

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
(Leiter Prof. Dr. Klaus Osterrieder, wissenschaftliche Betreuung PD Dr. Kerstin Borchers)

**Untersuchungen zur Pathogenese der neurologischen Form der EHV-1
Infektion des Pferdes unter Einbeziehung von EHV-4 und -9 und
besonderer Berücksichtigung von zirkulierenden Immunkomplexen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Daniel Böttner
Tierarzt aus Hamburg

Berlin 2009

Journal Nr. 3249

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: PD Dr. Kerstin Borchers
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Arthur Grabner
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Peter Thein

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses, horse diseases, nervous system diseases, equid herpesvirus 1,
equid herpesvirus 4, equid herpesvirus 9, neurons., adhesion, immune
complexes, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 11. Juni 2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-746-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt	Seite
Abkürzungen	5
Einleitung	8
1. Literaturübersicht	9
1.1 Die Familie der Herpesviren	9
1.2 Equine Alphaherpesviren	11
1.2.1 Geschichte von EHV-1/-4 und EHV-9	11
1.2.2 Weitere Herpesviren bei Equiden	11
1.3 Klinisch manifeste Verlaufsformen der EHV-1 und -4 Infektionen beim Pferd	12
1.3.1 Infektion des Respirationstraktes	12
1.3.2 Virämie	13
1.3.3 EHV bedingte Aborte	13
1.3.4 Die neurologische Verlaufsform der EHV-1 Infektion des Pferdes	14
1.4 Equines Herpesvirus Typ 9 (EHV-9)	22
1.5 Latenz	23
1.6 Immunologie	24
1.7 Impfung	25
1.8 Problemstellung	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Materialnachweis	29
2.2 Probengut	30
2.2.1 Blutserum und Plasma von natürlich infizierten Pferden	30
2.2.2 <i>Post mortem</i> Gewebematerial von Pferden	30
2.2.3 Gewebeschnitte von Pferden und Mäusen	31
2.2.4 Equines Herpesvirus Typ 9 (EHV-9);	31

Inhalt

2.3 Viren und Zellen	31
2.3.1 Zellkultur	32
2.3.2 Virusvermehrung	33
2.3.3 Virustitration	34
2.3.4 Virusanzucht	35
2.4 Serologische Tests	35
2.4.1 Neutralisationstest (NT)	35
2.4.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) zum EHV-1 Immunkomplexnachweis	36
2.4.3 Herstellung der Virusantigen-Kontrolle für den ELISA	38
2.4.4 Immunperoxidase Technik (APAPP)	39
2.5 Aufbereitung von <i>post mortem</i> Material	39
2.5.1 Virus DNA Isolierung aus Gewebeproben	39
2.5.2 Virus DNA Isolierung aus Paraffinschnitten	40
2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	40
2.6.1 Detektion von EHV-1 und -4 DNA mittels PCR	41
2.6.2 Etablierung einer EHV-9 spezifischen nPCR	42
2.6.3 Analytische Gelelektrophorese	43
2.7 DNA Detektion mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung und Southern Hybridisierung	44
2.7.1 Reinigung und Isolierung von Virus DNA	44
2.7.2 DNA Sondenmarkierung mit Digoxigenin dUTP	45
2.7.3 Dot Blot	47
2.7.4 <i>In situ</i> -Hybridisierung	48
2.7.5 Southern Blot	50
2.7.6 Southern Hybridisierung	51
2.8 Restriktionsenzymanalyse	52

2.9 Proteinchemische und immunologische Methoden	53
2.9.1 Präzipitation von Serumproben mit Polyethylenglykol (PEG)	53
2.9.2 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	54
2.9.3 Silberfärbung	55
2.9.4 Western Blot	56
2.10 Statistische Methoden	58
3. Ergebnisse	59
3.1 Etablierung eines ELISAs zur Bestimmung zirkulierender Immunkomplexe im Blutserum	60
3.2 Antikörpertiter gegen EHV-1 im Neutralisationstest	62
3.3 EHV-1 Immunkomplexe bei Pferden mit und ohne Ataxie	63
3.4 EHV-1 Immunkomplexe bei geimpften und nicht geimpften Pferden	66
3.5 EHV-1 Immunkomplexe in Abhängigkeit vom Alter der Tiere	68
3.6 Jahreszeitenverteilung, Rasse und Geschlecht	70
3.7 Nachweis von EHV-1 Antigen im Western Blot (Immuno Blot) aus PEG Präzipitaten	72
3.8 EHV-1/-4 Virus DNA Nachweis aus PEG präzipitierten Serumproben	76
3.9 Nachweis von EHV-1 und -4 DNA in <i>post mortem</i> Geweben von adulten Pferden per nPCR	77
3.10 Nachweis von EHV-1 DNA in ZNS Geweben künstlich infizierter Mäuse per <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH)	79
3.11 Nachweis von EHV-1 DNA in ZNS Geweben experimentell und natürlich infizierter Pferde per <i>in situ</i> -Hybridisierung	83
3.12 Tropismus von EHV-1 in Geweben des ZNS und in weiteren Organen von zwei abortierten Feten	87
3.12.1 REA von zwei isolierten EHV-1 Stämmen aus abortierten Feten	92

3.13 Nachweisverfahren von EHV-9 und Differenzierung des neurotrophen Alphaherpesvirus von EHV-1/-4	94
3.13.1 Etablierung einer EHV-9 spezifischen nested Polymerase Kettenreaktion (EHV-9 PCR)	94
3.13.2 Wachstumsvergleich von EHV-1, -4, und -9 auf verschiedenen Zelllinien	95
3.13.3 Restriktionsenzymanalyse und Southern- Hybridisierung der Virusstämme EHV-1 und EHV-9	97
4. Diskussion	99
4.1 Beurteilungen des ELISAs zum Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen aus Serumproben	100
4.2 Die Bedeutung von EHV-1 bedingten zirkulierenden Immunkomplexen	101
4.3 Tropismus von EHV-1 in Geweben des ZNS	103
4.3.1 Gewebetropismus von EHV-1 im ZNS bei Pferden	103
4.3.2 Gewebetropismus von EHV-1 im ZNS bei Mäusen	104
4.3.3 Tropismus von EHV-1 in fetalen Gewebeproben von Pferden	105
4.4 Zur Bedeutung des equinen Herpesvirus Typ 9 (EHV-9)	106
5. Zusammenfassung	109
6. Summary	110
7. zitierte Literatur	113
8. Anhang	127
9. Danksagung	135
10. Selbstständigkeitserklärung	136

Abkürzungen

verwendete Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
Aqua bidest	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
BHV	Bovines Herpesvirus
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumine
CIC	zirkulierende Immunkomplexe
CMC	Carboxymethylzellulose
CpE	cytopathogener Effekt
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
ddH ₂ O	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxirubonukleotidtriphosphat
ED-Zellen	equine Dermalzellen
EDM	Eagle's minimum essential medium, Dulbecco's modification
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHM	Equine Herpesvirusmyeloencephalopathy
EHV-1	Equines Herpesvirus Typ 1
EHV-4	Equines Herpesvirus Typ 4
EHV-9	Equines Herpesvirus Typ 9
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant essay
FCS	fetales Kälber Serum
fg	Femtogramm
g	Gramm
gB	Glycoprotein B
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFT	Immunfluoreszenztest
IHC	Immunhistochemie
ISH	<i>In situ</i> -Hybridisierung
kB	Kilobasen
Lfd. Nr.	Laufende Nummer

Abkürzungen

Ln.	Lymphknoten
mAk	monoklonaler Antikörper
MG	Mausgewebe
min.	Minute
m.o.i	Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection)
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NCS	Newborn calf serum
n.d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
nPCR	nested Polymerase-Kettenreaktion
NT	Neutralisationstest
PBMC	peripheral Blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PFU	Plaque forming units
pg	Picogramm
p.i.	post infectionem
POD	Peroxidase
REA	Restriktionsenzymanalyse
rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raum Temperatur
s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPF	Specific pathogen free
SSC	Standard Sodium Citrate
SSP	Lachssperma (Salomon sperm)
Tab.	Tabelle
Taq.	Terminus aquarius
TE	Tris-EDTA
Temp.	Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N	über Nacht

Abkürzungen

U	Unit
WNV	West Nile Virus
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-Phosphat	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
ZIK	zirkulierende Immunkomplexe
ZNS	Zentrales Nervensystem (Central nervous system)

1. Einleitung

In dieser Arbeit stehen die Equinen Herpesviren Typ 1 (EHV-1) und Typ 4 (EHV-4) und die von ihnen ausgelöste neurologische Erkrankung bei Pferden im Mittelpunkt. Sie gehören zur großen Familie der *Herpesviridae*, die weltweit in der Wirbeltierpopulation verbreitet sind (Roizman, 1995). EHV-1 und EHV-4 sind zwei von neun Herpesviren, die in natürlicher Weise Equiden infizieren. EHV-9 ist ein neues, neurogenes Herpesvirus bei Wildequiden und Gazellen und soll in diese Arbeit mit einbezogen werden.

In jüngerer Zeit traten in Deutschland und weltweit vermehrt Ausbrüche der neurologischen Verlaufsform der Herpesvirusinfektion bei Pferden in Erscheinung und sorgten unter Pferde- und Gestütsbesitzern zum Teil für erhebliche Unruhe.

- Ein Fallbericht aus dem Jahre 2002 beschreibt den Ausbruch in einer Reitschule, in der zahlreiche Pferde neurologische Symptome zeigten, fünf von ihnen mussten aufgrund der Schwere der Symptome euthanasiert werden. EHV-1 wurde als ursächlicher Erreger identifiziert. Ataxie und Paresen bis hin zum Festliegen der Tiere gehören zu den am häufigsten beobachteten Symptomen. Die Erkrankung trat sowohl bei Stuten als auch bei Wallachen auf, die Tiere gehörten verschiedenen Altersklassen (5-26 Jahren) an und waren mit einer handelsüblichen inaktivierten Vakzine geimpft (Stierstorfer et al., 2002).
- In einem aktuellen Ausbruch im Sommer 2005 erkrankten zahlreiche Pferde aus verschiedenen Beständen in Schleswig-Holstein an einer akuten Herpesvirusinfektion. Neben Pferden mit einer milden Verlaufsform der Erkrankung führte insbesondere der Tod bzw. die Euthanasie von mindestens 4 Tieren schnell zu großer Unruhe unter Pferde- und Reitstallbesitzern. Die Landestierärztekammer Schleswig Holstein empfahl eine regelmäßige Impfung aller (noch nicht erkrankter) Tiere sowie eine Isolation und Transportbeschränkung von erkrankten und verdächtigen Pferden für einen Zeitraum von 4 Wochen. Eine Charakterisierung der Virusstämme im Landeslabors Neumünster ergab, dass es sich bei den Erregern um einen Querschnitt aus seit vielen Jahren in Deutschland und Europa grassierenden EHV-1 Stämmen handelt. Hinweise auf Virusstämme, die z.B. momentan in Nordamerika schwere Erkrankungen verursachen, konnten nicht bestätigt werden. (LTK Schleswig-Holstein)

1.1 Die Familie der Herpesviren

Die große Familie der *Herpesviridae* gehört wird nach ihren biologischen Eigenschaften in die Subfamilien α - Herpesvirinae, β -Herpesvirinae und γ -Herpesvirinae eingeteilt. Daneben erfolgt die Eingruppierung anhand von Genomcharakteristika in die Strukturtypen A, B, C, D, E und F. Trotz einer großen Heterogenität innerhalb der Virusfamilie sind allen Herpesviren einige Charakteristika gemeinsam (zur Übersicht siehe Roizman et al., 1995):

- Morphologische Struktur.

Der Innenkörper (Core) enthält die doppelsträngige DNA und ist von 162 Kapsomeren, die eine ikosaedrische Struktur bilden, umgeben. Der Durchmesser des Kapsids ist mit 100-110 nm bei allen Herpesviren recht einheitlich. Das Kapsid ist von einem amorphen Tegument umgeben und nach außen von einer Virushülle begrenzt. Die Hülle enthält zahlreiche virale Glykoproteine. Mit einer Größe von 120-200 nm gehören die Herpesviren zu den größten bekannten Viren.

- Genom

Das Genom besteht aus einem einzigen doppelsträngigen DNA Molekül in einer Größenordnung von 120-250 Kilobasenpaaren.

- Latenz

Ein weiteres Merkmal der Herpesviren ist ihre Fähigkeit zur Latenz im Wirtsorganismus. Unter Latenz versteht man „eine reversible, nichtproduktive Infektion einer Zellen durch ein replikationskompetentes Virus“ (Garcia-Blanco et al., 1991). Latenz kann nach akuter Infektion auftreten und lebenslang erhalten bleiben. Ein in Latenz befindliches Virus kann durch bestimmte Stimuli wieder reaktiviert werden und durch Virusvermehrung zur Zerstörung der Zelle führen. Im Latenzstadium ist die virale Proteinproduktion weitgehend eingestellt und das Genom liegt in der Regel als Episom vor. Durch sogenannte Latenz- assoziierte Transkripte (LAT) wird die Latenz reguliert (Fraser et al., 1992).

- Replikation

Im Zellkern der Wirtszelle findet der Vermehrungszyklus der Herpesviren statt in dessen Verlauf die Wirtszelle in der Regel zerstört wird. Nach der Fusion der Virushülle mit der Zellmembran erfolgen die Penetration des DNA-Proteinkomplexes und die Freisetzung in das Zytoplasma. Durch Kernporen gelangt die virale DNA in den Zellkern, wo die virale DNA Synthese und der Zusammenbau des Kapsids (Assembly) stattfinden. Die erste Einhüllung erfolgt an der inneren Kernmembran

(Budding) und der Transport durch das Zytoplasma im endoplasmatischen Retikulum und in Golgivesikeln zur Zellmembran. Die Ausschleusung kann durch „Knospung“ an der Zellmembran erfolgen. Virale Glykoproteine sind für die Schritte der Replikation (Adsorption, Penetration, Release (=Freisetzung durch Budding) und der Induktion der humoralen und zellulären Immunantwort) von großer Bedeutung.

Die Einteilung in die schon genannten Subfamilien α -, β - und γ -Herpesviren erfolgt anhand des unterschiedlichen biologischen Verhaltens dieser Viren in Bezug auf ihr Wachstum, ihres Wirtsspektrums, sowie des Latenzortes (Roizman, 1995):

Alphaherpesviren zeichnen sich durch einen kurzen Replikationszyklus aus und infizieren in sehr kurzer Zeit *in vitro* die Zellkultur. Dabei werden infizierte Zellen in der Regel zerstört. Als Latenzorte kommen vorwiegend sensorische Ganglien in Betracht. Zu den equinen α -Herpesviren gehören EHV-1, EHV-4 und EHV-3. Neuere Untersuchungen weisen ein neues α -Herpesvirus mit der Bezeichnung EHV-9 bei Equiden nach (Fukushi et al., 1997).

Betaherpesviren breiten sich nur langsam in Zellkulturen aus. Infizierte Zellen bilden typischerweise Riesenzellen aus, weswegen sich für einige β -Herpesviren auch der Name „Cytomegalie-Viren“ etabliert hat. Das Wirtsspektrum ist enger als bei den α -Herpesviren. Als Latenzorte gelten sekretorische Drüsen, lymphoretikuläre Zellen und die Nieren. β -Herpesviren konnten als Pathogene bei Equiden bisher nicht nachgewiesen werden.

Gammaherpesviren sind langsam wachsende Herpesviren mit einem engen Wirtsspektrum. Sie gehen in lymphatischen Zellen (B- oder T-Zellen) in Latenz und haben zum Teil die Fähigkeit befallene Zellen zu transformieren und so zu unkontrolliertes Zellwachstum auszulösen. Equine Vertreter der γ -Herpesviren sind EHV-2 und EHV-5.

1.2 Equine Alphaherpesviren

1.2.1 Geschichte von EHV-1/ -4 und EHV-9

Die enge biologische und immunologische Verwandtschaft von EHV-1- und EHV-4 führte in der Zeit bis 1981 dazu, dass sie zunächst nicht differenziert und unter dem Namen EHV-1, zusammengruppiert wurden. EHV-1 wurde mit den unterschiedlichen Krankheitskomplexen Rhinopneumonits, Stutenaborten sowie neurologischen Störungen in Zusammenhang gebracht (Dimock et al., 1932; Shimizu et al., 1959; Saxegaard, 1966; Jackson et al., 1971; Meyer et al., 1987; Thein, 1993). Virusisolate aus abortierten Feten konnten auf heterologen Zelllinien angezüchtet werden, Isolate aus Pferden mit Rhinopneumonitissymptomen dagegen nur auf homologen Zelllinien. So erfolgte die Einteilung in zwei Subtypen, Subtyp 1 für Isolate aus Aborten und Subtyp 2 für Erreger der EHV-Rhinopneumonitis (Mayr et al., 1965; Ludwig, 1972; Borgen et al., 1974). Mit der Restriktionsenzymanalyse konnten in späteren Jahren weitere Unterschiede zwischen den beiden Subtypen deutlich gemacht werden und es folgte nach weiteren Untersuchungen der DNA-Basenhomologie schließlich die Unterteilung in EHV-1 (ehemals Subtyp 1) und EHV-4 (ehemals Subtyp 2) (Allen et al., 1982). Serologisch besteht eine enge Verwandtschaft zwischen den beiden Viren, die sich nicht nur in ähnlichen Krankheitsbildern äußert, sondern auch durch Kreuzreaktivität in serologischen Tests (Studdert, 1983; Thein et al., 1987). Bei Sequenzanalysen zeigten Riggio et al. (1989) eine Homologie in konservierten Genen von 65-85 %. Neben EHV-1 und -4 ist das erst vor kurzem entdeckte equine Herpesvirus vom Typ 9 im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen bei Gazellen von Bedeutung (Fukushi et al., 1997).

1.2.2 Weitere Herpesviren bei Equiden

Zu den weiteren bekannten Herpesviren der Equiden gehört EHV-3 (Alphaherpesvirus), die Gammaherpesviren EHV-2 und EHV-5, sowie die bei Eseln vorkommenden Herpesviren EHV-6 (Alphaherpesvirus), -7 (Gammaherpesvirus), -8 (Alphaherpesvirus) (Studdert, 1974).

1.3 Klinisch manifeste Verlaufsformen der EHV-1 und -4 Infektionen beim Pferd

Die Equinen Herpesviren Typ 1 und 4 sind weltweit enzootisch als Pathogene in der Pferdepopulation verbreitet. Zu den klinischen Erscheinungsbildern gehören die Stutenaborte, respiratorische Erkrankungen, Geburten lebensschwacher Fohlen und die neurologische Verlaufsform (Ludwig et al., 1988; Thein et al., 1988; Ostlund, 1993; Reed et al., 2004). Die Erstinfektion mit EHV-1/-4 verläuft bei den meisten Pferden unbemerkt. Die serologische Prävalenz von EHV-1 bzw EHV-4 positiven Pferden beträgt in von Crabb und Studdert untersuchten Beständen 9 % für EHV-1 und 100 % für EHV-4 (Crabb et al., 1993). In einer neueren Untersuchung betrug die Seroprävalenz für EHV-1 spezifische Antikörper 30 % und die Seroprävalenz für EHV-4 Antikörper erneut 100 % (Crabb et al., 1995). Obwohl beide Viren für die einzelnen Krankheitsbilder verantwortlich sein können, wird EHV-1 vorwiegend mit Aborten, Neugeborenensterblichkeit und neurologischer Verlaufsform in Verbindung gebracht, während EHV-4 vornehmlich für die respiratorische Erkrankung verantwortlich ist (Allen et al., 1986; van Maanen, 2002). EHV-4 konnte jedoch schon vor Jahren auch als alleiniger Erreger für die neurologische Verlaufsform -bzw. im Sinne eine Doppelinfektion mit EHV-1 nachgewiesen werden(Thein, 1981).

1.3.1 Infektion des Respirationstraktes

Die Infektion des Respirationstraktes mit EHV-1/4 geschieht in der Regel durch aerogene Übertragung. Die primäre Replikation findet in den Epithelien der oberen Luftwege statt mit nachfolgender Replikation in den Geweben des tieferen Respirationstraktes sowie der tributären Lymphknoten. Bei immunologisch naiven Pferden kann es zu einer massiven Replikation von EHV-1 und -4 des Respirationstraktes kommen (Gibson et al., 1992 b) begleitet von Vaskulitis und Thrombosen kleiner Blutgefäße (Patel et al., 1982; Kydd et al., 1994). Die nasale Virusausscheidung bei experimentell infizierten Pferden konnte von Gibson et al. (1992 b) von Tag 1 bis zu 17 Tagen p.i. beobachtet werden. Zu den klinischen Symptomen der EHV-1/4 Infektion des Respirationstraktes bei Pferden gehören Fieber, Appetitverlust, seröser Nasenausfluss, folliculäre Hyperplasie des Laryngs sowie sekundär bakteriell bedingter mukopurulenten Nasenausfluss (Studdert, 1974). Die Symptome heilen in der Regel in 10 Tagen komplikationslos ab, eine klinische Unterscheidung zwischen EHV-1 und EHV-4 kann nur anhand der Symptome nicht getroffen werden (Matsumura et al., 1992). Während die EHV-Infektion des Respirationstraktes häufig bei Fohlen nach dem Absetzen

innerhalb des ersten Lebensjahres beobachtet wird (Ostlund, 1993), verläuft die Infektion bei adulten Pferden oftmals subklinisch (Studdert, 1974; Ostlund, 1993; Thein, 1996). Sowohl EHV-1 als auch EHV-4 können als Erreger für die respiratorische Verlaufsform der Erkrankung verantwortlich sein (Allen et al., 1986). Die akute respiratorische Erkrankung ist jedoch prädominant von EHV-4 verursacht (van Maanen, 2002).

1.3.2 Virämie

EHV-1/-4 infizierte mononucleäre Zellen können 4-6 Tage nach der respiratorischen Infektion in den Blutstrom eintreten und in einer zellassozierten Virämie resultieren. Obwohl zunächst nur für EHV-1 eine Virämie nachgewiesen werden konnte, zeigten Matsumura und Ostlund diese auch für bestimmte Stämme von EHV-4 (Ostlund, 1991; Matsumura et al., 1992). Infizierte periphere mononucleäre Blutzellen (PBMC) transportieren das Virus durch den Körper und erreichen auf diesem Wege Endothelien beispielsweise des Uterus oder Nervensystems (Allen et al., 1986). T-Lymphozyten sind die wichtigsten PBMC für die Verbreitung des Virus während der virämischen Phase (Scott et al., 1983). Die EHV-1 Virämie kann bei der zentralnervösen Verlaufsform für einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen *post infectionem* angenommen werden (Thein et al., 1988).

1.3.3 EHV bedingte Aborte

EHV-1 induzierte Aborte treten typischerweise im letzten Trimester der Trächtigkeit (7-11 Trächtighkeitsmonat) von Stuten auf. Nach einer primären Replikation der Viren im Respirationstrakt erreichen infizierte PBMC den Uterus. Durch Infektion der Endothelzellen des Endometriums kommt es zur Schädigung der Blutgefäße (Vaskulitis mit Thromboisierung von uterinen Gefäßen, ischämische Endometriumsdegeneration) und zur Transfektion des Virus auf den Fetus (Jackson et al., 1977; Edington et al., 1991; Smith et al., 1992; Smith et al., 2001; Gerst et al., 2003).

Neben der transplazentaren Virämie als möglichen Infektionsweg des Fetus stellt Smith et al. (1992) auch die Inhalation von virushaltiger Amnionflüssigkeit durch den Fetus als weiteren Infektionsweg dar. Es konnte gezeigt werden, dass die vaskulären Schädigungen am Uterus und an der Plazenta im letzten Drittel der Trächtigkeit stärker sind (Smith et al., 1992), als in früheren Stadien der Trächtigkeit (Smith et al., 1996). Es bestehen große Unterschiede in der Virulenz einzelner EHV-1 Stämme. Eine hohe Virulenz eines EHV Stammes konnte von

Patel. et. al (1982) mit einem Tropismus zu Gefäßendothel insbesondere der Nasenschleimhaut, der Lungen, aber auch des zentralen Nervensystems in Verbindung gebracht werden. Mumford konnte EHV-1 Stämme mit unterschiedlicher Virulenz bezüglich der Induktion von Aborten nachweisen (Mumford et al., 1994). Die geringere Virulenz des Stammes V592 im Vergleich zu den virulenteren Stämmen Ab4 und Army 183 ging mit einem geringeren Endotheliotropismus einher (Smith et al., 2000). In einer Untersuchung von Nugent et al. zu den beiden EHV-Stämmen Ab4 und V529 konnte die Variation einer Aminosäure im Open Reading Frame 30 (ORF 30) für das Auftreten der abortogenen bzw. neurologischen Verlaufsform gezeigt werden (Nugent et al., 2006).

Spätaborte infolge einer EHV Infektion bei Stuten treten sowohl als Einzelfälle, wie auch in größeren Pferdebeständen/Gestüten als seuchenhaftes Ereignis, so genannte „abortion Storms“ auf. Die Inkubationszeiten variieren von 6 Tagen bis zu 4 Monaten (Mumford et al., 1987). Wird ein Fetus erst sehr spät im Laufe der Trächtigkeit mit EHV-1 infiziert, kommt es häufig zur Geburt lebensschwacher Fohlen, welche oft innerhalb von 24 Stunden post partum sterben oder nach 18-24 Stunden heftige respiratorische Symptome entwickeln und diesen innerhalb von ca. drei Tagen erliegen.

1.3.4 Die neurologische Verlaufsform der EHV-1 Infektion des Pferdes

Die neurologische Verlaufsform der EHV-1 Infektion des Pferdes wird unter den Bezeichnungen paretisch-paralytische Verlaufsform, paretisches Syndrom, Schlaganfall des Pferdes, EHV bedingte Myeloencephalitis bzw. Meningoencephalomyelitis, Equine Herpes-Myeloencephalopathy (EHM), „equine stroke“ in der Literatur gefunden.

Neben den EHV bedingten Aborten und respiratorischen Erkrankungen ist die neurologische Verlaufsform eine weitere Manifestationsform der Herpesvirusinfektion des Pferdes. Obwohl schon von Manninger 1949 beschrieben, wird der zentralnervösen Form in neuerer Zeit vermehrte Aufmerksamkeit gewidmet. Ob dies mit einer erhöhten Erkrankungsinzidenz zu tun hat ist noch nicht geklärt (Reed et al., 2004), es ist aber vermehrt über diese Erkrankung in den letzten Jahren berichtet und veröffentlicht worden (Thein, 1981; Thein, 1993; McCartan et al., 1995; Friday et al., 2000; van Maanen et al., 2001; Stierstorfer et al., 2002; Borchers et al., 2006 b).

EHV-4 wird mit der herpesvirusbedingten neurologischen Verlaufsform ebenfalls in Verbindung gebracht und konnte erstmals von Thein (1979) nachgewiesen werden. In

späteren Ausbrüchen gelang auch anderen der Nachweis von EHV-4 (Thein et al., 1988; Thein, 1993; Verheyen et al., 1998; van Maanen et al., 2000; Benetka et al., 2002).

Die neurologische Form der EHV-1 und EHV-4 Infektion ist weltweit verbreitet mit Erkrankungsfällen in Europa, Australien und den Vereinigten Staaten (Kohn et al., 1987). Der erste Virusnachweis aus ZNS Geweben von EHV 1 gelang Saxegaard (1966) und von EHV-4 Thein (1979).

Klinische Symptome, Krankheitsverlauf: erstmals berichtete Manninger 1949 von zentralnervösen Störungen im Gefolge von Virusabort der Stute (Manninger, 1949). Das dominierende Symptom dieser Erkrankung ist die Ataxie. Zudem können zahlreiche weitere Symptome die in Tabelle 1 zusammengefasst sind auftreten. In vielen Fällen von neurologischer Erkrankung der EHV-Infektion ist anamnestisch ein Hinweis auf Fieber, Inappetenz, Apathie, respiratorische Symptome oder Aborte vorhanden, die dem neurologischen Geschehen um ca. 1 Woche vorausgehen. So berichtet Stierstorfer et al. (2002) von einem Ausbruch in einer Reitschule, bei dem zunächst bei mehreren Tieren mit Fieber und milde respiratorische Symptome beobachtet wurden und ca. 1 Woche darauf Paralysen der Hinterhand bis hin zum vollständigen Festliegen der Pferde auftraten. In einem anderen Ausbruch, ebenfalls in einer Reitschule, wurde zunächst ein Pferd mit Inappetenz, Fieber und Apathie beobachtet und im weiteren Verlauf entwickelten 19 Pferde (= 41 % des Bestandes) neurologische Symptome wie Ataxien, Paresen, Festliegen, Blasenlähmungen, Kopfschütteln, Hinterhandödeme (Friday et al., 2000). In Belgien zeigten in einem Pferdebestand (n=41) zunächst 42 % der Tiere Fieber und Anorexie, 15 % entwickelten daraufhin Ataxien und Paralysen der Hintergliedmaßen, einige Tiere zusätzlich zerebrale Störungen, Blindheit und Torticollis (van der Meulen et al., 2003). In zahlreichen weiteren Fallberichten wird von ähnlichen Ausbrüchen berichtet (Petzoldt et al., 1982; Chowdhury et al., 1986; Donaldson et al., 1998; Olsen, 2001; Studdert et al., 2003).

Die klinischen Parameter zur paretisch-paralytischen Verlaufsform der EHV-1 Infektion des Pferdes sind in Tabelle 1 in Anlehnung an Thein (1988) zusammengefasst:

Tabelle 1: EHV-1 neurologische Erkrankung des Pferdes: klinische Parameter

Inkubationszeit	Symptome	Diagnose	Labor
4-9 Tage	Fieber, Ataxie, Paresen (Hinterhand), Paralysen, Festliegen, Blasenlähmung (Dysurie) Kotretention, Blindheit, cerebrale Störungen, Faciale Paresen, Penisparese reduzierter Schwanztonus	(1) Anamnese: z.T.Fieber (39,0->40), resp. Symptome, Aborte, Inappetenz, Apathie, (2) klin. Symptomatik, (3) Labor (Nasentupfer, Blutproben, Liquor) (4) ggf. Pathologische Untersuchung	Serumantikörper, Serumpaare im Abstand von 1-2 Wochen, Virusnachweis (z.B. Nasentupfer), Liquoruntersuchung auf Antikörper, Protein, Xanthochromie

Nicht alle in Tab. 1 genannten Symptome müssen bei einem Erkrankungsfall auftreten, häufig bleiben allgemeine Krankheitssymptome wie Fieber, Apathie etc. unbemerkt.

Differentialdiagnostisch müssen weitere Erkrankungen von der EHV-Myeloencephalopathie abgrenzt werden. So führen Kraft et. al. (1982) neben der Druseenzephalitis und Tollwut vor allen auch die Bornasche Krankheit (Borna Disease Virus, BDV) als Differentialdiagnose an. Klinisch lasse sich BDV durch ein gestörtes Sensorium der Tiere von EHM abgrenzen, bei der das Sensorium trotz Festliegens häufig ungestört sei. Dies kann jedoch kein eindeutiger Hinweis auf die jeweilige Erkrankung sein. Weiterhin abzugrenzen von der neurologischen Form der EHV-1/-4 Erkrankung ist die vermehrt in den USA vorkommende Equine degenerative Myeloencephalopathie (EDM). Hier wird keine virale Ursache vermutet, sondern ein Zusammenhang mit Mangelercheinungen (Vitamin E, Kupfer) sowie eine erbliche Komponente gesehen (Quarter Horses, Appaloosa, Morgan) (Gandini et al., 2004). Die Protozoenenzephalitis (*Sarcocystis neurona*, *Anaplasma phagocytophilum*) kommt ebenfalls differentialdiagnostisch in Betracht, hier sind nach einer serologischen Bestätigung mit der Behandlung durch Triemetoprim/Sulfonamide gute Erfolge zu erzielen. In den letzten Jahren ist vor allem in den USA, aber auch in Israel und Frankreich die Verbreitung von West Nile Virus (WNV) in der Pferdepopulation vorangeschritten. Der Erreger, ein Flavivirus, führt zu Enzephalitiden und neurologischen Ausfallserscheinungen bei Pferden (Schuler et al., 2004). Erste Fälle von WNV Infektionen bei Pferden in Südeuropa sind bekannt geworden (Cantile et al., 2000; Murgue et al., 2001).

Zu den Differentialdiagnosen infektiöser Ursache kommen noch weitere, nicht infektiöse Ursachen hinzu. Dazu zählen zervikale Wirbelfrakturen, zervikale Wirbelinstabilität (Wobbler-Syndrom), ZNS-Trauma, ZNS-Abszesse, Tumore und Vergiftungen.

Die in der Literatur zu findenden Hinweise zur **Therapie** der EHV-Myelopathie bei erkrankten Tieren beziehen sich auf:

- (1) Allgemeine Hygienemaßnahmen,
- (2) Symptomatische Therapie und
- (3) Antivirale Therapie.

Zu den allgemeinen Maßnahmen zählen das Verbringen der betroffenen Pferde in eine separierte, saubere Box, die ausreichende Versorgung mit Wasser und Futter, der Schutz vor Verletzungen (bei festliegenden Pferden) sowie die Beschränkung von Pferdetransporten in- oder aus dem betroffenen Bestand bis mindestens 21 Tage nach Auftreten des letzten Krankheitsfalls. Symptomatisch wird die Gabe von nicht steroidal Antiphlogistika (NSAID) (Holbrook et al., 1994), Dimethyl sulfoxid (DMSO, 1g/kg KG) als Infusion in Ringer Lösung (Alsup et al., 1984), Dexamethason (0,05-0,10 mg/ kg KG) alle 12 Stunden, empfohlen. Die Behandlung mit Kortikosteroiden ist umstritten, vor allem wegen der immunsuppressiven Wirkung (Kohn et al., 1987; Kortz, 1992). Der Immunmodulator Zylexis® (früher Baypamun) kann zusätzlich zur unterstützenden Therapie verabreicht werden (Thein, 1993). Antivirale Therapie mit Acyclovir, einem azyklischen Nukleosidanalogon, in einer Dosierung von 10 mg/ kg KG 3-5 x täglich per os ist eine Möglichkeit der Therapie (Thein, 1994). Es fehlen jedoch noch kontrollierte Studien über die Wirksamkeit bei Pferden und trotz abgelaufener Patente für diesen Wirkstoff ist die Behandlung kostspielig (van der Meulen et al., 2003; Wilkins et al., 2003).

Pathogenese: Die Pathogenese der neurologischen EHV-1 Infektion des Pferdes unterscheidet sich von den durch andere Alphaherpesviren hervorgerufenen neurologischen Erkrankungen. Bei Infektionen mit humanem Herpesvirus 1 und 2, Pseudorabiesvirus (PsR) und bovinem Herpesvirus 1 (BHV-1) konnte ein klarer Neurotropismus mit Virusreplikation in den Neuronen des ZNS nachgewiesen werden (Bagust et al., 1972; Rock et al., 1988; Gressens et al., 1994; Patel et al., 2004).

Im Unterschied hierzu kommt es durch EHV-1 zur Infektion von Endothelien kleiner Blutgefäße unter anderem im zentralen Nervengewebe, es besteht also ein Endotheliotropismus (Patel et al., 1982; Edington et al., 1986; Kohn et al., 1987; Whitwell et al., 1992). Das Virus gelangt, nach einer primären Replikation im lymphatischen Gewebe der Nasenschleimhaut, über den Blutweg in PBMC (zellassozierte Virämie) zu den Endothelzellen. Typische Veränderungen an Endothelzellen kleiner Blutgefäße sind dann eine Vaskulitis, Thrombose und daraus resultierende Ischämie häufig begleitet von lokalen

Hämorrhagien (Platt et al., 1980; Thein, 1996; Wilson, 1997; Stierstorfer et al., 2002). EHV-1 kann sich in endothelialem Gewebe direkt von einer infizierten Zelle zur nächsten Zelle durch Zellfusion oder Riesenzellbildung ausbreiten, ohne dabei eine extrazelluläre Phase durchzumachen (Allen et al., 1986).

In Abbildung 1 ist der Weg von der Infektion bis zum Erreichen von ZNS Geweben schematisch (in Anlehnung an Thein) dargestellt:

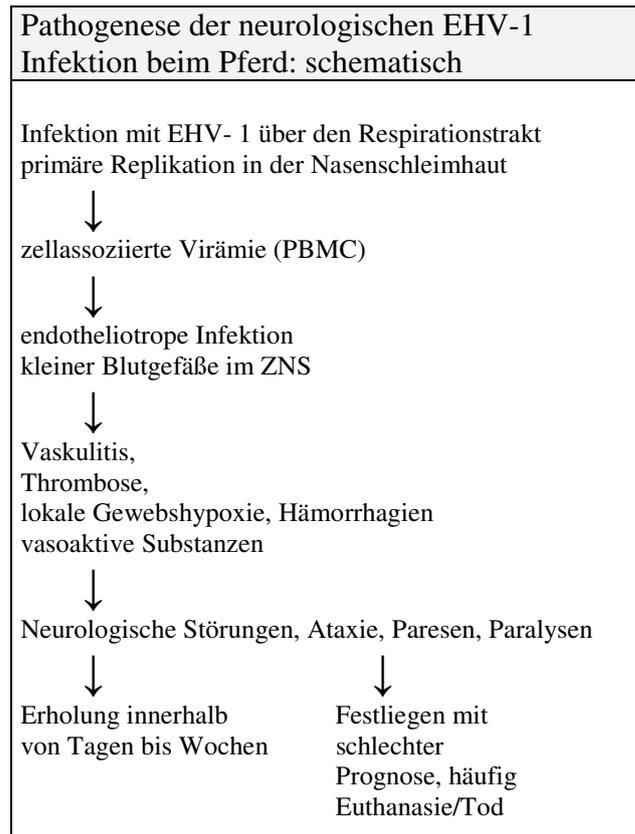


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Infektionsweges von EHV-1 bei der neurologischen Verlaufsform

Im Zusammenhang mit der Pathogenese der neurologischen Verlaufsform der EHV-Infektion wird auch die Bedeutung von Immunkomplexen diskutiert. Hohe, schnell ansteigende EHV Antikörpertiter sind typisch für die EHV-Myelopathie (Thein, 1981; Petzoldt et al., 1982). Auch im Rahmen der EHV-Diagnostik des Instituts für Virologie der FU-Berlin ist insbesondere bei Ataxiefällen immer wieder aufgefallen, dass extrem hohe Serumantikörpertiter im Neutralisationstest messbar sind, die auch innerhalb weniger Tage signifikant angestiegen (persönliche Mitteilung PD Dr. K Borchers, 2005). Die Titerhöhe und der Titerverlauf bei Pferden mit anderen Symptomen waren dagegen nicht in dieser Form auffällig. Thein (1988) hat schon vor Jahren die Vermutung geäußert, dass im Falle von

Ataxien Immunkomplexe für den auffälligen Titeranstieg mit verantwortlich sind. Immunkomplexe können im Blut zirkulieren, aber auch makrophagiert werden. Sie können jedoch auch mithilfe humoraler Mediatoren vasoaktive Amine freisetzen, die Komplementkaskade induzieren und lysosomale Enzyme aktivieren und damit eine hämorrhagische Diathese und eine Endothelzellzerstörung herbeiführen. Auch Edington et al. (1986) konnten ab dem 2. Tag p.i. bei künstlich mit EHV-1 infizierten Stuten einen deutlichen Anstieg an zirkulierenden Immunkomplexen (ZIK) im Blut nachweisen. Ein Maximum an ZIK wurde am Tag 10 p.i gemessen und nach 28 Tagen konnten keine Immunkomplexe mehr detektiert werden. Unterstützend hierzu wurde bei Stuten mit sehr schnellen und hohen Antikörperanstiegen als Reaktion auf eine neurologische EHV-Infektion wesentlich schwerere paretische Ausfallerscheinungen beobachtet, als bei Stuten mit einer nur leichten Serumantikörpererhöhung (Jackson et al., 1971). Edington et al. (1986) brachte den Beweis, dass EHV-1 selbst in der Lage ist, Endothelzellen kleiner Blutgefäße des Nervensystems zu infizieren und dass die Rolle von zirkulierenden Immunkomplexen nur sekundär und lokal begrenzt sind. Läsionen des Gefäßendothels konnten nur in den Geweben beobachtet werden, wo auch eine Virusvermehrung stattgefunden hatte, nicht jedoch in Endothelien ohne Virusvermehrung (Edington et al., 1986). Eine Immunkomplexkrankheit im Sinne einer generalisierten Typ III Reaktion vom Arthus-Typ kommt somit nicht in Betracht.

Die Frage, warum es im Zuge einer EHV-Infektion des Pferdes in einigen Fällen zu Aborten, in anderen zu neurologischen Ausfallerscheinungen kommt, konnte noch nicht hinreichend geklärt werden. Verschieden virulente Stämme von EHV-1 könnten für die Ausprägung des einen oder anderen Krankheitsbildes verantwortlich sein. So zeigt der gering virulente EHV- 1 Stamm V592 in einer Studie von Smith et al. (1999) im Vergleich zu dem hoch virulenten Stamm Ab4 einen wesentlich geringeren Endotheliotropismus. Der Unterschied zwischen den Stämmen V592 und Ab4 zeigte sich neben der geringer ausgebildeten Infektion von Endothelien auch in der kaum vorhandenen Ausprägung von Vaskulitis und Thrombose bei den Tieren, die mit dem wenig virulenten Stamm V592 infiziert waren. In neueren Untersuchungen zu diesen beiden Virusstämmen konnte gezeigt werden, dass die Variation einer Aminosäure im Polymerasegen für die Ausprägung der neurologischen Verlaufsform von Bedeutung sein könnte (Nugent et al., 2006). Auch in früheren Studien konnte ein unterschiedlicher zellulärer Tropismus verschiedener EHV-1 Stämme gezeigt werden, ohne eine dafür überzeugende Ursache zu nennen (Patel et al., 1982; Studdert et al., 1984).

In Restriktionsenzymmustern von EHV Virusisolaten aus abortierten Feten, sowie von neurologisch erkrankten Pferden konnten geringfügige Unterschiede nachgewiesen werden. So zeigten Studdert et al. (1984), dass ein Aborte verursachendes Virusisolat und ein neurogenes Isolat im Restriktionsprofil mit den Enzymen *Bgl* I, *Pvu* II, *Xho* I und *Hind* III Unterschiede aufwiesen, während die gleichen Isolate mit *Bam* HI geschnitten, identisch waren. Das bei einem EHV-1 Ausbruch in einem Lippizanergestüt (Aborte und nachfolgende Paralyse bei mehreren Pferden) gewonnene Virusisolat (Austria IV) zeigt beim Verdau mit verschiedenen Enzymen nur geringe Differenzen zu anderen, damals bekannten EHV-1 Isolaten (Chowdhury et al., 1986). In zahlreichen untersuchten EHV-1 Feldisolaten aus den Niederlanden konnte keine Zuordnung des Restriktionsprofils zu den unterschiedlichen Ausprägungen der Erkrankung erfolgen (respiratorisch, abortogen, neurogen) erfolgen (van Maanen et al., 2000).

Tearle et al. (2003) versuchten ein *in vitro* System zu etablieren, mit dem sich verschieden virulente Stämme identifizieren ließen. Hierzu wurde die Wachstumskinetik in verschiedenen Zellkulturen, die Plaquegröße, die Replikationsfähigkeit in fetalen Endothelien und die Sensitivität auf Acyclovir von den Virusstämmen Ab4, V592, sowie eines EHV-4 Stammes untersucht. Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen EHV-1 und EHV-4 Stämmen konnten gefunden werden, eine diagnostisch nutzbare Unterscheidung von verschieden virulenten EHV-1 Stämmen aufgrund dieser Untersuchungsparameter war jedoch nicht möglich (Tearle et al., 2003).

Untersuchungen zur Pathogenese der neurologischen Verlaufsform der EHV-1 Infektion wurden auch am Mausmodell durchgeführt (Walker et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass nach intranasaler Infektion mit dem EHV-1 Stamm Ab4 Virus schon nach wenigen Stunden in Nasenschleimhautepithel und subepithelialen Zellen des Respirationstraktes zu finden war. Neben einem Infektionsweg über respiratorisches Epithel mit möglicher hämatogener Verbreitung konnte auch der direkte Infektionsweg ins ZNS über den Nervus olfactorius und den Trigeminalnerv gezeigt werden (Baxi et al., 1996; Bartels et al., 1998; Gosztonyi et al., 2008). In einer weiteren Untersuchung war die Neuroinvasion eines mausadaptierten Virusstammes (NHH1) nach intra peritonealer Infektion stärker ausgeprägt, als der nicht adaptierte Stamm (HH1) (Hasebe et al., 2002 a). Im Unterschied zum Endotheliotropismus von EHV-1 im Pferd konnte der Zelltropismus im Mausmodell auch für Neurone, Gliazellen und Ependymalzellen gezeigt werden (Hasebe et al., 2002 b). In einem Vergleich zum Tropismus von EHV-1 im ZNS von Pferden und Mäusen konnte gezeigt

werden, dass die Empfänglichkeit von mikrovaskulären Endothelzellen im Gehirn bei Pferden und Mäusen Unterschiede aufweist. Während in den endothelialen ZNS-Zellen bei Pferden eine Virusvermehrung in diesen Zellen stattfand, virales Antigen nachweisbar war, sowie virale Partikel im Zytoplasma elektronenmikroskopisch dargestellt werden konnten, traten diese Effekte bei den untersuchten ZNS-Mausendothelien nicht auf (Hasebe et al., 2006).

Weiterhin könnte das Vorkommen von bestimmten Glykoproteinen ein Faktor für die Neurovirulenz bestimmter EHV Stämme sein. Bei der Pseudorabiesinfektion des Schweins (ebenfalls ein α -Herpesvirus) sind die Glykoproteine I und E (gI, gE) für den Neurotropismus und die Virusverteilung im ZNS mitverantwortlich. In einem Vergleich von einem Virusstamm, dem die Glykoproteine gI und gE fehlten, mit einem anderen Stamm mit den Glykoproteinen gI und gE, konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass auch hier diese Glykoproteine für die Neurovirulenz verantwortlich sind (Frampton et al., 2004). Ob diese Glykoproteine auch im eigentlichen Wirt, dem Pferd, eine Rolle in Bezug auf die Neuropathogenität spielen, ist noch nicht hinreichend geklärt. In neueren Untersuchungen wird versucht anhand von Sequenzanalysen verschiedener EHV-1 Stämme, neurogene, respiratorische und Abort auslösende Stämme voneinander zu differenzieren. Die Variation einer einzelnen Aminosäure der DNA-Polymerase ist eng verknüpft mit dem Auftreten der neurologischen Form der EHV-1 Infektion. Auffallend ist, dass die variierte Aminosäure in einer stark konservierten Region des EHV-1 Polymerasegens liegt (Nugent et al., 2006).

1.4. Equines Herpesvirus Typ 9 (EHV-9)

Das Equine Herpesvirus Typ 9 (EHV-9) wurde bei einem Ausbruch von akuter Enzephalitis bei Thompson Gazellen (*Gazella thompsoni*) in einem japanischen Zoo isoliert. Dem zunächst als Gazellen Herpesvirus 1 (GHV-1) bezeichneten Virus, wurde aufgrund von serologischen Charakteristika, Restriktionsenzym- und Sequenzanalysen eine nahe Verwandtschaft mit dem Equinen Herpesvirus Typ 1 nachgewiesen. Es folgte die Einteilung als neuer Typ eines Equinen Herpesvirus (EHV-9) mit einer stark neurovirulenten Ausrichtung (Fukushi et al., 1997). Der natürliche Wirt von EHV-9 ist noch unbekannt. Auch über die Verbreitung von EHV-9 innerhalb der Equiden-, Wildequiden-, sowie Zoo- und Wildtierpopulation liegen nur wenige Daten vor. In einer neueren Untersuchung konnte eine hohe Prävalenz von EHV-9 spezifischen Antikörpern in einer Zebra population im afrikanischen Serengeti Nationalpark nachgewiesen werden (Borchers et al., 2005). Eine experimentell mit EHV-9 auslösbare fulminante Enzephalitis konnte bei Gazellen, Schweinen, Ziegen, Hunden und Katzen erzeugt werden (Narita et al., 2000; Taniguchi et al., 2000 a; Taniguchi et al., 2000 b; Yanai et al., 2003 a; Yanai et al., 2003 b). Bei Pferden ließ sich experimentell nur eine moderate Enzephalitis erzeugen (Taniguchi et al., 2000 a).

Es wird angenommen, dass Zebras als natürliches Reservoir für EHV-9 dienen könnten. Unterstützt wird diese Hypothese auch davon, dass die ursprünglich im Zoo an Enzephalitis verendeten Gazellen in einem Gehege mit Zebras gehalten wurden (Yanai et al., 2003 a), sowie von den Untersuchungen von Borchers et al (2005), die eine Verbreitung von EHV-9 spezifischen Antikörpern bei wild lebenden Burchell-Zebras in Tansania zeigte. Der Nachweis, dass EHV-9 in Burchells-Zebras im Trigeminalganglion latent vorliegt, bestätigt diese Vermutung (Borchers et al., 2008). Bei in Gefangenschaft gehaltenen Grevys Zebras und Blackbuck Antilopen konnte ein weiterer Herpesvirusstamm der eng mit EHV-1 und EHV-9 verwandt ist charakterisiert werden (Borchers et al., 2006 a).

1.5 Latenz

Herpesviren haben die Fähigkeit nach einer akuten Infektion ein Latenzstadium im Wirtsorganismus zu erreichen. Die Latenz kann lebenslang erhalten bleiben. Unter Latenz versteht man „eine reversible, nichtproduktive Infektion einer Zelle durch ein replikationskompetentes Virus“ (Garcia-Blanco et al., 1991).

Im Latenzstadium ist die virale Proteinproduktion weitgehend eingestellt und das Genom liegt vermutlich als Episom vor. In einem Pferdebestand stellen latent infizierte Tiere eine potenzielle Infektionsquelle dar. Unter bestimmten Umständen, z. B. Stress kann es zur Reaktivierung von latentem Virus kommen. Diagnostisch sind latent infizierte Tiere schwer zu erfassen. Latentes Virus konnte durch Verbringen von latent infizierten Zellen in einer permissiven Zellkultur reaktiviert werden, damit war ein *in vitro* Nachweis möglich (Stevens et al., 1971). Weiterhin kann der Nachweis von Latenz- assoziierten Transkripten (LAT), welche bei Alphaherpesviren in Nervenzellen gefunden werden, diagnostisch genutzt werden (Stroop et al., 1984). Durch Latenz- assoziierte Transkripte wird das in Latenz befindliche Virus reguliert (Fraser et al., 1992).

Hinsichtlich der Latenzorte für EHV-1 und EHV-4 gab es lange Zeit Unklarheit. Nach experimenteller Infektion von Pferden mit EHV-1 gelang in der Latenzphase mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) die Isolierung von EHV-1 aus lymphatischen Organen und PBMC (Welch et al., 1992). Bei ebenfalls experimentell infizierten spezifisch Pathogen freien (SPF) Ponys konnte EHV-1 in der Latenzphase durch Kokultivierung und PCR in der Nasenschleimhaut und im Trigeminalganglion nachgewiesen werden (Slater et al., 1994 a). In PBMC gelang der Nachweis mittels PCR nur bis zur 8. Woche *post infectionem* (Slater et al., 1994 b). Bei Mäusen konnten in experimentellen Studien als Latenzorte ebenfalls das Trigeminalganglion, Nasenschleimhaut und Bulbus olfactorius gefunden werden (Baxi et al., 1996). In *post mortem* Geweben natürlich infizierter Pferde konnte das Trigeminalganglion als Latenzort bestätigt werden, sodass heute die Nasenschleimhaut und Trigeminalganglion als Hauptlatenzorte für EHV-1 gelten (Borchers et al., 1998).

Für EHV-4 konnten in Untersuchungen ebenfalls das Trigeminalganglion durch den Nachweis von LAT in Nervenzellen mittels RT-PCR und durch *in-situ* PCR bestätigt werden. Darüber hinaus konnte EHV-4 DNA auch in der Lunge, vornehmlich im Bronchial- und Alveolarepithel mit der *in-situ* PCR nachgewiesen werden (Borchers et al., 1997; Borchers et al., 1999).

Die Reaktivierung von latentem Virus stellt eine potenzielle Gefahr für andere Pferde desselben Bestandes dar. Durch die Gabe von Kortikosteroiden gelang experimentell die Reaktivierung von latentem Virus mit nasaler Virusausscheidung (mit und ohne Virämie) (Edington et al., 1985; Slater et al., 1994 a; Slater et al., 1994 b). Die Reaktivierung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen:

- (1) Durch die Reaktivierung aus dem Trigeminalganglion oder anderen Ganglien kann es zur Infektion des Respirationsepithels kommen.
- (2) Die Reaktivierung kann aus den Lymphozyten des nasopharyngealen Epithels kommen, oder
- (3) aus den Lymphozyten des Uterusepithels mit einem potenziellen Abort bei tragenden Stuten.

Herpesvirusbedingte Aborte oder Ataxien könnte somit auf eine lokale Virusreaktivierung folgen (Edington et al., 1985; Mumford, 1991).

1.6 Immunologie

Die Funktion des Immunsystems bei der neurologischen EHV-Erkrankung des Pferdes ist noch nicht vollständig geklärt. Als Reaktion auf eine Herpesvirusinfektion des Pferdes kann sowohl eine lokale Immunantwort am Ort der primären Replikation (Nasenschleimhaut) als auch eine systemische Immunantwort beobachtet werden.

Bei der neurologischen EHV-Infektion sind häufig schnell ansteigende hohe neutralisierende Antikörpertiter zu beobachten (Thein, 1981; Petzoldt et al., 1982; van Maanen et al., 2001; Studdert et al., 2003). Eine starke humorale Immunantwort ist typisch für die EHV-Myelopathie. Sie könnte erklärt werden mit der Bildung von zirkulierenden Immunkomplexen ausgelöst durch eine EHV-1/4 (Re-oder Doppel-) Infektion oder Reaktivierung mit einem hohen Antigen–Antikörperverhältnis. Bei experimentell mit EHV-1 (Army 183) infizierten Pferden stimmten die neurologischen Symptome mit dem Nachweis zirkulierender Immunkomplexe überein (Edington et al., 1986; Thein et al., 1988). EHV-4 ist alleine zur Induktion von Immunkomplexen nicht ausreichen (Meyer et al., 1987).

Die systemische, humorale Immunantwort nach experimenteller Infektion von spezifisch pathogenfreien Pferden mit EHV-1 ist 5-6 Tage *post infectionem* (p.i.) mit einem Anstieg der IgM und etwas später der IgG Titer nachzuweisen (Stokes et al., 1991; Chong et al., 1992). Der IgM Titer steigt bis zum Tag 18 nach einer Infektion an und fällt dann langsam wieder

ab. Der IgG Antikörperanstieg verläuft langsamer und erreicht seinen Höhepunkt vom Tag 18.-28. mit einem über Monate langsam abfallenden Titer (Stokes et al., 1991; Gibson et al., 1992 a). Virus neutralisierende (VN) Antikörper treten ab dem 10. Tag *post infectionem* auf und erreichen ein Maximum nach ca. 4 Wochen. Diese Titer bleiben für ca. 4 Monate erhöht (Edington et al., 1990; Stokes et al., 1991; Chong et al., 1992; Gibson et al., 1992 a). Der Anstieg von komplementbindenden Antikörpern beginnt zwischen Tag 7-15 p.i. und erreicht seinen Höhepunkt ca. Tag 16-26 p.i mit einem anschließenden, langsamen Abstieg (Edington et al., 1990; Hannant et al., 1991; Gibson et al., 1992 a; Tewari et al., 1993).

Die Beteiligung zellulärer Immunmechanismen bei der EHV-Myelopathie ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt starke Hinweise, dass zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) eine entscheidende Rolle bei der Tilgung der EHV leukozyten-assoziierten Virämie spielen (Slater et al., 2000; Kydd et al., 2006)

Die Präsentation viraler Peptide, welche assoziiert mit Major Histokompatibility (MHC) 1 Molekülen dem Immunsystem präsentiert werden, könnte für die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten verantwortlich sein (Allen et al., 1995; Soboll et al., 2003; Kydd et al., 2006). EHV-1 kann jedoch über eine Regulierung der MHC-1 Moleküle und einer Reduktion der viralen Antigenpräsentation an der Zelloberfläche zur Verringerung der CTL-Reaktion beitragen (Smith et al., 1992; Rappocciolo et al., 2003; van der Meulen et al., 2003)

Mit neutralisierenden Antikörpern ist hingegen nur die Bekämpfung von zellfreiem Virus möglich (Bryans, 1969). Die Höhe an neutralisierenden Antikörpern korreliert also nicht unbedingt mit dem Schutz vor der Infektion (Burrows et al., 1984; Mumford, 1991; Hannant et al., 1993; Mumford et al., 1994).

1.7 Impfung

Die Impfung gegen EHV-1 und EHV-4 ist eine prophylaktische Maßnahme zur Bekämpfung der EHV Infektion. Bei erkrankten Tieren wird vor allem symptomatisch behandelt (s. 1.3.4), da eine kausale Therapie nicht zur Verfügung steht. Es sind heute verschiedene Impfstoffe im Handel, die entweder als attenuierte Lebendvakzine oder als inaktivierter Impfstoff angeboten werden (Tab. 2):

Tabelle 2: Impfstoffe gegen EHV-1 und EHV-4

Impfstoff	Art	Adjuvans	Impfschutz gegen	Virusstämme
Resequin NN Plus	inaktiviert	Aluminiumhydroxid, Immunostim®	EHV-1, EHV- 4, Influenza	EHV-1 (RAC-H), EHV- 4 (2252) Influenza A/ equi 1 Prag, Influenza A/ equi 2 Newmarket 1 und 2
Duvaxyn EHV-1, 4	inaktiviert	Carbopol	EHV-1, EHV- 4	EHV-1 (438/77) EHV- 4 (405/76)
Cavallon IR	inaktiviert		EHV-1, Influenza	Influenza A/equi1/Prag 56 Influenza A/equi 2/Frankreich 79 EHV-1, (Kentucky)
Prevaccinol	attenuiert		EHV-1	EHV-1 (RAC-H)

Die aus der natürlichen Infektion mit EHV-1/-4 resultierende Immunität ist bekanntermaßen nicht von langer Dauer (Doll et al., 1963). Auch durch die Schutzimpfung ergibt sich nur eine kurz andauernde Immunität, woraus sich das relativ häufige Impfintervall für die equinen Herpesimpfungen erklärt. Auch nach mehrmaliger Boosterimpfung konnte nur eine Halbwertszeit der Antikörper von ca. 90 Tagen erreicht werden (Wood, 1992).

Durch die Impfung kann eine Reduktion der Virusausscheidung, sowie eine Minderung der klinischen Symptome erreicht werden, sie kann jedoch keinen vollständigen Schutz vor Infektion und Aborten bieten (Thein, 1974; Steinhagen, 1986; Burki et al., 1990; Wood, 1992; Hannant et al., 1993).

Fohlen sind zum einen durch die Aufnahme maternaler Antikörper über die Plazenta (Samuel et al., 1976) zum anderen aber über eine starke Anreicherung von Immunoglobinen im Kolostrum (Thein, 1983; Thein et al., 1989) nach dessen Aufnahme passiv geschützt. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichend schutzgeimpfte Mutterstute. Eine Erstimpfung sollte frühestens im Alter von 6 Monaten, besser noch erst mit 9 Monaten erfolgen (Thein, 1996; Thein, 2002)

Tabelle 3: Impfschema (in Anlehnung an Thein 2003):

Zeitpunkt	Inaktiviert, EHV 1 und EHV 4
1. Impfung	(6.)-9. Lebensmonat
2. Impfung	6-8 Wochen nach Erstimpfung
3. Impfung	6-8 Wochen nach Zweitimpfung
Wiederholungsimpfung	Alle 6 Monate

Von Thein wird seit Langem der Impfschutz auf Basis einer inaktivierten Vakzine empfohlen (Thein, 1996) und von einem Wechsel zwischen inaktivierter und attenuierter Vakzine abgeraten (Thein, 1996; Thein, 2002). Die Verwendung von attenuierten Impfstoffen birgt gewisse Risiken. Neben der Möglichkeit der Latenzbildung durch den Impfstamm selbst (Engels, 1991; Stokes et al., 1991), wird auch die Virulenzsteigerung durch Viruspassagen im natürlichen Wirt diskutiert. Auch die Beteiligung von Impfstämmen an herpes-bedingten Aborten wurde wiederholt in Betracht gezogen und brachte unterschiedliche Ergebnisse. Von 65 Virusisolaten aus abortierten Feten konnte mittels Restriktionsenzymanalyse und Hybridisierung in keinem Fall eine Beteiligung des Impfstamms RAC-H nachgewiesen werden (Meyer et al., 1992). In einer andern Untersuchung in Kentucky waren 15 % der aufgetretenen Aborte auf den Impfstamm zurückzuführen (Allen et al., 1983).

1.8 Problemstellung

Aus der vorangestellten Übersicht ergeben sich noch offene Fragen bezüglich der Pathogenese und Diagnostik der paretisch- paralytischen Verlaufsform der EHV-1 Infektion des Pferdes.

Insbesondere die Bedeutung von **zirkulierenden Immunkomplexen** und der **Zell- und Gewebetropismus** von **EHV-1 im ZNS** sollte mit Hilfe von virologischen und molekularbiologische Methoden untersucht werden und weitere Erkenntnisse im Hinblick auf diese Form der Herpesvirusinfektion des Pferdes gewonnen werden. Hierzu wurde ein ELISA zum Nachweis von Immunkomplexen aus Serumproben etabliert. Untersucht wurden Serumproben von neurologisch erkrankten und nicht erkrankten Tieren, sowie frische und in Paraffin eingebettete Gewebeprouen von künstlich und natürlich mit EHV-1 infizierten Pferden. Ferner wurden Paraffinschnitte von künstlich mit EHV-1 infizierten Mäusen untersucht, um anhand des Mausmodells den Gewebetropismus von EHV-1 im Vergleich zum natürlichen Wirt, dem Pferd darzustellen. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Charakterisierung von EHV-9, einem noch weitgehend unbekanntem, ebenfalls neuropathogenen Alphaherpesvirus durchgeführt. Hierbei ging es insbesondere um die Frage der Etablierung von Verfahren zum Nachweis von EHV-9, um dieses Virus ggf. auch in der Routinediagnostik mit abklären zu können.

Folgende Fragen standen hierbei im Mittelpunkt:

- Welche Bedeutung haben zirkulierende Immunkomplexe im Zusammenhang mit der neurologischen Verlaufsform der EHV-Infektion des Pferdes?
- Welche Rolle spielen Alter, Impfung und Jahreszeit im Zusammenhang mit dem Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen bei der neurologischen EHV-Erkrankung des Pferdes?
- Lässt sich der Immunkomplexnachweis für die Diagnostik nutzen?
- Was kann über den Zell- und Gewebetropismus von EHV-1 im ZNS gesagt werden und können daraus weitere Hinweise zur Pathogenese dieser Erkrankung getroffen werden?

2. Material und Methoden

2.1 Materialnachweis

Amersham Pharmacia , Buckinghamshire,UK:	Hybond-P PVDF Transfermembran, REA Enzyme
BDH Chemicals Ltd. , Analar Pool, UK:	Carboxymethylzellulose
Biochrom , Berlin:	NCS, Ficoll
Biolabs , Taunus, Schwalbach:	REA Enzyme
Bioline GmbH , Luckenwalde:	Hyperladder I Marker
Biorad , Hercules, USA:	Prestained SDS Page Standards
Boehringer , Mannheim:	Digoxigenin DNA-Markierungs- und Detektions Kit, Lachssperma-DNA, Proteinase K
Dako Cytomation GmbH , Hamburg:	Anti Digoxigenin F(ab) AP, EnVision Labelled Polymer
Dianova , Hamburg:	ELISA Antikörper, FITC anti-Spezies IgG
Difco , Michigan, USA:	Trypsin
Fluka , Neu-Ulm:	Giemsa Lösung für die Mikroskopie
Invitek GmbH , Berlin:	RTP DNA/ RNA Virus Mini Kit
Invitrogen GmbH Karlsruhe:	Tetramethylethylendiamin (TEMED)
LifeTecnologies , Gaithersburg,USA:	Agarose Ultrapur, EDM, Ethidiumbromid, FCS, Restriktionsenzyme, Puffer
Marabu , Tamm:	FixoGum
NEN Research Produkts , Boston, USA:	Gene Screen Plus Nitrozellulose-Membran
Nunc , Roskilde, Denmark:	MaxiSorb Immuno Module ELISA Platten
Promega , Maidson, USA:	Nucleasefreies Wasser
Quiagen , Hilden:	Taq Polymerase, 10x PCR Puffer
Roth , Karlsruhe:	Agarose (ultrapure), Formamid, Tris
Schleicher & Schuell , Dassel:	Gel Blotting Papers
Sigma , Deisenhofen :	Fast Red TR/ Naphthol Tabelt Sets, EDTA, Paraformaldehyd

Weitere Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Merk (Darmstadt), steriles Einmalmaterial von Nunc (Wiesbaden) und TPP Tissue Culture (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

2.2 Probengut

2.2.1 Blutserum und Plasma von natürlich infizierten Pferden

Zur Untersuchung von Pferdeserum- und Plasmaproben auf Antikörper und Antigen gegen EHV-1 und EHV-4 wurden 102 Blutproben aus der Routinediagnostik des Institutes für Virologie genutzt. Die Proben wurden fortlaufend nummeriert (1-102). Für die ELISA-Untersuchungen (s.2.4.2) wurden anhand der Anamnese der einzelnen Pferde verschiedene Gruppen gebildet, sodass die Parameter „Ataxie“, Alter, Rasse, Geschlecht, Neutralisationstiter (NT) und Impfstatus miteinander verglichen werden konnten. Blutserumproben wurden bis zum Gebrauch in sterilen Einmalgefäßen bei –20 °C aufbewahrt.

2.2.2 *Post mortem* Gewebematerial von Pferden

Post mortem entnommenes Organmaterial von Pferden mit Verdacht auf EHV Infektion (29 frische Gewebeproben) wurden durch die Tierpathologie der FU-Berlin zur Verfügung gestellt und mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und der *in situ*-Hybridisierung (ISH) auf das Vorhandensein von virusspezifischer DNA untersucht. Zur Untersuchung kamen neurologische Gewebe wie Großhirn, Kleinhirn, Rückenmark, Ganglien, periphere Nerven, sowie nicht neurologisches Material von Lunge, Leber, Milz und Nasenschleimhaut. Weiterhin wurden zu Kontrollzwecken 63 Gewebeproben von Rückenmark, Nasenschleimhaut und Bulbus olfactorius von frisch geschlachteten Pferden ohne eine vorherichtlich bekannte Erkrankung mittels nPCR auf EHV-1 und EHV-504 untersucht. Es wurden insgesamt 92 Gewebeproben untersucht. Das Gewebematerial wurde unter möglichst keimfreien Bedingungen entnommen und in sterilen Einmalgefäßen auf Eis transportiert und bearbeitet und bei –20 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei –70 °C.

2.2.3 Gewebeschnitte von Pferden und Mäusen

In Paraffin eingebettete ca. 4 µm dicke Gewebeschnitte auf Objektträgern wurden zur Untersuchung per PCR und *in situ*-Hybridisierung genutzt. Es kamen neurologische Gewebe von natürlich infizierten Pferden (Gehirn, Rückenmark, periphere Nerven, Ganglien), sowie nicht neurologische Gewebeschnitte (Nasenschleimhaut, Leber, Lunge, Milz) zur Untersuchung. Diese wurden durch die Tierpathologie der FU-Berlin (14 Proben) zur Verfügung gestellt. Zusätzlich standen ZNS Gewebe künstlich mit EHV-1 infizierter Pferde aus einem Infektionsversuch aus England zur Verfügung (6 Proben) (K. Smith, AHT Newmarket, England). Ferner wurden verschiedene Gewebeschnitte (24 Proben, s. Tab. 19) von experimentell mit EHV-1 infizierten Mäusen aus einer früheren Studie des Institutes für Virologie untersucht (K.Borchers, Projekt Nr. G 0236/95). Die 3-4 Wochen alten BALB/c Mäuse waren intranasal mit 5×10^6 PFU/Maus mit dem EHV-1 Stamm Ab4 infiziert worden (Baxi et al., 1996; Bartels et al., 1998). Diese Proben wurden per PCR und *in situ*-Hybridisierung untersucht. Gewebeschnitte wurden bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur trocken gelagert.

2.2.4 EHV-9

Der in dieser Arbeit untersuchte Virusstamm EHV-9 wurde von H. Fukushi et al. (Japan) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Molekularbiologische Untersuchungen des Virus mittels PCR und REA wurden im Vergleich zu EHV-1 und EHV-4 durchgeführt. Das Wachstumsverhalten auf verschiedenen Zelllinien wurde analysiert.

2.3 Viren und Zellen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Viren und Virusisolate verwendet, die in folgender Tabelle (Tab. 4) mit Angaben zur Herkunft dargestellt sind.

Tabelle 4: Viren und Virusisolate mit Herkunft

Virus/ Virusisolat	Bezeichnung/ Herkunft	Referenz
EHV-1	Austria IV Fohlen, Abort, 1983	Chowdhury et al. 1986
	Mar 87 Pferd, Rhinopneumonitis 1987	P. Thein, 1987
EHV- 4	T252 Fohlen, Nasenabstrich 1975	P. Thein, 1976
EHV- 9	EHV-9 Thompson Gazelle, Japan, 1997	Fukushi et. al 1997

Die in Tabelle 4 genannten EHV-1 und EHV-4 Stämme werden routinemäßig im Institut für Virologie für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke genutzt. EHV-9 konnte aus einer an Enzephalitis erkrankten Gazelle in Japan isoliert werden (Fukushi et al., 1997).

Die Vermehrung von EHV-1, -4 und -9 wurde in Equinen Dermalzellen (ED Zellen) und Rabbit Kidney 13 (RK13, nicht EHV-4) und für den Wachstumsvergleich in weiteren Zelllinien (Tab. 5) durchgeführt:

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

Abkürzung/ Passage (p)	Bezeichnung
ED p53	Equine Dermalzellen
TUW p18	Equine Trachealzellen Uta Wolfinger
MDBK p185	Madin Darby Bovine Kidney
RK 13 p185	Rabbit Kidney
Oligo p147	Oligozellen
Vero p30	Nierenepithel von Meerkatzen
MDCK p185	Madin Darby Canine Kindney
CrFK p243	Crandell Feline Kidney
JK Milz p176	Junge Kaninchen Milzellen
Ferkelhaut p53	Ferkelhautzellen

2.3.1 Zellkultur

Trypsinlösung (0,25%)

Trypsin	2,5 g
EDTA- Dihydrat	2,0 mM (0,774 g)
PBS	ad 1000 ml

Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4

NaCl	137 mM (8,0 g)
KCl	2,7 mM (0,2 g)
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8 mM (1,42 g)
KH ₂ PO ₄	1,8 mM (0,24 g)
Aqua bidest	ad 1000 ml

Eagles minimum essential medium (Dulbeccos modification)

EDM-Pulver	133 g
NaHCO ₃	37 g
Penicillin G	0,2 g
Streptomyconsulfat	0,2 g
Aqua bidest	ad 10 Liter

Serum neugeborener Kälber, Newborn calf serum (NCS)

Die hier verwendeten Zelllinien wurden in EDM Nährmedium mit 5 % NCS bei 37°C und 5 % CO₂ Begasung in Plastikschaalen vermehrt. Equine Dermalzellen aus der Institutssammlung (ED Zellen) und Rabbit Kidney Zellen (RK 13) waren die am häufigsten verwendeten Zelllinien. Für den Wachstumsvergleich (s. 3.13.2) wurden weitere Zelllinien verwendet (s. Tab. 5).

Zweimal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 passagiert. Hierzu musste das Medium abgesaugt, die Zellen mit Trypsinlösung gewaschen und dann für 5-10 Minuten in Trypsinlösung inkubiert werden. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten, konnten sie in Nährmedium resuspendiert und in neue Schalen überführt werden. Es folgte die Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂ Begasung im Feuchtbrutschrank.

2.3.2 Virusvermehrung

EDM Nährmedium (s.2.3.1)

PBS (s.2.3.1)

Trypsinlösung (s.2.3.1)

NCS

Zur Virusvermehrung wurde das EDM-Nährmedium vorsichtig aus den Zellkulturschalen abpipettiert und anschließend der semikonfluente Zellrasen mit einer Infektionsmultiplizität (multiplicity of infection, m.o.i) von 0,1 infiziert. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂ im Feuchtbrutschrank wurde der Überstand entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und dann mit EDM/ 5 % NCS bedeckt. Bis zur Ausprägung eines deutlichen zytopathogenen Effektes (cpE, Plaques) verblieben die Platten im Feuchtbrutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ Begasung. Das Medium konnte nun abgesaugt werden und grobe Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm (Heraeus Christ, Minifuge 2) entfernt. Der Virustiter konnte durch die Virustitration (s. 2.5) ermittelt werden. Der Überstand wurde portioniert bei -70° C eingefroren.

2.3.3 Virustitration

Overlaymedium Carboxymethylzellulose (CMC):

CMC-Natriumsalz	8 g
NCS	10 ml
EDM	ad 500 ml

4 % (v/v) Formaldehydlösung in PBS

Formaldehyd 37%	10,8 ml
PBS (s.2.4.1)	ad 100 ml

NCS

EDM

Giemsalösung

Für die Virustitration, die als Plaquetest erfolgte, wurde der virushaltige Zellüberstand in EDM logarithmisch zur Basis 10 verdünnt. In einer 24-Lochplatte wurden im

Doppelansatz 200µl jeder Verdünnungsstufe in die Kavitäten pipettiert und 10^4 ED Zellen in 200 µl EDM/ NCS hinzugegeben. Nach einer Stunde bei 37° C im Feuchtbrutschrank wurden zur Verhinderung der extrazellulären Virusausbreitung 250 µl CMC-Overlaymedium pro Vertiefung hinzupipettiert und es erfolgte eine weitere Inkubation für 24 Stunden (EHV-1) bzw. 48 Stunden (EHV-4) (bis zur Ausbildung von Plaques) bei 37° C im Feuchtbrutschrank. Fixiert wurden die Platten mit 4 % Formaldehyd (20 Minuten) und dann mit GiemsaLösung gefärbt. Der Virustiter wurde in Plaque Forming Units pro ml angegeben.

2.3.4 Virusanzucht

steriler Seesand

EDM

Zum Nachweis von infektiösem Virus aus Gewebeproben wurden zunächst erbsengroße Gewebestücke zur Zerstörung der Zellen mit Seesand im Mörser zerrieben und in 10 ml EDM aufgenommen. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 2000 rpm (Heraeus Chris Minifuge 2) gewonnener Überstand wurde auf ED Zellen ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37° C im Feuchtbrutschrank. Die Platten wurden täglich auf das Auftreten zytopathogener Effekte (cpE) kontrolliert.

2.4 Serologische Tests

In zwei Tests wurden in Pferdeseren zum einen spezifische Antikörper die das Virus neutralisieren (Neutralisationstest, NT) und zum andern im indirekten Immunfluoreszenstest (IFT) auch andere Antikörper nachgewiesen und so ein Bild vom Infektionsstatus der Tiere gewonnen. Ein von mir entwickelter ELISA diente zum Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen aus Serumproben.

2.4.1 Neutralisationstest (NT)

CMC-Overlaymedium

EDM

EDM/ NCS

GiemsaLösung

4% Formalin/ PBS

Zur Vorbereitung für den NT wurden die Seren bei 56° C 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert (Komplementinaktivierung).

Je 100µl des logarithmisch zur Basis 10 in EDM Medium verdünnten Serums wurde in die Kavitäten einer 24-Lochplatte gegeben, dazu kamen 100 µl einer auf 10³ PFU pro ml in EDM Medium eingestellten Virussuspension. Als Positiv- und Negativkontrolle wurden entsprechende Pferdeseren mitgeführt. Die 24-Lochplatte wurde dann für 60 Minuten im Feuchtbrutschrank bei 37° C inkubiert und nach der Zugabe von 10⁴ ED Zellen in 200 µl EDM pro Vertiefung eine weitere Stunde in den Brutschrank gestellt. Es folgte die Abdeckung mit 400µl CMC Overlaymedium pro Kavität und die Inkubation für 48 Stunden (bis zur Ausbildung deutlicher Plaques) im Brutschrank. Die Fixation erfolgte mit 4% Formalin 20 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend wurden die Plaques mit der Giemsa-Färbung sichtbar gemacht und unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet. Die Serumverdünnungsstufe, bei der eine 50%-Plaquereduktion gegenüber der Viruskontrolle zu erkennen war, wurde als Titer angegeben. Auffällig waren Titer >1:10. Serumpaare (untersucht im Abstand von 2-3 Wochen) mit Titerveränderungen um den Faktor 4 und größer galten als signifikant.

2.4.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) zum EHV-1 Immunkomplexnachweis

96-Lochplatten (MaxiSorb Immuno Module, Nunc)

Coatingpuffer: Natriumhydrogenphosphat (0,02 M), NaCl 1,46 %, pH 7,6

Waschpuffer: 0,9 % NaCl / 0,5% Tween 20

Verdünnungspuffer: PBS pH 7,2 / 0,1% Tween 20

Konjugatpuffer: TBS pH 8,0 / 0,1% Tween 20

Substratpuffer: Diäthanolaminpuffer pH 9,8

Der ELISA wurde in zwei Variationen durchgeführt, als **(1) Antigennachweis** und als **(2) Immunkomplexnachweis** (ZIK, zirkulierende Immunkomplexe). Die Etablierung dieses ELISAS erfolgte in Anlehnung an den ELISA zur Detektion von Borna Disease Virus (BDV) (Bode et al., 2001). Es wurden für beide ELISA-Varianten die gleichen initialen coating Schritte ausgeführt. Die 96-Lochplatte wurde mit 1,8µg pro ml mit AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Dianova) in Coatingpuffer (100 µl pro Kavität) beschichtet. Nach einer Stunde bei 37° C im Feuchtbrutschrank und dreimaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer (Tecan washer) erfolgte die weitere Beschichtung mit EHV-1/-4 spezifischem monoklonalem

Antikörper Ai11C10 (Reuter, 1995) 1:500 in Verdünnungspuffer. Je Kavität wurden 100µl aufgetragen und die Platte für eine weitere Stunde bei 37° C in den Brutschrank gestellt (alternativ bei 4° C über Nacht). Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau der beiden ELISA-Varianten:

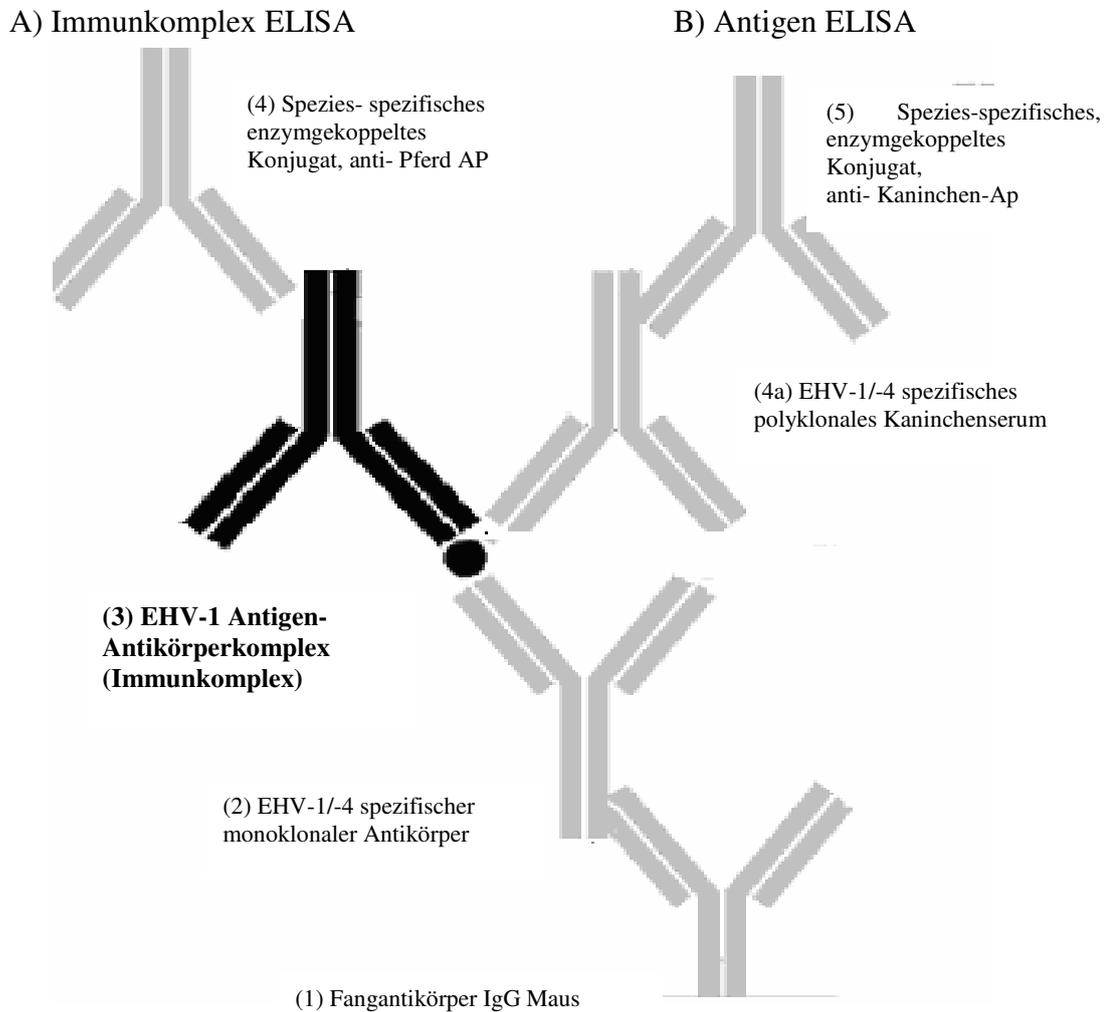


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des ELISAs

Beim **Immunkomplex ELISA** wird der Komplex aus EHV-1 Antigen und EHV-1 Antikörper (3, schwarz) von dem monoklonalen AK (2) erkannt und durch den spezies-spezifischen, enzymgekoppelten (α -Pferd) AK (4) und das Substrat sichtbar gemacht.

Beim **Antigen ELISA** wird EHV-1 Antigen (3a, schwarz) von dem monoklonalen Antikörper (2) detektiert und durch ein EHV-1/-4 spezifisches Serum (4a), sowie eines spezies-spezifischen, enzymgekoppelten (α -Kaninchen) AK (5) nachgewiesen.

A) Immunkomplexnachweis: Hier wurde das Pferdeserum- oder Plasma initial 1:20 in PBS/Tween verdünnt und dann die Reihe in einer 1:2-Verdünnung fortgeführt. Nach einer Stunde Inkubation und dem Waschschrift wurde spezies-spezifisches IgG alkalische Phosphatase (Dianova) Konjugat (100µl je Kavität, 1:3000 in Konjugatpuffer) hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte 1 Stunde bei 37° C.

Je 100 ml Substrat pro Well (P-Nitrophenylphosphat 1mg/ml in Substratpuffer) wurde nach einer Inkubation von 5 Minuten mit 3 M NaOH gestoppt und bei 405 nm im Tecan Plate Reader gemessen.

Als Kontrollen wurden gereinigtes EHV-1 Virusantigen (Mar 87) für den Antigen-ELISA sowie ein deutlich positives Pferdeserum (Fio1) für den ZIK-ELISA mitgeführt. Die Herstellung der Virusantigenkontrolle ist unter 2.4.4 beschrieben. In 2 Wells der ELISA-Platte wurden alle Reagenzien des Tests pipettiert, jedoch ohne Serum oder Plasmaprobe. Diese Felder dienten als negative Kontrolle. 2 weitere Wells der Platte wurden ganz leer gelassen, diese dienten der Leerwertmessung (Blank). Nach entsprechenden Grenzwertmessungen wurden die ELISA Ergebnisse folgendermaßen bewertet: Als positives Ergebnis wurden Messwerte $\geq 0,300$ Extinktion bei 405 nm ($\geq ++$). Als Immunkomplex positiv wurden nur die Proben gewertet, die gleichzeitig im Antigen ELISA positiv waren.

B) Antigennachweis: 100 μ l Serum- oder Plasmaproben wurden in einer 1:2-Verdünnungsreihe in Verdünnungspuffer aufgetragen und eine Stunde bei 37° C in den Feuchtbrutschrank gestellt. Anschließend wurde 3x gewaschen und für eine weitere Stunde mit EHV-1/-4 spezifischem, polyklonales Kaninchenserum MV 4 (Borchers et al., 1999), 1:500 (100 μ l/ Kavität) inkubiert. Als Konjugat wurde nach einem weiteren Waschschriff 100 μ l Ziege- anti- Kaninchen IgG alkalische Phosphatase (Dianova) in einer Verdünnung von 1:3000 in Konjugatpuffer aufgetragen und eine Stunde inkubiert (37° C). Die Platte wurde nun erneut im Platten- Washer 3x gewaschen.

Das Substrat und die Messung wurden analog zu der oben beschriebenen Immunkomplexbestimmung durchgeführt.

2.4.3 Herstellung der Virusantigen Kontrolle für den ELISA

Succrose	20%
TE Puffer pH 7,4	10 mM Tris/ HCL
PBS/Tween Puffer	

Virushaltiger Zellkulturüberstand (EHV-1 Mar 87/ED-Zellen) wurde durch Zentrifugation (10 Minuten bei 8000 rpm) im GSA-Rotor (Sorvall) von Zelltrümmern gereinigt. Der Überstand wurde dann über ein 5 ml Sucrosekissen geschichtet und bei 27000 rpm in einem SW-Rotor 2 Stunden ultrazentrifugiert (Beckmann Zentrifuge). Das virushaltige Pellet wurde in 600 μ l

PBS/Tween Puffer resuspendiert, bei 56°C inaktiviert, für 1 Minute mit Ultraschall behandelt und für die Weiterverwendung portioniert und bei -20° C eingefroren. In gleicher Weise wurden Virusantigenpartikel aus dem EHV-4 Stamm T252 hergestellt. Das so gewonnene und gereinigte EHV-4 Virusantigen konnte als Kontrolle im ELISA eingesetzt werden.

2.4.4 Immunperoxidase Technik (APAPP)

Die Immunperoxidase Färbung wurde zum EHV-1 Antigennachweis aus Gewebeschnitten aus dem ZNS und weiteren Organen durchgeführt. Die Methode wurde erstmals von Whitwell beschrieben (Whitwell et al., 1992). Die Durchführung erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Tierpathologie der FU-Berlin und wurde von Fr. Prof. Dr. Sterner-Kock und Mitarbeitern durchgeführt. Die ca. 4 µm dicken Gewebeschnitte waren in Paraffin gebettet und auf Objektträger aufgezogen. Zur Detektion von EHV-1 Antigen wurde ein EHV-1 spezifischer monoklonaler Antikörper aus dem Institut für Virologie verwendet (Reuter, 1995)

2.5 Aufbereitung von *post mortem* Material

Frische Gewebestücke aus der Tierpathologie der FU-Berlin oder vom Schlachthof, sowie in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte wurden für die DNA-Isolierung aufbereitet. Das frische Gewebe wurde in sterilen Einmalgefäßen bis zur Verarbeitung auf Eis gehalten und nach Gebrauch eingefroren (-20 C°).

2.5.1 Virus DNA Isolierung aus Gewebeproben

Proteinase K Verdauerpuffer: NaCl 75 mM (438mg)
EDTA 24 mM (893mg)
1% SDS
Aqua bidest ad 100 ml

Proteinase K (10 mg/ml Stocklösung)

Die DNA-Präparation aus Gewebeproben erfolgte nach der von (Bartels et al., 1998) beschriebenen Methode. In sterilen DNase und RNase freien Eppendorfröhrchen wurden 500µl Verdauerpuffer sowie Proteinase K mit einer Endkonzentration von 0,15 mg pro ml

vorgelegt. Mit einer Skalpellklinge wurde ein linsengroßes Gewebestück fein zerkleinert und in das entsprechende Röhrchen verbracht. Der Ansatz wurde bei 56° C über Nacht im Wasserbad zum Verdau belassen und dann für 10 Minuten bei 100° C gekocht um die Enzymreaktion zu stoppen. Ein Ansatz ohne Gewebe diente als Präparationskontrolle. Es folgte die fotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration bei 260 nm (Shimadzu, UV-1202). Für die PCR wurden 1-2 µg gesamt DNA eingesetzt.

2.5.2 Virus DNA Isolierung aus Paraffinschnitten

Proteinase K Verdaupuffer: NaCl 75 mM (438mg)
EDTA 24 mM (893mg)
1% SDS
Aqua bidest ad 100 ml

Proteinase K (10 mg/ml Stocklösung)

Die DNA-Isolierung aus in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten erfolgte nach der Methode von Smith und Borchers (Smith et. al 2001). Initial wurden die Gewebeschnitte 10 Minuten in Xylol entparaffinisiert, für 2x 5 Minuten in absoluten Alkohol gewaschen und dann luftgetrocknet. Vor dem Abkratzen der Gewebe mit einer sterilen Skalpellklinge von den Objektträgern wurden diese in Aqua bidest angefeuchtet. Aufgrund der geringeren Probenmenge wurde ein kleinerer Ansatz mit 100µl/ Verdaupuffer pro Probe und 0,15 mg pro ml Proteinase K eingesetzt. Der DNA Gehalt wurde auch hier fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für die PCR wurden 1-2 µg der so gewonnenen DNA eingesetzt.

2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Der Nachweis von EHV-1 und -4 DNA konnte mit bereits etablierten nested Polymerase Kettenreaktionen (nPCR) durchgeführt werden (Borchers et al., 1993). Für den Nachweis von EHV-9 DNA wurde eine spezifische nPCR entwickelt. (s.2.6.2)

2.6.1 Detektion von EHV-1 und -4 DNA mittels PCR

Die Polymerase Kettenreaktion diente in dieser Arbeit zum Nachweis von EHV-1, EHV-4 und EHV-9 Virus DNA. Weiterhin wurde eine PCR zur Kontrolle der DNA-Präparation durchgeführt, bei der das konservierte Gen eines in allen eukaryotischen Zellen vorkommenden Proteins (β -Aktin) nachgewiesen wurde (Shankar et al., 1992). Bis auf die „ β -Aktin“ PCR wurden alle PCRs als nested PCRs durchgeführt. Dabei wird aus der amplifizierten Sequenz der ersten PCR-Runde, mit einem zweiten Primerpaar ein kleineres Sequenzstück, welches innerhalb des ersten liegt, amplifiziert.

EHV-1 Virus DNA wurde anhand der auf der Genomfrequenz des „Immediate early“ Gens 0 (ICPO) basierenden spezifischen nPCR nachgewiesen. Virus DNA konnte so noch bei 1 fg gereinigter DNA detektiert werden. (Borchers et al., 1998).

Der **EHV-4** Nachweis basiert auf der Region des Glykoproteins B (gB). Bei EHV-4 liegt die Nachweisgrenze bei 0,1 fg (Borchers et al., 1993).

Die EHV-1, -4 und -9 PCR wurden in einem Heizblockcycler (Hybaid Omnigen MWG, Biotech, Ebersberg, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	94° C, 30 s
Annealing	primerspezifische Temperatur, 30 s
Synthese	72° C, 60 s
Anzahl der Zyklen	35

Die „ β -Aktin“ PCR wurde in einem weiteren Heizbockcycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) unter unten aufgeführten Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung	94° C, 60 s
Denaturierung	94° C, 30 s
Annealing	56° C, 30 s
Synthese	72° C, 60 s
Anzahl der Zyklen	40

In Tabelle 6 sind die Annealing Temperaturen und die entstehenden Fragmentgrößen für jede PCR-Runde dargestellt:

Tabelle 6: Temperaturen und entstehende Fragmentgrößen bei den verschiedenen durchgeführten Polymerase Kettenreaktionen (PCR)

PCR	Runde	Annealing-Temperatur	Fragmentgröße	Genom-bzw. Gen-Position
EHV-1 ICPO	1.Runde	56° C,	388 Bp	Pr.1 109882 Pr.2 110269
	2.Runde	59° C,	128 Bp	Pr.3 110035 Pr.4 110162
	1.Runde	56° C,	951 Bb	Pr.1 1974 Pr.2 2906
	2.Runde	67° C,	580 Bb	Pr.3 2126 Pr.4 2706
EHV-4 gB	1.Runde	56° C,	951 Bb	Pr.1 1974 Pr.2 2906
	2.Runde	67° C,	580 Bb	Pr.3 2126 Pr.4 2706
β-Aktin	1.Runde	56° C,	248 Bp	

Pr.= Primer

2.6.2 Etablierung einer EHV-9 spezifischen nPCR

Eine nested PCR zur Detektion von equiner Herpesvirus-9 DNA sollte etabliert werden. Anhand bekannter Nucleotidsequenzen (Fukushi et al., 1997) für dieses Virus konnten die Primerpaare aus der Region, die für das Glycoprotein B (gB) codiert, gewählt werden. Durch die Nutzung eines äußeren und eines inneren Primerpaares lässt sich die Sensitivität der nested PCR im Vergleich zur Standard PCR erhöhen. Das äußere und innere Primerpaar sind in Tabelle 7 dargestellt:

Tabelle 7: Äußeres und inneres Primerpaar der EHV-9 nPCR

Primer ¹	Sequenz	Annealing Temperatur	Fragmentgröße	Gen-Position
EHV-9 F2	5'-CCTCAGCCAACCCAAGATG-3'	70° C		109-127
EHV-9 B5	5'-GCATAATCACTGCGGTATTGTC-3'	70° C	816 Bp	946-925
EHV-9 F1	5'-GCAAACAACAGAGGGTTCGGTAG-3'	70° C		568-589
EHV-9 B1	5'-CGGTCTTCCAAAAGGGTCAAG-3'	70° C	203 Bp	791-771

¹ F2 ist der obere Primer des äußeren Paares, B5 der untere Primer des äußeren Paares, F1 ist der obere Primer des inneren Paares, B1 der untere Primer des inneren Paares

Die Spezifität der EHV-9 nPCR wurde detailliert überprüft. Aufgrund hoher Sequenzhomologien im Glycoprotein B ergab auch EHV-1 DNA in der EHV-9 PCR ein positives Ergebnis. In der EHV-1 ICPO PCR die auf der Genomfrequenz des „Immediate early“ Gens 0 (ICPO) beruht, wurde jedoch ausschließlich EHV-1 und keine EHV-9 DNA erkannt. Auf diese Weise konnte nur im Ausschlussprinzip eine Abgrenzung von EHV-9 und EHV-1 erfolgen.

2.6.3 Analytische Gelelektrophorese

TAE-Puffer (10x):

Tris (hydroxymethyl) aminomethan	0,4 M (48,5 g)
Na- Acetat	0,06 M (4,13 g)
EDTA Dinatriumslaz-Dihydrat	0,01 M (3,7 g)
Aqua bidest	ad 1000 ml
pH	7,9

Probenpuffer:

70% Sucrose (w/v)	70 g
0,25 % Bromphenolblau (w/v)	250 mg
Aqua bidest	ad 100 ml

Ethidiumbromid-Lösung:

Ethidiumbromid	1 g
Aqua bidest	100 ml

Laufpuffer 1x TAE mit Ethidiumbromid-Lösung

Hochreine Standardagarose

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten nach der PCR oder der REA wurden in einer horizontalen Elektrophoresekammer Agarosegele (hochreine Standardagarose, Life Technologies) in einer Konzentration von 0,7-2,0 % in Laufpuffer mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg pro ml) verwendet. Nach dem Lösen in Puffer und dem vorsichtigen Aufschmelzen in der Mikrowelle wurde die flüssige Agarose in die Gelkammer gegossen, mit Laufpuffer überschichtet und die Proben mit 1/10 Volumen Probenpuffer in die

Geltaschen aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei einer Spannung von 3 V pro cm. Als Marker wurde bei jeder Gelelektrophorese 5µl der Bioline Hyperladder (Bioline GmbH, Luckenwalde) mit aufgetragen. Dieser Marker lieferte Banden mit einer Größe von 10000 Bp-100 Bp. Nach der vollständigen Auftrennung wurde das Gel auf dem Transluminator (Biometra, FLX-20M) bei UV-Licht betrachtet und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera bei 312 nm Wellenlänge fotografiert.

2.7 DNA Detektion mittels *in situ*-Hybridisierung und Southern Hybridisierung

Für den DNA-Nachweis per *in situ*-Hybridisierung wurde zunächst DNA isoliert und gereinigt, dann eine DNA-Sonde hergestellt und diese im Dot Blot überprüft.

2.7.1 Reinigung und Isolierung von Virus DNA

TE Puffer

Tris/HCL	10 mM (0,61 g)
EDTA pH 8.0	1 mM (0,185g)
Aqua bidest	ad 500 ml

Sucroselösung 20 % 20 % (w/v) in TE Puffer

Sodiumdodecylsulfat-Lösung 20 %

SDS 20% (w/v) in Aqua bidest

EDTA Lösung 0,2 M

EDTA	7,44 g
Aqua bidest	ad 100 ml

Proteinase K (10 mg/ml Stocklösung)

RNAse I, DNase I

Zur Reinigung und anschließenden Isolierung von Virus DNA wurde virushaltiger Zellkulturüberstand (ca.500 ml) wie unter 2.3.2 beschrieben gewonnen und bei 3000 rpm

(Heraeus Christ Minifuge 2) zentrifugiert. Der so vorgereinigte Überstand konnte nun in Ultrazentrifugenröhrchen übertragen und mit 5 ml 20% Sucroslösung unterschichtet werden. Die Ultrazentrifugation erfolgte 1 Stunde bei 27000 rpm in einem SW 27 Rotor (Beckmann). Das entstandene Pellet wurde nach dem Abgießen des Überstandes in 1 ml 1x DNase Puffer resuspendiert und durch enzymatische Digestion mit je 1,5µl DNase I und RNase I für 30 Minuten bei 37° C die zellulären Nukleinsäuren entfernt. Nach der erneuten Zugabe von 1,5µl DNase I und RNase I für 30 Minuten zum vollständigen Abbau, konnte die Freisetzung der Virus DNA beginnen. Hierzu wurde über Nacht eine Inkubation mit 250µl 0,2 M EDTA, 10µl 20% SDS Lösung, sowie 100µl Proteinase K (0,1 mg/ml Endkonzentration) bei 60° C im Wasserbad durchgeführt.

Die sich anschließende Virus DNA Isolierung erfolgte mit dem RTP[®] DNA/RNA Virus Mini Kit der Firma Invitex (Invitex GmbH, Berlin) nach den Anweisungen des Herstellers.

Das Viruspellet wurde in 400µl ddH₂O aufgenommen, in das Extraktionsröhrchen überführt und für 15 Minuten unter kontinuierlichem Schütteln bei 65° inkubiert. Durch die Zugabe von 400µl Binding Solution, vorsichtigem Mischen und Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 rpm erfolgte im Spin Filter das Binden der DNA. Nach zwei Waschrufen (30 Sekunden, 10000 rpm) mit den Waschpuffern R1 und R2 wurde in 4 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (15000 rpm) das restliche Ethanol entfernt. Der Spin Filter wurde in das Lösungsröhrchen umgesetzt und 40-60µl vorgewärmter (80°C) Elution Puffer hinzupipettiert. Das nach 1 Minute Zentrifugation entstandene Eluat enthielt die Virus DNA. Es folgte die Konzentrationsbestimmung mittels Elektrophorese durch Auftragung von 3µl des gewonnenen Eluats auf ein Agarosegel. Es wurde DNA-Konzentrationen von ca. 10- 40 ng/µl erzielt. Lagerung erfolgt bei 4° C bis zum weiteren Gebrauch.

2.7.2 DNA Sondenmarkierung mit Digoxigenin dUTP

EDTA-Lösung 0.2 M:

EDTA	7,44 g
Aqua bidest	ad 100 ml

Ammoniumacetat 5 M:

NH ₄ - Acetat	38,54 g
Aqua bidest	ad 100 ml

Lachssperm DNA 10µg/µl

Ethanol absolut und Ethanol 80 %

TE Puffer

DNA Sonden wurden in dieser Arbeit für die *in situ*-Hybridisierung und für die Southern Hybridisierung benötigt. Es wurden ausschließlich nicht radioaktiv markierte Sonden verwendet. Im Vergleich zu einer radioaktiven Markierung kann mit einer Digoxigenin markierten Sonde unter sicherheitsrechtlichen Aspekten wesentlich leichter gearbeitet werden. Hergestellt wurde eine EHV-1 Gesamt-DNA Sonde, eine EHV-1 ICPO Sonde, eine EHV-4 Gesamt-DNA Sonde, sowie zu Kontrollzwecken eine BHV-1 Sonde (Bovines Herpesvirus-1). Die Markierung erfolgte mit dem Digoxigenin-DNA-Markierungs-Kit der Firma Boehringer/Mannheim gemäß den Herstellerangaben.

Die entsprechende Virus DNA (ca. 200 ng) wurde 10 Minuten bei 100°C denaturiert und sofort für 5 Minuten auf Eis gekühlt um eine Renaturierung zu verhindern. Dann kamen pro Ansatz

- 2 µl Hexanukleotid-Mix,
- 2 µl dNTP Markierungsmix und
- 1 µl Klenow Enzym (2 U/µl)

hinzu und die Proben wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgte durch die Zugabe von 2µl 0,2 M EDTA und die folgende Fällung mit:

- 40 µl 5M Ammoniumacetat
- 5 µl Lachssperm DNA
- 33 µl Aqua bidest und
- 300 µl eiskaltem Ethanol absolut

für 2 Stunden bei -20 °C im Gefrierschrank. Das nach der anschließenden Zentrifugation (15 Minuten, 15000 rpm, Mikrozentrifuge 154, Ole Dich, Denmark) entstandene Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl Tris-EDTA (TE) Puffer resuspendiert. Die Überprüfung der Sonde erfolgte im Dot Blot (s. 2.7.2) und die Lagerung bei -20°C im Gefrierschrank.

2.7.3 Dot Blot

Puffer1	Tris HCL	100 mM (12,11 g)
	NaCL	150 mM (8,77 g)
	Aqua bidest	ad 1000 ml
	pH 7,5	
Puffer 2	Blocking- reagenz	0,5 % (w/v)
	Puffer 1	ad 100 ml
Puffer 3	Tris HCL	100 mM (12,11 g)
	NaCl	100 mM (5,84 g)
	MgCL ₂	50 mM (4,76 g)
	Aqua bidest	ad 1000 ml
	pH 9,5	
Puffer 4	Tris HCL	10 mM (1,21 g)
	EDTA	1 mM (0,372 g)
	Aqua bidest	ad 1000 ml
	pH 8	
Nitroblau- Tetrazoliumsalsz (NBT)	50 mg/ml in 70% Dimethylformamid (v/v)	
X-Phosphat (5-Bromo-4 chloro- indolylphosphat)	50 mg/ml in 100% Dimethylformamid	
Färbelösung	NBT-Lösung	45 µl
	X-Phosphat	35 µl
	Puffer 3	ad 10 ml

Im Dot Blot wurde mit dem Digoxigenin-DNA Detektions Kit (Boehringer, Mannheim) die erfolgreiche Markierung der Sonde überprüft und deren Konzentration bestimmt.

Es wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Schritten von 1:10-1:10⁶ sowohl von der Sonde als auch von einer Kontrollsonde (Konzentration 5ng/ml) hergestellt. Je 1µl der Verdünnungsstufen wurde auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen und nach kurzem Eintauchen in Puffer 1 für 30 Minuten in Puffer 2 geschwenkt. Nach einem Waschschrift (Puffer 1) konnte das Konjugat anti-Digoxigenin AP (1:5000 in Puffer 1) für 30 Minuten bei RT aufgetropft werden. Einem weiteren Waschvorgang (2x 15 Minuten Puffer 1) folgte die Farbreaktion mit NBT/X-Phosphat im Dunkeln. Nach dem Reaktionsstopp mit Puffer 4 und dem Trocknen der Membran erfolgte die Konzentrationsbestimmung anhand der Verdünnungsreihe im Vergleich zur Referenzsonde.

Es wurden Sondenkonzentrationen zwischen 5ng/µl- 40ng/µl erzielt.

2.7.4 *In situ*-Hybridisierung

100% Formamid (v/v)/ 20% Dexransulfat (w/v)

20x Standard Sodium Citrat (SSC)

NaCl	3 M (175,3 g)
Tri-Na-Cirat-Dihydrat	0,3 M (88,2 g)
Aqua bidest	ad 1000 ml

50x Denhardt- Puffer

Ficoll	2 g
Polyvinylpyrrolidose	2 g
BSA	2 g
Aqua bidest	ad 200 ml

Heringssperm DNA (HS DNA), 6,6 µg/µl

Magnesiumchlorid- Lösung 1

MgCl ₂ 5 M	47,6 g
PBS	ad 100 ml

Magnesiumchlorid- Lösung 2

MgCl ₂ 5 M	1 ml
PBS	ad 1000 ml

Glycin- Lösung

Glycin	2 g
PBS	ad 1000 ml

Paraformaldehyd 4% in PBS/ 5 mM MgCl₂

Paraformaldehyd	20 g
PBS/5 mM MgCl ₂	ad 500 ml

Xylol

Ethanol absolut und Ethanol 70%

Die *in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin markierten DNA Sonden wurde zum Nachweis von EHV- 1 und EHV- 4 DNA in verschiedenen Gewebeschnitten genutzt (Baxi et al., 1996; Bartels et al., 1998; Smith et al., 2001). Das für die ISH verwendete Probengut ist unter 2.2.3 beschrieben.

Die ca. 4 µm dicken, mit einem Mikrotom hergestellten Paraffinschnitte wurden für 10 Minuten in Xylol und 2x 5 Minuten in Ethanol abs. entparaffinisiert. Es folgte die Rehydrierung in PBS 5mM MgCl₂ (2x 5 Minuten) und der Aufschluss der Zellmembranen durch das Auftropfen von Proteinase K (0,2 mg/ml, Boehringer, Mannheim) für 5 Minuten. Dem Enzymstopp durch Waschen in PBS / Glycin (3x 5 Minuten) folgte die Nachfixierung in 4% Paraformaldehyd in PBS/ 5mM MgCl₂. Nach einem weitem Waschschrift mit PBS/Glycin (2x 5 Minuten) und der Dehydrierung durch je 5 Minuten in Ethanol 70% und Ethanol abs., konnte nach kurzem Lufttrocknen der Schnitte der Hybridisierungsmix aufgetragen werden.

Dazu wurden 10 µl des Hybridisierungsmix bestehend aus

- 50% Formamid/10% Dextransulfat,
- 2x SSC,
- 2x Denhardt,
- 400 ng/µl HS DNA,
- 1-2 µg/ml DNA Sonde

vorsichtig auf jeden Schnitt aufgetropft und mit einem Plastikdeckgläschen abgedeckt. Die Denaturierung erfolgte bei 120° C mit anschließend sofortiger Abkühlung im Eiswasserbad. Zur eigentlichen Hybridisierungsreaktion wurden die Deckgläschen mit FixoGum (Marabu, Tamm) abgedichtet, die Objektträger bei 37° C für 48 Stunden in einer feuchten Kammer auf einem mit 6x SSC getränktem Schwamm inkubiert. Nach dieser Zeit konnten die Deckgläschen abgenommen werden und die Schnitte in mehreren Schritten gewaschen

werden: 2x kurz in 2x SSC, 3x 10 Minuten in 2x SSC, 30 Minuten in 2x SSC bei 55°C im Wasserbad, 3 Minuten 0,2x SSC, 30 Minuten 0,2x SSC bei 42°C im Wasserbad und zur Äquilibrierung 2-3 Minuten in PBS.

Vor dem Auftragen des Konjugats Rabbit F^{ab} Anti DIG alkalische Phosphatase 1:100 (DAKO, Hamburg) in Puffer 1 (s.2.7.3), wurden unspezifische Signale durch 5% BSA in PBS mit HS DNA geblockt (30 Minuten) und 3x 10 Minuten mit Puffer 1 gewaschen. Nach dem Abwaschen des nicht gebundenen Brückenantikörpers (Konjugats) wurde als Signalverstärkung ein enzymgekoppeltes Polymer (DAKO EnVision Labelled Polymer AP, Enhancer, DAKO, Hamburg) für 30 Minuten unverdünnt aufgetropft (Gerst et al., 2003). Zweimaliges Waschen in Puffer 1 (je 15 Minuten) und äquilibrieren in Puffer 3 (s.2.7.3) folgte die Farbreaktion (im Dunkeln) mit 4,5 µl NBT/ 3,5µl x-Phosphat/ml in Puffer 3 als Substrat. Die Reaktion wurde durch 5 minütiges Waschen in Puffer 4 (s.2.7.3) gestoppt, die Gewebeschnitte in Ethanol 70 %, Ethanol abs. je 5 Minuten dehydriert und mit einem Tropfen Histokit und Deckglas eingebettet. Die Auswertung erfolgte bei verschiedenen (10x, 40x)Vergrößerungen unter dem Durchlichtmikroskop.

Bei jeder *in situ*-Hybridisierung wurden als Positivkontrollen Gewebeschnitte aus Lunge und Leber eines EHV-1 positiven Pferdes mitgeführt. Zudem wurde ein Teil der untersuchten Proben stichprobenartig mit einer nicht homologen BHV-1 (Bovines Herpesvirus 1) DNA Gesamtsonde untersucht. So konnte bei den Ergebnissen der EHV-Hybridisierungen sichergestellt werden, dass es sich um virusspezifische Signale handelte.

2.7.5 Southern Blot

Denaturierungspuffer

NaOH	0,4 N (16 g)
NaCl	0,6 M (34,8 g)
Aqua bidest	ad 1000 ml

Neutralisationspuffer

NaCl	1,5 M (87,6 g)
Tris-HCl	0,5 M (78,8 g)
Aqua bidest	ad 1000 ml

20x Standard Sodium Citrat (SSC)

NaCl	3,0 M (175,3 g)
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	0,3 M (88,2 g)
Aqua bidest	ad 1000 ml

HCL	0,25 %
NaOH	0,4 N
Tris-HCL	0,2 M

Nach der Methode von Southern (1975) wurde die in der Restriktionsenzyme Analyse geschnittene DNA auf eine Nitrozellulosemembran (NEN Research Produkts, Boston USA) transferiert.

Das Agarosegel wurde zum Entfernen des Ethidiumbromids 15 Minuten in Aqua bidest entfärbt und zum Zerkleinern der DNA für 30 Minuten in 0,25 N HCL bei RT gewaschen. Die sich anschließende Denaturierung und Neutralisation erfolgte je 30 Minuten in den entsprechenden Puffern. Die auf Gelgröße zugeschnittene Nitrozellulosemembran wurde mit destilliertem Wasser befeuchtet und für 15 Minuten in 10x SSC geschwenkt. Die Membran wurde auf das Gel gelegt und mit Filterpapieren abgedeckt. Der Transfer erfolgte nun mittels vertikaler Diffusion von 10x SSC vom Gel zur Membran. 24 Stunden später konnte der Transfer beendet werden und die Membran nach kurzem Waschen in 0,4 N NaOH und 0,2 M Tris-HCL getrocknet werden. Zur Kontrolle des vollständigen Transfers wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht auf eine vollständige Diffusion der DNA aus dem Agarosegel kontrolliert. Die Aufbewahrung der Membran erfolgte trocken bei 4° C.

2.7.6 Southern Hybridisierung

Prähybridisierungsmix

50 % (v/v) Formamid	250 ml
5x SSC	125 ml 20x SSC
2 % (w/v) Blockingreagenz	100 ml 10%ige Stocklösung
0,1 % (w/v) N- Laurolylsacrosine	500 mg
0,02% SDS	500 µl 20%iges SDS
50 µl/ml Hefe RNA	25 mg
Aqua bidest	ad 500 ml

Waschpuffer 1 (2x SSC, 1% SDS)

20x SSC	100 ml
20% SDS	5 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

Waschpuffer 2 (0,1x SSC, 0,1% SDS)

20x SSC	5 ml
20% SDS	5 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

Puffer 1,2,3,4 *siehe* 2.7.2

Die Nitrozellulosemembran mit der transferierten DNA wurde mit 5 ml Prähybridisierungsmix in einem Glasrohr für 1 Stunde bei 42° C inkubiert. Anschließend wurden 20-50 ng/ml Digoxigen-markierte Sonde (s. 2.7.2) für 10 Minuten denaturiert und sofort auf Eiswasser abgekühlt. Nach dem Abgießen des Prähybridisierungsmixes aus dem Glasrohr wurde die denaturierte Sonde mit 5 ml frischem Prähybridisierungsmix eingegossen und zur Hybridisierung für 48 Stunden bei 42° C im Hybridisierungsofen gelassen. Die Membran konnte anschließend aus dem Glasrohr entnommen werden, 2x 15 Minuten in Waschpuffer 1 bei RT und 2x 15 Minuten in Waschpuffer 2 bei 68° gewaschen werden. Nach kurzer Äquilibration in Puffer 1 wurde in Puffer 2 30 Minuten bei RT geblockt. Die Membran wurde nun 30 Minuten in anti- Digoxigenin alkalische Phosphatase (1:5000 in Puffer 1) geschwenkt, 1 Minute in Puffer 1 gewaschen und zur Äquilibration 15 Minuten in Puffer 3 getaucht. Die Farbreaktion erfolgte mit 4,5 µl NBT/3,5 µl x-Phosphat pro ml in Puffer 3. Puffer 4 stoppte die Farbreaktion und die Membran konnte bei RT getrocknet werden.

2. 8 Restriktionsenzymanalyse (REA)

Restriktionsenzyme, Enzympuffer

Probenpuffer (s.2.6.3)

Aqua bidest

Die Restriktionsenzymanalyse wurde zur Spezifizierung isolierter Virus DNA eingesetzt, wobei insbesondere Unterschiede zwischen den untersuchten Viren EHV-1, EHV-4 und EHV-9 herausgearbeitet werden sollten.

Es wurde in einem 20 µl Gesamtansatz 200 ng der zu untersuchenden DNA mit entsprechenden Puffern und Enzymen auf Eis pipettiert und fehlendes Volumen mit Aqua bidest aufgefüllt. Enzyme und Puffer wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet. Nach einem Restriktionsenzymverdau von 2 Stunden bei 37 ° C im Wasserbad konnten die Fragmente in der Gelelektrophorese auf einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt werden (3V cm²). In dieser Arbeit wurden in der REA die Enzyme *Eco* RI (Biolabs), *Bam* HI (Biolabs) und *Bgl* II (Amersham) verwendet.

2.9 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.9.1 Präzipitation von Serumproben mit Polyethylenglykol (PEG)

Die Präzipitation von Serumproben mit Polyethylenglykol wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Holloway et al., 1993; Bode et al., 2001). Aus den Pferdeserum- oder Plasmaproben sollten virusspezifische Proteine präzipitiert werden, um diese anschließend elektrophoretisch aufzutrennen und im Western Blot sichtbar zu machen.

3,5% Polyethylenglycol 8000 in 0,1 % Boratpuffer (pH 8,4)

1,5 M Glycin Puffer (pH 1,85)

1,5 M Tris/HCL Puffer (pH 9.0)

Lämmli Puffer : Bromphenolblau 100 mg, Glycerin 3,5 ml, SDS 1,5 g, 1M Tris HCL pH 6.8,
Mercaptoethanol 2,5 ml

Für die PEG Präzipitation wurden 5 ml der jeweiligen Serumprobe oder Plasmaproben mit 20 ml der 3,5% PEG Lösung gegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Das Präzipitat wurde anschließend zweimal mit 0,1% Boratpuffer gewaschen (1900 x g, 10 Minuten) und das Pellet in 300 ml Glycinpuffer für 1 Stunde bei 37° C gelöst. Jeweils 30µl der dissoziierten Immunkomplexe wurden mit demselben Volumen Tris/HCL Puffer neutralisiert. Die Proben konnten dann in 60 µl Lämmli Puffer für 5 Minuten gekocht und für die SDS Page Gele verwendet werden. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei - 20° C.

2.9.2 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Es wurde ein Polyacrylamidgel (10%) bestehend aus Trenngel und Sammelgel in ein vertikales Biorad Gelkammersystem (Biorad, Hercules, USA) gegossen.

Trenngel (10 %, 6 ml pro Gel)

30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	2,0 ml
1,88 m Tris/HCL, pH 8,0	1,2 ml
0,5 % SDS	1,2 ml
Aqua bidest	1,6 ml
Tetramethylethyldiamin	6,0 µl
Ammoniumpersulfatlösung 10 %	30 µl

Sammelgel (5 %, 2 ml pro Gel)

30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	0,33 ml
0,625 M Tris/HCL, pH 8,0	0,4 ml
0,5 % SDS	0,4 ml,
Tetramethylethyldiamin	2,0 µl
Ammoniumpersulfatlösung 10 %	10 µl

Elektrophoresepuffer, pH 8,3 (10x)

Tris Base	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	5 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

Laufpuffer (2,5x)

0,0625 m Tris/HCL, pH 6,8	0,189 g
SDS 2%	0,5 g
Glycerin 10%	2,5 ml
Bromphenolblau 1%	250 µl
Aqua bidest	ad 10 ml

Die Glasplatten der Gelkammer (Biometra) wurden sorgfältig mit Alkohol gereinigt, mit Silikondichtungen abgedichtet und mit Klammern fixiert. Zunächst wurde das Trenngel vorsichtig zwischen die Glasplatten gegossen und mit ca. 1 ml Aqua bidest während der Polymerisation vor Austrocknung geschützt. Nach dem Absaugen des Wassers mit Filterpapier wurde der Trogformer eingesetzt und das Sammelgel gegossen. Bevor das Gel in die Kammer eingesetzt werden konnte, wurde der Kamm gezogen und die Gummidichtungen entfernt.

Es konnte ein Probenvolumen von ca. 20 µl pro Geltasche aufgetragen werden. Vor dem Auftragen wurde die Probe mit halben Volumen Laufpuffer vermischt und für 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Beim Durchlaufen des Sammelgels betrug die Stromstärke 15 mA und beim Durchlaufen des Trenngels ca. 30 mA.

Sobald die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel konnte für die Silberfärbung oder den Western-Blot weiterverwendet werden.

2.9.3 Silberfärbung

Die Färbung eines SDS PAGE Gels mit Silbernitrat ermöglichte eine Kontrolle der erfolgreichen elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen.

Methanollösung 50 %

Methanol	50 %
Essigsäure	7,5 %

Methanollösung 5 %

Methanol	5 %
Essigsäure	7,5 %

Glutardialdehyd 5 %

Färbelösung

Silbernitrat	0,8 g
Ammoniak 33 %	2 ml
NaOH 1N	2 ml
Aqua dest	ad 100 ml

Entwickler

Zitronensäure 5 %	200 µl
Formaldehyd 37 %	100 µl
Aqua dest	ad 100 ml

Glycerin 5-10%

Das Gel wurde zunächst für je 30 Minuten bei RT in 50 % iger Methanollösung und dann in 5% iger Methanollösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend kam es für 20 Minuten in die 5 %-Glutardialdehyd-Lösung und wurde dann für mindestens 1 Stunde oder über Nacht gewässert (mehrmaliger Wasserwechsel). Die Färbung erfolgte für 10 Minuten in Färbepuffer. Zum Unterdrücken des Hintergrundes folgte ein zweimaliges Waschen in Aqua bidest für je 5 Minuten in einer neuen Schale. Nun konnte der Entwickler hinzugegeben werden und die Färbung wurde je nach Intensität der Banden nach ca. 5-10 Minuten in Methanol 5%/ Essigsäure 7,5 % abgestoppt. Nach kurzem Schwenken des Gels in Aqua bidest wurde es für 1 Stunde in 5-10 % Glycerin unter leichtem Schwenken gelegt.

Es folgt die Trocknung des Gels indem es auf ein entsprechend zurechtgeschnittenes Filterpapier gelegt und für eine Stunde im Vakuum-GelDryer (Biometra) getrocknet wurde.

2.9.4 Western Blot (Immuno Blot)

starker Anodenpuffer	300 mM Tris- Base, pH 10,4 10 % Methanol
schwacher Anodenpuffer	25 mM Tris- Base, pH 10,4 10 % Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris- Base , pH 9,4 40 mM ε- Aminocarbonsäure 10 % Methanol
Blockpuffer	PBS/ 1 % BSA/ Tween 20 0,05 %
Waschpuffer 1	PBS/ Tween 20 0,05 %
Waschpuffer 2	PBS/ 1% FCS
Substratpuffer	50µg Carbazole (3Amino-9Ethyl Carbazole) DMSO 5 ml H ₂ O ₂ 150 µl Acetatpuffer ad 50 ml

Für den Transfer der Proteine vom SDS-PAGE-Gel auf eine PVDF-Membran (Amersham Pharmcia, UK) wurde die Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten (ca. 8x6 cm) und für 30 Sekunden in Methanol abs. gelegt. Nachfolgend wurde sie für 15 Minuten in schwachen Anodenpuffer äquilibriert. Zusätzlich wurden 6 Blottingpapiere (Schleicher & Schuell, 1,5 mm) in gleicher Größe zurechtgeschnitten und ebenfalls 15 Minuten in schwachen Anodenpuffer (1 Papier), starken Anodenpuffer (2 Papiere) und Kathodenpuffer (3 Papiere) gelegt. Das SDS-PAGE-Gel wurde für die gleiche Zeit in Kathodenpuffer äquilibriert. Der Transfer im Semi-Dry Verfahren erfolgte in einer Biometra Kammer nach folgendem Sandwichaufbau:

- 3 Filter (Kathodenpuffer)
- Polyacrylamidgel
- PVDF Membran
- 1 Filter (schwachen Anodenpuffer)
- 2 Filter (starker Anodenpuffer)

Vorsichtig wurden die Luftblasen zwischen den einzelnen Papierlagen entfernt und die Kammer für 45 Minuten bei 4 mA/cm^2 an das Power Pack angeschlossen. Nach dem Transfer konnte die Membran bis zur weiteren Verwendung luftgetrocknet, oder sofort weiter für den Assay benutzt werden.

Für die Weiterverarbeitung kam die Membran für 1 Stunde in Blockpuffer um unspezifische Signale zu blocken. Es folgte die Inkubation mit dem ersten und zweiten Antikörper für je eine Stunde. Der monoklonale Antikörper Ai11C10 ist gegen EHV-1 gerichtet, reagiert aber kreuz mit EHV-4. Auch mit dem polyklonalen Kaninchenserum konnte nicht zwischen EHV-1 und EHV-4 differenziert werden.

Tabelle 8: Western Blot mit monoklonalen-und polyklonalen Antikörpern

	(1) monoklonaler Ak	und	(2) polyklonaler AK
1. Antikörper	EHV-1/-4 mk Ak Ai11C10*, (1:500 in PBS/ 1% BSA)		EHV-1/-4 spez. polyklonales Kaninchenseum MV4, (1: 500 in PBS/ 1%BSA)
2. Antikörper (Konjugat)	α - Maus POD, (1: 1000 in PBS/ 1% FCS)		α -Kaninchen POD, (1: 5000 in PBS/ 1% FCS)
Substrat	H_2O_2 in Substratpuffer		H_2O_2 in Substratpuffer

*(Reuter, 1995)

Zwischen der Inkubation mit den Antikörpern erfolgten jeweils zwei Waschgänge (je 15 Minuten) mit Waschpuffer 1 (nach dem ersten AK) und Waschpuffer 2 (nach dem zweiten AK). Alternativ zu den POD markierten Antikörpern wurde bei sonst gleichen Bedingungen auch alkalische Phosphatase (AP)-markierte AK benutzt. In diesem Fall wurde als Substrat das Sigma FastRed Tabletten Set eingesetzt.

2.10 Statistische Methoden

Die Auswertung der Ergebnisse der Immunkomplexuntersuchung in Blutseren erfolgte mittels SPSS Version 15.0 (englische Version). Die Resultate wurden mit SPSS als Box Plots angegeben. Soweit die statistische Signifikanz der ELISA-Auswertung angegeben ist wurde diese mit dem „Mann-Whitney-U-Test“ ermittelt. Er dient zur Überprüfung der signifikanten Übereinstimmung zweier Verteilungen. Die Ergebnisse der Gewebetropismus-Untersuchungen wurden rein deskriptiv ausgewertet.

3. Ergebnisse

Im Rahmen meiner Untersuchungen sollten Erkenntnisse zur Bedeutung von zirkulierenden Immunkomplexen, zum Gewebe- und Zelltropismus im Hinblick auf die EHV-1 bedingte Myeloenzephalopathie des Pferdes gewonnen werden. EHV-9, ein relativ neues, ebenfalls neuropathogenes Alpha-Herpesvirus wurde in diese Arbeit miteinbezogen.

Die Ergebnisse meiner Dissertation umfassen folgende Bereiche:

1. Untersuchungen von Blutserumproben im Hinblick auf die Bedeutung von Immunkomplexen, Impfung, Alter und Jahreszeitverteilung im Zusammenhang mit dem Auftreten der paretisch-paralytischen Verlaufsform der EHV-1 Infektion des Pferdes. Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen im Blutserum. EHV-Antigennachweis im Western Blot zur Bestätigung der ELISA Ergebnisse.
2. Virologische, molekularbiologische und immunhistologische Untersuchungen an frischen und in Paraffin eingebetteten *post mortem* Geweben zum Vorkommen und zum Gewebetropismus von EHV-1 im zentralen Nervensystem. Hierzu wurden verschiedene Gewebeproben von experimentell und natürlich infizierten Pferden und von experimentell infizierten Mäusen untersucht.
3. Untersuchungen zur Genomcharakterisierung per Restriktionsenzymanalyse und PCR sowie zum Wachstumsverhalten von EHV-9 und möglicher Nutzung dieser Ergebnisse für die Routinediagnostik von EHV-9.

3.1 Etablierung eines ELISAs zur Bestimmung zirkulierender Immunkomplexe im Blutserum

Die Bedeutung zirkulierender Immunkomplexe im Blut bei Pferden mit EHV bedingter Ataxie ist noch nicht hinreichend geklärt und sollte hier genauer untersucht werden. Eine immunologische Reaktion, in deren Folge es zur Bildung von zirkulierenden Immunkomplexen kommt, wird für Gefäßschädigungen und Vaskulitis im ZNS verantwortlich gemacht (Bitsch et al., 1971; Charlton et al., 1976). Von Edington et al. (1986) konnten bei experimentell mit EHV-1 infizierten Pferden ab dem 2. Tag p.i. Immunkomplexe im Serum bei Pferden mit der neurologischen Form der EHV-Infektion nachgewiesen werden. Da Gefäßläsionen aber nur in Epithelien gefunden werden konnten, wo es auch zu einer Virusreplikation gekommen war und nicht in Organen wie beispielsweise den Nieren, sah er die Bedeutung von Immunkomplexen im Zusammenhang mit der neurologischen Form der EHV-1 Infektion jedoch als sekundär und lokal begrenzt an. In meiner Arbeit soll zum einen geklärt werden, ob der Immunkomplexnachweis aus Serumproben von Pferden mit einem hierzu entwickelten ELISA Test möglich ist, zum anderen soll die Bedeutung von Immunkomplexen im Zusammenhang mit der neurologischen Verlaufsform der EHV-Infektion untersucht werden.

Zum Nachweis von EHV bedingten Immunkomplexen aus Serumproben wurde ein ELISA aufgebaut (siehe 2.4.2). Den hier dargestellten Ergebnissen liegen die in Anhang 1 angegebenen Daten zugrunde. Das Prinzip des ELISAs beruht auf einem von Bode et al. (2001) beschriebenen Test zum Nachweis von Borna Disease Virus (BDV). Für den EHV-Antigen- und Immunkomplexnachweis wurde dieser ELISA von mir entsprechend modifiziert und auf seine Spezifität hin überprüft.

Der Aufbau des ELISAs ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Einem Fangantikörper (Anti- Maus) der direkt an den Boden der ELISA Platten geheftet wurde (Coating), folgte der EHV-1/-4 spezifische monoklonale Mausantikörper Ai11C10 (Reuter, 1995). Nach dem Auftragen der Patientenserumprobe konnte zum einen Virusantigen, zum anderen Antigen-Antikörperkomplexe detektiert werden. Das Virusantigen wurde mit einem im Kaninchen gewonnenen EHV-1/-4 spezifischen Serum und einem entsprechenden Konjugat erfasst. Die Antigen-Antikörperkomplexe wurden mit einem Enzym gekoppelten, Spezies spezifischem (anti Pferd AP) Konjugat detektiert. Mit jeder auf diese Weise zweifach untersuchten Probe konnte davon ausgegangen werden, dass (1) EHV Antigen und (2) EHV spezifische Antikörper vorhanden waren und somit die Voraussetzung für die Bildung von

Immunkomplexen gegeben war. Die Durchführung von Antigen- und Immunkomplex ELISA sollte die Sicherheit bezüglich des Immunkomplex Nachweises erhöhen.

Der ELISA wurde detailliert auf seine Spezifität hin überprüft. Als Positivkontrolle wurde gereinigtes und inaktiviertes Virus (EHV-1, Mar 87) in jedem Test mitgeführt. Ein Serum eines nachweislich EHV-1 positiven Pferdes (Fio1) diente als zusätzliche Positivkontrolle. Zur Kontrolle des Tests wurde jeweils eine Komponente des ELISAs weggelassen bzw. Seren anderer Tierarten eingesetzt:

- Beim Weglassen des Fangantikörpers fiel das Ergebnis wesentlich schwächer aus. Der Fangantikörper hatte also eine Enhancerfunktion.
- Durch das Weglassen des EHV-1/-4 spezifischen Antikörpers konnte kein positives Ergebnis erzielt werden, ebenso bei fehlendem Konjugat, bzw. beim Weglassen des polyklonalen Kaninchenserums beim Antigen ELISA.
- Gereinigtes EHV-4 Virusantigen (Stamm T252, siehe 2.4.3) ergaben ein positives Resultat, dieses fiel aber deutlich schwächer aus als bei dem gereinigten EHV-1 Antigen und war aufgrund der bekannten Kreuzreaktion des mak Ai11C10 zu erwarten.
- Mit Seren anderer Tierarten sollten eventuelle Kreuzreaktionen mit Antigen oder Antikörpern anderer Herpesviren ausgeschlossen werden. Hierzu wurde ein Serum von einem Rind mit einem erhöhten NT-Titer gegen das Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1), ein Serum eines Hundes mit einem erhöhtem NT Titer gegen das Canine Herpesvirus (CHV) und das Serum eines Schweins mit erhöhten NT Titern gegen Suid Herpesvirus 1 (SHV-1) aufgetragen. Zur Detektion wurden die entsprechenden spezies-spezifischen Konjugate verwendet.
- Es wurden Pferdeseren mit sehr niedrigen Antikörpertitern im NT gegen EHV-1 und Seren mit erhöhten NT Titern aufgetragen. Die ELISA Ergebnisse fielen unterschiedlich aus und werden im Weiteren noch diskutiert.
- Für die Negativkontrolle wurde in jedem Test eine Verdünnungsreihe ohne Serumprobe aufgetragen, aber alle anderen Komponenten des ELISAs normal verwendet.

Das gereinigte EHV-1 Antigen zeigte im Antigen ELISA mit einem entsprechend positiven (Kontroll-) Serum ein deutlich positives Resultat. Das positive Kontrollserum war sowohl im Antigen-, als auch im Immunkomplex-ELISA positiv. In den einzelnen Verdünnungsstufen war eine klare Abstufung zu erkennen. Die aufgetragenen Pferdeseren mit den verschiedenen EHV-1/-4 NT Titern lieferten sowohl positive als auch negative Resultate im ELISA. Auf die Ergebnisse von Pferdeseren wird im Folgenden noch genauer eingegangen. Die Seren von Rind, Hund und Schwein ergaben sowohl im Antigen als auch im Immunkomplex ELISA ein negatives Resultat. Die negative Kontrolle lieferte in jedem Fall ein negatives Ergebnis.

Fazit: Der Nachweis von EHV-1 (-4) Antigen und Immunkomplexen mit dem aufgebauten ELISA war möglich. Da der monoklonale Antikörper sowohl für EHV-1, als auch EHV-4 detektieren kann, konnte mit dem ELISA nicht zwischen einer EHV-1 und EHV-4 Infektion unterschieden werden. Der Nachweis von Antigen-Antikörperkomplexen (Immunkomplexen) wurde immer dann als positiv gewertet, wenn die gleiche Probe sowohl im Antigen ELISA, als auch im Immunkomplex ELISA ein positives Ergebnis zeigte. In den Fällen, wo nur Antigen oder nur Antikörper nachweisbar waren, konnte nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es zur Bildung von Immunkomplexen gekommen war.

Mit dem hier beschriebenen ELISA konnten Immunkomplexe aus Serumproben von Pferden nachgewiesen werden. Nach der Etablierung des Tests sollte nun überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem positiven Immunkomplexnachweis und einer EHV bedingten Ataxie bei Pferden gibt. Hierzu wurden 102 Serumproben von Pferden untersucht.

3.2 Antikörpertiter gegen EHV-1 im Neutralisationstest

Antikörpertiter gegen EHV-1 bei Pferden können von mehreren Faktoren abhängig sein. Durch natürliche Infektion, die weitverbreitete Impfung, aber auch durch Reaktivierung von latentem Virus reagieren bis zu 30 % der Pferde seropositiv auf EHV-1 (Crabb et al., 1995). Antikörpertiter wurden hier im Neutralisationstest (NT) bestimmt. Die Höhe der Antikörpertiter wurde bei Pferden mit neurologischer Symptomatik und zum Vergleich bei Tieren ohne neurologische Erkrankung betrachtet, um einen möglichen Zusammenhang mit der EHV bedingten Ataxie herauszuarbeiten. Die neurologische Verlaufsform der EHV-Infektion wird hauptsächlich mit EHV-1 in Verbindung gebracht, so dass hier primär EHV-1 und nicht EHV-4 im Vordergrund stand.

Es wurde von jeder Blutprobe im Neutralisationstest (s.2.4.1) der Antikörpertiter gegen EHV-1 bestimmt. Im NT wurden Titer von > 1:10 als erhöht gewertet (persönliche Mitteilung, Borchers 2005). Ein eindeutiger Nachweis einer akuten EHV-1 Infektion des Pferdes kann durch die Untersuchung von Serumpaaren im Abstand von 2-3 Wochen erfolgen. Bei der einmaligen Untersuchung einer Serumprobe ist bei Pferden mit sehr niedrigen NT-Titern und unbekannter Impfvorgeschichte bei der Interpretation der Testresultate Vorsicht geboten. Von den hier untersuchten Seren mit erhöhten Titern war in der Regel eine zweite Probe (ca. 2 Wochen später entnommen) vorhanden. Die einzelnen Titerwerte zu den entsprechenden Tieren sind im Anhang 3.1 nochmals separat aufgeführt.

Es wurden 102 Serumproben von Pferden per Neutralisationstest (NT) auf eine EHV-1 Infektion untersucht. Die Häufigkeiten von niedrigen und erhöhten NT Titern der untersuchten Proben ergab bei 30 Tieren einen deutlich erhöhten Antikörpertiter gegen EHV-1 und bei 72 Tieren einen unauffälligen EHV- 1 Titer (Tab. 9)

Tabelle 9: EHV-1 Neutralisationstiter der untersuchten Serumproben von Pferden

EHV-1 NT-Titer	N	Minimum	Maximum
Titer niedrig	72	<1:10	1:10
Titer erhöht	30	1:20	1:40
Insgesamt	102	<1:10	1:40

Von den hier vorhandenen Proben zeigten ca. ein Drittel der Pferde eine deutliche serologische Reaktion auf das equine Herpesvirus 1. Im Folgenden soll nun der Zusammenhang zwischen der NT-Titerhöhe, den zirkulierenden Immunkomplexen und dem Auftreten von Ataxien bei den hier untersuchten Pferden dargestellt werden.

3.3 EHV-1 Immunkomplexe bei Pferden mit und ohne Ataxie

Die Untersuchung von Serumproben auf zirkulierende EHV-1-Immunkomplexe sollte deren mögliche Bedeutung im Zusammenhang der EHV-1 bedingten Ataxie zeigen. Der Nachweis von zirkulierenden EHV-1 Immunkomplexen aus dem Blutserum erfolgte mit dem beschriebenen ELISA Test. Bei ELISA Werten von >0,300 galt der IC-Nachweis als gegeben. Von den untersuchten Pferden (n= 102) zeigten 57 Tiere neurologische Symptome mit dem Verdacht, dass ursächlich eine EHV-1 Infektion vorlag und 45 Tiere waren vorberichtlich ohne neurologische Ataxien. Die Daten zu den einzelnen Pferden sind nochmals in Anhang 1

dargestellt. EHV-1 Immunkomplexe konnten sowohl bei den ataktischen, als auch den nicht ataktischen Pferden nachgewiesen werden (Abb. 3):

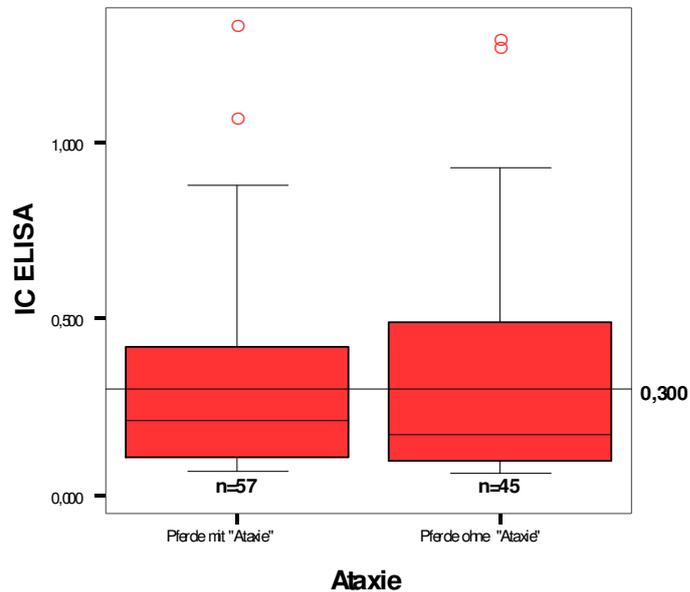


Abbildung 3: EHV-1 IC ELISA bei Ataxiepferden und Pferden ohne Ataxie. Ein positiver EHV-1 Immunkomplex Nachweis war oberhalb des Referenzwertes (0,300) gegeben. Rote Kreise geben Ausreißerwerte an.

Die Häufigkeit eines positiven bzw. negativen EHV-1 Immunkomplex Nachweises war in beiden Gruppen in etwa gleich groß, so dass sich diesbezüglich kein statistisch signifikanter Unterschied ergab. In Tabelle 10 sind die entsprechenden Zahlen dargestellt:

Tabelle 10: Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen bei Pferden mit und ohne Ataxiesymptome

		IC ELISA		Gesamt
		IC positiv	IC negativ	
Pferde mit "Ataxie"	Anzahl	23	34	57
	%	40,4%	59,6%	100%
Pferde ohne „Ataxie“	Anzahl	16	29	45
	%	35,6%	64,4%	100%

Ein positiver Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen gelingt bei 40,4 % der ataktischen Pferde und bei nur 35,6 % der nicht ataktischen Pferde, dies entspricht den in Abbildung 3 oberhalb der Referenzlinie dargestellten Tieren. In der folgenden Untersuchung wird in dieses Ergebnis noch der NT-Antikörpertiter mit einbezogen.

Ergebnisse

Die Höhe des Neutralisationstiter (NT) und eine klinische Symptomatik, welche eine Infektion mit EHV-1 nahe legte, waren ausschlaggebend für die Diagnose einer equinen Herpesvirusinfektion. Pferde der hier untersuchten Gruppe mit und ohne Ataxien wurden getrennt nach NT Titerhöhe auf zirkulierende Immunkomplexe untersucht (Abb.4).

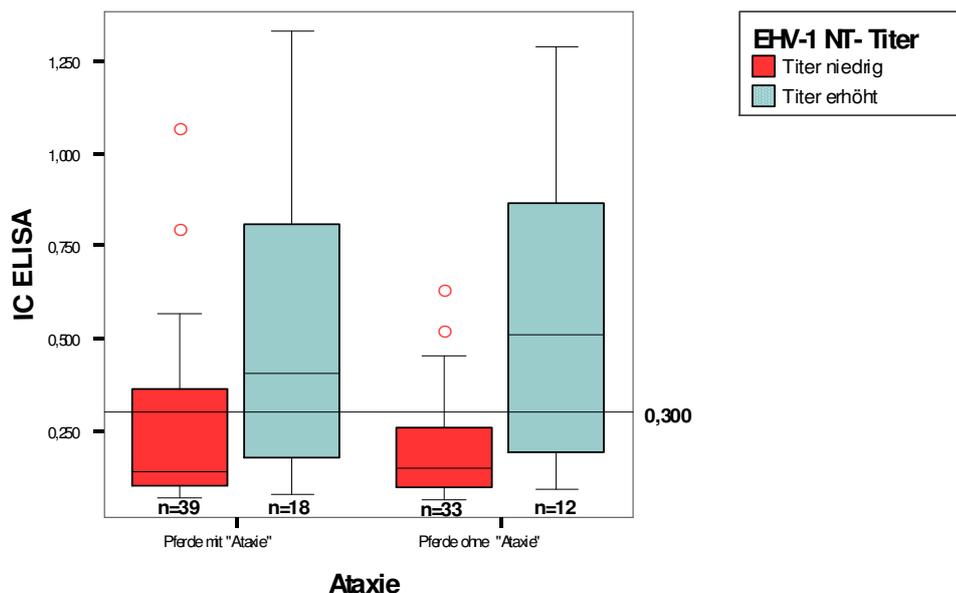


Abbildung 4: EHV-1 Immunkomplexnachweis in Abhängigkeit von der Antikörpertiterhöhe im Neutralisationstest. IC Nachweis oberhalb der Referenzlinie (0,300) positiv. Rote Kreise geben Ausreißerwerte an.

Die Höhe des NT Titers gegen EHV-1 hat einen statistisch signifikanten ($p < 0.05$) Einfluss auf den Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen im Blut. Tiere mit hohen Antikörpertitern zeigen in dieser Untersuchung einen deutlich höheren Anteil IC positiver Proben, als die Tiere mit niedrigen Neutralisationstitern. Zwischen den Pferden mit Ataxie und den Tieren ohne Ataxie besteht kein signifikanter Unterschied, d.h. in beiden Gruppen ist die Häufigkeitsverteilung in etwa gleich. In der folgenden Tabelle (Tab. 11) sind nochmals die IC positiven und IC negativen Pferde in Abhängigkeit vom NT-Antikörpertiter dargestellt:

Tabelle 11: Zirkulierende Immunkomplexe bei Ataxiepferden und Tieren ohne neurologische Symptome in Abhängigkeit von der Höhe der Antikörper im NT-Test

EHV-1 NT-Titer			IC ELISA		Gesamt
			IC positiv	IC negativ	
Titer niedrig	Pferde mit "Ataxie"	Anzahl	11	28	39
		%	28,2%	71,8%	100%
	Pferde ohne „Ataxie“	Anzahl	8	25	33
		%	24,8%	75,8%	100%
Titer erhöht	Pferde mit "Ataxie"	Anzahl	12	6	18
		%	66,7%	33,3%	100%
	Pferde ohne „Ataxie“	Anzahl	8	4	12
		%	66,7%	33,3%	100%

Es zeigt sich, dass die Werte bei den Pferden mit hohen Antikörpertitern nahezu gleich sind, unabhängig vom Vorbericht. Bei den Tieren mit niedrigen NT Antikörpertitern fällt der IC-Nachweis in der Gruppe der ataktischen Pferde mit 28,2 % häufiger positiv aus, als in der Gruppe der nicht neurologisch erkrankten Tiere (24,8 %).

Anhand meiner Untersuchungen zeigt sich, dass es aufgrund einer Infektion mit equinem Herpesvirus 1/-4 zur Bildung von Immunkomplexen im Blut kommen kann. Der Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen bei Pferden, die immunologisch mit EHV-1/-4 in Kontakt waren, ist signifikant häufiger als bei Tieren ohne einen nachweisbaren EHV-1/-4 Titer. Die Bildung von Immunkomplexen erfolgt bei Pferde mit neurologischen Symptomen („Ataxie“) und Tieren ohne neurologische Symptomatik gleich häufig.

3.4 EHV-1 Immunkomplexe bei geimpften und nicht geimpften Pferden

Die Impfung gegen EHV-1 (und EHV-4) wird nach einer Grundimmunisierung heute üblicherweise in 6-monatigem Abstand durchgeführt. Das Auftreten der neurologischen Verlaufsform der EHV-Infektion ist sowohl bei geimpften (Friday et al., 2000; Stierstorfer et al., 2002), als auch bei nicht geimpften Pferden beobachtet worden (van Maanen et al., 2001; van der Meulen et al., 2003). Es besteht der Verdacht, dass erhöhte Antikörpertiter durch Infektion, Reaktivierung oder Impfung an der Entstehung der neurologischen Verlaufsform der EHV-1 Infektion beteiligt sein könnten (Edington et al., 1986). Ein Impferfolg gegen EHV ist vor allem durch die Senkung des Infektionsdruckes innerhalb einer Population gegeben. Dies ist insbesondere bei regelmäßigen Bestandsimpfungen der Fall. Anhand der

hier vorliegenden Serumproben sollte der Zusammenhang von Impfung und der Bildung von Immunkomplexen dargestellt werden.

Es lagen von 83 Pferden Informationen zum EHV-1 (-4) Impfstatus vor, nicht jedoch zum genauen Zeitpunkt der letzten Impfung. Von den 83 Tieren waren 39 Pferde regelmäßig geimpft und 44 Pferde nicht gegen EHV-1 (-4) geimpft. Bei den geimpften Pferden erfolgte die Impfung regelmäßig laut Herstellerangaben, so dass in der Regel die letzte Impfung maximal sechs Monate zurücklag (Abb.5):

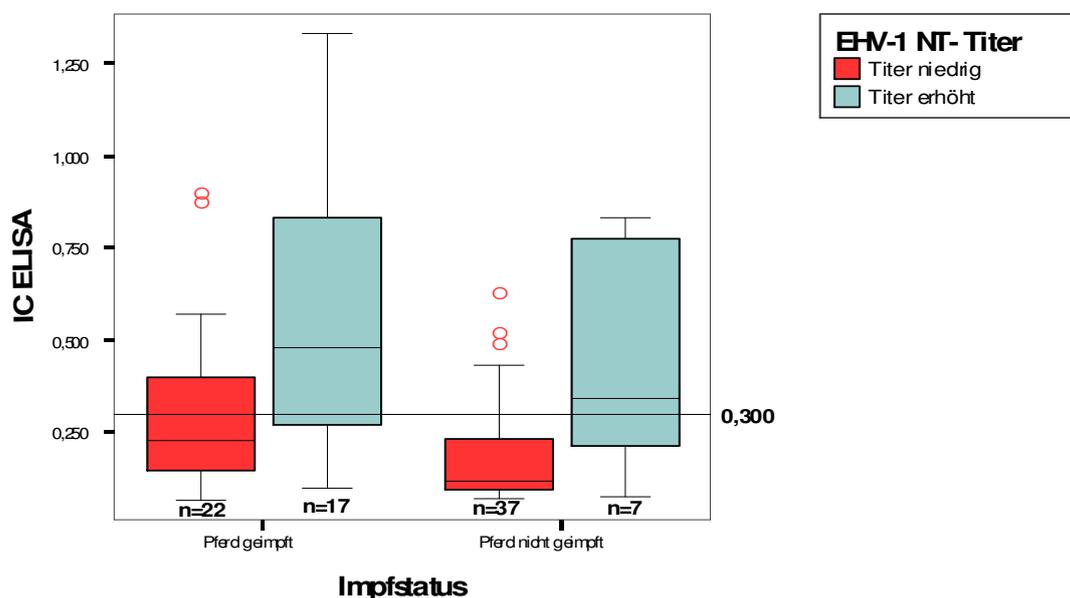


Abbildung 5: Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen bei geimpften und nicht geimpften Pferden in Abhängigkeit von der EHV-1 NT-Titerhöhe. (>0,300 = IC positiv). Rote Kreise geben Ausreißerwerte an.

Der Nachweis von EHV Immunkomplexen gelingt sowohl bei den gegen EHV-1 (-4) geimpften, als auch bei den nicht geimpften Tieren. Die Häufigkeit des positiven IC Nachweises weist jedoch signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen den Tieren mit hohen NT-Antikörpertitern und den Tieren mit niedrigen Titern auf. Hohe NT-Titer der untersuchten Proben korrelieren mit einem positiven Nachweis von IC im ELISA.

Tabelle 12: Immunkomplexe bei geimpften und nicht geimpften Pferden abhängig von der EHV-1 Titerhöhe im Neutralisationstest

EHV-1 NT-Titer			IC ELISA		Gesamt
			IC positiv	IC negativ	
Titer niedrig	Pferd geimpft	Anzahl	7	15	22
		%	31,8%	68,2%	100%
	Pferd nicht geimpft	Anzahl	8	29	37
		%	21,6%	78,4%	100%
Titer erhöht	Pferd geimpft	Anzahl	12	5	17
		%	70,6%	29,4%	100%
	Pferd nicht geimpft	Anzahl	5	2	7
		%	71,4%	28,6%	100%

Es zeigt sich, dass Pferde mit hohen Antikörpertitern unabhängig vom Impfstatus ca. gleich häufig Immunkomplexe im Blut bilden (70,6 % der geimpften zu 71,4 % der nicht geimpften Pferde). Bei den Pferden mit niedrigen EHV-1 NT Titern gelingt der IC-Nachweis bei nur 21,6 % der Tiere, während bei den geimpften noch 31,8 % zirkulierende Immunkomplexe aufweisen. Hier sind also bei den geimpften Tieren häufiger IC im Blut zu finden als bei den nicht geimpften Pferden. Dieser geringfügige Unterschied ist jedoch statistisch nicht relevant.

Zirkulierende Immunkomplexe können in dieser Untersuchung am häufigsten bei den regelmäßig geimpften Tieren, mit zum Zeitpunkt der Probenentnahme hohen EHV-1 Antikörpertitern gezeigt werden. Nicht geimpfte Pferde mit niedrigen NT Titern haben nur in wenigen Fällen nachweisbare Immunkomplexe im Blut.

3.5 EHV-1 Immunkomplexe in Abhängigkeit vom Alter der Tiere

EHV-1 ist in der Pferdepopulation weit verbreitet. Im Laufe eines Lebens kommen die meisten Pferde mehrfach durch natürliche Infektion, Reaktivierung aus dem Latenzstadium oder durch Impfung immunologisch mit equinen Herpesviren in Kontakt. Die Zusammenhänge zwischen dem Alter der Tiere und dem Nachweis von EHV bedingten Immunkomplexen sollte anhand der hier vorliegenden Proben untersucht werden.

Von 81 Tieren lagen Angaben zum Alter vor, wobei sich der Altersbereich von 1-24 Jahren erstreckte. Es wurden drei Altersbereiche gebildet: < 3 Jahre alte Pferde, 3-9-jährige und über 10-jährige. Die Gruppe der < 3-jährigen entspricht immunologisch noch wenig mit EHV-1 in

Kontakt gekommenen Tieren. Bei den 3-9-jährigen Pferden ist ein Kontakt mit EHV durch Infektion (Pferdekontakt z. B. durch Teilnahme an Pferdesportveranstaltungen) und Impfung wahrscheinlich. Über 10 Jahre alte Pferde haben ebenfalls eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Erregerexposition und sind im Vergleich zu den anderen Gruppen am häufigsten geimpft. Von Interesse wären noch Tiere von unter 6 Monaten gewesen, da die Pferde in diesem Alter üblicherweise noch nicht geimpft werden. In dieser Altersgruppe standen jedoch nicht genug Tiere zur Verfügung. Bei den hier untersuchten Altersgruppen ergab sich folgende Verteilung bezüglich des IC-Nachweises (Abb. 6)

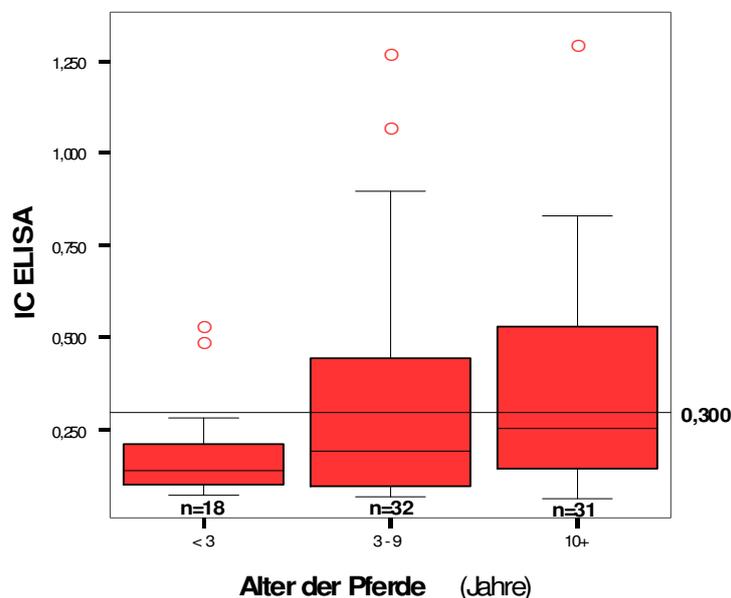


Abbildung 6: Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen in den verschiedenen Altersgruppen. Bei Werten von über 0,300 galt der Immunkomplexnachweis als positiv. Es zeigt sich eine Zunahme der nachweisbaren Immunkomplexe mit dem Alter der Pferde. Rote Kreise geben Ausreißerwerte an.

In der Altersgruppe der unter 3 Jahre alten Tiere konnte in nur 2 Fällen EHV-1 Immunkomplexe im Serum per ELISA nachgewiesen werden. In den beiden anderen Altersgruppen nimmt die Häufigkeit des IC Nachweises mit dem Alter der Pferde zu. Der Unterschied zwischen den 3-9 jährigen und den über 10 Jahre alten Pferden ist nur noch gering und statistisch nicht relevant (Tab. 13):

Tabelle 13: Der Nachweis von Immunkomplexen im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Altersgruppen der hier untersuchten Pferde

			IC ELISA		Gesamt
			IC positiv	IC negativ	
Alter der Pferde	< 3	Anzahl	2	16	18
		%	11,1%	88,8%	100%
	3 - 9	Anzahl	13	19	32
		%	40,6%	59,3%	100%
	10+	Anzahl	15	16	31
		%	48,4%	51,6%	100%

Die Daten zeigten, dass bei der Gruppe der über 10 Jahre alten Pferde bei 48,4 % zirkulierende Immunkomplexe nachzuweisen sind im Vergleich zu nur 40,4% der Gruppe der 3-9 jährigen Tiere. Erwartungsgemäß ist es bei den ganz jungen Pferden noch kaum zur Bildung von IC gekommen (11,1%).

Der EHV-Immunkomplexnachweis nimmt mit dem Alter der Tiere zu. Der größte Schritt erfolgt zwischen den sehr jungen, also immunologisch noch wenig mit dem Erreger in Kontakt gekommenen Tieren und den über 3 Jahre alten Pferden. Ab einem Alter von ca. 3-4 Jahren kann es durch die Teilnahme an Sportveranstaltungen (Rennen, Turniere etc.) zu einer erhöhten Erregerexposition kommen. Des Weiteren sind die Pferde in der Regel zu diesem Zeitpunkt schon wiederholt gegen EHV-1/4 geimpft.

3.6 Jahreszeitenverteilung, Rasse und Geschlecht

Es wird zum einen von einem gehäuften Auftreten von EHV-1 bedingten Ataxiefällen im Zusammenhang mit Geburten/ Aborten berichtet, also am Anfang des Jahres und im Frühjahr (Jackson et al., 1971; Greenwood et al., 1980; Chowdhury et al., 1986; Studdert et al., 2003). In anderen Untersuchungen können Erkrankungsfälle während des ganzen Jahres auftreten (Wilson, 1997).

Ein vermehrtes Vorkommen von Pferden mit hohen EHV-1 Neutralisationstitern in einem bestimmten Monat konnte bei den hier untersuchten Fällen nicht beobachtet werden (Tab. 14):

Tabelle 14: Zeitpunkt der Blutprobenentnahme bei den Pferden mit hohen Antikörpertitern gegen EHV-1 im Neutralisationstest

Monat der Probennahme	Anzahl der Tiere (hohe NT Titer), n= 30	Prozent
Januar	3	10,0
Februar	4	13,3
April	1	3,3
Mai	1	3,3
Juni	6	20,0
Juli	1	3,3
August	4	13,3
September	6	20,0
Oktober	2	6,7
November	1	3,3
Dezember	1	3,3

In den Monaten Juni und September traten die meisten Tiere mit hohen EHV-1 NT Titern auf. Eine statistisch relevante Häufung im Frühjahr im Zusammenhang mit EHV-1 Aborten konnte hier nicht beobachtet werden.

Die hier untersuchten Pferde verteilten sich wie folgt auf die Rassen Vollblut, Warmblut, Pony und Sonstige („Sonstige“ = keine Rasse bekannt) (Tab. 15)

Tabelle 15: Verteilung der hier untersuchten Pferde auf die einzelnen Rassen

	Häufigkeit	Prozent
Warmblut	37	36,3
Vollblut	21	20,6
Pony	5	4,9
Sonstige	39	38,2

Die Zugehörigkeit einer bestimmten Rasse der hier untersuchten Pferde (Vollblut, Warmblut, Pony, Sonstige) zeigte anhand der in Anhang 1 aufgeführten Daten keinerlei Zusammenhang mit dem Auftreten von Ataxien bzw. mit dem Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen.

Von 97 Pferden lagen Angaben zum Geschlecht (männlich; weiblich) der Tiere vor. Es konnten sowohl bei weiblichen, als auch bei männlichen Pferden EHV-1 bedingte

Immunkomplexe detektiert werden. Tabelle 16 zeigt die Verteilung der nachweisbaren IC auf die männlichen und weiblichen Pferde:

Tabelle 16: Immunkomplexnachweis bei männlichen und weiblichen Pferden

			IC ELISA		Gesamt
			IC positiv	IC negativ	
Geschlecht des Tieres	männlich	Anzahl	15	33	48
		%	31,3%	68,8%	100%
	weiblich	Anzahl	21	28	49
		%	42,9%	57,1%	100%

Weiblichen Pferde bilden mit 42,9 % im Vergleich zu 31,3 % der männlichen Tiere häufiger zirkulierende Immunkomplexe. Der Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant.

Über ein vermehrtes Vorkommen der EHV-1 bedingten Ataxie bei Stuten im Zusammenhang mit der Trächtigkeit und im Anschluss an das Verfohlen wird jedoch berichtet (Bitsch et al., 1971; Jackson et al., 1977; Platt et al., 1980; McCartan et al., 1995).

3.7 Nachweis von EHV-1 Antigen im Western Blot aus PEG Präzipitaten

Das Ziel dieser Untersuchung war der Nachweis von EHV-1 Virusantigen aus Immunkomplexen. Der Western Blot bietet den Vorteil, die nachgewiesenen Virusproteine elektrophoretisch auftrennen zu können, um so deren Größe genauer zu bestimmen. Stichprobenartig wurden aus den 102 Seren von Pferden 34 Proben ausgewählt (Tab. 17), die im ELISA auf das Vorhandensein von EHV spezifischen Immunkomplexen untersucht worden waren.

Blutserumproben von 34 Pferden wurden mit Polyethylenglykol (PEG) präzipitiert (s. 2.9.1). Es wurden sowohl Serumproben von Tieren mit einem hohen EHV-1 Antikörpertiter (NT) als auch Tiere mit niedrigen EHV-1 NT Titern verwendet. Die untersuchten Seren stammten von Tieren mit dem Verdacht auf EHV bedingte Ataxie und zur Kontrolle auch von Pferden ohne vorberichtlich neurologische Erkrankung.

Die Proben wurden in SDS PAGE Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Auftrennen erfolgte die Übertragung im Semi-Dry Verfahren auf eine PVDF-Membran. Der Immuno Blot wurde dann wie beschrieben (s. 2.9.4) mit dem EHV spezifischen Kaninchenserum MV4 bzw. dem monoklonalen Antikörper Ai11C10 durchgeführt. Ein weiteres Gel mit den

gleichen Proben wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung mit Silbernitrat gefärbt. Die sehr sensitive Silberfärbung ermöglichte eine Beurteilung über die erfolgreiche Elektrophorese und konnte mit den Resultaten des Western Blots verglichen werden (Silbernitrafärbung nicht gezeigt). Für den Blot in Abbildung 7 wurde als erster Antikörper Ai11C10, ein EHV-1/-4 spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet. In Abbildung 8 diente das EHV-1/-4 spezifische polyklonale Kaninchenserum MV4 als erster Antikörper. Während der monoklonale Antikörper noch spezifischer einzelne EHV Proteine nachweisen konnte, konnte mit dem polyklonalen Serum ein breiteres Spektrum von Virusproteinen detektiert werden.

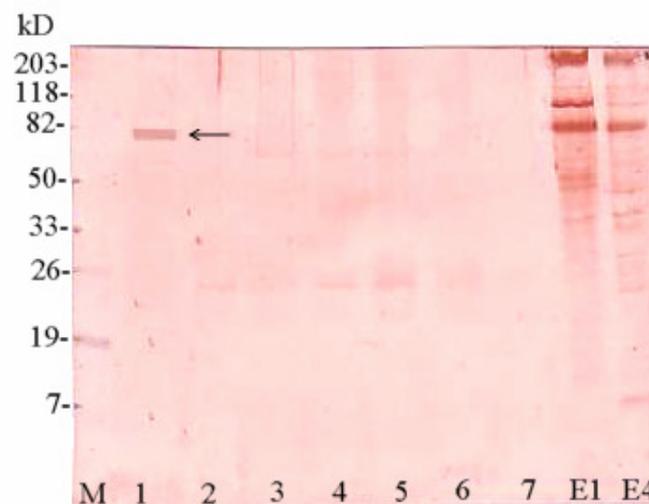


Abbildung 7: Western Blot, auf den Spuren 1-7 wurden präzipitierte Serumproben aufgetragen. Es wurde ein EHV-1 und EHV-4 spezifischer monoklonale Antikörper (Ai11C10) verwendet. Nur Probe Nr.1 (Pferd Nr. 34) zeigte eine eindeutige Bande. Als positive Kontrollen wurden gereinigtes EHV-1 Virus (E1, Mar87) und EHV-4 Virus (E4, T252) aufgetragen. M= Biorad[®] Board Range Marker

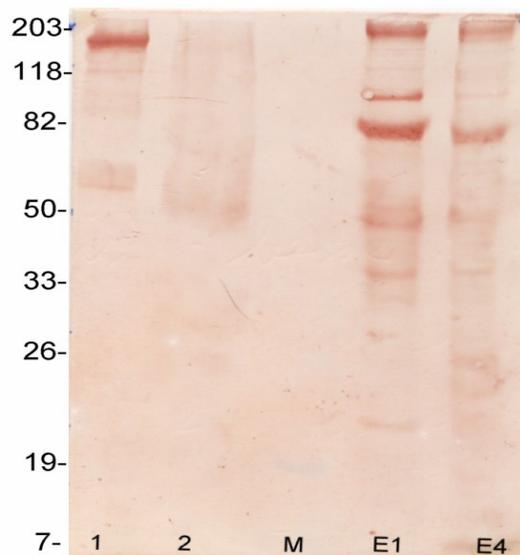


Abbildung 8: Western Blot, Proben 1 und 2 sind PEG- präzipitierte Serumproben, von denen Nr.1 (Pferd Nr.15) mehrere Banden zeigt. Als erster Antikörper diente das polyklonale Kaninchenserum MV4. Die Signale von Probe Nr.2 sind unspezifisch. Dazu wurde ein Marker (Biorad) und gereinigtes EHV-1 und EHV-4 Virus aufgetragen (E1, E4).

In der Abbildung 7 ist an der Position 1 die Probe von Pferd Nr. 34 aufgetragen. Es ist eine deutliche Bande (Größe 80 kD) zu erkennen, welche der Referenzbande von EHV-1 entspricht. In der zweiten Abbildung (Nr.8) sind an Position 1 die Probe von Pferd Nr.15 aufgetragen. Hier konnten mit dem polyklonalen Serum MV4 mehrere EHV-1 (-4) spezifische Banden dargestellt werden.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse des Western Blots und die dazugehörigen Resultate aus dem IC ELISA sowie die EHV-1 Neutralisationstiter aufgeführt. Zusätzlich ist dargestellt, ob die Pferde vorberichtlich neurologisch erkrankt waren („Ataxie“).

Tabelle 17: Resultate des Antigennachweises im Western Blot im Vergleich mit dem IC-Nachweis im ELISA

Tier Nr.	Neutralisations Titer EHV-1	EHV-1 Immunkomplexe	Ataxie	Western Blot
6	<1: 10	-	+	-
7	<1: 10	-	+	-
8	1: 40	-	+	+
9	<1: 10	-	+	-
14	1: 20	+	+	+
15	1: 20	+	+	+
16	<1: 10	-	+	-
17	<1: 10	+	+	-
18	1: 10	-	+	-
19	<1: 10	-	+	-
28	1: 20	-	+	-
29	1: 20	+	+	-
30	1: 20	+	+	-
31	1: 20	-	+	-
32	<1: 10	+	+	-
33	1: 20	+	+	-
34	1: 20	+	+	+
35	1: 20	+	+	-
36	1: 20	+	+	-
37	<1: 10	-	+	-
38	<1: 10	-	+	-
39	1: 10	-	+	-
40	1: 10	+	+	-
41	<1: 10	+	+	-
59	1: 20	-	-	-
60	1: 10	-	-	-
61	1: 10	+	-	-
62	<1: 10	-	-	-
63	<1: 10	-	-	-
64	<1: 10	-	-	-
65	<1: 10	-	-	-
69	1: 20	-	-	-
70	1: 20	+	-	-
71	1: 10	-	-	-

+ = Nachweis positiv

- = Nachweis negativ

Aus 4 von 34 im Western Blot Verfahren auf EHV-1 (-4) Antigen untersuchten Proben gelang der Antigennachweis (in Tab.17 grau unterlegt). Tabelle 17 zeigt, dass das Ergebnis im Western Blot übereinstimmt mit hohen EHV-1 NT Antikörpertitern. Der positive IC-Nachweis korreliert in 3 Fällen mit den Resultaten des Western Blots. Auch zeigen alle 4 im Western Blot positiven Pferde Ataxien.

Im Western Blot konnte in 3 Fällen mit dem polyklonalen Kaninchenserum MV4 EHV-spezifische Banden nachgewiesen werden. Es waren immer mehrere Banden (3-4) zu sehen. Mit dem monoklonalen Antikörper Ai11C10 konnte in einem Fall eine EHV-1 spezifische Bande (Einzelbande) dargestellt werden (Abb. 7, Nr. 1). Diese Bande hatte eine Größe von 80 kD und entsprach damit der in Untersuchungen von Reuter (1995) ermittelten Größe für diesen monoklonalen Antikörper im Western Blot. Von Proben mit niedrigem NT Titer gegen EHV-1 konnten keine spezifischen Banden im Western Blot produziert werden. In einigen Fällen konnten schwache Banden in einer Größe von ca. 50 und 29 kD belegt werden. Diese entsprachen wahrscheinlich der schweren und leichten Kette des ersten Antikörpers (nicht gezeigt).

Der Western Blot ist eine neben dem ELISA zusätzliche Möglichkeit EHV-1 Antigen aus Serumproben nachzuweisen. Die Auftrennung der Proteine ermöglicht dabei diese EHV-1 (-4) zuzuordnen und deren Größe zu bestimmen. Der positive Nachweis im Western Blot Verfahren gelang in meinen Untersuchungen nur bei wenigen Proben (4 aus 34). Diese Resultate müssen in der Diskussion bewertet werden.

3.8 EHV-1/-4 Virus DNA Nachweis aus PEG präzipitierten Serumproben

Zur Klärung, ob in den zirkulierenden Immunkomplexen Viruspartikel mit Nukleinsäuren oder infizierte Zellreste vorliegen, wurden die 34 für die Western Blot Untersuchung PEG präzipitierten Serumproben auch per PCR untersucht. Dazu wurde jeweils ein Volumen von 2µl und 10µl pro Probe für die PCR eingesetzt. Jede Probe wurde sowohl in der EHV-1 (ICP0) PCR als auch in der EHV-4 (gB) PRC getestet.

Es konnte in keinem Fall ein positives Ergebnis aus diesen Proben in der PCR erzielt werden. Auch die 4 im Western Blot positiven Proben waren hier negativ. Zu einem der PEG-Präzipitate wurde 2 µl EHV-1 DNA (gesamt DNA Konzentration 20 µg/µl) hinzugefügt um zu kontrollieren, ob PEG Reste oder andere Reagenzien die DNA zerstört haben könnten. Diese Probe war in der EHV-1 PCR positiv.

3.9 Nachweis von EHV-1 und -4 DNA in *post mortem* Geweben von adulten Pferden per nPCR

Organmaterial von Pferden die experimentell (intranasal) mit EHV-1 infiziert wurden (K.Smith, Newmarket,UK), sowie Material von natürlich infizierten Tieren die mit dem Verdacht auf eine Herpesvirus bedingte neurologische Genese euthanasiert oder gestorben waren (Tierpathologie, FU-Berlin), wurde mit der nPCR auf das Vorhandensein von spezifischer EHV-1 und EHV-4 Virus DNA untersucht. Insbesondere die Frage nach dem Gewebetropismus dieser Viren stand hier im Vordergrund der Untersuchungen. Weiterhin wurden Proben von frisch geschlachteten Pferden untersucht, bei denen kein Hinweis auf eine EHV-1/-4 Infektion bestand. Von besonderem Interesse waren dabei Proben aus verschiedenen Abschnitten des Rückenmarks, aus Teilen des Gehirns, wie z. B. Riechhirn, Stammhirn, Kleinhirn und Großhirn. Soweit vorhanden, wurden auch periphere Nerven und Ganglien mit einbezogen. Um den möglichen Infektionsweg verfolgen zu können und Aussagen über die Ausbreitung der Infektion treffen zu können, wurden soweit vorhanden, auch Gewebe anderer Organe wie der Nasenschleimhaut, Lunge, bronchiale Lymphknoten, Leber und Milz untersucht.

Für die paretisch-paralytische Verlaufsform der EHV-Infektion wird in den meisten Fällen EHV-1 verantwortlich gemacht. EHV-4 konnte in diesem Kontext seltener gefunden werden. Mit der sehr sensitiven und entsprechend typspezifischen nested Polymerase Kettenreaktion (s.2.6.1) wurden die Gewebeproben auf das Vorhandensein von EHV-1 DNA bzw. EHV-4 DNA untersucht. Stichprobenartig wurde eine PCR zur Kontrolle der DNA-Präparation durchgeführt, bei der das Gen eines in allen eukaryotischen Zellen vorkommenden Proteins (β -Aktin) nachgewiesen wurde.

Es wurden 49 Proben von neurologisch erkrankten Pferden (Tab.18) untersucht. Es standen unterschiedlich viele Gewebe pro Tier zur Verfügung. Von den Schlachthofpferden wurden 63 Proben untersucht. Eine Übersicht aller hier in der PCR getesteten Proben ist in Tabelle 18 gezeigt, die genauen Angaben (Gewebeart, PCR Ergebnis etc.) zu den einzelnen Pferden sind in Anhang A2 dargestellt.

Tabelle 18: Übersicht PCR Ergebnisse der untersuchten ZNS-Gewebe von Pferden

Anzahl Tiere	Herkunft	Probenart	EHV-1	EHV- 4
6 x Exp	England	Paraffin	2 x positiv	-
43 x Nat	Pathologie	Frisch und Paraffin	19 x positiv	1x positiv
63 x Nat	Schlachthof	Frisch	-	2 x positiv

Exp= experimentell infiziert, Nat= natürlich infiziert, Paraffin= Probe in Paraffin eingebettet

Von den 49 untersuchten Proben der Pferde mit Verdacht auf die neurologische Form der Herpesinfektion konnte bei 21 Proben EHV-1 DNA nachgewiesen werden. Diese positiven Proben stammten von 5 unterschiedlichen Tieren, von denen in den meisten Fällen mehrere Organgewebe positiv waren. Zu den positiven Geweben gehörten Rückenmark, Bulbus olfactorius, Kleinhirn, Großhirn und weitere (Anhang A2). Die EHV-1 positiven Tiere Nr.1 und Nr. 6 waren experimentell infiziert. Bei den übrigen Pferden handelt es sich um natürlich infizierte Tiere. Der EHV-1 Nachweis gelang sowohl aus frischem Gewebe, wie auch aus in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten. Bei Tier Nr.11, einem akut ataktischen Pferd, das nach dem Festliegen euthanasiert werden musste, gelang der EHV-1 Nachweis sowohl in der Nasenschleimhaut, der Lunge und den entsprechenden Lymphknoten als auch im ZNS (Bulbus olfactorius, Rückenmark) (Abbildung 9). Es konnte bei diesem Tier auch EHV-4 DNA in der Nasenschleimhaut (Doppelinfektion) nachgewiesen werden. Die EHV-4 Nachweise waren bei allen anderen Tieren negativ. Bei Tier Nr.18 einem ebenfalls aufgrund von Ataxien euthanisiertem Pferd waren zudem mehrere Gewebe aus dem ZNS-EHV-1 positiv in der PCR.

In Geweben, die von Tieren am Schlachthof entnommen wurden, konnte in keinem Fall EHV-1 DNA nachgewiesen werden, aber bei zwei Tieren war der EHV-4 DNA Nachweis in der Nasenschleimhaut positiv.

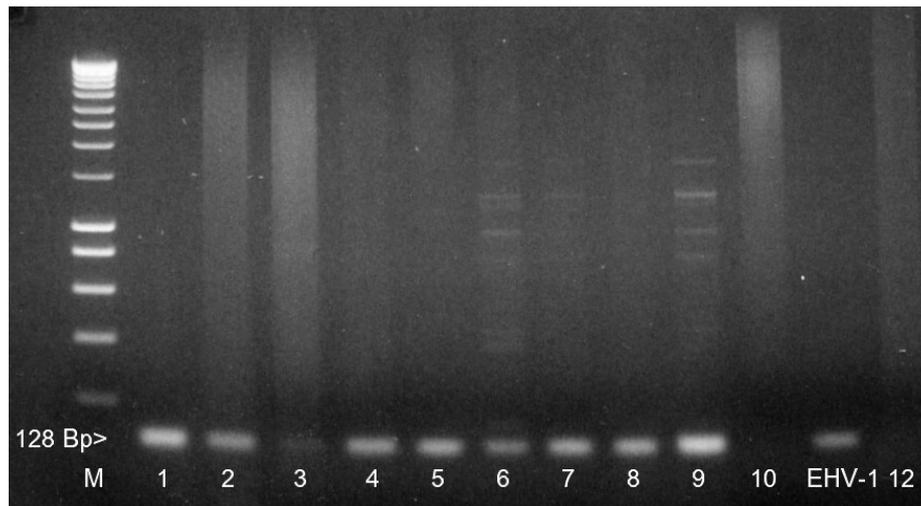


Abbildung 9: PCR Ergebnis von Pferd Nr.11: Nasenschleimhaut (1), Bulbus olfactorius (2), Cortex frontalis (3), Rückenmark cervical (4), Rückenmark lumbal (5), Lymphknoten Kopf (6), Lunge (7), Lymphknoten Lunge (8), Konjunktiva (9), Präparationskontrolle (10), EHV-1 positiv Kontrolle, PRC negativ Kontrolle (12).

In den Untersuchungen zum Gewebetropismus von EHV-1/-4 in verschiedenen Geweben neurologisch erkrankter Pferde gelang der EHV-1 Nachweis in mehreren Fällen. Diese Tiere waren experimentell bzw. natürlich mit EHV-1 infiziert. Der Nachweis von EHV-4 in neurologischen Geweben gelang in keinem Fall, lediglich bei einem Tier konnte EHV-4 in der Nasenschleimhaut detektiert werden. Die Resultate der untersuchten Tiere vom Schlachthof ergaben keinen Nachweis von EHV-1 und in zwei Fällen einen positiven EHV-4 Nachweis in Proben aus der Nasenschleimhaut.

3.10 Nachweis von EHV-1 DNA in ZNS Geweben künstlich infizierter Mäuse per *in situ*-Hybridisierung (ISH)

Aus archivierten, in Paraffin eingebetteten murinen Geweben aus früheren Infektionsstudien (Gosztanyi et al. 2008) wurde EHV- 1 DNA mittels *in situ*-Hybridisierung lokalisiert. Mit der *in situ*-Hybridisierung kann nicht nur der Virus DNA Nachweis erfolgen, sondern auch Aussagen über die Lokalisation des Virus in einem bestimmten Gewebe bzw. Zellen getroffen werden. Mit dem Mausmodell konnten zudem potenzielle Unterschiede im Gewebetropismus von EHV- 1 zum natürlichen Wirt Pferd herausgearbeitet werden.

Für die *in situ*-Hybridisierung (s.2.7.4) wurden in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte aus verschiedenen Abschnitten vom Gehirn und der Nasenschleimhaut genutzt. Es wurden bei jeder ISH nicht infizierte Mausgewebe als *negativ* Kontrolle und ein EHV-1 positiver

Ergebnisse

Lungenschnitt (Pferd) als *positiv* Kontrolle mitgeführt. Als Sonde diente eine Digoxigenin markierte EHV-1 gesamt DNA Sonde (s. 2.7.2). Zusätzlich zur *in situ*-Hybridisierung wurden die jeweiligen Gewebeschnitte auch in der EHV-1 nPCR überprüft. Für die PCR wurden 2-3 der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte aufbereitet (s. 2.5.2) und die auf diese Weise isolierte Virus DNA konnte in der EHV-1 ICP0 PCR nachgewiesen werden. Die große Sensitivität der PCR ermöglichte den Nachweis auch aus sehr kleinen Gewebeproben. Einen Überblick über die untersuchten Mausgewebe, sowie die Resultate der *in situ*-Hybridisierung und PCR gibt Tabelle 19:

Tabelle 19: Untersuchte Mausgewebe in der *in situ*-Hybridisierung und EHV-1 PCR

Probe Nr.	Gewebe	<i>In situ</i> -Hybridisierung	EHV-1 nPCR
MG 10	Nasenschleimhaut	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
	Bulbus olfactorius	-	-
	Frontale Rinde	-	-
	Ganglion trigeminale	-	-
MG 11	Nasenschleimhaut	-	-
	Bulbus olfactorius	-	<i>positiv</i>
	Frontale Rinde	-	-
	Ganglion trigeminale	-	-
	Lunge	-	-
MG 12	Nasenschleimhaut	-	-
MG 13	Frontale Rinde	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
MG 14	Nasenschleimhaut	-	-
	Frontale Rinde	-	<i>positiv</i>
MG 15	Lunge	-	<i>positiv</i>
MG 16	Lunge	-	-
MG 17	Bulbus olfactorius	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
MG 18	Frontale Rinde	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
MG 19	Bulbus olfactorius	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
	Frontale Rinde	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
Kontrolltiere:			
MG 20	Nasenschleimhaut	-	-
	Bulbus olfactorius	-	-
	Ganglion trigeminale	-	-
MG 21	Nasenschleimhaut	-	-
	Bulbus olfactorius	-	-

MG= Mausgewebe, Kontrolltiere= nicht infizierte Mäuse, - = negativ

Positive ISH Signale stellten sich in Form blau-lila gefärbter Zellen dar. Abbildung 10 zeigt ein Schnitt eines infizierten Mausgehirns (10 A) im Vergleich zu einem nicht infizierten Kontrolltier (10 B). Die Abbildung 11 und 12 zeigen weitere positive EHV-1 Hybridisierungssignale in Gehirngewebe infizierter Mäuse:

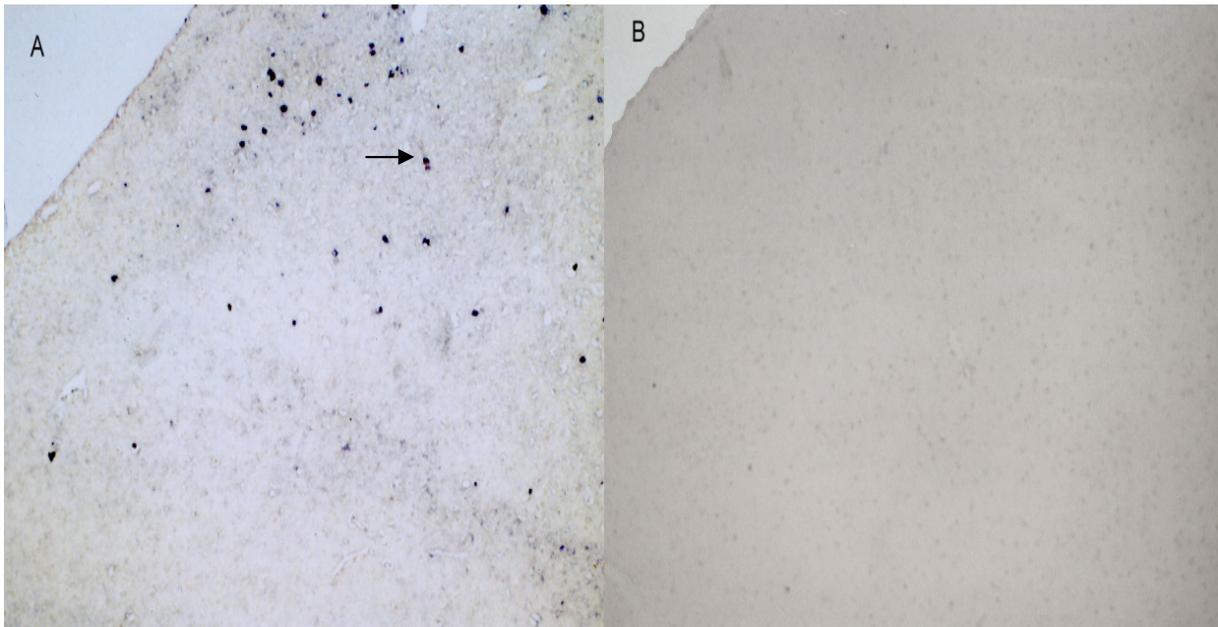


Abbildung 10: *In situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin- markierten EHV-1 gesamt DNA Sonde. (A) EHV-1 positives Mausgehirn, (B) nicht infiziertes Kontrolltier. Der Pfeil zeigt beispielhaft eine EHV-1 positive Zelle. Vergrößerung x 50

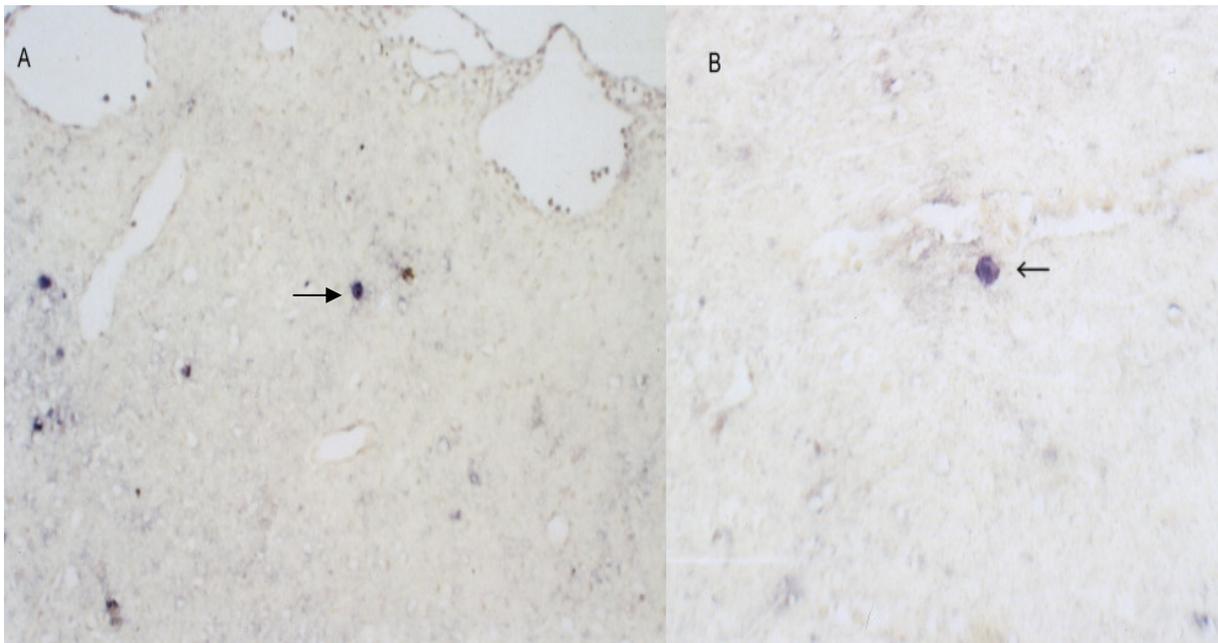


Abbildung 11: *In situ*-Hybridisierung künstlich mit EHV-1 infizierter Mäuse. Positive Signale (Pfeile) in neuronalen Zellen des Mausgehirns. EHV-1 gesamt DNA Sonde. A= Vergrößerung x 50, B= Vergrößerung x 100

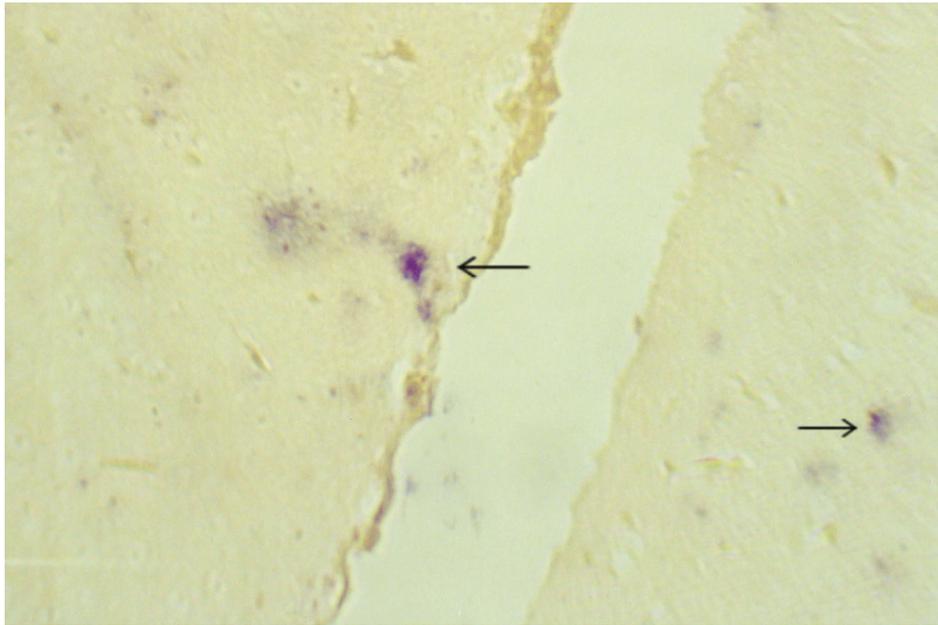


Abbildung 12: Gewebeschnitt eines infizierten Mausgehirns. Positive Hybridisierungssignale (Pfeile) in Neuronen mit einer EHV-1 gesamt DNA Sonde. Vergrößerung x 100

Sowohl in der Nasenschleimhaut (Mausgewebe (MG) 10) als auch in Teilen des Gehirns (MG 13, 14, 17, 18, 19) waren positive Hybridisierungssignale zu finden. Betroffene Zellen waren die verschiedenen Zellen des Nervengewebes, wie Neurone, Astrozyten, Gliazellen. Ein spezifischer Endotheliotropismus wie in den ISH-Schnitten der Pferdewebe konnte nicht beobachtet werden. Durch den langen und mit vielen Wasch- und Bearbeitungsschritten verbundenen Verlauf der *in situ*-Hybridisierung konnten einige Gewebe nur unzureichend beurteilt werden, da es zu Ablösungserscheinungen und Verfärbungen, insbesondere von morphologisch sehr lockeren Geweben, gekommen war. Alle in der *in situ*-Hybridisierung positiven Gewebe waren auch in der EHV-1 PCR positiv. Bei einigen Geweben konnte in der PCR ein positives Ergebnis erzielt werden, die *in situ*-Hybridisierung war jedoch negativ (s.Tab. 19).

In den EHV-1 infizierten Mausgeweben kann mit der ISH EHV-1 DNA nachgewiesen werden. In den nicht infizierten Kontrolltieren waren diese Signale nicht zu finden (Abbildung 10 B). Betroffene Zellen des ZNS sind Neurone, Astrozyten und Gliazellen (Abbildung 10 A, 11, 12). Positive Signale in Endothelzellen kleiner Blutgefäße konnten nicht gefunden werden. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der EHV-1 PCR einiger Mausgewebe. Eine Korrelation der PCR und ISH Ergebnisse besteht insofern, dass alle in der ISH als EHV-1 positiv bewerteten Proben auch in der PCR ein positives Ergebnis aufwiesen. Bei einigen Proben gelang der EHV-1 DNA Nachweis mit der PCR, nicht jedoch mittels der ISH.

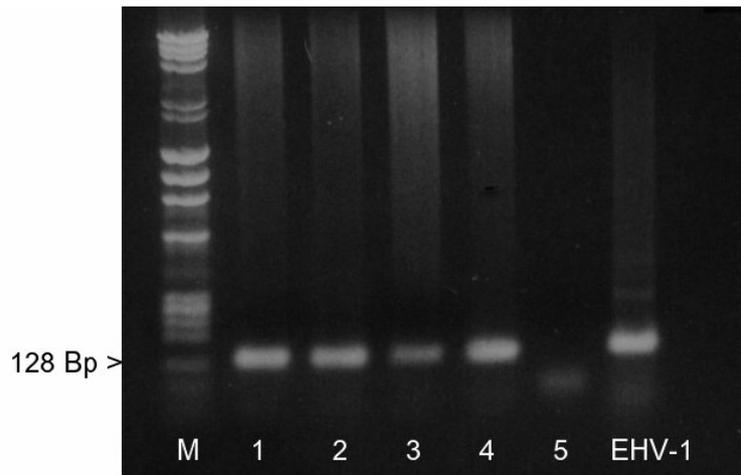


Abbildung 13: EHV-1 ICP0 nPCR der Mausgewebe MG 17 (1), MG 18 (2) MG 19 (3+4). Bei den EHV-1 positiven Proben ist ein 110 Bp großes DNA Fragment amplifiziert worden. Negativ Kontrolle (5) und EHV-1 positiv Kontrolle. M= Marker Φ X 174RF DNA/ Hae III. Die Elektrophorese wurde auf einem 1,5% horizontalem Agarosegel durchgeführt.

Die ISH von EHV-1 infizierten neuronalen Mausgeweben zeigte im Hinblick auf den Gewebetropismus Unterschiede zu den untersuchten Gewebeproben des Pferdes. Einen ausgeprägten Endotheliotropismus von EHV-1 konnte in den hier untersuchten Mausgeweben nicht festgestellt werden. Diese Unterschiede zu den Geweben des eigentlichen Wirtes Pferd sind zu diskutieren.

3.11 Nachweis von EHV-1 DNA in ZNS Geweben experimentell und natürlich infizierter Pferde per *in situ*-Hybridisierung

Ziel dieser Untersuchung war es, den postulierten Endotheliotropismus von EHV-1 im equinen Wirt zu verifizieren und mehr über den Zelltropismus von EHV-1 in neurologischen Geweben zu erfahren. Damit sollten mögliche Rückschlüsse auf den Infektionsweg des Virus gezogen werden. Die Lokalisation von EHV-1 in bestimmten Geweben lässt sich mit der *in situ*-Hybridisierung bestimmen. Hier sollten zudem mögliche Unterschiede zu den per ISH untersuchten Mausgeweben dargestellt werden.

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von experimentell (intranasal) mit EHV-1 infizierten Pferden und Paraffinschnitte von natürlich neurologisch erkrankten Pferden mit dem Verdacht auf eine herpesbedingte Pathogenese wurden mit der *in situ*-Hybridisierung und mittels nPCR auf das Vorhandensein von EHV-1 DNA untersucht. Es wurde eine digoxigenin-markierte EHV-1 Gesamt-DNA-Sonde verwendet. Da in seltenen Fällen auch EHV-4 als Erreger der

neurologischen Verlaufsform in Betracht kommt (Thein et al., 1988), wurde an einer Auswahl von Schnitten auch eine EHV-4 DNA Sonde in der ISH verwendet. Als Kontrolle diente ein EHV-1 positiver Lungen- und Leberschnitt. Die in der *in situ*-Hybridisierung untersuchten Gewebeschnitte wurden zusätzlich per PCR auf das Vorhandensein von EHV-1 und/oder EHV-4 DNA analysiert. Hierzu erfolgte zunächst die DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten (2.5.2) und im Anschluss der Virus DNA Nachweis mit der EHV-1 bzw. EHV-4 PCR.

Die verwendeten Gewebe und die Ergebnisse der Hybridisierung und PCR sind in Tabelle 20 zusammengefasst:

Tabelle 20: Untersuchte Pferdegewebe in der *in situ*-Hybridisierung mit einer EHV-1 Sonde und per PCR

Pferd Nr.	Gewebe	Infiziert	ISH	EHV-1 PCR	EHV- 4 PCR
1	Rückenmark	Exp	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>	-
2	Rückenmark	Exp	-	-	-
3	Rückenmark	Exp	-	-	-
4	Rückenmark	Exp	-	-	-
5	Rückenmark	Exp	-	-	-
6	Gehirn	Exp	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>	-
12	Rückenmark cer.	Nat	-	<i>positiv</i>	-
12	Rückenmark lum.	Nat	-	<i>positiv</i>	-
13	Rückenmark cer.	Nat	-	-	-
13	Rückenmark lum.	Nat	-	-	-
13	periph Nerv	Nat	-	-	-
14	periph Nerv	Nat	-	-	-
14	Rückenmark lum.	Nat	-	-	-
14	Stammhirn	Nat	-	-	-
15	Rückenmark cer.	Nat	-	-	-
15	Kleinhirn	Nat	-	-	-
16	Rückenmark cer.	Nat	-	-	-
16	Stammhirn	Nat	-	-	-
17	Kleinhirn	Nat	-	<i>positiv</i>	-
17	Stammhirn	Nat	-	<i>positiv</i>	-
Kontrolltiere	versch.Gewebe	-	-	-	-

Exp.= experimentell infiziert, Nat.= natürlich infiziert

Positive Signale in der ISH konnten in zwei Fällen bei experimentell mit EHV- 1 infizierten Pferden gefunden werden. Diese stimmten mit den Ergebnissen der EHV-1 PCR überein. Bei den natürlich infizierten Tieren waren die Signale in der ISH nicht eindeutig positiv, so dass sie hier als negativ beurteilt wurden. In keinem Fall konnte in der ISH ein positives Resultat mit einer EHV-4 DNA Sonde erzielt werden. Die EHV-4 PCR war in allen Fällen negativ.

Positive Signale in der Hybridisierung von neurologischen Geweben von Pferden betrafen vor allem Endothelien kleiner Blutgefäße. Der Nachweis gelang bei den hier durchgeführten Untersuchungen nur in den Endothelzellen von Gefäßen bzw. Bronchiolen (Kontrollen) und nicht in den eigentlichen Zellen des neuronalen Gewebes, wie Neuronen, Astrozyten, Gliazellen etc. In den Abbildungen 14, 15 und 16 sind Gefäße und Bronchiolen im Anschnitt mit den typischen blau-lila Signalen der ISH zu erkennen.

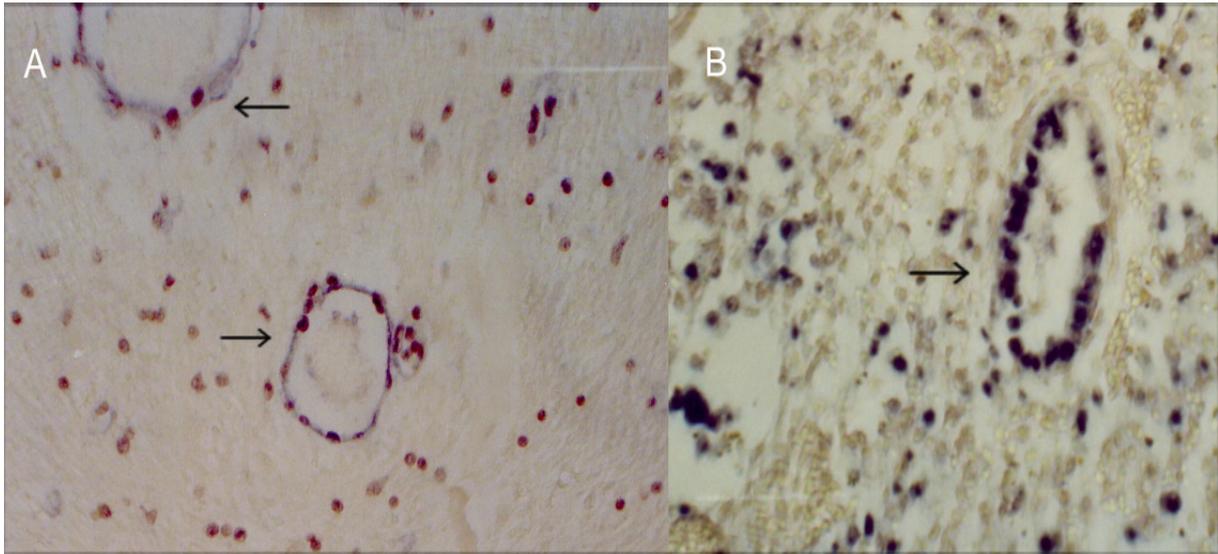


Abbildung 14: *In situ*-Hybridisierung mit einer EHV-1 gesamt DNA Sonde. Rückenmarksschnitt eines EHV-1 infizierten Pferdes (Probe Nr.1) mit positiven Signalen an Endothelien kleiner Blutgefäße (A), sowie einem Lungenschnitt eines EHV-1 positiven Pferdes als Kontrolle, positive Signale an Endothelien kleiner Bronchiolen. Vergrößerung x 50



Abbildung 15: *In situ*-Hybridisierung von einem Großhirnschnitt eines EHV-1 infizierten Pferdes (Probe Nr.6). Es wurde eine Digoxigenin-markierte EHV-1 DNA Sonde verwendet. Positive Signale können entlang der angeschnittenen Gefäße beobachtet werden. Vergrößerung x 50



Abbildung 16: Positive Hybridisierungssignale im Rückenmark eines EHV-1 infizierten Pferdes (Probe Nr.1). Die mit Digoxigenin-markierte Sonde ergibt blau-lila Signale an Endothelien kleiner Blutgefäße. Vergrößerung x 50

Per *in situ*-Hybridisierung konnte in einer früheren Studie des Instituts für Virologie EHV-1 DNA in Gewebeschnitten der Lunge, Leber und Plazenta von Pferden gezeigt werden (Gerst et al., 2003). In meinen Untersuchungen konnte ich auch in verschiedenen neurologischen Geweben von Pferden DNA des equinen Herpesvirus 1 nachweisen. Bei 2 von 6 experimentell intranasal mit EHV-1 infizierten Pferden konnten positive ISH Signale in Endothelien kleiner Blutgefäße des Rückenmarks und Gehirns erzielt werden (s. Abb.14, 15, 16). Bei den natürlich infizierten Tieren gelang kein eindeutiger Nachweis mit der ISH. In der EHV-1 PCR konnte auch bei den natürlich infizierten Tieren EHV-1 DNA nachgewiesen werden (Probe Nr. 7 und Nr.8).

Betroffene Zellen der mittels ISH untersuchter Gewebe waren vor allem Endothelzellen kleiner Blutgefäße, was den Endotheliotropismus von EHV-1 in neuronalem Gewebe bestätigt. In keiner der mit ISH und PCR untersuchten Proben konnte eine Beteiligung von EHV-4 gezeigt werden.

3.12 Tropismus von EHV-1 in Geweben des ZNS und in weiteren Organen von zwei abortierten Feten

Die vorangegangenen Untersuchungen zum Gewebetropismus bezogen sich auf adulte Tiere. Für das Verstehen der Pathogenese und Latenz ist es auch wichtig den Gewebetropismus in fetalen Geweben zu analysieren. Um einen möglichen Unterschied im Tropismus der EHV-1 Infektion bei juvenilen und adulten Pferden zu erkennen, wurden zwei abortierte Feten betrachtet, bei denen auch Nervengewebe zum Teil massiv von einer EHV-1 Infektion betroffen war.

Von zwei im letzten Drittel der Trächtigkeit abortierten Feten wurden verschiedene Gewebe, sowohl aus dem ZNS als auch aus der Lunge, Leber und Milz untersucht. Im **Fall 1** verfohlte die Stute auf der Weide 4 Wochen vor dem errechneten Geburtstermin. Es ist nicht bekannt, ob die Stute im Vorwege klinische Symptome (Fieber, Nasenausfluss etc.) zeigte. Im **zweiten Fall** handelte es sich um eine Traberstute, bei der es im letzten Trimester der Trächtigkeit ohne sichtbare klinische Symptome zum Abort kam. Beide Fälle traten unabhängig voneinander auf, der Impfstatus der Muttertiere ist unbekannt. In Tabelle 21 sind die untersuchten Gewebe beider Fälle zusammengefasst:

Tabelle 21: Untersuchung fetaler Gewebe mittels APAPP, PCR und Anzucht auf EHV-1 und EHV-4

Organ Gewebe	Fall 1				Fall 2			
	APAPP EHV-1	PCR EHV-1	PCR EHV-4	Anzucht EHV-1	APAPP EHV-1	PCR EHV-1	PCR EHV-4	Anzucht EHV-1
Cerebellum	+	+	-	-	+	+	-	-
Cerebrum	+	+	-	-	+	+	-	-
Lunge	+	-	-	+	+	+	-	-
Leber	+	-	-	+	+	+	-	+
Milz	-	nd	nd	+	-	nd	nd	+

+ = positiv, - = negativ, nd= nicht durchgeführt

Die in Tabelle 21 aufgeführten Gewebeproben wurden per Immunperoxidasetechnik (APAPP, s. 2.4.4) auf das Vorhandensein von EHV-1 Antigen untersucht. Diese Untersuchung erfolgte in Kooperation mit der Tierpathologie der FU-Berlin, die Abbildungen erfolgen mit freundlicher Genehmigung von Fr. Prof. Dr. Sterner-Kock. Hierbei diente der monoklonale Antikörper Ai 2G7 (Reuter, 1995) zur spezifischen Detektion von EHV-1 in den untersuchten Geweben. Positive APAPP Signale waren im Durchlichtmikroskop deutlich an der roten Färbung an den entsprechenden Stellen zu erkennen.

Es wurde ein Virusgenomnachweis mittels PCR durchgeführt, dabei wurden die für die PCR aufbereiteten Gewebe (s. 2.5) sowohl auf das Vorhandensein von EHV-1 als auch EHV-4 DNA untersucht.

Eine Anzucht von EHV-1 und -4 auf ED Zellen erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben. Weiterhin wurden die einzelnen Proben histopathologisch im HE Schnitt beurteilt.

Die folgenden Bilder zeigen positive APAPP Signale in den Hepatozyten der Leber (Abbildung 17 u. 19) sowie in Epithelzellen kleiner Bronchioli der Lunge (Abbildung 18). Im ZNS konnten multifokale Signale in und um Neurone sowohl im Großhirn als auch im Kleinhirn gefunden werden (Abbildung 20 u. 21):

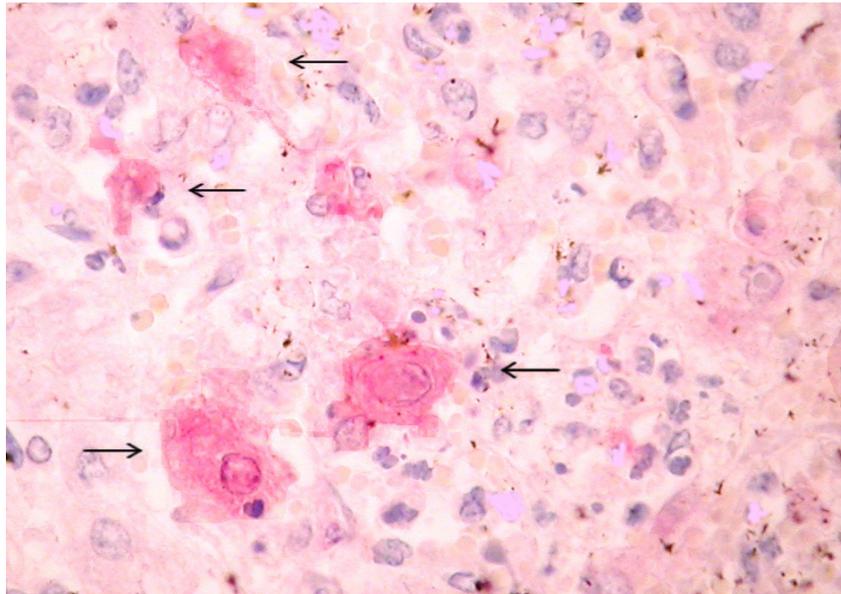


Abbildung 17: EHV-1 Antigennachweis in Hepatozyten (schwarze Pfeile) der Leber von Fall 1. Mit der Immunoperoxidase Technik konnte EHV-1 positive Signale in Hepatozyten nachgewiesen werden, als Antikörper diente der EHV-1 spezifische monoklonale Antikörper Ai 2G7. Vergrößerung 100x

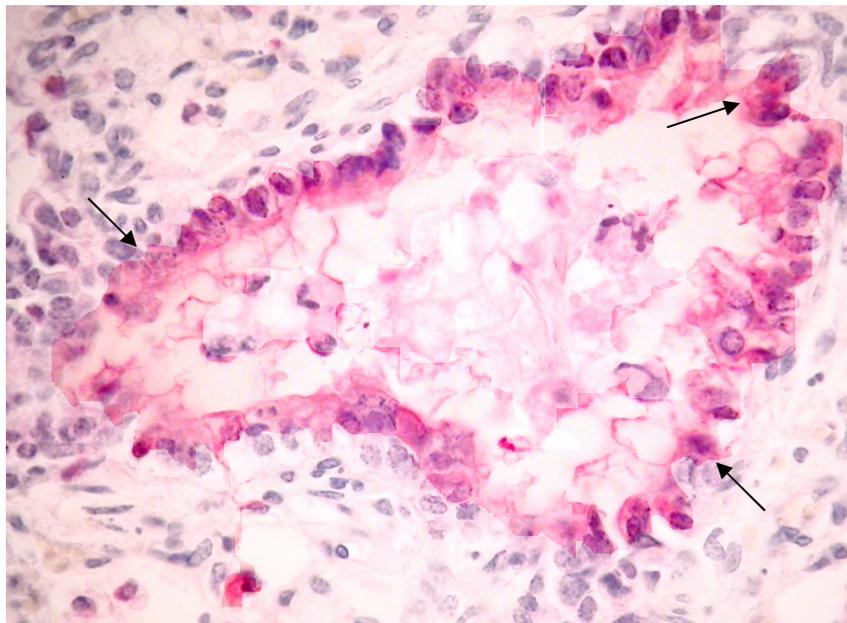


Abbildung 18: Ausschnitt aus Lungengewebe von einem abortierten Foetus. Die Lunge (Fall 1) zeigt EHV-1 positive APAPP Signale (rot, schwarze Pfeile) in Epithelien der Bronchioli. Vergrößerung 100 x

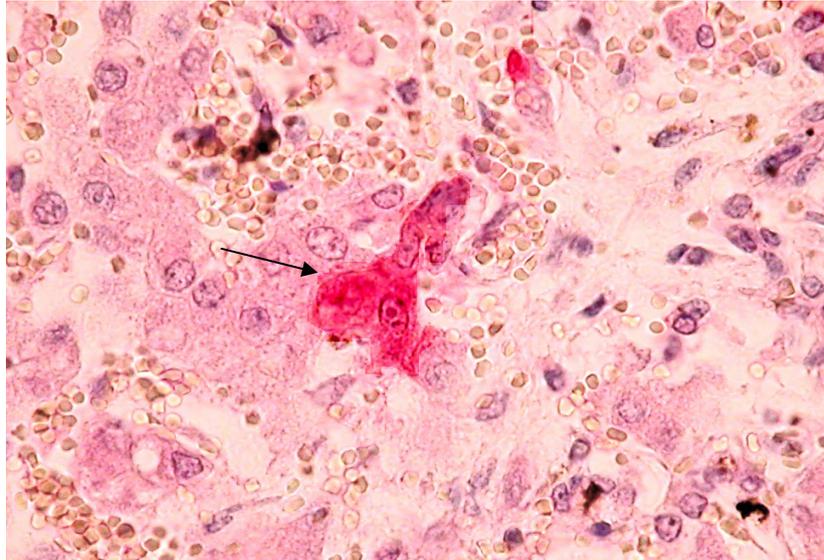


Abbildung 19: EHV-1 Nachweis in einem Leberschnitt (Fall 2). Einzelne Hepatozyten zeigen nach Immunperoxidase Färbung (APAPP) mit einem EHV-1 spezifischen monoklonalen Antikörper deutliche Signale (schwarzer Pfeil). Vergrößerung 100x

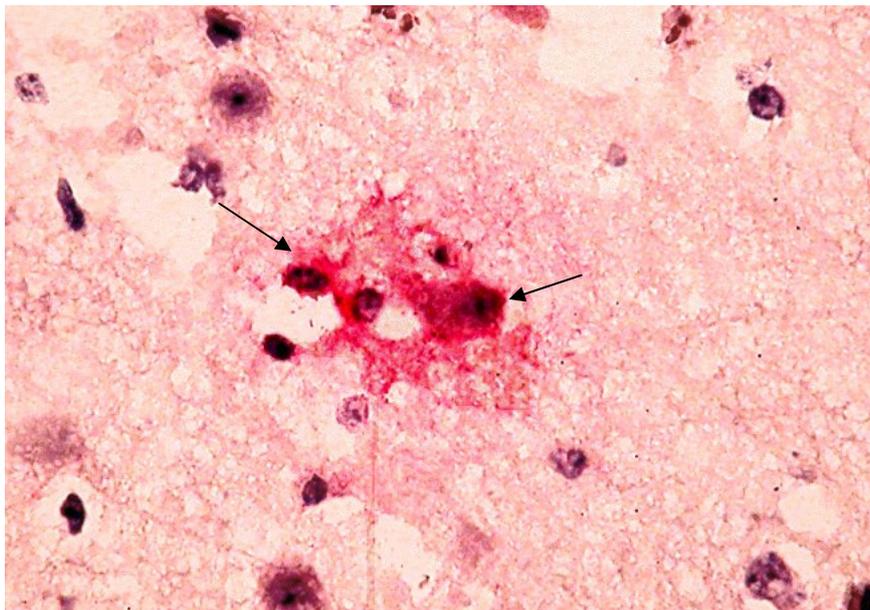


Abbildung 20: EHV-1 Antigennachweis im Großhirn von Fall 2 mit der Immunoperoxidase Technik (schwarze Pfeile). Die Signale sind in und um neuronale Zellen zu erkennen. Vergrößerung 100 x

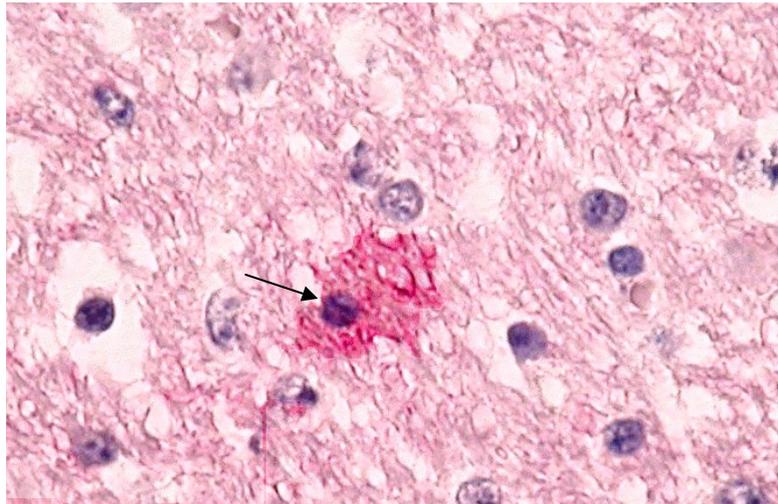


Abbildung 21: Gewebeschnitt aus dem Kleinhirn (Fall 2) mit deutlichem APAPP Signal in neuronalen Zellen (Pfeil). Der EHV-1 Nachweis war in multiplen Lokalisationen des Kleinhirns positiv. Vergrößerung 100x

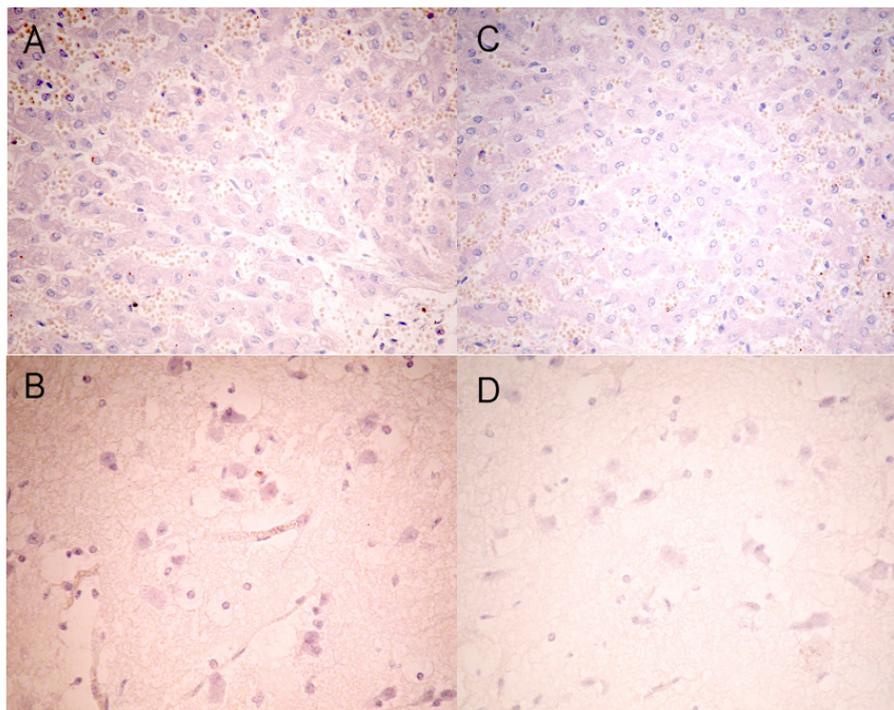


Abbildung 22: Bei diesen Negativkontrollen von beiden hier untersuchten Foeten (Fall 1 und 2) wurde der EHV-1 spezifische monoklonale Antikörper in der Untersuchung weggelassen. Die typischen positiven Signale fehlten vollständig. Die Bilder zeigen jeweils einen Gehirn- und Leberschnitt von Fall 1 (C+ D) und Fall 2 (A+ B).

EHV-1 konnte in beiden Fällen als Ursache der Aborte ausgemacht werden.

Im **Fall 1** gelang der EHV-1 Virus DNA Nachweis im Groß- und Kleinhirn, nicht jedoch aus der Lunge und Leber. Das Ergebnis der PCR wurde unterstützt durch das histologische Bild

einer milden, multifokalen Enzephalitis. Die Virusanzucht (s. 2.3.4) von EHV-1 gelang im Fall 1 aus der Lunge, Leber und Milz. Histologisch zeigte die Lunge in der HE Diagnostik fetale Atelektasen, multifokale Epitheldesquamation und hyperämische Bereiche. Mit der Immunperoxidase-Technik (APAPP) konnte EHV-1 Virusantigen sowohl im ZNS als auch in Lunge und Leber gezeigt werden.

In **Fall 2** dominierte histologisch das Bild einer starken, multifokalen, nekrotisierenden Enzephalitis. Die EHV-1 PCR von Groß- und Kleinhirn war positiv. Der EHV-1 Antigennachweis mittels APAPP zeigte deutlich positive Signale sowohl in Klein- und Großhirn als auch in den Geweben von Lunge und Leber. Die Virusanzucht (EHV-1) gelang im Fall 2 aus der Leber und der Milz. Im Fall zwei waren zusätzlich die Nasenschleimhaut, Stammhirn, Riechhirn und Rückenmark in der EHV-1 PCR positiv. Die Lunge zeigte pathohistologisch mittelgradige Atelektasen und hyperämische Bereiche.

EHV-4 konnte in beiden Fällen weder in der Anzucht, noch in der EHV-4 gB nPCR gefunden werden.

3.12.1 REA von zwei isolierten EHV-1 Stämmen aus abortierten Feten

Bei zwei im letzten Drittel der Trächtigkeit abortierten Feten (s. 3.12) konnte EHV-1 als Abortursache ausgemacht werden. Die von den beiden Tieren isolierte Virus-DNA sollte nun mittel Restriktionsenzymanalyse (s. 2.8) untersucht werden und mit dem EHV-1 Stamm Mar87, sowie mit dem EHV-4 Stamm T252 verglichen werden. Folgende Abbildung 23 zeigt das Restriktionsenzymprofil von Fall 1 und 2, sowie EHV-1 (Mar 87) und EHV-4 (T252) zur Kontrolle:

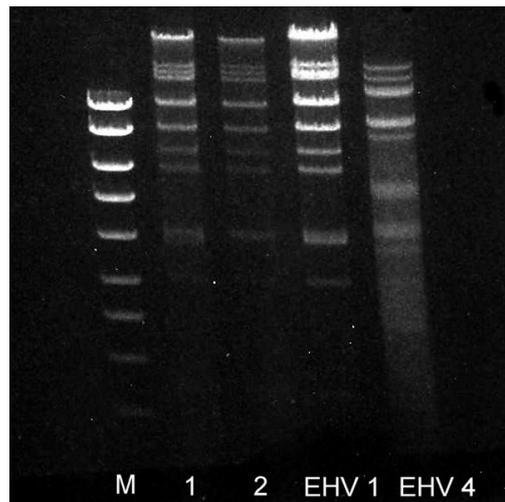


Abbildung 23: Restriktionsenzymanalyse von Fall 1 (1), Fall 2 (2), sowie EHV-1 (Mar87) und EHV-4 (T252), geschnitten mit dem Enzym *Bgl* II. Die Elektrophorese erfolgte auf einem 0,7 % Agarosegel in einer horizontalen Kammer. M= Marker Bioline Hyperladder

Die REA Muster der beiden Virusisolate von Fall 1 und 2 zeigen eindeutige Übereinstimmungen mit dem Referenzstamm Mar 87 und klare Unterschiede zu EHV-4. Auf der Basis der Restriktionsenzymanalyse lassen sich keine Unterschiede zwischen den Isolaten und dem EHV-1 Referenzstamm feststellen.

EHV-1 konnte als ursächliches Agens zweier Fohlenaborte ausgemacht werden. Die Untersuchung der beiden abortierten Feten konnte zeigen, dass bei diesen beiden Tieren multiple Organe unter zum Teil massiver Beteiligung des ZNS vom Virusbefall betroffen waren. Die Infektion muss *intra uterin* stattgefunden haben. Mit der Immunperoxidase-Färbung gelang der Antigennachweis in Neuronen des ZNS.

Es besteht eine Korrelation der Ergebnisse der verschiedenen Tests der beiden hier untersuchten Fälle. In allen Tests konnte nur EHV-1, nicht aber EHV-4 gefunden werden. Der EHV-1 Nachweis in ZNS Gewebe und den Organen Lunge und Leber gelang übereinstimmend sowohl mit der PCR, als auch mit der Immunperoxidasefärbung. Auch konnte aus Lunge und Leber (Fall 1), bzw. aus der Leber (Fall 2) EHV-1 angezüchtet werden. Eine Virusanzucht aus den hier untersuchten ZNS-Geweben (Kleinhirn, Großhirn) gelang in beiden Fällen nicht.

3.13 Nachweisverfahren von EHV-9 und Differenzierung des neurotrophen Alphaherpesvirus von EHV-1/-4

EHV-1 ist seit Langem im Zusammenhang mit Ataxien bei Pferden bekannt. Darüber hinaus ist bekannt, dass auch andere Equiden-Arten und Nicht-Equiden von Herpesviren befallen und neurologisch erkranken können. Die Rolle von EHV-9 im Zusammenhang mit herpesbedingten neurologischen Erkrankungen bei Zoo- und Wildtieren, sowie bei verschiedenen Equiden-Arten ist bisher wenig erforscht. EHV-9 ist aufgrund der hohen serologischen und genetischen Homologie zu EHV-1 diagnostisch nur schwer abzugrenzen, so dass es hier in der Vergangenheit möglicherweise auch zu Fehldiagnosen gekommen ist.

In einem japanischen Zoo gehaltene Thompson Gazellen die zusammen mit Zebras in einem Gehege untergebracht waren, erkrankten an Enzephalitis und mussten getötet werden. Dem zunächst als Gazellen Herpesvirus 1 (GHV-1) bezeichneten Virus, wurde aufgrund von serologischen Charakteristika, virologischen, molekularbiologischen und genetischen Merkmalen eine nahe Verwandtschaft mit dem Equinen Herpesvirus Typ 1 nachgewiesen. Es folgte die Einteilung als neuer Typ eines Equinen Herpesvirus (EHV-9) mit einer stark neurovirulenten Ausrichtung (Fukushi et al., 1997).

Hier sollte ein Beitrag zur sichereren Diagnose von EHV-9 geleistet werden um ggf. bei ungeklärten Fällen von Enzephalitiden bei verschiedenen Zoo- und Wildtieren, aber auch in der heimischen Equidenpopulation EHV-9 als ursächlich beteiligten Erreger überprüfen zu können. Zum einen wurde versucht eine EHV-9 spezifische PCR aufzubauen, zum anderen wurden Charakteristika des Virus bezüglich seines Wachstumsverhaltens und seines Restriktionsenzymmusters gesammelt.

3.13.1 Etablierung einer EHV-9 spezifischen nested Polymerase Kettenreaktion (EHV-9 PCR)

Aufgrund der starken Homologie von EHV-1 und EHV-9 sollte geklärt werden, ob es diagnostisch zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Hierzu wurde EHV-9 per PCR, Zellkultur und REA untersucht.

Die Etablierung einer PCR bot die Möglichkeit eine EHV-9 Infektion spezifisch zu diagnostizieren. Anhand bekannter Nucleotidsequenzen konnten die Primerpaare aus der Region, die für das Glycoprotein B (gB) codiert, ausgewählt werden (Tab.7, 2.6.2). Durch die Nutzung eines äußeren und eines inneren Primerpaares lässt sich die Sensitivität

der nested PCR im Vergleich zur Standard PCR erhöhen. In der ersten PCR-Runde konnte ein 816 Bp großes Fragment amplifiziert werden, in der zweiten Runde mit dem inneren Primerpaar ein 203 Bp großes Fragment. Die besten Ergebnisse wurden mit einer relativ hohen Annealing- Temperatur von 68-70° C in beiden PCR-Runden erzielt. Abbildung 24 zeigt die positive Bande der zweiten PCR-Runde:

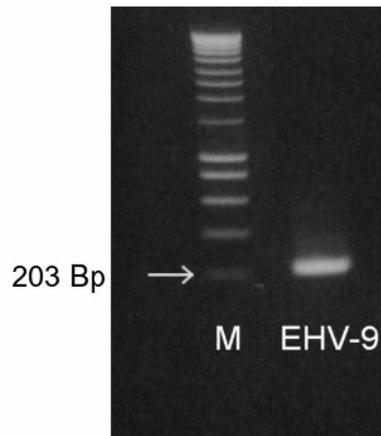


Abbildung 24: In der EHV-9 gB nested PCR wird in der zweiten Runde mit dem inneren Primerpaar ein 203 Bp großes Fragment amplifiziert. M= Marker (Bioline Hyperladder). Die Proben wurden auf ein horizontales 1,5% iges Agarosegel aufgetragen.

Aufgrund der hohen genetischen Verwandtschaft (Sequenzhomogenität im Glykoprotein B) von EHV-9 und EHV-1 wurde auch der zur Kontrolle getestete EHV-1 Stamm Mar 87 in der EHV-9 PCR als positiv erkannt. In der schon etablierten und routinemäßig eingesetzten EHV-1 ICP0 nPCR hingegen wurde ausschließlich EHV-1 als positiv erkannt und EHV-9 DNA nicht amplifiziert (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Differenzierung von EHV-9 wurde hier das Wachstumsverhalten auf unterschiedlichen Zelllinien, sowie das REA-Muster im Vergleich zu EHV-1 und -4 geprüft.

3.13.2 Wachstumsvergleich von EHV-1, -4, und -9 auf verschiedenen Zelllinien

Das Wachstumsverhalten der equinen Alphaherpesviren Typ 1, 4, und -9 auf verschiedenen Zelllinien (s.2.3) unterscheidet sich voneinander. So ist z. B. bekannt, dass EHV-4 im Gegensatz zu EHV-1 nicht auf Rabbit Kidney 13 (RK 13) Zellen wächst. Das unterschiedliche Wachstumsverhalten soll hier als ein Merkmal zur Charakterisierung des Equinen Herpesvirus Typ 9 dienen, sowie ein möglicher Nutzen für die Diagnostik getestet werden (Tabelle 22). Alle Virusstämme wurden auf ED Zellen vermehrt und anschließend

3x Plaque gereinigt. Das Wachstum der gereinigten Viren wurde auf verschiedenen Zelllinien nach Infektion mit 0,1 m.o.i des jeweiligen Virusstammes getestet:

Tabelle 22: Wachstumsvergleich von EHV-1 -4 und -9 auf verschiedenen Zelllinien (nach 48 Std.)

Zellen / Passage	EHV-1	EHV-4	EHV-9
ED p53	++++	++++	++++
TUV p 18	±	±	+
MDBK p185	++++	+	+++
RK 13 p 147	++++	-	++++
Oligo p 110	++++	+	+++
Vero p 30	±	±	+++
MDCK p 185	-	-	-
CrFK p 243	-	-	-
JK Milz p 176	+	-	+++
Ferkelhaut p 53	±	-	±

Plaquebildung von: - = (keine Plaquebildung) bis ++++ = (sehr hohe Plaquebildung)

Eine ausführliche Tabelle (s. Anhang 3) mit der Darstellung weiterer Zeitpunkte ist im Anhang 3 zu finden.

Das Wachstum von EHV-4 unterscheidet sich am deutlichsten von den zwei anderen Viren. EHV-4 wächst nicht auf RK 13- und Ferkelhautzellen und wesentlich langsamer und schwächer auf MDBK-, Oligo- und JK Milzzellen. Differenzen sind auch zwischen EHV-1 und dem Isolat EHV-9 zu erkennen. Der neurotrope Stamm EHV-9 zeigt ein deutlich besseres Wachstum auf Vero-, und JK Milzzellen, d. h. nach 48 Std. zeigten sich hier bereits zahlreiche Plaques (Borchers et al., 2006 a). Von EHV-9 ist bekannt, dass es eine große Vielzahl von Tierarten befallen kann (Fukushi et al., 1997; Narita et al., 2000; Taniguchi et al., 2000 b; Yanai et al., 2003 a; Yanai et al., 2003 b). Bei experimentellen Infektionen mit EHV-9 zeigte sich das Virus sowohl bei Hunden als auch bei Katzen infektiös. Im Kontrast dazu gelang hier keine Virusvermehrung auf Mardin-Darby canine kidney (MDCK), sowie feline Nierenzellen (CrFK).

EHV-9 verhält sich im Wachstumsvergleich ähnlich dem nah verwandten EHV-1. Dennoch zeigen sich auf bestimmten Zelllinien Unterschiede im Wachstumsverhalten. Eine Differenzierung der beiden Viren nur aufgrund ihres unterschiedlichen Wachstumsverhaltens liefert jedoch keine ausreichend sicheren Resultate. Ein Grund für die Abweichungen im Wachstumsverhalten könnte ein wesentlich weiteres Wirtsspektrum von EHV-9 sein. Der Ursprungswirt von EHV-9 ist noch nicht bekannt.

3.13.3 Restriktionsenzymanalyse und Southern-Hybridisierung der Virusstämme EHV-1 und EHV-9

Zur Darstellung feiner Unterschiede im Restriktionsmuster wurden EHV-1 und EHV-9 mit drei verschiedenen Enzymen geschnitten. Anschließend erfolgte eine Übertragung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA Fragmente auf eine Nitrozellulosemembran und die Hybridisierung mit einer EHV-1 DNA Sonde. Es wurden jeweils 200 ng virale DNA eingesetzt.

Abbildung 25 zeigt das Restriktionsenzymprofil von EHV-1 und-9 mit dem Ergebnis der Southern-Hybridisierung.

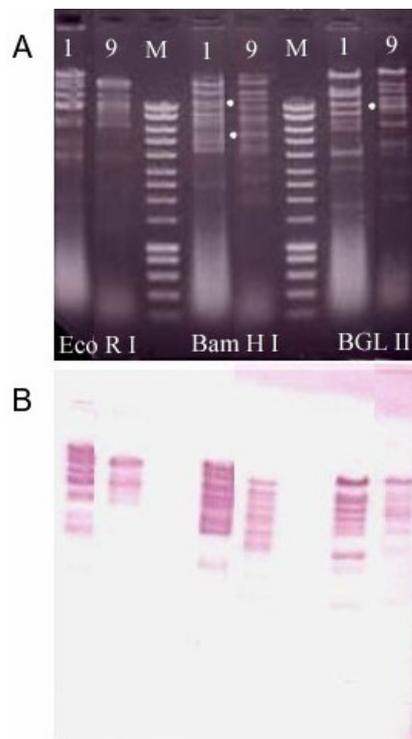


Abbildung 25: Agarosegel (A) mit Restriktionsenzymmuster von EHV-1 (1) und EHV-9 (9) geschnitten mit den Enzymen *Eco* RI, *Bam* HI und *Bgl* II, sowie Nitrozellulosemembran (B) der gleichen Proben wie oben nach der Southern-Hybridisierung mit einer digoxigenin markierten EHV-1 DNA Sonde. Die Punkte kennzeichnen Stellen unterschiedlicher Bandenmuster, Agarosegel 0,7 %, M= BiolineMarker.

Die Restriktionsenzymprofile zeigen bei allen drei Enzymen eine hohe Übereinstimmung zwischen EHV-1 und EHV-9. Die Sequenzanalyse von Glycoprotein B spezifischen PCR Fragmenten konnte diese Resultate bestätigen (Borchers et al., 2006 a). Feine Unterschiede

lassen sich im Bereich einzelner Banden mit allen drei Enzymen, insbesondere jedoch mit den Enzymen *Bgl* II und *Bam* HI darstellen. Im Southern Blot lässt sich mit der EHV-1 gesamt DNA Sonde neben EHV-1 auch das EHV-9 Virusisolat darstellen. Mit der EHV-1 DNA Sonde werden auch alle EHV-9 Banden hybridisiert.

Mit der Restriktionsenzymanalyse können feine Differenzen im Bandenmuster von EHV-1 und EHV-9 dargestellt werden und somit ein weiterer Anhaltspunkt dafür gefunden werden, dass es sich bei dem hier untersuchten Virusisolat EHV-9 um ein eigenständiges Virus mit einer hohen Verwandtschaft zu EHV-1 handelt.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur neurologischen Verlaufsform der Infektion mit den equinen Herpesviren des Typs 1 durchgeführt, sowie auf das neurotrope Virus EHV-9 eingegangen.

- In diesem Zusammenhang wurde insbesondere auf die mögliche Bedeutung von zirkulierenden Immunkomplexen für die Pathogenese der Erkrankung eingegangen. Hierzu wurden 102 Serumproben auf das Vorhandensein von EHV spezifischen, zirkulierenden Immunkomplexen untersucht und deren Einfluss für die EHV bedingte Ataxie genauer betrachtet. Darüber hinaus wurde versucht zu klären, ob der Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen für die Diagnostik der neurologischen Verlaufsform genutzt werden kann.
- Anhand von Gewebeproben aus dem ZNS von natürlich und experimentell mit EHV-1 infizierten Pferden sollten die Fragen nach dem Gewebe- und Zelltropismus bei dieser Form der EHV-Infektion des Pferdes näher analysiert werden. Hierbei wurde zusätzlich auf einen möglichen Unterschied im Tropismus bei Geweben adulter und fetaler Gewebe eingegangen. Gewebeproben aus dem ZNS von künstlich mit EHV-1 infizierten Mäusen wurden zusätzlich auf den Zelltropismus von EHV-1 im nicht natürlichen Wirt untersucht.
- EHV-9 wurde im Hinblick auf eine verbesserte Diagnostik dieses relativ neuen Herpesvirus analysiert. Hierzu wurden neben der Etablierung einer PCR auch vergleichende Untersuchungen in Bezug auf das Wachstumsverhalten und Unterschiede von EHV-9 und EHV-1 im Restriktionsenzymmuster eingegangen.
- Als serologische Untersuchungsmethoden standen der Neutralisationstest (NT) und der von mir etablierte ELISA zur Verfügung. Virologische und molekularbiologische Tests waren die Virusanzucht, Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Restriktionsenzymanalyse (REA), die Immunperoxidasetechnik (APPAP), *in situ*-Hybridisierung und Southern Hybridisierung.

4.1 Beurteilung des ELISAs zum Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen aus Serumproben

Die Etablierung eines Tests zum Nachweis von Immunkomplexen aus Serumproben war die Voraussetzung, um deren Bedeutung im Zusammenhang mit der paretisch-paralytischen Verlaufsform der EHV-Infektion zu evaluieren. Hierzu wurde von mir der schon beschriebene ELISA aufgebaut. Da der im ELISA genutzte monoklonale Antikörper sowohl mit EHV-1 als auch mit EHV-4 reagierte, war eine Unterscheidung diesbezüglich nicht möglich. Der nach dem Sandwichprinzip aufgebaute ELISA ermöglichte zum einen den Nachweis von Virusantigen und in der zweiten Variante die Detektion von zirkulierenden Immunkomplexen. Beim Aufbau des Tests wurde zunächst ein Fangantikörper, sowie ein EHV-1/-4 spezifischer monoklonaler Antikörper auf die ELISA-Platte aufgetragen. Dazu wurde das entsprechende Patientenserum gegeben. Die Detektion erfolgte im Falle des Antigennachweises mithilfe eines polyklonalen Kaninchenserums und eines spezies-spezifischen Konjugats. Die Spezifität des ELISA wurde durch entsprechende Kontrollen sichergestellt. Das als positive Kontrolle eingesetzte gereinigte EHV-1 Virusantigen reagierte im Test immer eindeutig und zuverlässig. Die durchgeführte Negativkontrolle, bei der alle Komponenten, nicht jedoch das Patientenserum aufgetragen wurden, ergab erwartungsgemäß ein negatives Ergebnis. Auch die weiteren unter 3.1 aufgeführten Kontrollen zur Spezifität des ELISAs ergaben als Resultat, dass mit diesem Test ein sicherer Nachweis von EHV-1/-4 Virusantigen und Immunkomplexen möglich war. Die hohe serologische Homogenität zwischen EHV-1 und EHV-4 erlaubte keine Unterscheidung dieser beiden Viren in dem ELISA-Test.

Das Ergebnis im ELISA wurde immer dann als positiv bewertet, wenn sowohl der Antigen als auch der Antikörpernachweis positiv waren. Wenn der Antigen- und Antikörpertest positiv ausfiel, konnte davon ausgegangen werden, dass es zur Bildung von Immunkomplexen gekommen war.

Mit dem ELISA ist die Detektion von zirkulierenden Immunkomplexen aus Serumproben möglich, ein möglicher Nutzen dieses Nachweises wird im Folgenden diskutiert.

4.2 Die Bedeutung von EHV- 1 bedingten zirkulierenden Immunkomplexen

Für das Entstehen von herpesbedingten Ataxien bei Pferden werden auch zirkulierende Immunkomplexe mit verantwortlich gemacht (Edington et al., 1986; Thein et al., 1988). Die Untersuchung von Serumproben neurologisch erkrankter und nicht neurologisch erkrankter Pferde sollte einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Herpesvirus bedingten neurologischen Symptomatik und dem Nachweis von Immunkomplexen im Serum aufzeigen.

Die 102 untersuchten Serumproben stammten von 57 Pferden mit anamnestischen Ataxien und 45 Pferden ohne neurologische Erkrankung. Bei 30 Tieren konnte ein deutlich erhöhter Antikörpertiter gegen EHV-1 festgestellt werden, bei diesen Pferden konnte von einer akuten Herpesvirus bedingten Reaktion des Immunsystems ausgegangen werden. In meinen Untersuchungen korrelierte die Höhe des NT Titers signifikant mit der Bildung von Immunkomplexen, d. h., bei der immunologischen Reaktion auf eine Herpesvirusinfektion kam es zur Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen im Blut. Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Immunkomplexen nicht mit der Ausbildung neurologischer Symptome („Ataxie“) korrelierte. Der IC-Nachweis war also bei ataktischen und nicht ataktischen Pferden gleich oft möglich. Anhand der hier untersuchten Serumproben kann kein Zusammenhang zwischen der EHV bedingten Ataxie und der Bildung von zirkulierenden Immunkomplexen hergestellt werden.

Ein Teil der im ELISA auf zirkulierende Immunkomplexe untersuchten Pferdeseren wurden im Western Blot auf das Vorhandensein virusspezifischen Antigens untersucht.

Von den 34 stichprobenartig ausgesuchten Serumproben, die auch im Western Blot untersucht wurden, konnten nur bei 4 Proben positive Signale erzeugt werden. Diese 4 Pferde hatten auch deutlich erhöhte EHV-1 Antikörpertiter, sowie bei 3 Pferden war auch der IC ELISA positiv. Die 4 Tiere zeigten vom Erkrankungsbild neurologische Symptome (s. Tab.17). Es konnte gezeigt werden, dass der Antigennachweis aus PEG präzipitierten Serumproben möglich ist. Nach einer Infektion mit EHV-1 wird das Virus mit peripheren Blutmonozyten in Form einer zellassozierten Virämie im Körper verbreitet (Allen et al., 1986). Diese zellassozierte Virämie könnte erklären, warum der Antigennachweis im Western Blot nur in wenigen Fällen möglich war. Der in 4 Fällen positive EHV-1 Antigennachweis im Western Blot könnte durch infizierte Zellreste in den Serumproben bedingt sein. Weiterhin stellt sich die Frage, ob die Fällung des Serums mit Polyethylenglycol einen Einfluss auf das Ergebnis

haben könnte. Insgesamt kann der Western Blot für meine hier durchgeführten Untersuchungen als wenig geeignete Methode zum Antigennachweis betrachtet werden, weil ein hoher methodischer Aufwand einer nur geringen Sensitivität gegenübersteht.

Herpesvirus bedingte Ataxien konnten sowohl bei Pferden die regelmäßig gegen EHV-1/-4 geimpft waren beobachtet werden, als auch bei nicht geimpften Tieren (Thein, 1993; Friday et al., 2000; Stierstorfer et al., 2002; van der Meulen et al., 2003). Die Impfung gegen EHV-1/-4 erfolgt bei Pferden normalerweise alle 6 Monate. Es konnte gezeigt werden, dass trotz mehrmaliger Boosterung nur eine Halbwertszeit der Antikörper von ca. 90 Tagen besteht (Wood, 1992). In meinen Untersuchungen ist zu erkennen, dass die regelmäßige Impfung nur geringfügig häufiger zur Bildung von Immunkomplexen führt, als bei den nicht geimpften Tieren. Der Immunkomplexnachweis in den Gruppen der geimpften und nicht geimpften Pferde korreliert wiederum mit der Höhe des EHV-1 NT Antikörpertiters. Hohe Antikörpertiter sind durch die regelmäßige Impfung gewünscht, um einen optimalen Schutz zu gewährleisten.

Der immunologische Kontakt mit EHV-1/-4 nimmt erwartungsgemäß mit dem Alter der Tiere zu. Neben der oben erwähnten Impfung ist die akute Infektion mit EHV-1/-4, sowie die Reaktivierung von latentem Virus dafür verantwortlich (Borchers et al., 1998). In den Ergebnissen der hier untersuchten Serumproben kann dies auch in Bezug auf die Immunkomplexbildung bestätigt werden. Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil IC positiver Tiere. In der Gruppe der unter 3 Jahre alten Pferde können bis auf zwei Ausreißer noch keine Immunkomplexe nachgewiesen werden. Ab einem Alter von 3 Jahren ist der IC-Nachweis häufiger positiv, allerdings erfolgt nur noch ein moderater Anstieg bis zu den über 10 Jahre alten Pferden.

Die Untersuchungen zu den zirkulierenden Immunkomplexen haben gezeigt, dass es im Rahmen von serologischen Reaktionen auf eine EHV-1 Infektion, Impfung oder auch Reaktivierung zur Bildung von IC im Blut kommen kann. Der Anstieg korreliert mit dem Antikörperanstieg im Neutralisationstest. Ein Zusammenhang mit der Entstehung der neurologischen Verlaufsform der EHV-1 Infektion konnte nicht gezeigt werden. In der Studie von Edington et al. (1986) konnte *post infectionem* ebenfalls ein Anstieg von zirkulierenden Immunkomplexen nachgewiesen werden. Die beobachteten Läsionen an Endothelzellen im ZNS schrieb er jedoch Virus-Zell Interaktionen zu, so dass auch hier kein direkter

Zusammenhang zwischen neurologischer EHV-1 Infektion und zirkulierenden Immunkomplexen gezeigt werden konnte (Edington et al., 1986) .

Für die Neuropathogenität einer EHV-1 Infektion wird laut neuerer Untersuchungen eine Variation in einer Aminosäure im Polymerasegen verantwortlich gemacht (Nugent et al., 2006; Goodman et al., 2007). Hierbei führt eine Mutation im Polymerasegen zu einem schnelleren Wachstum der Isolate gekoppelt mit einer längeren und stärkeren Virämie.

Im Vergleich von neurotrophen und abortogenen EHV-1 Stämmen konnte mittels quantitativer Realtime PCR aus PBMC eine signifikant höhere Menge an Virus DNA und eine längere Dauer der PBMC-assoziierten Virämie bei den neurotrophen Virusstämmen gezeigt werden. Die größere Virusmenge und längere Virämiedauer begünstigen einen effektiven Befall von Endothelzellen im ZNS der betroffenen Pferde (Allen et al., 2006).

4.3 Tropismus von EHV-1 in Geweben des ZNS

Die Untersuchungen an *post mortem* Geweben von Pferden mittels PCR und *in situ*-Hybridisierung sollten EHV-1 Genom in neurologischen Geweben nachweisen und genauere Hinweise auf den Zell- und Gewebetropismus von EHV-1 im zentralen Nervensystem liefern. Aus anderen Untersuchungen insbesondere im Zusammenhang mit EHV-1 bedingten Aborten ist bekannt, dass dieses Virus einen ausgeprägten Endotheliotropismus aufweist (Edington et al., 1986). Pathologische Veränderungen zeigen sich vor allem an Endothelien kleiner Blutgefäße. Bei der neurologischen Form der EHV-1 Infektion konnten Endothelläsionen und Thrombosierungen kleiner Blutgefäße im ZNS wiederholt gezeigt werden (Patel et al., 1982; Studdert et al., 2003). Die Virusanzucht aus ZNS Material gelang im Vergleich zur Virusanzucht aus Abortgewebe nur selten (Little et al., 1976; Thein, 1979; Studdert et al., 1984; Edington et al., 1986). Dies könnte nach Edington et al (1986) an hohen Antikörpertitern und der intrazellulären Lokalisation von EHV-1 liegen.

4.3.1 Gewebetropismus von EHV-1 im ZNS bei Pferden

In den von mir untersuchten Proben konnte gezeigt werden, dass der Virusgenomnachweis sowohl per PCR als auch mit der *in situ*-Hybridisierung aus frischem und in Paraffin eingebetteten ZNS Material möglich ist. Während der Nachweis per PCR bei experimentell und natürlich infizierten Pferden möglich war, konnten mit der *in situ*-Hybridisierung nur in

zwei Fällen bei den experimentell infizierten Tieren eindeutig positive Signale erzielt werden. Mit der nPCR konnte in 21 aus 49 Proben EHV-1 DNA amplifiziert werden (Tab. Anhang 2). Bei zwei Tieren (Nr.11, Nr.18) waren Proben aus verschiedenen Regionen des ZNS vorhanden. Bei Pferd Nr. 11 war die Nasenschleimhaut, Bulbus olfactorius, cervicales- und lumbales Rückenmark, Lunge, Lungenlymphknoten und Konjunktiva in der PCR EHV-1 positiv. Bei Pferd Nr. 18 ebenfalls die Nasenschleimhaut, Kleinhirn, Großhirn, Medulla oblongata, N.opticus, Bulbus olfactorius, Konjunktiva, Trigeminal Ganglion, sowie das lumbale Rückenmark EHV-1 positiv. In beiden Fällen konnte von einer massiven, multiple Organe betreffenden Infektion ausgegangen werden.

Bei den untersuchten Pferden vom Schlachthof, bei denen kein Hinweis auf eine Infektion mit EHV-1 bestand, konnte in keinem Fall per PCR EHV-1 in ZNS Geweben oder in der Nasenschleimhaut gefunden werden. In der Nasenschleimhaut von zwei Schlachtpferden konnte hingegen EHV-4 DNA nachgewiesen werden. Möglicherweise wurde hier EHV-4 im Latenzstadium bei diesen sonst klinisch unauffälligen Pferden gefunden.

Die PCR ermöglicht einen klaren Virusgenomnachweis aus ZNS Material von Pferden, ohne jedoch eine genauere Aussage über die betroffenen Zellen des Nervengewebes zu ermöglichen. Die *in situ*-Hybridisierung liefert darüber hinaus Informationen über die beteiligten Zellen und lässt eine differenzierte Aussage über den Gewebe- und Zelltropismus von EHV-1 im ZNS zu. Mit der *in situ*-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass EHV-1 in neuronalen Geweben Endothelzellen kleiner Blutgefäße infiziert. Bei einem experimentell mit EHV-1 infizierten Tier konnten Hybridisierungssignale im Rückenmark, in einem zweiten Fall in einem Großhirnschnitt nachgewiesen werden (Pferd. Nr. 1 und Nr. 6). Der damit einhergehende Pathomechanismus von Mikrothrombose, Vaskulitis und lokaler Gewebshypoxie führt schließlich zu klinisch sichtbaren Symptomen wie Ataxien, Festliegen etc. (Studdert et al., 2003). Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung in meinen Untersuchungen konnten Angaben aus der Literatur bestätigen (Schmidt et al., 1994). Die Hybridisierungssignale lassen sich an Endothelien kleiner Blutgefäße erkennen und nicht in den Zellen des Nervengewebes, wie Neurone, Gliazellen Astrozyten etc. Positive ISH Signale konnten in dieser Untersuchung nur bei den experimentell mit EHV- 1 infizierten Pferden gefunden werden. Trotz wiederholter Durchführung der ISH konnten auch bei den in der PCR EHV-1 positiven Pferden (Nr. 12, Nr. 17) keine eindeutigen ISH-Signale gezeigt werden. Insbesondere eine höhere Spezifität der PCR gegenüber der ISH könnte hierfür verantwortlich sein. Von den 6 experimentell infizierten Tieren konnte bei zwei Pferden EHV-1 mit der PCR

und der ISH detektiert werden. Bei den übrigen 4 Tieren konnte mit beiden Methoden trotz experimenteller (intranasaler) Infektion kein EHV- 1 in ZNS Geweben nachgewiesen werden.

4.3.2 Gewebetropismus von EHV-1 im ZNS bei Mäusen

Es wurden 24 in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von experimentell mit EHV-1 infizierten Mäusen per PCR und *in situ*-Hybridisierung untersucht. Der Gewebetropismus von EHV-1 in ZNS Geweben der Maus sollte mit dem Tropismus von EHV-1 im ZNS Geweben des Pferdes verglichen werden.

Bei den untersuchten ZNS-Schnitten von EHV-1 infizierten Mausgeweben konnte der bei Pferden gezeigte Endotheliotropismus kleiner Blutgefäße im ZNS nicht bestätigt werden. Hier zeigten sich positive Hybridisierungssignale vielmehr in multifokalen Lokalisationen des Rückenmarks und Gehirns. Mit der ISH konnten bei 6 Gewebeschnitten Hybridisierungssignale in der Nasenschleimhaut, dem Bulbus olfactorius und der frontalen Rinde gezeigt werden. Diese Gewebe waren auch in der PCR EHV-1 positiv. Mit der PCR konnten in drei weiteren Geweben EHV-1 DNA nachgewiesen werden. Der Infektionsweg von EHV-1 in Mäusen direkt über die Riechbahnen, sowie über den N. trigeminus ins Gehirn konnte in einer Untersuchung von Bartels et. al. (1998) und einer neueren Untersuchung von Gosztonyi (Gosztonyi et al., 2008) dargestellt werden.

4.3.3 Tropismus von EHV-1 in fetalen Gewebeproben von Pferden

Gewebeproben aus dem ZNS sowie zusätzlich aus Lunge, Leber und Milz von 2 abortierten Feten wurden mittels verschiedener Methoden auf eine EHV-1 Infektion untersucht. Von Interesse waren hier zum einen die Lokalisation des Virus im Klein- und Großhirn und mögliche Unterschiede im Zelltropismus zu adulten Pferden. Als Infektionsweg kann neben der transplazentaren Übertragung auch die Inhalation virushaltiger Amnionflüssigkeit in Betracht kommen (Smith et al., 1996).

Die pathohistologische Untersuchung zeigte bei den abortierten Fohlen eine massive, multifokale Enzephalitis. In den Ergebnissen konnte bei beiden Tieren virales Antigen sowie virale Nukleinsäuren in Klein- und Großhirn nachgewiesen werden. Eine Virusanzucht aus den ZNS-Proben gelang nicht. Eine Virusisolation aus dem ZNS von Pferden gelang auch in anderen Untersuchungen nur in wenigen Fällen (Saxegaard, 1966; Thein, 1979; Studdert et

al., 1984). Es konnte jedoch replikationsfähiges Virus aus Lunge, Leber und Milz des einen Tieres, sowie aus Leber und Milz des zweiten Tieres angezüchtet werden.

Der Antigennachweis mittels Immunperoxidasefärbung bei den beiden abortierten Feten zeigte multifokale Lokalisationen im Gehirn. Positive Signale waren sowohl in Endothelien, als auch in den Neuronen darstellbar. Die intra uterine Verbreitung des Virus bei Feten unterliegt noch anderen Mechanismen als bei adulten Tieren.

4.4 Zur Bedeutung des equinen Herpesvirus Typ 9 (EHV-9)

EHV-1 und EHV-4 sind als ursächliche Erreger für die neurologische Form der EHV-Infektion des Pferdes seit längerem bekannt. Der Zell- und Gewebetropismus zeigt bei Pferden einen deutlichen Endotheliotropismus in neuronalen Geweben mit den daraus resultierenden Symptomen.

Equiden könnten auch als natürlicher Wirt für EHV-9 angenommen werden, welches ebenfalls für neurologische Symptomatik verantwortlich ist (Taniguchi et al., 2000 a; Borchers et al., 2005; Borchers et al., 2006 a).

Bei einem akuten Ausbruch von Enzephalitis bei Thompson Gazellen (*Gazella thompsoni*) in einem japanischen Zoo wurde das Equine Herpesvirus Typ 9 (EHV-9) isoliert. Der natürliche Wirt von EHV-9 ist noch unbekannt. Möglicherweise kommt das Pferd als natürlicher Wirt in Betracht, weil es nicht an der Infektion verstirbt, sondern keine oder nur moderate klinische Symptome zeigt (Taniguchi et al., 2000 a). Der Verlauf bei anderen experimentell und natürlich infizierte Spezies endete hingegen oft tödlich (Fukushi et al., 2000; Narita et al., 2000; Taniguchi et al., 2000 b; Yanai et al., 2003 a; Yanai et al., 2003 b). Auch über die Verbreitung von EHV-9 innerhalb der Equiden-, Wildequiden-, sowie Zoo- und Wildtierpopulation liegen nur wenige Daten vor (Borchers et al., 2005).

Bei dem hier untersuchten Virus EHV-9 sollte insbesondere im Hinblick auf eine Nutzung für die Diagnostik, Charakteristika dieses Isolates näher untersucht werden. Die Abgrenzung von EHV-9 von dem nah verwandten EHV-1 war hierbei von besonderem Interesse. Es wurde eine EHV-9 spezifische PCR aufgebaut. EHV-1, -4 und -9 wurden vergleichend im Wachstumsvergleich auf verschiedenen Zelllinien untersucht. Mittels Restriktionsenzym-Analyse sollten Unterschiede im REA-Muster der Isolate EHV-1 und EHV-9 herausgearbeitet werden. In einer Untersuchung von Fukushi et. al (1997) konnten ebenfalls Abweichungen im DNA-Fingerprint zwischen EHV-9 und EHV-1 dargestellt werden.

Mit der durchgeführten Methoden konnte die nahe Verwandtschaft zwischen EHV-9 und EHV-1 bestätigt werden. In einem von Borchers et. al. (2006) dargestellten phylogenetischen Stammbaum konnte die Beziehung von EHV-1, EHV-9 und weitere isolierte equine Herpesviren zueinander dargestellt werden.

Mit der hier etablierten PCR, die auf Sequenzen im Glycoprotein B (gB) beruht, war eine sichere Abgrenzung von EHV-9 und EHV-1 nicht möglich. Nur im Ausschlussverfahren konnte mit der EHV-1 ICPO PCR eine Abgrenzung zwischen den beiden Viren erfolgen. In der ICPO-PCR war ausschließlich EHV-1 positiv, EHV-9 DNA wurde hier nicht amplifiziert. Die EHV-9 PCR eignet sich also nur bedingt für eine schnelle Diagnostik, in Kombination mit der EHV-1 ICPO PCR ist die Detektion von EHV-9 DNA jedoch möglich.

Das Wachstumsverhalten von EHV-1, -4 und -9 auf den verschiedenen Zelllinien zeigte wiederum die nahe Verwandtschaft von EHV-9 und EHV-1. Deutlich konnte von diesen beiden Viren EHV-4 abgegrenzt werden. Der neurotrope Stamm EHV-9 zeigte in meinen Untersuchungen eine im Vergleich zu EHV-1 deutliche Ausprägung von Plaques auf Vero- und JK Milzzellen und ein moderat schnelleres Wachstumsverhalten auf TUV-Zellen. Mittels der Restriktionsenzym-Analyse lassen sich Unterschiede im Bereich einzelner Banden mit den Enzymen *Eco* RI, *Bgl* II und *Bam* HI darstellen. Die Restriktionsenzymprofile zeigen bei allen drei Enzymen eine große Übereinstimmung zwischen EHV-1 und EHV-9.

Die Sequenzanalyse von Glycoprotein B-spezifischen PCR Fragmenten konnte diese Resultate bestätigen (Borchers et al., 2005). Bei Analysen von Aminosäuren im Glycoprotein B konnte gezeigt werden, dass die Übereinstimmung von EHV-1 zu EHV-9 97,1 % beträgt. Die Übereinstimmung von EHV-1 und -4 liegt hingegen nur bei 93,3 % (Borchers et al., 2005).

EHV-9 hat als neurotropes Herpesvirus das Potential, bei zahlreichen Spezies eine z.T. tödlich verlaufende Erkrankung hervorzurufen. Auch bei Primaten konnte mit EHV-9 experimentell eine mit neurologischen Symptomen einhergehende Erkrankung hervorgerufen werden, bei der sich histologisch das Bild einer fulminanten Enzephalitis darstellte (Kodama et al., 2007). Bei Pferden gibt es zurzeit keine Hinweise auf Erkrankungen, die auf einer natürlichen Infektion mit EHV-9 beruhen. Aufgrund der Kreuzreaktion mit EHV-1/-4 und eines ähnlichen Wachstumsverhaltens in Zellkulturen ist keine Differenzierung möglich. Von Interesse für die Zukunft wäre, auch in der Routinediagnostik Proben auf EHV-9 zu untersuchen, um weitere

Hinweise auf die Verbreitung und den natürlichen Wirt bzw. Zwischenwirt dieses Virus zu bekommen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur neurologischen Verlaufsform der EHV-1 Infektion des Pferdes durchgeführt. Hierzu wurde zum einen die Bedeutung zirkulierender Immunkomplexe untersucht und zum anderen der Gewebetropismus von EHV-1 im zentralen Nervensystem bei Pferden und zum Vergleich bei Mäusen untersucht. Die Diagnostik von EHV-9 und der Vergleich dieses neurotrophen Virus mit EHV-1 und EHV-4 war weiterer Bestandteil der Arbeit.

Die Bedeutung von zirkulierenden Immunkomplexen wurde anhand von 102 Serumproben von Pferden mit und ohne herpesbedingte neurologische Erkrankung analysiert. Die Immunkomplexe konnten mithilfe eines von mir aufgebauten ELISAs gemessen werden. Es wurde gezeigt, dass bei Pferden mit hohen Antikörpertitern gegen EHV-1 auch signifikant häufiger zirkulierende Immunkomplexe gemessen werden können. Es gab dabei keinen Zusammenhang zwischen den Tieren mit vorberichtlicher „Ataxie“ und den Tieren ohne neurologische Erkrankung. In Bezug auf die Impfung von Pferden gegen EHV-1/-4 zeigte sich, dass bei den geimpften Tieren mit hohen NT-Antikörpertitern häufig zirkulierende Immunkomplexe nachzuweisen sind, der Unterschied zu den nicht geimpften Tieren mit hohen NT-Antikörpertitern ist jedoch statistisch nicht relevant. Zudem konnte dargestellt werden, dass es mit zunehmendem Alter der Pferde auch eine Zunahme der IC positiven Tiere gibt.

Auch wenn der Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen im Blut von Pferden anhand der hier untersuchten Proben erstmal keinen konkreten Zusammenhang mit der neurologischen Verlaufsform der EHV-1 Infektion zeigte, sollte in Folgestudien deren Bedeutung weiterführend untersucht werden. Hier wäre z. B. der *in situ* Nachweis von Immunkomplexen direkt in den betroffenen Endothelgeweben des zentralen Nervensystems von Interesse. In weiteren Untersuchungen zur Bedeutung von zirkulierenden Immunkomplexen könnte die genauere Bedeutung von EHV- 4, sowie ein insgesamt größere Probenzahl aufschlussreiche Ergebnisse liefern.

Bei den Untersuchungen zum Tropismus von EHV-1 in Geweben des zentralen Nervensystems konnte EHV-1 mit der PCR in Teilen des Gehirns sowie des Rückenmarks gefunden werden. Bei den Pferden mit dem Verdacht auf die neurologische Form der EHV-1

Infektion war der Virusgenomnachweis bei 21 von 49 Proben positiv. Bei den 63 untersuchten Proben von nicht erkrankten Schlachthopferden konnte in keinem Fall EHV-1 im ZNS nachgewiesen werden. Bei den experimentell infizierten Pferden konnte EHV-1 auch mit der *in situ*-Hybridisierung im ZNS gezeigt werden. Dabei konnte der Endotheliotropismus für EHV-1 bestätigt werden.

Bei den experimentell infizierten Mausgeweben war sowohl mit der PCR, als auch der ISH EHV-1 in ZNS Geweben zu detektieren. Hier konnte in 9 von 20 Proben per PCR und in 6 Gewebeschnitten mit der *in situ*-Hybridisierung EHV-1 DNA detektiert werden. Ein Endotheliotropismus war hier nicht zu bestätigen, vielmehr fand eine multifokale Infektion neuronalen Gewebes statt.

Bei den 2 untersuchten Feten konnte im ZNS sowohl ein Endotheliotropismus, als auch die multifokale Infektion von neuronalen Zellen gezeigt werden.

EHV-4 konnte in den Untersuchungen zum Gewebetropismus in keinem Fall im Zusammenhang mit der neurologischen Verlaufsform der EHV-Infektion gefunden werden.

Das equine Herpesvirus 9 wurde im Vergleich zu EHV-1 und EHV-4 untersucht. Dabei zeigten sich Unterschiede im Wachstumsverhalten von EHV-9 zu EHV-1 insbesondere auf Vero- und JK Milzzellen. EHV-4 war im Wachstumsverhalten am deutlichsten von den anderen beiden Viren abzugrenzen. Die REA konnten feine Unterschiede von EHV-9 und EHV-1 im Restriktionsenzymmuster zeigen. Mit der Kombination von EHV-9- und EHV-1 PCR war eine Abgrenzung dieser beiden Viren voneinander erfolgen.

Alle drei hier aufgeführten Untersuchungen zu dem neurotrophen Virus EHV-9 zeigen dessen nahe Verwandtschaft zu EHV-1 und grenzt es deutlich ab von EHV-4.

6. Summary

Studies on the pathogenesis of the equine herpesvirus associated neurological disease in consideration of circulating immunocomplexes and tissue tropism

In the presented thesis investigations were carried out on EHV-1 associated neurological disease in horses. The relevance of circulation immune complexes and the tropism of EHV-1 in tissues of the central nervous system in horses and in mice were analyzed.

Furthermore the diagnostic on EHV-9 was part of this study and the comparison of this neurotropic virus with EHV-1 and EHV-4.

Blood serum samples of 102 horses were investigated for EHV-1 related circulation immune complexes (CIC) by ELISA assay.

Horses with high antibody titer in neutralization test showed a significant higher amount of CIC in blood samples. The detection of CIC in horses with equine herpesvirus associated neurological disease in comparison to non neurological affected horses showed no significant difference. There was a moderate increase of CIC in horses regularly vaccinated against EHV-1/-4 if compared with non vaccinated animals. In young horses the detection of CIC was much lower than in older horses, but the increase of CIC in older animals was only moderate. Even though in this study circulation immune complexes could not be directly associated with herpesvirus myeloencephalopathy further studies should be taken on a more extensive number of samples. Focus could be laid on the *in situ* detection of CIC in central nervous system tissues and a determination of EHV-1 and EHV-4 circulating immune complexes.

EHV-1 DNA could be detected in tissues of the central nervous system of horses by polymerase chain reaction. In horses with EHV-1 associated neurological disease 21 of 49 samples of CNS tissues were positive for EHV-1 by PCR. In 63 CNS probes of non neurological affected horses no EHV-1 could be found. By *in situ* hybridization technique in experimental infected horses endotheliotropism of EHV-1 in CNS could be shown.

EHV-1 infected mouse tissues showed no endotheliotropism but a multifocal infection of neurons in CNS. In 9 of 20 tissue samples EHV-1 DNA was found by PCR and in 6 samples by *in situ* hybridization.

In two aborted foetuses due to an EHV-1 infection of the mares the virus could be detected in both, neurons and in endothelial cells of the CNS.

EHV-4 was not detected in any of the investigated samples.

The neurotropic virus EHV-9 was compared with the viruses EHV-1 and – 4. On Vero- and JK spleen cells EHV- 9 and EHV-1 showed differences in respect to their growing behaviour. EHV-4 showed a complete different behaviour regarding growing behaviour compared to the other viruses.

By restriction enzyme analyses EHV-9 and EHV-1 showed only small differences in restriction pattern. EHV-9 – and -1 polymerase chain reaction in combination offered another possibility to detect EHV-9 DNA and distinguish it from EHV-1.

The investigation on EHV-9 showed the close relation of this virus to EHV-1 and demarcates it from EHV- 4.

- Allen, G. P.; Turtinen, L. W. (1982):
Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of equine herpesvirus 1.
J Virol Oct;44(1):. S. 249-55.
- Allen, G. P.; Yeargan, M. R.; Turtinen, L. W.; Bryans, J. T.; McCollum, W. H. (1983):
Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 infections by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA.
Am J Vet Res 44(2). S. 263-71.
- Allen, G. P.; Bryans, J. T. (1986):
Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections.
Prog Vet Microbiol Immunol 2. S. 78-144.
- Allen, G. P.; Yeargan, M. R.; Costa, L. R.; Cross, R. (1995):
Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses in horses infected with equine herpesvirus 1.
J Virol 69(1). S. 606-12.
- Allen, G. P.; Breathnach, C. C. (2006):
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 38(3). S. 252-7.
- Alsup, E. M.; DeBowes, R. M. (1984):
Dimethyl sulfoxide.
J Am Vet Med Assoc 185(9). S. 1011-4.
- Bagust, T. J.; Clark, L. (1972):
Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus.
J Comp Pathol 82(4). S. 375-83.
- Bartels, T.; Steinbach, F.; Hahn, G.; Ludwig, H.; Borchers, K. (1998):
In situ study on the pathogenesis and immune reaction of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infections in mice.
Immunology 93(3). S. 329-334.
- Baxi, M. K.; Borchers, K.; Bartels, T.; Schellenbach, A.; Baxi, S.; Field, H. J. (1996):
Molecular studies of the acute infection, latency and reactivation of equine herpesvirus-1 (EHV-1) in the mouse model.
Virus Res 40(1). S. 33-45.
- Benetka, V.; Brandstätter, M.; Högl, S.; Möstl, K. (2002):
EHV-4 bedingter Abortus in einem österreichischen Pferdebestand mit respiratorischen und neurologischen Krankheitsfällen.
Tierärztliche Umschau 57. S. 464-471.
- Bitsch, V.; Dam, A. (1971):
Nervous disturbances in horses in relation to infection with equine rhinopneumonitis virus.
Acta Vet Scand 12(1). S. 134-6.

- Bode, L.; Reckwald, P.; Severus, W. E.; Stoyloff, R.; Ferszt, R.; Dietrich, D. E.; Ludwig, H. (2001):
Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies--the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders.
Mol Psychiatry 6(4). S. 481-91.
- Borchers, K.; Slater, J. (1993):
A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4.
J Virol Methods 45(3). S. 331-6.
- Borchers, K.; Wolfinger, U.; Lawrenz, B.; Schellenbach, A.; Ludwig, H. (1997):
Equine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected horses detected by direct in situ PCR.
J Gen Virol 78 (Pt 5). S. 1109-14.
- Borchers, K.; Wolfinger, U.; Schellenbach, A.; Lawrenz, B.; Glitz, F.; Ludwig, H. (1998):
Equine herpesvirus type 1 and trigeminal ganglia of naturally infected horses: detection of DNA and latency associated transcripts.
Equine Infectious Disease VIII. S. 147- 152.
- Borchers, K.; Wolfinger, U.; Ludwig, H. (1999):
Latency-associated transcripts of equine herpesvirus type 4 in trigeminal ganglia of naturally infected horses.
J Gen Virol 80 (Pt 8). S. 2165-71.
- Borchers, K.; Wiik, H.; Frolich, K.; Ludwig, H.; East, M. L. (2005):
Antibodies against equine herpesviruses and equine arteritis virus in Burchell's zebras (*Equus burchelli*) from the Serengeti ecosystem.
J Wildl Dis 41(1). S. 80-6.
- Borchers, K.; Böttner, D.; Lieckfeldt, D.; Ludwig, A.; Frolich, K.; Klingeborn, B.; Widen, F.; Allen, G.; Ludwig, H. (2006 a):
Characterization of equid herpesvirus 1 (EHV-1) related viruses from captive Grevy's zebra and blackbuck.
J Vet Med Sci 68(7). S. 757-60.
- Borchers, K.; Thein, R.; Sterner-Kock, A. (2006 b):
Pathogenesis of equine herpesvirus-associated neurological disease: a revised explanation.
Equine Vet J 38(3). S. 283-7.
- Borchers, K.; Lieckfeldt, D.; Ludwig, A.; Fukushi, H.; Allen, G.; Fyumagwa, R.; Hoare, R. (2008):
Detection of Equid Herpesvirus 9 DNA in the trigeminal ganglia of a Burchell's zebra from the Serengeti Ecosystem.
The Journal of Veterinary Medical Science in press.
- Borgen, H. C.; Ludwig, H. (1974):
Equine herpesvirus 1: biological and biophysical comparison of two viruses from different clinical entities.
Intervirology 4(3). S. 189-98.

Bryans, J. T. (1969):

On immunity to disease caused by equine herpesvirus 1.

J Am Vet Med Assoc 155(2). S. 294-300.

Burki, F.; Rossmann, W.; Nowotny, N.; Pallan, C.; Mostl, K.; Lussy, H. (1990):

Viraemia and abortions are not prevented by two commercial equine herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horses.

Vet Q 12(2). S. 80-6.

Burrows, R.; Goodridge, D.; Denyer, M. S. (1984):

Trials of an inactivated equine herpesvirus 1 vaccine: challenge with a subtype 1 virus.

Vet Rec 114(15). S. 369-74.

Cantile, C.; Di Guardo, G.; Eleni, C.; Arispici, M. (2000):

Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy.

Equine Vet J 32(1). S. 31-5.

Charlton, K. M.; Mitchell, D.; Girard, A.; Corner, A. H. (1976):

Meningoencephalomyelitis in horses associated with equine herpesvirus 1 infection.

Vet Pathol 13(1). S. 59-68.

Chong, Y. C.; Duffus, W. P. (1992):

Immune responses of specific pathogen free foals to EHV-1 infection.

Vet Microbiol 32(3-4). S. 215-28.

Chowdhury, S. I.; Kubin, G.; Ludwig, H. (1986):

Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induced abortions and paralysis in a Lipizzaner stud: a contribution to the classification of equine herpesviruses.

Arch Virol 90(3-4). S. 273-88.

Crabb, B. S.; Studdert, M. J. (1993):

Epitopes of glycoprotein G of equine herpesviruses 4 and 1 located near the C termini elicit type-specific antibody responses in the natural host.

J Virol 67(10). S. 6332-8.

Crabb, B. S.; MacPherson, C. M.; Reubel, G. H.; Browning, G. F.; Studdert, M. J.; Drummer, H. E. (1995):

A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1.

Arch Virol 140(2). S. 245-58.

Crabb, B. S.; Studdert, M. J. (1995):

Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus).

Adv Virus Res 45. S. 153-90.

Dimock, W. W.; Edwards, P. R. (1932):

Infections of fetuses and foals.

Agric. Expt. Stud Suppl.Bull.333.

Doll, E. R.; Bryans, J. T. (1963):

A planned infection program for immunizing mares against viral rhinopneumonitis.

Cornell Vet 53. S. 249-62.

- Donaldson, M. T.; Sweeney, C. R. (1998):
Herpesvirus myeloencephalopathy in horses: 11 cases (1982-1996).
J Am Vet Med Assoc 213(5). S. 671-5.
- Edington, N.; Bridges, C. G.; Huckle, A. (1985):
Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids.
Equine Vet J 17(5). S. 369-72.
- Edington, N.; Bridges, C. G.; Patel, J. R. (1986):
Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke.
Arch Virol 90(1-2). S. 111-24.
- Edington, N.; Bridges, C. G. (1990):
One way protection between equid herpesvirus 1 and 4 in vivo.
Res Vet Sci 48(2). S. 235-9.
- Edington, N.; Smyth, B.; Griffiths, L. (1991):
The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortions.
J Comp Pathol 104(4). S. 379-87.
- Engels, M. (1991):
Strukturelle und funktionelle Genomeigenschaften animaler Herpesviren als Basis für die Entwicklung neuer Impfstoffe.
Zürich, Universität Zürich. Habilitationsschrift. S.
- Frampton, A. R., Jr.; Smith, P. M.; Zhang, Y.; Grafton, W. D.; Matsumura, T.; Osterrieder, N.; O'Callaghan, D. J. (2004):
Meningoencephalitis in mice infected with an equine herpesvirus 1 strain KyA recombinant expressing glycoprotein I and glycoprotein E.
Virus Genes 29(1). S. 9-17.
- Fraser, N. W.; Block, T. M.; Spivack, J. G. (1992):
The latency-associated transcripts of herpes simplex virus: RNA in search of function.
Virology 191(1). S. 1-8.
- Friday, P. A.; Scarratt, W. K.; Elvinger, F.; Timoney, P. J.; Bonda, A. (2000):
Ataxia and paresis with equine herpesvirus type 1 infection in a herd of riding school horses.
J Vet Intern Med 14(2). S. 197-201.
- Fukushi, H.; Tomita, T.; Taniguchi, A.; Ochiai, Y.; Kirisawa, R.; Matsumura, T.; Yanai, T.; Masegi, T.; Yamaguchi, T.; Hirai, K. (1997):
Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1.
Virology 227(1). S. 34-44.

- Fukushi, H.; Taniguchi, A.; Yasuda, K.; Yanai, T.; Masegi, T.; Yamaguchi, T.; Hirai, K. (2000):
A hamster model of equine herpesvirus 9 induced encephalitis.
J Neurovirol 6(4). S. 314-9.
- Gandini, G.; Fatzer, R.; Mariscoli, M.; Spadari, A.; Cipone, M.; Jaggy, A. (2004):
Equine degenerative myeloencephalopathy in five Quarter Horses: clinical and neuropathological findings.
Equine Vet J 36(1). S. 83-5.
- Garcia-Blanco, M. A.; Cullen, B. R. (1991):
Molecular basis of latency in pathogenic human viruses.
Science 254(5033). S. 815-20.
- Gerst, S.; Borchers, K.; Gower, S. M.; Smith, K. C. (2003):
Detection of EHV-1 and EHV-4 in placental sections of naturally occurring EHV-1- and EHV-4-related abortions in the UK: use of the placenta in diagnosis.
Equine Vet J 35(5). S. 430-3.
- Gibson, J. S.; O'Neill, T.; Thackray, A.; Hannant, D.; Field, H. J. (1992 a):
Serological responses of specific pathogen-free foals to equine herpesvirus-1: primary and secondary infection, and reactivation.
Vet Microbiol 32(3-4). S. 199-214.
- Gibson, J. S.; Slater, J. D.; Awan, A. R.; Field, H. J. (1992 b):
Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation.
Arch Virol 123(3-4). S. 351-66.
- Goodman, L. B.; Loregian, A.; Perkins, G. A.; Nugent, J.; Buckles, E. L.; Mercorelli, B.; Kydd, J. H.; Palu, G.; Smith, K. C.; Osterrieder, N.; Davis-Poynter, N. (2007):
A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity.
PLoS Pathog 3(11). S. e160.
- Gosztonyi, G.; Borchers, K.; Ludwig, H. (2008):
Pathogenesis of equine herpesvirus-1 (EHV-1) infection in the mouse model.
APMIS, in press.
- Greenwood, R. E.; Simson, A. R. (1980):
Clinical report of a paralytic syndrome affecting stallions, mares and foals on a thoroughbred studfarm.
Equine Vet J 12(3). S. 113-7.
- Gressens, P.; Martin, J. R. (1994):
In situ polymerase chain reaction: localization of HSV-2 DNA sequences in infections of the nervous system.
J Virol Methods 46(1). S. 61-83.

- Hannant, D.; O'Neill, T.; Jesset, D.; Mumford, J. A. (1991):
Evidence for non specific immunosuppression during the development of immune responses to equid herpesvirus- 1.
Equine Immunology Supplement 12. S. 41- 45.
- Hannant, D.; Jessett, D. M.; O'Neill, T.; Dolby, C. A.; Cook, R. F.; Mumford, J. A. (1993):
Responses of ponies to equid herpesvirus-1 ISCOM vaccination and challenge with virus of the homologous strain.
Res Vet Sci 54(3). S. 299-305.
- Hasebe, R.; Kimura, T.; Nakamura, K.; Okazaki, K.; Ochiai, K.; Wada, R.; Umemura, T. (2002 a):
Passage of equine herpesvirus-1 in suckling mouse brain enhances extraneural virus growth and subsequent hematogenous neuroinvasion.
J Vet Med Sci 64(10). S. 907-12.
- Hasebe, R.; Kimura, T.; Sato, E.; Okazaki, K.; Ochiai, K.; Wada, R.; Umemura, T. (2002 b):
Equine herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of neuroadapted virus and its parental strain.
J Comp Pathol 127(2-3). S. 118-25.
- Hasebe, R.; Kimura, T.; Nakamura, K.; Ochiai, K.; Okazaki, K.; Wada, R.; Umemura, T. (2006):
Differential susceptibility of equine and mouse brain microvascular endothelial cells to equine herpesvirus 1 infection.
Arch Virol 151(4). S. 775-86.
- Holbrook, T. C.; Moore, J. N. (1994):
Anti-inflammatory and immune support in endotoxemia and septicemia.
Vet Clin North Am Equine Pract 10(3). S. 535-47.
- Holloway, Y.; Snijder, J. A.; Boersma, W. G. (1993):
Demonstration of circulating pneumococcal immunoglobulin G immune complexes in patients with community-acquired pneumonia by means of an enzyme-linked immunosorbent assay.
J Clin Microbiol 31(12). S. 3247-54.
- Jackson, T.; Kendrick, J. W. (1971):
Paralysis of horses associated with equine herpesvirus 1 infection.
J Am Vet Med Assoc 158(8). S. 1351-7.
- Jackson, T. A.; Osburn, B. I.; Cordy, D. R.; Kendrick, J. W. (1977):
Equine herpesvirus 1 infection of horses: studies on the experimentally induced neurologic disease.
Am J Vet Res 38(6). S. 709-19.
- Kodama, A.; Yanai, T.; Yomemaru, K.; Sakai, H.; Masegi, T.; Yamada, S.; Fukushi, H.; Kuraishi, T.; Hattori, S.; Kai, C. (2007):
Acute neuropathogenicity with experimental infection of equine herpesvirus 9 in common marmosets (*Callithrix jacchus*).
J Med Primatol 36(6). S. 335-42.

- Kohn, C. W.; Fenner, W. R. (1987):
Equine herpes myeloencephalopathy.
Vet Clin North Am Equine Pract 3(2). S. 405-19.
- Kortz, G. (1992):
Current Therapie in Equine Medicine. / R. NE (Hrsg.).
Philadelphia: WB Saunders Co. - S. 550-552.
- Kydd, J. H.; Smith, K. C.; Hannant, D.; Livesay, G. J.; Mumford, J. A. (1994):
Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: implications
for vaccination strategies.
Equine Vet J 26(6). S. 466-9.
- Kydd, J. H.; Townsend, H. G.; Hannant, D. (2006):
The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines.
Vet Immunol Immunopathol 111(1-2). S. 15-30.
- Little, P. B.; Thorsen, J. (1976):
Disseminated necrotizing myeloencephalitis: a herpes-associated neurological disease of
horses.
Vet Pathol 13(3). S. 161-71.
- Ludwig, H. (1972):
Genetic material of herpesviruses. I. Biophysical-chemical characterization of herpesvirus
DNAs.
Med Microbiol Immunol (Berl) 157(3). S. 186-211.
- Ludwig, H.; Thein, P.; Chowdhury, S. I. (1988):
Herpesvirus infections of equine animales.
In: Virus diseases in laboratory and captive animals. / G. Darai (Hrsg.).
Boston: Martin Nijhoff Publishers. - S. 283-297.
- Manninger, R. (1949):
Studies in infectious abortions in mares due to a filterable virus.
Acta Vet Hung I. S. 62-68.
- Matsumura, T.; Sugiura, T.; Imagawa, H.; Fukunaga, Y.; Kamada, M. (1992):
Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse
populations.
J Vet Med Sci. Apr;54. S. 207-11.
- Mayr, A.; Böhm, H.; Brill, J.; Woyciechowska, S. (1965):
Charakterisierung eines Stutenabortvirus aus Polen und Vergleich mit bekannten
Rhinopneumonitisvirus- Stämmen des Pferdes.
Arch Virusforsch 17. S. 217- 30.
- McCartan, C. G.; Russell, M. M.; Wood, J. L.; Mumford, J. A. (1995):
Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal
disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm.
Vet Rec 136(1). S. 7-12.

Meyer, H.; Thein, P.; Hubert, P. (1987):

Characterization of two equine herpesvirus (EHV) isolates associated with neurological disorders in horses.

Zentralbl Veterinarmed B 34(7). S. 545-8.

Meyer, H.; Hubert, P.; Schwend, C.; Eichhorn, W. (1992):

Rapid identification and differentiation of the vaccine strain Rac H from EHV 1 field isolates using a non-radioactive DNA probe.

Vet Microbiol 30(1). S. 13-20.

Mumford, J. A.; Rossdale, P. D.; Jessett, D. M.; Gann, S. J.; Ousey, J.; Cook, R. F. (1987):

Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985.

J Reprod Fertil Suppl 35. S. 509-18.

Mumford, J. A. (1991):

The epidemiology of equid herpesvirus abortion: a tantalizing mystery.

Equine Vet J 23(2). S. 77-8.

Mumford, J. A.; Hannant, D.; Jesset, D. M.; O'Neill, T.; Smith, K.; Ostlund, E. N. (1994):
Abortigenic and neurological disease caused by experimental infection with equid herpesvirus 1.

In: VII Proceedings of 7th International Conference of equine Infectious Diseases.
Tokyo. S. 261- 275.

Murgue, B.; Murri, S.; Zientara, S.; Durand, B.; Durand, J. P.; Zeller, H. (2001):

West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years.

Emerg Infect Dis 7(4). S. 692-6.

Narita, M.; Uchimura, A.; Kimura, K.; Tanimura, N.; Yanai, T.; Masegi, T.; Fukushi, H.; Hirai, K. (2000):

Brain lesions and transmission of experimental equine herpesvirus type 9 in pigs.

Vet Pathol 37(5). S. 476-9.

Nugent, J.; Birch-Machin, I.; Smith, K. C.; Mumford, J. A.; Swann, Z.; Newton, J. R.;

Bowden, R. J.; Allen, G. P.; Davis-Poynter, N. (2006):

Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks.

J Virol 80(8). S. 4047-60.

Olsen, T. F. (2001):

Equine herpesvirus myeloencephalopathy in a 14-year-old quarter horse stallion.

Can Vet J 42(3). S. 217-20.

Ostlund, E. N. (1991):

Equine Herpesvirus 1.

In: Proc AAEP. 36. S. 387.

- Ostlund, E. N. (1993):
The equine herpesviruses.
Vet Clin North Am Equine Pract 9(2). S. 283-94.
- Patel, J. R.; Edington, N.; Mumford, J. A. (1982):
Variation in cellular tropism between isolates of equine herpesvirus-1 in foals.
Arch Virol 74(1). S. 41-51.
- Patel, J. R.; Didlick, S.; Bateman, H. (2004):
Efficacy of a live equine herpesvirus-1 (EHV-1) strain C147 vaccine in foals with maternally-derived antibody: protection against EHV-1 infection.
Equine Vet J 36(5). S. 447-51.
- Petzoldt, K.; Rosenbruch, M.; Thein, P.; Merkt, H.; Schulze-Spuntrup, J. (1982):
[Cases of Paresis and Paralysis in a German Thoroughbred Stud (author's transl)].
Berl Munch Tierarztl Wochenschr 95(5). S. 81-5.
- Platt, H.; Singh, H.; Whitwell, K. E. (1980):
Pathological observations on an outbreak of paralysis in broodmares.
Equine Vet J 12(3). S. 118-26.
- Rappocciolo, G.; Birch, J.; Ellis, S. A. (2003):
Down-regulation of MHC class I expression by equine herpesvirus-1.
J Gen Virol 84(Pt 2). S. 293-300.
- Reed, S. M.; Toribio, R. E. (2004):
Equine herpesvirus 1 and 4.
Vet Clin North Am Equine Pract 20(3). S. 631-42.
- Reuter, T. (1995):
Etablierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper und Versuch zur gentechnischen Konstruktion antigenbindender Antikörperfragmente (Fab).
Berlin, FU- Berlin, Journal Nr. 1851. S.
- Rock, D. L.; Hagemoser, W. A.; Osorio, F. A.; McAllister, H. A. (1988):
Transcription from the pseudorabies virus genome during latent infection. Brief report.
Arch Virol 98(1-2). S. 99-106.
- Roizman, B. S. A. E. W., R.J.; Kieff, E.; Rickinson, A.B.; Mocarsky, J.; Britt, W.J.; Alford, C.A.; Cohen, J.I.; Strauss, S.E.; Arvin, A.M.; Pellet, P.E.; Black, J.B.; frenkel, N.; Roffmann, E. (1995):
In: Virology. - Fields, B.N; Kniepe, D.M; Howely, P.M.
Philadelphia New York: Lippincot- Raven Publishers.
- Samuel, C. A.; Allen, W. R.; Steven, D. H. (1976):
Studies on the equine placenta II. Ultrastructure of the placental barrier.
J Reprod Fertil 48(2). S. 257-264.

Saxegaard, F. (1966):

Isolation and identification of equine rhinopneumonitisvirus(equine abortion virus) from cases of abortion and paralysis.

Nord. Vet.- Med 18. S. 504-512.

Schmidt, P.; Meyer, H.; Hubert, P.; Hafner, A.; Andiel, E.; Grabner, A.; Dahme, E. (1994):
In-situ hybridization for demonstration of equine herpesvirus type 1 DNA in paraffin wax-
embedded tissues and its use in horses with disseminated necrotizing myeloencephalitis.

J Comp Pathol. Apr.; 110(3). S. 215- 25.

Schuler, L. A.; Khaitza, M. L.; Dyer, N. W.; Stoltenow, C. L. (2004):

Evaluation of an outbreak of West Nile virus infection in horses: 569 cases (2002).

J Am Vet Med Assoc 225(7). S. 1084-9.

Scott, J. C.; Dutta, S. K.; Myrup, A. (1983):

In vivo harboring of equine herpesvirus- 1 in leucocyte population and subpopulations and
their quantitation from experimentally infected ponies.

Am J Vet Res 44. S. 1344- 1348.

Shankar, V.; Kao, M.; Hamir, A. N.; Sheng, H.; Koprowski, H.; Dietzschold, B. (1992):

Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after
intranasal infection of rats with Borna disease virus.

J Virol 66(2). S. 992-8.

Shimizu, T.; Ishizaki, R.; Ishii, S.; Kawakami, Y.; Kaji, T.; Sugimura, K.; Matumoto, M.
(1959):

Isolation of equine abortion virus from natural cases of equine abortion in horse kidney cell
culture.

Jpn J Exp Med 29. S. 643-9.

Slater, J.; Baxi, M.; Tewari, D.; Gibson, J. S.; Field, H. J.; Ludwig, H.; Steinbach, F.;
Borchers, K. (1994 b):

Experimental infection of pathogen- free ponies with equine herpesvirus- 1: Detection of
infectious virus and viral DNA.

Equine Infectious Disease VII. S. 255- 260.

Slater, J.; Hannant, D. (2000):

Equine immunity to viruses.

Vet Clin North Am Equine Pract 16(1). S. 49-68.

Slater, J. D.; Borchers, K.; Thackray, A. M.; Field, H. J. (1994 a):

The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the
horse.

J Gen Virol 75 (Pt 8). S. 2007-16.

Smith, K. C.; Whitwell, K. E.; Binns, M. M.; Dolby, C. A.; Hannant, D.; Mumford, J. A.
(1992):

Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant
pony mares with equine herpesvirus 1.

Equine Vet J 24(4). S. 256-9.

- Smith, K. C.; Mumford, J. A.; Lakhani, K. (1996):
A comparison of equid herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus.
J Comp Pathol 114(3). S. 231-47.
- Smith, K. C.; Whitwell, K. E.; Mumford, J. A.; Hannant, D.; Blunden, A. S.; Tearle, J. P. (2000):
Virulence of the V592 isolate of equid herpesvirus-1 in ponies.
J Comp Pathol 122(4). S. 288-97.
- Smith, K. C.; Borchers, K. (2001):
A study of the pathogenesis of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion by DNA in-situ hybridization.
J Comp Pathol 125(4). S. 304-10.
- Soboll, G.; Whalley, J. M.; Koen, M. T.; Allen, G. P.; Fraser, D. G.; Macklin, M. D.; Swain, W. F.; Lunn, D. P. (2003):
Identification of equine herpesvirus-1 antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes.
J Gen Virol 84(Pt 10). S. 2625-34.
- Steinhagen, P. (1986):
Zur Problematik der equinen Herpesvirus (EHV-1)- Infektion und ihrer Bekämpfung mit Hilfsstoffen.
Tierarztl Umschau 41. S. 260- 266.
- Stevens, J. G.; Cook, M. L. (1971):
Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice.
Science 173(999). S. 843-5.
- Stierstorfer, B.; Eichhorn, W.; Schmahl, W.; Brandmuller, C.; Kaaden, O. R.; Neubauer, A. (2002):
Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) myeloencephalopathy: a case report.
J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 49(1). S. 37-41.
- Stokes, A.; Corteyn, A. H.; Murray, P. K. (1991):
Clinical signs and humoral immune response in horses following equine herpesvirus type-1 infection and their susceptibility to equine herpesvirus type-4 challenge.
Res Vet Sci 51(2). S. 141-8.
- Stroop, W. G.; Rock, D. L.; Fraser, N. W. (1984):
Localization of herpes simplex virus in the trigeminal and olfactory systems of the mouse central nervous system during acute and latent infections by in situ hybridization.
Lab Invest 51(1). S. 27-38.
- Studdert, M. J. (1974):
Comparative aspects of equine herpesviruses.
Cornell Vet 64(1). S. 94-122.

Studdert, M. J. (1983):

Restriction endonuclease DNA fingerprinting of respiratory, foetal and perinatal foal isolates of equine herpesvirus type 1.

Arch Virol 77(2-4). S. 249-58.

Studdert, M. J.; Fitzpatrick, D. R.; Horner, G. W.; Westbury, H. A.; Gleeson, L. J. (1984):

Molecular epidemiology and pathogenesis of some equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus) isolates.

Aust Vet J 61(11). S. 345-8.

Studdert, M. J.; Hartley, C. A.; Dynon, K.; Sandy, J. R.; Slocombe, R. F.; Charles, J. A.;

Milne, M. E.; Clarke, A. F.; El-Hage, C. (2003):

Outbreak of equine herpesvirus type 1 myeloencephalitis: new insights from virus identification by PCR and the application of an EHV-1-specific antibody detection ELISA.

Vet Rec 153(14). S. 417-23.

Taniguchi, A.; Fukushi, H.; Matsumura, T.; Yanai, T.; Masegi, T.; Hirai, K. (2000 a):

Pathogenicity of a new neurotropic equine herpesvirus 9 (gazelle herpesvirus 1) in horses.

J Vet Med Sci 62(2). S. 215-8.

Taniguchi, A.; Fukushi, H.; Yanai, T.; Masegi, T.; Yamaguchi, T.; Hirai, K. (2000 b):

Equine herpesvirus 9 induced lethal encephalomyelitis in experimentally infected goats.

Arch Virol 145(12). S. 2619-27.

Tearle, J. P.; Smith, K. C.; Platt, A. J.; Hannant, D.; Davis-Poynter, N. J.; Mumford, J. A. (2003):

In vitro characterisation of high and low virulence isolates of equine herpesvirus-1 and -4.

Res Vet Sci 75(1). S. 83-6.

Tewari, D.; Gibson, J. S.; Slater, J. D.; O'Neill, T.; Hannant, D.; Allen, G. P.; Field, H. J. (1993):

Modulation of the serological response of specific pathogen-free (EHV-free) foals to EHV-1 by previous infection with EHV-4 or a TK-deletion mutant of EHV-1.

Arch Virol 132(1-2). S. 101-20.

Thein, P. (1974):

Schutzimpfung gegen Rhinopneumonitis unter besonderer Berücksichtigung der Virusausscheidung.

Tierärztliche Umschau 7. S. 363.

Thein, P. (1979):

Central nervous system form of rhinopneumonitis virus infection.

Zentralbl Veterinarmed B 26(7). S. 570-576.

Thein, P. (1981):

Infection of the central nervous system of horses with equine herpesvirus serotype 1.

J S Afr Vet Assoc 52(3). S. 239-41.

Thein, P. (1983):

Zur Muttertierschutzimpfung beim Pferd.

Tierärztliche Umschau(11). S. 783-790.

Thein, P.; Ludwig, H.; Meyer, H. (1987):

Beitrag zur molekularen Epizootiologie equiner Herpesviren.

Tierärztliche Umschau 42. S. 23-27.

Thein, P.; Brown, K. (1988):

Infection with equine herpesvirus and its manifestation in the central nervous system of the horse.

Tierarztl Prax 16(3). S. 295-302.

Thein, P.; Eßlich, G.; Grunmach, J.; Abar, B. (1989):

Grundlagen und Kontrolle des Immunstatus beim Saugfohlen.

Der praktische Tierarzt(70). S. 15-28.

Thein, P. (1993):

Einsatz von Baypamun P beim Pferd.

Der praktische Tierarzt 3. S. 208-209.

Thein, P. (1994):

Therapieansätze bei Infektionen mit Pferdeherpesviren.

Der praktische Tierarzt 9. S. 786-792.

Thein, P. (1996):

Herpesvirusinfektionen des Pferdes.

In: Handlexikon der tierärztlichen Praxis. / E. Wiesener (Hrsg.). Enke Verlag. - S. 349- 349.

Thein, P. (2002):

Vaccination and vaccination strategies against Equine Herpes virus.

In: Intervet Symposium on Respiratory Diseases in Horses.

Sweden.

van der Meulen, K.; Vercauteren, G.; Nauwynck, H.; Pensaert, M. (2003):

A local epidemic of equine herpesvirus 1- induced neurological disorders in belgium.

Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 72. S. 366- 372.

van Maanen, C.; Vreeswijk, J.; Moonen, P.; Brinkhof, J.; de Boer-Luijtz, E.; Terpstra, C.

(2000):

Differentiation and genomic and antigenic variation among fetal, respiratory, and neurological isolates from EHV1 and EHV4 infections in The Netherlands.

Vet Q 22(2). S. 88-93.

van Maanen, C.; Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M.; Damen, E. A.; Derksen, A. G.

(2001):

Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics.

Equine Vet J 33(2). S. 191-6.

van Maanen, C. (2002):

Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update.

Vet Q 24(2). S. 58-78.

Verheyen, K.; Newton, J. R.; Wood, J. L.; Birch-Machin, I.; Hannant, D.; Humberstone, R. W. (1998):

Possible case of EHV-4 ataxia in warmblood mare.
Vet Rec 143(16). S. 456.

Walker, C.; Love, D. N.; Whalley, J. M. (1999):

Comparison of the pathogenesis of acute equine herpesvirus 1 (EHV-1) infection in the horse and the mouse model: a review.
Vet Microbiol 68(1-2). S. 3-13.

Welch, H. M.; Bridges, C. G.; Lyon, A. M.; Griffiths, L.; Edington, N. (1992):

Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues.
J Gen Virol 73 (Pt 2). S. 261-8.

Whitwell, K. E.; Gower, S. M.; Smith, K. C. (1992):

An immunoperoxidase method applied to the diagnosis of equine herpesvirus abortion, using conventional and rapid microwave techniques.
Equine Vet J 24(1). S. 2-3.

Wilkins, P. A.; Henninger, R.; Reed, S. M.; Del Piero, F. (2003):

Acyclovir as Treatment for EHV- 1 Myeloencephalopathy.
In: 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners.
New Orleans, AAEP. -.

Wilson, W. D. R. (1997):

Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy.
Vet Clin North Am Equine Pract 13(1). S. 53-72.

Wood, J. L. (1992):

Vaccination of mares against equine herpesvirus-1.
Vet Rec 130(10). S. 211-2.

Yanai, T.; Fujishima, N.; Fukushi, H.; Hirata, A.; Sakai, H.; Masegi, T. (2003 a):

Experimental infection of equine herpesvirus 9 in dogs.
Vet Pathol 40(3). S. 263-7.

Yanai, T.; Tujioka, S.; Sakai, H.; Fukushi, H.; Hirai, K.; Masegi, T. (2003 b):

Experimental infection with equine herpesvirus 9 (EHV-9) in cats.
J Comp Pathol 128(2-3). S. 113-8.

Teile der hier vorliegenden Ergebnisse sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Borchers, K.; Böttner, D.; Lieckfeldt, D.; Ludwig, A.; Frolich, K.; Klingeborn, B.; Widen, F.; Allen, G.; Ludwig, H. (2006):

Characterization of equid herpesvirus 1 (EHV-1) related viruses from captive Grevy's zebra and blackbuck.
J Vet Med Sci 68(7). S. 757-60

Anhang 1: Daten der ELISA Untersuchungen

Tier Nr.	Rasse *	Alter [Jahre]	Geschlecht	Probenmonat	Jahr	Impfstaus **	Ataxie ***	NT Titer	ELISA Werte	ELISA Bewertung****	Western Blot
1	1	16	m	5	2004	1	1	<1:10	0,067	2	-
2	1	16	m	5	2004	1	1	<1:10	0,169	2	-
3	1	10	w	6	2004	1	1	<1:10	0,24	2	-
4	1	1	m	6	2004	2	1	<1:10	0,284	2	-
5	1	1	m	6	2004	2	1	<1:10	0,162	2	-
6	1	.	m	7	2004	2	1	<1:10	0,121	2	neg
7	1	2	m	8	2004	.	1	<1:10	0,137	2	neg
8	1	12	m	9	2004	.	1	1:40	0,178	2	pos
9	4	1	w	9	2004	2	1	<1:10	0,104	2	neg
10	3	12	w	9	2004	.	1	<1:10	0,215	2	-
11	4	.	m	9	2004	.	1	<1:10	0,795	1	-
12	4	1	w	9	2004	.	1	<1:10	0,103	2	-
13	4	12	w	9	2004	1	1	<1:10	0,569	1	-
14	1	11	m	1	2004	1	1	1:20	0,809	1	pos
15	1	11	m	1	2004	1	1	1:20	0,831	1	pos
16	1	5	w	1	2004	2	1	<1:10	0,111	2	neg
17	1	9	m	1	2004	.	1	<1:10	1,067	1	neg
18	1	7	m	1	2004	2	1	1:10	0,079	2	neg
19	1	7	m	1	2004	2	1	<1:10	0,073	2	neg
20	4	8	w	1	2004	2	1	1:10	0,433	1	-
21	4	.	w	1	2004	.	1	1:10	0,386	1	-
22	1	5	w	2	2004	2	1	<1:10	0,093	2	-
23	1	5	w	2	2004	2	1	1:10	0,121	2	-
24	1	5	w	8	2004	.	1	<1:10	0,111	2	-
25	1	5	w	8	2004	.	1	<1:10	0,112	2	-

Tier Nr.	Rasse *	Alter [Jahre]	Geschlecht	Probenmonat	Jahr	Impfstaus **	Ataxie ***	NT-Titer	ELISA Werte	ELISA Bewertung****	Western Biot
26	4	1	m	8	2003	2	1	<1:10	0,102	2	-
27	4	1	m	9	2003	2	1	<1:10	0,094	2	-
28	4	2	w	9	2003	2	1	1:20	0,076	2	neg
29	4	10	w	9	2003	2	1	1:20	0,319	1	neg
30	4	10	w	10	2003	2	1	1:20	0,832	1	neg
31	1	7	m	10	2003	1	1	1:20	0,169	2	neg
32	1	20	w	10	2003	2	1	<1:10	0,385	1	neg
33	4	10	m	12	2003	2	1	1:20	0,343	1	neg
34	4	.	.	9	2004	.	1	1:20	0,467	1	pos(mab)
35	2	.	w	1	2005	1	1	1:20	1,332	1	neg
36	4	.	.	11	2004	.	1	1:20	0,878	1	neg
37	3	2	w	2	2004	2	1	<1:10	0,117	2	neg
38	4	8	w	2	2004	2	1	<1:10	0,136	2	neg
39	3	8	w	2	2004	1	1	1:10	0,213	2	neg
40	3	8	w	3	2004	1	1	1:10	0,399	1	neg
41	1	8	w	3	2004	1	1	<1:10	0,422	1	neg
42	4	5	m	3	2004	.	1	<1:10	0,093	2	-
43	4	4	m	3	2004	2	1	<1:10	0,077	2	-
44	2	12	m	4	2004	2	1	1:10	0,225	2	-
45	4	8	m	3	2004	1	1	1:10	0,374	1	-
46	2	3	m	4	2004	1	1	<1:10	0,294	2	-
47	1	8	w	4	2004	.	1	<1:10	0,35	1	-
48	2	16	m	5	2004	1	1	1:20	0,109	2	-
49	2	16	m	6	2004	1	1	1:20	0,108	2	-
50	4	.	w	5	2004	.	1	<1:10	0,069	2	-

Tier Nr.	Rasse *	Alter [Jahre]	Geschlecht	Probenmonat	Jahr	Impfstaus **	Ataxie ***	NT Titer	ELISA Werte	ELISA Bewertung****	Western Blot
51	4	1	m	5	2004	2	1	<1:10	0,488	1	-
52	4	5	m	6	2004	1	1	1:20	0,466	1	-
53	4	5	m	6	2004	1	1	1:20	0,475	1	-
54	4	5	m	8	2004	1	1	1:20	0,48	1	-
55	4	14	w	2	2004	.	1	1:40	0,254	2	-
56	4	14	w	2	2004	.	1	1:40	0,33	1	-
57	4	10	m	9	2004	.	1	<1:10	0,069	2	-
58	1	.	m	7	2003	2	2	1:10	0,09	2	-
59	1	.	m	7	2003	2	2	1:20	0,107	2	neg
60	4	.	m	8	2003	2	2	1:10	0,105	2	neg
61	4	.	m	8	2003	2	2	1:10	0,519	1	neg
62	4	.	w	10	2004	2	2	<1:10	0,231	2	neg
63	1	3	w	10	2004	2	2	<1:10	0,069	2	neg
64	1	1	m	10	2004	2	2	<1:10	0,094	2	neg
65	4	.	w	11	2004	2	2	<1:10	0,069	2	neg
66	4	5	w	3	2002	1	2	<1:10	0,253	2	-
67	4	.	m	3	2002	1	2	<1:10	0,173	2	-
68	4	5	.	8	2002	1	2	<1:10	0,896	1	-
69	1	15	m	8	2002	1	2	1:20	0,101	2	neg
70	1	13	m	8	2002	1	2	1:20	0,493	1	neg
71	2	24	w	6	2002	1	2	1:10	0,064	2	neg
72	2	1	.	6	2002	1	2	<1:10	0,096	2	-
73	2	1	m	6	2002	1	2	1:20	0,271	2	-
74	2	1	m	6	2002	1	2	<1:10	0,211	2	-
75	2	1	.	6	2002	1	2	<1:10	0,149	2	-
76	2	1	w	6	2002	1	2	1:20	0,531	1	-

Tier Nr.	Rasse *	Alter [Jahre]	Geschlecht	Probenmonat	Jahr	Impfstaus **	Ataxie ***	NT Titer	ELISA Werte	ELISA Bewertung****	Western Blot
77	2	1	m	6	2002	1	2	<1:10	0,178	2	-
78	2	8	w	2	2004	1	2	1:40	1,268	1	-
79	2	9	w	2	2004	1	2	<1:10	0,454	1	-
80	2	14	w	2	2004	1	2	1:40	1,291	1	-
81	2	.	w	3	2004	1	2	<1:10	0,1	2	-
82	2	.	w	3	2004	1	2	<1:10	0,874	1	-
83	2	.	w	3	2004	1	2	<1:10	0,078	2	-
84	2	.	w	4	2004	.	2	1:20	0,09	2	-
85	4	13	m	6	2004	1	2	1:10	0,256	2	-
86	1	12	w	6	2004	2	2	<1:10	0,773	1	-
87	2	.	w	6	2004	1	2	1:20	0,931	1	-
88	1	8	m	6	2004	2	2	<1:10	0,103	2	-
89	4	5	m	7	2004	2	2	<1:10	0,078	2	-
90	4	20	w	8	2004	2	2	<1:10	0,169	2	-
91	2	.	w	8	2004	1	2	1:20	0,406	1	-
92	1	12	m	9	2004	2	2	1:40	0,804	1	-
93	1	11	m	9	2004	2	2	1:20	0,741	1	-
94	3	2	w	10	2004	2	2	<1:10	0,147	2	-
95	4	12	w	12	2004	2	2	1:10	0,408	1	-
96	4	5	m	12	2004	2	2	1:10	0,628	1	-
97	4	.	m	1	2005	.	2	<1:10	0,094	2	-
98	1	14	m	1	2005	2	2	<1:10	0,089	2	-
99	1	6	w	12	2004	2	2	<1:10	0,094	2	-
100	1	10	w	12	2004	2	2	<1:10	0,339	1	-
101	1	11	w	12	2004	2	2	<1:10	0,123	2	-
102	1	4	w	12	2004	2	2	<1:10	0,098	2	-

Erklärung zu Anhang 1:

- *Rasse: 1 Warmblut, 2 Vollblut, 3 Pony, 4 sonstige (bzw. keine Angabe, also auch Tiere der drei zuvor genannten Gruppen)
 in Jahren; keine Angaben= Alter unbekannt
- Alter: m = männlich, bzw. männlich kastriert; w = weiblich.
- Geschlecht: 1= regelmäßig gegen EHV-1/-4 geimpft; 2= nicht geimpft; keine Angabe: Impfstatus unbekannt
- **Impfstatus: 1= Pferde mit neurologischen Symptomen („Ataxie“); 2= Pferde ohne neurologische Symptomatik
- *** Ataxie: 1= ELISA Ergebnis positiv, d.h. Immunkomplexnachweis in dieser Probe; 2= ELISA Ergebnis negativ
- **** ELISA Bewertung pos: positiv, neg: negativ, - nicht durchgeführt
- Western Blot

Anhang 2: PCR Ergebnisse der untersuchten ZNS-Gewebe von Pferden						
Pferd Nr.	Herkunft	Gewebe	Infiziert	Probenart	EHV-1 PCR	EHV- 4 PCR
1	E	Rückenmark	Exp	Par	<i>positiv</i>	-
2	E	Rückenmark	Exp	Par	-	-
3	E	Rückenmark	Exp	Par	-	-
4	E	Rückenmark	Exp	Par	-	-
5	E	Gehirn	Exp	Par	-	-
6	E	Rückenmark	Exp	Par	<i>positiv</i>	-
7	P	Gehirn	Nat	F	-	-
8	P	Gehirn	Nat	F	-	-
	P	Bulbus olfact.	Nat	F	-	-
9	P	Gehirn	Nat	F	-	-
	P	Bulbus olfact.	Nat	F	-	-
	P	Lunge	Nat	F	-	-
10	P	Stammhirn	Nat	F	-	-
	P	Kleinhirn	Nat	F	-	-
	P	Großhirn	Nat	F	-	-
	P	Ammondshorn	Nat	F	-	-
	P	Bulbus olfact.	Nat	F	-	-
11	P	Nasen SH	Nat	F	<i>positiv</i>	<i>positiv</i>
	P	Bulbus olfact.	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Cortex front.	Nat	F	-	-
	P	Rückenm. cer	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Rückenm. lum	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Kopf Lymphk.	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Lunge	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Lungen Lymph	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Konjunktiva	Nat	F	<i>positiv</i>	-
12	P	Rückenm. cer.	Nat	Par	-	-
	P	Rückenm. lum.	Nat	Par	-	-
13	P	Rückenm. cer.	Nat	Par	-	-
	P	Rückenm. lum	Nat	Par	-	-
	P	Periph. Nerv	Nat	Par	-	-
14	P	Periph. Nerv	Nat	Par	-	-
	P	Rückenm. lum	Nat	Par	-	-
	P	Stammhirn	Nat	Par	-	-
15	P	Rückenm.cer	Nat	Par	-	-
	P	Kleinhirn	Nat	Par	-	-
16	P	Rückenm. cer	Nat	Par	-	-
	P	Stammhirn	Nat	Par	-	-
17	P	Kleinhirn	Nat	Par	<i>positiv</i>	-
	P	Stammhirn	Nat	Par	<i>positiv</i>	-
18	P	Nasen SH	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Kleinhirn	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Großhirn	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Medulla obl.	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	N. opticus	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Bulbus olfac.	Nat	F	<i>positiv</i>	-

Anhang

Pferd Nr.	Herkunft	Gewebe	Infiziert	Probenart	EHV-1 PCR	EHV- 4 PCR
18	P	Konjunktiva	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Ggl. Trigemini.	Nat	F	<i>positiv</i>	-
	P	Rückenm. lum	Nat	F	<i>positiv</i>	-
PCR Ergebnisse der untersuchten ZNS-Gewebe von Schlachthofpferden						
Anzahl	Herkunft	Gewebe	Infiziert	Probenart	EHV-1 PCR	EHV- 4 PCR
38 x	S	Rückenmark cer.+ lum.	Nat	F	-	-
14 x	S	Nasenschleim- haut	Nat	F	-	2 x <i>positiv</i>
11 x	S	Bulbus olfact.	Nat	F	-	-

ZNS Gewebe von neurologisch erkrankten Pferden und nicht neurologisch erkrankten Tieren (Schlachthof). E= Proben aus England (K.Smith, Newmarket, AHT), P= Proben aus der Pathologie, S= Proben vom Schlachthof, Par= Paraffinschnitte, F= frisches Gewebe, Exp= experimentell infiziert, Nat= natürlich infiziert, Foh= Fohlen, cer= cervical, lum= lumbal

Anhang

Anhang 3: Wachstumsvergleich von EHV-1, -4, -9 auf verschiedenen Zelllinien

Zellen/Passage	Virus	24 h	48 h	72 h	120 h
ED p 53	EHV- 1	++++	++++	++++	++++
	EHV- 4	+	++++	++++	++++
	EHV- 9	+++	++++	++++	++++
TUW p 18	EHV- 1	-	±	±	-
	EHV- 4	-	±	±	+
	EHV- 9	-	+	+	+
MDBK p185	EHV- 1	+	++++	++++	++++
	EHV- 4	-	+	+++	+++
	EHV- 9	+	+++	++++	++++
RK 13 p 147	EHV- 1	++++	++++	++++	++++
	EHV- 4	-	-	-	-
	EHV- 9	++++	++++	++++	++++
Oligo p 110	EHV- 1	+	+++++	++++	++++
	EHV- 4	-	+	+++	++++
	EHV- 9	+	+++	++++	++++
Vero p 30	EHV- 1	-	±	±	±
	EHV- 4	-	±	+	+
	EHV- 9	-	+++	+++	+++
MDCK p 185	EHV- 1	-	-	-	-
	EHV- 4	-	-	-	-
	EHV- 9	-	-	-	-
CrFK p 243	EHV- 1	-	-	-	-
	EHV- 4	-	-	-	-
	EHV- 9	-	-	-	-
JK Milz p 176	EHV- 1	-	+	+	+
	EHV- 4	-	-	+	+
	EHV- 9	+	+++	+++	+++
Ferkelhaut p 53	EHV- 1	-	±	+	+++
	EHV- 4	-	-	-	-
	EHV- 9	-	±	+	+++

- = kein Wachstum

+ = wenige Plaques

++ = Plaques

+++ = viele Plaques

++++ = sehr viele Plaques

± = sehr schwache Plaques

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin angefertigt.

Dem jetzt emeritierten ehemaligen Leiter des Instituts für Virologie der FU-Berlin, Herrn Prof. Dr. Hanns Ludwig danke ich für die freundliche Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Klaus Osterrieder, dem Direktor des Instituts für Virologie der FU-Berlin, unter dessen Leitung des Instituts ich diese Arbeit beenden konnte danke ich herzlich.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Kerstin Borchers für die Überlassung des Themas und die freundliche und engagierte Betreuung der gesamten Arbeit. Ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Auch gilt mein Dank Fr. Prof. Dr. Sterner-Kock von der Tierpathologie der FU-Berlin sowie Ihren freundlichen Mitarbeitern für die Hilfe bei den Immunperoxidase-Untersuchungen sowie die Überlassung von Fotos für diese Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie der FU-Berlin möchte ich für Ihre Hilfe danken, die mit Ihrer praktischer Unterstützung zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere gilt mein Dank hier Frau Tine Leiskau, Annelie Büchel und Ann Reum.

Schließlich Dank an alle die mich während der Arbeit mit Ideen, Diskussionen und Rat unterstützt haben: Marisa, Marco, Alexandra, Oliver, Ina und meine Freunde.

10. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Literatur eigenständig erstellt habe.

Berlin, den 15.07.2008

Daniel Böttner