

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

Epidemiologische Aspekte der Equiden Herpes
Myeloenzephalopathie (EHM)

von Eva Klouth
aus Troisdorf

München 2023

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. Lutz S. Göhring, Ph.D.

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Lutz S. Göhring, Ph.D.

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rolf Mansfeld

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	5
1. Equides Alphaherpesvirus 1 (EHV-1)	5
1.1. Taxonomie	5
1.2. Besonderheiten von EHV-1	5
1.2.1. Infizierte Spezies	5
1.2.2. Latenz	6
1.2.3. Horizontaler Infektionsweg	6
1.2.4. Unterschied zu EHV-4	6
2. Krankheitsbilder einer EHV-1-Infektion.....	7
2.1. Respiratorische Symptome	7
2.2. EHM und Abort	8
2.3. Weitere Komplikationen	8
3. Verläufe von EHM-Ausbrüchen	8
3.1. Risikofaktoren	8
3.2. Risk-factor-analysis und Confounding	9
3.3. Umweltfaktoren	11
3.4. Virusspezifische Faktoren	11
3.5. Andere Faktoren	12
3.6. Wirtsspezifische Faktoren	14
3.6.1. Immunstatus	14
3.6.2. Alter	15
3.6.3. Rasse	15
3.6.4. Geschlecht	16
III. HYPOTHESE	17
IV. ERGEBNISSE	19
1. Publikation I: Apparent Breed Predilection for Equid Herpesvirus-1- Associated Myeloencephalopathy (EHM) in a Multiple-Breed Herd.....	19

2. Publikation II: Epidemiological Aspects of Equid Herpesvirus-Associated Myeloencephalopathy (EHM) Outbreaks	30
V. DISKUSSION.....	45
VI. ZUSAMMENFASSUNG	49
VII. SUMMARY	51
VIII. LITERATURVERZEICHNIS.....	53
IX. DANKSAGUNGEN	63

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAEP	American Association of Equine Practitioners
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BoHV	Bovines Alphaherpesvirus
CaHV	Canides Alphaherpesvirus
CpHV	Caprines Alphaherpesvirus
DNA	deoxyribonucleic acid
EHM	Equide Herpes Myeloenzephalopathie; Equide Alphaherpesvirus-assozierte Myeloenzephalopathie
EHV	Equides Alphaherpesvirus
FHV	Felides Alphaherpesvirus
HHV	Humanes Alphaherpesvirus
IC	index case
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	Interferon
ORF	open reading frame
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
SNP	single nucleotide polymorphism
SuHV	Suides Alphaherpesvirus
TCD	tumor control dose
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSPAN	Tetraspanin
VZV	Varicella Zoster Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Unter den in Europa relevanten Infektionskrankheiten für Pferde, die hohe wirtschaftliche und ideelle Verluste verursachen und Turnier- und Freizeitsport einschränken, spielt das Equide Alphaherpesvirus (EHV) eine tragende Rolle. Erst im Jahr 2021 sorgte der große Ausbruch auf einem internationalen Springturnier in Valencia, Spanien (COUROUCÉ et al., 2021) für großes mediales Interesse.

Unter den Equiden Herpesviren gibt es zwei, die für solche Ausbruchsszenarien relevant sind: EHV-1 und EHV-4. Beide sind Alphaherpesviren und gehören zu den behüllten, doppelsträngigen DNA-Viren (DAVISON et al., 2009). Während EHV-4 hauptsächlich Atemwegserkrankungen verursacht, ist EHV-1 mit einer deutlich höheren Abortrate und der großen Gefahr für die Entwicklung neurologischer Symptome (Equide Herpes Myeloenzephalopathie, neu: Equide Alphaherpesvirus-assoziierte Myeloenzephalopathie, EHM) die gefährlichere Spezies (PATEL und HELDENS, 2005).

Das Virus gelangt über Maul oder Nüstern in den Pferdekörper und vermehrt sich in der pharyngealen Mukosa, penetriert die regionalen Lymphknoten, in denen es sich vermehrt, bevor es zu einer Leukozyten-assoziierten Virämie kommt (ALLEN et al., 1999). Auf dem Blutweg gelangt das Virus zum trächtigen Uterus oder zum ZNS, wo es Endothelinfektionen verursacht. Durch Entzündungen der Gefäßwände und damit verbundene Auswanderung der teils befallenen und nicht-befallenen Zellen kommt es zu perivaskulären Ansammlungen, wodurch lokale Ischämien und dadurch Nekrosen hervorgerufen werden (ALLEN et al., 2004; LUNN et al., 2009). Im trächtigen Uterus führt dies zum Abort des Fetus oder zur Geburt lebensschwacher Fohlen. Besonders im letzten Trimester der Trächtigkeit ist der Uterus für das Virus angreifbar (ALLEN et al., 1999). Im ZNS, fast ausnahmslos im Rückenmark, führt die Unterversorgung zu neurologischen Ausfällen, meist mit stärkerer deutlicherer Ausprägung in der hinteren Körperhälfte beginnend (FRIDAY et al., 2000). Diese reichen von herabgesetztem Schweiftonus über Harnabsatzprobleme und Ataxie bis hin zum Festliegen (FRIDAY et al., 2000). Die Prognose wird mit steigender Schwere der Ausfälle schlechter, sodass ein festliegendes Pferd eine sehr schlechte Prognose hat, wieder zu alter Form zurückzufinden. Häufig werden Pferde nach 48 bis 72-stündigem Festliegen euthanasiert. Erholen sie sich soweit, dass sie wieder aufstehen können, bleibt es häufig bei Ataxien und Schwäche mit geringerer Ausprägung (VAN MAANEN et al., 2001; HENNINGER

et al., 2007).

Da EHM das Ergebnis einer multifaktoriellen Pathogenese ist, erkrankt eine sehr variable Anzahl an Pferden während eines Ausbruchs an EHM und die Verläufe sind unterschiedlich schwer. Es wird bereits seit Jahrzehnten daran geforscht und es wurden verschiedene Faktoren gefunden, die beeinflussen können, welche Pferde und wie viele Pferde neurologisch erkranken. Man unterscheidet zwischen Umweltfaktoren, virusspezifischen und wirtsspezifischen Faktoren (THRUSFIELD, 1986).

Umweltfaktoren sind Außentemperatur und Luftfeuchtigkeit. Es wird vermutet, dass das Virus bei kühleren Temperaturen länger überlebt, daher tritt die überwiegende Zahl der Ausbrüche im Herbst, Winter und frühen Frühjahr auf. Bei Hitze und Trockenheit wird das Virus wahrscheinlich schneller inaktiviert, daher kommt es im Sommer zu deutlich weniger Ausbrüchen (GOEHRING et al., 2006). Weitere Umweltfaktoren sind stallspezifische Besonderheiten, die sich zwischen verschiedenen Ausbrüchen stark unterscheiden können. Es handelt sich um Haltungsform und Konstruktion der Stalleinheiten, die bestimmen, wie groß die Kontaktmöglichkeiten zwischen den Pferden sind. Ferner ist die Größe der Stalleinheiten entscheidend dafür, wie viele Pferde mit dem Infizierten den gleichen Luftraum teilen. Interventionen, die vom Stallpersonal getroffen werden, unterscheiden sich auch oft beträchtlich zwischen den Betrieben, sowohl was den Zeitpunkt als auch was die Qualität der getroffenen Maßnahmen angeht (KLOUTH et al., 2022).

Viruspezifische Faktoren sind zum einen die infektiöse Dosis, mit der ein Pferd in Kontakt kommt (MUMFORD et al., 1994) und zum anderen, ob das Virus über eine bestimmte Strangvariante verfügt. Man spricht hier über die Zugehörigkeit zur N- oder D-Variante. Die beiden Varianten unterscheiden sich durch eine Punktmutation (Single nucleotide polymorphism, SNP) im Polymerase-Gen (ORF30) an Position 2254. Bei der N-Variante befindet sich an dieser Stelle ein Asparagin, bei der D-Variante eine Asparaginsäure (NUGENT et al., 2006; PRONOST et al., 2010). Sowohl die Replikation als auch die Virämie verlaufen bei der D-Variante robuster, wodurch es zu einer höheren Virämie und zu einer schnelleren Ausbreitung in der Umgebung kommt (ALLEN und BREATHNACH, 2006; ALLEN, 2008; PRONOST et al., 2010). Retrospektiv wurde bei EHV-1-Ausbrüchen mit EHM häufiger die D-Variante gefunden als die N-Variante. Das bedeutet jedoch nicht, dass die N-Variante keine (schweren) EHM-Ausbrüche verursachen kann, wenn die Umstände entsprechend sind, wie unter anderem auch der

oben genannte Ausbruch in Spanien 2021 zeigt (KUBACKI et al., 2021; VEREECKE et al., 2021).

Da ein Ausbruch in einem Betrieb zu einer bestimmten Jahreszeit stattfindet und damit Temperatur und Luftfeuchtigkeit relativ konstant sind und da der Ausbruch meistens nur die Infektion mit einem Subtyp beinhaltet und es sich nur selten um Mischinfektionen handelt, geht man davon aus, dass es außerdem wirtsspezifische Faktoren gibt. Diese werden seit Jahren intensiv diskutiert. Rasse-, Alters- und Geschlechtsprädispositionen werden vermutet. Goehring et al. konnten in einer vierjährigen Studie in den Niederlanden Rasseprädispositionen für Traber, Barockpferde und Kaltblüter im Vergleich zu Robustponys (Shetlandpony and Dartmoor-Pony) nachweisen (GOEHRING et al., 2006). Schwerwiegende Ausbrüche in Gestüten bestimmter Rassen (Englisches Vollblut, Lipizzaner, Warmblut) legen nahe, dass diese Rassen ebenfalls ein erhöhtes Risiko haben (GREENWOOD und SIMSON, 1980; BÜRKI et al., 1984; WALTER et al., 2013), während Beschreibungen über Ausbrüche in Betrieben, in denen größtenteils Araber, Islandpferde, Haflinger oder Shetlandponys gehalten werden, in der Literatur nicht zu finden sind.

Allen beschrieb 2008 ein erhöhtes Risiko für alte Pferde > 20 Jahre (ALLEN, 2008) in einer experimentellen Infektionsstudie mit 36 Pferden. Goehring et al. (GOEHRING et al., 2006) und Henninger et al. (HENNINGER et al., 2007) fanden eher ein Risiko für erwachsene Pferde > 3 bzw. > 5 Jahre. Fohlen und Jungpferde erkrankten nur sehr selten an der neurologischen Verlaufsform. Maxwell et al. (MAXWELL et al., 2017) nutzten das so genannte „old-horse-model“ für ihre experimentelle Infektionsstudie und erreichten mit der Infektion alter Stuten (> 20 Jahre) eine hohe EHM-Rate.

Auch geschlechtsspezifische Unterschiede scheinen zu existieren. So waren in einem großen EHV-1-Ausbruch während eines Westernturniers in den USA im Jahre 2011 Stuten signifikant mehr gefährdet für neurologische Symptome als Wallache und Hengste (TRAUB-DARGATZ et al., 2013). In der retrospektiven Analyse von Goehring et al. (GOEHRING et al., 2006) hatten Stuten ein höheres Risiko für einen schweren Verlauf.

Da mehrere Impfstoffe gegen EHV-1 existieren, entsteht auch immer wieder die Diskussion, ob eine Impfung das Auftreten von EHM reduzieren kann. Gleichzeitig gibt es aber auch Gerüchte, die Impfung könne das Risiko für die neurologische Verlaufsform sogar erhöhen. Traub-Dargatz et al. (TRAUB-DARGATZ et al., 2013) konnten nachweisen, dass Pferde, die kurz vor der Exposition (bis zu fünf Wochen) die letzte

Impfung erhalten hatten, ein höheres Risiko hatten, an EHM zu erkranken, als ungeimpfte oder Pferde, deren letzte EHV-1-Impfung schon länger zurücklag. Henninger et al. (HENNINGER et al., 2007) entdeckten, dass Pferde, die drei- bis viermal im Jahr vor dem Ausbruch geimpft worden waren ein höheres Risiko für die Entstehung neurologischer Symptome hatten. Allerdings waren genau diese Pferde auch die älteren Pferde, die in dieser Studie ein höheres Risiko hatten zu erkranken.

Ziel unserer Studie war es, die wirtsspezifischen Faktoren Alter, Rasse, Geschlecht und Impfstatus epidemiologisch zu untersuchen. Dafür wurden über drei Jahre retrospektive Daten von EHV-1-Ausbrüchen gesammelt. 13 Ausbrüche aus unterschiedlichen Betrieben in Deutschland, Schweden und Dänemark mit fast 600 Pferden kamen zusammen. In einem dieser Ausbrüche waren die Daten so umfangreich und die Bedingungen, unter denen verschiedene Rassen gemeinsam gehalten wurden, so gut randomisiert, dass er zusätzlich für sich alleine ausgewertet und veröffentlicht wurde. Probleme der Untersuchungen waren, dass meistens nicht alle Pferde in einem Betrieb getestet wurden, sodass nur bei Pferden, die auch Symptome wie Fieber entwickelt haben und bei jenen, die positiv getestet wurden, davon ausgegangen werden kann, dass sie die Infektion durchgemacht haben. Um Pferde auszuschließen, die nicht mit dem Virus in Kontakt waren, wurden einzelne Stalltrakte, in denen keine Symptome auftraten, komplett von der Analyse ausgeschlossen. Van Maanen et al. (VAN MAANEN et al., 2001) wiesen im Jahre 1995 im Rahmen eines EHV-1-Ausbruchs bei 40 von 41 Pferden hohe EHV-1-Antikörpertiter nach, 28 davon serokonvertierten während des Ausbruchs, 12 hatten schon zu Beginn hohe Titer. Man kann also davon ausgehen, dass in einem Stalltrakt, in dem sich infizierte Pferde befinden, auch die anderen Pferde mit dem Virus in Kontakt kommen. Ein weiteres Problem stellen die unterschiedlichen Bedingungen in den einzelnen Betrieben dar: Unterschiedliche Haltungsformen, variable Zeiträume zwischen Symptombeginn beim Index-Case (IC) und der Diagnose EHV-1 und unterschiedliche Interventionen und Behandlungen. Wir benannten diesen Parameter als „Farm-Effekt“ und ließen ihn in einige statistische Auswertungen mit einfließen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Equides Alphaherpesvirus 1 (EHV-1)

Das Equide Alphaherpesvirus 1 wurde bis 2021 als Equides Herpesvirus 1 bezeichnet (STOKOL und SOBOLL HUSSEY, 2020).

1.1. Taxonomie

Das Internationale Komitee für Virustaxonomie (ICTV) ordnet EHV-1 der Ordnung der *Herpesvirales* zu. Innerhalb derer gehört es zur Familie der *Herpesviridae*, die sich in unterschiedliche Subfamilien unterteilen, je nach Wirt, Zelltropismus und Replikationszyklus: *Alpha-*, *beta-* und *gamma-herpesvirinae* (GATHERER et al., 2021). EHV-1 gehört zu den *Alphaherpesvirinae* und innerhalb derer zum Genus *Varicellovirus* (GATHERER et al., 2021). Damit gehört es zum gleichen Genus wie das Bovine Alphaherpesvirus 1 (Infektiöse Bovine Rhinotracheitis Virus, BoHV1), das Bovine Alphaherpesvirus 5 (Bovines Encephalitis Herpesvirus, BoHV5), das Canide Alphaherpesvirus 1 (CaHV1), das Caprine Alphaherpesvirus 1 (CpHV1), das Felide Alphaherpesvirus 1 (FHV1), das Suide Alphaherpesvirus 1 (Pseudorabies Virus, SuHV1), das Humane Alphaherpesvirus 3 (Varicella Zoster Virus, HHV3) und die Equiden Alphaherpesviren EHV-3 (Equides Koitalexanthem Virus), EHV-4 (Equides Rhinopneumonitis Virus), EHV-8 (auch: Asinin herpesvirus 3) und EHV-9 (GATHERER et al., 2021). Wie alle Herpesviridae ist EHV-1 ein behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus mit einem ikosaedrischen Kapsid (GATHERER et al., 2021). EHV-2 und -5 gehören zur Subfamilie der Gammaherpesviridae und innerhalb derer zum Genus Percavirus (GATHERER et al., 2021).

1.2. Besonderheiten von EHV-1

1.2.1. Infizierte Spezies

Außer Equiden (Pferde, Esel, Maultiere, Maulesel, Onager und Zebras) (MONTALI et al., 1985; ATASEVEN et al., 2009; YILDIRIM et al., 2015; NEGUSSIE et al., 2017) infiziert EHV-1 auch Lamas, Alpakas, Eisbären und Nashörner. Es kann auch hier neurologische Symptome und Abort verursachen (WHITEHEAD und BEDENICE, 2009; ABDELGAWAD et al., 2014; FLANDERS et al., 2018). Zu Studienzwecken wurden außerdem auch Mäuse und Hamster mit EHV-1 infiziert, was auch bei diesen Spezies zu

Enzephalitiden und Aborten führte (WALKER et al., 1999; EL-HABASHI et al., 2019).

1.2.2. Latenz

Eine weitere Besonderheit von Equiden Alphaherpesviren ist die Latenz bei einem einmal infizierten Tier. 60% der Reitpferdepopulation sind vermutlich latent infiziert (EDINGTON et al., 1994). 80-90 % der Pferde werden vermutlich mit EHV-1 infiziert, bevor sie 2 Jahre alt sind (OLADUNNI et al., 2019). Während Gammaherpesviren das Lymphgewebe als Rückzugsort nutzen, favorisieren Alphaherpesviren periphere sensorische Nerven (GIEßLER, 2021). EHV-1 findet sich typischerweise im Trigemininalganglion, weil die Nervenendigungen leicht über den Respirationstrakt zu erreichen sind (SLATER et al., 1994). EHV-1 wurde allerdings auch schon latent im Lymphgewebe des Respirationstraktes entdeckt (WELCH et al., 1992; EDINGTON et al., 1994; CHESTERS et al., 1997; SMITH et al., 1998). Giessler et al. fanden heraus, dass EHV-1, neben der Wanderung an peripheren Nerven, sehr wahrscheinlich T-Lymphozyten als Transportmittel ins Abdomen und damit zu anderen Organen nutzt, ähnlich wie das humane Varicella-Zoster-Virus (VZV oder HHV3) (GIESSLER et al., 2020). Bei Immunschwäche, möglicherweise verursacht durch andere Infektionen, durch Medikamente oder auch durch Stress, kann es zur Reaktivierung und zur Ausbildung klinischer Symptome kommen (LUNN et al., 2009; PUSTERLA et al., 2009). Dieser Prozess wird als Reaktivierung und Rekrudeszenz bezeichnet (PUSTERLA et al., 2009).

1.2.3. Horizontaler Infektionsweg

EHV-1 wird horizontal per Tröpfchen- oder Schmierinfektion, auch über kontaminierte Objekte, übertragen (LUNN et al., 2009). Dafür benötigt es keinen Vektor. Das unterscheidet das Virus von zahlreichen anderen Viren, wie z. B. Togaviren und Flaviviren (Flaviviridae), die durch Vektoren, in diesem Falle Insekten, auf den Wirt übertragen werden (SCHMALJOHN und MCCLAIN, 1996).

1.2.4. Unterschied zu EHV-4

EHV-1 und EHV-4 werden oft miteinander verglichen, nicht zuletzt, weil der übliche in Deutschland verwendete inaktivierte Impfstoff ein Kombinationsimpfstoff gegen beide Viren ist (ZOETIS, 2017). Eine Infektion mit EHV-4 kann zunächst auch durchaus ähnlich ablaufen wie eine EHV-1-Infektion. Betroffene Pferde zeigen hier ebenfalls Fieber, zusätzlich häufig respiratorische Symptome wie Nasenausfluss, geschwollene Lymphknoten und teilweise Husten (REED und TORIBIO, 2004). Diese Symptome sind

bei Infektionen mit EHV-4 sogar teilweise stärker ausgeprägt (SLATER et al., 2006). Allerdings handelt es sich hier häufiger um Jungpferde-Infektionen und daher um Erstinfektionen. Der wichtige Unterschied einer EHV-4-Infektion im Vergleich zu einer EHV-1-Infektion ist, dass EHV-4 meist keine nachweisbare Virämie verursacht, sondern lokal im Respirationstrakt begrenzt bleibt. Somit kommt es auch nicht zu einer systemischen Infektion mit weiteren Komplikationen, weil keine anderen Organsysteme angegriffen werden (SLATER et al., 2006).

2. Krankheitsbilder einer EHV-1-Infektion

2.1. Respiratorische Symptome

Nach oraler oder nasaler Aufnahme infiziert das Virus schnell das Epithel des Respirationstraktes und repliziert dort (ALLEN et al., 1999). Dadurch kommt es im Epithel zu Erosionen der mukosalen Oberfläche (LUNN et al., 2009). Gleichzeitig verbreitet sich das Virus unterhalb des Epithels und infiziert empfängliche Zellen (Leukozyten und Endothelzellen) (ALLEN et al., 1999). 24-48 Stunden nach Infektion gelangt das Virus in die Lymphknoten der oberen Atemwege (KYDD et al., 1994; LUNN et al., 2009). In den Lymphknoten gelangt das Virus schließlich in Monozyten und (T)-Lymphozyten und dann intrazellulär ins Gefäßsystem (Blut- und Lymphkreislauf) (ALLEN et al., 1999). Es kommt zur Zell-vermittelten Virämie in „Peripheral blood mononuclear cells“ (PBMC). Über einen Zeitraum von 10-14 Tagen nach der Infektion scheidet das infizierte Pferd über die Atemwegssekrete Virus aus und ist damit für andere Pferde infektiös (LUNN et al., 2009). Bei Erstinfektion von Jungtieren kommt es meist zur ausgeprägten Atemwegserkrankung (ALLEN und BREATHNACH, 2006; LUNN et al., 2009); nur ein kleiner Anteil der erwachsenen Pferde entwickelt respiratorische Symptome (SLATER et al., 2006). Respiratorische Ausprägungen sind Fieber, geschwollene Lymphknoten, seröser, muköser oder mukopurulenter Nasenausfluss und selten Husten (GREENWOOD und SIMSON, 1980; GOEHRING et al., 2006). Begleitet werden diese Symptome oft von Konjunktivitiden und Ödemen, meist an den distalen Gliedmaßen (GREENWOOD und SIMSON, 1980; VAN MAANEN et al., 2001). Die betroffenen Pferde zeigen gleichzeitig häufig Inappetenz und sind apathisch (GREENWOOD und SIMSON, 1980; HENNINGER et al., 2007). Adulte Pferde werden meist erst auffällig, wenn sie bereits virämisch sind und daraufhin (hohes) Fieber entwickeln (SLATER et al., 2006).

2.2. EHM und Abort

Die Pathogenese der EHM und des Aborts ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Mit Hilfe der PBMC gelangt das Virus ins Blut (Zell-assoziierte Virämie) (ALLEN et al., 1999). Die Virämie führt zu einer systemischen Verbreitung des Virus. Unter anderem wird das Endothel von Gefäßen des zentralen Nervensystems (ZNS) und des Endometriums befallen (EDINGTON et al., 1986). Es kommt zu Vaskulitiden, Mikrothrombosen und Auswanderung der PBMC aus den Gefäßen mit anschließenden perivaskulären Ansammlungen und thromboischämischen Infarkten, gefolgt von Nekrosen von Anteilen des Rückenmarks (GOEHRING et al., 2006; LUNN et al., 2009), bzw. im Uterus von Microcotyledonen (ALLEN et al., 1999; SLATER et al., 2006). Bei Befall des ZNS – meist ist das gesamte Rückenmark betroffen, selten das Gehirn (LUNN et al., 2009) – folgen zentralnervöse Ausfälle, vorwiegend der hinteren Körperhälfte (FRIDAY et al., 2000) mit Schweifatonie, Harnabsatzstörungen, Paresen/Paralysen und Ataxien, bis hin zum Festliegen (SLATER et al., 2006; PRONOST et al., 2012). Im Uterus geht das Virus in den meisten Fällen auf den Fötus über und führt zu einer verfrühten Ablösung der Placenta und damit zum Abort (ALLEN et al., 1999; SLATER et al., 2006).

2.3. Weitere Komplikationen

Weitere Komplikationen einer Virämie sind häufig Ödeme an den Gliedmaßen, seltener am Unterbauch (GREENWOOD und SIMSON, 1980; VAN MAANEN et al., 2001). Es kann zu Vaskulitiden über die bisher genannten Organe hinaus kommen. Ferner sind Lungenödeme, Lungenthrombosen und Enteritiden beschrieben (WHITWELL und BLUNDEN, 1992; DEL PIERO et al., 2000).

3. Verläufe von EHM-Ausbrüchen

3.1. Risikofaktoren

10-50 % der Pferde entwickeln EHM im Rahmen eines EHV-1-Ausbruchs (GREENWOOD und SIMSON, 1980; VAN MAANEN et al., 2001; SLATER et al., 2006; HENNINGER et al., 2007; PRONOST et al., 2012). Es gibt zahlreiche Gründe dafür, dass diese Zahl so stark schwankt.

Im „Equine Herpesvirus-1 Consensus Statement“ von 2009 (LUNN et al., 2009) wurde eine Reihe von Risikofaktoren definiert, die aus verschiedenen Fallberichten, Ausbruchsanalysen und einigen epidemiologischen Studien zusammengetragen wurden. Dabei handelt es sich bei den Faktoren 1-10 um bekannte Risikofaktoren und bei den

Faktoren 11-13 um vermutete Risikofaktoren:

- 1) Es muss das Virus EHV-1 und es müssen empfängliche Pferde vorhanden sein.
- 2) Es muss ein infiziertes, ausscheidendes Pferd vorhanden sein.
- 3) Die Mehrzahl der Ausbrüche tritt im Spätherbst, Winter und Frühjahr auf.
- 4) Das Alter ist ein bestätigter Faktor in der Entwicklung von EHM. EHM kann bei Pferden jeden Alters auftreten, sogar bei Jährlingen, es ist aber bei jungen Tieren deutlich seltener.
- 5) Nach Exposition sind die Pferde 3-6 Monate vor einer Reinfektion geschützt.
- 6) Abort kann bei Stuten jeden Alters auftreten, tritt aber fast immer im letzten Drittel der Trächtigkeit auf.
- 7) Pferde mit hohem Fieber ($> 103,5^{\circ} \text{ F} = 39,7^{\circ} \text{ C}$) und länger anhaltendem hohem Fieber haben ein höheres Risiko für die Entwicklung von EHM.
- 8) Häufig wird vom Hinzukommen neuer Pferde kurz vor einem EHV-1-Ausbruch, insbesondere einem EHM-Ausbruch, berichtet.
- 9) Die klinische Infektion mit der D-Variante ist bei an EHM erkrankten Pferden häufiger als die Infektion mit der N-Variante.
- 10) Rasse und Geschlecht wurden als Risikofaktoren für EHM identifiziert.
- 11) Die geografische Lage scheint bei der Entwicklung von EHM eine Rolle zu spielen.
- 12) Stressoren wie Absetzen, Umstallen, Transport und Co-Infektionen gehen häufig einer EHV-1-Infektion voraus.
- 13) Es wird vermutet, dass der Immunstatus einen Zusammenhang mit der Entwicklung von EHM hat.

Die Risikofaktoren werden im Folgenden in Umweltfaktoren, viruspezifische Faktoren und wirtsspezifische Faktoren unterteilt.

3.2. Risk-factor-analysis und Confounding

Das Auftreten einer Infektionskrankheit bei einem bestimmten Tier kann von vielen Faktoren abhängig sein (THRUSFIELD, 1986). Mit dem Wissen über diese Faktoren kann man bestimmte Tiere als gefährdet einstufen und damit unter Umständen das Auftreten oder die Weiterverbreitung von Krankheiten verhindern (THRUSFIELD, 1986). Nach Thrusfield können die Risikofaktoren auf drei Arten unterteilt werden: 1) primär oder sekundär, 2) intrinsisch oder extrinsisch, und 3) mit Umwelt, Erreger oder Wirt assoziiert.

Bei manchen Infektionskrankheiten ist der Erreger der wichtigste Risikofaktor und andere scheinen von geringer Wichtigkeit zu sein. Bei anderen, multifaktoriellen Krankheiten kann eine Interaktion zwischen den einzelnen Risikofaktoren identifiziert werden und kann sogar notwendig sein, um die Krankheit auszulösen (THRUSFIELD, 1986). Auf der Basis bisheriger Beobachtungen und Forschungen wurden oben genannte Risikofaktoren für EHM ermittelt.

Risikoanalyse ist definiert als ein Prozess, der aus drei Komponenten besteht: Risikoeinschätzung, Risikomanagement und Risikokommunikation. Risikoeinschätzung beinhaltet die Identifikation der Gefahr, die Charakterisierung der Gefahr, die Beurteilung der Exposition und die Charakterisierung des Risikos. Risikomanagement ist der Prozess, in dem Alternativen abgewogen werden und regulatorische Maßnahmen beschlossen werden. Risikokommunikation ist der Austausch von Informationen über das Risiko zwischen beteiligten Parteien (THRUSFIELD, 2018). Risikoanalyse ist also die Basis für die Analyse von Zusammenhängen im Rahmen einer Infektionskrankheit.

Doch nicht jeder Faktor, der bei der Betrachtung von Daten eines Ausbruchsszenarios als Risikofaktor erscheint, ist auch ein solcher. Bei der statistischen Auswertung eines Ausbruchs sind einige Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten. Faktoren, die in der Analyse ein Risiko dazustellen scheinen, können sogenannte Confounder, Störfaktoren sein (KYRIACOU und LEWIS, 2016). Beim Confounding ist der zu untersuchende Effekt (scheinbarer Effekt) mit dem Effekt einer anderen Variable vermischt (VAN STRALEN et al., 2010). Die Analyse resultiert in einer verzerrten oder sogar umgekehrten Bewertung der Auswertungsergebnisse (MCNAMEE, 2003). Die Gefahr für Confounding kann durch gutes Studiendesign reduziert werden (MCNAMEE, 2003). Es gibt drei Kriterien, die erfüllt werden müssen, um eine Variable als potentiellen Confounder zu benennen: 1) Die Variable muss mit der Exposition assoziiert und damit ungleich unter den exponierten Gruppen verteilt sein. 2) Die Variable muss ein Risikofaktor für die Krankheit sein. 3) Die Variable sollte kein Zwischenschritt zwischen Exposition und Krankheit sein. Wenn diese Kriterien erfüllt sind, kann es sein, dass die Variable ein Confounder ist (JAGER et al., 2008; VAN STRALEN et al., 2010). Es gibt eine Reihe von Methoden, die beschrieben sind, um Confounding zu kontrollieren oder zu verhindern: Randomisierung, Restriktion, Angleichung und Schichtung (JAGER et al., 2008).

3.3. Umweltfaktoren

Der entscheidende Umweltfaktor für den Verlauf eines EHV-1-Ausbruchs ist die Jahreszeit, wahrscheinlich Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Die überwiegende Zahl der Ausbrüche findet im Winter und frühen Frühjahr bei nassem und feuchtem Wetter statt (GOEHRING et al., 2006; LUNN et al., 2009). Dabei spielt es allerdings auch eine Rolle, dass Pferde im Winter mehr Zeit im Stall verbringen und dadurch leichter Infektionen übertragen werden können. Schließlich kann EHV-1 auf verschiedenen Materialien und bei unterschiedlichen Temperaturen, auch in Innenräumen, mindestens 48 Stunden infektiös bleiben (SAKLOU et al., 2021).

3.4. Virusspezifische Faktoren

Schon 1994 hatten Mumford et al. (MUMFORD et al., 1994) durch unterschiedliche Infektionsexperimente mit verschiedenen Virussträngen die Erfahrung gemacht, dass eine bestimmte infektiöse Dosis notwendig ist, um Symptome auszulösen. Sie nutzten den häufig EHM-auslösenden Ab4-Strang und zusätzlich den V592/2-Strang, der in der Vergangenheit mehr Aborte als EHM ausgelöst hatte. Bei Exposition mit einem Aerosol, das V592/2 enthielt, konnten auch bei längerer Exposition (=höhere infektiöse Dosis), kaum Symptome ausgelöst werden. Bei Exposition mit einem Aerosol des Ab4-Strangs ($10^{7.5}$ TCD₅₀) wurde schwere EHM ausgelöst. Zwei von sieben tragenden Stuten waren festliegend und wurden euthanasiert, die fünf verbliebenen entwickelten alle eine Ataxie für mindestens fünf Tage. Drei der Stuten abortierten. Bei intranasaler Infektion mit dem gleichen Virus in der Konzentration 10^7 TCD₅₀ abortierten vier von fünf Stuten und eine wurde festliegend und daraufhin euthanasiert. Nach zehnfacher Reduktion der Dosis auf 10^6 TCD₅₀ wurden erneut fünf Stuten intranasal infiziert. Hier abortierten vier Stuten und keine von ihnen entwickelte neurologische Symptome. In jedem der Experimente wurde nachgewiesen, dass alle Pferde infiziert waren, entweder durch Nachweis einer Virämie oder einer Serokonversion.

Außerdem ist nachgewiesen, dass es EHV-1-Genotypen von unterschiedlicher Virulenz gibt. Nugent et al. (NUGENT et al., 2006) fanden im Jahre 2006 heraus, dass der bereits als neuropathogener Ab4-Strang bekannte EHV-1-Genotyp eine Mutation ist. Er entsteht durch eine Punktmutation an Position 2254 des ORF30-Gens (katalytischer Abschnitt der DNA-Polymerase). Statt eines Asparagins (Aminosäure N752) wird eine Asparaginsäure (Aminosäure D752) eingebaut (NUGENT et al., 2006; PRONOST et al., 2010). Die beiden Genotypen werden seither als N- und D-Variante bezeichnet. Die D-Variante kann

sich im Pferd besser replizieren und damit signifikant höhere Virustiter erreichen (ALLEN und BREATHNACH, 2006; ALLEN, 2008; PRONOST et al., 2010). Es wird angenommen, dass durch die höhere Replikationsrate auch leichter Endothelzellen infiziert werden können, wodurch der Blutfluss zum ZNS und die Entwicklung neurologischer Symptome beeinflusst werden können (PRONOST et al., 2010). Perkins et al. wiesen 2009 nach, dass die Wahrscheinlichkeit für EHM im Zusammenhang mit der D-Variante 162-mal höher ist als mit dem N-Typ (PERKINS et al., 2009; PRONOST et al., 2010). Interessanterweise ist bei Aborten die Infektion mit dem N-Strang häufiger (LUNN et al., 2009). Trotzdem können Ausbrüche mit der N-Variante auch zu hohen EHM-Raten führen (KUBACKI et al., 2021; VEREECKE et al., 2021). Gründe dafür könnten unter anderem auch Mutationen in anderen als den bisher untersuchten DNA-Abschnitten sein (LIU et al., 2006; PERKINS et al., 2009; PRONOST et al., 2010; SMITH et al., 2010).

3.5. Andere Faktoren

Damit eine gewisse infektiöse Dosis ins Pferd gelangt, ist eine Übertragung notwendig. Die kann entweder per direktem Kontakt mit anderen infizierten Equiden, über belebte oder unbelebte Objekte, an denen Virusmaterial vorhanden ist, oder als Aerosol erfolgen (LUNN et al., 2009). Diverse Faktoren, die stallspezifisch sind, machen hier einen entscheidenden Unterschied. Zunächst nimmt die Haltungform essentiellen Einfluss auf die Übertragungsmöglichkeiten zwischen den Tieren. Stehen alle Pferde in einer Herde, kann ein Pferd alle anderen infizieren. In Stallgassen ist die Gefahr schon insoweit gemindert, dass ein Pferd nur zu zwei weiteren direkten Kontakt hat und dass, je nach Größe der Stallgasse, auch nur eine begrenzte Anzahl an Pferden den gleichen Luftraum teilt. Problematisch wird es wieder, wenn Pferde aus unterschiedlichen Stalltrakten tagsüber zusammen auf Paddock oder Weide stehen und so Austausch zwischen den Stalltrakten stattfinden kann (KLOUTH et al., 2021). Eine sehr sichere Möglichkeit der Haltung in Bezug auf Infektionskrankheiten ist die Trennung einzelner Boxen durch feste Holzwände statt durch Gitterstäbe. Hier kann kein direkter Nasenkontakt stattfinden, wodurch die Infektionsgefahr deutlich geringer ist. Andererseits ist die Haltung im Freien aus dem Grund zu bevorzugen, dass in Innenräumen viel weniger Luftzirkulation stattfindet, was zu einer höheren Anreicherung der Luft mit Aerosolen führt (ROWE et al., 2021). Isolierte Haltungsformen widersprechen außerdem den tierschutzrechtlich geforderten Haltungsformen (BMELV, 2009).

Herrscht bereits eine Ausbruchssituation in dem jeweiligen Betrieb, so kommt es auch hier entscheidend darauf an, welche Interventionen zu welchem Zeitpunkt getroffen werden, um eine weitere Ausbreitung zu verhindern. Die Absonderung der betroffenen Pferde, am besten in einem separaten Stalltrakt, wenn dies nicht möglich ist, mit einer Abgrenzung zu den Nachbarpferden, die Nasenkontakt verhindert, ist hierbei der wichtigste Teil (eigene Erfahrung). Außerdem muss das Personal instruiert werden, dass kranke Pferde immer als letzte versorgt werden, dass Pferde so wenig wie möglich angefasst und getrennt voneinander bewegt werden, dass zwischen den Stalltrakten die Kleidung gewechselt wird und dass Desinfektionsmaßnahmen eingeführt werden. Gegenstände, die im Isolationsstall benutzt werden, sollten dort vorerst auch bleiben. Der sonstige Personenverkehr sollte während des Ausbruchs so gering wie möglich gehalten werden. Besitzer dürfen zu ihren Pferden, aber keine anderen Pferde anfassen. Reitlehrer und sonstige nicht zwingend benötigte Berufsgruppen dürfen das Gelände vorerst nicht betreten. Schmiede und Tierärzte müssen informiert werden, um Hygienevorkehrungen treffen zu können und sollten auch nur zu notwendigen Terminen kommen. Selbstverständlich darf kein Pferd während der Quarantäne den Stall verlassen oder neu einziehen. In Betrieben, in denen schnell und konsequent gehandelt wird und auch schon vor der Diagnosestellung bei Verdacht solche Maßnahmen ergriffen werden, breitet sich die Infektion erfahrungsgemäß meist weniger stark aus (KOHN et al., 2006; LUNN et al., 2009; GOEHRING et al., 2010b; GÖHRING et al., 2021). Die Menge an Virusmaterial, die vom infizierten Pferd ausgeschieden wird, nimmt mit der Dauer der Erkrankung ab. So konnten Burgess et al. (BURGESS et al., 2012) nachweisen, dass die Wahrscheinlichkeit der Ansteckung am ersten Tag der neurologischen Symptome 66,7 %, am vierten Tag 45,7 % und am zehnten Tag nur noch 4,8 % betrug. Es wird empfohlen, die Quarantäne 21-28 Tage nach den letzten Symptomen aufrechtzuerhalten. Falls entschieden wird, anschließend keinen Wiederholungstest bei allen Pferden durchzuführen, empfiehlt die American Association of Equine Practitioners (AAEP) eine 28-tägige Quarantäne nach dem Verschwinden der Symptome im letzten Fall (BURGESS et al., 2012). Bei wiederholten Tests, an 2-4 aufeinanderfolgenden Tagen nach dem Verschwinden der letzten Symptome, kann die Quarantäne auch schon nach 14 Tagen aufgehoben werden (LUNN et al., 2009; BURGESS et al., 2012).

3.6. Wirtsspezifische Faktoren

3.6.1. Immunstatus

Das Immunsystem besteht aus angeborener und erworbener Komponente. Die angeborene Immunabwehr ist unspezifisch und besteht aus einer zellulären und einer humoralen Komponente. Im Rahmen der erworbenen oder auch spezifischen Immunabwehr werden Antikörper nach dem Erkennen von Antigenen produziert (KAUFMANN, 2014a). Die Produktion übernehmen Plasmazellen, die sich aus B-Lymphozyten entwickeln (KAUFMANN, 2014b). Ein geschwächtes oder überreaktives Immunsystem kann wahrscheinlich dazu beitragen, dass eine EHV-1-Infektion schwerwiegender abläuft und es zur Ausprägung einer EHM kommt. So beobachteten Traub-Dargatz et al. (TRAUB-DARGATZ et al., 2013) eine erhöhte Gefahr für EHM bis zu fünf Wochen nach einer EHV-1-Impfung. Auch wird vermutet, dass Stress, der das Immunsystem schwächt, ein Auslöser für die Reaktivierung der latenten Infektion sein kann (LUNN et al., 2009).

Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass Pferde nach EHV-1-Exposition einen 3-6-monatigen Schutz vor erneuter Infektion besitzen (KYDD et al., 2006; LUNN et al., 2009). Diesen Schutz versucht man auch mit Impfungen zu erzielen, die bisher aber keinen nachweislichen Schutz gegen EHM bieten können (LUNN et al., 2009), wozu bisher jedoch auch keine Studien stattfanden. Da die Zell-assoziierte Virämie als entscheidender Punkt für die Entstehung einer EHM, ebenso wie für den Abort, angesehen wird, gilt es als Hauptziel, diese mit einer Immunantwort auf die Impfung kontrollieren zu können (LUNN et al., 2009). Sowohl Tot- als auch Lebendimpfstoffe reduzieren bereits die Ausscheidung und konnten in einer experimentellen Infektionsstudie sowohl Virämie als auch klinische Symptome reduzieren (GOEHRING et al., 2010a).

Frühere Hypothesen, eine frequente Impfung würde eine höhere Gefahr für EHM bergen (HENNINGER et al., 2007), konnten nicht belegt werden, da die häufig geimpften Pferde gleichzeitig auch die älteren waren, die auch ungeimpft ein erhöhtes Risiko für EHM besitzen (GOEHRING et al., 2006; ALLEN, 2008). Eine höhere Impffrequenz als die vom Hersteller empfohlenen sechs Monate beziehungsweise eine zu häufige Impfung resultiert aber auch nicht zwangsweise in verbesserter Immunität (WAGNER et al., 2015).

3.6.2. Alter

In mehreren epidemiologischen Studien waren ältere Pferde signifikant häufiger von EHM betroffen als jüngere (GOEHRING et al., 2006; HENNINGER et al., 2007; ALLEN, 2008). Während in den Studien von Goehring et al. (GOEHRING et al., 2006) und Henninger et al. (HENNINGER et al., 2007) die Aussage auf erwachsene Pferde (> 3 bzw. > 5 Jahre) beschränkt wurde, waren in der experimentellen Infektionsstudie von Allen (ALLEN, 2008) Pferde > 20 Jahre signifikant häufiger betroffen. Für eine weitere experimentelle Infektionsstudie von Maxwell et al. im Jahre 2017 (MAXWELL et al., 2017) wurden daraufhin 18 Stuten verwendet, die nach Zahnaltersbestimmung alle auf > 20 Jahre geschätzt wurden. Es wurde eine hohe EHM-Rate beobachtet.

Hansen et al. (HANSEN et al., 2013) wiesen 2013 nach, dass die Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α aus PBMCs bei alten Pferden (> 20 Jahre) deutlich höher ist als bei jüngeren und mittelalten Pferden. Zusätzlich war die Expression von IFN- γ auch in Lymphozyten, die aus einer broncho-alveolären Lavage (BAL) entnommen wurden, verstärkt. Die Produktion dieser proinflammatorischen Zytokine ist also altersabhängig. Das Phänomen ist auch aus der Humanmedizin als „inflammaging“ bekannt und könnte ein bedeutender Faktor für die Entwicklung von Atemwegserkrankungen beim älteren Pferd sein.

3.6.3. Rasse

Goehring et al. (GOEHRING et al., 2006) entdeckten 2006 in einer vierjährigen retrospektiven Studie mit 196 Pferden Rasseprädispositionen für Traber, Barockpferde (hier: Friese, Andalusier, Lipizzaner) und Kaltblüter verglichen mit Pony Urrassen wie Shetlandponys und Dartmoor-Ponys. In der Literatur findet man darüber hinaus eine Vielzahl an Ausbruchsberichten von Betrieben, die vorwiegend oder ausschließlich eine Pferderasse halten (z. B. Gestüte): Greenwood & Simson, 1980 (GREENWOOD und SIMSON, 1980) (Englisches Vollblut), Bürki et al., 1984 (BÜRKI et al., 1984) (Lipizzaner), Pronost et al., 2011 (PRONOST et al., 2012) und Walter et al., 2013 (WALTER et al., 2013) (Warmblut). Bei einem großen Ausbruch auf einem Paint Horse Turnier in den USA kam es ebenfalls zu hohen EHM-Zahlen (TRAUB-DARGATZ et al., 2013). Auch bei einem Ausbruch in dem Reitstall einer Universität, 2007, (HENNINGER et al., 2007) kam es zu hohen EHM-Zahlen und schweren Verläufen. Hier waren ebenfalls hauptsächlich Englische Vollblüter, Warmblüter und Quarter Horses untergebracht. Im Kontrast dazu findet man in der gesamten Literatur keine Beschreibungen über

Ausbrüche auf Arabergestüten, ebenso findet man keine Schilderungen von Ausbrüchen auf Gestüten von Robustpferderassen (Haflinger, Fjordpferd, Isländer, Shetlandpony).

2019 konnten Brosnahan et al. (BROSNAHAN et al., 2019) in einer genomweiten Assoziationsstudie mit 129 EHV-1-infizierten Pferden, davon 61 mit EHM und 68 ohne EHM, nachweisen, dass ein Intron des *Tetraspanin 9* (TSPAN9) Gens, das in Endothelzellen und Thrombozyten exprimiert wird, bei Pferden mit EHM durch ein SNP vorlag, im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich virämisch wurden. Dunuwille et al. (DUNUWILLE et al., 2020) widerlegten diesen Fund im Jahre 2020 zunächst wieder, schlossen aber nicht aus, dass es andere komplexe, genetische und wirtsassoziierte Faktoren gibt, die bei der Entstehung von EHM eine Rolle spielen.

3.6.4. Geschlecht

Auch Geschlechtsprädispositionen wurden schon bei mehreren Ausbrüchen beobachtet. Traub-Dargatz et al. untersuchten die Daten von 123 Pferden, die auf einem Turnier gewesen waren, auf dem EHV-1 ausbrach. 19 Pferde entwickelten neurologische Symptome und 14 weitere waren EHV-1-infiziert. Im Vergleich der neurologischen mit den nicht-neurologischen, aber infizierten Pferden, waren weibliche Pferde signifikant häufiger von EHM betroffen als männliche (TRAUB-DARGATZ et al., 2013). In der niederländischen Studie von Goehring et al. (GOEHRING et al., 2006) waren Stuten zwar nicht allgemein häufiger an EHM erkrankt, sie zeigten aber häufiger schwere Verläufe mit Festliegen. Im Rahmen des schwerwiegenden EHV-1-Ausbruchs in Valencia, Spanien im Jahre 2021 entwickelten Stuten, die zuvor Fieber gezeigt hatten, häufiger neurologische Symptome als Wallache, die ebenfalls zuvor mit Fieber aufgefallen waren (COUROUCÉ et al., 2021).

III. HYPOTHESE

Unterschiede in Alter, Rasse, Geschlecht und Immunisierungsstatus tragen als wirtsspezifische Faktoren zur Entwicklung einer EHM im Laufe einer EHV-1-Infektion bei.

IV. ERGEBNISSE

Basierend auf den bisherigen epidemiologischen Forschungsergebnissen und den kursierenden Hypothesen zu Alters-, Rasse- und Geschlechtsprädispositionen wurde eine große retrospektive, epidemiologische Studie über mehrere Ausbrüche geplant. Über drei Jahre (2018-2020) wurden Daten von vergangenen und aktuellen Ausbrüchen gesammelt. Ein Ausbruch war in vielerlei Hinsicht besonders, sodass er zusätzlich einzeln publiziert wurde. Hier wurden 143 Pferde unterschiedlichster Rassen, auf drei Laufställe verteilt, gehalten. Tagsüber kamen alle Pferde gemeinsam auf einen Paddock mit einer einzelnen Tränke. Lediglich ein einziges Pferd war regelmäßig gegen EHV-1/-4 geimpft. Etwa 50 der 143 Pferde entwickelten im Laufe des Ausbruchs Fieber, 33 zeigten neurologische Symptome unterschiedlicher Schweregrade. Die Pferde, welche an EHM erkrankten, standen regelmäßig mit anderen Pferden zusammen im Laufstall, die keine Symptome entwickelten. Die Haltungssituation der Pferde war dadurch sehr gut vergleichbar und man kann von einem hohen Durchseuchungsgrad in der Herde ausgehen.

1. **Publikation I: Apparent Breed Predilection for Equid Herpesvirus-1-Associated Myeloencephalopathy (EHM) in a Multiple-Breed Herd**

Eva Klouth¹, Yury Zablotzki², and Lutz S. Goehring¹

¹ Equine Hospital Center for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians University, 80539 Munich, Germany

² Center for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine Ludwig-Maximilians University, 80539 Munich, Germany



Pathogens 2021, 10, 537. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050537>

Accepted: 26 April 2021

Published: 29 April 2021

Article

Apparent Breed Predilection for Equid Herpesvirus-1-Associated Myeloencephalopathy (EHM) in a Multiple-Breed Herd

Eva Klouth^{1,*}, Yury Zablotski²  and Lutz S. Goehring¹ 

¹ Equine Hospital Center for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine Ludwig-Maximilians University, 80539 Munich, Germany; Goehring@pferd.vetmed.uni-muenchen.de

² Center for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine Ludwig-Maximilians University, 80539 Munich, Germany; Y.Zablotski@med.vetmed.uni-muenchen.de

* Correspondence: eva.klouth@pferd.vetmed.uni-muenchen.de

Abstract: Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) causes several outbreaks of abortion and/or equid herpesvirus-associated myeloencephalopathy (EHM) worldwide each year. EHM is of great concern, as permanent neurological gait anomalies can leave a horse unfit for future use. The study assesses the risk factors associated with the occurrence of EHM. During an unmitigated outbreak, 141 adult horses/ponies of several distinct breeds were evaluated—using multiple Bayesian logistic regression calculating the odds ratios for breed, age, and sex. In total, 33 of the 141 horses showed signs of EHM. Fjord horses and warmblood horses were overrepresented among those developing EHM. The pony breeds, Welsh and Shetland ponies, were underrepresented. In addition, age and sex were not associated with the risk for EHM. The main limitation was that it was a retrospective analysis with some flaws of documentation. It can be concluded that breed was a significant risk factor for developing EHM during this outbreak.



Citation: Klouth, E.; Zablotski, Y.; Goehring, L.S. Apparent Breed Predilection for Equid Herpesvirus-1-Associated Myeloencephalopathy (EHM) in a Multiple-Breed Herd. *Pathogens* **2021**, *10*, 537. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050537>

Academic Editor: Lawrence S. Young

Received: 25 February 2021

Accepted: 26 April 2021

Published: 29 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: EHV-1; risk factors; warmblood; Fjord horse; equine; horses

1. Introduction

Equid herpesvirus-1 (EHV-1) is a worldwide cause of contagious infections in horses and ponies. As a respiratory tract infection can be followed by cell-associated viremia in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), EHV-1 infection may lead to secondary complications such as EHV-1-associated myeloencephalopathy (EHM), abortion, neonatal death, and chorioidoretinopathy. Details of pathogenesis are yet to be uncovered; however, it involves (restricted) endothelial cell infection of the eye, the pregnant uterus, and the spinal cord. EHM is the result of random and multi-focal acute vasculitis and thrombotic infarctions of the spinal cord (micro)vasculature. Depending on the extent of infarction, clinical signs will include ataxia, dysmetria, and loss of strength in all four limbs. With a further increase in the quantity and quality of infarctive events, the horse will become recumbent [1]. While all equidae are susceptible to primary (respiratory tract) EHV-1 infection, the risk of developing EHM is perceived to be unevenly distributed between different breeds or age groups, and between male and female animals [1–3]. EHM has been recognized as a multi-factorial disease. The virus and the magnitude and duration of viremia are frequently discussed, but the risk factors breed, age, and sex are not always considered while analyzing final outbreak numbers [3–5].

Here, we describe the course of a fairly unmitigated EHV-1 infection outbreak in a large, (EHV-1) unvaccinated (except 1 animal) multiple-breed herd. The purpose of this study was to investigate retrospectively whether predilection for breed, age, or sex influenced the outcome (EHM) during this outbreak.

2. Results

On 23 December 2016, a gelding was noticed with dysuria. Shortly afterwards, it became recumbent and was euthanized. A postmortem-collected nasal swab of this horse was submitted to a commercial laboratory for EHV-1 DNA testing using quantitative (q)PCR analysis. The laboratory reported a positive result, but a further differentiation into D- or N-subtype was not pursued. This horse was considered the index case (IC) of this outbreak. A few days later, a second horse was euthanized due to recumbency and transported to the state diagnostic laboratory (LGL Erlangen, Bavaria, Germany) for postmortem examination. Spinal cord tissue was found to be qPCR-positive for EHV-1 DNA. At that time, quarantine was announced for the facility. Quarantine was lifted by the end of March 2017. During this time, horses/ponies were not allowed to enter or leave the premises (except for body disposal), and horse owners were asked to tend to their own horses only. Other mitigating efforts such as barrier precautions, separate small-group arrangements, setting up of an isolation facility, or special personnel instructions were not implemented. Importantly, the daily routine of the combined turn-out of all horses/ponies was maintained during this entire period. Of the 141 animals, up to 50 (35%) were found with a fever for at least 1 day. A total of 33 animals developed EHM (Figure 1b, Table 1). Twenty-five animals were categorized with EHM grade I severity and 8 animals with EHM grade II severity. Immediately following the positive qPCR results in the second EHM case, each animal received a single dose of an avipox-based immunomodulator (Zylexis[®], Zoetis, Berlin, Germany). Any animal detected with a fever received variable doses of flunixin meglumine or meloxicam (both from Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) for the duration of a fever episode. About 10 animals with high and prolonged fevers were treated with dexamethasone (once daily, for 2–4 days, no dose higher than 0.05 mg/kg). Unfortunately, any further detailed documentation regarding the specific animal and the dosage and duration of treatment is lacking.

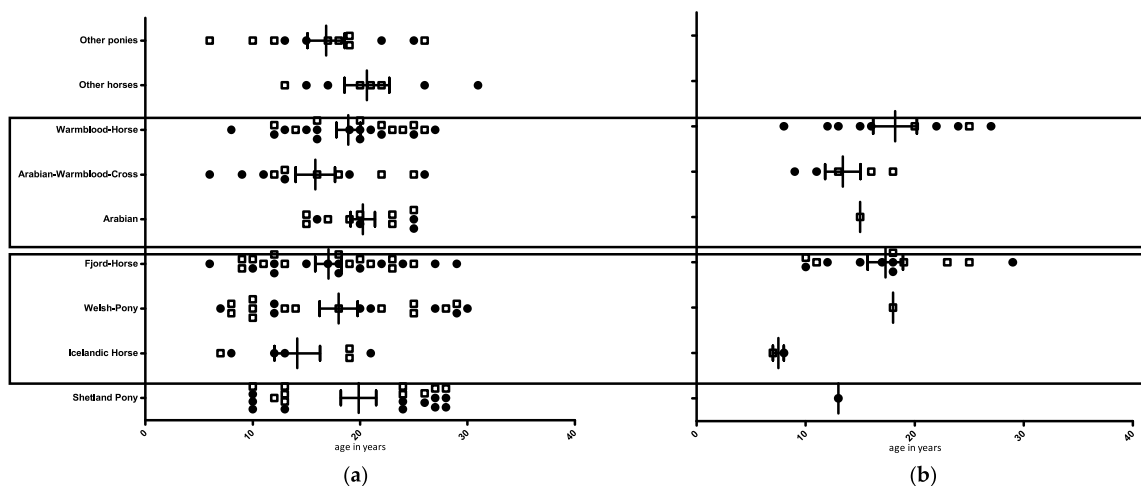


Figure 1. Herd distribution according to breed (*y*-axis), age in years (*x*-axis), and sex (female: open squares; male (castrated): closed circles). Panel (a): total group at the beginning of the EHV-1 outbreak. Panel (b): EHM cases. Two frames indicate animals housed by night in the same stable building.

Table 1. EHM cases per breed, age, and sex.

Breed	n	Age						
		Min	Max	Mean	Median	SD *	IQR **	
Warmblood horse	10	8	27	18.20	18.0	6.32	10.00	
Arabian-WB crossbreed	5	9	18	13.40	13.0	3.65	5.00	
Arabian	1	15	15	15.00	15.0	N/A	0.00	
Fjord horse	13	10	29	17.31	18.0	5.86	7.00	
Welsh pony	1	18	18	18.00	18.0	N/A	0.00	
Icelandic horse	2	7	8	7.50	7.5	0.71	0.50	
Shetland pony	1	13	13	13.00	13.0	N/A	0.00	
Sex	Male	19	8	29	15.63	15.0	6.18	6.50
	Female	14	7	25	17.00	18.0	5.45	6.25

* SD: standard deviation; ** IQR: interquartile range.

Only horses with a defined genetical background (breed) and group size >6 were included in the multiple logistic regression ($n = 121$) analysis for “breed.” This excluded the two groups “other ponies” and “other horses.” Results of the multiple logistic regression show a strong correlation between breed and EHM (Table 2). Fjord horses were the group with the highest number of EHM cases and served as the reference breed. Warmblood horses did not differ (OR = 1.10; CI = 0.37–3.29; $p = 0.866$) compared to Fjord horses. However, Shetland ponies (OR = 0.09; CI = 0.02–0.55; $p = 0.008$) and Welsh ponies (OR = 0.09; CI = 0.01–0.52; $p = 0.007$) apparently had a lower risk of developing EHM. Pairwise comparison of all breeds via post hocs showed that Fjord and warmblood horses had an increased risk for EHM compared to Shetland and Welsh ponies. EHM grade II severity had only 8 observations; however, all but one of the observations (7-year-old Icelandic mare) were either in the Fjord ($n = 4$) or in the warmblood ($n = 3$) group.

Table 2. Results of the multiple Bayesian logistic regression ($n = 121$).

Predictors	Odds Ratios	CI	p-Value
(Intercept)	1.94	0.42–8.84	0.389
Shetland pony	0.09 *	0.02–0.55	0.008
Icelandic horse	0.46	0.09–2.37	0.348
Welsh pony	0.09 *	0.01–0.52	0.007
Arabian	0.19	0.03–1.16	0.069
Arabian-WB crossbreed	0.83	0.22–3.05	0.773
Warmblood	1.10	0.37–3.29	0.866
Age	0.94	0.88–1.02	0.121
Sex (male)	1.29	0.53–3.11	0.573

* marks the significant values.

EHM was evenly distributed among age. Furthermore, age did not influence the development of either EHM-I or EHM-II during this outbreak. As a total of 14 male and 11 female animals showed EHM-I signs and 6 geldings and 4 mares developed grade II EHM, sex had no influence on the development of EHM in this outbreak (Table 3). As a side note, the only EHV-1-vaccinated horse, a 12-year-old Icelandic horse gelding, had a fever for two days but no signs of EHM.

We re-grouped breeds into “high-risk EHM” and “low-risk EHM” based on our observations during this outbreak, and on outbreak reports of single (or predominant) breed outbreaks published in peer-reviewed literature. The purpose was to control for other factors. We considered as high-risk EHM breeds Fjord and Warmblood horses and, based on the literature, Draft horses and Quarter horses [2,6]. Low-risk EHM breeds included Shetland ponies, Icelandic horses, Welsh ponies, Haflinger horses, and Arabians (the latter three because currently there are no reports of natural EHM outbreaks on single-breed

operations in the peer-reviewed scientific literature). Only horses with a defined genetical background and no crossbreeds participated in this evaluation. The number of horses available for this assessment was reduced to $n = 115$ (Figure 2). This allowed us to include the few other members of defined breeds, while crossbred horses or unknown breeds were excluded. The only observation was that EHM cases in the low-risk group were found in the lower (=younger) arithmetic half (Figure 2).

Table 3. Herd details: distribution and specification.

Breed	<i>n</i>	Age						Female/Male	
		Min	Max	Mean	Median	SD	IQR		
Shetland pony	21	10	28	19.86	24.0	7.53	14.00	10/11	
Icelandic horse	7	7	21	14.14	13.0	5.61	9.00	3/4	
Welsh pony	22	7	30	18.14	19.0	7.95	14.50	13/9	
Fjord horse	26	6	29	17.04	18.0	6.24	9.75	13/13	
Arabian	12	15	25	20.25	20.0	3.91	6.75	8/4	
Arabian-WB crossbreed	12	6	26	15.83	14.5	6.31	8.00	6/6	
Warmblood horse	23	8	27	19.22	20.0	5.32	8.00	9/14	
Other ponies	12	6	26	16.83	17.5	5.98	7.00	8/4	
Other horses	8	13	31	20.62	20.5	5.88	6.50	4/4	
Sex	Male	69	6	31	18.58	19.0	6.82	12.00	0/69
	Female	74	6	29	17.81	18.5	6.11	10.00	74/0
Total	143	6	31	18.18	19.0	6.45	11.00	74/69	

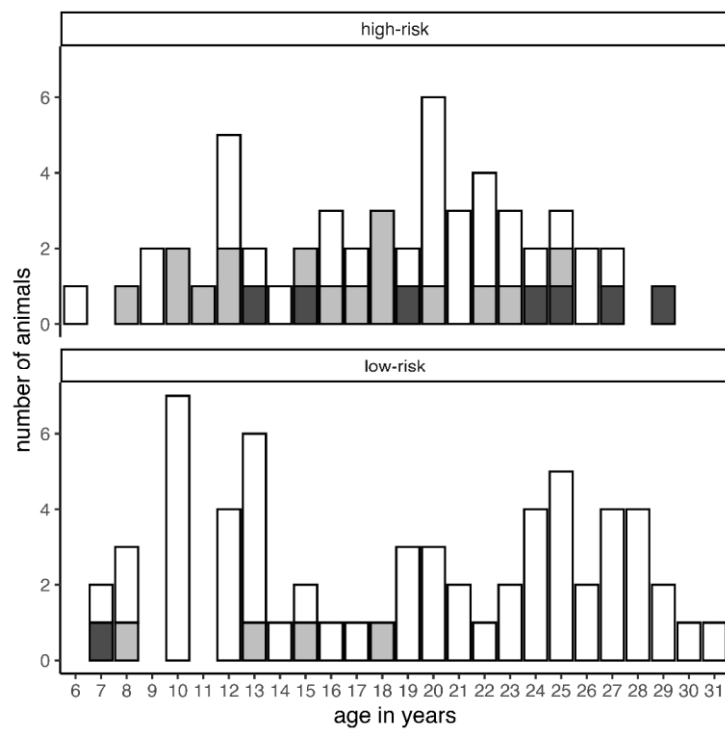


Figure 2. Separation of a total of 115 animals into high-risk and low-risk breeds with age on the x-axis: blank = unaffected; light gray = EHM grade I; dark gray = EHM grade II.

3. Discussion

There is ample discussion on how viral factors of EHV-1 influence the course of an EHV-1 outbreak and their role in causing EHM [6]. There are few reports focusing on breed, age, and sex as risk factors, but there is an ongoing debate on EHV-1 vaccine efficacy and EHV-1-related disease prevention.

Early outbreak descriptions focus on single-breed operations, on predominantly female populations on stud farms, or on outbreaks at training facilities with a relatively young or adolescent horse population [7–10]. Two reports describe natural disease outbreaks in mixed equine populations [11,12]; however, comparing strata of subpopulations lacked statistical power, or the data were affected by the confounding factors of “location on the premises” or “intervention during the outbreak.” Here, we present the data of an EHV-1 infection outbreak with very little intervention and mitigation, which resulted in an overall 23% incidence rate of EHM cases. This outbreak started during early winter (Northern Hemisphere), while the period between winter and early spring is typically the season with the most EHM outbreaks. The premises were quarantined for 3 months, which is unusually long for an EHV-1 outbreak. Explanations are likely the size and lack of mitigating efforts, which in general should include testing aimed at the identification of shedding animals followed by separation from the uninfected group of animals. This outbreak is unique because of the total number of horses/ponies that must have been exposed to the virus due to uninhibited transmission and the heterogeneity of the population, yet capable of being divided into sizable groups of distinct breeds, with each group having a fairly similar distribution of age and sex within the subgroups. Viral spread and transmission within the herd was facilitated during shared daytime pasture access and between some distinct breeds by night due to group housing with possible direct, nose-to-nose contacts or fomite transfer (feed racks and water troughs). Other aspects and measures of this outbreak were less fortunate for our retrospective data analysis. Fever is a key clinical sign of EHV-1 infection, and high fevers are typically a sign of viremia. Due to a lack of documentation other than “fevers noticed in various breeds (and stable units)” and “fevers in about one third of animals,” the assumption of an even spread of infection over the entire herd is questionable. Furthermore, although all animals, regardless of ownership, breed, age, or sex, received a single immune stimulant injection, and all animals with a fever, as long as the fever persisted, were treated with an NSAID, these measures did not interfere with our data analysis. As some animals were treated with dexamethasone, there may be risk of study bias. However, study bias is probably only minor as dexamethasone administration occurred in a small number (about 10) of horses/ponies with prolonged fever episodes and was not limited to members of a particular breed.

However, the main findings of this outbreak were an increased risk for EHM in specific breeds, warmblood horses and Fjord horses, and, apparently, a decreased risk in small pony breeds, Shetland ponies and Welsh ponies. These findings are in further support of the risk factors previously suggested by Goehring et al. (2006) [2], which then did not reach statistical significance due to a small sample size. This group analyzed 9 EHM outbreaks involving a total of 195 horses and ponies on unvaccinated (EHV-1) premises in the Netherlands and suggested an increased risk for EHM in the Draft horse, Standardbred, and Hispanic breeds (PRE, Lipizzaner). In addition, EHM numbers in the Dutch study had also been extremely low in small pony breeds (Shetland and Welsh). However, their concerns were (partial) mitigation during an outbreak, different management, separate locations for some of the breeds on premises, and a small sample size. This is the first report suggesting an increased risk of developing EHM in Fjord horses. To our knowledge, and after screening the literature, there have not been reports of EHM outbreaks on (single-breed) Fjord, Icelandic, or Haflinger horse operations in EHV-1 endemic areas, while sizable operations exist as single-breed operations. Goehring et al. [2] have already suggested a reduced risk for EHM in small (archetypical-type) ponies during EHV-1 outbreaks and included Icelandic horses, Shetland and Welsh ponies, and also the Fjord and Haflinger horses in their discussion, mainly based on an assumed common ancestry and similar

genetical background. However, our data from this outbreak suggest differently. It is worth pointing out that Fjord horses were group-housed by night, together with Welsh ponies, Icelandic horses, and other (mixed-breed) ponies, sharing the same air space and through direct contacts, increasing the likelihood of (smear) infection transmission. These intensified contacts extend to another group of horses that were stabled by night in the same building (stable C). This unit included all warmblood, warmblood–Arabian, and purebred Arabian horses. Only 1 out of 12 Arabian horses developed EHM, while almost half (10 animals) of the warmblood horses and interestingly 5 of the 12 Arabian–warmblood crossbred horses developed EHM. Our findings suggest a risk-enhancing factor for EHM in breeds such as warmblood and Fjord, while a protective factor or the absence of a factor apparently lowered the risk for EHM in the Arabian horse and various pony breeds. We made these observations among members of a particular line of Arabian horses, the Shagya Arabian, which has been shown to be genetically distinct from other Arabian horse lineages [13,14]. This could mean that our observations strictly relate to this particular lineage of Arabian horses. However, there are no reports of EHM outbreaks on any of the many renowned Arabian horse farms around the globe, including those in EHV-1 endemic areas, and Arabian horses with EHM have been underrepresented during mixed-breed operation outbreaks that differentiated between breeds. Genetic diversity also exists between various warmblood stud books, and as Welsh ponies are categorized into several subgroups (A–D), with each letter indicating a different size and phenotype, this should also hold true for the Welsh pony. During a genomewide association study, Brosnahan et al. found a single-nucleotide polymorphism (SNP) in an intron of the tetraspanin 9 gene, located on chromosome 6, when they compared horses with a fever and EHM with matching horses that had only developed a fever during experimental infection/natural EHV-1 outbreak conditions. As this study suffered from small numbers of horses to compare, it could be of importance to investigate and compare this particular SNP between warmblood, Fjord, Welsh, Shetland, and Arabian horses.

Age has been suggested to influence the risk for EHM development. These propositions are based on a controlled infection study where one group of female horses <15 years of age and another group >20 years of age were infected simultaneously. In group 1, only 1 out of 12 horses developed EHM, while 8 out of 12 horses did so in group 2 [1]. Two studies of naturally occurring EHM outbreaks claim more EHM cases in horses older than 3 years [2] or older than 5 years [4], with the first study suggesting an age cut-off between adolescence and adulthood. Our study population, with a mean age of about 18 years, was relatively old, with the youngest animal at 6 years of age. EHM cases were scattered among all age groups, and we did not observe a (linear) increase in EHM incidence with age. When we split the breeds into low-risk and high-risk breeds, it appeared that those few ($n = 5$) EHM cases in the low-risk group were all younger than 20 years of age. However, due to the coincidence of low numbers, “other factors,” not yet determined for this particular outbreak, could be responsible for these skewed numbers. Other factors could include previous exposure, co-infection, or other environmental factors simultaneously occurring in all age groups.

Traub-Dargatz et al. [5] observed that female horses developed EHM upon infection 4.3 times more often than male horses. Van Maanen et al. [12] found an almost equal distribution of EHM between male and female animals, although females were more often recumbent and thus more severely affected (similar to our EHM grade II). The multiple-outbreak study from the Netherlands came to similar conclusions [2], while we also did not detect a gender correlation here. The main difference between these reports is actually the environment or circumstances of the outbreak. Traub-Dargatz describes an outbreak during a (multiple-day) competition, where horses had been transported over long distances to attend. Van Maanen, Goehring, and our outbreak described here are reports from home premise outbreaks under presumably more stable horse boarding circumstances. However, these three reports describe outbreaks in one geographical region (central Europe) and all are outbreaks among unvaccinated (for EHV-1) animals. The results

obtained by Traub-Dargatz et al. [5] originated from (partially) EHV-1-vaccinated animals. While finalizing this manuscript, we became witness to an extraordinary EHM outbreak among a sizable group of warmblood horses, originating from several different European countries, that were gathering in Valencia, Spain, for a multiple-week competitive/training event. Early reports described a relatively young (<15 years of age) horse population, and the group had been reported to be partially vaccinated against EHV-1. There are currently no confirmed data available of the male/female ratio of the horses attending this show; however, apparently, the majority of EHM-affected horses were female [15]. These early details resemble the situation described by Traub-Dargatz, with additional stressors of competition and travel, different from the circumstances described by others and us. While data collection on this outbreak is ongoing, it shows that most likely multiple factors, potentially also with different levels of impact, are necessary to turn an EHV-1 infection into EHM.

There exists an opinion among some horse owners, and even among some veterinarians, that vaccination against EHV-1 puts a horse at a greater risk of developing EHM upon EHV-1 infection than if it were unvaccinated. In our study, with a 23% EHM fatality rate in the entire (unvaccinated) herd, it can be safely said that vaccination against EHV-1 has not contributed to the risk of developing EHM during this outbreak. However, during the 2011 EHM outbreak among mainly (young) Paint horses in the US, described by Traub-Dargatz et al. [5], horses that were vaccinated against EHV-1 (and other diseases) within a 5-week period prior to EHV-1 exposure were, apparently, at an increased risk of developing EHM compared to those vaccinated more than 5 weeks ago. These findings could suggest a unique window of vulnerability for recently vaccinated horses, which needs further investigation.

In summary, EHM is most likely a multi-factorial disease following EHV-1 infection. Numerous factors could play a role in the pathogenesis, resulting in different levels of disease severity: virus strain variation, infectious dose and duration of exposure, host immunity, and other factors. The main findings of our study are that it seems likely that an increased risk for EHM exists in certain breeds over others, and within a high-risk breed, the influence of age seems less important. Furthermore, we could not identify an influence of sex. A meta-analysis of several outbreak data sets is necessary to strengthen a risk factor hypothesis; however, as each outbreak is uniquely different from the next in so many aspects, this will be a very difficult task. In the meantime, early detection of an index case with EHM, early identification of shedders through testing, and separating shedders from non-shedders will slow down disease spread and decrease EHM incidence regardless of "other factors".

4. Materials and Methods

This outbreak started during December 2016, and quarantine was lifted by the end of March 2017. Data were collected retrospectively during site visits and through phone interviews with the facility owner, veterinarians of the involved practices, and board members of the riding association, who were also boarders of horses at the facility at that time. Data collection started a little over a year after the outbreak and took about 6 months. The premises are located in rural southeastern Germany, at a 40 km distance from a larger city. Previously, the operation was used as a stud farm for (Shagya) Arabian horses and converted into a mixed-breed horse/pony operation during the early 2010s, offering boarding, a commercial riding program for children, and a retirement home for old horses. There were 143 horses/ponies on the grounds at the beginning of the outbreak. Two thirds of the herd was owned by the farm owner, and the remainder was individually owned (one person with 1 or 2 animals). The total surface of the operation encompasses about 12 ha. It includes several hectares of pasture (not used during the outbreak), a central 1.2 ha area of all-weather pasture, an indoor riding arena, three main stables (A–C), a storage building, and the living quarters (Figure 3).

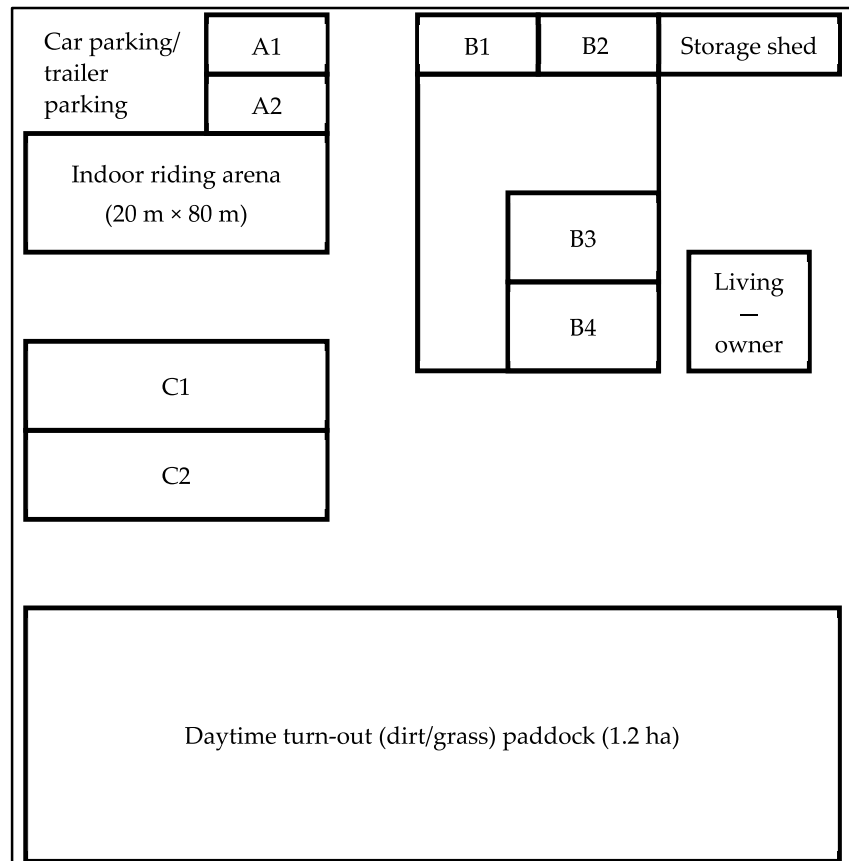


Figure 3. Schematic overview of the premises (not in scale) with commingling of all animals on daytime turn-out (dirt/grass) area, the indoor riding arena, a storage shed, the home of the owner, and with stable units A–C for night time housing.

Detailed information on (i) ID of the horse, (ii) age, and (iii) sex were available for the time point at the beginning of the outbreak. With the exception of a group of 12 “mid-size” ponies, a clear breed affiliation was available for each animal (131 animals). The defined breeds were (i) 21 Shetland ponies, (ii) 7 Icelandic horses, (iii) 22 Welsh ponies, (iv) 26 Fjord horses, (v) 12 (Shagya) Arabians, (vi) 12 Arabian–warmblood (F1) crossbred horses, and (vii) 23 warmblood horses (various stud books). Another 8 horses (1 Haflinger horse, 1 Haflinger–crossbred, 3 (American) Quarter horses, and 3 Draft horses), combined in a group of “others,” were excluded from breed-dependent calculation because of a small sample size. The youngest animal was 6, and the oldest 31 years old. Only castrated males ($n = 69$) and intact females ($n = 74$) were on the grounds (Figure 1a, Table 3).

During daytime, all animals combined spent a minimum of 6 h on an all-weather pasture area (Figure 3). While outside, hay was supplied along the side closest to the farm buildings, and there was a single shared water source (trough). At night, the animals were housed in three separate stable buildings (A, B, C; Figure 3). Each building was divided into two to four subunits, as described. Fences or feeding (hay) racks were used as dividers. Uniformly, straw (pot stall system) was used for bedding. Shetland ponies were housed in A1 and A2. Stable B (B1, B2, B3, and B4, with a 2 m service aisle between B2 and B3) housed Fjord, Welsh, Icelandic, and Haflinger horses and the mid-size, yet unspecified, ponies. Stable C housed Arabian, warmblood, and Arabian–warmblood crossbred horses in two units (C1, C2) divided by a feed rack. Spread of horses/ponies over the subunit was at random, not by breed. Hayracks in a building were typically used by animals

from both sides. Feed was the same for all stables consisting of a mixture of straw, hay, and alfalfa silage, as well as oats and barley. Only some of the privately owned horses were vaccinated (various products) against tetanus and equine influenza. One Icelandic horse (a 12-year-old gelding) was regularly (every 6 months) vaccinated against EHV-1 using a modified-live virus vaccine (Prevaccinol[®], MSD Animal Health, Unterschleißheim, Germany). Detailed computed information included which animal developed EHM. The animals with the severe or tetraplegic form of EHM were euthanized within 24 h of non-improvement and categorized as EHM-II (severe), and marked in the notes accordingly. All horses/ponies with signs of ataxia, weakness, or urinary incontinence that remained standing were categorized as EHM-I (mild to moderate). Two animals were euthanized during the outbreak, but it was unclear whether they showed signs of colic or EHM-II. A necropsy was not done, and without information about the cause of recumbency, both a 21-year-old Welsh pony gelding and a 26-year-old warmblood mare were omitted of any calculation, bringing down the number from 143 to 141. Rectal temperature data were collected daily from all animals, fever was defined as a temperature >38.2 °C, and temperature data were not recorded.

Statistical Methods

We used Microsoft Office 2019 for data processing and management. For statistical analysis, R version 3.6.3 (2020-02-29 R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) statistical software was used. The graphic representation was done with Microsoft Office, R statistical software, and GraphPad Prism 5.04. Breed, gender, and EHM category were treated as categorical variables, and age as a continuous variable. The level of significance was pre-set as $\alpha \leq 0.05$. Descriptive statistics of different breeds and gender, including mean and median age, age range, standard deviation, interquartile range, and numbers of female vs. male, is available in Table 3. A multivariate Bayesian logistic regression without interactions was performed, with breed, gender, and age as independent variables, and EHM as a dependent variable. A Bayesian approach was chosen due to a small number of observations of some breeds, which then resulted in more reliable estimates of odds ratios and their confidence intervals compared to a frequentist generalized logistic regression. The association between independent variables was checked with the chi-square test for categorical variables and with Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests for age due to the non-normal distribution. The multicollinearity of independent variables was checked with variation inflation factor (VIF). There was no association between independent variables, and multicollinearity assumption was not violated (all VIF < 5) (Table 2). Due to the exploratory approach of the study, correction of the *p*-values for multiple comparisons during post hoc was not performed. We categorized animals according to breed. As only a few representatives of certain breeds were among the total, those were categorized as “others” and did not participate in evaluation (Draft, Quarter, Haflinger horse). Some of the ponies with unknown genetical background were categorized as “other pony” and were not evaluated as well. The breeds included in the calculation were (i) Shetland pony, (ii) Icelandic horse, (iii) Welsh pony, (iv) Fjord horse, (v) Arabian, (vi) Arabian–warmblood (F1), and (vii) warmblood. Sex categories were either male (castrated) or female (intact). The number of horses included for the multiple Bayesian logistic regression was 121.

Author Contributions: Conceptualization: L.S.G. and E.K.; methodology: Y.Z.; software: Y.Z.; validation: E.K., L.S.G. and Y.Z.; formal analysis: Y.Z.; investigation: L.S.G.; resources: L.S.G.; writing—original draft preparation: E.K.; writing—review and editing: L.S.G.; visualization: E.K. and Y.Z.; supervision: L.S.G.; project administration: L.S.G.; funding acquisition: L.S.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study is part of a larger study focusing on EHV-1 and EHM epidemiology. It was kindly supported by Dechra Veterinary Products (s’-Hertogenbosch, The Netherlands).

Institutional Review Board Statement: As this study is a retrospective analysis of a disease outbreak without any consulting or direct actions from our side influencing the outbreak course, an institutional animal care & use committee evaluation is not required.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the owner, the riding school board members, and the veterinarians of the involved practices for sparing their time to provide us with information.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Allen, G.P. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *Am. J. Vet. Res.* **2008**, *69*, 1595–1600. [CrossRef] [PubMed]
2. Goehring, L.S.; van Winden, S.C.; Van Maanen, C.; van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S. Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in the Netherlands: A four-year retrospective study (1999–2003). *J. Vet. Intern. Med.* **2006**, *20*, 601–607. [PubMed]
3. Allen, G.P.; Kydd, J.H.; Slater, J.D.; Smith, K.C. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. In *Equine Infectious Diseases*, 8th ed.; Wernery, U., Wade, J., Mumford, J., Eds.; R&W Publications: Newmarket, UK, 1999; pp. 129–146.
4. Henninger, R.W.; Reed, S.M.; Saville, W.J.; Allen, G.P.; Hass, G.F.; Kohn, C.W.; Sofaly, C. Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *J. Vet. Intern. Med.* **2007**, *21*, 157–165. [CrossRef] [PubMed]
5. Traub-Dargatz, J.L.; Pelzel-McCluskey, A.M.; Creekmore, L.; Geiser-Novotny, S.; Kasari, T.; Wiedenheft, A.; Bush, E.; Bjork, K. Case-control study of a multistate equine herpesvirus myeloencephalopathy outbreak. *J. Vet. Intern. Med.* **2013**, *27*, 339–346. [CrossRef] [PubMed]
6. Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.; Mumford, J.; Swann, Z.; Newton, J.; Bowden, R.; Allen, G.; Davis-Poynter, N. 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.* **2006**, *80*, 4047–4060. [CrossRef] [PubMed]
7. Bürki, F.; Nowotny, N.; Hinaidy, B.; Pallan, C. Die Ätiologie der Lipizzanerseuche in Piber 1983: Equine Herpesvirus 1. *Wien Tierärztl Mschr* **1984**, *71*, 312–320.
8. Bitsch, V.; Dam, A. Nervous disturbances in horses in relation to infection with equine rhinopneumonitis virus. *Acta Vet. Scand.* **1971**, *12*, 134. [PubMed]
9. Greenwood, R.; Simson, A. Clinical report of a paralytic syndrome affecting stallions, mares and foals on a Thoroughbred studfarm. *Equine Vet. J.* **1980**, *12*, 113–117. [CrossRef] [PubMed]
10. Carman, S.; Nagy, É.; Caldwell, D.; van Dreumel, T.A. Equine herpesvirus type 1 neurological disease and enterocolitis in mature standardbred horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* **1993**, *5*, 261–265. [CrossRef] [PubMed]
11. Friday, P.A.; Scarratt, W.K.; Elvinger, F.; Timoney, P.J.; Bonda, A. Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2000**, *14*, 197–201. [CrossRef] [PubMed]
12. van Maanen, C.; van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.S.; Damen, E.; Derksen, A. Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: Clinical and virological characteristics. *Equine Vet. J.* **2001**, *33*, 191–196. [CrossRef] [PubMed]
13. Khanshour, A.; Conant, E.; Juras, R.; Cothran, E.G. Microsatellite Analysis of Genetic Diversity and Population Structure of Arabian Horse Populations. *J. Hered.* **2013**, *104*, 386–398. [CrossRef] [PubMed]
14. Sadeghi, R.; Moradi-Shahrbabak, M.; Miraei Ashtiani, S.R.; Schlamp, F.; Cosgrove, E.J.; Antczak, D.F. Genetic diversity of Persian Arabian horses and their relationship to other native Iranian horse breeds. *J. Hered.* **2019**, *110*, 173–182. [CrossRef] [PubMed]
15. ProMED. EQUINE RHINOPNEUMONITIS—SPAIN (02): (VALENCIA) EHV-1, HORSE, INTERNATIONAL SPREAD, CONTROL. Available online: <https://promedmail.org/promed-post/?id=20210308.8233620> (accessed on 14 March 2021).

Für die Gesamtstudie wurden Daten von 13 Ausbrüchen in Deutschland, Schweden und Dänemark gesammelt. Informationen über Rasse, Alter, Geschlecht und Impfstatus sowie Krankheitsverlauf von 589 Pferden kamen zusammen. Es gab Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit der Ausbrüche, da die Pferde sehr unterschiedlich gehalten wurden, die Diagnose zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte und verschieden behandelt wurde. Es konnte aber davon ausgegangen werden, dass alle Pferde in den ausgewerteten Stalltrakten mit dem Virus in Kontakt gekommen waren.

Insgesamt 162 von 589 Pferden aus den ausgewerteten Ausbrüchen entwickelten während der Ausbrüche EHM. Es konnten Alters-, Rasse- und Geschlechtsprädispositionen gefunden werden; außerdem eine Auswirkung der Impfung auf die Entwicklung einer EHM bei Risikorassen.

2. Publikation II: Epidemiological Aspects of Equid Herpesvirus-Associated Myeloencephalopathy (EHM) Outbreaks

Eva Klouth¹, Yury Zablotki¹, Jessica Petersen², Marco de Bruijn³, Gittan Gröndahl⁴, Susanne Müller⁵, and Lutz S. Goehring⁵

¹ Center for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians University, 80539 Munich, Germany

² Department of Animal Science, University of Nebraska, Lincoln, NE 68588, USA

³ Wolvega Equine Hospital, 8474 EA Oldeholtpade, The Netherlands

⁴ National Veterinary Institute (SVE), 75189 Uppsala, Sweden

⁵ Baden-Wuerttemberg Animal Health Services, 70736 Fellbach, Germany

⁶ M.H. Gluck Equine Research Center, College of Agriculture, Food and the Environment, University of Kentucky, Lexington, KY 40506, USA

Viruses 2022, 14, 2576. <https://doi.org/10.3390/v14112576>

Accepted: 15 November 2022

Published: 21 November 2022



Article

Epidemiological Aspects of Equid Herpesvirus-Associated Myeloencephalopathy (EHM) Outbreaks

Eva Klouth ^{1,†}, Yury Zablotzki ^{1,†} , Jessica L. Petersen ² , Marco de Bruijn ³ , Gittan Gröndahl ⁴, Susanne Müller ⁵ and Lutz S. Goehring ^{6,*}

- ¹ Center for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians University, 80539 Munich, Germany
- ² Department of Animal Science, University of Nebraska, Lincoln, NE 68588, USA
- ³ Woltega Equine Hospital, 8474 EA Oldeholtspade, The Netherlands
- ⁴ National Veterinary Institute (SVE), 75189 Uppsala, Sweden
- ⁵ Baden-Wuerttemberg Animal Health Services, 70736 Fellbach, Germany
- ⁶ M.H. Gluck Equine Research Center, College of Agriculture, Food and the Environment, University of Kentucky, Lexington, KY 40506, USA
- * Correspondence: l.goehring@uky.edu
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Klouth, E.; Zablotzki, Y.; Petersen, J.L.; de Bruijn, M.; Gröndahl, G.; Müller, S.; Goehring, L.S. Epidemiological Aspects of Equid Herpesvirus-Associated Myeloencephalopathy (EHM) Outbreaks. *Viruses* **2022**, *14*, 2576. <https://doi.org/10.3390/v14112576>

Academic Editor: Shafiqul Chowdhury

Received: 30 October 2022
Accepted: 15 November 2022
Published: 21 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Equid Herpesvirus Myeloencephalopathy (EHM) is a multifactorial disease following an EHV-1 infection in Equidae. We investigated a total of 589 horses on 13 premises in Europe in search of risk factors for the development of EHM. We found that fever ($p < 0.001$), increasing age ($p = 0.032$), and female sex ($p = 0.042$) were risk factors for EHM in a logistic mixed model. Some breeds had a decreased risk to develop EHM compared to others (Shetland and Welsh ponies; $p = 0.017$; $p = 0.031$), and fewer EHV-1-vaccinated horses were affected by EHM compared to unvaccinated horses ($p = 0.02$). Data evaluation was complex due to high variability between outbreaks with regards to construction and environment; viral characteristics and the virus's transmissibility were affected by operational management. This study confirms earlier suspected host-specific risk factors, and our data support the benefit of high vaccine coverage at high-traffic boarding facilities.

Keywords: risk factor; boarding facility; age; breed; sex; vaccination

1. Introduction

Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) is a worldwide cause of respiratory disease in horses; however, infection is also associated with complications, including abortion and Equid herpesvirus-associated myeloencephalopathy (EHM). EHV-1 is a highly contagious disease that spreads horizontally via direct nose-to-nose contact or indirectly via airspace or fomites [1]. Following upper respiratory tract infection, the virus progresses into local lymphatic tissue, and cell-associated viremia in lymphocytes and monocytes may follow [2]. Viremia allows EHV-1 to reach the (small) vasculature of the pregnant uterus and/or CNS, resulting in mononuclear cell extravasation, vasculitis, thrombosis, and ischemia [3]. During EHM, the entire spinal cord can become affected, which will result in impairment of a horse's gait, causing ataxia, weakness, paralysis, and/or dysmetria [4]. Typically, only the viremic phase in the adult horse is accompanied by fevers (>38.4 °C), whereas the initial respiratory tract infection prior to viremia in the adult is usually not [5,6]. In a stable building or unit with clinical cases of fever and/or EHM, seroconversion has been detected in up to 90% of all occupants, including asymptomatic cases [7]. Of those with fever, only a proportion will develop clinical EHM [8]. Outbreaks can be contained successfully to a single stable unit [9].

Whether viremia occurs or differs in magnitude and duration depends on characteristics of the viral strain, cumulative infectious dose, and on the host's preinfection

immunity [4]. EHV-1 infection experiments have shown that some vaccines are able to fully or partially suppress viremia in vaccinated horses compared to unvaccinated controls [10]. Furthermore, a virus-specific factor, a single nucleotide polymorphism (SNP) results in a D-(histidine)- over N (arginine)-amino acid switch in the polymerase gene (ORF30) and likely in more robust shedding and viremia of the infected [11].

EHM has been more frequently encountered in some breeds over others. 'Tall horse' premises (housing draft horse breeds, Thoroughbreds, Standardbreds, Warmblood breeds, American Paint/Quarter Horses) appear more commonly affected by EHM, whereas significant differences were found on mixed operations co-stabling Shetland/ Welsh ponies. A recently described outbreak in a mixed-breed operation showed significant differences in EHM frequencies between Fjord/Warmblood and Shetland/Welsh ponies [12]. EHM is more frequently reported in the adult horse compared to the (weaned) foal or yearling, with some who believe EHM frequency and severity increases with age [13]. Inconsistently, female horses have been associated with an increased risk for EHM upon infection or with increased disease severity [9,14]. Having had an infection within the past 12 months has also been shown to limit viremia [15]. Two outbreak investigations have suggested an overrepresentation of EHM cases among the EHV-1-vaccinated (or 'more recently' vaccinated) over the unvaccinated [14,16]. This discussion is sparked by preliminary reports of an EHM outbreak at a multiple week competitive event in Valencia, Spain in 2021 with similar findings [17].

This study takes a retrospective look at nearly 600 horses/ponies of various breeds, stabled at 13 premises with EHV-1 outbreaks with EHM in Germany, Denmark, and Sweden between 2009 and 2020. The aim of the study was to perform a risk factor analysis for occurrence of EHM upon infection with EHV-1. Although similar studies have been conducted on unvaccinated herds in the past, this study includes both EHV-1-vaccinated and unvaccinated animals.

2. Materials and Methods

Farm owners/managers, referring veterinarians, or horse owners who called for advice on EHV-1 outbreak management were referred to one of the authors. All premises enrolled were investigated after quarantine had been lifted. We asked farm management and/or DVMs to file a survey, which was then discussed during site visits by the authors (EK, GG, SM). At that time, individual questionnaires were handed out to horse owners. Thirteen outbreaks with 589 horses on different premises in Germany (9), Denmark (2), and Sweden (2) were investigated between 2018 and 2020. We included data from 2 outbreaks already published in 2013 and 2021 [12,18]. Results from owner-filled questionnaires were cross-referenced with farm management or DVM on-site information. The farm owner/management version focused on general information about the farm (region and country; type of operation; type of husbandry; number of horses; breed distribution; number of EHV-vaccinated horses; and layout of the farm with approximate size); specific information about the outbreak (starting date, index case, season, and weather); number of horses with fever and/or EHM; number of euthanized horses; results of postmortem exams; infectious agent and co-infections (strain variant and concurrent infections with other pathogens); the timing and duration of any interventions, quarantine implemented, testing, further laboratory diagnostics, whether horses stayed on the premises or were transported to a hospital or a different farm; and whether other premises in the vicinity were affected, and if so, whether these were in-contact facilities, and what criteria determined lifting quarantine.

The following data were collected from horse owners by questionnaire: (1) animal ID; (2) sex (female, male intact, or male castrated); (3) breed; (4) age at time of outbreak; (5) vaccinated against EHV-1 (or -1/-4); (6) location during the outbreak; (7) was EHV-1 diagnosed in your horse?; (7a) date of first clinical signs; (7b) which clinical signs (none, fever, cough, nasal discharge, (limb) edema, neurological clinical signs (paresis, paralysis, ataxia, tail hypotonia/ atonia, urinary incontinence/ dysuria, recumbency), other-which?);

(7c) treatments; (8) did your horse survive the outbreak? If not, when (date) was euthanasia/death? (9) Anything special you want to mention about the animal? After a few weeks, the questionnaires were collected, and data were sorted and tabulated.

Animals ($n = 589$) were stratified according to breed, age, and sex ('male' or 'female'). Vaccination for EHV-1/-4 was either 'yes = 1' or 'no = 0', and 1 required the following criteria: i) primary course of immunization with a licensed product and ii) followed by booster vaccinations at least every 6 months regardless of the follow-up product. Animals that had received vaccines in the past but were not currently vaccinated were categorized 0. Cutoff for 'fever' was a rectal temperature ≥ 38.3 °C, with 0 = no fever and 1 = fever. Clinical signs of neurologic disease, attributable to EHM, including dysuria, were coded 0 (=none) or 1 (=present). We encountered a large diversity of breeds (see Table 1). Warmblood horses (from various studbooks throughout Europe) were the predominant breed with 296 animals, followed by smaller numbers of other breeds. Those with >15 members were the following: American Quarter Horse ($n = 46$), (Norwegian) Fjord Horse ($n = 32$), Shetland pony ($n = 24$), Welsh (A-C) pony ($n = 23$), and Arabian ($n = 16$), (Tyrolean) Haflinger horse ($n = 16$). To include as many animals as possible, we assigned remaining breeds to one of 6 clusters based on genetic background using the information by Petersen et al. (2013) [19] and Felicetti et al. (2010) [20]. The Petersen study shows genetical proximity between 38 defined breeds based on majority rule and neighbor-joining tree calculations, with data acquired from 10,000+ single nucleotide polymorphisms (SNP). Felicetti et al. evaluated similarity in 15 breeds with partial inclusion and overlap with breeds included by Petersen [19]; however, their group allocation was based on microsatellite data. Based on further recommendations (JLP), we added some yet-unassigned breeds to the following clusters: Criollo—cluster 3; Friesian and Haflinger—cluster 4; Connemara and Welsh pony—cluster 5 (British Isles pony breeds), and Konik, Huzul—cluster 6 (Nordic pony, coldblooded breeds). We did not reach consensus for the following breeds: Lipizzaner ($n = 1$), Lewitz horse ($n = 1$), Duellmener ($n = 1$), and Pinto ($n = 1$). These animals remained unassigned and were excluded from any 'breed' calculations. The product of direct (F1) crossbreeding within a cluster resulted in addition of the data to the same cluster (e.g., a Warmblood-Standardbred cross product, 2 horses). Products of crossbreeding between 2 clusters were excluded from the breed analysis ($n = 15$, Arabian-WB). A sizeable number of animals ($n = 67$) had no pedigree information and were excluded from 'breed' analysis.

Premises A–H and L were in Germany; farms I and M in Denmark; and farms J and K in Sweden. The total number of units and those affected by EHV-1 are listed in Table 2. A unit was considered 'affected' based upon the following findings: (i) diagnostic samples positive for EHV-1; (ii) fever; and (iii) EHM. We assumed > 90% of horses within an affected unit were exposed to EHV-1 and (sub)clinically infected [7]. For the ease of calculations, we assumed all animals exposed and infected. We used R 3.6.3 (29 February 2020) statistical software. All variables—breed, age, sex, and vaccination status—were treated as categorical; age was treated as continuous. We fitted a logistic mixed model to predict EHM, with age, sex, vaccination, and fever as fixed effects, and with farm as a random effect. Due to 311 missing out of 3540 observations, a total of 339 animals with complete records were included in this analysis. The proportion of EHM within 7 breeds with >15 members ($n = 453$) was calculated using a chi-square test, with a proportion test for EHM vs not-EHM for each breed (Figure 1), and a pairwise Fisher's exact test, with Holm adjustment for multiple comparisons for pairwise comparisons between the breeds. The same methods were applied to analyze EHM proportions in clusters 1–6 ($n = 502$) (Figure 2). A chi-square test was used to investigate the effect of EHV vaccination on the proportion of animals with EHM. Separate calculations were done for cluster 1 ($n = 196$) or not-clusters 1 ($n = 91$) animals (Figure 3). The level of significance was set at $\alpha < 0.05$.

Table 1. Breeds alphabetically listed with numbers (n) of horses per breed and genetic cluster assignment (1–6).

Breed Denomination	n	n with EHM	Cluster Assignment
American Paint Horse	1	1	1
American Quarter Horse (AQH)	46	14	1
Appaloosa	1	0	1
Standardbred	2	1	1
Thoroughbred	3	2	1
Warmblood (all studbooks) (WB)	296	87	1
F1 crossbred within cluster	1	0	1
Arabian	16	3	2
Criollo	1	0	3
Lusitano	2	1	3
Mestizio	1	0	3
Pura raza espanola (PRE)	10	1	3
Draft horse	5	0	4
Friesian	3	1	4
Haflinger	16	3	4
F1 crossbred within cluster	1	0	4
Connemara	5	1	5
New Forest	1	0	5
Welsh pony (classes A–C)	23	1	5
Fjord	32	14	6
Gotland pony	1	0	6
Huzul (Carpathian)	2	0	6
Icelandic	8	2	6
Konik	1	0	6
Shetland pony	24	1	6
Total assigned to clusters	502	133	
Duelmener	1	1	unassigned
Lewitzer	1	1	unassigned
Lipizzaner	1	0	unassigned
Pinto	1	0	unassigned
Robust pony (unknown pedigree; combined based on size, built & appearance)	20	0	unassigned
Sport pony (unknown pedigree; combined based on built & use (dressage, show jumping))	40	9	unassigned
F1 crossbreeds between different cluster	15	6	unassigned
Pedigree unknown horses	8	0	unassigned
Total	589	150	

Table 2. EHV-1 outbreak characteristics of included premises.

Country	Farm ID	Stable Units with Infection, Out of Total Units	EHV-1 Genotype	Horses in Affected Units	Horses with Fever	Horses with Neurological Signs (EHM)	EHV-1 Vaccinated Horses	Questionnaire Return Rate ⁽¹⁾	
Denmark (DK)									
Germany (GE)									
Sweden (SE)									
							Total	with EHM	
GE	A	2 of 4	D	51	46 (90%)	22 (43%)	-	-	100%
GE	B	2 of 2	D	45	30 (67%)	25 (56%)	0	0	49%
GE	C *	7 of 11	D	79	55 (70%)	8 (10%)	32	4	100% ⁽²⁾
GE	D	4 of 4	-	45	4 (9%)	1 (2%)	-	0	38%
GE	E **	3 of 3	-	141	est. 40%	33 (23%)	1	0	100% ⁽²⁾
GE	F	2 of 2	-	70	11 (16%)	2 (3%)	-	-	20%
GE	G	4 of 4	D	54	23 (43%)	9 (17%)	29	5	100%
GE	H	1 of 6	-	23	19 (83%)	18 (78%)	5	5	100%

Table 2. Cont.

Country	Farm ID	Stable Units with Infection, Out of Total Units	EHV-1 Genotype	Horses in Affected Units	Horses with Fever	Horses with Neurological Signs (EHM)	EHV-1 Vaccinated Horses	Questionnaire Return Rate ⁽¹⁾	
Denmark (DK)								Total	with EHM
Germany (GE)									
Sweden (SE)									
DK	I	4 of 5	D	70	68 (97%)	7 (10%)	0	0	9%
SE	J	1 of 1	D	59	35 (59%)	20 (34%)	1	0	100%
SE	K	2 of 2	D	40	22 (55%)	4 (10%)	1	0	100%
GE	L	3 of 3	N	41	15 (37%)	1 (2%)	8	0	100%
DK	M	3 of 3	-	54	42 (78%)	12 (22%)	0	0	100%
Min				23	9%	2%			9%
Max				141	97%	78%			100%
Mean				594	59%	24%			76%

(*) Walter et al., 2013 [18]. (**) Klouth et al., 2021 [12]. ⁽¹⁾ % return from affected stable units only. ⁽²⁾ limited information provided on most questionnaires.

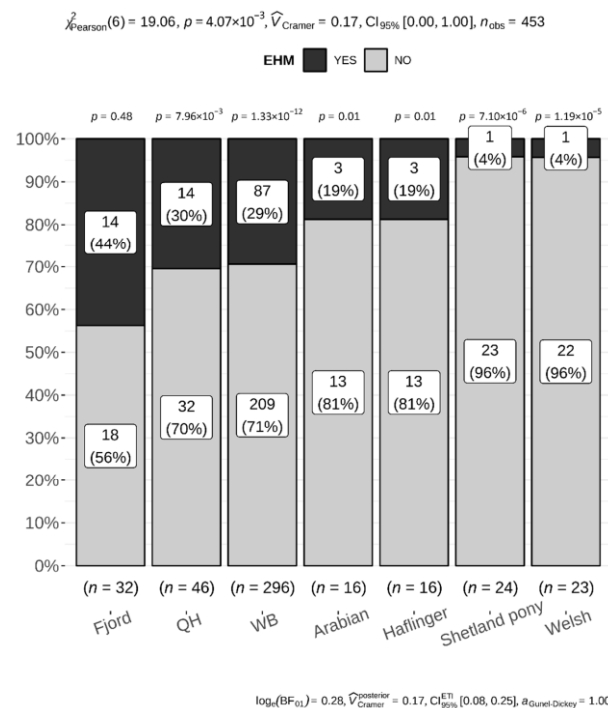


Figure 1. From left to right, 7 distinct breeds (Fjord, Quarter Horse (QH), Warmblood (WB), Arabian, Haflinger, Shetland and Welsh pony) are arranged by decreasing EHM frequency (numbers and percentage as stacked bar plot). The *p*-values above individual stacked bars compare the proportions of EHM-affected (dark gray) individuals to unaffected (light gray) animals within each breed. A chi-square test (top of the plot) finds a significant relationship between breed and EHM (*p* = 0.004), suggesting the need of post hoc pairwise comparisons between individual breeds via Fisher’s tests (reason: low numbers per category). The effect of this relationship is small ($V_{\text{Cramer}} = 0.17$ [21]). In contrast to the *p*-value, the Bayes Factor (BF) provides weak evidence for a relationship between EHM and breed ($\log(\text{BF}_{01}) = 0.28$ [22]), whereas the Bayesian effect size suggests a moderately strong relationship ($V_{\text{Cramer}} = 0.21$; 95% Highest Density Intervals 0.22; 0.73). Such disagreement between the frequentist (plot top) and Bayesian methods (plot bottom) might be caused by a low number of observations in several breeds and suggests the need for more data.

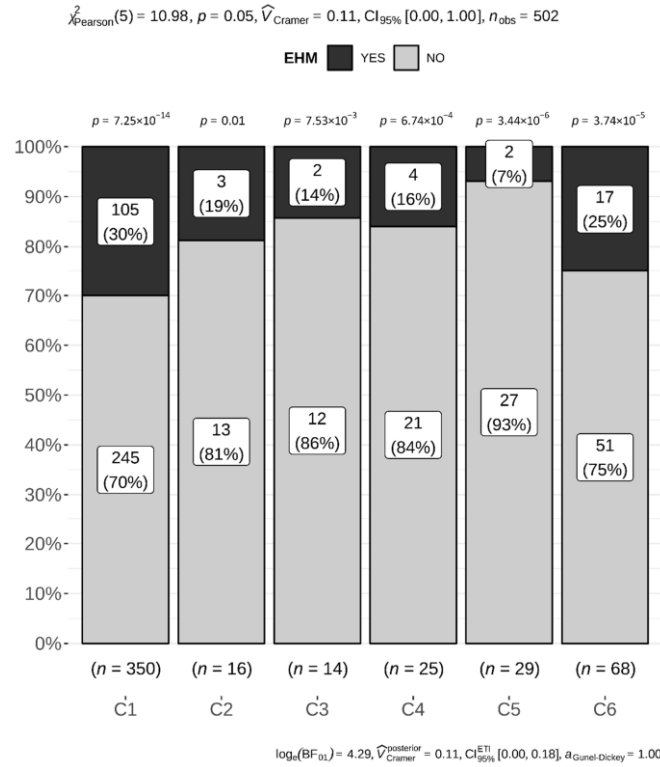


Figure 2. Six breed clusters (1–6) according to similar genetical background are arranged from left to right. EHM frequencies per cluster are shown as percentage in a stacked bar plot (dark grey). The *p*-values above distinct stacked bars compare the proportions of EHM-affected (dark grey) individuals versus unaffected (light gray) animals inside of every particular breed cluster. The chi-square test finds only a suggestive relationship between breed clusters and EHM ($p = 0.05$, low evidence against the null hypothesis). Also, the effect of this relationship is small ($V_{\text{Cramer}} = 0.11$ [21]). The Bayes Factor (BF) supports this result by indicating a very strong evidence for the null hypothesis that there is no relationship between EHM and breed ($\log(\text{BF}_{01}) = 4.29$ [22]). The Bayesian effect size also supports this conclusion with a small effect size ($V_{\text{Cramer}} = 0.15$; 95% Highest Density Intervals 0.09; 0.20).

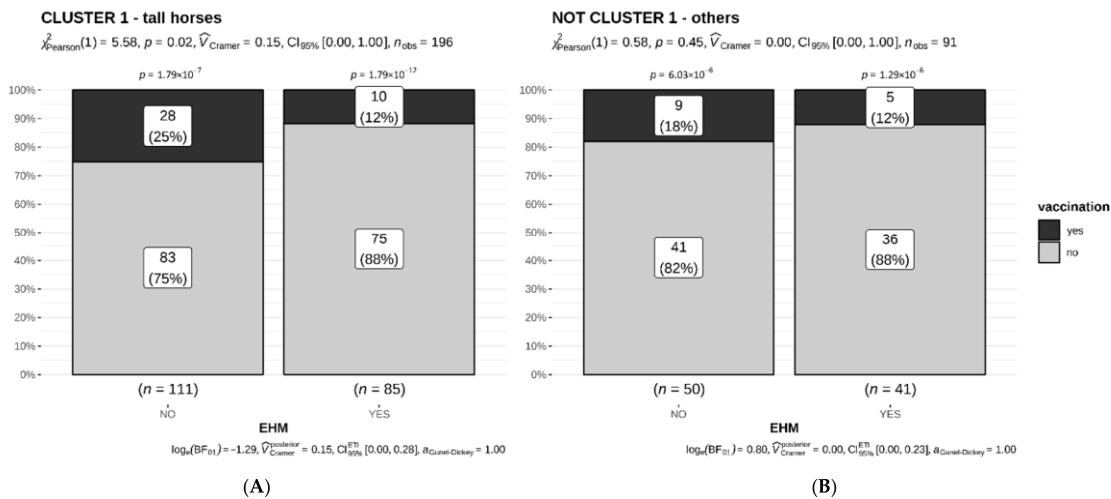


Figure 3. (A) Cluster 1 horses (genetically similar ‘tall’ horses) and 3 (B): all others (*not*-cluster-1) stratified into animals with EHM (right bar, panel (A) or (B)), or without EHM (left bar, panel (A) or (B)),

and further stratified vertically into EHV-unvaccinated (light gray) or EHV-vaccinated (dark gray) animals. The p -values above individual bars compare the proportions of vaccinated versus unvaccinated animals, indicating fewer animals were vaccinated. The chi-square test (results at top of figure) finds a benefit of vaccination in the prevention of EHM ($p = 0.02$) for cluster 1 horses (panel (A)). Those without EHM (left bar) were more frequently (25%) fully vaccinated when compared to horses with EHM, where only 12% were fully vaccinated. The difference in percentages is small ($V_{\text{Cramer}} = 0.15$ [21]). The Bayes Factor (BF) supports this result by indicating a substantial evidence for the benefit of vaccination in EHM prevention ($\log(\text{BF01}) = -1.29$ [22]). The Bayesian effect size is, however, also small ($V_{\text{Cramer}} = 0.16$; 95%; Highest Density Intervals 0.03; 0.28). Findings for *not*-cluster-1 animal results were not significant, likely due to small sample size. The chi-square test (results: top of figure, panel (B)) finds no relationship between vaccination and EHM ($p = 0.45$, no evidence against the null hypothesis). The difference in percentages is small ($V_{\text{Cramer}} = 0.0$ [21]). The Bayes Factor (BF) supports the latter result by indicating no evidence for the null or for the alternative hypothesis ($\log(\text{BF01}) = 0.80$ [22]) and by showing a very small Bayesian effect size ($V_{\text{Cramer}} = 0.09$; 95% Highest Density Intervals 0; 0.23).

3. Results

3.1. Operation Characteristics

Premises differed in many aspects, including the type of husbandry (individual boxes, paddock boxes, or group husbandry); number and size of units (Table 2); and if they were a mixed-breed vs. single- or predominate-breed operation. All farms allowed boarding to some degree, defined as renting boxes to individual horse owners or accepting horses from elsewhere for a limited time. Some farms had additional functions (breeding (B and C); old horse retirement (E); and riding instruction (E, J, and L). It is noteworthy that the consequence of 'additional function' is that a variable proportion of animals on a farm are owned by a single person, often the farm owner/management. The predominant breed on farms A and B was the American Quarter Horse, and Warmblood on farms C, D, F, H, and J–M. In addition to Warmbloods, farms J, K, and M housed many sport ponies without specified breed backgrounds. Farms E, G, and I were mixed-breed operations.

Most farms (A–D, F, H, J, L, and M) had open sidings between boxes (exception: farm K). Farms A, C, and D had mostly single box aisles; other animals were kept in small group husbandry systems. Farm E had an indoor group husbandry system with groups of 4 to 24 horses. While group-housed during nights, all animals were combined in a large outdoor paddock during the daytime (detailed information: [12]).

3.2. EHM Outbreak Characteristics

Only horses from affected stable units were included in the study. Data on outbreaks in C and E were published previously [12,18]. Unfortunately, a few data sets of affected units were incomplete when filed or not filed at all (Table 2).

Most outbreaks started between November and April, with the exceptions of farm B (June) and D (July). The outbreaks started differently. On farms A, B, F, G, and K–M, they began with febrile horses and coughing; on farms D, E, H–J with ataxia or recumbency; or with an abortion (farm C). Numbers of febrile horses and EHM cases varied between outbreaks (Table 2). Reported additional clinical signs during an outbreak included abortions (8; farms C and M), distal limb edema (20; farms G, F and I), and coughing (6; farms B, F, J, and L). Polymerase gene polymorphism (N- or D-variant) was determined in 8 outbreaks (Table 2). Among those was outbreak L, with a confirmed N-strain variant. Whereas every third horse was affected by a fever, only one animal developed EHM.

All farms announced quarantine as soon as an EHV-1 diagnosis was confirmed, with a few starting quarantines upon suspicion while awaiting laboratory confirmation. Treatment and mitigation strategies and the timing of implementation varied highly. The duration of quarantine ranged from 3 to 15 weeks. Typically, quarantine was lifted four weeks after the last horse with fever or neurologic disease was identified. Farm E maintained their daily routine of daytime turnout (exception: recumbent horses, detailed information [12]);

also farms J and K turned out non-EHM affected horses during the daytime. Any further information on outbreak propagation and mitigation strategies was mostly unavailable.

3.3. Animal Data and Risk Assessment

We included 589 horses/ponies in this study (Table 1). Only those stabled in units with at least one confirmed EHM case, or with a fever attributed to EHV-1 infection were included. EHM incidence in affected units varied (range: 2.2–78.3%; mean: 20.9; SD: 23.0; median: 10.1).

Comparing all outbreaks in a mixed effects logistic regression, EHM was significantly associated with increasing age, female sex, and fever. The model's total explanatory power is substantial, with a conditional $R^2 = 0.58$, whereas the part of the calculation that relates to the fixed effects alone was 0.25 (marginal R^2). Age of the horses ranged from 1 to 33 years (mean: 14 years; SD: 6.8 years; median: 13 years; IQR: 9 years). An odds ratio (OR) for age was 1.06 (CI = 1.01–1.12; $p = 0.032$). Treated as a continuous variable, an age increase by one year increased the risk for EHM by 6%. There were 287 male (incl. 3 intact males) and 251 female animals in affected units. Female horses were at greater risk to develop EHM (OR = 1.94; CI = 1.02–3.67; $p = 0.042$). A potent indicator of whether an animal would develop EHM during an outbreak was fever (OR = 13.95; CI = 5.75–33.81; $p \leq 0.001$) (Table 3).

Table 3. Results of the logistic mixed model.

Predictors	EHM		
	Odds Ratios	95% CI	<i>p</i>
(Intercept)	0.02 **	0.01–0.11	<0.001
Age	1.06 *	1.01–1.12	0.032
Sex (female)	1.94 *	1.02–3.67	0.042
Vaccination (yes)	1.02	0.35–2.98	0.965
Fever (yes)	13.95 **	5.75–33.81	<0.001
Random Effects			
σ^2	3.29		
τ_{00} farm	2.62		
ICC	0.44		
N_{farm}	12		
Observations	339		
Marginal R^2 /Conditional R^2	0.249/0.582		
AIC	292.679		

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

We compared 453 horses/ponies of 7 distinct breeds with group sizes > 15 and their respective EHM frequencies. Figure 1 shows the proportions of EHM-affected animals within a distinct breed. Comparing these breeds using pairwise Fisher's exact test with Holm adjustment for multiple comparisons, Fjord horses and Shetland ponies ($p = 0.017$), and Fjord horses and Welsh ponies ($p = 0.031$) differed significantly in their EHM proportions. Other comparisons did not reach statistical significance.

We reassigned 502 animals to 6 clusters with similar genetical background (Table 1). For each cluster we determined the proportion of EHM (Figure 2). As we allocated several 'tall horse' breeds to cluster 1, the group size totaled 350; however, it did not alter the proportion of EHM-affected animals (30%) (compare Figure 1 with Figure 2). Welsh ponies assigned to cluster 5 were combined with few other breeds, which increased the group size in cluster 5 slightly, but more so, the EHM proportion increased to 7% within the cluster. As we combined the Icelandic horse, Shetland pony and Fjord horses in cluster 6, the group size increased to $n = 68$, but it also increased the EHM proportion in this cluster. Applying identical statistical methods, a pairwise Fisher's exact test followed by Holm adjustment for multiple comparisons, differences in EHM proportions between cluster 1 and cluster 5 were reaching significance only in the uncorrected Fisher's exact test ($p = 0.005$). We noticed the

same trend between cluster 5 and cluster 6 ($p = 0.051$). With Holm adjustment for multiple comparisons, only cluster 1 and 5 differences approached statistical significance ($p = 0.078$).

3.4. Vaccination

For the next analysis, we only included animals with a documented EHV-1 vaccination history according to equine passport information. Cluster 1 was more likely vaccinated compared to the other clusters. To investigate a potential effect of vaccination on EHM frequencies, we sorted EHV-1 vaccinated, unvaccinated, and EHM frequencies for cluster 1 vs. all other (*not*-cluster 1) animals (Figure 3A,B). A total of 287 animals were included with 196 horses in cluster 1 and 91 animals in all other clusters (*not*-cluster 1). For cluster 1 there were 111 horses without signs of EHM, of which 28 (25%) were vaccinated. Among cluster 1 horses, 85 were identified with EHM, of which 10 (12%) were vaccinated (Figure 3A). In the *not*-cluster 1 group (Figure 3B) there were 50 horses/ponies without EHM, of which 9 (18%) were vaccinated. Only 5 (12%) of 41 animals in *not*-cluster-1 with EHM were vaccinated. Analyzing the influence of an EHV vaccination using a chi-square-test, the p -value for cluster 1 was 0.018, indicating a benefit of vaccination, but with a weak relationship ($V_{\text{Cramer}} = 0.15$). With a bias factor (BF) of -1.29 , indicating substantial evidence for the H_1 -hypothesis, we may assume that there is a beneficial effect of vaccination reducing the probability for EHM in cluster 1 horses overall. In *not*-cluster 1 animals, the difference of EHM in vaccinated vs. unvaccinated (9 vs. 5 animals) was less pronounced and not statistically significant ($p = 0.445$), likely because of a small sample size of vaccinated horses. Data were independent from each other. Interestingly, the percentage of vaccinated animals that still developed EHM (12%) was the same in both groups.

4. Discussion

The results of the present study show a highly variable incidence of EHM among the investigated outbreaks, with a seasonal accumulation during (European) winter and spring. Most outbreaks were in boarding facilities, which also implies a high volume of human traffic. All premises included in this study stabled either primarily, mostly, or a large proportion of Warmblood (WB) or American Quarter Horse (AQH). Even within single or predominant breed premises with an EHV-1 outbreak, the EHM incidence varied between 2.2–78.3%, which clearly indicates the highly variable presentation of this disease, likely influenced by multiple variables of infection dynamics. We confirm, however, increasing age and female sex as risk factors for higher EHM incidence, whereas the incidence varied distinctly between breeds in mixed-breed operations. Our findings corroborate those in a previous study on EHM outbreaks in the Netherlands between 1999–2003 [9]. Whereas animals in the Dutch study were all unvaccinated against EHV-1, according to our definition, our study included an 18% proportion of confirmed (biannually) vaccinated animals.

Limitations: we excluded an EHM outbreak because of the specific circumstances in an equine hospital [23]. Furthermore, we cannot claim completeness, since we included all EHM outbreaks within the time period investigated, as we typically followed up on voluntary reporting.

Here, we confirm previous findings that most EHM outbreaks in the northern hemisphere occur during the cooler time of the year, although we are aware of outbreaks that started in the midst of summer. A seasonality for EHM outbreaks is consistent with alternative data sources. Pusterla et al., 2022, found that EHV-1 in nasal swabs of horses affected by fever or respiratory disease were limited to spring months, and monthly reports from the Equine Disease Communication Center, Lexington, Kentucky, or the International Collating Centre, Newmarket, UK, show a peak in EHM reporting between late fall and late spring [24]. The general belief is that extrinsic (environmental) factors likely enhance or sustain viral transmissibility. All operations included in this study were boarding or combined training and breeding facilities. This implies frequent horse movements on-and-off the premises; frequent direct and indirect contacts between animals; and a high human traffic volume on-and-off and within the premises, which all can facilitate viral spread. While all

premises were characterized by an even distribution of age and sex frequencies, our results confirm a previously described increased risk for EHM in horses with increasing age and for the female sex following an infection [13]. These risk factors may relate to differences in inflammatory pathways or immunological profiles in the aged vs. young, or to variation in stress-related or male/female reproductive endocrinology [6].

With only four exceptions, most operations in our study were single- or predominate-breed operations composed of WB or AQH. A total of 66% of our overall study population were either WB horses (50%), AQH (8%), Shetland (4%) or Welsh pony (4%). These breeds are common and popular in Europe and are frequently encountered at equestrian events, used for recreational riding, or kept for companionship. EHM outbreaks on single-breed operations have been described for Thoroughbred, Standardbred, WB (and sport horse crossbreeds), AMQ/Paint, and Lipizzaner [14,18,25,26]. Denmark, Germany, and Sweden, however, are also known for large and numerous operations that exclusively house Icelandic or Arabian horses, whereas Germany and neighboring Austria boast several Tyrolean Haflinger single-breed premises. Similar to the competitive WB and AQH calendar, and similar to Thoroughbred/Standardbred racing schedules, there is an extensive competitive agenda for Icelandic, Arabian, and Haflinger horses—including multiple-day competitions, equestrian training clinics, and breeding stock shows—that require mixing and mingling as well as transportation and traveling. Yet, to our knowledge, there have been no EHM outbreaks reported from single-breed operations for any of the three breeds. Interestingly, while resilient data is unavailable, Haflinger and Icelandic breed stakeholders confirm EHV-1 abortions on single-breed operations (R. Mair, Fohlenhof Ebbs, Austria, and G. Jónsson, Icelandic Horse breeder association (IPZV), Hannover, Germany, both: personal comm.). Furthermore, a recently published investigation into EHV-1 infection prevalence among Arabian horses in Egypt evidenced abortions caused by EHV-1 with only a single EHM case during four years of surveillance [27]. These observations support that EHV-1 is also prevalent among these breeds; however, despite its presence, EHM cases are rare. In the Dutch study, Goehring et al. (2006) already noticed that EHM incidence among Arabian horses and Haflingers was low and in numbers between an increased incidence for WB and a decreased incidence for Shetland and Dartmoor ponies (listed as ‘archetypical ponies’), which served as the reference (OR = 1) for odds ratio (OR) calculations [9]. Most of our Arabian horse populations in this study were housed on a single farm (farm E, Table 2). This farm was considered a truly multiple-breed herd with roughly 140 animals. This farm also housed a 26-head herd of Fjord horses, of which 13 developed EHM during this outbreak. Different from the Dutch study, we used this group as the reference for OR calculations evaluating this individual outbreak [12]. ORs suggested a decreased EHM risk for both Shetland and Welsh ponies ($p = 0.008$ and $p = 0.007$, respectively). The ORs for Arabian horses suggested a trend for a reduced risk; however, results were not statistically significant ($p = 0.07$). As EHM incidence on farm E was similar among WB and Fjord horses, it was not surprising that there were no changes in odds when these two breeds were compared. The importance of the variability in EHM incidence among the five breeds is noteworthy, as all animals were age-matched, with an equal ratio between sexes. Furthermore, all five breeds were mingling during the daytime on an outdoor paddock, and this practice was continued during the entire outbreak. In addition, Arabian and Warmblood horses (EHM in 1/12 vs. 10/22 animals), and Fjord horses and Welsh ponies (EHM in 13/26 vs. 1/21) were housed together by nights in a closed building in group husbandry [12]. We believe these findings and the disproportionate number of outbreaks reported on single/predominant WB and AQH breed farms compared to farms with predominant Icelandic, Arabian, or Haflinger populations is strong evidence to consider breed as a risk factor in the development of EHM. These findings and the peer-reviewed literature supported an increased risk for EHM among members of cluster 1 breeds compared to other clusters. Ignoring the importance of the intrinsic and extrinsic factors of multifactorial disease during an individual farm outbreak and comparing breeds in a pairwise fashion showed statistically significant results only between the Fjord horses

and the Shetland and Welsh pony group ($p = 0.017$ and $p = 0.031$, respectively). These results are similar to the previous study conducted in the Netherlands, which showed a decreased EHM incidence for Shetland pony. However, here it was of no help combining breeds with similar genetical background in clusters in an attempt to increase group sizes. Specifically, when we combined Shetland pony, Icelandic and Fjord horse in cluster six, we lost statistical power because of the high EHM incidence. Fjord horses as a group were added to an otherwise low incidence group (Shetland pony). In summary, our results indicate that susceptibility for EHM is likely complex, as it is a multifactorial disease. Including available literature sources and observations as listed above, genetic factors are likely to influence susceptibility to EHM; however, they do not segregate by breed type (or cluster), as seen in cluster 6.

A fever in the adult horse or pony following an EHV-1 infection is typically a systemic response to viremia. It is a monophasic fever for two to seven, and under experimental conditions a first day of fever is noticed between days two to five post infection [5,6]. Absence of fever in purpose-infected (adult) animals, on the other hand, correlates with no or low-grade viremia. However, as primary respiratory tract infections occur, the animal will replicate and shed virus, and the animal will seroconvert. During most outbreaks, data collection on body temperature was performed at many time points and in most animals, but not in all. During some outbreaks, we were only able to obtain an estimate of the proportion of fever in the herd. Hence, fever 'yes/no' during the outbreak has mostly been the only available information to us. As viremia is a prerequisite for EHM, it is not surprising that detected fever in this study had the highest OR for EHM of all risk factors investigated. This has been also shown in the past [9]. The general belief is that proinflammatory cascades and immune profiles generated during viremia will prime the CNS vasculature to allow lymphocytic/monocytic cell extravasation and endothelial cell infection [8]. While only a proportion of viremic animals develop EHM, it may depend on magnitude and duration of viremia. However, a significant difference of undetectable viremia has been noticed among vaccinates in two separate vaccination-challenge experiments in the past [10,28].

As >90% seroconversion for EHV-1 is assumed in a barn unit affected by EHM, and only a proportion of animals develops fever or EHM, a subclinical infection of (almost) the entire unit has to be assumed [7]. A balance between viral qualities, infectious dose, and innate/specific immunity in the host will determine the degree of clinical signs following an infection. Transmissibility of infectious virus can be mitigated by distance and barriers, whereas specific immunity against EHV-1 originates from previous exposure and/or vaccine prophylaxis. Reliable vaccination status could be obtained from 287 animals, and only a small proportion of animals were vaccinated against EHV-1 (18.1%). A slightly higher percentage of EHV-1 vaccinated horses (19.4%, 38 of 196) was detected in cluster 1 horses, whereas the percentage of vaccinated horses was 18.7% (14/91) in any not-cluster 1 animal. More than 95% of animals were vaccinated with an inactivated product against EHV-1 (and -4), which was the predominant product on the market during the observational period. As breed, age, sex and occurrence of EHM were the only objective descriptors in this outbreak evaluation and seroconversion data were unavailable, we limited our assessment on the possible effect of vaccination on EHM to cluster 1 horses. Here, we noticed a lower percentage of EHM affected horses among the EHV-1-vaccinated (12%) over the unvaccinated (or insufficiently vaccinated) horses (25%). While this calculation does not take other risk-increasing or risk-reducing factors such as distance, exposure to infectious dose, or mitigation into account, it may indicate some level of protection from viremia and EHM in the vaccinee. However, this data also suggests that regardless of breed, age, and sex, where high infectious doses and effective transmissibility are achieved, EHM will be induced, regardless.

This study is a retrospective analysis of 13 highly variable outbreaks with data collection in 3 European countries, where local characteristics and procedures are likely to be of major importance in the course of an outbreak. In our experience, prevention or mitigation comes through rapid identification of an index case, immediate testing of animals in the

vicinity of case 1, and swift transfer of any shedding animal into isolation units. However, in addition to farm-dependent factors, our findings strengthen current thoughts on other risk factors in the development of EHM. We are aware that a study such as ours does not allow stringent hypothesis testing. However, it should stimulate hypothesis generation for future projects. In fact, our findings support the reliability of the ‘old horse model’ in EHV-1 experimental infection. This model is already in use in experiments where a high proportion of EHM-affected animals is desired, without the need for large group sizes to test vaccine or drug efficacy against EHM [5,6,29].

Author Contributions: Conceptualization, E.K. and L.S.G.; data curation, E.K.; formal analysis, Y.Z.; funding acquisition, L.S.G.; investigation, L.S.G.; methodology, Y.Z. and J.L.P.; project administration, L.S.G.; resources, G.G., S.M. and L.S.G.; software, Y.Z.; supervision, L.S.G.; validation, E.K., Y.Z., J.L.P., M.d.B., G.G., S.M. and L.S.G.; visualization, Y.Z.; writing—original draft, E.K. and L.S.G.; writing—review & editing, L.S.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by Dechra Veterinary Products (s’Hertogenbosch, The Netherlands).

Institutional Review Board Statement: As this study is a retrospective analysis of a disease outbreak without any consulting or direct actions from our side influencing the outbreak course, an institutional animal care and use committee evaluation is not required.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the veterinarians, the farm management, and the horse owners for their time giving us the needed information.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Lunn, D.; Davis-Poynter, N.; Flaminio, M.; Horohov, D.; Osterrieder, K.; Pusterla, N.; Townsend, H. Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J. Vet. Intern. Med.* **2009**, *23*, 450–461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wilsterman, S.; Soboll-Hussey, G.; Lunn, D.; Ashton, L.; Callan, R.; Hussey, S.; Rao, S.; Goehring, L. Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet. Microbiol.* **2011**, *149*, 40–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Edington, N.; Welch, H.; Griffiths, L. The prevalence of latent equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Vet. J.* **1994**, *26*, 140–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Allen, G.P.; Kydd, J.H.; Slater, J.D.; Smith, K.C. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. In *Equine Infectious Diseases*, VIII ed.; Wernery, U., Wade, J., Mumford, J., Eds.; R&W Publications: Newmarket, Suffolk, UK, 1999; pp. 129–146.
5. Maxwell, L.K.; Bentz, B.G.; Gilliam, L.L.; Ritchey, J.W.; Pusterla, N.; Eberle, R.; Holbrook, T.C.; McFarlane, D.; Rezabek, G.B.; Meinkoth, J.; et al. Efficacy of the early administration of valacyclovir hydrochloride for the treatment of neuropathogenic equine herpesvirus type-1 infection in horses. *Am. J. Vet. Res.* **2017**, *78*, 1126–1139. [[CrossRef](#)]
6. Giessler, K.; Goehring, L.; Jacobs, S.; McCauley, A.; Esser, M.; Lee, Y.; Zarski, L.; Weber, P.; Soboll Hussey, G. Use of the old horse model to identify horst factors contributing to EHM pathogenesis. In Proceedings of the Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, IL, USA, 4–7 December 2020; p. 269.
7. van Maanen, C.; van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.S.; Damen, E.; Derksen, A. Neurological disease associated with EHV-1 infection in a riding school: Clinical and virological characteristics. *Equine Vet. J.* **2001**, *33*, 191–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Pusterla, N.; Hussey, G.S.; Goehring, L.S. Equine Herpesvirus-1 Myeloencephalopathy. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2022**, *38*, 339–362. [[CrossRef](#)]
9. Goehring, L.S.; van Winden, S.C.; Van Maanen, C.; van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S. Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in the Netherlands: A four-year retrospective study (1999–2003). *J. Vet. Intern. Med.* **2006**, *20*, 601–607.
10. Goehring, L.; Wagner, B.; Bigbie, R.; Hussey, S.; Rao, S.; Morley, P.; Lunn, D. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine* **2010**, *28*, 5203–5211. [[CrossRef](#)]

11. Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K.; Mumford, J.; Swann, Z.; Newton, J.; Bowden, R.; Allen, G.; Davis-Poynter, N. 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.* **2006**, *80*, 4047–4060. [[CrossRef](#)]
12. Klouth, E.; Zablotski, Y.; Goehring, L.S. Apparent Breed Predisposition for Equid Herpesvirus-1-Associated Myeloencephalopathy (EHM) in a Multiple-Breed Herd. *Pathogens* **2021**, *10*, 537. [[CrossRef](#)]
13. Allen, G.P. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *Am. J. Vet. Res.* **2008**, *69*, 1595–1600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Traub-Dargatz, J.L.; Pelzel-McCluskey, A.M.; Creekmore, L.; Geiser-Novotny, S.; Kasari, T.; Wiedenheft, A.; Bush, E.; Bjork, K. Case-control study of a multistate equine herpesvirus myeloencephalopathy outbreak. *J. Vet. Intern. Med.* **2013**, *27*, 339–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Schnabel, C.L.; Babasyan, S.; Rollins, A.; Freer, H.; Wimer, C.L.; Perkins, G.A.; Raza, F.; Osterrieder, N.; Wagner, B. An equine herpesvirus type 1 (EHV-1) Ab4 open reading frame 2 deletion mutant provides immunity and protection from EHV-1 infection and disease. *J. Virol.* **2019**, *93*, e01011–e01019. [[CrossRef](#)]
16. Henninger, R.W.; Reed, S.M.; Saville, W.J.; Allen, G.P.; Hass, G.F.; Kohn, C.W.; Sofaly, C. Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *J. Vet. Intern. Med.* **2007**, *21*, 157–165. [[CrossRef](#)]
17. Couroucé, A.; Tessier, C.; Pomares, R.; Thévenot, R.; Marcillaud-Pitel, C.; Pronost, S.; Legrand, L.; Pitel, P.H. EHV-1 neurological outbreak during a show jumping competition: A clinical and epidemiological study. In Proceedings of the 11th International Equine Infectious Diseases Conference, virtual conference, 27 September–1 October 2021; p. 52.
18. Walter, J.; Seeh, C.; Fey, K.; Bleul, U.; Osterrieder, N. Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. *Acta Vet. Scand.* **2013**, *55*, 19. [[CrossRef](#)]
19. Petersen, J.L.; Mickelson, J.R.; Cothran, E.G.; Andersson, L.S.; Axelsson, J.; Bailey, E.; Bannasch, D.; Binns, M.M.; Borges, A.S.; Brama, P. Genetic diversity in the modern horse illustrated from genome-wide SNP data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54997. [[CrossRef](#)]
20. Felicetti, M.; Lopes, M.; Verini-Supplizi, A.; da Câmara Machado, A.; Silvestrelli, M.; Mendonça, D.; Distl, O. Genetic diversity in the Maremmano horse and its relationship with other European horse breeds. *Anim. Genet.* **2010**, *41*, 53–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Funder, D.C.; Ozer, D.J. Evaluating effect size in psychological research: Sense and nonsense. *Adv. Methods Pract. Psychol. Sci.* **2019**, *2*, 156–168. [[CrossRef](#)]
22. Jeffreys, H. *The Theory of Probability*; OUP: Oxford, UK, 1998.
23. Vandenberghe, E.; Boshuizen, B.; Delesalle, C.J.; Goehring, L.S.; Groome, K.A.; van Maanen, K.; de Bruijn, C.M. New Insights into the Management of an EHV-1 (Equine Hospital) Outbreak. *Viruses* **2021**, *13*, 1429. [[CrossRef](#)]
24. Pusterla, N.; Barnum, S.; Young, A.; Mendonsa, E.; Lee, S.; Hankin, S.; Brittner, S.; Finno, C.J. Molecular Monitoring of EHV-1 in Silently Infected Performance Horses through Nasal and Environmental Sample Testing. *Pathogens* **2022**, *11*, 720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Friday, P.A.; Scarratt, W.K.; Elvinger, F.; Timoney, P.J.; Bonda, A. Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2000**, *14*, 197–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bürki, F.; Nowotny, N.; Hinaidy, B.; Pallan, C. Die Ätiologie der Lipizzanerseeuche in Piber 1983: Equine Herpesvirus 1. *Wien Tierärztl Mschr* **1984**, *71*, 312–320.
27. Ahdy, A.M.; Ahmed, B.M.; Elgamal, M.A.; Shaalan, M.; Farag, I.M.; Mahfouz, E.R.; Darwish, H.R.; Sayed-Ahmed, M.Z.; Shalaby, M.A.; El-Sanousi, A.A. Detection of Equid Alphaherpesvirus 1 from Arabian Horses with different clinical presentations between 2016–2019 in Egypt. *J. Equine Vet. Sci.* **2022**, *114*, 103960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Minke, J.; Fischer, L.; Baudu, P.; Guigal, P.; Sindle, T.; Mumford, J.; Audonnet, J. Use of DNA and recombinant canarypox viral (ALVAC) vectors for equine herpes virus vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2006**, *111*, 47–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Allen, G.; Breathnach, C. Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine Vet. J.* **2006**, *38*, 252–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

V. DISKUSSION

Die Studien bestätigen vorherige Beobachtungen, dass Prädispositionen für die Ausprägung einer EHM verantwortlich sein können. In Bezug auf die Rassen konnten bisherige Studien bestätigt werden, die ergaben, dass Warmblüter und Quarter/Paint Horses häufig betroffen sind (TRAUB-DARGATZ et al., 2013; WALTER et al., 2013). Um Prädispositionen bei Englischen Vollblütern, Trabern, Barockpferden und Kaltblütern bestätigen zu können, blieb unsere Fallzahl bei diesen Rassen zu klein. Auch ein zuvor beobachtetes vermindertes Risiko bei Robustponys (GOEHRING et al., 2006) konnten wir bestätigen. Bisher nicht beschriebene Ausbrüche auf reinen Araberbetrieben legen die These nahe, dass diese Rasse unempfindlich gegenüber EHM ist. Auch diese Beobachtung sehen wir in der ersten Studie bestätigt, gab es doch 13 Araber, die mit EHM erkrankten Pferden zusammengehalten wurden, von denen nur ein einziger selber EHM entwickelte. Eine völlig neue Entdeckung ist die Häufigkeit des Auftretens neurologischer Symptome beim Fjordpferd. Bisher waren auch für diese Rasse keine Ausbrüche auf Zuchtbetrieben beschrieben und sie wurden zu den Robustponys gezählt und für unempfindlich gehalten. Allerdings muss auch betont werden, dass diese Prädisposition nur in einem Ausbruch beobachtet werden konnte und dass wir nicht ausschließen können, dass andere, unbekannte Umstände diese Ergebnisse beeinflusst haben.

Die bisherige These, dass alte Pferde eine höhere Gefahr haben, an EHM zu erkranken, konnte in der ersten Studie nicht bestätigt werden. Allerdings war die gesamte Population hier auch sehr alt. Mit einem Alter von sechs Jahren bei dem jüngsten Pferd lagen wir hier schon über der beschriebenen Altersgrenze für EHM von drei Jahren (GOEHRING et al., 2006) bzw. fünf Jahren (HENNINGER et al., 2007). In der Gesamtstudie konnte dann eine lineare Zunahme mit dem Alter beobachtet werden, sodass das sogenannte „old-horse-model“ bestätigt werden kann.

Eine zuvor angenommene Geschlechtsprädisposition für weibliche Pferde (GOEHRING et al., 2006; TRAUB-DARGATZ et al., 2013) konnten wir trotz gleichmäßiger Geschlechtsverteilung in der ersten Studie nicht nachweisen. In der Gesamtstudie waren weibliche Pferde häufiger von EHM betroffen als männliche.

Eine viel diskutierte Frage ist, ob die Impfung Auswirkungen auf die Entwicklung einer EHM haben kann oder nicht. Dabei wird sowohl ein schützender Effekt als auch ein

prädisponierender Effekt diskutiert (HENNINGER et al., 2007; TRAUB-DARGATZ et al., 2013; VAN GALEN et al., 2015). Besonders aktuell ist die Diskussion durch die ab 2023 geltende Impfpflicht im deutschen Turniersport (HELKENBERG und BASIC, 2021). Die Tatsache, dass die Impfung zwar im Falle einer Infektion die Ausscheidung limitiert, aber nicht erwiesenermaßen die Symptome reduziert, lässt viele Pferdebesitzer zögern. In den letzten Jahren häufen sich außerdem die Gerüchte über schlimme Impfreaktionen und über die angeblich schlimmere Verlaufsform von EHV-1-Infektionen bei geimpften Pferden (persönliche Erfahrung). Abgesehen von dem erhöhten Risiko für einen schwereren Verlauf bis zu 5 Wochen nach der Impfung (TRAUB-DARGATZ et al., 2013) konnte Derartiges noch nicht bewiesen werden. Der einzelne Ausbruch mit nur einem geimpften Pferd zeigt, dass die Impfung definitiv nicht als Hauptverursacher hoher EHM-Zahlen bezeichnet werden darf. In der Gesamtstudie gab es eine Impfquote von 23 %. Hier konnte gezeigt werden, dass die Impfung bei Risikorassen einen schützenden Effekt gegen die Ausprägung neurologischer Symptome haben kann. Schließlich wurden für die betreffende Analyse nur erkrankte (Fieber und/oder EHM) Pferde herangezogen, die definitiv mit dem Virus in Kontakt gekommen waren. Bei den häufig betroffenen Rassen, die wir in Cluster 1 zusammengefasst hatten, konnte die Impfung die EHM-Rate von 25 % auf 12 % reduzieren. Eine EHM-Rate von 10-12 % scheint in größtenteils geimpften Beständen üblich zu sein (unveröffentlichte Berichte aus den USA). Hier handelt es sich wahrscheinlich um Pferde, die mit besonders hohen infektiösen Dosen in Kontakt kamen oder die aus anderen Gründen prädisponiert waren. Diese Beobachtung bestätigt auch die multifaktorielle Pathogenese.

Ein begleitender „Farm-Effekt“, sprich ein Einfluss des jeweiligen Betriebes und anderer ausbruchsspezifischer Parameter auf die Ergebnisse, kann nie ausgeschlossen werden. In der Auswertung der Gesamtstudie haben wir dies in die gemischte logistische Regression mit einbezogen, indem der Faktor „Farm“, also aus welchem Betrieb und welchem Ausbruch die Daten stammten, als „Random-Effekt“ mitberechnet wurde. So können mögliche verfälschende Umstände – Confounder – aus der Analyse ausgeschlossen werden. Diese Confounder könnten z. B. sein, dass Pferde einer Rasse immer zusammen gehalten wurden und sich deshalb gegenseitig angesteckt haben, dass nur alte Tiere auch geimpft waren oder dass private Pferde, die zufällig alle weiblich waren, andere Behandlungen erhalten haben als z. B. die männlichen Schulpferde. Ein Farm-Effekt kann auch dadurch entstehen, dass Quarantäne- und Hygienemaßnahmen in einigen Betrieben konsequenter als in anderen durchgehalten wurden und dass die

Diagnosestellung zu unterschiedlichen Zeiten erfolgte, sodass Interventionen nicht immer frühestmöglich getroffen wurden.

Um weitere Klarheit darüber zu erlangen, welche wirtsspezifischen Unterschiede für die extrem unterschiedlichen Verläufe im Rahmen eines EHM-Ausbruchs verantwortlich sind, wäre eine epidemiologische Studie mit einer gleichmäßigeren Rasseverteilung interessant. Ideal wäre, wenn die äußeren Umstände (Haltungsform, Behandlung, Absonderung betroffener Pferde) der Ausbrüche so ähnlich wie möglich gehalten würden, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu erzielen. Sinnvoll wäre es außerdem, alle Pferde, insbesondere auch die asymptomatischen, zu testen, um besser einschätzen zu können, welche Pferde nicht infiziert wurden und welche tatsächlich infiziert waren, aber keine Symptome entwickelten. Langfristig muss der entscheidende Faktor im Erbgut häufig betroffener Pferde gefunden werden, es sind also weitere Genanalysen notwendig. Hierfür könnte man sowohl natürliche Ausbrüche als auch experimentelle Infektionen verwenden, wobei natürliche Ausbrüche aus ethischer Sicht selbstverständlich zu bevorzugen sind. Interessant wäre es, Rassen, die in mehreren Studien signifikant für EHM gefährdet waren, mit denen zu vergleichen, die bisher als ungefährdet gelten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Equide Herpesvirus 1, welches weltweit verbreitet ist und in vielen Ländern der Welt immer wieder schwere Ausbrüche verursacht, kann beim Pferd Atemwegserkrankungen, Aborte und eine Myeloenzephalopathie (EHM) auslösen. Interessanterweise sind die Zahlen an EHM erkrankter Pferde in den verschiedenen beschriebenen Ausbrüchen sehr unterschiedlich, was vermuten lässt, dass es Faktoren gibt, die die Entstehung einer EHM beeinflussen. Da ein Großteil der Ausbrüche im Winterhalbjahr auftritt und Ausbrüche im Sommer meist milder verlaufen, ist inzwischen bekannt, dass es Umweltfaktoren wie Jahreszeit, Temperatur und Luftfeuchtigkeit gibt, die einen Einfluss auf die Entwicklung eines EHV-1-Ausbruchs haben. Bewiesen ist außerdem, dass es unterschiedliche Subtypen des EHV-1 gibt, von denen einer durch eine Punktmutation in der DNA-Polymerase entstanden ist und sich schneller im Wirt vermehrt. Dadurch kann er auch häufiger EHM auslösen. Hier spricht man von einem virusspezifischen Faktor. Warum es aber innerhalb eines Ausbruchs, bei dem eine Wetterlage herrscht und der von einem Virusstamm ausgelöst wurde, trotzdem so unterschiedliche Verläufe der Erkrankung gibt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Wirtsspezifische Faktoren, wie Alter, Rasse, Geschlecht und Immunstatus werden vermutet, konnten aber bisher nicht eindeutig bewiesen werden.

Um die wirtsspezifischen Faktoren näher zu untersuchen, wurden Daten der aufgestellten Pferde von 13 Betrieben gesammelt, in denen EHV-1-Ausbrüche aufgetreten waren. Dabei wurden Alter, Rasse, Geschlecht und Impfstatus der erkrankten, aber auch der asymptomatischen Pferde dokumentiert. Es wurde ausgewertet, ob es Alters-, Rasse- oder Geschlechtsprädispositionen gab und ob der Impfstatus einen Einfluss auf die Entwicklung einer EHM hatte.

Eine bisher vermutete Zunahme des EHM-Risikos beim alten Pferd konnten wir bestätigen. Ebenfalls bestätigte sich die bereits vermutete Risikorasse Warmblut. Robustponys scheinen, wie zuvor postuliert, einen natürlichen Schutz gegen EHM zu besitzen. Überraschend war die Häufigkeit, in der EHM in einem Ausbruch bei Fjordpferden auftrat. Zuvor vermutete Geschlechtsprädispositionen konnten wir auch bestätigen. Eine Impfung gegen EHV-1/-4 hatte bei Risikorassen ebenfalls Einfluss auf die Entwicklung einer EHM.

Weitere epidemiologische Studien mit besser vergleichbaren Ausbrüchen und weitere Genanalysen der Risikorassen sind notwendig.

VII. SUMMARY

Equid alphaherpesvirus 1 has a worldwide distribution and it continues to cause severe outbreaks in many countries of the world. It can produce respiratory disease, abortion, and myeloencephalopathy (EHM) in horses. Interestingly, the numbers of EHM-affected horses in the different outbreaks are very diverse, which leads to the hypothesis, that there are factors, that influence the development of EHM. With a bigger part of the outbreaks occurring in the winter season, and outbreaks occurring in the summer are normally milder and infrequent, we speak of environmental factors, meaning season, temperature and humidity. It is further proven, that different subtypes of EHV-1 exist, with one of them having developed through a pointmutation in the DNA-Polymerase, being able to spawn faster in the host and therefore, is able to cause more EHM. This is what we call a virus specific factor. How it is possible, that the courses of the disease are so different in horses during one outbreak, during specific meteorological conditions, and caused by one virus strain, is not yet resolved clearly.

To investigate the host specific factors closer, data of the stabled horses of 13 farms with EHV-1 outbreaks were collected. Age, breed, sex, and vaccination status of the affected as well as the unaffected horses were documented. It was evaluated if there were predispositions for age, breed and sex, and if the vaccination status influenced the development of EHM.

We could reassure a before suspected increase of EHM in older horses. Furthermore, the earlier suspected risk breed “warmblood” was confirmed. Robust ponies seem to have a natural protection against EHM, as it was supposed earlier as well. Surprising was the high incidence of EHM in Fjord horses during one outbreak. Sex predispositions assumed before, we could also validate. A vaccination against EHV-1/-4 had an influence on the development of EHM in risk-breeds.

Further epidemiological studies with better comparable outbreaks and further genetic analysis of risk breeds are necessary.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelgawad A, Azab W, Damiani AM, Baumgartner K, Will H, Osterrieder N, Greenwood AD. Zebra-borne equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in non-African captive mammals. *Veterinary microbiology* 2014; 169: 102-6.

Allen G, Kydd J, Slater J, Smith K. Equid herpesvirus 1 and equid herpesvirus 4 infections. *Infectious diseases of livestock* 2004; 2: 829-59.

Allen G, Breathnach C. Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine Veterinary Journal* 2006; 38: 252-7.

Allen GP, Kydd JH, Slater JD, Smith KC. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. In: *Equine Infectious Diseases*, VIII edn. Wernery U, Wade J, Mumford J, eds. Newmarket, Suffolk, UK: R&W Publications 1999: 129-46.

Allen GP. Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *American journal of veterinary research* 2008; 69: 1595-600.

Ataseven VS, Dağalp SB, Güzel M, Başaran Z, Tan MT, Geraghty B. Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Research in veterinary science* 2009; 86: 339-44.

BMELV (2009) Leitlinien zur Beurteilung von Pferdehaltungen unter Tierschutzgesichtspunkten. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) Referat Tierschutz, Bonn, Germany. 17

Brosnahan M, Al Abri M, Brooks S, Antczak D, Osterrieder N. Genome-wide association study of equine herpesvirus type 1-induced myeloencephalopathy identifies a significant

single nucleotide polymorphism in a platelet-related gene. *The Veterinary Journal* 2019; 245: 49-54.

Burgess B, Tokateloff N, Manning S, Lohmann K, Lunn D, Hussey S, Morley P. Nasal Shedding of Equine Herpesvirus-1 from Horses in an Outbreak of Equine Herpes Myeloencephalopathy in Western Canada. *Journal of veterinary internal medicine* 2012; 26: 384-92.

Bürki F, Nowotny N, Hinaidy B, Pallan C. Die Ätiologie der Lipizzanerseuche in Piber 1983: Equine Herpesvirus 1. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 1984; 71: 312-20.

Chesters P, Allsop R, Purewal A, Edington N. Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *Journal of virology* 1997; 71: 3437-43.

Couroucé A, Tessier C, Pomares R, Thévenot R, Marcillaud-Pitel C, Pronost S, Legrand L, Pitel PH (2021) EHV-1 neurological outbreak during a show jumping competition: a clinical and epidemiological study. 11th International Equine Infectious Diseases Conference. Virtual Conference. 52

Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. The order herpesvirales. *Archives of virology* 2009; 154: 171-7.

Del Piero F, Wilkins P, Timoney P, Kadushin J, Vogelbacker H, Lee J, Berkowitz S, D. La Perle K. Fatal nonneurological EHV-1 infection in a yearling filly. *Veterinary pathology* 2000; 37: 672-6.

Dunuwille WM, YousefiMashouf N, Balasuriya UB, Pusterla N, Bailey E. Genome-wide association study for host genetic factors associated with equine herpesvirus type-1 induced myeloencephalopathy. *Equine Veterinary Journal* 2020; 52: 794-8.

Edington N, Bridges C, Patel J. Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis

caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Archives of virology* 1986; 90: 111-24.

Edington N, Welch H, Griffiths L. The prevalence of latent equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses. *Equine Veterinary Journal* 1994; 26: 140-2.

El-Habashi N, El-Nahass E-S, Abd-Ellatieff H, Saleh A, Abas O, Tsuchiya Y, Fukushi H, Yanai T. Lesions and Distribution of Viral Antigen in the Brain of Hamsters Infected With Equine Herpesvirus (EHV)-9, EHV-1 Strain Ab4p, and Zebra-Borne EHV-1. *Veterinary pathology* 2019; 56: 691-702.

Flanders JA, Wack RF, Pusterla N, Mapes SM, Collins D, Gamble KC. Survey for equine herpesviruses in polar bears (*Ursus maritimus*) and exotic equids housed in us AZA institutions. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2018; 49: 599-608.

Friday PA, Scarratt WK, Elvinger F, Timoney PJ, Bonda A. Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses. *Journal of veterinary internal medicine* 2000; 14: 197-201.

Gatherer D, Depledge DP, Hartley CA, Szpara ML, Vaz PK, Benkő M, Brandt CR, Bryant NA, Dastjerdi A, Doszpoly A. ICTV virus taxonomy profile: herpesviridae 2021. *Journal of General Virology* 2021; 102: 001673.

Gießler K. Characterizing viral distribution, viral load and cell tropism during early latent Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) infection: novel insights into EHV-1 latency pathogenesis. *Diss. med. vet.* 2021. Ludwig-Maximilians Universität.

Giessler KS, Samoilowa S, Soboll Hussey G, Kiupel M, Matiasek K, Sledge DG, Liesche F, Schlegel J, Fux R, Goehring LS. Viral load and cell tropism during early latent Equid Herpesvirus 1 infection differ over time in lymphoid and neural tissue samples from experimentally infected horses. *Frontiers in Veterinary Science* 2020; 7: 621.

Goehring L, Wagner B, Bigbie R, Hussey S, Rao S, Morley P, Lunn D. Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine* 2010a; 28: 5203-11.

Goehring L, Landolt G, Morley P. Detection and management of an outbreak of equine herpesvirus type 1 infection and associated neurological disease in a veterinary teaching hospital. *Journal of veterinary internal medicine* 2010b; 24: 1176-83.

Goehring LS, van Winden SC, Van Maanen C, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MMS. Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in the Netherlands: a four-year retrospective study (1999–2003). *Journal of veterinary internal medicine* 2006; 20: 601-7.

Göhring L, Feige K, Sloet M, De Clercq D, Gerber V, Korbacska-Kutasi O, Corradini I, Malalana F, Morgan R, Katz L. Outbreak of EHV-1 in Valencia—Update 16th March 2021. *ECEIM* 2021: <https://www.eceim.info/news/outbreak-of-ehv-1-in-valencia-update-16th-march-2021>. 03-22-2023.

Greenwood R, Simson A. Clinical report of a paralytic syndrome affecting stallions, mares and foals on a Thoroughbred studfarm. *Equine Veterinary Journal* 1980; 12: 113-7.

Hansen S, Sun L, Baptiste KE, Fjeldborg J, Horohov DW. Age-related changes in intracellular expression of IFN- γ and TNF- α in equine lymphocytes measured in bronchoalveolar lavage and peripheral blood. *Developmental & Comparative Immunology* 2013; 39: 228-33.

Helkenberg U, Basic J. Beirat Sport: Herpes-Impfpflicht für Turnierpferde kommt 2023. *Deutsche Reiterliche Vereinigung* 2021: <https://www.pferd-aktuell.de/news/aktuelle-meldungen/sport/beirat-sport-herpes-impfpflicht-fuer-turnierpferde-kommt-2023>. 11-13-2021.

Henninger RW, Reed SM, Saville WJ, Allen GP, Hass GF, Kohn CW, Sofaly C. Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a university equestrian center. *Journal of veterinary internal medicine* 2007; 21: 157-65.

Jager K, Zoccali C, Macleod A, Dekker F. Confounding: what it is and how to deal with

it. *Kidney international* 2008; 73: 256-60.

Kaufmann SHE. Immunologische Grundbegriffe. In: *Basiswissen Immunologie*. Doyon R-M, Wolter, H., ed. Berlin: Springer-Verlag 2014a: 2-5.

Kaufmann SHE. Antikörper und ihre Antigene. In: *Basiswissen Immunologie*. Doyon R-M, Wolter, H., ed. Berlin: Springer-Verlag 2014b: 19-38.

Klouth E, Zablotzki Y, Goehring LS. Apparent Breed Predilection for Equid Herpesvirus-1-Associated Myeloencephalopathy (EHM) in a Multiple-Breed Herd. *Pathogens* 2021; 10: 537.

Klouth E, Zablotzki Y, Petersen JL, de Bruijn M, Gröndahl G, Müller S, Goehring LS. Epidemiological Aspects of Equid Herpesvirus-Associated Myeloencephalopathy (EHM) Outbreaks. *Viruses* 2022; 14: 2576.

Kohn CW, Reed SM, Sofaly CD, Henninger RW, Saville WJ, Allen GP, Premanadan C. Transmission of EHV-1 by horses with EHV-1 myeloencephalopathy: implications for biosecurity and review. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2006; 5: 60-6.

Kubacki J, Lechmann J, Fraefel C, Bachofen C. Genome Sequence of Equid Alphaherpesvirus 1 (EHV-1) from a Nasal Swab of a Swiss Horse Associated with a Major EHV-1 Outbreak following a Show Jumping Event in Valencia, Spain. *Microbiology Resource Announcements* 2021; 10: e00732-21.

Kydd JH, Smith K, Hannant D, Livesay GJ, Mumford JA. Distribution of Equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Veterinary Journal* 1994; 26: 470-3.

Kydd JH, Townsend HG, Hannant D. The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Veterinary immunology and immunopathology* 2006; 111: 15-30.

Kyriacou DN, Lewis RJ. Confounding by indication in clinical research. *Jama* 2016; 316: 1818-9.

Liu S, Knafels JD, Chang JS, Waszak GA, Baldwin ET, Deibel MR, Thomsen DR, Homa FL, Wells PA, Tory MC. Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 18193-200.

Lunn D, Davis-Poynter N, Flaminio M, Horohov D, Osterrieder K, Pusterla N, Townsend H. Equine herpesvirus-1 consensus statement. *Journal of veterinary internal medicine* 2009; 23: 450-61.

Maxwell LK, Bentz BG, Gilliam LL, Ritchey JW, Pusterla N, Eberle R, Holbrook TC, McFarlane D, Rezabek GB, Meinkoth J, Whitfield C, Goad CL, Allen GP. Efficacy of the early administration of valacyclovir hydrochloride for the treatment of neuropathogenic equine herpesvirus type-1 infection in horses. *American journal of veterinary research* 2017; 78: 1126-39.

McNamee R. Confounding and confounders. *Occupational and environmental medicine* 2003; 60: 227-34.

Montali RJ, Allen G, Bryans J, Phillips L, Bush RM. Equine herpesvirus type 1 abortion in an onager and suspected herpesvirus myelitis in a zebra. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1985; 187: 1248-9.

Mumford JA, Hannant D, Jessett D, O'Neil T, Smith K, Ostlund E. Abortigenic and neurological disease caused by experimental infection with equid herpesvirus-1. *Equine Infectious Diseases VII* 1994: 261-75.

Negussie H, Gizaw D, Tessema TS, Nauwynck HJ. Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy, an emerging threat of working equids in ethiopia. *Transboundary and emerging diseases* 2017; 64: 389-97.

Nugent J, Birch-Machin I, Smith K, Mumford J, Swann Z, Newton J, Bowden R, Allen

G, Davis-Poynter N. Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *Journal of virology* 2006; 80: 4047-60.

Oladunni FS, Horohov DW, Chambers TM. EHV-1: A constant threat to the horse industry. *Frontiers in microbiology* 2019; 10: 2668.

Patel J, Heldens J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)—epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *The Veterinary Journal* 2005; 170: 14-23.

Perkins GA, Goodman LB, Tsujimura K, Van de Walle GR, Kim SG, Dubovi EJ, Osterrieder N. Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984–2007). *Veterinary microbiology* 2009; 139: 375-8.

Pronost S, Cook R, Fortier G, Timoney P, Balasuriya U. Relationship between equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy and viral genotype. *Equine Veterinary Journal* 2010; 42: 672-4.

Pronost S, Legrand L, Pitel PH, Wegge B, Lissens J, Freymuth F, Richard E, Fortier G. Outbreak of equine herpesvirus myeloencephalopathy in France: a clinical and molecular investigation. *Transboundary and emerging diseases* 2012; 59: 256-63.

Pusterla N, Mapes S, Madigan JE, MacLachlan NJ, Ferraro G, Watson JL, Spier S, Wilson WD. Prevalence of EHV-1 in adult horses transported over long distances. *The Veterinary Record* 2009; 165: 473.

Reed SM, Toribio RE. Equine herpesvirus 1 and 4. *Veterinary Clinics: Equine Practice* 2004; 20: 631-42.

Rowe BR, Canosa A, Drouffe J-M, Mitchell J. Simple quantitative assessment of the outdoor versus indoor airborne transmission of viruses and covid-19. *Environmental*

research 2021; 198: 111189.

Saklou NT, Burgess BA, Ashton LV, Morley PS, Goehring LS. Environmental persistence of equid herpesvirus type-1. *Equine Veterinary Journal* 2021; 53: 349-55.

Schmaljohn AL, McClain D. Alphaviruses (togaviridae) and flaviviruses (flaviviridae). In: *Medical Microbiology*, IV edn. Baron S, ed. Galveston, Texas: 1996:

Slater J, Borchers K, Thackray A, Field H. The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology* 1994; 75: 2007-16.

Slater J, Lunn D, Horohov D, Antczak D, Babiuk L, Breathnach C, Chang Y-W, Davis-Poynter N, Edington N, Ellis S. Report of the equine herpesvirus-1 Havermeier Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. *Veterinary immunology and immunopathology* 2006; 111: 3-13.

Smith D, Iqbal J, Purewal A, Hamblin A, Edington N. In vitro reactivation of latent equid herpesvirus-1 from CD5+/CD8+ leukocytes indirectly by IL-2 or chorionic gonadotrophin. *Journal of General Virology* 1998; 79: 2997-3004.

Smith KL, Allen GP, Branscum AJ, Cook RF, Vickers ML, Timoney PJ, Balasuriya UB. The increased prevalence of neuropathogenic strains of EHV-1 in equine abortions. *Veterinary microbiology* 2010; 141: 5-11.

Stokol T, Soboll Hussey G. Current Research in Equid Herpesvirus Type-1 (EHV-1). *Frontiers in Veterinary Science* 2020; 6: 492.

Thrusfield M. Determinants of disease. *Veterinary Epidemiology* 1986: 46.

Thrusfield M, Christley, R., Brown, H., Diggle, P.J., French, N., Howe, K., Kelly, L., O'Connor, A., Sargeant, J. and Wood, H. Risk analysis. In: *Veterinary Epidemiology*: 2018: 540-64.

Traub-Dargatz JL, Pelzel-McCluskey AM, Creekmore L, Geiser-Novotny S, Kasari T, Wiedenheft A, Bush E, Bjork K. Case-control study of a multistate equine herpesvirus myeloencephalopathy outbreak. *Journal of veterinary internal medicine* 2013; 27: 339-46.

Van Galen G, Leblond A, Tritz P, Martinelle L, Pronost S, Saegerman C. A retrospective study on equine herpesvirus type-1 associated myeloencephalopathy in France (2008–2011). *Veterinary microbiology* 2015; 179: 304-9.

Van Maanen C, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MS, Damen E, Derksen A. Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Veterinary Journal* 2001; 33: 191-6.

Van Stralen K, Dekker F, Zoccali C, Jager K. Confounding. *Nephron Clinical Practice* 2010; 116: c143-c7.

Vereecke N, Carnet F, Pronost S, Vanschandevijl K, Theuns S, Nauwynck H. Genome Sequences of Equine Herpesvirus 1 Strains from a European Outbreak of Neurological Disorders Linked to a Horse Gathering in Valencia, Spain, in 2021. *Microbiology Resource Announcements* 2021; 10: e00333-21.

Wagner B, Goodman L, Babasyan S, Freer H, Torsteinsdóttir S, Svansson V, Björnsdóttir S, Perkins G. Antibody and cellular immune responses of naïve mares to repeated vaccination with an inactivated equine herpesvirus vaccine. *Vaccine* 2015; 33: 5588-97.

Walker C, Love DN, Whalley JM. Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review. *Veterinary microbiology* 1999; 68: 3-13.

Walter J, Seeh C, Fey K, Bleul U, Osterrieder N. Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. *Acta veterinaria scandinavica* 2013; 55: 19.

Welch HM, Bridges CG, Lyon AM, Griffiths L, Edington N. Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues. *Journal of General Virology* 1992; 73: 261-8.

Whitehead CE, Bedenice D. Neurologic diseases in llamas and alpacas. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2009; 25: 385-405.

Whitwell KE, Blunden A. Pathological findings in horses dying during an outbreak of the paralytic form of Equid herpesvirus type 1 (EHV-1) infection. *Equine Veterinary Journal* 1992; 24: 13-9.

Yildirim Y, Yilmaz V, Kirmizigul A. Equine herpes virus type 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) infections in horses and donkeys in northeastern Turkey. *Iranian journal of veterinary research* 2015; 16: 341.

Zoetis. Fachinformation in Form der Zusammenfassung der Merkmale des Tierarzneimittels (Summary of Product Characteristics). Berlin: Zoetis 2017: https://www2.zoetis.de/content/assets/PDFs/Equip_EHV_1,4_SPC_Zoetis_20170503.pdf. 01-03-2023.

IX. DANKSAGUNGEN

Zunächst möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Lutz Göhring für seine unermüdliche Beratung, Hilfe beim Schreiben und den großen Ideen- und Wissensreichtum bedanken, den er immer wieder hat einfließen lassen. Selbst in den schwierigen Corona-Zeiten, in denen die persönliche Kommunikation teilweise nicht mehr möglich war, hat er immer einen Weg gefunden, mir einen schnellen Gesprächstermin anzubieten und mir weiterzuhelfen. Dafür bin ich sehr dankbar!

Für die statistische Auswertung und die sehr gute Erklärung statistischer Sachverhalte, möchte ich mich bei Dr. Yury Zablotzki bedanken. Stets konnte ich mich auf eine schnelle Rückmeldung, zuverlässig ausgeführte Berechnungen und kompetente sowie leicht verständliche Erklärungen verlassen.

Weiterhin bin ich Dr. Gittan Gröndahl, Dr. Marco de Bruin, Dr. Susanne Müller, Dr. Louise Husted und Lene Kristensen sowie weiteren Kollegen überaus dankbar. Sie haben uns über Ausbrüche informiert, haben mir erforderliche Informationen zukommen lassen und sich viel Zeit genommen, um mit mir die genaue Situation des jeweiligen Ausbruchs zu analysieren. Auch vielen Dank an Dr. Jasmin Walter, die mir gestattete, die Daten eines Ausbruchs zu verwenden, den sie selber schon veröffentlicht hatte und mir auch mit weiteren Informationen behilflich war. Meine Dankbarkeit gilt weiterhin den zahlreichen Stall- und Pferdebesitzern, die mir wertvolle Informationen lieferten, mich auf Ihrem Hof empfangen haben, mich herumgeführt haben und den gesamten Ausbruch jeweils besprochen haben. Ihre Mühe weiß ich sehr zu schätzen.

Vielen Dank auch an Frau Schadt, die mir geholfen hat, die Arbeit trotz sehr schwieriger Umstände noch pünktlich abzugeben. So eine große Hilfsbereitschaft ist nicht selbstverständlich!

Ein Dank geht auch an die Firma Dechra Veterinary Products für die Finanzierung des Projekts.

Meinen Kollegen der Klinik für Pferde der LMU, insbesondere Dr. Kirsten Hahn, bin ich überaus dankbar für die fachliche Beratung, kombiniert mit seelischem Beistand in schwierigen Phasen und für das immer offene Ohr.

Ein besonders großer Dank geht an meinen Freund Thomas, der sich in den vergangenen Jahren jede meiner Sorgen und Probleme angehört hat, mir mit der immer gleichen Ruhe

und Besonnenheit beisteht und mir, darüber hinaus, mit seinem großen Informatikwissen so manches Mal weitergeholfen hat. Ich danke dir mein Schatz und freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft!

Meinen Eltern, die mich mein ganzes bisheriges Leben in allem, was ich vorhabe voller Vertrauen unterstützen, die mir unglaublich viel Kraft geben und ohne die ich weder seelisch noch finanziell diese Aufgaben stemmen könnte, möchte ich ebenfalls meinen tiefsten und allerherzlichsten Dank sagen. Ich hoffe ihr wisst, was ihr mir bedeutet und wie dankbar ich bin, für die Möglichkeiten, die ihr mir eröffnet!

Meiner liebsten Freundin Luisa Danke für deinen Beistand, deinen Zuspruch und deine Aufheiterungen und dass du dir immer meine Sorgen angehört hast!