden im ersten Schritt zur Aktivierung in destilliertem Wasser durch Zentrifugieren gewaschen, wobei ein Waschgang das Mischen (beziehungsweise Resuspension in Waschlösung), Zentrifugieren und anschließende vorsichtige Abkippen des Überstandes beinhaltete. Es folgte eine Resuspension in 80 μ L 100 mM

Natriumphosphatpuffer pH 6,2. Weiter wurden 10 μL 50 mg/mL Sulfo-NHS in destilliertem Wasser (Pierce Biotechnology Inc., Rockford Illinois, USA) und 10 μL 1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimidhydrochlorid 50 mg/mL in destilliertem Wasser (Pierce Biotechnology Inc., Rockford Illinois, USA) bei leichtem Rütteln hinzugegeben und für 20 Min inkubiert, wobei die Mixtur in 10 Min Intervallen leicht gerüttelt wurde. Eine zweimalige Waschung der Perlen in 250 μL 50 mM 2-[N-Morpholino]Ethansulfonsäure pH 5,0 und eine anschließende Resuspension in 100 μL 50 mM 2-[N-Morpholino]Ethansulfonsäure pH 5,0 folgten. Zu den so aktivierten Perlen wurden entweder 40 μL gB, gC oder gD hinzugegeben und das Volumen mit 50 mM 2-[N-Morpholino]Ethansulfonsäure pH 5,0 auf 500 μL ergänzt. Die Mixtur wurde gerüttelt und für drei Stunden bei Rotation inkubiert. Antigene und Perlen waren nun verbunden. Nach Zentrifugierung erfolgte eine Resuspension in Blocking-Puffer (PBS mit 1% bovinem Serumalbumin und 0,05% Natriumazid) mit anschließender 30 minütiger Inkubation. Danach wurden die Perlen dreimal in PBS mit 0,1% bovinem Serumalbumin, 0,02% Tween 20 und 0,05% Natriumazid gewaschen. Schließlich wurden die antigen-gekoppelten Perlen gezählt und im Dunkeln bei 2-8°C gelagert (WAGNER und FREER 2009, ANGELONI, et al. 2016). Des Weiteren wurden in der Vorbereitung der Überstand generiert aus den Nasentupfern in PBS sowie die Kontrollproben im Verhältnis 1:400 in Blocking-Puffer verdünnt. Drei Kontrollen mit bekannten Antikörpertitern, eine negative, eine mittelgradig positive und eine hochgradig positive, wurden in jedem Durchlauf dazugegeben. MultiScreen HTS 96-Well-Filterplatten (Millipore Multiscreen HTS Plate, Millipore, Danvers, Massachusetts, USA) wurden in PBS mit 0,02% Tween 20 für mindestens zwei Min getränkt. Das PBS mit 0,02% Tween 20 wurde abgesaugt und 50 μL antigen-gekoppelte-Perlen-Lösung, die 5×10^3 von je einem der Antigene (gB, gC und gD) enthielt, wurden pro Well dazugegeben. Die Platten wurden zugedeckt, um sie vor Licht zu schützen und bei 18 -25°C für 30 Min auf einem Rüttler platziert, anschließend mit einem Plattenwascher (Biotek ELx50, Biotek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA) gewaschen und 50 μL biotinyliertes Ziegen-anti-Pferde-IgG(H+L)-Serum (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) in einer Verdünnung 1:10000 in Blocking-Puffer hinzugegeben. Danach erfolgte abermals eine Inkubation über 30 Min bei 18-25°C auf dem Rüttler. Wiederum wurden die Platten gewaschen und 50 μL Streptavidin-Phycoerythrin 1:100 gelöst in

Blocking-Puffer (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) hinzugegeben. Anschließend erfolgte erneut eine Inkubation auf dem Rüttler über 30 Min. Nach einem weiteren Plattenwaschgang wurde abermals 100 µL Blocking-Puffer auf die Platten pipettiert, welche dann auf wie zuvor beschrieben bedeckt und auf den Rüttler gestellt wurden, um die Perlen zu resuspendieren. Abschließend wurde das Immunoassay auf den Platten mittels eines kommerziellen elektronischen Systems (Luminex 200[®], Luminex Corporation, Madison, Wisconsin, USA) durchgeführt. Die ermittelten Daten wurden als Median der fluoreszierenden Intensität (MFI) dargestellt.

Zum Zeitpunkt der Datenanalyse der Pilotstudie konnten ausschließlich anti-gC- und -gD-spezifische Antikörper gemessen werden. In Experiment 2 der Hauptstudie stand dann zusätzlich die Analyse für anti-gB-Ig zur Verfügung.

5.7. Nachweis mukosaler Zytokine mittels eines Luminex[®] Multiplex Capture Sandwich Immunoassay

Ebenfalls im Überstand der Nasentupfer in PBS und im selben Labor wie die nasalen Ig wurden die Zytokine IFN- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 und IL-17 in einem Multiplex Capture Sandwich Immunoassay nachgewiesen. Auch dieser Test ist von der Luminex[®] Corporation (Austin, Texas, USA) entwickelt und von Wagner und Freer, 2009 für EHV-1 validiert worden. Ähnlich dem in Kapitel 5.6 beschriebenen Analyseverfahren beruht das Prinzip auf einer Antigen-Antikörperbindung. Allerdings ist in diesem Falle das Antigen der Analyt und die Antikörper sind an die fluoreszierenden Perlen gebunden. Ist diese Bindung erfolgt, wird entweder ein biotinylierter Antikörper dazugegeben, an den ein fluoreszierender Farbstoff binden kann oder, wie in diesem Falle, ein sekundärer Antikörper, der bereits mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert ist. Qualität und Konzentration des Analyten in der Probe misst wie in Kapitel 5.6 der computergesteuerte Immunoassay (WAGNER und FREER 2009, ANGELONI, et al. 2016).

Das Protokoll folgte dem beschrieben bei Wagner und Freer 2009. Monoklonale Antikörper (mAB), die sich gegen die oben genannten Zytokine richteten, wurden mit fluoreszierenden Perlen nach der gleichen Methode verknüpft, wie für die Antigene in Kapitel 5.6 beschrieben. Die gekoppelten Perlen wurden zu einer

Konzentration von 1×10^5 Perlen/mL je Zytokin in Blocking-Puffer verdünnt. Für den Versuch kamen pro Well auf der MultiScreen HTS 96-Well-Filterplatte 5 x 103 Perlen eines jeden mAB-Typen zum Einsatz. Für die Zytokin-Standardproben wurden dreifach Verdünnungen von Überständen rekombinanter Zytokin/IgG Fusionsproteinen eines jeden oben genannten Zytokins in bekannter Konzentration verwendet. Wie in Kapitel 5.6 wurden die 96-Well-Platten zunächst in PBS mit 0,02% Tween 20 für mindestens zwei Min getränkt. Dann wurden in jedes Well 50 μ L je einer Standardprobe beziehungsweise des Überstandes eines Nasentupfers in PBS gegeben. Weiterhin erfolgte die Zugabe von 50 μ L Perlen in Blocking-Puffer und eine Inkubation bei 18-25°C auf einem Rüttler über 30 Min. Anschließend wurden die Platten mit PBS plus 0,1% bovinem Serumalbumin, 0,02% Tween 20 und 0,05% Natriumazid gewaschen, indem nach jeder Hinzugabe der Waschlösung die Platten manuell entleert wurden. Dann wurden 50 μ L einer primären Detektor-Antikörper-Mixtur in Blocking-Puffer, welche biotinylierte mAbs gegen die zu untersuchenden Zytokine enthielt, hinzugegeben und eine weitere Inkubation bei 18 -25°C auf dem Rüttler über 30 Min erfolgte. Ein weiterer Waschgang wie oben beschrieben schloss sich an und 50 μ L einer Streptavidin-Phycoerythrin-Mixtur, welche auch Phycoerythrin konjugierte anti-Ziege Eselantikörper (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) enthielt, wurden hinzugefügt. Eine Inkubation und ein anschließender Waschgang folgten wie oben beschrieben. Die Perlen wurden in 100 μ L Blocking-Puffer resuspendiert und 15 Min auf dem Rüttler inkubiert. Anschließend wurden die Platten in einem kommerziellen System analysiert (Luminex IS 100[®], Luminex Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Die Daten wurden als MFI dargestellt (WAGNER und FREER 2009).

6. Statistik

Die statistische Analyse der gemessenen Parameter und Analytkonzentrationen sowie deren graphische Darstellung wurde mit einer kommerziellen computergesteuerten Statistiksoftware (GraphPad Prism Version 5.0 für das Betriebssystem Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) durchgeführt.

Zur statistischen Berechnung wurden die in Brüchen vorliegenden VN-Titer Log_2^-

¹ transformiert.

Zunächst wurden alle Datenreihen im *Shapiro-Wilk-Test* auf Normalverteilung getestet. Da diese niemals bei allen zu vergleichenden Datenreihen vorlag, erfolgte eine nicht-parametrische Analyse aller Daten.

Die statistische Signifikanz der durchgeführten Tests wurde auf eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ festgelegt.

Die Varianz der Analytkonzentrationen in einer Gruppe über einen bestimmten Zeitraum wurde mit dem Friedman-Test durchgeführt. Ebenso wurde die Varianzanalyse des klinischen Scores in beiden Gruppen exekutiert. Anschließend wurden die Werte einer Gruppe an verschiedenen Zeitpunkten mit einem Post-hoc-Test, dem *Dunn's Multiple Comparison Test* verglichen. Die beiden Gruppen Pferde und Maultiere wurden an jedem Zeitpunkt mit dem *Mann-Whitney-Test* einander gegenübergestellt. Der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient r_s wurde berechnet, um eine mögliche Korrelation zwischen den SAA-Konzentrationen und den VN-Titern der Tiere zu untersuchen.

IV. ERGEBNISSE

Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden die Ergebnisse im Text folgendermaßen dargestellt: Median [Interquartilsabstand].

1. Pilotstudie

In der Pilotstudie wurde an pD-2 in n=1 Maultier geringgradiger Nasenausfluss notiert. An pD1 war dieser dann bei allen n=4 Tieren sichtbar und hielt bis pD4 an. Darüber hinaus wurden von pD-2 bis pD7 keine weiteren klinischen Befunde detektiert.

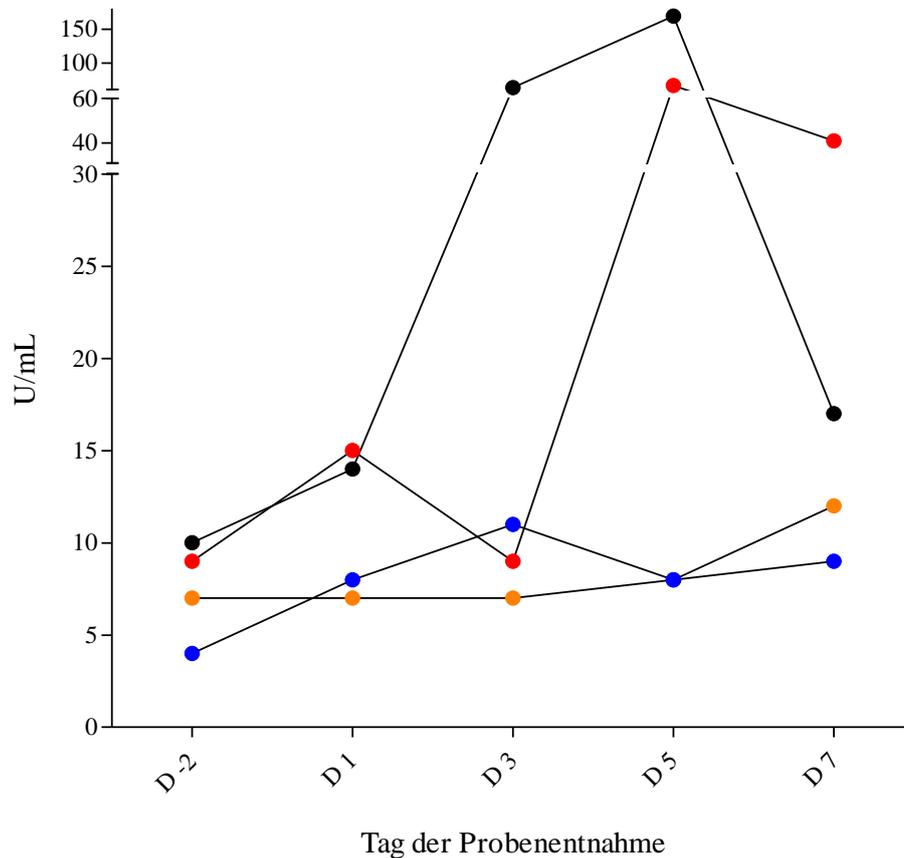
Die VN waren im VN-T an pD-2 in Maultieren (M1: 1:1024; M2: 1:512) deutlich höher als in Pferden (H1: 1:128; H2 1:128). Eine signifikante Veränderung konnte bis pD21 allerdings in beiden Tierarten nicht gemessen werden. Ein ELISA stand aus Kostengründen in der Pilotstudie nicht zur Verfügung.

Weder in Pferden noch in Maultieren wurde vor pD0 die Ausscheidung von EHV-1-Antigen über die Nase in der qPCR detektiert. Die Werte der positiven und negativen Kontrollen lagen bei 22,5 Ct und keinem Ct entsprechend. An pD1 wurde in n=1 Haflinger (H1: 35 Ct) und n=1 Maultier (M1: 32 Ct) EHV-1-gB nachgewiesen. Das andere Maultier schied dann bei der nächsten Probenentnahme an pD3 kleine Mengen (M2: 36 Ct) Virus über die Nase aus. N=1 Haflinger (H2) blieb dagegen über den gesamten Zeitraum der Messung EHV-1-negativ. In der Pilotstudie konnten aufgrund einer zum Zeitpunkt der Analyse fehlenden Standardkurve keine gB-Molekülkonzentrationen errechnet werden. Auf eine nachträgliche Berechnung wurde aus Kostengründen verzichtet.

Die Analyse der Ig anti-gC und -gD in der nasopharyngealen Mukosa ergab folgende Ergebnisse: Alle Tiere (n=4) in der Pilotstudie zeigten einen Anstieg der nasalen Ig im Vergleich zu pD-2, wobei H1 und M2 am deutlichsten reagierten, während n=1 Pferd (H2) erst an pD7 eine nennenswerte Zunahme verzeichnete (Siehe Abb. A1, Abb. A2 und Tabelle A1 im Anhang). Diese Beobachtung spiegelte sich interessanterweise in der Entwicklung des IFN- γ wider (pD-2: H1: 10, H2: 7, M1: 9, M2: 4 U/mL). Auch hier stiegen die Werte (Tabelle A2 im Anhang) von H2 erst an pD7 (12 U/mL) an, während bei H1 (169 U/mL) und M1 (67 U/mL) die Werte an pD5 am höchsten waren (Abb. 6, Anhang: Tabelle A2).

Weder konnte eine Veränderung des IFN- α , noch der IL-4, -10 und -17 in der Pilotstudie gemessen werden.

Abb. 6



Entwicklung der IFN- γ Konzentration ab 2 Tage vor, bis 7 Tage nach der IN Applikationen eines EHV-1-MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in der Pilotstudie in 2 Maultieren und 2 Pferden; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (drei Segmente): IFN- γ Konzentration in Einheiten/mL (U/mL); schwarz: Pferd 1, gelb: Pferd 2, rot: Maultier 1, blau: Maultier 2

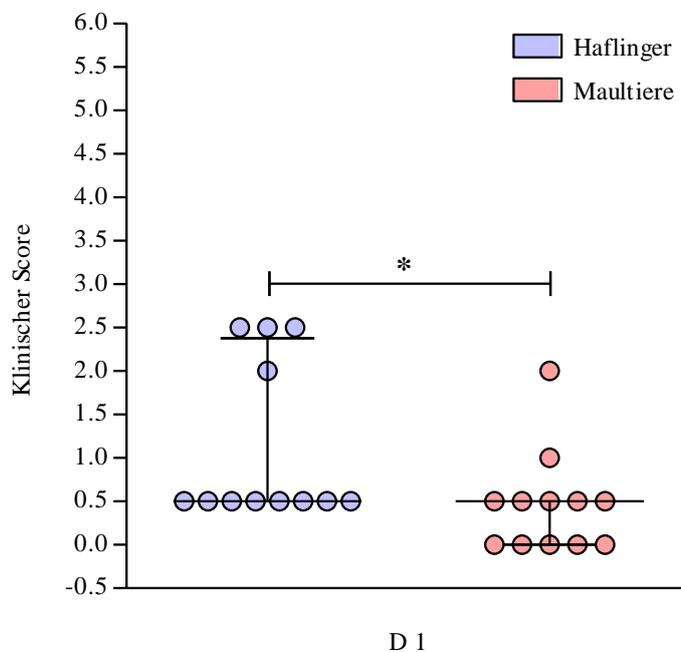
2. Die IM Impfung mit inaktiviertem EHV-1, -4 Antigen

2.1. Klinische Befunde

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen in Experiment 1 sind im Anhang in Tabelle A3 aufgelistet. Klinische Befunde wurden vor und nach der IM Impfung in beiden Tierarten notiert.

Fieber wurde in 4/12 Pferden und 2/12 Maultieren gemessen. Dabei trat das Fieber in n=4 Pferden und n=1 Maultier an D1 sowie in n=1 Maultier an D3 auf und hielt bei allen Tieren ≤ 24 Stunden an. Eine Schwellung der Injektionsstelle ≤ 5 cm im Durchmesser konnte in 9/12 Pferden und 7/12 Maultieren ab D2 bis D7 palpirt werden, wobei die höchste Anzahl betroffener Tiere (n=5 Pferde; n=5 Maultiere) an D3 notiert wurde. Bei allen 24 Tieren wurde zwischen D-2 und D7 an mindestens einem Tag geringgradiger seröser Nasenausfluss beobachtet. Bei 6/12 Haflingern und 5/12 Maultieren bereits an D-2. Die statistische Auswertung des klinischen Score ergab keine signifikante Veränderung an irgendeinem der Tage nach der Impfung im Vergleich zu D-2. Keine signifikante Differenz konnte darüber hinaus zwischen Pferden (5,0 [3,13; 7,5]) und Maultieren (3,5 [2,12; 11]) mit Blick auf die kumulativen klinischen Score-Werte innerhalb der ersten sieben Tage nach der Impfung beobachtet werden. Gleichzeitig war der klinische Score an D1, obwohl in beiden Tierarten mit Median 0,5 relativ niedrig, in Pferden (0,5 [0,5; 2,4]) signifikant ($P > 0,05$) gegenüber dem in Maultieren (0,5 [0; 0,5]) erhöht (Abb. 7).

Abb. 7



*Klinischer Score nach IM Impfung mit inaktiviertem EHV-1/-4-Vakzin (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) in Experiment 1 an D1 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: klinischer Score; * $P < 0,05$*

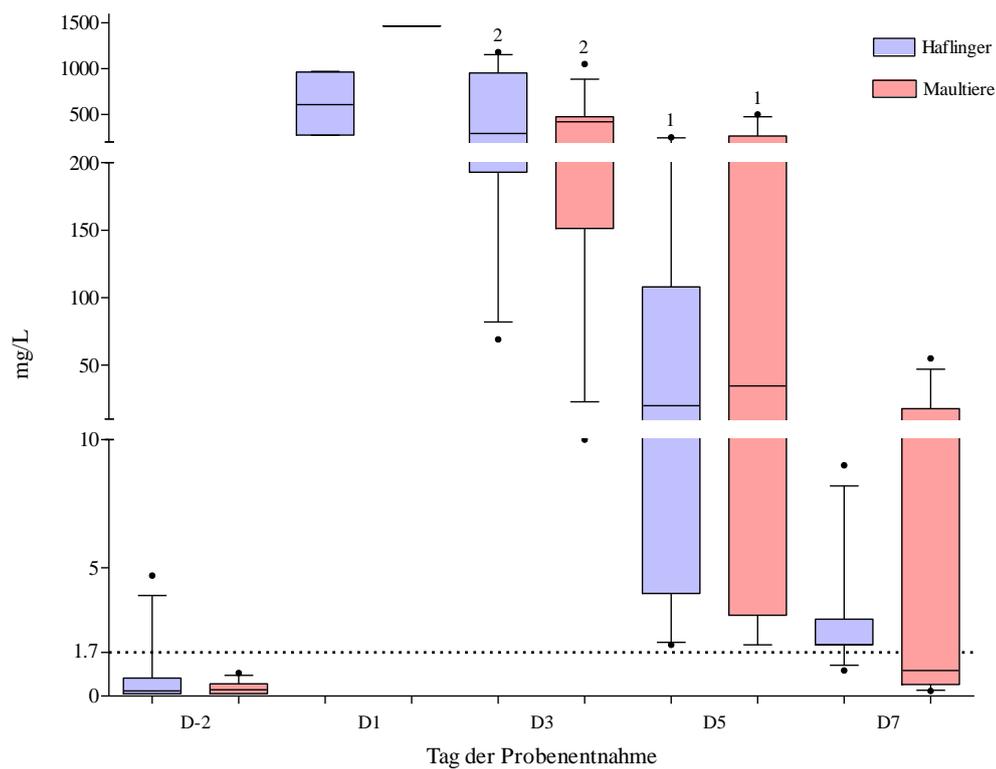
2.2. Serum Amyloid A (SAA)

Die Ergebnisse der SAA-Titer in diesem Kapitel stammen von n=11 Haflingern und n=12 Maultieren, da von einem Haflinger die D-2-Serumprobe fehlte.

Die Entwicklung der SAA-Konzentrationen von D-2 bis D7 ist in Abb. 8 dargestellt. Vor der Impfung an D-2 waren die SAA-Konzentrationen sowohl in Pferden als auch in Maultieren grundsätzlich niedriger als der vom Labor genannte Grenzwert 1,7 mg/L. Ausnahme war n=1 Pferd, in dessen Serumprobe an D-2 4,7 mg/L detektiert wurden. In den Tieren, deren Rektaltemperatur an D1 >38,0°C gemessen wurde (siehe klinische Befunde), wurden deutlich erhöhte SAA-Werte an diesem Tag (935 [Minimum 278, Maximum 1219] mg/L) im Vergleich zu D-2 (0.09 [Minimum 0.09, Maximum 0.25]) beobachtet. Die SAA-Konzentrationen waren an D3 in beiden Gruppen am höchsten. Der Anstieg war hoch signifikant ($P<0.001$) im Vergleich zu D-2 in sowohl Pferden (293 [194; 954] mg/L) als auch in Maultieren (421 [151; 477] mg/L). Die Werte waren auch an D5 signifikant ($P<0.01$) gegenüber D-2 erhöht, wieder sowohl in Pferden (20 [4; 108] mg/L) als auch in Maultieren (35 [3; 267] mg/L). An D7 näherten sich die Werte dann wieder denen an, die an D-2 gemessen worden waren. Pferde: 2 [2; 3] mg/L. Maultiere: 1 [0.5; 17,8] mg/L. An keinem der Tage wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt.

Es bestand keine Korrelation zwischen den höchsten SAA-Konzentrationen eines jeden Tieres und dem klinischen Score.

Die Entwicklung der SAA-Konzentrationen ist in Abb. 8 auf der folgenden Seite grafisch dargestellt.

Abb. 8

Entwicklung der SAA-Konzentrationen in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) nach IM Impfung mit inaktiviertem EHV-1/-4-Vakzin (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) in Experiment 1 von D-2 bis D7 im Friedman-Test und post-hoc Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (drei Segmente): SAA-Konzentrationen (mg/L); statistisch signifikanter Unterschied der VN-Titer im Vergleich zu D-2: ¹P<0,01, ²P<0,001

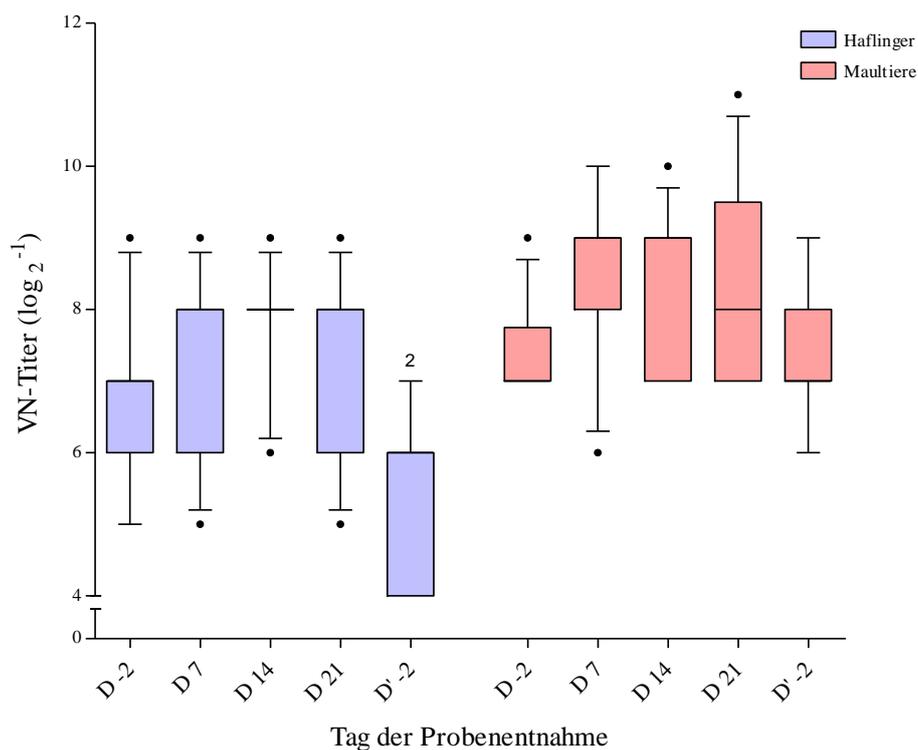
2.3. Virusneutralisierende Antikörpertiter (VN)

Wie schon für die Auswertung der SAA-Konzentrationen beschrieben, fehlte die Serumprobe eines Haflingers an D-2. Infolgedessen wurde er bei der statistischen Berechnung nicht berücksichtigt und die Ergebnisse der VN-Titer in diesem Kapitel stammen von n=11 Haflingern und n=12 Maultieren. Die Entwicklung der VN-Titer, welche sich aus dem VN-T ergab, wurde zur einfacheren Darstellung Log_2^{-1} -transformiert. Die VN-Titer der einzelnen Tiere sind im Anhang in den Tabellen A4 und A5 aufgelistet.

In beiden Gruppen war über den gesamten ersten Teil kein signifikanter Anstieg der VN-Titer festzustellen. Bezieht man allerdings die erste Messung von Teil

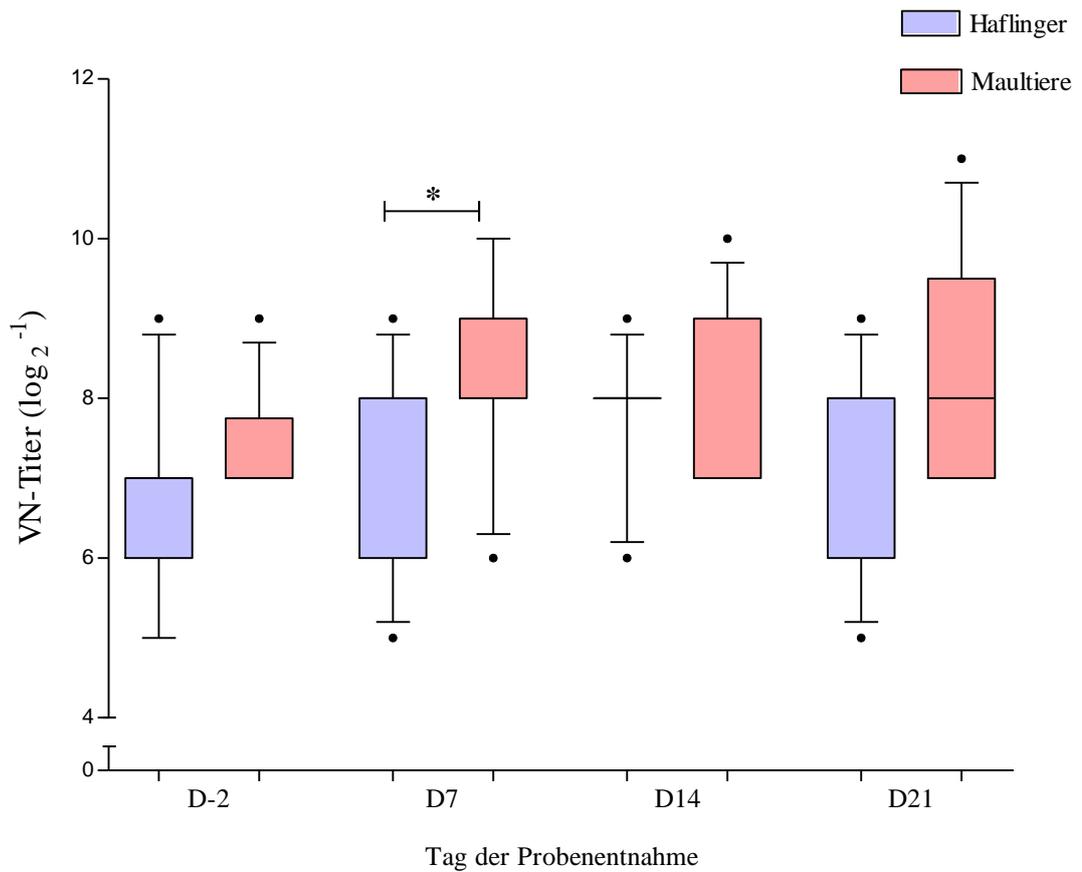
zwei mit ein, konnte eine signifikante ($P < 0,05$) Abnahme von D21 (8 [6; 8]) bis 123 Tage nach der Impfung (D²-2) (6 [4; 6]) in Pferden gemessen werden. In Maultieren wurden dagegen auch dann keine signifikanten Veränderungen an zwei aufeinanderfolgenden Probenentnahmetagen beobachtet. Vor der Impfung war der Unterschied zwischen den VN-Titern in Pferden (7 [6; 7]) und in Maultieren (7 [7; 7,8]) nicht signifikant. Allerdings wurden an D7 in Maultieren (9 [8; 9]) signifikant ($P < 0,05$) höhere VN-Titer gemessen, als in Pferden (8 [6; 8]). Dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen an D7 zeigt, dass der Anstieg in Maultieren innerhalb der ersten Tage nach der Impfung deutlicher war als in Pferden, obwohl eine Signifikanz zwischen D-2 und D7 in Maultieren nicht detektiert werden konnte (Abb. 9 und 10).

Abb. 9



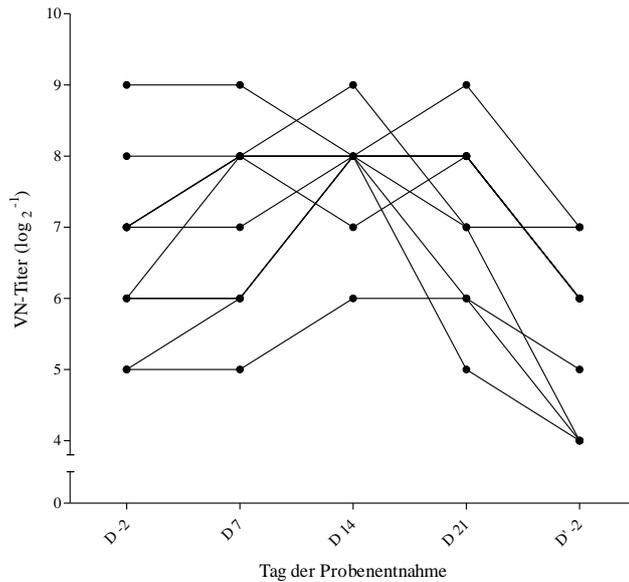
VN-Titer im VN-T nach IM Impfung mit inaktiviertem EHV-1/4-Vakzin (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) in Experiment 1 über 123 Tage von D⁻² bis D²-2 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Friedman-Test und Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): VN-Titer (Log₂⁻¹); statistisch signifikanter Unterschied der VN-Titer im Vergleich zum Vortag: ²P > 0,01

Abb. 10

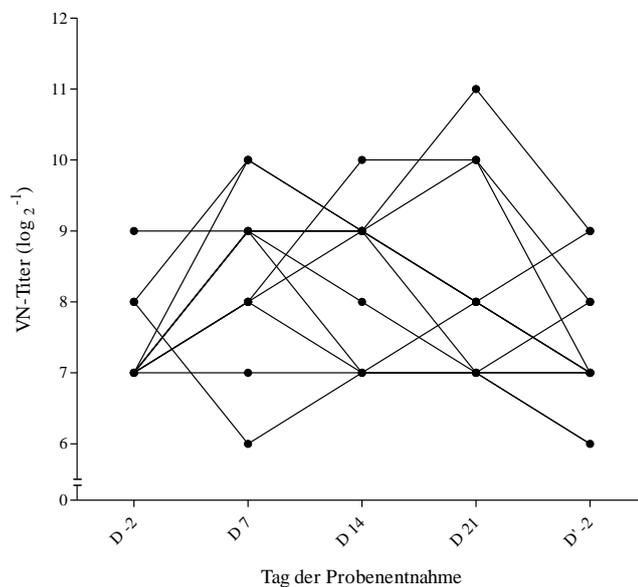


*VN-Titer im VN-T nach IM Impfung mit inaktiviertem EHV-1/-4-Vakzin (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) in Experiment 1 über 21 Tage von D-2 bis D21 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Vergleich im Mann-Whitney-test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): VN-Titer (Log₂⁻¹); *P<0,05*

In den folgenden Spaghetti-Diagrammen Abb. 11 und Abb. 12 wird deutlich, dass die Entwicklung innerhalb beider Gruppen eine hohe Variabilität zeigte. Während einige Tiere bereits innerhalb der ersten sieben Tage einen deutlichen Anstieg verzeichneten, reagierten andere gar nicht oder die Titer fielen nach der Impfung sogar ab.

Abb. 11

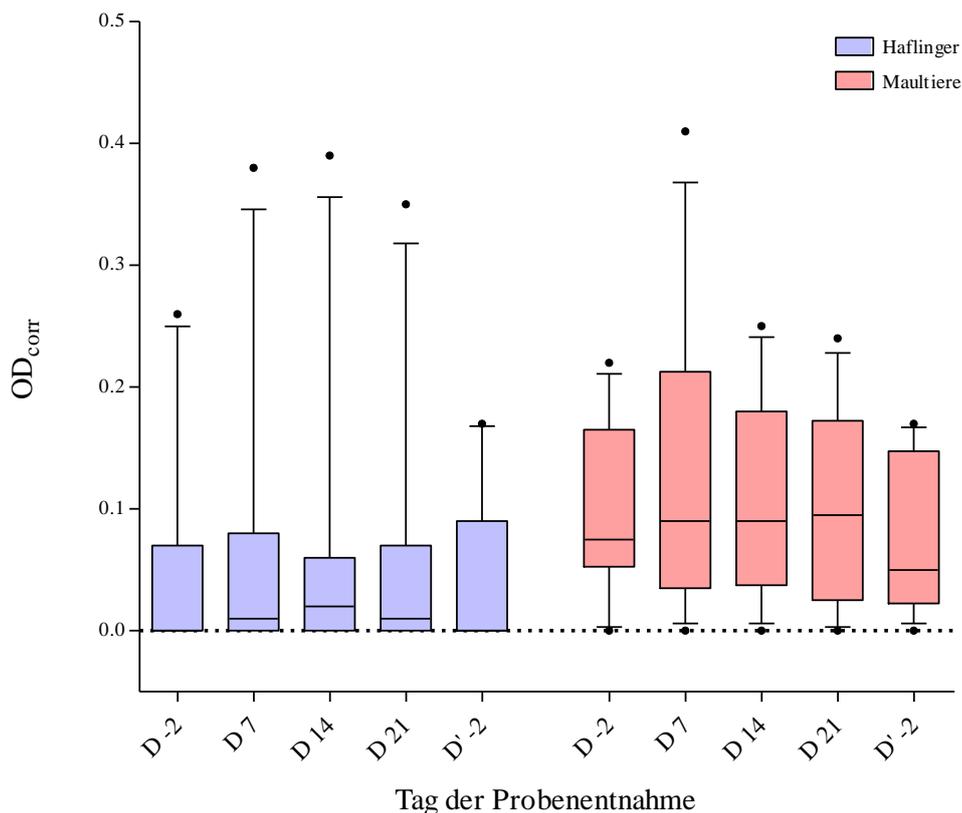
Entwicklung der VN der Haflinger im VN-T nach IM Impfung mit inaktiviertem EHV-1/4-Vakzin (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) in Experiment 1 von D-2 bis D'2 im Spaghetti-Diagramm; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): Entwicklung der VN-Titer (Log_2^{-1}) der einzelnen Haflinger von Ausgangspunkt D-2 bis 123 Tage nach der Impfung (D'-2)

Abb. 12

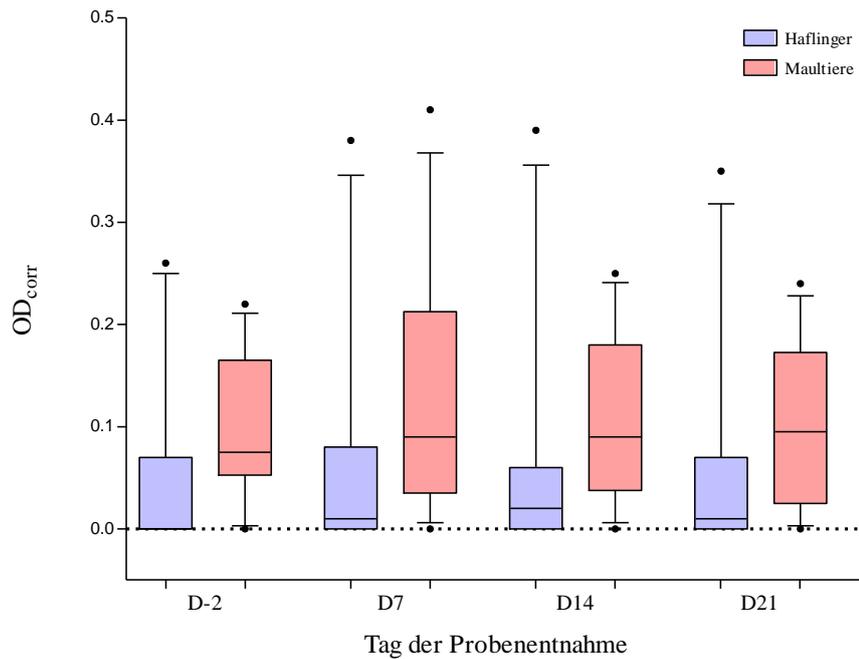
Entwicklung der VN der Maultiere im VN-T nach IM Impfung mit inaktiviertem EHV-1/4-Vakzin (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) in Experiment 1 von D-2 bis D'2 im Spaghetti-Diagramm; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): Entwicklung der VN-Titer (Log_2^{-1}) der einzelnen Maultiere von Ausgangspunkt D-2 bis 123 Tage nach der Impfung (D'-2)

Im ELISA waren alle Testergebnisse valide, was durch die Werte der Positiv (Pos)- und Negativkontrollen (Neg) auf den 96-Well-Platten (Tabelle 3) angezeigt wurde: $OD_{corr\ Pos} > 0,6$; $OD_{corr\ Neg} < 0,1$. Die Werte in Maultieren (0,08 [0,05; 0,17]) waren vor der Impfung mit dem inaktivierten EHV-1/4 Impfstoff zwar höher als in Pferden (0 [0; 0]), allerdings ohne Signifikanz. Auch konnte weder eine signifikante Veränderung der Titer innerhalb einer Gruppe, noch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Tierarten über den gesamten Zeitraum der Messungen in Teil 1 beobachtet werden. Die Titerentwicklung EHV-1-spezifischer Antikörper im Zeitraum D-2 bis D'-2 innerhalb der Gruppen (Abb. 13) und vergleichend zwischen beiden Tierarten (Abb. 14) ist im Folgenden grafisch dargestellt.

Abb. 13



Titer EHV-1-spezifischer Antikörper im ELISA nach IM Impfung mit inaktiviertem EHV-1/4-Vakzin (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) in Experiment 1 über 123 Tage von D-2 bis D'-2 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Friedman-Test und post-hoc Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: Korrigierte Optische Dichte (OD_{corr})

Abb. 14

Titer EHV-1-spezifischer Antikörper im ELISA nach IM Impfung mit inaktiviertem EHV-1/4-Vakzin (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Deutschland) in Experiment 1 über 21 Tage von D-2 bis D21 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Vergleich im Mann-Whitney-test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: Korrigierte Optische Dichte (OD_{corr})

Eine Korrelation zwischen der VN-Titer-Entwicklung und den höchsten SAA-Konzentrationen eines jeden Tieres bestand nicht.

3. Die Verabreichung eines modifizierten EHV-1 Lebendimpfstoffes

3.1. Klinische Befunde

Wie im ersten Teil der Hauptstudie wurden auch im zweiten Experiment klinische Befunde sowohl vor als auch nach D'0 notiert.

Fieber trat an D'7 auf, als bei n=1 Maultier eine Rektaltemperatur von 38,6°C gemessen wurde, die allerdings im Laufe des Tages wieder unter 38,0°C sank. Bei allen 24 Tieren konnte zwischen D'-2 und D'7 an mindestens einem Tag

geringgradiger seröser Nasenausfluss beobachtet werden, wobei 2/12 Haflingern und 3/12 Pferden bereits vor der Verabreichung des MLV geringgradig serösen Nasenausfluss zeigten. Darüber hinaus wurden weder in Maultieren noch in Pferden klinische Befunde notiert. Die statistische Auswertung zeigte aufgrund der Entwicklung des Nasenausflusses an D'3 allerdings einen signifikant ($P > 0,05$) höheren klinischen Score in Pferden (0,5 [0,5; 0,5]) im Vergleich zu Maultieren (0 [0; 0,5]), der aber mit einem Median von 0,5 gleichwohl sehr niedrig war.

3.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die mittels qPCR im DNA-Extrakt der Nasentupfer bestimmten gB-DNA-Kopien, offenbarten wie mit Blick auf die Pilotstudie zu erwarten war, auch im Hauptversuch die temporäre Ausscheidung von EHV-1-Antigen über die nasopharyngeale Mukosa, infolge der IN Applikation mit EHV-1-MLV. Die Konzentration der EHV1-Genomequivalente wird in diesem Kapitel in Molekülen/mL angegeben.

Die Ct-Werte der positiven und negativen Kontrollen wurden im Hauptversuch mit 14,2 Ct ($3,4 \times 10^{10}$ Moleküle/mL) beziehungsweise kein Ct gemessen. Für die Tiere ergaben sich zwischen D'-2 und D'7 folgende in Abb. 15 grafisch dargestellte Ergebnisse:

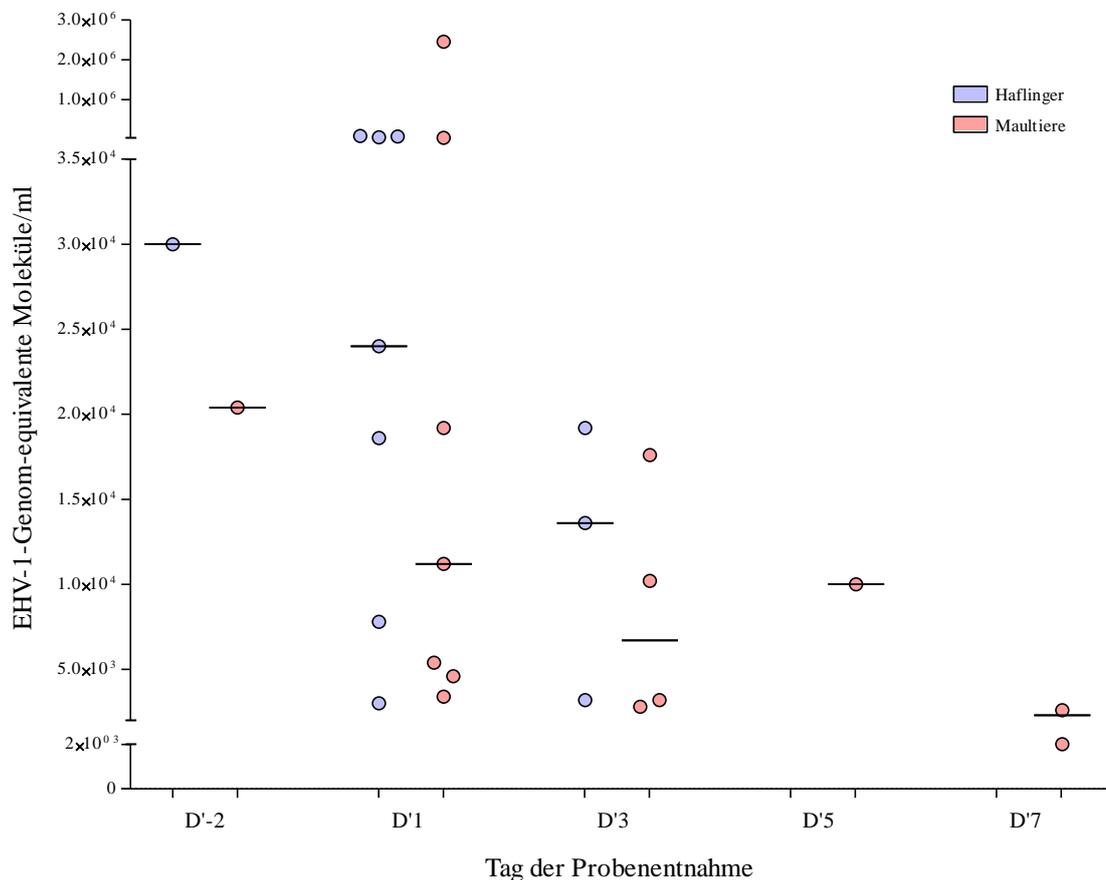
An D'1 wurde sowohl in den Nasentupfern von 7/12 Pferden als auch von 7/15 Maultieren EHV-1 nachgewiesen. Die Menge betrug bei Pferden ($2,4 \times 10^4$ [$7,8 \times 10^3$; $7,3 \times 10^3$] Moleküle/mL) und bei Maultieren ($1,1 \times 10^4$ [$4,6 \times 10^3$; $3,7 \times 10^4$] Moleküle/mL). Damit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. D'3 ergab in 3/12 Pferden ($3,2 \times 10^3$; $1,4 \times 10^4$; $1,9 \times 10^4$ Moleküle/mL) und 4/15 Maultieren ($2,8 \times 10^3$; $3,2 \times 10^3$; 10^4 ; $1,8 \times 10^4$ Moleküle/mL), davon n=1 Kontrolle, EHV-1-gB positive Nasentupfer. An D'5 wurde in n=1 Maultier (10^4 Moleküle/mL) und an D'7 in n=2 Maultieren (2×10^3 ; $2,6 \times 10^3$ Moleküle/mL), davon n=1 Kontrolle, EHV-1-Antigen nachgewiesen. Die Dauer der EHV-1-Ausscheidung nach der Verabreichung des MLV betrug bei Pferden (1 [0; 1] d) und bei Maultieren (1 [1; 1,8] d). Folglich war die Differenz in der Dauer der Ausscheidung zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant. Interessanterweise waren n=1 Haflinger (3×10^4 Moleküle/mL) sowie n=1 Maultier (2×10^4 Moleküle/mL) an D'-2, i.e. vor der IN Applikation des EHV-1

MLV, EHV-1 positiv. Eine Stranganalyse (Institut für Virologie, FU Berlin, Berlin, Deutschland) wurde durchgeführt, um eine Kontamination mit dem MLV-Strang Rac-H auszuschließen. Diese ergab, dass es sich bei dem ausgeschiedenen EHV-1 um einen Wildtyp handelte. Weitere Versuche von Stranganalysen der Proben anderer Tiere nach D'0, führten aufgrund der hohen Ct-Werte nicht zum Erfolg. Allerdings wurde im qPCR (Institut für Virologie, FU Berlin, Berlin, Deutschland) an D'-2 in drei weiteren Pferden EHV-4 (30, 33, 37 Ct) nachgewiesen.

In allen anderen Tieren war der Ct-Wert >37 Ct oder kein Ct wurde gemessen.

Alle Werte sind auch in Tabelle A8 im Anhang nochmals aufgeführt.

Abb. 15



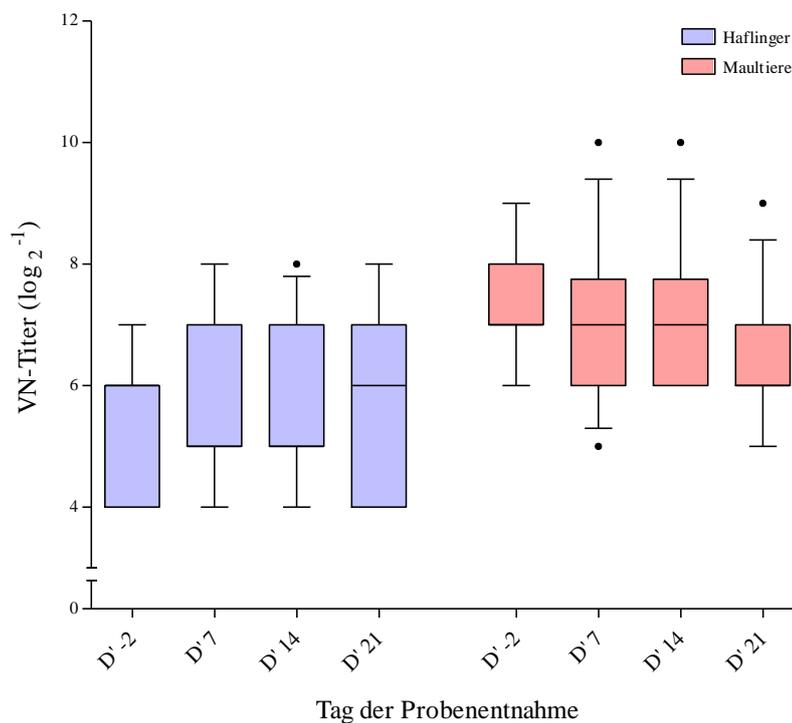
Ausscheidung der EHV-1-Genomequivalente über die nasale Mukosa, detektiert in der qPCR aus Nasentupfern, nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 über 7 Tage von D'-2 bis D'7 in Haflingern und Maultieren; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (drei Segmente): EHV-1-gB-Moleküle/5µL; blau: Haflinger, rot: Maultiere; "-" Median; Anzahl der Punkte=Anzahl ausscheidender Tiere

3.3. Virusneutralisierende Antikörper (VN)

Die Entwicklung der VN-Titer von D'-2 bis D'21, welche sich aus dem VN-T ergab, wurde zur einfacheren Darstellung Log_2^{-1} -transformiert und sind in den Figuren 16 und 17 dargestellt. Die VN der einzelnen Tiere sind im Anhang in den Tabellen A6 und A7 aufgelistet.

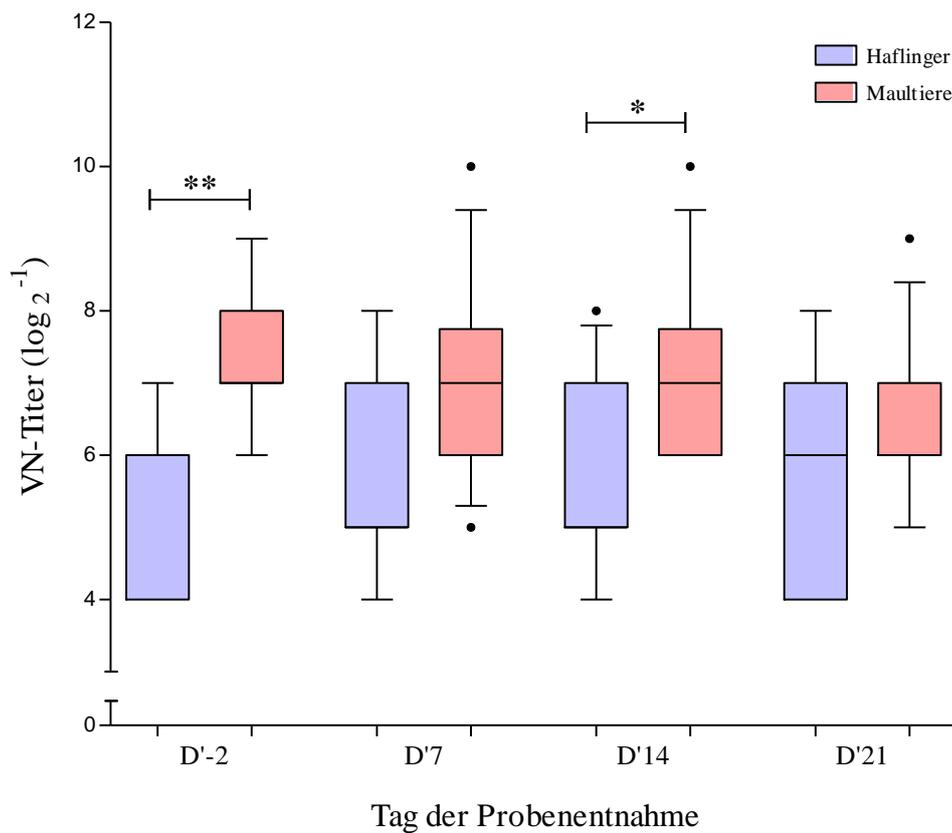
Innerhalb der beiden Gruppen wurde zwischen D'-2 und D'21 keine signifikante Veränderung der VN-Titer im VN-T gemessen. Die beiden Gruppen im Vergleich betrachtet, war der Unterschied an D'-2 allerdings hochsignifikant ($P < 0,001$), wobei in Pferden (6 [4; 6]) und in Maultieren (7 [7; 8]) detektiert wurden. An D'14 wurde ebenfalls ein signifikanter ($P < 0,05$) tierartlicher Unterschied beobachtet, dabei waren die Werte in Maultieren (7 [6; 7,8]) höher als in Pferden (5 [5; 7]). Die drei Kontroll-Maultiere, die nur 0,9% NaCl-Lösung, nicht aber das MLV verabreicht bekamen, zeigten im VN-T keinen Anstieg der VN-Titer zwischen D'-2 und D'21.

Abb. 16



VN-Titer im VN-T nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'21 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Friedman-Test und Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): VN-Titer (Log_2^{-1})

Abb. 17



VN-Titer im VN-T nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 über 21 von D'-2 bis D'-21 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Vergleich im Mann-Whitney-test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): VN-Titer (Log_2^{-1}); * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

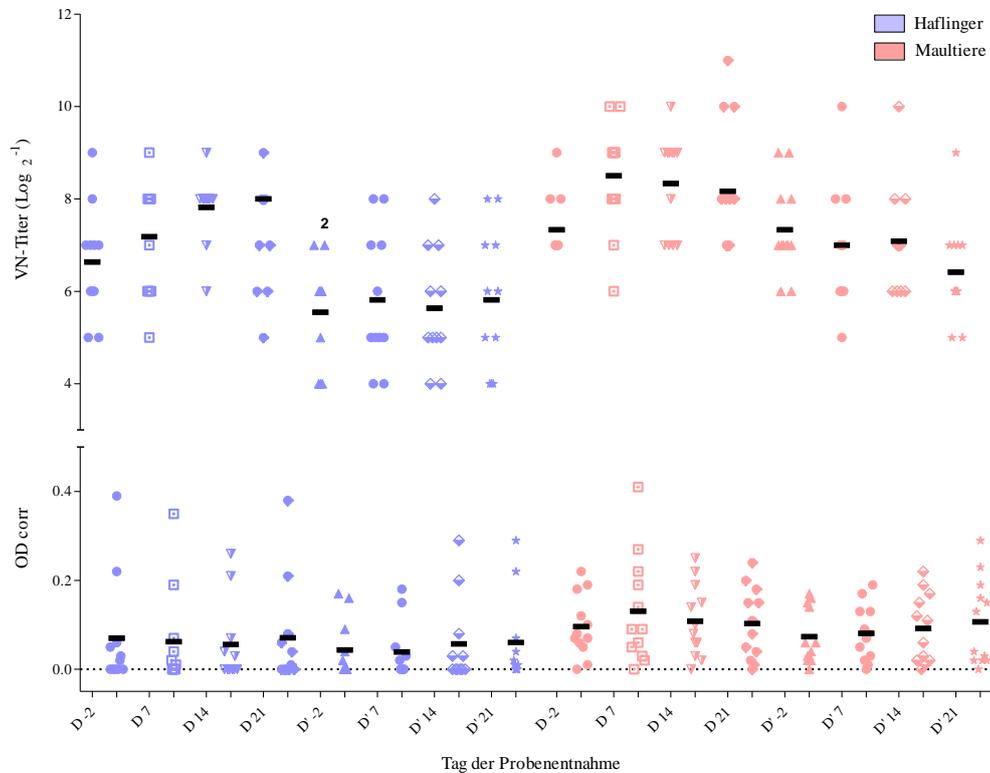
Im ELISA konnte weder innerhalb einer Gruppe noch im Vergleich zwischen Haflingern und Maultieren eine signifikante Veränderung der VN-Titer im Zeitraum D'-2 bis D'21 notiert werden. Die Grafische Darstellung der Ergebnisse befindet sich im Anhang in den Abb. 3 und 4.

Wie schon im VN-T, zeigten die Kontrollen auch im ELISA keine Veränderung der VN-Titer zwischen D'-2 und D'21.

Die Bewegung der Mediane von Maultieren und Pferden über den gesamten Zeitraum der VN-Überwachung (146 Tage) sowohl in Experiment 1 als auch 2, ist im Folgenden (Abb. 18) grafisch dargestellt. Hieraus ist klar ersichtlich, dass der

ELISA die markanten Zu- und Abnahmen der VN-Titer im VN-T nicht bestätigte.

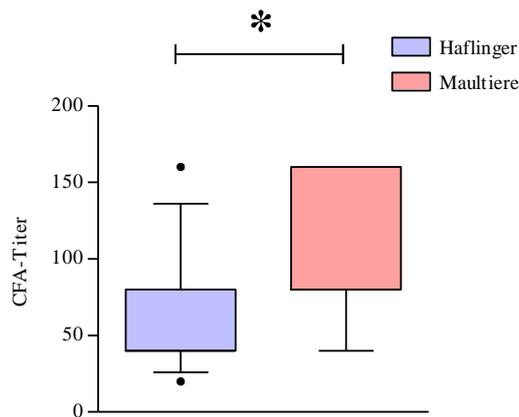
Abb. 18



Vergleich der Mediane der VN beider Gruppen, Haflinger (blau), Maultiere (rot), in ELISA (unten) und VN-T (oben) über die 146 Tage von Experiment 1 und 2 (D-2 bis D-21) im Friedman-Test und post-hoc Dunn's Multiple Comparison Test; Daten gestreut dargestellt (Minimum bis Maximum). „-“: Median; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): Korrigierte Optische Dichte (OD_{corr}), VN-Titer (Log_2^{-1}); statistisch signifikanter Unterschied der VN-Titer im Vergleich zum Vortag: $^2P < 0,01$

3.4. Komplementfixierende Antikörper im CFA

Die an D'-2 gemessenen CFA-Titer sind im Anhang in Tabelle A6 aufgeführt und in Abb. 19 dargestellt. Sie waren in beiden Gruppen ≥ 20 und in Maultieren (80 [80; 160]) signifikant ($P < 0,05$) höher als in Pferden (40 [40; 80]). CFA-Titer können > 40 auf eine kürzlich eingetretene EHV-1- bzw. EHV-4-Infektion hinweisen (HARTLEY, et al. 2005).

Abb. 19

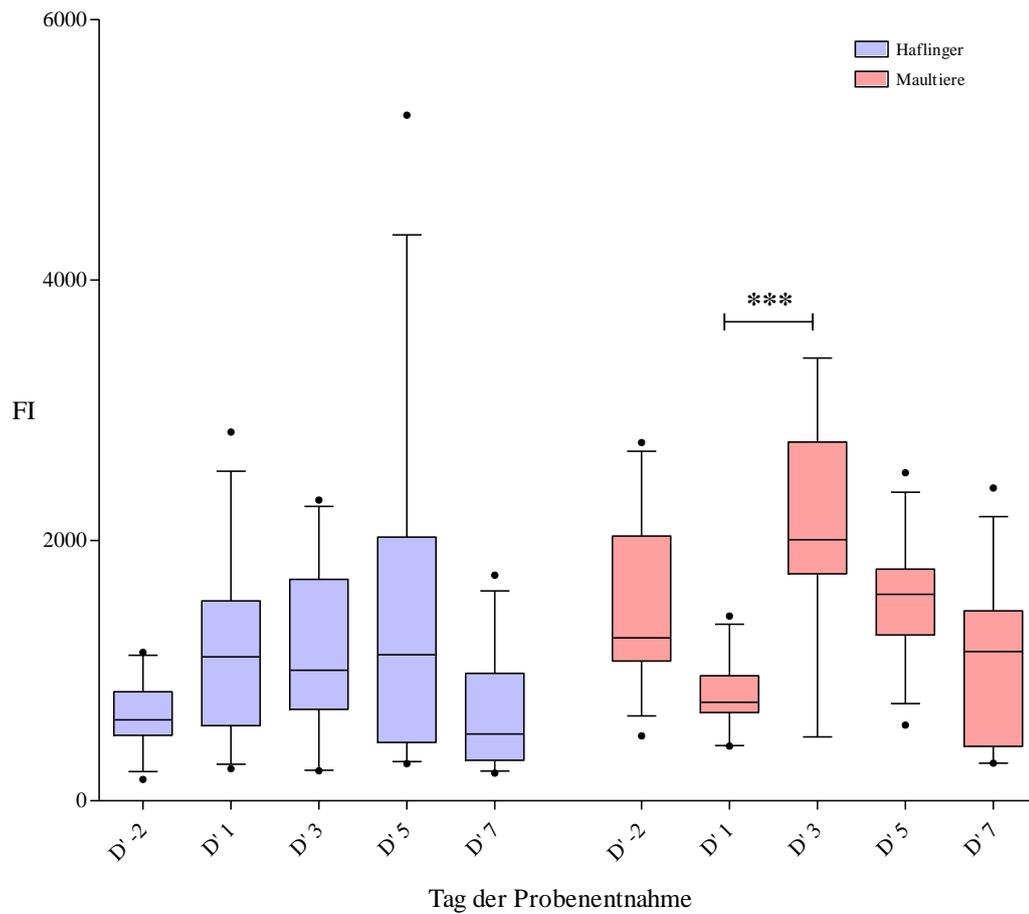
*Komplementfixierende Antikörpertiter nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 an D'-2 in Haflingern und Maultieren vergleichend im Mann-Whitney-test; x-Achse: Tierart (Pferd: blau, Maultier: rot); Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); y-Achse: CFA-Titer; * $P < 0,05$*

3.5. Mukosale Immunoglobuline anti-gB, -gC und -gD

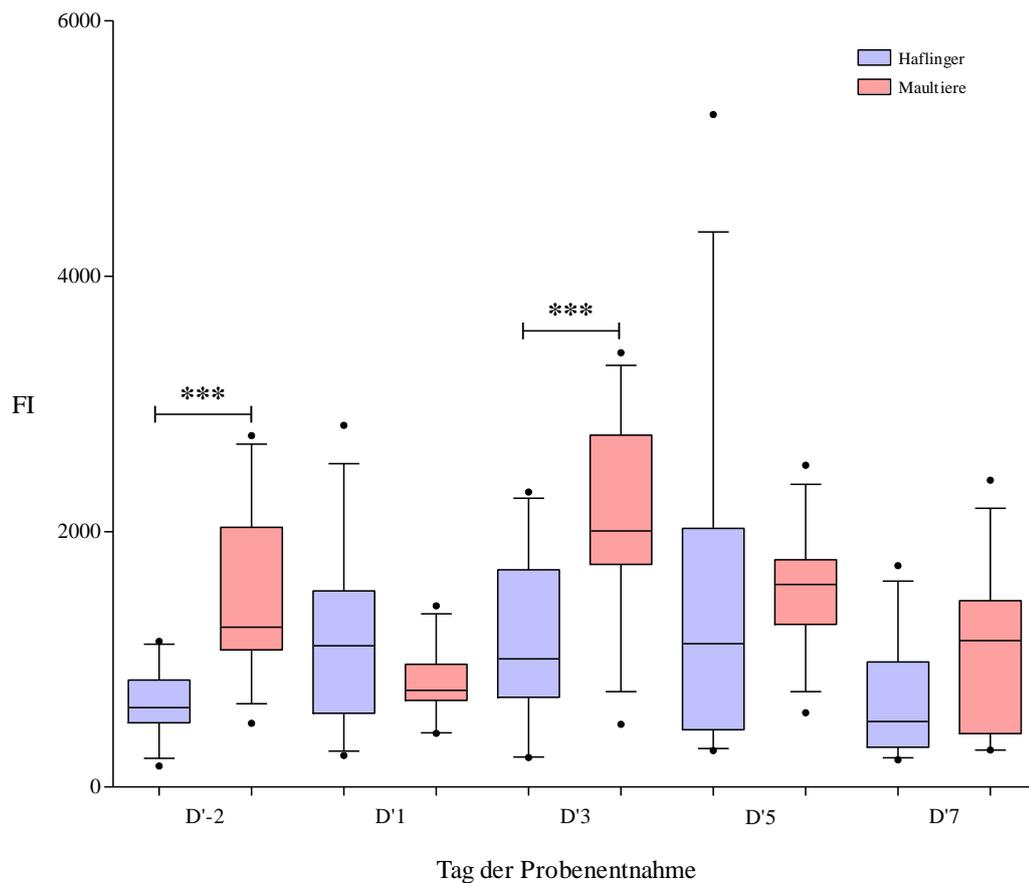
Die Ig-Konzentrationen aller drei Typen (anti-gB, -gC und -gD), gemessen von D'-2 bis D'7 sind für jedes Tier im Anhang in den Tabellen A9 bis A11 aufgeführt.

3.5.1. EHV-1-anti-gB

Vor der Impfung betragen die anti-gB-Ig in Pferden (623 [503; 837] FI) und in Maultieren (1251 [1074; 2034] FI) und waren damit in letzteren signifikant ($P < 0,001$) höher als in ersteren. In Pferden war zwischen D'-2 und D'7 keine signifikante Varianz von einem auf den folgenden Tagen zu beobachten. In Maultieren dagegen, war der Anstieg der Ig anti-gB von D'1 (757 [679; 960] FI) nach D'3 (2000 [1730; 2147] FI) signifikant ($P < 0,001$). Gleichzeitig wurde auch zwischen beiden Gruppen, Pferden (1004 [703; 1700] FI) und Maultieren (2005 [1743; 3401] FI), eine Signifikanz ($P < 0,05$) an D'3 detektiert. (Für die graphische Darstellung der Varianz der Ig anti-gB zwischen D'-2 und D'7 siehe Abb. 20. Für tierartliche Unterschiede der Ig anti-gB siehe Abb. 21).

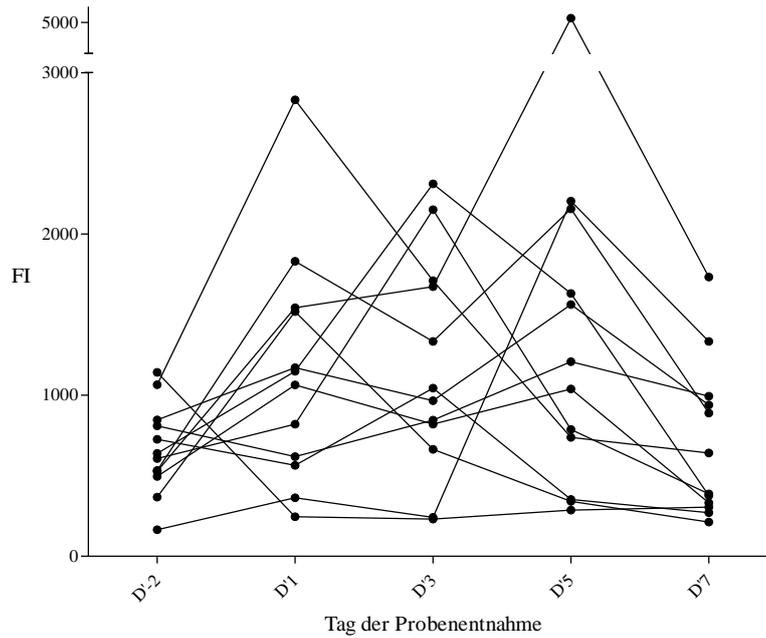
Abb. 20

Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gB-Ig nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Friedman-Test und Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: anti-gB-Ig-Konzentrationen (FI); *** $P > 0,001$

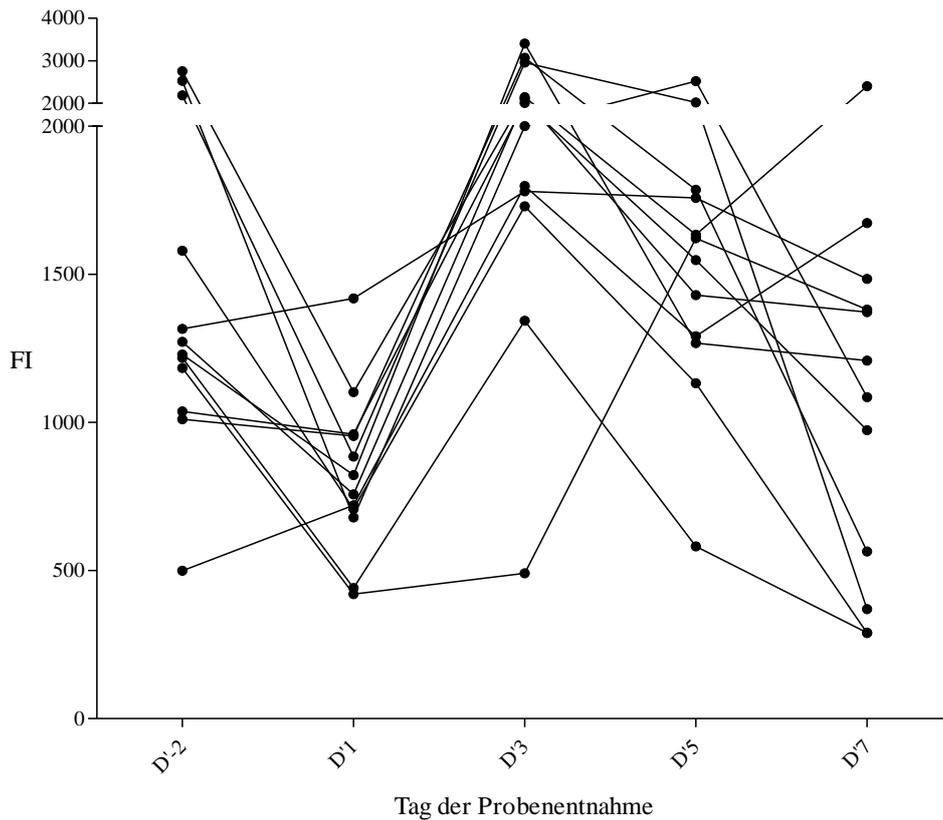
Abb. 21

*Mukosale anti-EHV-1-gB-Ig nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) vergleichend im Mann-Whitney-test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: anti-gB-Ig-Konzentrationen (FI); *** P < 0,001*

Aus den folgenden Spaghetti-Diagrammen (Abb. 22 und 23) wird ersichtlich, dass die Entwicklung der anti-gB-Ig innerhalb beider Gruppen eine hohe Variabilität aufwies. Während einige Tiere einen deutlichen Anstieg verzeichneten, reagierten andere gar nicht oder die Titer fielen sogar ab. Deutlich sichtbar ist der Rückgang bei fast allen Maultieren von D'-2 nach D'1 und der folgende Wiederanstieg an D'3. Diese Bewegung wurde von den drei Maultieren, die nur 0,9% NaCl-Lösung, nicht aber EHV-1-Antigen erhielten gleichermaßen gezeigt.

Abb. 22

Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gB-Ig der Haflinger nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 im Spaghetti-Diagramm; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): Entwicklung der mukosalen anti-gB-Ig-Konzentrationen (FI) der einzelnen Pferde von Ausgangspunkt D'-2 bis D'7

Abb. 23

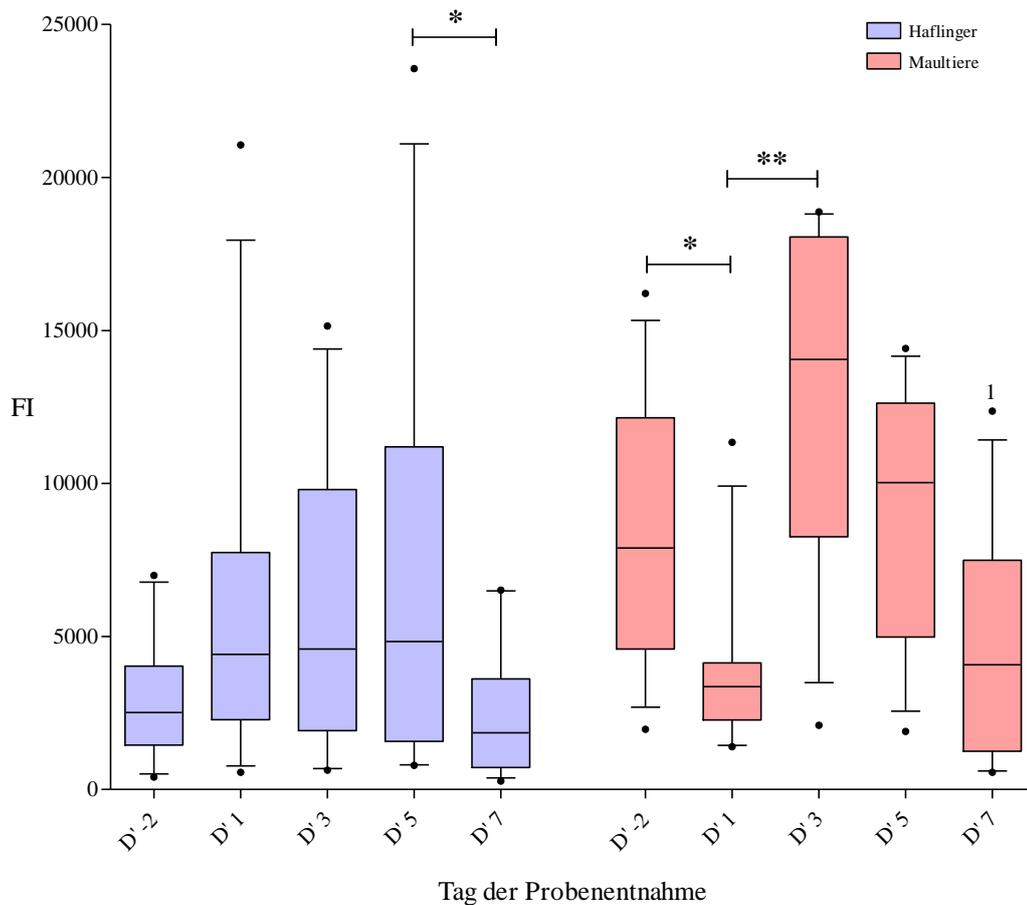
Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gB-Ig der Maultiere nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 im Spaghetti-Diagramm; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): Entwicklung der mukosalen anti-gB-Ig-Konzentrationen (FI) der einzelnen Pferde von Ausgangspunkt D'-2 bis D'7

3.5.2. EHV-1-anti-gC

Die anti-gC-Ig vor der IN Applikation des EHV-1 MLV waren in Pferden (2511 [1448; 4030] FI) signifikant ($P < 0,001$) niedriger als in Maultieren (7893 [4591; 12144] FI). In Pferden wurde ein signifikanter ($P < 0,05$) Rückgang der anti-gC-Ig von D'5 (4835 [1572; 11196] FI) bis D'7 (1855 [721; 3614] FI) beobachtet. Darüber hinaus wurden keine statistisch signifikanten Veränderungen zwischen D'-2 und D'7 in Pferden gemessen. In Maultieren wurde von D'-2 (7927 [5004; 13270] FI) bis D'1 (3361 [2274; 4140] FI) ein signifikanter ($P < 0,05$) Abfall der anti-gC-Ig-Konzentrationen gemessen. Darauf folgte ein signifikanterer ($P < 0,01$) Anstieg bis D'3 (13499 [7396; 17859] FI). Darüber hinaus war ein signifikanter

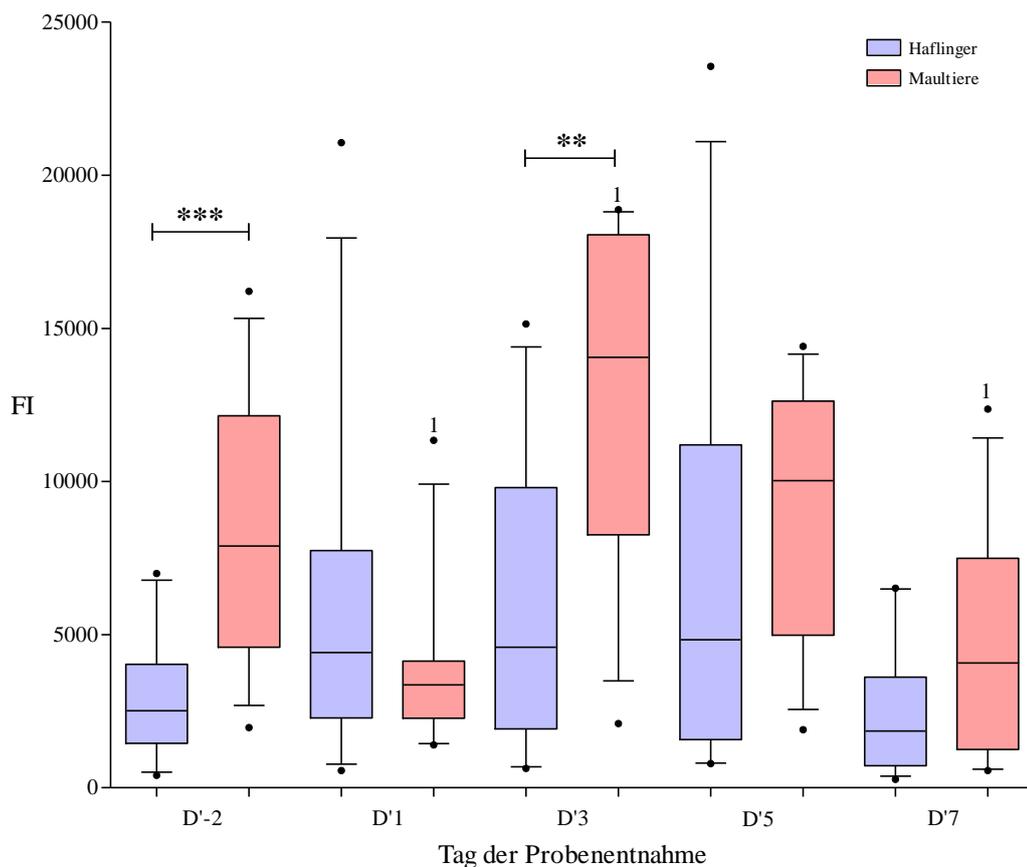
($P < 0,05$) Rückgang an D'7 (4010 [1123; 7758] FI) gegenüber D'-2 (7927 [5004; 13270] FI) zu verzeichnen. An D'3 waren außerdem die anti-gC-Ig-Konzentrationen in Maultieren (13499 [7396; 17859] FI) signifikant höher als in Pferden (4590 [1926; 9804] FI). (Für die graphische Darstellung der Varianz der Ig anti-gC zwischen D'-2 und D'7 siehe Abb. 24. Für tierartliche Unterschiede der Ig anti-gC siehe Abb. 25).

Abb. 24



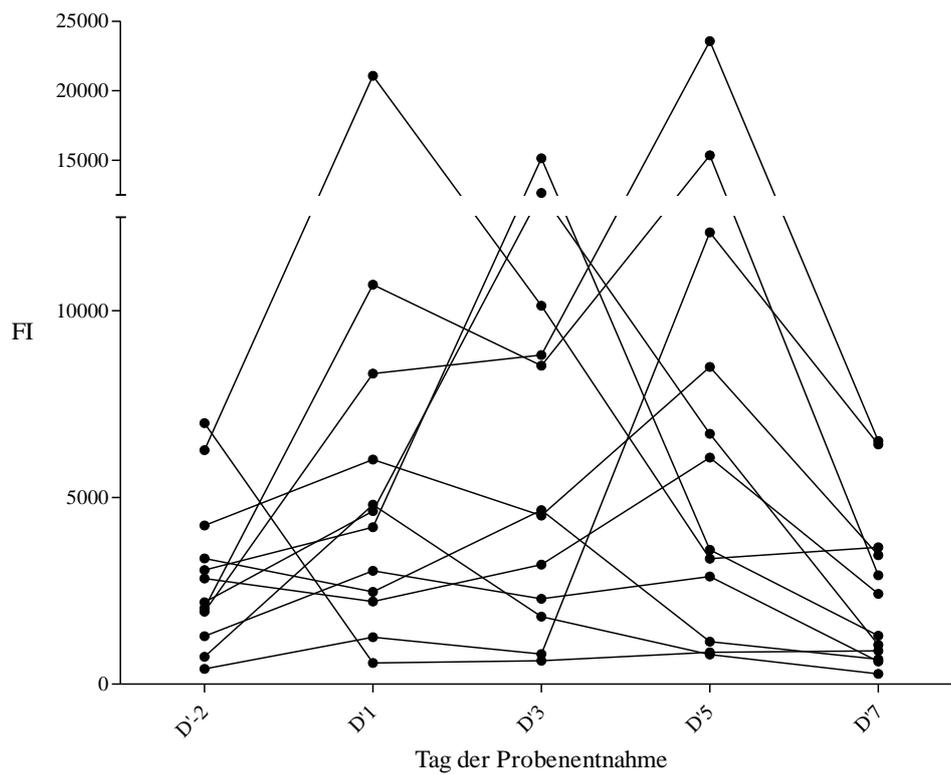
*Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gC-Ig nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Friedman-Test und Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: anti-gC-Ig-Konzentrationen (FI); * $P > 0,05$, ** $P > 0,01$; statistisch signifikanter Unterschied der Anti-gC-Konzentrationen im Vergleich zu D'-2: ¹ $P > 0,05$*

Abb. 25

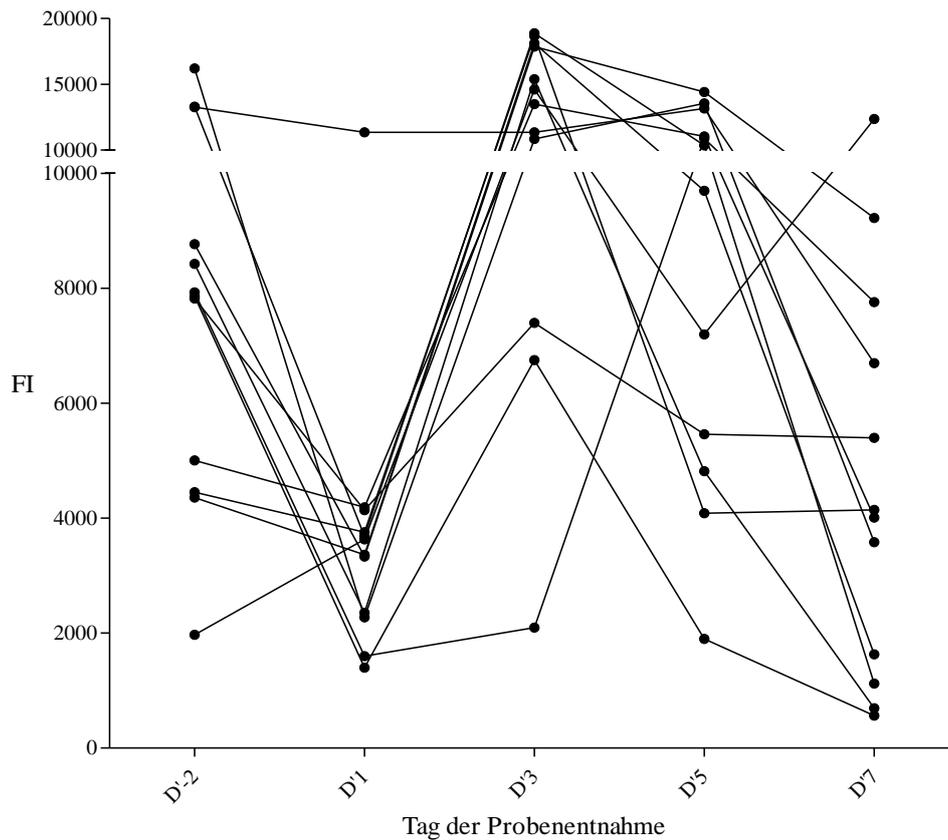


Mukosale anti-EHV-1-gC-Ig nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) vergleichend im Mann-Whitney-test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: anti-gC-Ig-Konzentrationen (FI); ** $P < 0,01$, *** $P > 0,001$; statistisch signifikanter Unterschied der Anti-gC-Konzentrationen im Vergleich zu D'-2: † $P > 0,05$

In den folgenden Spaghetti-Diagrammen (Abb. 26 und 27) ist dargestellt, dass die Entwicklung der anti-gC-Ig innerhalb beider Gruppen eine hohe Variabilität aufwies. Während einige Tiere einen deutlichen Anstieg verzeichneten, reagierten andere gar nicht oder die Titer fielen sogar ab. Deutlich sichtbar ist der Rückgang bei fast allen Maultieren von D'-2 nach D'1 und der folgende Wiederanstieg an D'3, der schon bei den anti-gB-Ig beobachtet wurde. Diese Bewegung wurde auch im Falle der anti-gC-Ig von den drei Maultieren, die nur 0,9% NaCl-Lösung, nicht aber EHV-1-Antigen erhielten gleichermaßen gezeigt.

Abb. 26

Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gC-Ig der Haflinger nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D-2 bis D+7 im Spaghetti-Diagramm; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): Entwicklung der mukosalen anti-gC-Ig-Konzentrationen (FI) der einzelnen Pferde von Ausgangspunkt D-2 bis D+7

Abb. 27

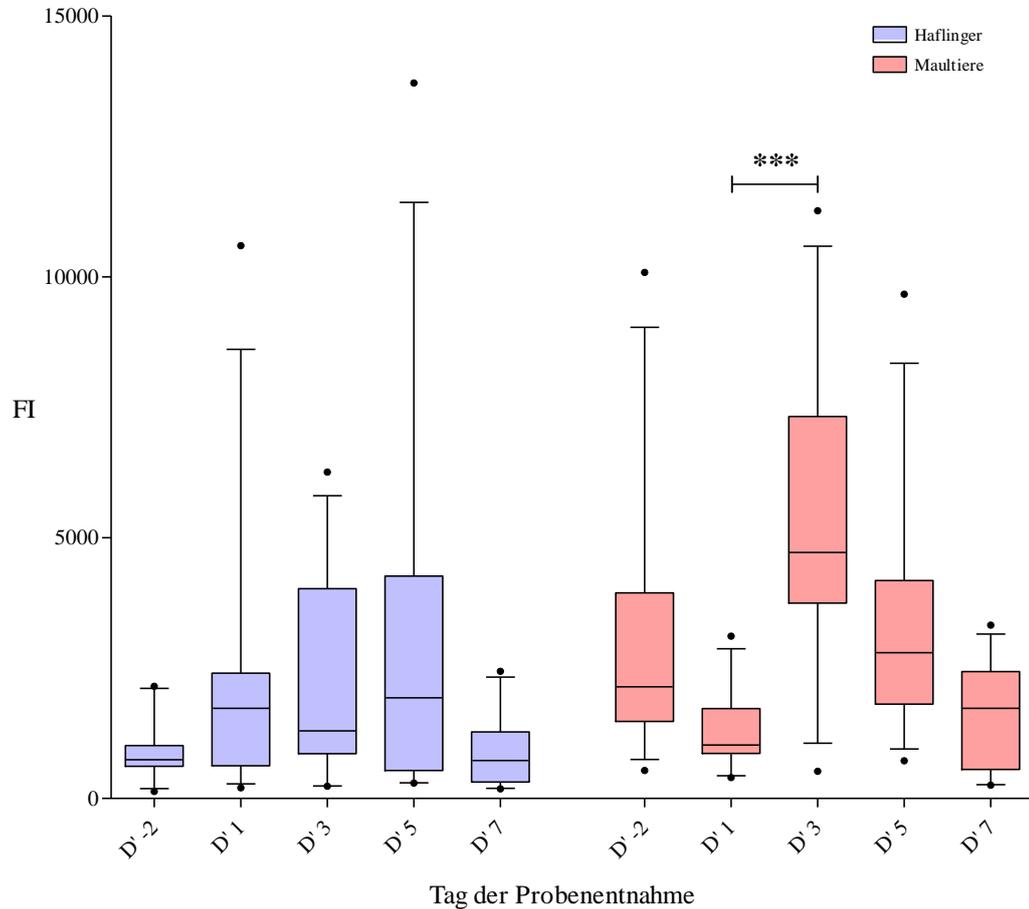
Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gC-Ig der Maultiere nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 im Spaghetti-Diagramm; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): Entwicklung der mukosalen anti-gC-Ig-Konzentrationen (FI) der einzelnen Pferde von Ausgangspunkt D'-2 bis D'7

3.5.3. EHV-1-anti-gD

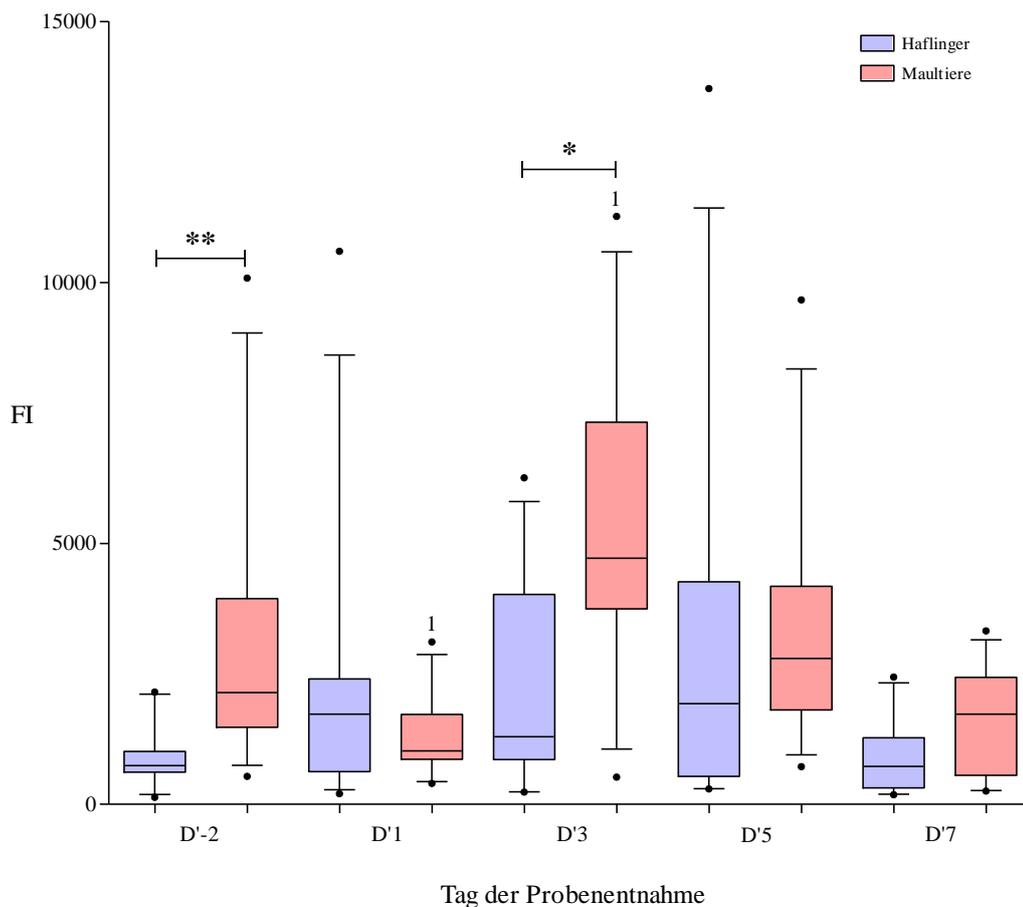
An D'-2 waren die anti-gD-Ig-Konzentrationen in Maultieren (2140 [1474; 3941] FI) signifikant ($P < 0,01$) höher als in Pferden (740 [618; 1013] FI). In Pferden wurde im Zeitraum der Probenentnahme eine signifikante Veränderung weder an zwei aufeinanderfolgenden Tagen noch gegenüber D'-2 gemessen. In Maultieren wurde dagegen ein signifikanter ($P < 0,001$) Anstieg der anti-gD-Ig-Konzentrationen an D'3 (4683 [3716; 7182] FI) verglichen mit D'1 (1023 [865; 1725] FI) beobachtet. An D'3 waren die anti-gD-Ig-Werte der Maultiere (4683 [3716; 7182] FI) auch signifikant ($P < 0,05$) gegenüber denen in Pferden (1296 [855; 4020] FI) erhöht. (Für die graphische Darstellung der Varianz der Ig anti-gD

zwischen D'-2 und D'7 siehe Abb. 28. Für tierartliche Unterschiede der Ig anti-gD siehe Abb. 29).

Abb. 28

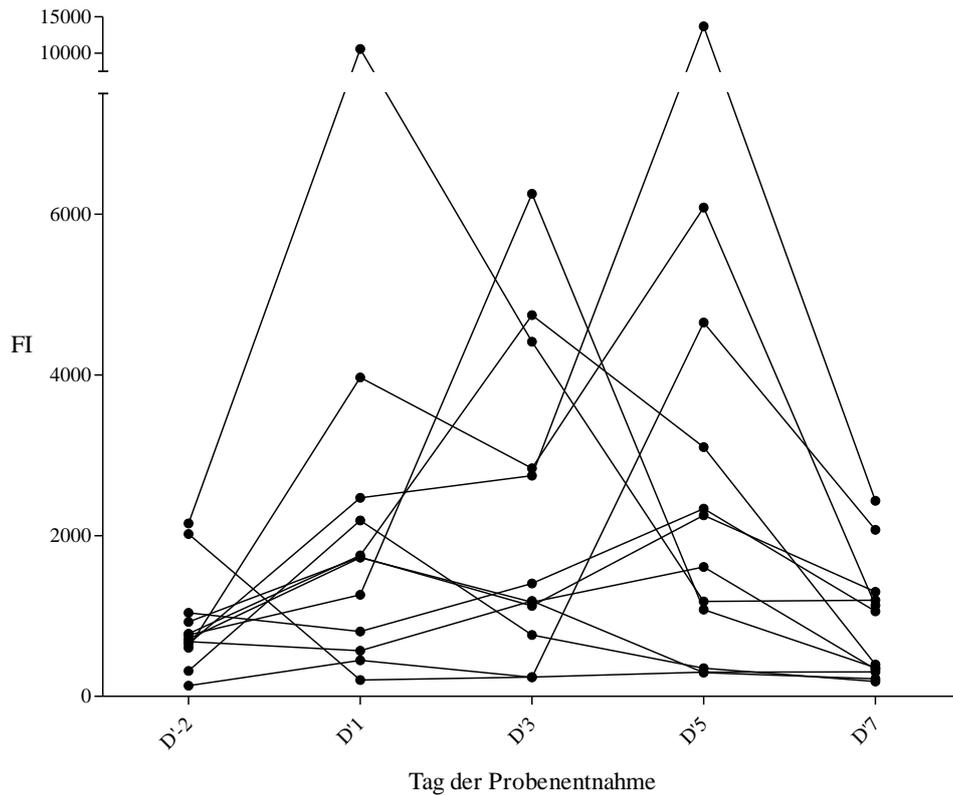


Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gD-Ig nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Friedman-Test und Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: anti-gD-Ig-Konzentrationen (FI); *** P < 0,01

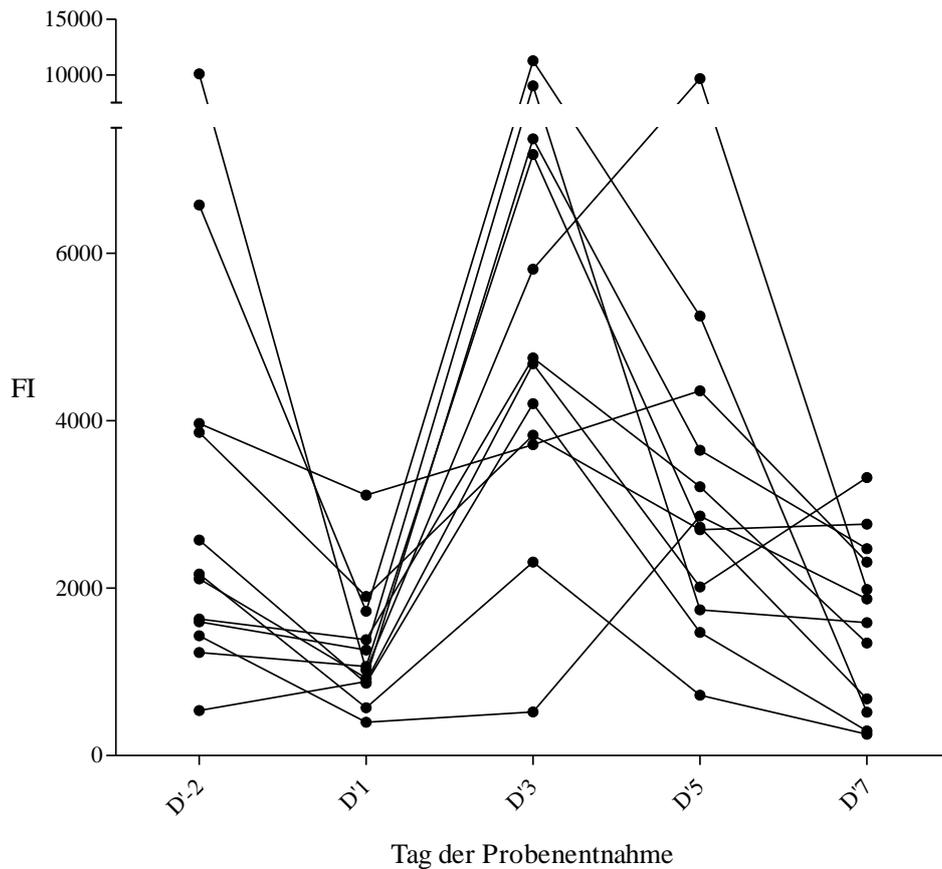
Abb. 29

*Mukosale anti-EHV-1-gD-Ig nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) vergleichend im Mann-Whitney-test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: anti-gD-Ig-Konzentrationen (FI); * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; statistisch signifikanter Unterschied der Anti-gD-Konzentrationen im Vergleich zum Vortag: ¹ $P > 0,05$*

In den folgenden Spaghetti-Diagrammen (Abb. 30 und 31) wird gezeigt, dass die Entwicklung der anti-gC-Ig innerhalb beider Gruppen eine hohe Variabilität aufwies. Während einige Tiere einen deutlichen Anstieg verzeichneten, reagierten andere gar nicht oder die Titer fielen sogar ab. Deutlich sichtbar ist der Rückgang bei fast allen Maultieren von D'-2 nach D'1 und der folgende Wiederanstieg an D'3, welcher schon bei den anderen beiden Ig-Typen beobachtet wurde. Diese Bewegung wurde auch im Falle von anti-gD-Ig von den drei Maultieren, die nur 0,9% NaCl-Lösung, nicht aber EHV-1-Antigen erhielten gleichermaßen gezeigt.

Abb. 30

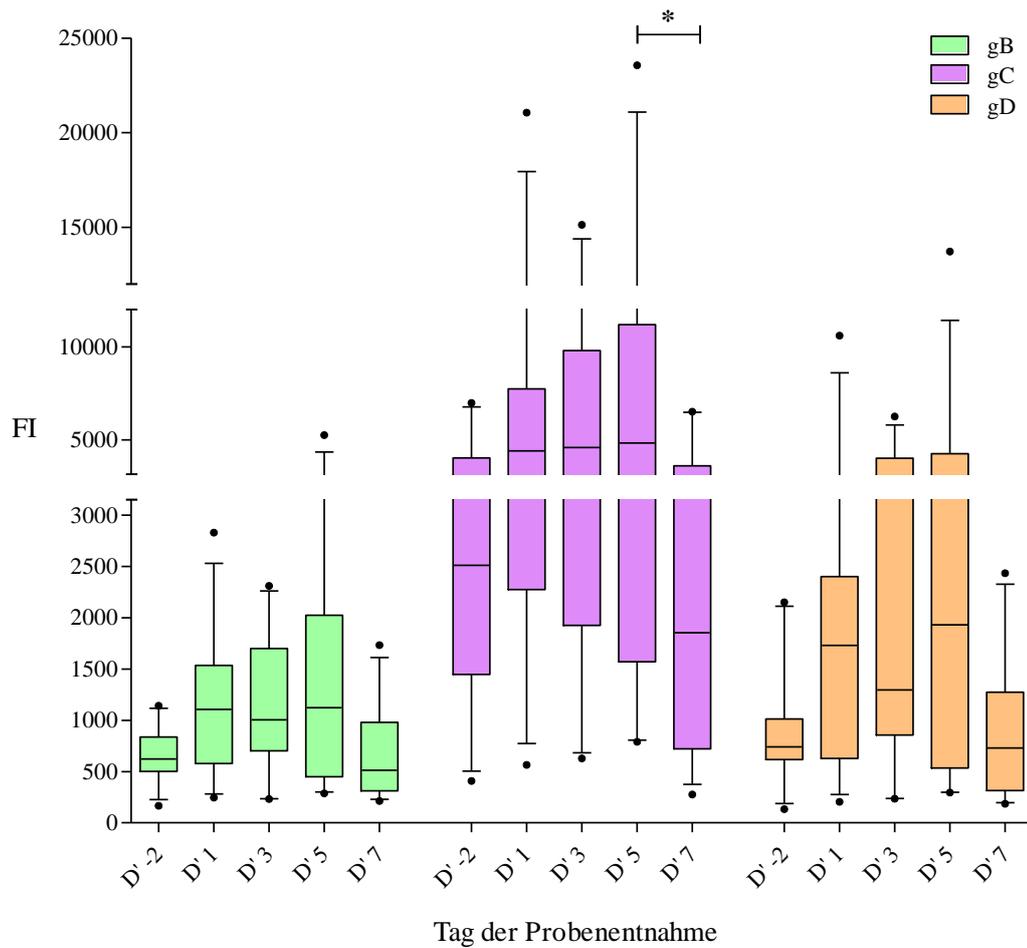
Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gD-Ig der Haflinger nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D-2 bis D+7 im Spaghetti-Diagramm; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): Entwicklung der mukosalen anti-gD-Ig-Konzentrationen (FI) der einzelnen Pferde von Ausgangspunkt D-2 bis D+7

Abb. 31

Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gD-Ig der Maultiere nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D-2 bis D+7 im Spaghetti-Diagramm; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (zwei Segmente): Entwicklung der mukosalen anti-gD-Ig-Konzentrationen (FI) der einzelnen Pferde von Ausgangspunkt D-2 bis D+7

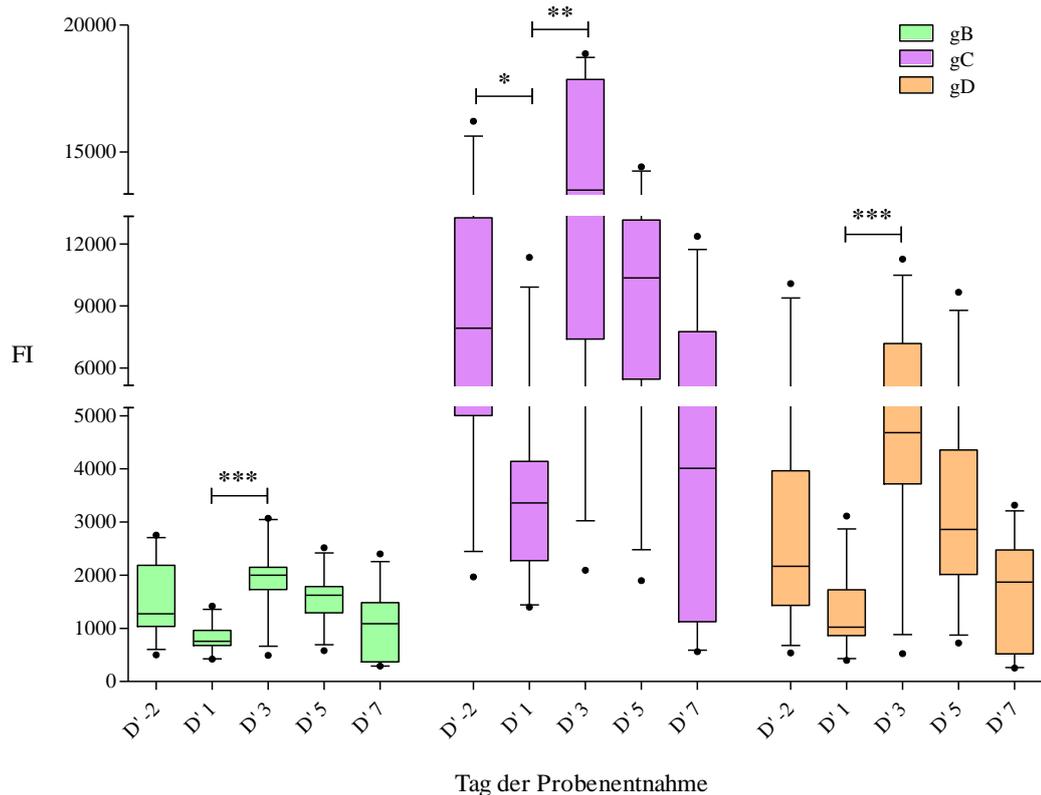
Die Entwicklung der drei Ig-Typen lief bei beiden Tierarten ähnlich ab. Die folgenden Abb. 32 und Abb. 33 zeigen die Veränderungen der drei Ig-Typen für jede Gruppe nebeneinander:

Abb. 32



Übersicht der Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gB (grün), -gC (violett), -gD (orange) Ig in Haflingern nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D⁻² bis D⁷ im Friedmann-Test und Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (drei Segmente): anti-gB, -gC, -gD Ig-Konzentrationen (FI); * $P < 0,05$

Abb. 33



Übersicht der Entwicklung mukosaler anti-EHV-1-gB (grün), -gC (violett), -gD (orange) Ig in Maultieren nach IN Applikation des MLV (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Deutschland) in Experiment 2 von D'-2 bis D'7 im Friedman-Test und Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (drei Segmente): anti-gB, -gC, -gD Ig-Konzentrationen (FI); * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

3.6. Mukosale Zytokine IFN- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 und IL-17

In der Pilotstudie zeigte hinsichtlich der gemessenen Zytokine lediglich IFN- γ einen Anstieg, wenngleich dieser nur in einigen Tieren deutlich war. Im Hauptversuch konnte dagegen keines der Zytokine IFN- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 oder IL-17 zwischen D'-2 und D'7 im Nasensekret weder der Haflinger noch der Maultiere gemessen werden.

V. DISKUSSION

Diese Studie ist wahrscheinlich die erste ihres Umfangs, welche Teile der Immunantwort auf sowohl die EHV-1/-4-Impfung *lege artis*, als auch auf die intranasale/-pharyngeale Antigenverabreichung von EHV-1 in Pferden und Maultieren untersuchte. Die Analyse wurde ermöglicht, da Tiere aus einem Bestand zur Verfügung standen und folglich beinahe gleichen Haltungs- und Trainingsbedingungen ausgesetzt waren.

Ziel war es in zwei zusammenhängenden Experimenten zunächst den immunologischen Effekt infolge der Impfung mit einem handelsüblichen, inaktivierten EHV-1 und -4 Vakzin anhand der VN-Titerentwicklung sowie konsekutiv Teilbereiche des Immunsystems von Maultier und Pferd nach IN Applikation von Antigen in der Form eines attenuierten EHV-1-Stammes zu untersuchen. Der Schwerpunkt lag dabei in der Beobachtung tierartlicher Unterschiede. Diese Studie ist darüber hinaus wohl eine der wenigen oder vielleicht die erste, in der eine kontrollierte Antigenverabreichung (auch Challenge genannt) in einem Zeitabstand von vier Monaten nach der letzten Impfung durchgeführt wurde.

Der große Vorteil bei den ausgewählten Tieren in beiden Experimenten waren die bereits genannten nahezu gleichen Haltungsbedingungen, insbesondere die seit mindestens einem Jahr regelmäßig und immer zum selben Zeitpunkt durchgeführte Impfung gegen EHV-1. Als limitierender Faktor der im Vorfeld zusammengestellten Herde kann die ungleichmäßige Verteilung des Alters (Pferde: 4-18 Jahre, Median: 11,5; Maultiere: 9-17 Jahre, Median: 14) in beiden Gruppen angeführt werden. Dass das Alter eines Pferdes definierte Abschnitte seiner Immunität beeinflusst, ist beschrieben (KATEPALLI, et al. 2008). Allerdings war der Altersunterschied im Median zwischen beiden Gruppen gering. Darüber hinaus waren 100% der Pferde Wallache während 50% der Maultiere Wallache und 50% Stuten waren, womit eine Inhomogenität der Geschlechter über beide Gruppen auftrat. Nach Kenntnis des Autors sind jedoch bisher weder in Impfstudien, noch in Infektionsexperimenten geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort gegen EHV-1 aufgetreten.

Die in Experiment 1 und 2 verwendeten Impfstoffe waren zum Zeitpunkt dieser Studie in Deutschland zugelassen und wurden regelmäßig in der Praxis eingesetzt.

Die Injektion des inaktivierten EHV-1/-4 Vakzin erfolgte nach Empfehlung des Herstellers (ZOETIS DEUTSCHLAND 2017) in den *Musculus pectoralis*. Dieser Impfstoff hat bei Pferdebesitzern den Ruf, unerwünschte Nebenwirkungen wie lokale Reaktionen in Form von Schwellungen der Injektionsstelle und Fieber zu verursachen. Folgende klinische Symptomatik trat im Zusammenhang mit der Impfung auf: Innerhalb von 48 Stunden nach der Administration wurden in beiden Gruppen lokale Reaktionen in Form von Schwellungen der Injektionsstelle sowie vereinzelt in beiden Tierarten Fieber beobachtet. Dass bei den Pferden im Gegensatz zu den Maultieren innerhalb der ersten 48 Stunden ein höherer klinischer Score notiert wurde, lässt sich auf die erhöhte Fieberinzidenz (n=4) bei ersteren im Vergleich zu letzteren (n=1) zurückführen. Der vor- und nach der Impfung notierte Nasenausfluss ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die klinische Untersuchung nicht immer in derselben Umgebung durchgeführt wurde. Unterschiedliche Umwelteinflüsse könnten die Häufigkeit des Auftretens beeinflusst haben (z. B. zeitlich eng mit der Erfassung der klinischen Daten im Zusammenhang stehende Heuaufnahme).

Überraschend war, dass bis zu fünf Tage nach der Impfung signifikant erhöhte SAA-Werte in sowohl Pferden als auch Maultieren gemessen wurden (Abb. 8). Dabei waren die Werte von Maultieren und Pferden ähnlich, korrelierten allerdings in beiden Tierarten nicht mit dem klinischen Score. SAA gilt als zuverlässiger Marker bei lokalen und systemischen Entzündungsprozessen in Pferden (HOOIJBERG, et al. 2014, PIHL, et al. 2016). Der in dieser Studie verwendete Impfstoff enthält das Adjuvans Carbopol, welches in der Veterinärmedizin vielfach eingesetzt wird. Grund dafür ist die bessere immunologische Antwort gegenüber Impfstoffen, die kein Carbopol enthalten oder durch andere Adjuvantien unterstützt werden (MUMFORD, et al. 1994, HOLMES, et al. 2006, MINKE, et al. 2006, GILDEA, et al. 2013, MAIR, et al. 2015). Im Zusammenhang mit der Verabreichung von EHV-1/4-Antigenen als Impfstoff, dem Carbopol beigemischt worden war, wurden bereits in der Vergangenheit lokale Schwellungen der Injektionsstelle beschrieben (HOLMES, et al. 2006). Andersen et al. 2012 detektierten darüber hinaus nach der Administration eines Carbopol-unterstützten Influenzavakzins sowohl eine lokale

Reaktion an der Injektionsstelle, als auch signifikant erhöhte SAA-Werte (ANDERSEN, et al. 2012). Der Verfasser analysierte deshalb, an die Methoden in dieser Studie angelehnt, Serumproben von n=6 Pferden vor und nach einer Impfung gegen Influenza mit einem Carbopol-unterstützten Vakzin. Ähnlich wie in dieser Studie nach EHV-1/4-Impfung und in der zuvor genannten von Andersen et al. 2012 entwickelte ein Pferd innerhalb von 48 Stunden Fieber und die SAA-Werte in 5/6 Probanden stiegen deutlich an, erreichten allerdings nicht die Werte, die nach der EHV-1/4-Impfung gemessen worden waren. Zur detaillierten Analyse der Rolle des Adjuvans fehlte in dieser Studie allerdings sowohl eine Kontrollgruppe, welcher das EHV-1/4-Antigen ohne Carbopol verabreicht wurde, als auch Evidenz, dass SAA, ähnlich wie in Pferden, in Maultieren ein zuverlässiger Indikator für Entzündungsprozesse ist. Es besteht gleichwohl die Möglichkeit, dass Carbopol neben den EHV-1 und -4 Antigenen zu sowohl den lokalen als auch den systemischen entzündlichen Reaktionen nach der EHV-1/4-Impfung in Pferden und Maultieren beigetragen hat.

Ähnlich Pferden, bilden Maultiere infolge einer Infektion mit EHV-1 VN, scheiden das Virus aus und leiden an klinischen Symptomen wie Erkrankung der oberen Atemwege, Glieder- und Unterbauchödemen, sowie EHM (ATASEVEN, et al. 2009, PUSTERLA, et al. 2012b, NEGUSSIE, et al. 2015). Gleichzeitig geben Untersuchungen von EHV-1-Ausbrüchen in Herden, bestehend aus Pferden und Maultieren Anhaltspunkte, dass sich Pathogenese, Viruskinetik und klinischer Verlauf in den Tierarten unterscheiden können (PUSTERLA, et al. 2012b). Während Immunologie und Impfprogramme in Pferden und Ponys in der Vergangenheit mehrfach untersucht wurden (HELDENS, et al. 2001, FOOTE, et al. 2002, PATEL, et al. 2003a, SOBOLL, et al. 2006, GOEHRING, et al. 2010c), gibt es nach Kenntnis des Verfassers keine Studie, die sich mit der Impfung gegen EHV-1 in Maultieren oder Eseln befasst.

VN-Titer werden regelmäßig als Indikator für die Effektivität von EHV-Impfstoffen gemessen (HOLMES, et al. 2006), da der Nachweis der Immunantwort regulatorischer-, zytotoxischer- und Gedächtnis-Immunzellen technisch anspruchsvoll und zeitaufwendig ist und folglich selten routinemäßig eingesetzt wird (KYDD, et al. 2006b). Einfach messbare VN-Titer sind allerdings nur ein partieller Parameter für die Effizienz eines Immunsystems. Hohe VN-Titer als Indikator für einen belastbaren immunologischen Schutz gegen klinische

EHV-1-Infektion werden daher kontrovers diskutiert (FOOTE, et al. 2002, MUMFORD, et al. 2003, KYDD, et al. 2006b, LUNN, et al. 2009, DAMIANI, et al. 2014). Heldens et al. konnten jedoch in einem Infektionsexperiment, dessen Probanden mit demselben Impfstoff geimpft worden waren, der in dieser Studie in Experiment 1 verwendet wurde, zeigen, dass p.i. hohe VN-Titer mit verminderter Virusausscheidung korrelierten (HELDENS, et al. 2001). Zwar waren die VN-Titer in Maultieren tendenziell höher als in Pferden, allerdings konnte in dieser Arbeit weder in Pferden noch in Maultieren ein signifikanter Anstieg der VN-Titer im VN-T nach der Impfung beobachtet werden. Dies ist vermutlich auf die hohe Variabilität innerhalb der Gruppen zurückzuführen. Während ein Großteil der Maultiere einen Anstieg der VN-Titer innerhalb der ersten sieben Tage verzeichnete, womit ein signifikanter Unterschied zu Pferden an D7 entstand, zeigten andere keine Veränderung. Bei einem Maultier konnte sogar ein Rückgang detektiert werden. In Pferden blieben die VN-Titer innerhalb der ersten sieben Tage überwiegend gleich und waren bei dem größeren Teil der Gruppe erst an D14 erhöht (Abb. 9-12). Auch dort wurde in zwei Probanden eine Verminderung der VN-Titer beobachtet. In Pferden wurde unter Einbezug der ersten Messung aus Experiment 2 zwischen D21 und D'-2 ein signifikanter Rückgang gemessen. Vergleicht man D-2 mit D'-2 ist zwar ebenfalls eine Abnahme im Median der VN-Titer zu beobachten, allerdings ist dieser nicht signifikant. Der Rückgang könnte also zum einen auf die hohe Variabilität der VN-Titer innerhalb der Pferdegruppe oder aber möglicherweise auf eine Fehlerabweichung in der Laboranalyse zurückzuführen sein. Aus organisatorischen Gründen wurden die VN-Titer der Tage D'-2, D'7, D'14 und D'21 in einem dreimonatigen Abstand zu denen gemessen, die in Experiment 1 genommen worden waren (D-2, D7, D14, D21). Eine Intertestvariabilität kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Da dies als Schwachpunkt in der Interpretation der VN-Titer über den gesamten Zeitraum beider Experimente gelten musste, führte der Autor an allen Serumproben zusätzlich den EHV-1-spezifischen gG-ELISA durch. Dabei wurden diesmal sämtliche Serumproben eines Tieres auf einer Platte verarbeitet, um Fehlerabweichungen zu vermeiden. In Übereinstimmung mit dem VN-T wurde auch im gG-ELISA kein signifikanter Anstieg der VN-Titer in beiden Gruppen über den gesamten Zeitraum der Probenentnahme beobachtet. Der Test war allerdings schwer zu interpretieren, da die Werte sich in einem niedrigen Messbereich befanden. Das Ausbleiben einer

Serokonversion in einigen Pferden nach wiederholter Impfung gegen EHV-1, wie es in dieser Studie beobachtet wurde, ist in der Vergangenheit bereits mehrfach beschrieben worden (HELDENS, et al. 2001, FOOTE, et al. 2002, MUMFORD, et al. 2003, HOLMES, et al. 2006). Es ist auch bekannt, dass dies unabhängig von der Konzentration bereits vorhandener VN-Titer bei adulten Pferden vorkommen kann (MUMFORD, et al. 2003, WAGNER, et al. 2015). Es bleibt zu klären, ob die hohe Variabilität der VN-Titer innerhalb beider Gruppen nach der Impfung charakteristisch für das EHV-1/-4-Vakzin ist, oder, ob ähnliches im Zusammenhang mit anderen Impfungen beobachtet werden kann. Interessanterweise waren im VN-T die VN-Titer in Maultieren an D7 signifikant gegenüber denen in Pferden erhöht. An den übrigen Tagen waren zwar ebenfalls höhere Titer in Maultieren zu beobachten, allerdings war der Unterschied zwischen den Tierarten nicht signifikant (Abb. 10). Während die Seroprävalenz von EHV-1 in Pferde- und Maultierpopulationen in den letzten Jahren häufiger untersucht wurde (ATASEVEN, et al. 2009, NEGUSSIE, et al. 2015, YILDIRIM, et al. 2015), gibt es nach Wissen des Verfassers bisher keine Studie, deren Gegenstand der direkte Vergleich der VN-Titer-Entwicklung nach EHV-1-Infektion oder einer Impfung zwischen adulten Pferden und Maultieren war. Pusterla et al. 2012 führte an, dass möglicherweise die unterschiedliche Genetik der beiden Tierarten der Grund für die Differenz des Verlaufes einer EHV-1-Infektion in dem jeweiligen Organismus sein könnte (PUSTERLA, et al. 2012b). Bei dem Maultier sind eine verbesserte Tragleistung und Trittsicherheit sowie eine höhere kognitive Fähigkeit gegenüber seinen Elterntieren beschrieben, die wahrscheinlich auf den Heterosis-Effekt zurückzuführen sind (PROOPS, et al. 2009, PIETTA und BARTMANN 2012). Die vermehrte VN-Bildung in Maultieren im Vergleich zu Pferden könnte möglicherweise ebenfalls durch den Heterosis-Effekt verursacht worden sein. Zur genaueren Untersuchung der Hypothese, dass die stärker ausgeprägte Leistungsfähigkeit in Maultieren gegenüber der in Pferden und Eseln auch immunologisch Ausdruck findet, bedarf es allerdings weiterer Studien.

Ziel der Verabreichung eines attenuierten EHV-1-Stammes im zweiten Experiment war es sowohl die Aspekte der angeborenen und spezifischen mukosalen als auch Teile der systemischen humoralen Immunantwort infolge EHV-1-Antigenpräsentation und Replikation in der Nasenschleimhaut in Pferden

und Maultieren zu untersuchen. Dazu wurde das MLV (Prevaccino1[®], Intervet/MSD, Deutschland), welches in Deutschland zur IM Verabreichung zugelassen ist, IN appliziert. Die IN oder IM Applikation eines MLV während eines EHV-1-Ausbruches im Bestand wird immer wieder diskutiert, da die Methode bei anderen Säugetierarten für Herpesvirusinfektionen bereits beschrieben ist (PATEL 2005). Die IN Administration eines attenuierten EHV-1-Stranges in Pferden durch Patel et al. 2003 im kontrollierten Infektionsexperiment, führte bei einigen Tieren zu einer Virämie (PATEL, et al. 2003b). Da die Sicherheit einer Applikation des in dieser Studie verwendeten MLV auf die Nasenschleimhaut bisher nicht dokumentiert war, erteilte die Dienststelle, welcher der Versuch angezeigt worden war, die Auflage vor dem Hauptversuch eine Pilotstudie mit n=2 Pferden und n=2 Maultieren unter Quarantänebedingungen durchzuführen. In diesem Vorversuch war keines der Tiere klinisch auffällig und es wurden nur geringe Mengen EHV-1-Antigen innerhalb der ersten drei bis vier Tage ausgeschieden. Die Verabreichung des MLV auf die Mukosa des Nasopharynx führte also nicht zu klinischer Erkrankung und konnte als sicher gelten. Außerdem wurde ein Anstieg des Zytokins IFN- γ sowie der EHV-1-spezifischen anti-gC- und -gD-Ig beobachtet.

Im Hauptversuch wurde die Methode der Verabreichung gegenüber der in der Pilotstudie dann geringfügig verändert. Statt die gesamte Impfdosis über eine Nasenöffnung zu verabreichen, wurde sie mit steriler 0,9% NaCl-Lösung verdünnt und unmittelbar danach mit einer porigen Drainage in beide Nasenöffnungen gegeben, um eine verbesserte Verteilung des MLV zu gewährleisten.

In der Vergangenheit zeigten mukosale IgA und IgG virusneutralisierende Aktivität *in vitro* (BREATHNACH, et al. 2001). In den Studien wurde ein ähnliches MLV, wie das, welches in dieser Studie verwendet wurde, mit beinahe der gleichen Methodik appliziert und der hypothetisierte Schutz in einer folgenden experimentellen Infektion mit einem virulenten EHV-1-Strang getestet. Dabei konnte kein Anstieg mukosaler Antikörper beobachtet werden. Da aber die IM Impfung mit einem inaktivierten Impfstoff einen rapiden Anstieg mukosaler Antikörper nach EHV-1-Infektion zur Folge hatte, postulierten die Autoren, dass die Kombination der regulären Impfung mit einem inaktivierten Impfstoff und die anschließende Applikation eines MLV auch ohne Infektion zu einem Anstieg

mukosaler Antikörper führen könnte (BREATHNACH, et al. 2001). Diese Hypothese konnte in diesem Experiment weder in Pferden noch in Maultieren bestätigt werden. In keiner Gruppenanalyse zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mukosalen Ig innerhalb der ersten sieben Tage nach der Administration des MLV. Allerdings wurde wie schon bei der Entwicklung der VN-Titer in Experiment 1 eine große Variabilität innerhalb der Gruppen beobachtet. Hierbei wurden sowohl bei Maultieren als auch bei Pferden vereinzelt hohe Ig-Konzentrationen an D'-2 gemessen, die nach MLV Applikation nicht weiter anstiegen. Gleichzeitig reagierten andere Tiere mit niedrigeren Anfangswerten allerdings mit ein deutlichen Zunahme. Auch eine akute Zytokinproduktion (IFN- γ) wie sie in der Pilotstudie detektiert worden war, konnte weder bei Maultieren noch bei Pferden beobachtet werden. Dennoch zeigten sich infolge der Applikation bemerkenswerte Veränderungen und tierartige Unterschiede: Alle drei spezifischen Immunglobuline gegen die viralen Glykoproteine gB, gC und gD waren bereits vor der Applikation des MLV in Maultieren signifikant höher als in Pferden. Ein interessantes Ergebnis ist weiter, dass in Maultieren ein deutlicher Abfall der Ig einen Tag nach der MLV-Administration (D'1) gegenüber den Konzentrationen davor (D'-2) beobachtet werden konnte (Abb. 33). Dieser war mit Blick auf die gC-spezifischen Ig sogar signifikant. Innerhalb der folgenden zwei Tage erfolgte in Maultieren ein signifikanter Anstieg aller Ig. Der Grund für diese Entwicklung ist unklar. Möglich ist, dass die halbjährliche Routineimpfung mit dem inaktivierten Vakzin in Maultieren für eine effektivere Produktion mukosaler Antikörper sorgte als in Pferden. Weiter ist ebenfalls denkbar, dass die mukosalen Ig der Maultiere schneller eine Bindung mit EHV-1-Antigen eingehen, als die der Pferde. So könnte es zunächst zu einer Bindung großer Mengen Ig mit dem applizierten, attenuierten EHV-1 gekommen sein und damit zu einem Verbrauch der vorhandenen Antikörper innerhalb von 24 Stunden nach der Applikation des MLV. Anschließend erfolgte dann möglicherweise eine durch die Präsenz und etwaige Replikation des EHV-1-Antigen initiierte Bildung neuer mukosaler Ig, welche dann zwei Tage später messbar war. Vorstellbar ist auch, dass es in Maultieren zu einer Art „Schockstarre“ kommt, welche die Ig-Produktion vorübergehend unterdrückt. In Pferden könnte dagegen sowohl die Ig-EHV-1-Bindung als auch die Produktion neuer mukosaler Ig ausgewogener verlaufen. Gegen eine effektive mukosale Neutralisierung von EHV-1 in Maultieren sprechen die Ergebnisse von Pusterla et al. 2012. Die Autoren

postulierten, dass EHV-1 sich in der Mukosa von Maultieren möglicherweise besser vermehren kann als in der von Pferden, beziehungsweise die mukosale Abwehr in Maultieren weniger effektiv ist (PUSTERLA, et al. 2012b).

Die Ausscheidung des Antigens betreffend, führte die gegenüber der Pilotstudie im Hauptversuch angewendete Methode der MLV-Applikation zu keiner nennenswerten Veränderung. EHV-1-Antigen wurde über sieben Tage nach der Administration des MLV über das Nasensekret ausgeschieden. Dabei wurde einen Tag nach der Verabreichung die größte Menge, allerdings kein signifikanter tierartlicher Unterschied in den Proben gemessen. An D'3, D'5 und D'7 wurde in beiden Gruppen nur noch vereinzelt gB-DNA in den Nasentupfern detektiert. Da die Periode der Ausscheidung in beiden Gruppen ebenfalls von kurzer Dauer war (beide Median: 1 d), ist also anzunehmen, dass nur eine sehr geringe Vermehrung des attenuierten Virus in der Mukosa beider Tierarten stattfand. In einigen Probanden blieb sie möglicherweise sogar aus. Denkbar ist folglich, dass die hohen gB-Konzentrationen an D'1 neben einer Vermehrung des Virus in einigen Tieren möglicherweise auch auf Reste des applizierten EHV-1-Antigen zurückzuführen sind, wie dies bereits für ein Infektionsexperiment in der Vergangenheit beschrieben wurde (HELDENS, et al. 2001). Das Ausbleiben klinischer Symptome lässt darüber hinaus vermuten, dass die Replikation des attenuierten EHV-1 ausschließlich auf mukosaler Ebene im Nasopharynx stattfand. Wie schon in der Pilotstudie wurde in der Hauptstudie lediglich geringgradiger, seröser Nasenausfluss in den Tieren beobachtet. Zwar kam dieser in Pferden an D'3 signifikant häufiger vor, allerdings zeigten, wie schon in Experiment 1, einige Tiere bereits an D'-2 geringgradigen, serösen Nasenausfluss. Auch kann wie in Experiment 1 vorausgesetzt werden, dass die unterschiedlichen Orte, an denen die Messungen durchgeführt wurden, einen Einfluss auf das klinische Bild hatten.

Überraschenderweise waren ein Pferd und ein Maultier zwei Tage vor der Administration des MLV in der qPCR EHV-1 positiv. Um zu überprüfen, ob die Probe während der Verarbeitung im Labor mit Impfvirus kontaminiert worden war, wurde eine Stranganalyse durchgeführt. Diese ergab jedoch, dass es sich um einen EHV-1-Wildtyp handelte, der eindeutig vom MLV abgegrenzt werden konnte. Dies war möglich, da Rac-H die Löschung eines Großteils des ORF1 und des kompletten ORF 2 besitzt, womit bei der Vorlage eines EHV-1-Wildtyps in

der PCR Rac-H sehr viel weniger Basenpaare aufweisen würde als der nach der Vorlage gesuchte Wild-Typ (AKHMEDZHANOV, et al. 2017). Aufgrund dieses Ergebnisses entstand der Verdacht, dass ein nicht bestimmter natürlicher EHV-1-Strang vor Applikation des MLV unkontrolliert zirkulierte. Anschließend wurden in einem CFA, der kurzlebige IgM und IgG, die an Epitope des EHV-1 binden, detektiert (HARTLEY, et al. 2005, BALASURIYA, et al. 2015), die D'-2 Serumproben aller Tiere untersucht. Alle Probanden, mit Ausnahme eines Pferdes, zeigten erhöhte Titer komplementbindender EHV-1-spezifischer Antikörper. Darüber hinaus waren ebenfalls in allen Tieren bis auf ein Pferd die EHV-4-CF-Titer erhöht. Der CFA hat den Nachteil, dass er nicht zuverlässig zwischen EHV-1 und EHV-4 differenzieren kann (HARTLEY, et al. 2005). Deshalb wurden sämtliche an D'-2 generierten Nasentupfer in der qPCR auch auf EHV-4 gB untersucht. In drei Pferden wurde dabei EHV-4-DNA detektiert. Die Ergebnisse des CFA und der qPCR an D'-2 zeigten, dass zwar in einem nicht exakt bestimmbareren Zeitraum, aber unmittelbar vor der Verabreichung des MLV sowohl EHV-1 als auch EHV-4 in der Herde zirkulierten. Bereits in der Vergangenheit wurde gezeigt, dass EHV-4 unerwartet reaktiviert und über die Atemwege ausgeschieden werden kann. Gelegentlich geschieht dies zeitgleich mit EHV-1 (PUSTERLA, et al. 2011). Interessanterweise wurden bei keinem der 50 Tiere im Bestand Anzeichen einer klinischen Erkrankung beobachtet, obwohl die Herde täglich durch mehrere Personen observiert wurde, allerdings wurde nicht bei allen Tieren die Körpertemperatur im Vorfeld regelmäßig überwacht. Rückblickend hätte eine stärkere Ausdehnung des klinischen, serologischen und virologischen Monitoring der Herde im Vorfeld von D'-2 möglicherweise Aufschluss über Zeitpunkt und Indexfall der natürlichen Infektion geben können. Die Prävalenz latenter EHV-1-Infektion ist sowohl in Pferden als auch in Maultieren untersucht worden und betrug 15% bis 54% in Pferden je nach Analyseverfahren und geografischer Lokalität und 67% in Maultieren, wobei die Anzahl der untersuchten Maultiere in dem genannten Experiment sehr klein war (ALLEN, et al. 2008, PUSTERLA, et al. 2010). Im Falle von EHV-4 lag sie in der qPCR in den *Lymphonodi mandibulares*, Bronchiallymphknoten und Trigeminalganglien von Pferden höher (83%). Grund für die Zirkulation des EHV-1 und -4 könnten also auch in der Herde aus der Latenz hochgefahrene Viren gewesen sein. Stressoren wie Transport und Ankunft neuer Tiere in einer Gruppe sind als mögliche Ursachen für Ausbrüche von EHV-1- und -4

beschrieben (LUNN, et al. 2009, SCHULMAN, et al. 2015). Somit könnte einerseits die Rückkehr einiger Tiere von einem Manöver sechs Tage vor D'-2 Ursache für die nachweisbare Virusexkretion einzelner Tiere gewesen sein. Schulman et al. untersuchten den physiologischen Stress in einem Bestand, in welchem Herdenteile zu einer Auktion verlegt wurden. Interessanterweise zeigten Stuten, die im Bestand verblieben waren höheren physiologischen Stress als jene, die zu der Auktion führen (SCHULMAN, et al. 2014). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch die Verkleinerung einer Herde trotz gleichbleibender Umgebung vorübergehend mit Stress verbunden sein kann, der z. B. durch Rankämpfe verursacht wird. Es ist also andererseits vielleicht sogar wahrscheinlicher, dass die Zirkulation des EHV-1/-4 im Zeitraum der Abwesenheit der Tiere im Manöver ihren Ursprung nahm und zwar im Heimbestand. Die an D'-2 bereits hohen anti-EHV-1/-4 CFA-Titer, gemessen sechs Tage nach Reintegration der Rückkehrer in die Herde, lassen ebenfalls so einen früheren Ausbruch vermuten. Die Titer im CFA in den Rückkehrern waren ebenfalls hoch. Es ist also wiederum auch nicht auszuschließen, dass auch die Tiere im Manöver unabhängig von denen, die im Bestand verbliebenen waren, EHV-1 oder -4 oder beide im Zeitraum ihrer Abwesenheit aus der Latenz hochgefahren haben. Es gibt keine frühere Probe mit der die Werte von D'-2 verglichen werden und damit der Verlauf der Infektion näher analysiert werden könnte. Eine Schwäche des CFA ist eine fehlende standardisierte Methodik in den verschiedenen Laboren (HARTLEY, et al. 2005), allerdings wurde der CFA in dieser Studie in einem OIE-zertifizierten Labor durchgeführt. Es ist somit wahrscheinlich, dass ein Großteil der Herde sowohl EHV-1-Wildtyp, als auch EHV-4 ausgesetzt waren.

Infektionen der Atemwege sind Infektionen in einem offenen System und auch eine gut ausgeprägte Immunität kann einer hohen infektiösen Dosis nicht standhalten. Die Tatsache, dass die Zirkulation von EHV-1 und -4 Feldvirus sowie zusätzlich EHV-1 MLV klinisch unauffällig blieb, ist bemerkenswert. Dies könnte zum einen auf die geschlossene Impfdücke zurückzuführen sein, die bei den geringen Virusmengen vor (sub)klinischer Manifestierung schützte. Zum anderen ist denkbar, dass die Viren eine Stimulation vermieden, um die Abwehr zu umgehen und sich unbemerkt ausbreiten zu können.

Die Interpretation der in Experiment 2 erhaltenen Parameter ist durch die natürliche EHV-1/-4-Zirkulation notwendigerweise beeinflusst. Es fehlen nach

Kenntnis des Autors Angaben zu der Entwicklung von VN-Titern in adulten, regelmäßig geimpften Pferden und Maultieren infolge einer EHV-1-beziehungsweise EHV-4-Infektion. Das Ausbleiben der Serokonversion trotz Virusausscheidung im zweiten Teil der Studie in der gesamten Herde ist überraschend, bedenkt man, dass in einigen Tieren wahrscheinlich eine dreifache Stimulation durch EHV-1 Wild-Typ, MLV und EHV-4 stattgefunden hat. Möglicherweise hat die Infektionsdosis bzw. Virulenz aber in keinem Fall ausgereicht, um die weitere Bildung systemischer EHV-1-spezifischer Antikörper zu initiieren. Andererseits könnten die bereits aufgrund der Impfungen zirkulierenden Antikörper eine weitere Bildung unterdrückt haben, wie es in der Vergangenheit für Influenza postuliert wurde (MUMFORD, et al. 2003). Die EHV-4-spezifischen Antikörper waren im gG-ELISA zwar deutlich höher als die EHV-1-spezifischen, allerdings zeigten auch diese über den gesamten Zeitraum der Studie keine nennenswerten Veränderungen (Daten nicht ausgewiesen).

Die Erkenntnis, dass EHV-1/-4-Wild-Typ zirkulierte, warf auch ein neues Licht auf die Entwicklung der mukosalen Ig in Maultieren. Dass an D'-2 in Maultieren signifikant höhere Konzentrationen aller drei Ig-Typen gegenüber Pferden gemessen wurden, hängt möglicherweise damit zusammen, dass in den Hybriden bei natürlicher Infektion grundsätzlich schneller und ausgeprägter mukosale Antikörper ausgebildet werden als in Pferden. Oder aber Zeitpunkt der Exposition mit EHV-1/-4 bzw. der Infektionsdruck könnte in den unterschiedlichen Herdentteilen variiert haben, da Maultiere und Pferde in den Freiläufen nach Spezies getrennt gehalten wurden. Der starke Rückgang der Ig in Maultieren an D'1 wiederum, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Ig-Produktion aufgrund der Präsenz mehrerer Antigene auf der Mukosa innerhalb eines kurzen Zeitraumes vorübergehend aussetzte, bevor eine starke Produktion bis D'3 wieder Nachschub lieferte. Eine frühere Messung der mukosalen Ig als D'-2 existiert nicht. Der Anstieg der anti-gC/gD-Ig infolge der Applikation des MLV, der noch in der Pilotstudie gezeigt werden konnte, blieb aber im Hauptversuch möglicherweise auch deshalb aus, weil eine Stimulation durch die EHV-Wild-Typen zu dem Zeitpunkt bereits stattgefunden hatte. Folglich reichte das attenuierte EHV-1-Antigen unter Umständen nicht mehr aus, um eine weitere Ig-Bildung anzukurbeln, welche die Konzentrationen signifikant gegenüber denen erhöht hätte, die an D'-2 gemessen worden waren.

Die Bedeutung der angeborenen, zellulären und humoralen Immunität gegen EHV-1 und andere Erreger der equiden Atemwege, ist mehrfach beschrieben worden (KYDD, et al. 2006b, SOBOLL HUSSEY, et al. 2014). Die zelluläre EHV-1-spezifische Immunantwort ist CD8⁺ CTL-vermittelt (KYDD, et al. 2006b, PERKINS und WAGNER 2015). Diese Zellen produzieren IFN- γ , ein Zytokin, welches ein sensibler Indikator für die Aktivierung der antigenspezifischen CD8⁺-Zellen ist und darüber hinaus auf eine CD4⁺-vermittelte Immunantwort vom Typ I hinweisen kann (SOBOLL, et al. 2003, ABBAS, et al. 2015). IFN- γ wird auch von NK produziert und ist somit Bestandteil des angeborenen Immunsystems, allerdings gibt es für NK beim Pferd bisher keine belastbaren Ergebnisse (QUINTANA, et al. 2011). Darüber hinaus exprimiert das Epithel der Atemwegsmukosa eine Vielzahl weiterer Zytokine (QUINTANA, et al. 2011), von denen in dieser Studie außer IFN- γ nur IFN- α , IL-4, IL-10 und IL-17 gemessen wurden. Sie alle werden von Zellen des angeborenen und des spezifischen Immunsystems produziert (ABBAS, et al. 2015). IL-4 ist dabei auch ein Indikator für die CD4⁺-T-Helferzellen vom Subtyp 2, die sich in der Regel gegen Mikroorganismen in der Mukosa richten, und IL-17 weist auf T-Helferzellen vom Subtyp 17 hin (ABBAS, et al. 2015, IWASAKI und MEDZHITOV 2015). Letztere spielen in der Eliminierung von extrazellulären Bakterien und Fungi eine Rolle (IWASAKI und MEDZHITOV 2011). Die Werte der Zytokine in den Nasentupfern zwischen D'-2 und D'7 waren ausnahmslos niedriger als der Grenzwert. Dies ist im Konsens mit dem, was Soboll Hussey et al. 2014 bei dem Kontakt von EHV-1 mit Zellen des equinen Respirationstraktes zeigten und außer im Falle von IFN- γ darauf zurückzuführen, dass es sich um EHV-1-unspezifische Zytokine handelt (SOBOLL HUSSEY, et al. 2014). Im Gegensatz zu dem, was in der Pilotstudie beobachtet worden war, konnte in der Hauptstudie allerdings auch kein Anstieg von IFN- γ gemessen werden. Eine Möglichkeit ist, dass aufgrund des höheren Verdünnungsgrades des applizierten MLV in der Hauptstudie im Vergleich zu der Pilotstudie, keine Entzündungsreaktion induziert wurde. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Zirkulation der EHV-1 und -4 Wildtypen die IFN- γ -Sekretion beeinflusst hat. Während in experimentell exponierten Pferden die Infektion mit EHV-1 zu einem Anstieg der IFN- γ -Sekretion in PBMC führte (PAILLOT, et al. 2005, PAILLOT, et al. 2006), zeigten Soboll Hussey et al. in einem Modell mit Epithelzellen des equinen Respirationstraktes, dass die Exposition mit EHV-1 zu einer

Verminderung von IFN- γ führte und postulierten die Möglichkeit der Evasion des Virus gegenüber der zellulären Immunabwehr in der Mukosa des Wirtes (SOBOLL HUSSEY, et al. 2014). Im Falle einer Zirkulation von EHV-1-Wildtyp in der gesamten Herde könnte dies auch in dieser Studie der Grund für das Ausbleiben eines Anstiegs des IFN- γ gewesen sein.

Experiment 1 und 2 sind als ein zusammenhängender Versuch zu betrachten, da mit der IN Applikation auch die durch regelmäßige Impfung induzierte Immunität in beiden Tierarten analysiert werden sollte. Die unkontrollierte Zirkulation vor D'-2 von EHV-1- und EHV-4-Wildtyp, ließ klare Schlüsse nur für den ersten Teil zu. Die Notwendigkeit der Berücksichtigung dieser Tatsache in Experiment 2 ist unglücklich. Die Durchführung der Studie in einem Bestand mit aktiven Arbeitstieren und hohem Personalvorkommen, hatte zur Folge, dass wie bereits teilweise beschrieben, die Versuchsleitung hinsichtlich Homogenität, Geschlossenheit und epidemiologischer Sicherheit in der Herde, Einschränkungen einkalkulieren musste. Dies repräsentiert durchaus die Situation im Felde, ist aber mit Blick auf eine zielgerichtete Untersuchung der Immunität gegen EHV-1 riskant. EHV-1 und -4 zirkulieren aufgrund ihrer bereits beschriebenen Eigenschaften wahrscheinlich häufig unbemerkt in Equidenbeständen und sind nicht zuletzt deswegen in den Pferdepopulationen weit verbreitet (LUNN, et al. 2009). Infolgedessen haben auch die Tiere in dieser Studie eine nicht einheitliche, unbekannte Infektionshistorie. Weiter können beide EHV-Typen zwar ganzjährig auftreten, allerdings sind klinische Verläufe der Infektion, insbesondere neurologische Komplikationen bei natürlichen Ausbrüchen hauptsächlich im Herbst, Winter und Frühjahr beschrieben (GOEHRING, et al. 2006, PUSTERLA, et al. 2011), also auch in dem Zeitraum, in dem Experiment 2 durchgeführt wurde. Es musste folglich im gesamten Versuchszeitraum und insbesondere zeitnah um und während Experiment 2 mit einem epidemiologischen Vorfall gerechnet werden. Der Umfang, in dem Eingriffe an den Tieren vorgenommen werden konnten, war durch die Anzeige des Tierversuches im Vorfeld vorgegeben, was bei einer plötzlichen Lageänderung essentielle zusätzliche Probennahmen verbot. Die intensive Betreuung der Herde durch den Stalldienst stellte eine Adspektion der Tiere mehrmals pro Tag sicher, allerdings konnte aufgrund des Dienstplanes keine regelmäßige klinische Untersuchung der Tiere außerhalb des vorher angemeldeten Versuchsablaufs durchgeführt werden.

Dessen ungeachtet können in dieser Studie interessante Schlussfolgerungen gezogen werden: So fällt bei regelmäßiger Impfung gegen EHV-1 ein Teil der humoralen Immunantwort in Maultieren scheinbar stärker aus als in Pferden, der Heterosis-Effekt wäre dafür eine mögliche Erklärung. Darüber hinaus legte die hohe Variabilität der VN-Titer innerhalb beider Gruppen auch nahe, dass bei mehreren Tieren einer Tierart das Immunsystem auf eine EHV-1/4-Impfung sehr individuell reagiert. Allerdings lässt sich von der in dieser Studie verwendeten Pferdegruppe nicht unbedingt auf die Tierart Pferd grundsätzlich schließen, da es sich hier ausschließlich um Haflinger handelte, eine Rasse mit enger, genetischer Basis. Weiter führte die Zirkulation eines EHV-1- und EHV-4-Wildtyps in einer Herde regelmäßig geimpfter Maultiere und Pferde nicht zu klinischer Erkrankung. Auch aus der Vergangenheit sind in diesem Bestand keine Erkrankungen infolge einer EHV-1- oder EHV-4-Infektion bekannt. Dies bestärkt den Grundsatz, dass die regelmäßige und gleichzeitige Impfung der gesamten Herde einen Schutz vor EHV-1- bzw. EHV-4-Erkrankungen liefern kann, falls die infektiöse Dosis den Schwellenwert bei den einzelnen Tieren nicht überschreitet. Die Impfung selbst führt dabei zu einer lokalen und systemischen Entzündungsreaktion, die drei bis fünf Tage anhalten kann. Demzufolge sollte die in der Praxis regelmäßig veranschlagte Belastungspause der Tiere von „nur“ zwei Tagen nach der Impfung überdacht und die Möglichkeit einer Ausweitung in Erwägung gezogen werden. Jedenfalls sollten Pferdebesitzer nach der EHV-1/4 Impfung die Dauer der Ruhephase von der Entwicklung der Körpertemperatur und der Beschaffenheit der Injektionsstelle abhängig machen.

Ein Booster-Effekt der angeborenen und spezifischen mukosalen Immunantwort infolge der IN Applikation eines MLV EHV-1 in regelmäßig gegen EHV-1/4 geimpften Pferden und Maultieren war individuell und kurzlebig. In Maultieren war die spezifische Immunantwort in dieser Studie zunächst sogar geschwächt, weshalb diese Methode im Falle eines EHV-1-Ausbruches sogar kontraindiziert sein kann. Deshalb sollten weitere Untersuchungen der angeborenen und spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort in Pferden und Maultieren in einem hygienisch geschlossenen Bestand mit Probanden untersucht werden, deren EHV-1-Infektions-Historie bekannt ist. Darüber hinaus ist weiter zu analysieren weshalb infolge einer Impfung gegen EHV-1/4 Maultiere höhere VN-Titer ausbilden als Pferde. Forschungsgegenstand in EHV-1-Studien sollte

zukünftig weiterhin die Effektivität eines individuellen Impfprogramms gegen EHV-1/4 in Pferden verschiedener Rassen, Maultieren und Eseln sein. Außerdem sollte in einem Infektionsexperiment die Wirksamkeit der Administration zugelassener Impfstoffe in Maultieren und Eseln untersucht werden.

10 Millionen Maultiere koexistieren neben 60 Millionen Pferden und 43 Millionen Eseln weltweit (FAO 2014). Schätzungsweise sind Arbeitstiere für 50% der Menschheit der Hauptenergielieferant und dreiviertel der Zugkraft in Entwicklungsländern wird durch Arbeitstiere geliefert, ein großer Teil davon Equiden (MA 2006). Wie im Falle des Bestandes indem die Proben für diese Studie genommen wurden werden Maultiere häufig mit Pferden zusammengehalten. Panzootisch, verursacht EHV-1 unter anderem Erkrankungen der oberen Atemwege, Aborte und zentralnervöse Erkrankungen in Equiden; Island bleibt als bis dato garantiert EHV-1-freies Land eine Ausnahme (OIE 2013). Weltweit, insbesondere in Entwicklungsländern, können Maultiere und Esel folglich ein epidemiologischer Faktor in gemischten Equidenpopulationen sein. Zur globalen Bekämpfung von EHV-1, sowie anderen Infektionskrankheiten ist eine umfassende Kenntnis der Immunsysteme aller Equiden von nicht geringer Bedeutung. Dies sollte in wissenschaftlichen Arbeiten zukünftig weiterhin berücksichtigt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Im Zusammenhang mit EHV-1-Infektionen sind in Maultieren Erkrankungen der oberen Atemwege und des zentralen Nervensystems und in Pferden darüber hinaus Aborte im letzten Drittel der Trächtigkeit beschrieben. Kommerzielle Impfstoffe sind erhältlich und eine regelmäßige Herdenimmunisierung führt nach allgemeiner Einschätzung mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Verminderung klinischer Erkrankungen, Ausmaß der Virämie und Virusausscheidung in Pferden.

Kernziel dieser Studie war es Teile der angeborenen und spezifischen lokalen und systemischen Immunantwort in regelmäßig geimpften Maultieren und Pferden nach der intranasalen (IN) Applikation eines attenuierten EHV-1-Antigen (Rac-H), erhältlich als modifiziertes Lebendvakzin (MLV), vergleichend zu beurteilen. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit eines Einsatzes des MLV als „Boosterimmunisierung“ untersucht werden.

Der Versuchsaufbau umfasste ein Pilotprojekt (IN Applikation von Rac-H in Form eines kommerziellen EHV-1-MLV) und einen Hauptversuch, aufgeteilt in zwei aufeinanderfolgende Teilerperimente: Erstens die Untersuchung der VN-Titerentwicklung nach intramuskulärer (IM) Impfung mit einem kommerziellen, inaktivierten EHV-1/-4-Vakzin in 12 Maultieren und 12 Pferden. Zweitens die Beurteilung der VN-Titerentwicklung und ausgewählter Teile der (un)spezifischen, mukosalen Immunität infolge der IN Applikation von Rac-H in Form eines kommerziellen EHV-1-MLV in 12 Maultieren und 12 Pferden.

Im Pilotversuch wurde das MLV zwei Haflinger-Pferden und zwei Maultieren unter Quarantäne IN verabreicht. Ziel dabei war die Replikationskinetik desselben in den Nasengängen sowie das mögliche Auftreten klinischer Symptome und darüber hinaus die mukosale, spezifische Immunglobulin (Ig)- und Zytokinsekretion zu untersuchen. Die Applikation führte in keinem der Tiere zu klinischer Erkrankung. Gleichzeitig schieden 3/4 Tieren am folgenden Tag EHV-1 über die nasale Mukosa aus und es konnte ein Anstieg der virus-spezifischen, mukosalen anti-gC- und anti-gD-Ig, sowie des IFN- γ innerhalb der ersten sieben Tage in allen 4 Probanden notiert werden.

Sofern nichts anderes angegeben ist, werden die weiteren Ergebnisse folgendermaßen dargestellt: Median [Interquartilsabstand]. Die VN-Titer wurden

zur einfacheren Darstellung Log_2^{-1} -transformiert.

Im ersten Experiment des Hauptversuches konnte bis 21 Tage nach der IM Impfung gegen EHV-1 und -4 in keiner der Gruppen eine signifikante Veränderung der VN-Titer gegenüber dem prä-Impfiter (D-2) beobachtet werden. An den Tagen D-2, D14 und D21 bestand kein signifikanter Unterschied der VN-Titer zwischen Pferden und Maultieren. Einzig am D7 waren die VN im VN-T in Maultieren (9 [8; 9]) signifikant ($P < 0,05$) gegenüber denen in Haflingern (8 [6; 8]) erhöht. Zwischen D0 und D3 wurde in 4/12 Haflingern und 2/12 Maultieren Fieber detektiert und in 9/12 Haflingern sowie 7/12 Maultieren eine Schwellung der Injektionsstelle beobachtet. Weiter wurden an D3 ($P < 0,001$) und D5 ($P < 0,01$) signifikant erhöhte Werte des Akute Phase Proteins SAA im Vergleich zu D-2 in beiden Gruppen gemessen.

Im zweiten Experiment, 4 Monate nach der IM Impfung gegen EHV-1/-4, fanden dieselben Tiere wie in Experiment 1 Verwendung. Zusätzlich waren 3 Kontrolltiere eingesetzt, denen lediglich Kochsalz plus Solvent ohne Antigen IN verabreicht wurde. Die größten Mengen EHV-1-DNA wurden an D'1 von 7/12 Haflingern ($2,4 \times 10^4$ [$7,8 \times 10^3$; $7,3 \times 10^4$] Moleküle/mL) und 7/15 Maultieren ($1,1 \times 10^4$ [$4,6 \times 10^3$; $3,7 \times 10^4$] Moleküle/mL) ausgeschieden. Die Dauer der Ausscheidung betrug in Pferden ≤ 5 d und in Maultieren ≤ 7 d. Auch diesmal konnte keine Veränderung der VN-Titer im Zeitraum von 21 Tagen nach der Applikation, weder in Haflingern noch in Maultieren detektiert werden. Allerdings waren die VN in Maultieren an D'-2 ($P < 0,01$) und D'14 ($P < 0,05$) gegenüber denen in Pferden signifikant erhöht. In Experiment 2 wurden keine Veränderungen der mukosalen Zytokine detektiert. Zusätzlich zu den in der Pilotstudie gemessenen mukosalen spezifischen anti-gC, -gD Ig, waren in diesem Experiment außerdem die Werte des anti-gB Ig verfügbar. Die drei gemessenen Ig fielen zwischen D'-2 und D'1 in Maultieren ab (anti-gC: $P < 0,05$; anti-gB, -gD: ns). Darauf folgte ein signifikanter Anstieg bis D'3 (anti-gB, -gD: $P < 0,001$; anti-gC: $P < 0,01$). Ähnliches konnte in Pferden nicht beobachtet werden lediglich ein signifikanter Rückgang der anti-gC ($P < 0,05$) von D'5 nach D'7 wurde detektiert. Der tierartige Unterschied war bei allen drei Ig-Typen an D'-2 (anti-gB, -gC: $P < 0,001$; anti-gD: $P < 0,01$) und D'3 (anti-gB: $P < 0,001$; anti-gC: $P < 0,01$, anti-gD: $P < 0,05$) signifikant.

Überraschend wurden an D'-2 zwei Tiere in der PCR EHV-1-positiv getestet.

Mittels einer ORF 1/2 Stranganalyse wurde ausgeschlossen, dass es sich um eine Kontamination der Probe mit MLV-Impfvirus handelte. Darüber hinaus testete eine EHV-4-gB-PCR am selben Tag 3 Pferde EHV-4-positiv. Außerdem waren in beiden Gruppen die EHV-1/-4-spezifischen CF deutlich erhöht. Diese Befunde demonstrierten, dass unmittelbar vor und wahrscheinlich auch während Experiment 2 EHV-1- und EHV-4-Feldvirus im Bestand zirkulierten.

Die Studie zeigte, dass die Impfung mit kommerziellem EHV-1/4-Impfstoff in Maultieren zu einem (kurzfristig) deutlicheren Titeranstieg der VN, im Vergleich zu Pferden führte. Darüber hinaus wurde nach der Impfung sowohl eine lokale als auch eine systemische Entzündungsreaktion in beiden Tierarten beobachtet, die bis zu sieben Tage anhielt. Die IN Verabreichung eines MLV führte zu einer schwachen Replikation im nasopharyngealen Epithel, verlief klinisch symptomlos und provozierte nur im Vorversuch eine lokale Immunantwort. Im Hauptversuch konnte dagegen kein Anstieg der mukosalen Antikörper- und Zytokinkonzentrationen im Vergleich zu D⁺-2 gemessen werden, der statistisch signifikant war, wenngleich Einzeltiere innerhalb der Gruppen sehr unterschiedlich reagierten. Ebenso blieben die VN-Titer unverändert. Gleichzeitig können für Experiment 2 keine endgültigen Schlüsse gezogen werden, da die Zirkulation von EHV-1 und -4 Feldvirus im Vorfeld die Immunantwort wahrscheinlich beeinflusst hat. Infektionen der Atemwege sind Infektionen in einem offenen System und auch eine gut ausgeprägte Immunität kann einer hohen infektiösen Dosis nicht standhalten. Darüber hinaus wird das klinische Bild einer EHV-1-Infektion auch durch den Strang-Typ beeinflusst. Interessant ist allerdings, dass die gleichzeitige Zirkulation von EHV-1 und -4 in einem Bestand von 50 regelmäßig geimpften Pferden und Maultieren nur zu geringer Ausscheidung von Virus führte und ohne klinische Symptomatik verlief. Dies ist zumindest für EHV-4 nicht ungewöhnlich, könnte möglicherweise aber auch auf die geschlossene Impfdecke zurückzuführen sein.

In dieser Arbeit konnten nur einzelne Parameter der Immunantwort nach EHV-1/-4-Impfung und intranasaler Applikation eines attenuierten EHV-1-Stammes in Maultieren und Pferden abgebildet werden. In zukünftigen Studien sollte die Wirksamkeit regelmäßiger Impfungen sowie die angeborene und spezifische Immunantwort in Maultieren und Pferden bei Infektionen mit EHV-1 weiter und umfangreicher untersucht werden.

Abschließend ist festzustellen, dass ein Anstieg der VN-Titer unmittelbar nach EHV-1/4-Impfung in Maultieren deutlicher ist als in Pferden, wenngleich das Ausmaß der VN-Produktion in Einzeltieren unberechenbar bleibt. Inwiefern dies für die EHV-1/4 Impfung charakteristisch ist, muss in weiteren Studien untersucht werden. Hinsichtlich der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion nach EHV-1/4 Impfung sollte die häufig von Pferdebesitzern veranschlagte zweitägige Pause möglicherweise verlängert werden. Intranasale Administration von attenuiertem EHV-1 resultierte in deutlicher, kurzlebiger, lokaler Ig-Produktion in einigen Tieren. Schlussfolgerungen hinsichtlich der möglichen Anwendung eines MLV IN während einer EHV-1 Infektion, konnten allerdings nicht gezogen werden, da im Zeitraum der Untersuchungen EHV-1 und -4 Feldvirus zirkulierte.

VII. SUMMARY

Immune Response of Regularly Vaccinated Horses and Mules Following Intranasal Administration of Attenuated Equid Herpesvirus-1 (EHV-1)

EHV-1 causes upper respiratory tract disease and neurological dysfunctions in equids as well as late term abortion in horses worldwide. Commercial vaccines are available and regular herd immunisation is propagated to reduce severity of clinical disease, lowering nasal viral shedding and reducing magnitude and length of viremia. Individual protection from infection has been difficult at best to be achieved so far.

Aims of this study were to analyse and compare defined components of the innate and antigen-specific local and systemic immune response in repeatedly vaccinated horses and mules according to manufacturer's instructions. In the following to evaluate intranasal (IN) application of EHV-1-Antigen, in the form of an attenuated modified live virus vaccine (MLV) strain Rac-H. The latter was done to investigate a possible role as booster immunisation during an active EHV-1 outbreak.

Experimental set-up included a pilot study and a main study, which consisted of 2 consecutive experiments using the same animals. A total of 31 adult animals were included in the study (14 horses, 14 mules plus 3 control mules). Animals were kept on the same premises, and exposed close to identical feeding, exercise and veterinary management.

In the pilot study live EHV-1 strain Rac-H, an in Germany available MLV-vaccine (Prevaccinol[®], Intervet/MSD, Germany) at a total dose of 1×10^7 TCID₅₀ was administered IN on p(pilot)D0 in 2 horse and 2 mule geldings. MLV replication kinetics in the nasopharyngeal mucosa and clinical signs were recorded for the next 7 days (pD1-pD7). In addition, swabs from nasal passages were collected and subsequently analysed for presence of EHV-1-specific (anti-gC, -gD) mucosal immunoglobulin (Ig) and various cytokines (Interferon (IFN)- α , IFN- γ , Interleukin (IL)-4, IL-10, IL-17). No clinical signs were observed during this period of the study. Two mules and 1 horse shed virus, last detected by qPCR on pD5. Ig concentrations increased in all 4 animals until pD7 (Anhang: Abb. A1, A2; Tabelle A1) with 1 horse and 1 mule showing a steeper and more profound

increase compared to the others, peaking on pD5. Of all measured cytokines, only IFN- γ was detected. Interestingly increase and decrease mirrored the Ig-concentrations of the same animals (Abb. 6; Anhang: Tabelle A2).

In the first experiment of the main study virus neutralising antibodies (VN) were measured in 12 horses and 12 mules pre- and post- intramuscular vaccination (IM) with a commercial inactivated EHV-1/EHV-4 vaccine (Equip[®] EHV-1, 4, Zoetis, Germany). VN-titres were measured on day -2 (D-2) and on days 7, 14 and 21 (D7, D14, D21). Titres were expressed as Log_2^{-1} in: Median [interquartile range]. Baseline VN-titres in horses (7 [6; 7]) showed greater variability compared to mules (7 [7; 7.8]). Titres increased more rapidly in mules when compared to horses, resulting in significantly ($P < 0,05$) higher titres in mules on D7 (horses: 8 [6; 8]; mules: 9 [8; 9]). However no significant titre increases were noticed by D21 within in either species compared to D-2. 4/12 horses and 2/12 mules developed a fever between D0 and D3. Additionally 9/12 horses and 7/12 mules showed injection site swelling between D0 and D7. Furthermore the acute phase protein Serum Amyloid A (SAA) concentrations, measured on D-2 until D7, were significantly elevated in both species on D3 ($P < 0.001$) and D5 ($P < 0.01$).

Four month after IM EHV-1/-4 vaccination on D'0 and similar to the pilot study, EHV-1 antigen, as an MLV-vaccine was administered IN to the 24 horses and mules that already participated in experiment 1. This part of the study was named experiment 2. Methods of administration of the MLV were slightly modified. An additional volume of (sterile) PBS, equal to the vaccine solvent volume was added and applied through a fenestrated Redon-drainage to achieve a better distribution of the antigen. Three controls (mules) were engaged receiving vaccine solvent plus 0,9% NaCl, but without antigen. Same clinical parameters were examined as in the pilot study from D'-2 to D'7. EHV-1-DNA concentrations were expressed in molecules/mL in: Median [interquartile range]. Highest EHV-1-DNA concentrations in nasal swabs were detected on D'1 in 7/12 horses ($2,4 \times 10^4$ [7,8 $\times 10^3$; $7,3 \times 10^4$] molecules/mL) and 7/15 mules ($1,1 \times 10^4$ [$4,6 \times 10^3$; $3,7 \times 10^4$] molecules/mL). Median duration of nasal shedding was ≤ 3 days in both species. In contrast to the pilot study, no cytokines were detected. Additionally to specific anti-gC and -gD Ig detection, anti-gB Ig was introduced in experiment 2. Already prior to antigen application (D'-2) there was a remarkable spread of data points among horses or mules. Only in mules all three Ig concentrations decreased

between D'-2 and D'1, regardless of its respective starting point, anti-gC significantly ($P<0,05$). This again was followed by an increase in concentration by D'3. This was significant for all 3 Ig (anti-gB, -gD: $P<0,001$; anti-gC: $P<0,01$). In horses, however, a significant change was detected between D'5 and D'7, when anti-gC decreased significantly ($P<0,05$). Inter species differences regarding Ig concentrations were significant on D'-2 (anti-gB, -gC: $P<0,001$; anti-gD: $P<0,01$) and D'3 (anti-gB: $P<0,001$; anti-gC: $P<0,01$, anti-gD: $P<0,05$) with higher concentrations detected in mules. Similar to experiment 1 VN titres were measured over a period of 21 days after MLV administration (D'-2, D'7, D'14, D'21). No significant increase or decrease was detected within either species. However, VN titres were generally higher in mules compared to horses. This difference was significant on D'-2 ($P<0,01$) and D'14 ($P<0,05$).

Surprisingly 2 animals (1 horse, 1 mule) were tested positive for EHV-1 in qPCR on D'-2 suggesting laboratory contamination of samples, or pre-experimental wild-type (wt) strain circulation. Strain analysis, however, provided proof for wt exposure. In addition, EHV-4 gB-PCR detected another 3 horses EHV-4 positive on the same day. EHV-1/-4 D'-2 complement fixing antibodies (CF) were increased in both species. These findings revealed EHV-1 and -4 wt strains were circulating prior and likely after antigen administration.

This study is probably the first one to investigate selected parameters of the immune response to EHV-1/-4 vaccination *lege artis* as well as the intranasal administration of EHV-1 antigen in horses and mules.

Advantage of the experimental setup was that selected animals were kept under virtually the same conditions. Notably frequent and simultaneous vaccination against EHV-1 and -4 was carried out in all participants in the past. The inactivated EHV-1/-4 vaccine applied in this study has a reputation among horse owners to cause injection site swelling and fever. In this study IM injection resulted in local reaction, fever (more often in horses compared to mules) and significant increases in SAA concentrations within 24 hours post vaccination and up to 7 days in some animals. The vaccine antigens are adjuvanted by Carbopol. This adjuvant in the past has been associated with the same clinical signs that were observed in this study and also with SAA elevation. Hence it is possible that Carbopol somehow contributed to the local and systemic inflammatory response.

VN titres are often used as indicator for vaccination efficacy. There was a significant inter species difference on D7 suggesting a faster and more distinct response to IM EHV-1/-4 antigen application in mules. However no significant VN titre increase compared to D-2 was observed for either group by D21 post vaccination. Taking a closer look at individual horses and mules a high variability was observed in each species. While some animals showed immediate VN titre elevation some remained at D-2 levels or VN titres even decreased. Whether this is unique for EHV-1/-4 vaccination has yet to be investigated.

With regards to the pilot study an increase of mucosal Ig and cytokines was expected in main experiment 2 subsequently to IN MLV administration. However no significant increase of neither anti-gB, -gC or -gD Ig was detected in either species. Surprisingly Ig concentrations in mules decreased within 24 hours post D'0 and subsequently were elevated until D'3. The reason for this is unclear. More effective binding of mules' Ig to EHV-1 antigen and a lack of quick replenishment is conceivable. Meanwhile horses' response proceeded more balanced. However this remains pure speculation as PCR and CF assay results on D'-2 indicated circulation of EHV-1 and -4 wt within the herd, before and during experiment 2. Surprisingly mucosal Ig concentrations in mules were widely scattered along the y-axis on D'-2. This could on one hand be related to intra species variability in baseline mucosal Ig concentrations. On the other hand EHV-1 and -4 wt exposure at various time points and to a different extent within the herd is possible. Although speculative, Ig production could have already been triggered in some animals, and was sent into a state of shock by further antigen exposure. Since circumstances which led to the uncontrolled circulation of the two EHV wt are unknown, final conclusions cannot be drawn for experiment 2. Interestingly no clinical signs were observed in the animals as well as other equids also housed on the premises. While generally speaking this is not unusual for EHV-4, however considering a triple challenge of EHV-1 wild type, MLV and EHV-4 within a short period of time this was somehow unexpected.

Similar to experiment 1 no increase of VN titres was observed after D'0 which suggests that neither wild type circulation nor IN MLV application was strong enough to induce further VN production.

In conclusion, immediate increases of VN titres after IM EHV-1/-4 vaccination appears to be more distinct in mules compared to horses, and production can be

rather unpredictable. With regards to local and systemic inflammatory response associated with EHV-1/-4 vaccination, resting periods of two days applied by most horse owners following vaccination might require prolongation. IN administration of attenuated EHV-1 induced distinct short-lived local Ig production in some mules and horses. However, final conclusions on a possible use of MLV IN in the 'face of an outbreak' cannot be drawn due to uncontrolled EHV-1/-4 wt co-circulation within the herd during this investigation.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. und PILLAI, S. (2015) Cellular and Molecular Immunology, 8; Elsevier Saunders

AKHMEDZHANOV, M., RYSBEK, N., OROZOV, J., MOSER, I., OSTERRIEDER, N. und DAMIANI, A. M. (2017) Late-Term Abortion, Stillbirth, and Neonatal Foal Death in Kyrgyzstan: First Isolation of Equine Herpesvirus Type 1 in the Country; Journal of Equine Veterinary Science 51 (46-53)

ALEMAN, M., PICKLES, K. J., SIMONEK, G. und MADIGAN, J. E. (2012) Latent equine herpesvirus-1 in trigeminal ganglia and equine idiopathic headshaking; J Vet Intern Med 26 (1), s. 192-194

ALLEN, G. P. (2007) Development of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1; J Vet Diagn Invest 19 (1), s. 69-72

ALLEN, G. P. (2008) Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses; Am J Vet Res 69 (12), s. 1595-1600

ALLEN, G. P., BOLIN, D. C., BRYANT, U., CARTER, C. N., GILES, R. C., HARRISON, L. R., HONG, C. B., JACKSON, C. B., POONACHA, K., WHARTON, R. und WILLIAMS, N. M. (2008) Prevalence of latent, neuropathogenic equine herpesvirus-1 in the Thoroughbred broodmare population of central Kentucky; Equine Vet J 40 (2), s. 105-110

ALLEN, G., YEARGAN, M., COSTA, L. R. und CROSS, R. (1995) Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses in horses infected with equine herpesvirus 1; J Virol 69 (1), s. 606-612

ANDERSEN, S. A., PETERSEN, H. H., ERSBOLL, A. K., FALK-RONNE, J. und JACOBSEN, S. (2012) Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses; *Vet J* 191 (2), s. 199-202

ANGELONI, S., CORDES, R., DUNBAR, S., GARCIA, C., GIBSON, G., MARTIN, C. und STONE, V. (2016) The Luminex® xMAP® Cookbook; http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook?_ga=1.79250964.1085157847.1489076290, zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

ARYA, M., SHERGILL, I. S., WILLIAMSON, M., GOMMERSALL, L., ARYA, N. und PATEL, H. R. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR; *Expert Rev Mol Diagn* 5 (2), s. 209-219

ATASEVEN, V. S., DAGALP, S. B., GUZEL, M., BASARAN, Z., TAN, M. T. und GERAGHTY, B. (2009) Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR; *Res Vet Sci* 86 (2), s. 339-344

AZAB, W. und OSTERRIEDER, N. (Year) of Conference Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) conquers and reprograms mononuclear cells to ensure transfer to endothelial cells; International Equine Infectious Disease Conference 2016, Buenos Aires, Argentina; *Journal of Equine Veterinary Science*

BALASURIYA, U. B., CROSSLEY, B. M. und TIMONEY, P. J. (2015) A review of traditional and contemporary assays for direct and indirect detection of Equid herpesvirus 1 in clinical samples; *J Vet Diagn Invest* 27 (6), s. 673-687

BOEHMER, P. E. und NIMONKAR, A. V. (2003) Herpes virus replication; *IUBMB Life* 55 (1), s. 13-22

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 (3-4),

s. 260-266

BREATHNACH, C. C., YEARGAN, M. R., SHEORAN, A. S. und ALLEN, G. P. (2001) The mucosal humoral immune response of the horse to infective challenge and vaccination with equine herpesvirus-1 antigens; *Equine Vet J* 33 (7), s. 651-657

BROWNING, G. F., FICORILLI, N. und STUDDERT, M. J. (1988) Asinine herpesvirus genomes: comparison with those of the equine herpesviruses; *Arch Virol* 101 (3-4), s. 183-190

BURGESS, B. A., TOKATELOFF, N., MANNING, S., LOHMANN, K., LUNN, D. P., HUSSEY, S. B. und MORLEY, P. S. (2012) Nasal shedding of equine herpesvirus-1 from horses in an outbreak of equine herpes myeloencephalopathy in Western Canada; *J Vet Intern Med* 26 (2), s. 384-392

BURNHAM, SUZANNE (Year) of Conference Anatomical Differences of the Donkey and Mule; 48th Annual Convention of the AAEP 2002, Orlando, Florida, USA;

CAMPBELL, N. A. und REECE, J. B. (2006) Mikroben als Modellsysteme: Die Genetik der Viren und Bakterien; in *Biologie*, 6; Pearson Studium; Kapitel 18
s. 385-413

CARMICHAEL, R. J., WHITFIELD, C. und MAXWELL, L. K. (2013) Pharmacokinetics of ganciclovir and valganciclovir in the adult horse; *J Vet Pharmacol Ther* 36 (5), s. 441-449

CARTER, JOHN B. und SAUNDERS, VENETIA A. (2013) Herpesviruses (and Other dsDNA Viruses); in *Virology : principles and applications*, 2nd; John Wiley & Sons; Kapitel 11 s. 121-134

CARVALHO, R. , PASSOS, L. M. F. , OLIVEIRA, A. M., HENRY, M. und

MARTINS, A. S. (2000) Detection of equine herpesvirus 1 DNA in a single embryo and in horse semen by polymerase chain reaction; *Arq Bras Med Vet Zootec* 52 (4), s. 302-306

CHANDLEY, A. C., JONES, R. C., DOTT, H. M., ALLEN, W. R. und SHORT, R. V. (1974) Meiosis in interspecific equine hybrids. I. The male mule (*Equus asinus* X *E. caballus*) and hinny (*E. caballus* X *E. asinus*); *Cytogenet Cell Genet* 13 (4), s. 330-341

CHIAM, R., SMID, L., KYDD, J. H., SMITH, K. C., PLATT, A. und DAVIS-POYNTER, N. J. (2006) Use of polarised equine endothelial cell cultures and an in vitro thrombosis model for potential characterisation of EHV-1 strain variation; *Vet Microbiol* 113 (3-4), s. 243-249

CHRISTENSEN, M., JACOBSEN, S., ICHIYANAGI, T. und KJELGAARD-HANSEN, M. (2012) Evaluation of an automated assay based on monoclonal anti-human serum amyloid A (SAA) antibodies for measurement of canine, feline, and equine SAA; *Vet J* 194 (3), s. 332-337

COOK, DAVID (2015) The Donkey Sanctuary, Annual Review; <https://www.thedonkeysanctuary.org.uk/annual-review>, zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

CRABB, B. S., MACPHERSON, C. M., REUBEL, G. H., BROWNING, G. F., STUDDERT, M. J. und DRUMMER, H. E. (1995) A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1; *Arch Virol* 140 (2), s. 245-258

CRABB, B. S. und STUDDERT, M. J. (1993) Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C termini elicit type-specific antibody responses in the natural host; *J Virol* 67 (10), s. 6332-6338

CUXSON, J. L., HARTLEY, C. A., FICORILLI, N. P., SYMES, S. J., DEVLIN, J. M. und GILKERSON, J. R. (2014) Comparing the genetic diversity of ORF30

of Australian isolates of 3 equid alphaherpesviruses; *Vet Microbiol* 169 (1-2), s. 50-57

DAMIANI, A. M., DE VRIES, M., REIMERS, G., WINKLER, S. und OSTERRIEDER, N. (2014) A severe equine herpesvirus type 1 (EHV-1) abortion outbreak caused by a neuropathogenic strain at a breeding farm in northern Germany; *Vet Microbiol* 172 (3-4), s. 555-562

DAVISON, A. J. (1991) Varicella-zoster virus. The Fourteenth Fleming lecture; *J Gen Virol* 72 (Pt 3) (475-486

DAVISON, A. J. (2010) Herpesvirus systematics; *Vet Microbiol* 143 (1), s. 52-69

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 (1), s. 171-177

DONOVAN, T. A., SCHRENZEL, M. D., TUCKER, T., PESSIER, A. P., BICKNESE, B., BUSCH, M. D., WISE, A. G., MAES, R., KIUPEL, M., MCKNIGHT, C. und NORDHAUSEN, R. W. (2009) Meningoencephalitis in a polar bear caused by equine herpesvirus 9 (EHV-9); *Vet Pathol* 46 (6), s. 1138-1143

DUNOWSKA, M. (2014) A review of equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part A: clinical presentation, diagnosis and treatment; *N Z Vet J* 62 (4), s. 171-178

EDINGTON, N., BRIDGES, C. G. und PATEL, J. R. (1986) Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke; *Arch Virol* 90 (1-2), s. 111-124

FAO (2014) FAOSTAT; <http://www.fao.org/faostat/en/-data/QA>, zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

FAO und BROOKE (2009) About the Brook; <http://www.fao.org/search/en/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=brooke&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2Fhome%2Fen%2F&ref=&ss=1656j615490j6>, zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

FOOTE, C. E., LOVE, D. N., GILKERSON, J. R. und WHALLEY, J. M. (2002) Serological responses of mares and weanlings following vaccination with an inactivated whole virus equine herpesvirus 1 and equine herpesvirus 4 vaccine; *Vet Microbiol* 88 (1), s. 13-25

FORTIER, G., RICHARD, E., HUE, E., FORTIER, C., PRONOST, S., POTTIER, D., LEMAITRE, L., LEKEUX, P., BORCHERS, K. und THIRY, E. (2013) Long-lasting airway inflammation associated with equid herpesvirus-2 in experimentally challenged horses; *Vet J* 197 (2), s. 492-495

FRAMPTON, A. R., JR., GOINS, W. F., COHEN, J. B., VON EINEM, J., OSTERRIEDER, N., O'CALLAGHAN, D. J. und GLORIOSO, J. C. (2005) Equine herpesvirus 1 utilizes a novel herpesvirus entry receptor; *J Virol* 79 (5), s. 3169-3173

FRAMPTON, A. R., JR., STOLZ, D. B., UCHIDA, H., GOINS, W. F., COHEN, J. B. und GLORIOSO, J. C. (2007) Equine herpesvirus 1 enters cells by two different pathways, and infection requires the activation of the cellular kinase ROCK1; *J Virol* 81 (20), s. 10879-10889

FRITSCHKE, A. K. und BORCHERS, K. (2011) Detection of neuropathogenic strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany; *Vet Microbiol* 147 (1-2), s. 176-180

FUERY, A., BROWNING, G. R., TAN, J., LONG, S., HAYWARD, G. S., COX, S. K., FLANAGAN, J. P., TOCIDLOWSKI, M. E., HOWARD, L. L. und LING, P. D. (2016) Clinical Infection of Captive Asian Elephants (*Elephas Maximus*) with Elephant Endotheliotropic Herpesvirus 4; *J Zoo Wildl Med* 47 (1), s. 311-318

FUKUSHI, H., TOMITA, T., TANIGUCHI, A., OCHIAI, Y., KIRISAWA, R., MATSUMURA, T., YANAI, T., MASEGI, T., YAMAGUCHI, T. und HIRAI, K. (1997) Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1; *Virology* 227 (1), s. 34-44

FUKUSHI, H., YAMAGUCHI, T. und YAMADA, S. (2012) Complete genome sequence of equine herpesvirus type 9; *J Virol* 86 (24), s. 13822

GARDINER, D. W., LUNN, D. P., GOEHRING, L. S., CHIANG, Y. W., COOK, C., OSTERRIEDER, N., MCCUE, P., DEL PIERO, F., HUSSEY, S. B. und HUSSEY, G. S. (2012) Strain impact on equine herpesvirus type 1 (EHV-1) abortion models: viral loads in fetal and placental tissues and foals; *Vaccine* 30 (46), s. 6564-6572

GARRE, B., SHEBANY, K., GRYSPEERDT, A., BAERT, K., VAN DER MEULEN, K., NAUWYNCK, H., DEPREZ, P., DE BACKER, P. und CROUBELS, S. (2007a) Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous infusion of acyclovir and after oral administration of acyclovir and its prodrug valacyclovir in healthy adult horses; *Antimicrob Agents Chemother* 51 (12), s. 4308-4314

GARRE, B., VAN DER MEULEN, K., NUGENT, J., NEYTS, J., CROUBELS, S., DE BACKER, P. und NAUWYNCK, H. (2007b) In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet; *Vet Microbiol* 122 (1-2), s. 43-51

GILDEA, S., QUINLIVAN, M., MURPHY, B. A. und CULLINANE, A. (2013) Humoral response and antiviral cytokine expression following vaccination of thoroughbred weanlings--a blinded comparison of commercially available vaccines; *Vaccine* 31 (45), s. 5216-5222

GILKERSON, J. R., WHALLEY, J. M., DRUMMER, H. E., STUDDERT, M. J. und LOVE, D. N. (1999a) Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997; *Vet Microbiol* 68 (1-2), s. 15-25

GILKERSON, J. R., WHALLEY, J. M., DRUMMER, H. E., STUDDERT, M. J. und LOVE, D. N. (1999b) Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals; *Vet Microbiol* 68 (1-2), s. 27-34

GOEHRING, L. S., BRANDES, K., ASHTON, L. V., WITTENBURG, L. A., OLEA-POPELKA, F. J., LUNN, D. P. und SOBOLL HUSSEY, G. (2016) Anti-inflammatory drugs decrease infection of brain endothelial cells with EHV-1 in vitro; *Equine Vet J*

GOEHRING, L. S., HUSSEY, G. S., ASHTON, L. V., SCHENKEL, A. R. und LUNN, D. P. (2011) Infection of central nervous system endothelial cells by cell-associated EHV-1; *Vet Microbiol* 148 (2-4), s. 389-395

GOEHRING, L. S., LANDOLT, G. A. und MORLEY, P. S. (2010a) Detection and management of an outbreak of equine herpesvirus type 1 infection and associated neurological disease in a veterinary teaching hospital; *J Vet Intern Med* 24 (5), s. 1176-1183

GOEHRING, L. S. und SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. (2001) The Mystery of Equine Herpes Myeloencephalopathy; *Equine Veterinary Education* 13 (36-42)

GOEHRING, L. S., SOBOLL HUSSEY, G., GOMEZ DIEZ, M., BENEDICT, K., MAXWELL, L. K., MORLEY, P. S., SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M. und LUNN, D. P. (2013) Plasma D-dimer concentrations during experimental EHV-1 infection of horses; *J Vet Intern Med* 27 (6), s. 1535-1542

GOEHRING, L. S., VAN MAANEN, C., BERENDSEN, M., CULLINANE, A., DE GROOT, R. J., ROTTIER, P. J., WESSELINGH, J. J. und SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M. (2010b) Experimental infection with neuropathogenic equid herpesvirus type 1 (EHV-1) in adult horses; *Vet J* 186 (2), s. 180-187

GOEHRING, L. S., VAN WINDEN, S. C., VAN MAANEN, C. und SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M. (2006) Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in The Netherlands: a four-year retrospective study (1999-2003); *J Vet Intern Med* 20 (3), s. 601-607

GOEHRING, L. S., WAGNER, B., BIGBIE, R., HUSSEY, S. B., RAO, S., MORLEY, P. S. und LUNN, D. P. (2010c) Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines; *Vaccine* 28 (32), s. 5203-5211

GONZALEZ-MEDINA, S. und NEWTON, J. R. (2015) Equine herpesvirus-1: dealing practically but effectively with an ever present threat; *Equine Vet J* 47 (2), s. 142-144

GOODMAN, L. B., WIMER, C., DUBOVI, E. J., GOLD, C. und WAGNER, B. (2012) Immunological correlates of vaccination and infection for equine herpesvirus 1; *Clin Vaccine Immunol* 19 (2), s. 235-241

GOTESMAN, M., KATTLUN, J., BERGMANN, S. M. und EL-MATBOULI, M. (2013) CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus; *Dis Aquat Organ* 105 (2), s. 163-174

GRIFFIN, B. D., VERWEIJ, M. C. und WIERTZ, E. J. (2010) Herpesviruses and immunity: the art of evasion; *Vet Microbiol* 143 (1), s. 89-100

GROSE, C. (2012) Pangaea and the Out-of-Africa Model of Varicella-Zoster Virus Evolution and Phylogeography; *J Virol* 86 (18), s. 9558-9565

GRYSPEERDT, A. C., VANDEKERCKHOVE, A. P., BAGHI, H. B., VAN DE WALLE, G. R. und NAUWYNCK, H. J. (2012) Expression of late viral proteins is restricted in nasal mucosal leucocytes but not in epithelial cells during early-stage equine herpes virus-1 infection; *Vet J* 193 (2), s. 576-578

GRYSPEERDT, A. C., VANDEKERCKHOVE, A. P., GARRE, B., BARBE, F.,

VAN DE WALLE, G. R. und NAUWYNCK, H. J. (2010) Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses; *Vet Microbiol* 142 (3-4), s. 242-253

HARTLEY, C. A., WILKS, C. R., STUDDERT, M. J. und GILKERSON, J. R. (2005) Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses; *Am J Vet Res* 66 (5), s. 921-928

HEBIA-FELLAH, I., LEAUTE, A., FIENI, F., ZIENTARA, S., IMBERT-MARCILLE, B. M., BESSE, B., FORTIER, G., PRONOST, S., MISZCZAK, F., FERRY, B., THORIN, C., PELLERIN, J. L. und BRUYAS, J. F. (2009) Evaluation of the presence of equine viral herpesvirus 1 (EHV-1) and equine viral herpesvirus 4 (EHV-4) DNA in stallion semen using polymerase chain reaction (PCR); *Theriogenology* 71 (9), s. 1381-1389

HELDENS, J. G., HANNANT, D., CULLINANE, A. A., PRENDERGAST, M. J., MUMFORD, J. A., NELLY, M., KYDD, J. H., WESTSTRATE, M. W. und VAN DEN HOVEN, R. (2001) Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares; *Vaccine* 19 (30), s. 4307-4317

HENNINGER, R. W., REED, S. M., SAVILLE, W. J., ALLEN, G. P., HASS, G. F., KOHN, C. W. und SOFALY, C. (2007) Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center; *J Vet Intern Med* 21 (1), s. 157-165

HERNANDEZ, D., YEO, W. M., BROOKS, M. B., NESS, S. L., DIVERS, T. J. und STOKOL, T. (2016) Effects of various antiplatelet drugs on ex vivo platelet activation induced by equine herpesvirus type 1; *Am J Vet Res* 77 (12), s. 1366-1373

HOLMES, M. A., TOWNSEND, H. G., KOHLER, A. K., HUSSEY, S.,

BREATHNACH, C., BARNETT, C., HOLLAND, R. und LUNN, D. P. (2006) Immune responses to commercial equine vaccines against equine herpesvirus-1, equine influenza virus, eastern equine encephalomyelitis, and tetanus; *Vet Immunol Immunopathol* 111 (1-2), s. 67-80

HOOIJBERG, E. H., VAN DEN HOVEN, R., TICHY, A. und SCHWENDENWEIN, I. (2014) Diagnostic and predictive capability of routine laboratory tests for the diagnosis and staging of equine inflammatory disease; *J Vet Intern Med* 28 (5), s. 1587-1593

HUANG, T., LEHMANN, M. J., SAID, A., MA, G. und OSTERRIEDER, N. (2014) Major histocompatibility complex class I downregulation induced by equine herpesvirus type 1 pUL56 is through dynamin-dependent endocytosis; *J Virol* 88 (21), s. 12802-12815

HUANG, T., MA, G. und OSTERRIEDER, N. (2015) Equine Herpesvirus 1 Multiply Inserted Transmembrane Protein pUL43 Cooperates with pUL56 in Downregulation of Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class I; *J Virol* 89 (12), s. 6251-6263

HUSSEY, G. S., GOEHRING, L. S., LUNN, D. P., HUSSEY, S. B., HUANG, T., OSTERRIEDER, N., POWELL, C., HAND, J., HOLZ, C. und SLATER, J. (2013) Experimental infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces chorioretinal lesions; *Vet Res* 44 (118)

HUSSEY, S. B., CLARK, R., LUNN, K. F., BREATHNACH, C., SOBOLL, G., WHALLEY, J. M. und LUNN, D. P. (2006) Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction; *J Vet Diagn Invest* 18 (4), s. 335-342

IWASAKI, A. und MEDZHITOV, R. (2011) A new shield for a cytokine storm; *Cell* 146 (6), s. 861-862

IWASAKI, A. und MEDZHITOV, R. (2015) Control of adaptive immunity by the

innate immune system; *Nat Immunol* 16 (4), s. 343-353

KASEM, S., YAMADA, S., KIUPEL, M., WOODRUFF, M., OHYA, K. und FUKUSHI, H. (2008) Equine herpesvirus type 9 in giraffe with encephalitis; *Emerg Infect Dis* 14 (12), s. 1948-1949

KATEPALLI, M. P., ADAMS, A. A., LEAR, T. L. und HOROHOV, D. W. (2008) The effect of age and telomere length on immune function in the horse; *Dev Comp Immunol* 32 (12), s. 1409-1415

KEGGAN, A., FREER, H., ROLLINS, A. und WAGNER, B. (2013) Production of seven monoclonal equine immunoglobulins isotyped by multiplex analysis; *Vet Immunol Immunopathol* 153 (3-4), s. 187-193

KLEIBOEKER, S. B., SCHOMMER, S. K., JOHNSON, P. J., EHLERS, B., TURNQUIST, S. E., BOUCHER, M. und KREEGER, J. M. (2002) Association of two newly recognized herpesviruses with interstitial pneumonia in donkeys (*Equus asinus*); *J Vet Diagn Invest* 14 (4), s. 273-280

KLEIBOEKER, S. B., TURNQUIST, S. E., JOHNSON, P. J. und KREEGER, J. M. (2004) Detection and nucleotide sequencing of a DNA-packaging protein gene of equine gammaherpesviruses; *J Vet Diagn Invest* 16 (1), s. 67-74

KOPPERS-LALIC, D., VERWEIJ, M. C., LIPINSKA, A. D., WANG, Y., QUINTEN, E., REITS, E. A., KOCH, J., LOCH, S., MARCONDES REZENDE, M., DAUS, F., BIENKOWSKA-SZEWCZYK, K., OSTERRIEDER, N., METTENLEITER, T. C., HEEMSKERK, M. H., TAMPE, R., NEEFJES, J. J., CHOWDHURY, S. I., RESSING, M. E., RIJSEWIJK, F. A. und WIERTZ, E. J. (2008) Varicellovirus UL 49.5 proteins differentially affect the function of the transporter associated with antigen processing, TAP; *PLoS Pathog* 4 (5), s. e1000080

KURTZ, B. M., SINGLETARY, L. B., KELLY, S. D. und FRAMPTON, A. R., JR. (2010) *Equus caballus* major histocompatibility complex class I is an entry

receptor for equine herpesvirus type 1; *J Virol* 84 (18), s. 9027-9034

KYDD, J. H., CASE, R., MINKE, J., AUDONNET, J. C., WAGNER, B. und ANTCZAK, D. F. (2014) Immediate-early protein of equid herpesvirus type 1 as a target for cytotoxic T-lymphocytes in the Thoroughbred horse; *J Gen Virol* 95 (Pt 8), s. 1783-1789

KYDD, J. H., DAVIS-POYNTER, N. J., BIRCH, J., HANNANT, D., MINKE, J., AUDONNET, J. C., ANTCZAK, D. F. und ELLIS, S. A. (2006a) A molecular approach to the identification of cytotoxic T-lymphocyte epitopes within equine herpesvirus 1; *J Gen Virol* 87 (Pt 9), s. 2507-2515

KYDD, J. H., SMITH, K. C., HANNANT, D., LIVESAY, G. J. und MUMFORD, J. A. (1994) Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity; *Equine Vet J* 26 (6), s. 470-473

KYDD, J. H., TOWNSEND, H. G. und HANNANT, D. (2006b) The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines; *Vet Immunol Immunopathol* 111 (1-2), s. 15-30

KYDD, J. H., WATTRANG, E. und HANNANT, D. (2003) Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares; *Vet Immunol Immunopathol* 96 (3-4), s. 207-217

LANG, A., DE VRIES, M., FEINEIS, S., MULLER, E., OSTERRIEDER, N. und DAMIANI, A. M. (2013) Development of a peptide ELISA for discrimination between serological responses to equine herpesvirus type 1 and 4; *J Virol Methods* 193 (2), s. 667-673

LATZEL, SYLVIA 2008 Klinische und pharmakologische Untersuchungen zur Eliminationskinetik von Xylazin (Rompun®) beim Maultier; Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München, BARTMANN, C. P.

LAVAL, K., FAVOREEL, H. W. und NAUWYNCK, H. J. (2015) Equine herpesvirus type 1 replication is delayed in CD172a+ monocytic cells and controlled by histone deacetylases; *J Gen Virol* 96 (Pt 1), s. 118-130

LECUYER, T. E., RINK, A., BRADWAY, D. S., EVERMANN, J. F., NICOLA, A. V., BASZLER, T. und HALDORSON, G. J. (2015) Abortion in a Mediterranean miniature donkey (*Equus asinus*) associated with a gammaherpesvirus similar to Equid herpesvirus 7; *J Vet Diagn Invest* 27 (6), s. 749-753

LUNN, D. P., DAVIS-POYNTER, N., FLAMINIO, M. J., HOROHOV, D. W., OSTERRIEDER, K., PUSTERLA, N. und TOWNSEND, H. G. (2009) Equine herpesvirus-1 consensus statement; *J Vet Intern Med* 23 (3), s. 450-461

MA, G., AZAB, W. und OSTERRIEDER, N. (2013) Equine herpesviruses type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--masters of co-evolution and a constant threat to equids and beyond; *Vet Microbiol* 167 (1-2), s. 123-134

MA, G., FEINEIS, S., OSTERRIEDER, N. und VAN DE WALLE, G. R. (2012) Identification and characterization of equine herpesvirus type 1 pUL56 and its role in virus-induced downregulation of major histocompatibility complex class I; *J Virol* 86 (7), s. 3554-3563

MA, K. (Year) of Conference Maintaining the Health of Working Equines; a Key Factor in the Support of Rural Communities in the Developing World; 9th International Congress of World Equine Veterinary Association, Marrakech, Morocco;

MAIR, K. H., KOINIG, H., GERNER, W., HOHNE, A., BRETTHAUER, J., KROLL, J. J., ROOF, M. B., SAALMULLER, A., STADLER, K. und LIBANOVA, R. (2015) Carbopol improves the early cellular immune responses induced by the modified-life vaccine Ingelvac PRRS(R) MLV; *Vet Microbiol* 176

(3-4), s. 352-357

MAXWELL, L. K., BENTZ, B. G., BOURNE, D. W. und ERKERT, R. S. (2008) Pharmacokinetics of valacyclovir in the adult horse; *J Vet Pharmacol Ther* 31 (4), s. 312-320

MCGEOCH, D. J., DALRYMPLE, M. A., DAVISON, A. J., DOLAN, A., FRAME, M. C., MCNAB, D., PERRY, L. J., SCOTT, J. E. und TAYLOR, P. (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1; *J Gen Virol* 69 (Pt 7) (1531-1574

MINKE, J. M., FISCHER, L., BAUDU, P., GUIGAL, P. M., SINDLE, T., MUMFORD, J. A. und AUDONNET, J. C. (2006) Use of DNA and recombinant canarypox viral (ALVAC) vectors for equine herpes virus vaccination; *Vet Immunol Immunopathol* 111 (1-2), s. 47-57

MSD TIERGESUNDHEIT (2009) Prevaccinol®; <http://www.msd-tiergesundheits.de/products/prevaccinol/prevaccinol.aspx>, zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

MUMFORD, E. L., TRAUB-DARGATZ, J. L., CARMAN, J., CALLAN, R. J., COLLINS, J. K., GOLTZ, K. L., ROMM, S. R., TARR, S. F. und SALMAN, M. D. (2003) Occurrence of infectious upper respiratory tract disease and response to vaccination in horses on six sentinel premises in northern Colorado; *Equine Vet J* 35 (1), s. 72-77

MUMFORD, J. A., WILSON, H., HANNANT, D. und JESSETT, D. M. (1994) Antigenicity and immunogenicity of equine influenza vaccines containing a Carbomer adjuvant; *Epidemiol Infect* 112 (2), s. 421-437

NEGUSSIE, H., GIZAW, D., TESSEMA, T. S. und NAUWYNCK, H. J. (2015) Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy, an Emerging Threat of Working Equids in Ethiopia; *Transbound Emerg Dis*

NUGENT, J., BIRCH-MACHIN, I., SMITH, K. C., MUMFORD, J. A., SWANN, Z., NEWTON, J. R., BOWDEN, R. J., ALLEN, G. P. und DAVIS-POYNTER, N. (2006) Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks; *J Virol* 80 (8), s. 4047-4060

O'NEILL, T., KYDD, J. H., ALLEN, G. P., WATTRANG, E., MUMFORD, J. A. und HANNANT, D. (1999) Determination of equid herpesvirus 1-specific, CD8+, cytotoxic T lymphocyte precursor frequencies in ponies; *Vet Immunol Immunopathol* 70 (1-2), s. 43-54

OIE, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (2013) List of Countries by Disease Situation; http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist, zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

OIE, WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (2016) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016, Equine rhinopneumonitis (equine herpesvirus-1 and -4); <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

ONS, E., VAN BRUSSEL, L., LANE, S., KING, V., CULLINANE, A., KENNA, R., LYONS, P., HAMMOND, T. A., SALT, J. und RAUE, R. (2014) Efficacy of a Parapoxvirus ovis-based immunomodulator against equine herpesvirus type 1 and *Streptococcus equi equi* infections in horses; *Vet Microbiol* 173 (3-4), s. 232-240

OSTERRIEDER, N. (2011) Familie Herpesviridae; in *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 9; Enke Verlag; Kapitel 26.1.4. s. 440-467

OSTLUND, E. N. (1993) The equine herpesviruses; *Vet Clin North Am Equine*

Pract 9 (2), s. 283-294

PAILLOT, R., CASE, R., ROSS, J., NEWTON, R. und NUGENT, J. (2008) Equine Herpes Virus-1: Virus, Immunity and Vaccines; The Open Veterinary Science Journal 2 (68-91

PAILLOT, R., DALY, J. M., JUILLARD, V., MINKE, J. M., HANNANT, D. und KYDD, J. H. (2005) Equine interferon gamma synthesis in lymphocytes after in vivo infection and in vitro stimulation with EHV-1; Vaccine 23 (36), s. 4541-4551

PAILLOT, R., ELLIS, S. A., DALY, J. M., AUDONNET, J. C., MINKE, J. M., DAVIS-POYNTER, N., HANNANT, D. und KYDD, J. H. (2006) Characterisation of CTL and IFN-gamma synthesis in ponies following vaccination with a NYVAC-based construct coding for EHV-1 immediate early gene, followed by challenge infection; Vaccine 24 (10), s. 1490-1500

PATEL, J. R. (2005) Characteristics of live bovine herpesvirus-1 vaccines; Vet J 169 (3), s. 404-416

PATEL, J. R., BATEMAN, H., WILLIAMS, J. und DIDLICK, S. (2003a) Derivation and characterisation of a live equid herpes virus-1 (EHV-1) vaccine to protect against abortion and respiratory disease due to EHV-1; Vet Microbiol 91 (1), s. 23-39

PATEL, J. R., FOLDI, J., BATEMAN, H., WILLIAMS, J., DIDLICK, S. und STARK, R. (2003b) Equid herpesvirus (EHV-1) live vaccine strain C147: efficacy against respiratory diseases following EHV types 1 and 4 challenges; Vet Microbiol 92 (1-2), s. 1-17

PATEL, J. R. und HELDENS, J. (2005) Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)--epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review; Vet J 170 (1), s. 14-23

PECK, K. E., MATTHEWS, N. S., TAYLOR, T. S. und MEALEY, K. L. (2002) Pharmacokinetics of sulfamethoxazole and trimethoprim in donkeys, mules, and horses; *Am J Vet Res* 63 (3), s. 349-353

PERKINS, G. A. und WAGNER, B. (2015) The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse; *Equine Vet J* 47 (3), s. 267-274

PIETTA, DIETER und BARTMANN, CLAUS PETER (2012) Hufpflege und -beschlag bei Eseln und Maultieren; in *Der Huf*, 6; Enke Verlag; Kapitel 18 s. 318-324

PIHL, T. H., SCHEEPERS, E., SANZ, M., GODDARD, A., PAGE, P., TOFT, N., KJELGAARD-HANSEN, M., ANDERSEN, P. H. und JACOBSEN, S. (2016) Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic; *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 26 (5), s. 664-674

PRONOST, S., LEGRAND, L., PITEL, P. H., WEGGE, B., LISSENS, J., FREYMUTH, F., RICHARD, E. und FORTIER, G. (2012) Outbreak of equine herpesvirus myeloencephalopathy in France: a clinical and molecular investigation; *Transbound Emerg Dis* 59 (3), s. 256-263

PROOPS, L., BURDEN, F. und OSTHAUS, B. (2009) Mule cognition: a case of hybrid vigour?; *Anim Cogn* 12 (1), s. 75-84

PROOPS, L., BURDEN, F. und OSTHAUS, B. (2012) Social relations in a mixed group of mules, ponies and donkeys reflect differences in equid type; *Behav Processes* 90 (3), s. 337-342

PUSTERLA, N. und HUSSEY, G. S. (2014) Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy; *Vet Clin North Am Equine Pract* 30 (3), s. 489-506

PUSTERLA, N., HUSSEY, S. B., MAPES, S., LEUTENEGGER, C. M.,

MADIGAN, J. E., FERRARO, G. L., WILSON, W. D. und LUNN, D. P. (2009a) Comparison of four methods to quantify Equid herpesvirus 1 load by real-time polymerase chain reaction in nasal secretions of experimentally and naturally infected horses; *J Vet Diagn Invest* 21 (6), s. 836-840

PUSTERLA, N., KASS, P. H., MAPES, S., JOHNSON, C., BARNETT, D. C., VAALA, W., GUTIERREZ, C., MCDANIEL, R., WHITEHEAD, B. und MANNING, J. (2011) Surveillance programme for important equine infectious respiratory pathogens in the USA; *Vet Rec* 169 (1), s. 12

PUSTERLA, N., MAPES, S. und DAVID WILSON, W. (2012a) Prevalence of latent alpha-herpesviruses in Thoroughbred racing horses; *Vet J* 193 (2), s. 579-582

PUSTERLA, N., MAPES, S., WADEMAN, C., WHITE, A., ESTELL, K. und SWAIN, E. (2012b) Investigation of the role of mules as silent shedders of EHV-1 during an outbreak of EHV-1 myeloencephalopathy in California; *Vet Rec* 170 (18), s. 465

PUSTERLA, N., MAPES, S. und WILSON, W. D. (2010) Prevalence of equine herpesvirus type 1 in trigeminal ganglia and submandibular lymph nodes of equids examined postmortem; *Vet Rec* 167 (10), s. 376-378

PUSTERLA, N., WILSON, W. D., MAPES, S., FINNO, C., ISBELL, D., ARTHUR, R. M. und FERRARO, G. L. (2009b) Characterization of viral loads, strain and state of equine herpesvirus-1 using real-time PCR in horses following natural exposure at a racetrack in California; *Vet J* 179 (2), s. 230-239

QUINTANA, A. M., LANDOLT, G. A., ANNIS, K. M. und HUSSEY, G. S. (2011) Immunological characterization of the equine airway epithelium and of a primary equine airway epithelial cell culture model; *Vet Immunol Immunopathol* 140 (3-4), s. 226-236

RASS, JULIA 2011 Morphologisch-funktionelle Untersuchungen an

Endometriumbiopsaten von zyklischen und azyklischen Maultierstuten; Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, SCHOON, H.-A. und BARTMANN, C. P.

REBHUN, W. C., JENKINS, D. H., RIIS, R. C., DILL, S. G., DUBOVI, E. J. und TORRES, A. (1988) An epizootic of blindness and encephalitis associated with a herpesvirus indistinguishable from equine herpesvirus 1 in a herd of alpacas and llamas; *J Am Vet Med Assoc* 192 (7), s. 953-956

REED, S. M. und TORIBIO, R. E. (2004) Equine herpesvirus 1 and 4; *Vet Clin North Am Equine Pract* 20 (3), s. 631-642

ROY, S. und WOLMAN, L. (1969) Electron microscopic observations on the virus particles in Herpes simplex encephalitis; *J Clin Pathol* 22 (1), s. 51-59

RYDER, O. A., CHEMNICK, L. G., BOWLING, A. T. und BENIRSCHKE, K. (1985) Male mule foal qualifies as the offspring of a female mule and jack donkey; *J Hered* 76 (5), s. 379-381

SARKAR, S., BALASURIYA, U. B., HOROHOV, D. W. und CHAMBERS, T. M. (2015) Equine herpesvirus-1 suppresses type-I interferon induction in equine endothelial cells; *Vet Immunol Immunopathol* 167 (3-4), s. 122-129

SCHULMAN, M., BECKER, A., GANSWINDT, S., GUTHRIE, A., STOUT, T. und GANSWINDT, A. (2014) The effect of consignment to broodmare sales on physiological stress measured by faecal glucocorticoid metabolites in pregnant Thoroughbred mares; *BMC Vet Res* 10 (25)

SCHULMAN, M. L., BECKER, A., VAN DER MERWE, B. D., GUTHRIE, A. J. und STOUT, T. A. (2015) Epidemiology and reproductive outcomes of EHV-1 abortion epizootics in unvaccinated Thoroughbred mares in South Africa; *Equine Vet J* 47 (2), s. 155-159

SEGARRA, A., BAILLON, L., TOURBIEZ, D., BENABDELMOUNA, A., FAURY, N., BOURGOUGNON, N. und RENAULT, T. (2014) Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*; *Vet Res* 45 (103)

SHERMAN, J., MITCHELL, W. R., MARTIN, S. W., THORSEN, J. und INGRAM, D. G. (1979) Epidemiology of equine upper respiratory tract disease on standardbred racetracks; *Can J Comp Med* 43 (1), s. 1-9

SLATER, J. (2013) Equine Herpesviruses; in *Equine Infectious Diseases 2*; Saunders Elsevier; Kapitel 14 s. 151-168

SLATER, J. D., BORCHERS, K., THACKRAY, A. M. und FIELD, H. J. (1994) The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse; *J Gen Virol* 75 (Pt 8) (2007-2016)

SMITH, D., HAMBLIN, A. und EDINGTON, N. (2002) Equid herpesvirus 1 infection of endothelial cells requires activation of putative adhesion molecules: an in vitro model; *Clin Exp Immunol* 129 (2), s. 281-287

SMITH, D. J., IQBAL, J., PUREWAL, A., HAMBLIN, A. S. und EDINGTON, N. (1998) In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD5+/CD8+ leukocytes indirectly by IL-2 or chorionic gonadotrophin; *J Gen Virol* 79 (Pt 12) (2997-3004)

SMITH, K. C. und BORCHERS, K. (2001) A study of the pathogenesis of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion by DNA in-situ hybridization; *J Comp Pathol* 125 (4), s. 304-310

SMITH, K. C., MUMFORD, J. A. und LAKHANI, K. (1996) A comparison of equid herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus; *J Comp Pathol* 114 (3), s. 231-247

SMITH, K. L., ALLEN, G. P., BRANSCUM, A. J., FRANK COOK, R., VICKERS, M. L., TIMONEY, P. J. und BALASURIYA, U. B. (2010) The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions; *Vet Microbiol* 141 (1-2), s. 5-11

SMITH, K. L., LI, Y., BREHENY, P., COOK, R. F., HENNEY, P. J., SELLS, S., PRONOST, S., LU, Z., CROSSLEY, B. M., TIMONEY, P. J. und BALASURIYA, U. B. (2012) New real-time PCR assay using allelic discrimination for detection and differentiation of equine herpesvirus-1 strains with A2254 and G2254 polymorphisms; *J Clin Microbiol* 50 (6), s. 1981-1988

SOBOLL, G., HUSSEY, S. B., WHALLEY, J. M., ALLEN, G. P., KOEN, M. T., SANTUCCI, N., FRASER, D. G., MACKLIN, M. D., SWAIN, W. F. und LUNN, D. P. (2006) Antibody and cellular immune responses following DNA vaccination and EHV-1 infection of ponies; *Vet Immunol Immunopathol* 111 (1-2), s. 81-95

SOBOLL, G., WHALLEY, J. M., KOEN, M. T., ALLEN, G. P., FRASER, D. G., MACKLIN, M. D., SWAIN, W. F. und LUNN, D. P. (2003) Identification of equine herpesvirus-1 antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes; *J Gen Virol* 84 (Pt 10), s. 2625-2634

SOBOLL HUSSEY, G., ASHTON, L. V., QUINTANA, A. M., LUNN, D. P., GOEHRING, L. S., ANNIS, K. und LANDOLT, G. (2014) Innate immune responses of airway epithelial cells to infection with equine herpesvirus-1; *Vet Microbiol* 170 (1-2), s. 28-38

SOBOLL HUSSEY, G., HUSSEY, S. B., WAGNER, B., HOROHOV, D. W., VAN DE WALLE, G. R., OSTERRIEDER, N., GOEHRING, L. S., RAO, S. und LUNN, D. P. (2011) Evaluation of immune responses following infection of ponies with an EHV-1 ORF1/2 deletion mutant; *Vet Res* 42 (23)

STOKOL, T., SERPA, P. B., ZAHID, M. N. und BROOKS, M. B. (2016) Unfractionated and Low-Molecular-Weight Heparin and the Phosphodiesterase Inhibitors, IBMX and Cilostazol, Block Ex Vivo Equid Herpesvirus Type-1-

Induced Platelet Activation; *Front Vet Sci* 3 (99)

STOKOL, T., YEO, W. M., BURNETT, D., DEANGELIS, N., HUANG, T., OSTERRIEDER, N. und CATALFAMO, J. (2015) Equid herpesvirus type 1 activates platelets; *PLoS One* 10 (4), s. e0122640

TAYLOR, TEX und MATTHEWS, NORA (Year) of Conference Donkey and Mule Scenarios: When to Stop, Think, Read, or Call; 48th Annual Convention of the AAEP 2002, Orlando, Florida, USA;

TEARLE, J. P., SMITH, K. C., BOYLE, M. S., BINNS, M. M., LIVESAY, G. J. und MUMFORD, J. A. (1996) Replication of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the testes and epididymides of ponies and venereal shedding of infectious virus; *J Comp Pathol* 115 (4), s. 385-397

TELFORD, E. A., WATSON, M. S., MCBRIDE, K. und DAVISON, A. J. (1992) The DNA sequence of equine herpesvirus-1; *Virology* 189 (1), s. 304-316

THOMSON, G. R., MUMFORD, J. A., CAMPBELL, J., GRIFFITHS, L. und CLAPHAM, P. (1976) Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract; *Equine Vet J* 8 (2), s. 58-65

TRAUB-DARGATZ, J. L., PELZEL-MCCLUSKEY, A. M., CREEKMORE, L. H., GEISER-NOVOTNY, S., KASARI, T. R., WIEDENHEFT, A. M., BUSH, E. J. und BJORK, K. E. (2013) Case-control study of a multistate equine herpesvirus myeloencephalopathy outbreak; *J Vet Intern Med* 27 (2), s. 339-346

TRAVIS, L. (1990) *The Mule*, 1; J. A. Allen & Co.; s.

TSUJIMURA, K., OYAMA, T., KATAYAMA, Y., MURANAKA, M., BANNAI, H., NEMOTO, M., YAMANAKA, T., KONDO, T., KATO, M. und MATSUMURA, T. (2011) Prevalence of equine herpesvirus type 1 strains of neuropathogenic genotype in a major breeding area of Japan; *J Vet Med Sci* 73

(12), s. 1663-1667

TSUJIMURA, K., YAMADA, M., NAGATA, S., YAMANAKA, T., NEMOTO, M., KONDO, T., KUROSAWA, M. und MATSUMURA, T. (2010) Pharmacokinetics of penciclovir after oral administration of its prodrug famciclovir to horses; J Vet Med Sci 72 (3), s. 357-361

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (2017) NLRAD-NAHRS Reportable Disease List; https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/monitoring-and-surveillance/sa_disease_reporting/ct_disease_list, zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

VANDEKERCKHOVE, A. P., GLORIEUX, S., GRYSPEERDT, A. C., STEUKERS, L., DUCHATEAU, L., OSTERRIEDER, N., VAN DE WALLE, G. R. und NAUWYNCK, H. J. (2010) Replication kinetics of neurovirulent versus non-neurovirulent equine herpesvirus type 1 strains in equine nasal mucosal explants; J Gen Virol 91 (Pt 8), s. 2019-2028

VENGUST, M., WEN, X. und BIENZLE, D. (2008) Herpesvirus-associated neurological disease in a donkey; J Vet Diagn Invest 20 (6), s. 820-823

VON DEN DRIESCH, A. und PETERS, J. (2003) Vom Hirten zum Hippiter; in Geschichte der Tiermedizin: 5000 Jahre Tierheilkunde, 2; Schattauer, F.K. Verlag; Kapitel 1 s. 3-53

WAGNER, B. und FREER, H. (2009) Development of a bead-based multiplex assay for simultaneous quantification of cytokines in horses; Vet Immunol Immunopathol 127 (3-4), s. 242-248

WAGNER, B., GOODMAN, L. B., BABASYAN, S., FREER, H., TORSTEINSDOTTIR, S., SVANSSON, V., BJORNSDOTTIR, S. und PERKINS, G. A. (2015) Antibody and cellular immune responses of naive mares

to repeated vaccination with an inactivated equine herpesvirus vaccine; *Vaccine* 33 (42), s. 5588-5597

WALTER, J., BALZER, H. J., SEEH, C., FEY, K., BLEUL, U. und OSTERRIEDER, N. (2012) Venereal shedding of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in naturally infected stallions; *J Vet Intern Med* 26 (6), s. 1500-1504

WALTER, J., SEEH, C., FEY, K., BLEUL, U. und OSTERRIEDER, N. (2013) Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis; *Acta Vet Scand* 55 (19)

WALTER, J., SEEH, C., FEY, K., BLEUL, U. und OSTERRIEDER, N. (2016) Prevention of equine herpesvirus myeloencephalopathy - Is heparin a novel option? A case report; *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 44 (5), s. 313-317

WILLIAMS, K. J., MAES, R., DEL PIERO, F., LIM, A., WISE, A., BOLIN, D. C., CASWELL, J., JACKSON, C., ROBINSON, N. E., DERKSEN, F., SCOTT, M. A., UHAL, B. D., LI, X., YOUSSEF, S. A. und BOLIN, S. R. (2007) Equine multinodular pulmonary fibrosis: a newly recognized herpesvirus-associated fibrotic lung disease; *Vet Pathol* 44 (6), s. 849-862

WILLIAMS, K. J., ROBINSON, N. E., LIM, A., BRANDENBERGER, C., MAES, R., BEHAN, A. und BOLIN, S. R. (2013) Experimental induction of pulmonary fibrosis in horses with the gammaherpesvirus equine herpesvirus 5; *PLoS One* 8 (10), s. e77754

WILSTERMAN, S., SOBOLL-HUSSEY, G., LUNN, D. P., ASHTON, L. V., CALLAN, R. J., HUSSEY, S. B., RAO, S. und GOEHRING, L. S. (2011) Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia; *Vet Microbiol* 149 (1-2), s. 40-47

WOHLSEIN, P., LEHMBECKER, A., SPITZBARTH, I., ALGERMISSEN, D., BAUMGARTNER, W., BOER, M., KUMMROW, M., HAAS, L. und

GRUMMER, B. (2011) Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts; *Vet Microbiol* 149 (3-4), s. 456-460

YEO, W. M., OSTERRIEDER, N. und STOKOL, T. (2013) Equine herpesvirus type 1 infection induces procoagulant activity in equine monocytes; *Vet Res* 44 (16)

YILDIRIM, Y., YILMAZ, V. und KIRMIZIGUL, A. H. (2015) Equine herpes virus type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) infections in horses and donkeys in northeastern Turkey; *Iran J Vet Res* 16 (4), s. 341-344

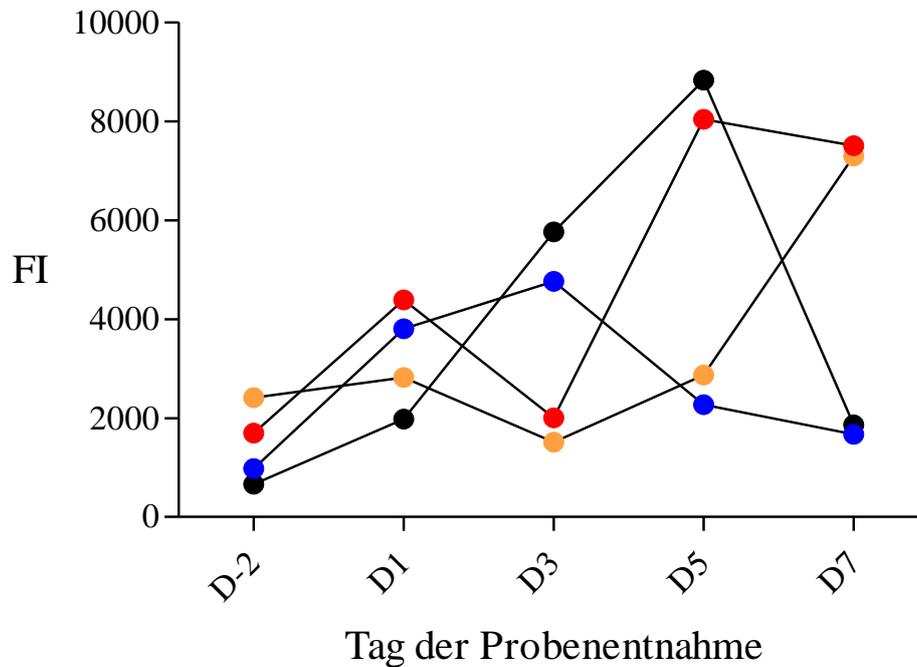
ZEITLER-FEICHT, M., MÜLLER, C., FRANZKY, A., PETTRICH, M., BOHNET, W., DEININGER, E., DÜE, M. und WITZMANN, P. (2009) Leitlinien zur Beurteilung von Pferdehaltungen unter Tierschutzgesichtspunkten; https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tierschutz/GutachtenLeitlinien/HaltungPferde.pdf?jsessionid=E3339DEF300675D5527167F54223DFFE.2_cid367?_blob=publicationFile, zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

ZOETIS DEUTSCHLAND (2017) EQUIP® EHV1,4; <https://www.zoetis.de/products/produktkatalog/index.aspx>, zuletzt aufgerufen am 16.03.2017

IX. ANHANG

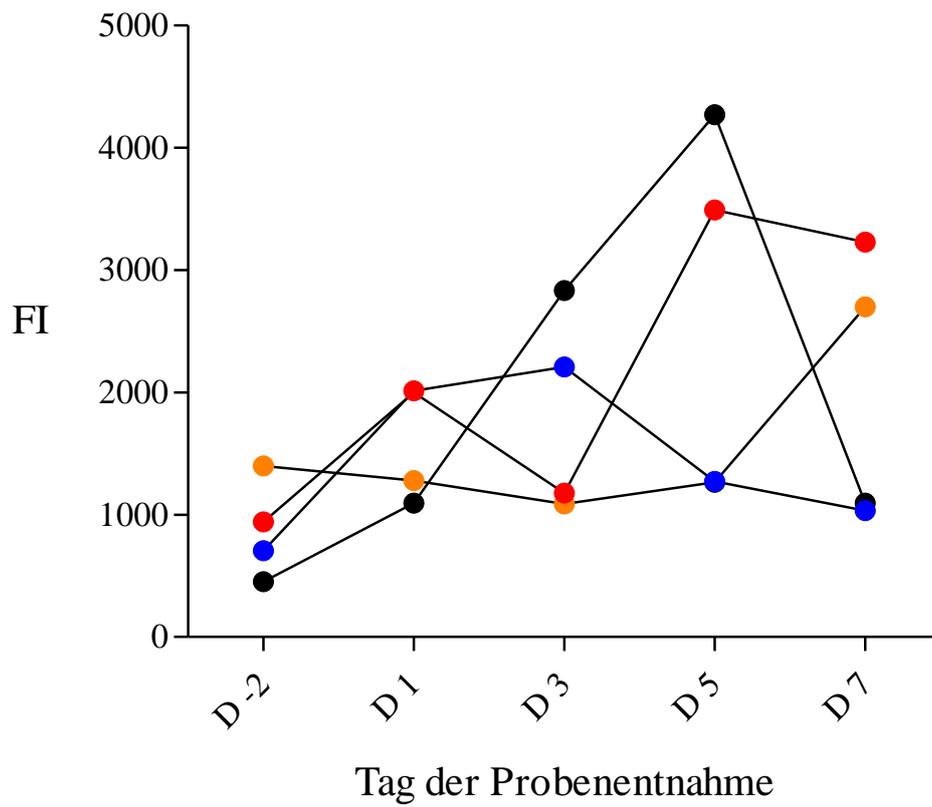
1. Pilotstudie

Abb. A1



Entwicklung der anti-gC-Ig-Konzentration ab 2 Tage vor, bis 7 Tage nach der IN Applikationen eines EHV-1-MLV in der Pilotstudie in 2 Maultieren und 2 Pferden; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (drei Segmente): anti-gC-Ig-Konzentrationen (FI); schwarz: Pferd 1, gelb: Pferd 2, rot: Maultier 1, blau: Maultier 2

Abb. A2



Entwicklung der anti-gD-Ig-Konzentration ab 2 Tage vor, bis 7 Tage nach der IN Applikationen eines EHV-1-MLV in der Pilotstudie in 2 Maultieren und 2 Pferden; x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse (drei Segmente): anti-gD-Ig-Konzentrationen (FI); schwarz: Pferd 1, gelb: Pferd 2, rot: Maultier 1, blau: Maultier 2

Tabelle A1*Anti-gC-Ig, anti-gD-Ig-Konzentrationen in der Pilotstudie*

	Gesamt Ig (FI)	H1	H2	M1	M2
pD-2	anti-gC	659	2409	1697	977
	anti-gD	452	1400	941	705
pD1	anti-gC	1983	2819	4390	3805
	anti-gD	1095	1280	1999	2012
pD3	anti-gC	5759	1512	2004	4760
	anti-gD	2834	1089	1177	2207
pD5	anti-gC	8831	2868	8036	2274
	anti-gD	4270	1266	3493	1273
pD7	anti-gC	1864	7297	7506	1669
	anti-gD	1096	2699	3230	1032

Anti-gC, -gD Ig, gemessen im Luminex Assay; H: Haflinger, M: Maultier, pD: Tag im Verhältnis zur Applikation des MLV

Tabelle A2*IFN- γ Pilotstudie*

	IFN- γ (U/mL)				
	pD-2	pD1	pD3	pD5	pD7
H1	10	14	64	169	17
H2	7	7	7	8	12
M1	9	15	9	67	41
M2	4	8	11	8	9

IFN- γ , gemessen im Luminex Assay; H: Haflinger, M: Maultier, pD: Tag im Verhältnis zur Applikation des MLV

2. Experiment 1

Tabelle A3

Klinische Befunde in den Gruppen D-2 bis D7

	Fieber			NA			LR		
	H	M	G	H	M	G	H	M	G
D -2	0	0	0	6	5	11	0	0	0
D 1	4	1	5	11	6	17	0	0	0
D 2	0	0	0	11	10	21	3	3	6
D 3	0	1	1	5	5	10	5	5	10
D 4	0	0	0	3	4	7	2	4	6
D 5	0	0	0	6	5	11	4	4	8
D 6	0	0	0	4	5	9	1	3	4
D 7	0	0	0	5	5	10	1	4	5

Anzahl der Tiere, die an dem jeweiligen Tag das jeweilige klinische Symptom zeigten; H: Haflinger, M: Maultiere, G: Gesamt; Fieber: >38°C, NA: Nasenausfluss, LR: lokale Reaktion

Tabelle A4

VN-T Experiment 1

	VN			
	D-2	D7	D14	D21
M1	1:128	1:256	1:512	1:256
M2	1:128	1:512	1:512	1:1024
M3	1:128	1:512	1:128	1:256
M4	1:512	1:512	1:512	1:256
M5	1:256	1:64	1:128	1:128
M6	1:128	1:128	1:128	1:128
M7	1:128	1:256	1:128	1:128
M8	1:256	1:1024	1:512	1:2048
M9	1:128	1:512	1:512	1:256
M10	1:128	1:512	1:256	1:128
M11	1:128	1:256	1:1024	1:1024
M12	1:128	1:1024	1:512	1:128
M13				
M14				
M15				
H1	1:128	1:256	1:128	1:256
H2	1:32	1:64	1:256	1:32
H3	1:128	1:256	1:256	1:256
H4	1:64	1:64	1:256	1:256
H5	1:64	1:64	1:256	1:64
H6	1:128	1:256	1:256	1:128
H7	1:64	1:256	1:256	1:256
H8	1:256	1:256	1:512	1:128
H9	1:32	1:32	1:64	1:64
H10	1:128	1:128	1:256	1:256
H11				
H12	1:512	1:512	1:256	1:512

VN beider Gruppen in Experiment 1, gemessen im VN-T; M13-15=Kontrolltiere; H11: Serumprobe D-2 fehlte => Ausschluss aus der VN-Analyse

Tabelle A5

gG-ELISA, Experiment 1

	gG-ELISA (OD _{corr})			
	D-2	D7	D14	D21
M1	0.05	0.05	0.06	0.05
M2	<0	<0	<0	<0
M3	0.07	0.02	0.02	0.01
M4	0.18	0.22	0.25	0.24
M5	0.1	0.06	0.06	0.08
M6	0.19	0.19	0.22	0.18
M7	0.12	0.14	0.14	0.15
M8	0.07	0.09	0.1	0.02
M9	0.22	.27	0.19	0.2
M10	0.01	0.03	0.03	0.04
M11	0.08	0.09	0.08	0.11
M12	0.06	0.41	0.15	0.15
M13				
M14				
M15				
H1	0.03	0.04	0.05	0.04
H2	0.21	0.21	0.22	0.19
H3	<0	<0	<0	<0
H4	0.04	0.06	0.03	0.02
H5	<0	<0	<0	<0
H6	<0	<0	<0	<0
H7	0.07	0.08	0.06	0.07
H8	0	0.01	0.02	0.01
H9	0.26	0.38	0.39	0.35
H10	<0	<0	<0	<0
H11				
H12	<0	<0	<0	<0

VN beider Gruppen in Experiment 1, gemessen im gG-ELISA; M13-15=Kontrolltiere; H11: Serumprobe D-2 fehlte => Ausschluss aus der VN-Analyse

3. Experiment 2

Tabelle A6

VN-T und CFA, Experiment 2

	CF	VN			
	D'-2	D'-2	D'7	D'14	D'21
M1	80	1:128	1:128	1:128	1:128
M2	160	1:256	1:256	1:256	1:64
M3	160	1:128	1:32	1:64	1:32
M4	160	1:512	1:256	1:256	1:128
M5	80	1:64	1:128	1:128	1:64
M6	80	1:64	1:64	1:64	1:64
M7	40	1:128	1:128	1:128	1:128
M8	160	1:512	1:1024	1:1024	1:512
M9	80	1:128	1:128	1:128	1:32
M10	80	1:256	1:64	1:64	1:64
M11	80	1:128	1:128	1:128	1:64
M12	40	1:128	1:64	1:64	1:128
M13	80	1:128	1:64	1:64	1:32
M14	40	1:32	1:64	1:64	1:32
M15	160	1:128	1:128	1:128	1:128
H1	80	1:64	1:256	1:128	1:32
H2	20	1:16	1:16	1:32	1:64
H3	160	1:64	1:32	1:64	1:64
H4	40	1:64	1:32	1:32	1:16
H5	80	1:32	1:16	1:16	1:16
H6	40	1:16	1:32	1:16	1:16
H7	40	1:64	1:64	1:128	1:256
H8	80	1:128	1:128	1:64	1:128
H9	40	1:16	1:32	1:32	1:32
H10	40	1:64	1:128	1:32	1:128
H11	80	1:128	1:256	1:64	1:128
H12	40	1:128	1:256	1:256	1:256

VN und CF beider Gruppen in Experiment 2, gemessen im VN-T und CFA; H: Haflinger, M: Maultier; M13-15=Kontrolltiere; H11: Serumprobe D-2 fehlte => Ausschluss aus der VN-Analyse

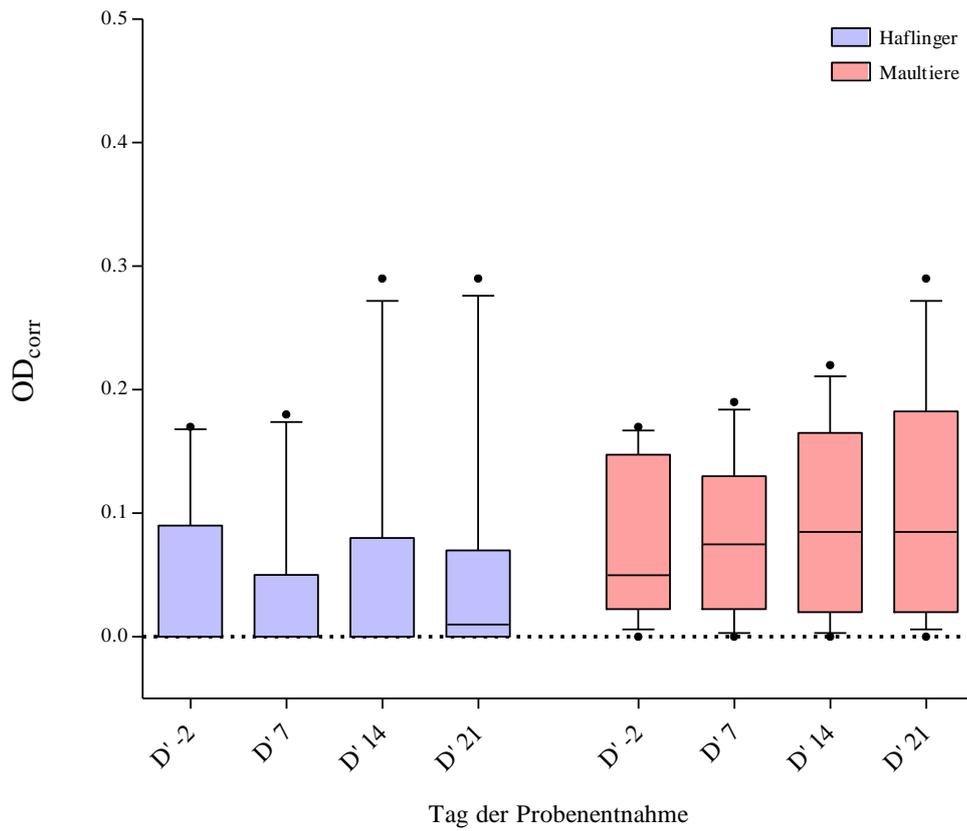
Tabelle A7

gG-ELISA, Experiment 2

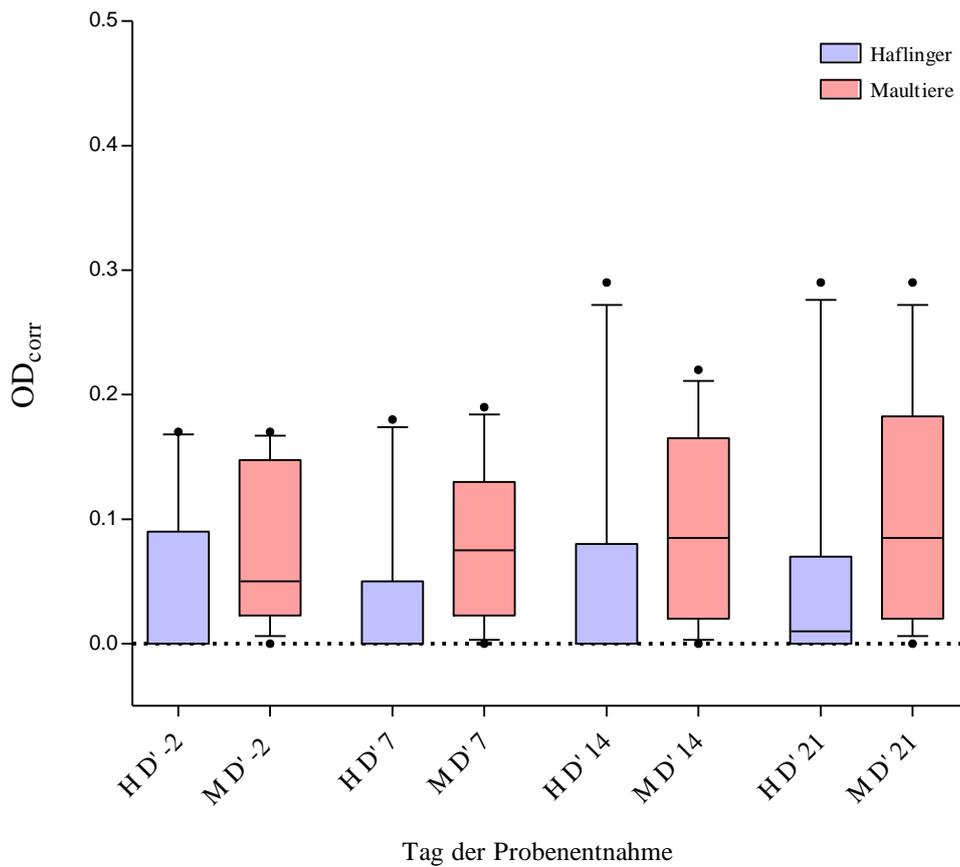
	gG-ELISA (OD _{corr})			
	D'-2	D'7	D'14	D'21
M1	0.03	0.03	0.03	0.03
M2	<0	<0	<0	<0
M3	0.03	0.01	0.01	0.02
M4	0.17	0.19	0.12	0.13
M5	0.06	0.09	0.17	0.29
M6	0.16	0.17	0.19	0.19
M7	0.14	0.13	0.15	0.16
M8	0.02	0.05	0.02	0.04
M9	0.15	0.13	0.11	0.15
M10	0.02	0.02	0.02	0.02
M11	0.04	0.07	0.06	0.02
M12	0.06	0.08	0.22	0.23
M13	0.09	0.1	0.11	0.13
M14	0.06	0.05	0.06	0.06
M15	0.17	0.15	0.17	0.16
H1	0.02	0.02	0.03	0.04
H2	0.17	0.18	0.20	0.22
H3	<0	<0	<0	<0
H4	0.04	0.03	0.03	0.02
H5	<0	<0	<0	<0
H6	<0	<0	<0	0.01
H7	0.09	0.05	0.08	0.07
H8	<0	0	<0	0.01
H9	0.16	0.15	0.29	0.29
H10	<0	<0	<0	<0
H11	0.02	0	0.05	0.06
H12	<0	<0	<0	<0

VN beider Gruppen in Experiment 1, gemessen im gG-ELISA; H: Haflinger, M: Maultier; M13-15=Kontrolltiere; H11: Serumprobe D-2 fehlte => Ausschluss aus der VN-Analyse

Abb. A3



VN-Titer im ELISA nach IN Applikation des MLV in Experiment 2 von D'-2 bis D'-21 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Friedman-Test und post-hoc Dunn's Multiple Comparison Test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: Korrigierte Optische Dichte (OD_{corr})

Abb. A4

VN-Titer im ELISA nach IN Applikation des MLV in Experiment 2 von D'-2 bis D'-21 in Haflingern (blau) und Maultieren (rot) im Vergleich im Mann-Whitney-test; Box-Whisker-Plots (Box 25-75%, Whisker 10-90%, Ausreißer als Punkt); x-Achse: Tag der Probenentnahme; y-Achse: Korrigierte Optische Dichte (OD_{corr})

Tabelle A8

CT-Werte und gB-Moleküle aller Tiere D'-2 bis D'7

	Tag der Probenentnahme									
	D'-2		D'1		D'3		D'5		D'7	
	Ct	gB-Mol/ 5µL	Ct	gB-Mol/ 5µL	Ct	gB-Mol/ 5µL	Ct	gB-Mol/ 5µL	Ct	gB-Mol/ 5µL
H1	-	-	-	-	36	16	-	-	-	-
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	-	-	34	93	-	-	-	-	-	-
H4	-	-	34	120	-	-	-	-	-	-
H5	-	-	35	39	35	68	-	-	-	-
H6	-	-	36	15	-	-	-	-	-	-
H7	-	-	32	433	-	-	-	-	-	-
H8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H9	33	150	32	363	34	96	-	-	-	-
H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H12	-	-	33	271	-	-	-	-	-	-
M1	-	-	-	-	36	14	-	-	-	-
M2	-	-	-	-	-	-	34	50	-	-
M3	-	-	34	56	-	-	-	-	-	-
M4	-	-	34	96	-	-	-	-	36	13
M5	-	-	36	17	35	88	-	-	-	-
M6	-	-	35	23	-	-	-	-	-	-
M7	-	-	28	12270	34	51	-	-	-	-
M8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M10	33	102	35	27	-	-	-	-	-	-
M11	-	-	33	183	-	-	-	-	-	-
M12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M14	-	-	-	-	-	-	-	-	36	10
M15	-	-	-	-	36	16	-	-	-	-

Ct-Werte, Anzahl der gB-Moleküle (gB-DNA-Kopien) in 5µL DNA-Extrakt der Nasentupfer aller Pferde (H1-H12) und Maultiere (M1-M12) einschließlich Kontrollen (M13c.-M15 c.), gemessen mittels qPCR, von D'-2 bis D'7. „-“: >37Ct/kein Ct-Wert/0 Moleküle/µL

Tabelle A9

Ig anti-gB, -gC, -gD Haflinger

	Ig anti- (FI)	D'-2	D'1	D'3	D'5	D'7
H1	gB	809	618	845	1207	993
	gC	2829	2211	3202	6069	2416
	gD	1041	808	1404	2337	1060
H2	gB	1141	246	231	286	305
	gC	6991	566	629	850	891
	gD	2022	204	242	303	306
H3	gB	495	1063	819	1038	331
	gC	1284	3038	2284	2883	606
	gD	715	1727	1173	1609	339
H4	gB	532	1830	1333	2156	888
	gC	2032	10697	8526	15352	2917
	gD	606	3970	2838	6084	1132
H5	gB	165	363	242	2203	1333
	gC	407	1260	805	12097	6420
	gD	133	448	236	4652	2072
H6	gB	607	819	2150	787	387
	gC	3054	4203	15142	3600	1294
	gD	764	1265	6254	1081	358
H7	gB	1064	2831	1709	738	641
	gC	6268	21065	10133	3362	3668
	gD	2151	10598	4414	1180	1195
H8	gB	846	1170	965	1562	938
	gC	4252	6013	4517	8493	3451
	gD	927	1733	1126	2252	1302
H9	gB	367	1518	664	340	212
	gC	736	4805	1806	790	276
	gD	316	2189	765	352	185
H10	gB	726	564	1043	353	270
	gC	3365	2470	4663	1135	664
	gD	682	568	1187	296	220
H11	gB	638	1148	2310	1630	376
	gC	2192	4632	12660	6703	1051
	gD	781	1755	4744	3101	397
H12	gB	527	1542	1673	5265	1732
	gC	1939	8320	8817	23560	6514
	gD	655	2470	2748	13714	2435

Anti-gB, -gC, -gD Ig, gemessen im Luminex Assay in Experiment 2; H: Haflinger

Tabelle A10

Ig anti-gB, -gC, -gD Maultiere

	Ig anti- (FI)	D'-2	D'1	D'3	D'5	D'7
M1	gB	1218	441	1343	581	290
	gC	7859	1401	6750	1898	563
	gD	2167	573	2313	723	254
M2	gB	1184	420	491	1622	1381
	gC	7927	1600	2093	10889	7758
	gD	1433	398	522	2863	1871
M3	gB	1037	960	2009	1548	974
	gC	5004	4190	13499	11039	4010
	gD	1632	1384	4750	3211	1346
M4	gB	1316	1419	1780	1758	1485
	gC	13270	11348	11351	13158	6696
	gD	3967	3112	3716	4357	2310
M5	gB	499	720	1798	1291	1673
	gC	1969	3630	14615	7197	12367
	gD	538	884	4683	2015	3320
M6	gB	2185	885	2957	2021	370
	gC	13296	3684	18874	10354	1123
	gD	6579	1725	11265	5253	517
M7	gB	2527	679	2000	2519	1085
	gC	16205	2274	10856	13560	3580
	gD	10082	1023	5812	9664	1985
M8	gB	2752	1102	2147	1634	2402
	gC	7821	4140	7396	5460	5397
	gD	3862	1903	3829	2697	2766
M9	gB	1011	954	3070	1785	564
	gC	4358	3361	18119	9696	1631
	gD	1233	1064	7182	2728	678
M10	gB	1229	-	3401	1268	1209
	gC	4453	-	18661	4087	4142
	gD	1597	-	9004	1740	1587
M11	gB	1580	707	1730	1132	289
	gC	8421	2354	15399	4817	694
	gD	2575	865	4205	1472	294
M12	gB	1272	757	2096	1430	1372
	gC	8765	3330	17859	14412	9220
	gD	2112	926	7367	3648	2473

Anti-gB, -gC, -gD Ig, gemessen im Luminex Assay in Experiment 2; M: Maultiere

Tabelle A11

Ig anti-gB, -gC, -gD Kontrollen (Maultiere)

	Ig anti- (FI)	D'-2	D'1	D'3	D'5	D'7
M13 c.	gB	734	221	1345	1718	711
	gC	2598	373	6342	8937	2406
	gD	1308	236	2776	4157	1109
M14 c.	gB	660	631	975	989	390
	gC	3873	2434	5826	3927	1244
	gD	1140	847	1628	1533	399
M15 c.	gB	1212	1165	1150	793	644
	gC	11060	6798	6650	4425	3559
	gD	2379	1681	1841	1092	831

Anti-gB, -gC, -gD Ig, gemessen im Luminex Assay in Experiment 2; M c.: Kontroll-Maultiere

4. Zwei Abstracts für die Präsentation erster Ergebnisse der Arbeit auf der International Equine Infectious Disease Conference 2016 in Buenos Aires, Argentinien

Innate and specific immune responses to intranasal modified-live EHV-1 virus vaccination in previously immunised equids - a pilot

EHV-1 infections are a world-wide cause of respiratory disease, late-term abortions and neurological disease. Inactivated and modified-live virus (MLV) vaccines are available for protection. However, availability depends on licensure and regulatory bodies in each country. The likelihood of (re-) infection in the individual animal depends on the infectious dose and on pre-existing immunity. Here, we investigated aspects of the innate and specific mucosal immune responses, as well as the systemic humoral immune response after intranasal application of an MLV vaccine (Prevaccinol[®]; MSD Merck) to animals regularly vaccinated (q6 months) with an inactivated vaccine (Equip[®]EHV-1,4; Zoetis). Our hypothesis was that an immune response occurs rapidly after intranasal application of MLV. Because the potential adverse effects of intranasal application of an MLV licensed for intramuscular application are unknown, we conducted a pilot study in 4 adult animals (2 mules, 2 horses). Clinical data were collected (rectal temperature (fever > 38.0°C), nasal discharge, lymphadenopathy), as well as data on viral nasal shedding, systemic and mucosal antibody production, and (limited) mucosal cytokine production. Time between most recent IM vaccination and start of the pilot was 12 weeks. Animals were quarantined on the premises. Clinical exams were performed daily from the day before (day -1) until day 7 post intranasal MLV application. Nasal swabs were collected on days -1, 1, 3, 5 and 7. Blood samples were collected and serum harvested on days -1, 7, 14 and 21. Nasal swab samples were subjected to detection of virus shedding using RT-qPCR, to measurement of total mucosal antibody concentrations (IgG1, IgG4/7), and to detection of the cytokines IFN- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-17. Virus-neutralising (VN) antibody titres in serum were determined on days -1, 7, 14 and 21. Nasal discharge was observed in all 4 animals within 24 hours and until day 4. Fever or lymphadenopathy was not detected. Virus shedding was low and occurred in 3/4 animals on day 1 and in 1/4 animals on day 3. IL-10 and IL-17 were not detected in any sample. IL-4 was

more frequently detected in mules, also prior to MLV application (day -1). IFN- α was only present in horse' samples, both before (day -1) and after intranasal vaccination. IFN- γ showed a significant increase post intranasal MLV application in all 4 animals. A 3-fold increase in mucosal antibody concentration was observed in 3/4 animal, 24 hours after intranasal MLV application. Intranasal MLV application did not have an effect on VN antibody titres. In conclusion, most animals showed a robust increase in mucosal antibody titres within 24 hours of intranasal MLV application, while significant side effects and nasal viral shedding were minor. Conduction of a full study comparing mucosal immunity between horses and mules is warranted.

Changes in clinical parameters, SAA concentrations and virus-neutralising antibody titres after EHV-1 vaccination in mules and horses

EHV-1 vaccination is performed to ameliorate clinical respiratory disease, late term abortion and myelopathy. Inactivated virus vaccines and few modified-live virus vaccines are available. A product in Europe claiming to aid in abortion prevention has a high antigenic load and manufacturer-specific adjuvants (Equip[®]EHV-1,4; Zoetis). While few horses develop local swelling or fever after IM administration, this is likely unacceptable for horse owners, and could lead to decreased compliance with vaccination. However, a post-vaccination systemic inflammatory response (SIR) could also indicate a more robust specific immunity. Therefore, we hypothesised that horses with detectable SIR will have higher virus-neutralising (VN) antibody titres than horses without detectable SIR. We also tested whether differences exist between vaccinated mules and horses. Adult mules (n=11) and horses (n=11), previously vaccinated with an inactivated EHV-1/EHV-4 vaccine (Equip[®]EHV-1,4) at 6-month intervals on at least two occasions were used. Booster vaccination was performed on day 0 (d0) of the study. Before and daily post vaccination for 7 days, rectal temperature, nasal discharge and mandibular lymph node (MLN) size were recorded. Blood was collected prior to vaccination (d0), on days 3, 5, 7, 14, 21, and additionally when fever was detected. Serum amyloid A (SAA) was measured on d0 – d7 as a marker of SIR. VN titres were measured on d0, 7, 14 and 21. Normality was assessed with the Shapiro-Wilk-test. Mann-Whitney-test was applied to compare horses to mules. A

Spearman-correlation-coefficient (R^2) between the maximum increase in VN titres and the highest SAA value was calculated. Significance was pre-set at $p < 0.05$. Pre-vaccination clinical exams were all normal. A single episode of fever ($>38.0^\circ\text{C}$) occurred in 4/11 (36%) horses and 2/11 (18%) mules (total fever days per subject = 1). All subjects showed seromucous nasal discharge for 7 days. MLN were unremarkable throughout the study. All subjects had increased post-vaccination SAA concentration ($>1.7\text{mg/L}$) on at least one occasion. VN results (median [interquartile range]) were significantly different ($P=0.0058$) between horses (1:256 [1:64; 1:256]) and mules (1:512 [1:256; 1:512]) on day 7. A statistically significant ($P < 0.05$) change in antibody titres compared to baseline (d0) was observed in mules on d7. No significant difference in SAA between horses and mules was recorded. A significant increase in SAA was observed on d3 ($P < 0.001$) and d5 ($P < 0.01$) compared to d0 in both groups. No correlation was observed between peak SAA and the increase in VN titres in horses ($R^2=0.09$, CI:-0.58-0.65; $P=0.80$) or mules ($R^2=0.06$, CI:-0.55-0.67; $P=0.86$). In conclusion, vaccination induced SIR characterised by significantly increased SAA, but the intensity of SIR was not associated with a higher VN antibody response. The immune response differed between groups, with higher antibody production in mules. Overall, the absence of a significant post-vaccination rise in VN titres suggests that the adequacy of current vaccination programs should be further investigated.

X. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt vor allem **Univ.-Prof. Lutz Göhring**, **Priv.-Doz. Dr. Claus-Peter Bartmann** und **Dr. Carlos Medina-Torres** für die engagierte Betreuung der Studie.

Darüber hinaus danke ich dem gesamten **Einsatz- und Ausbildungszentrum für Tragtierwesen 230**, insbesondere **Dr. Franz Edler von Rennenkampff** und **Heike Henseler** für die Unterstützung und Kooperation bei der Planung und Umsetzung der Feldversuche, sowie **Astrid Lotz**, **Marco Schneider**, **Norman Jenß** und **Isabel Kaschade** für die tatkräftige Assistenz bei der Entnahme der Proben.

Ferner geht mein verbindlicher Dank an **Prof. Bettina Wagner**, **Prof. Klaus Osterrieder**, **Dr. Anastasios Moschos**, **Prof. Ann Cullinane**, **Dr. Walid Azab** und **Dr. Armando Damiani** für die Durchführung der Analyseverfahren, die nicht im hauseigenen Labor realisiert werden konnten.

Zusätzliche, essentielle, fachliche Beratung erhielt ich von **Dr. Robert Fux**, **Prof. James Gilkerson** und **Dr. Kees van Maanen**.

Im Labor haben mich außerdem zuverlässig unterstützt: **Ana Maria Ulloa**, **Sylvia Jani** und **Elke Fink**.

Für das Lektorat danke ich **Dr. Anna May**.

Ohne die bedingungslose Rückendeckung meiner lieben Eltern, Dr. Christoph und Katharina Dumrath, wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Ihnen danke ich von ganzem Herzen. Ebenso danke ich meinen Brüdern Wilhelm, Friedrich, und Heinrich, wie auch meiner Verlobten Josephine von Rotenhan, deren aller stetige Zuversicht in das Gelingen der Arbeit, mich sicher durch die Doktorandenzeit getragen hat.

Von Ihm und durch Ihn und zu Ihm sind alle Dinge. Ihm sei Ehre in Ewigkeit!