

# Möglichkeiten und Grenzen der ätiologischen Differenzierung der equinen Herpesvirusinfektionen

O.-R. Kaaden, N. Osterrieder und W. Eichhorn

## Zusammenfassung

Von den fünf Herpesviren der Pferde sind drei Spezies für die Pferdepopulation als Krankheitserreger bedeutsam: 1. das equine Herpesvirus vom Typ 1 (EHV-1) verursacht den Virusabort und wird zudem mit neurologischen Symptomen in Verbindung gebracht. Es ist mit dem equinen Herpesvirus Typ 4 (EHV-4) serologisch und genetisch eng verwandt (Allen und Turtinen 1982). Das vorherrschende klinische Bild, das durch diese Virusspezies hervorgerufen wird, ist eine meist mild verlaufende Infektion des oberen Respirationstraktes (Rhinopneumonitis).

Das equine Herpesvirus vom Typ 3 (EHV-3) ist weit weniger bedeutsam und führt durch venerische Übertragung zur Ausprägung des Koitalexanthems in der Genitalschleimhaut bei Stuten und Hengsten (Pascoe et al. 1968).

Die Infektion mit dem equinen Herpesvirus 2 (EHV-2; Cytomegalovirus) verläuft im allgemeinen ohne klinische Symptome. Für das EHV-2 ebenso wie für das kürzlich beschriebene equine Herpesvirus 5 (EHV-5; Agius et al. 1992) gibt es in der Bundesrepublik Deutschland keine gesicherten Hinweise für eine klinische Relevanz.

Die Diagnose bei Verdacht auf EHV-1- und EHV-4-Infektionen stützt sich vor allem auf den Nachweis des Antigens in Organen von abortierten Feten (EHV-1) bzw. aus Nasentupfern (EHV-4) durch Immunofluoreszenz und Virusnachweis in der Zellkultur.

Als neue Methode steht auch der direkte Nukleinsäurenachweis mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Verfügung. Mit dieser Methode ist die Differenzierung zwischen EHV-1 und EHV-4 einerseits, aber auch zwischen dem in Deutschland weit verbreiteten Lebendimpfstamm RaCh und Feldvirusisolate innerhalb von 8 h nach Eingang des Probenmaterials möglich (Osterrieder et al. in Vorbereitung). Unsere vergleichenden Untersuchungen ergaben, daß die PCR-Methode eine verlässliche und sensitive Diagnose erlaubt.

Die serologische Untersuchung hinsichtlich dieser beiden Viren basiert vor allem auf dem Serumneutralisationstest. Dessen Aus-

sagekraft und die Möglichkeiten einer serologischen Differenzierung zwischen beiden Viren sind allerdings zurückhaltend zu beurteilen. So ist eine einmalige Statuserhebung unzureichend. Nur ein Antikörperanstieg innerhalb eines Zeitintervalles von 2 bis 3 Wochen kann auf eine abgelaufene Infektion deuten. Seit kurzem steht darüber hinaus ein ELISA mit gentechnologisch (rekombinantem) EHV-1-Glykoprotein aus Insektenzellen zur Verfügung, der in seiner Sensivität dem SNT entspricht, dessen Praktikabilität aber in weiteren Versuchen erprobt werden muß.

Der Nachweis von EHV-3 wird ebenfalls mit der Immunofluoreszenz und dem Erregernachweis in der Zellkultur geführt. Durch das relativ seltene Vorkommen und das eindeutige klinische Bild ist jedoch mit diesen Verfahren eine verlässliche Diagnose möglich. In dem Beitrag werden aktuelle Zahlen über die Inzidenz und Prävalenz der EHV-Infektionen aufgrund der Diagnostikbefunde des Institutes präsentiert.

## Einleitung

Die neueste Klassifikation und Nomenklatur der Viren (Francki et al. 1991) umfaßt die Unterfamilien Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae. Bei den Pferden sind bisher fünf genuine Herpesviren bekannt, die den Unterfamilien Alphaherpesvirinae (equines Herpesvirus 1, 4 und 3) sowie Betaherpesvirinae (equines Herpesvirus 2) angehören. Die equinen Herpesviren 6, 7 und 8 kommen nur bei Eseln vor und spielen veterinärmedizinisch keine wesentliche Rolle (Roizman 1992). Daneben können sich Pferde auch mit dem porzinen Herpesvirus 1, dem Aujeszky-(Pseudorabies-)Virus, infizieren und unter den typischen Symptomen der Pseudowut erkranken. Diese Herpesvirusinfektion bzw. -erkrankung soll in diesem Beitrag nicht näher besprochen werden, da sie zahlenmäßig von untergeordneter Bedeutung ist.

Herpesviren im allgemeinen, und equine Herpesviren im besonderen, sind zu persistierenden bzw. latenten Virusinfektionen befähigt. Beides sind Sonderformen der Virusreplikation, die ohne klinische Erschei-

nungen einhergehen und daher eine besondere Problematik für die Diagnostik von Herpesviren darstellen. Da die Begriffe Viruslatenz und Viruspersistenz häufig fälschlicherweise als Synonyme bezeichnet werden, soll hier zunächst noch einmal eine Definition der Begriffe gegeben werden.

**Viruslatenz:** Sie stellt eine Sonderform der Virus-Wirtszell-Interaktion dar, bei der kein infektiöses Virus gebildet wird. Die Virusreplikation beschränkt sich vielmehr auf die Synthese der viralen Nukleinsäure oder Proteine oder Teile von beiden.

**Viruspersistenz:** Bei dieser Form wird infektiöses Virus gebildet, die betroffene Wirtszelle aber im allgemeinen nicht im Sinne eines lytischen Effektes geschädigt wird. Es liegt also ein biologisches Gleichgewicht zwischen Wirtszelle und Erreger vor.

Latente oder persistierende Virusinfektionen können aber durch wirtsbedingte Faktoren (Stress, Hormone, immunsuppressive Behandlung usw.) im Sinne eines produktiven Vermehrungszyklus mit Ausschcheidung in infektiösem Virus aktiviert werden. Mit den üblichen diagnostischen Methoden sind diese Formen der Herpesvirusinfektion nicht oder nicht sicher zu bestimmen. Letztlich können nur molekularbiologische Methoden, wie z. B. Hybridisierungstechniken, Restriktionsanalyse viraler DNA oder die Polymerasekettenreaktion (PCR) in Sektionsmaterial oder peripheren Blutzellen latentes oder persistierendes Herpesvirus nachweisen. Alle genannten Verfahren sind zwar in unserem Institut etabliert, doch sind sie für Routineuntersuchungen zu aufwendig.

In jedem Fall muß beim Nachweis EHV-spezifischer Antikörper auch mit dem Vorhandensein von okkultem Virus gerechnet werden. Der negative Antikörpernachweis schließt somit latentes oder persistierendes Virus nicht aus.

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München

**Ergebnisse und Diskussion**

Herpesviren stellen neben den Influenzaviren die häufigste Ursache von Viruserkrankungen bei Pferden dar. Von den bislang beschriebenen fünf equinen Herpesviren sind drei Spezies obligat pathogen und verursachen akute klinische Erkrankungen und hohe wirtschaftliche Verluste.

Dazu gehört zum einen das equine Herpesvirus 1 (EHV-1), das der Erreger des Stutenabortes ist. Ebenfalls zur Subfamilie Alphaherpesvirinae ist das equine Herpesvirus 4 (EHV-4) zu rechnen, das die Rhinopneumonitis verursacht. Jedoch ist bei diesem Virus auch ein abortogenes Potential vorhanden, so daß gelegentlich auch aus abortierten Feten EHV-4 isoliert bzw. virusspezifisches Antigen nachgewiesen werden kann.

Neben der genitalen und respiratorischen Lokalisation werden beide Viren auch mit zentralnervösen Symptomen in Verbindung gebracht. In der Literatur wird jedoch übereinstimmend darüber berichtet, daß der Virus- bzw. Antigennachweis in Gehirn-, Rückenmark- und Liquorproben solcher Pferde mit zentralnervösen Symptomen zumeist negative Ergebnisse erbracht hat. Auch mit einer modifizierten PCR (Polymerase chain reaction), die den Nachweis von 50 physikalischen Viruspartikeln erlaubt, ist es uns bisher nicht gelungen, EHV-1- oder EHV-4-Genomsequenzen im ZNS oder im Liquor nachzuweisen. Ähnliche Ergebnisse liegen unter Verwendung der In-situ-Hybridisierung vor (Dahme persönl. Mitteilung). In einer kürzlichen Studie gelang es dagegen Thein et al. (1993), bei Pferden mit der paretisch-paralytischen Verlaufsform EHV-spezifische DNA mittels molekularbiologischer Techniken nachzuweisen. Allerdings verlief auch in diesen Fällen die Virusisolierung negativ. Da serologische Untersuchungen einen mittelbaren Zusammenhang zwischen equinen Herpesvirusinfektionen und einer zentralnervösen Symptomatik suggerieren, wird ein Autoimmunitätsgeschehen in der Pathogenese dieser Erkrankung diskutiert.

Das equine Herpesvirus 3 ist der Erreger einer venerischen Infektion bei Stuten und Hengsten, des sogenannten Coitalexanthems oder Bläschenausschlages. Obwohl die Inzidenz dieser Erkrankung deutlich hinter den EHV-1- und EHV-4-Infektionen zurücktritt, kommen sporadische Krankheitsfälle doch gelegentlich auch in der Bundesrepublik zur Beobachtung.

Das equine Herpesvirus 2, ein Cytomegalievirus, wurde zunächst bei Fällen von Keratokonjunktivitis festgestellt. Aber auch diesem Herpesvirus kommt ebenso wie dem in Australien beschriebenen equinen Herpesvirus 5 nach den Erfahrungen unserer Institutsdiagnostik keine wesentliche Bedeutung als Pathogen zu.

Das Schwergewicht im Infektionsgeschehen mit equinen Herpesvirusinfektionen liegt beim EHV-1. Von den zwischen 1979 und 1993 insgesamt untersuchten 1286 abortierten Feten wurden in 242 Fällen (18,8 Prozent) durch fluoreszenzserologischen Antigennachweis und Zellkulturnachweis von replikationsfähigem Virus EHV-1-positive Befunde erhoben. Die jahresmäßige Verteilung positiver und negativer Proben ist in Abbildung 1 dargestellt. Daraus geht ein-

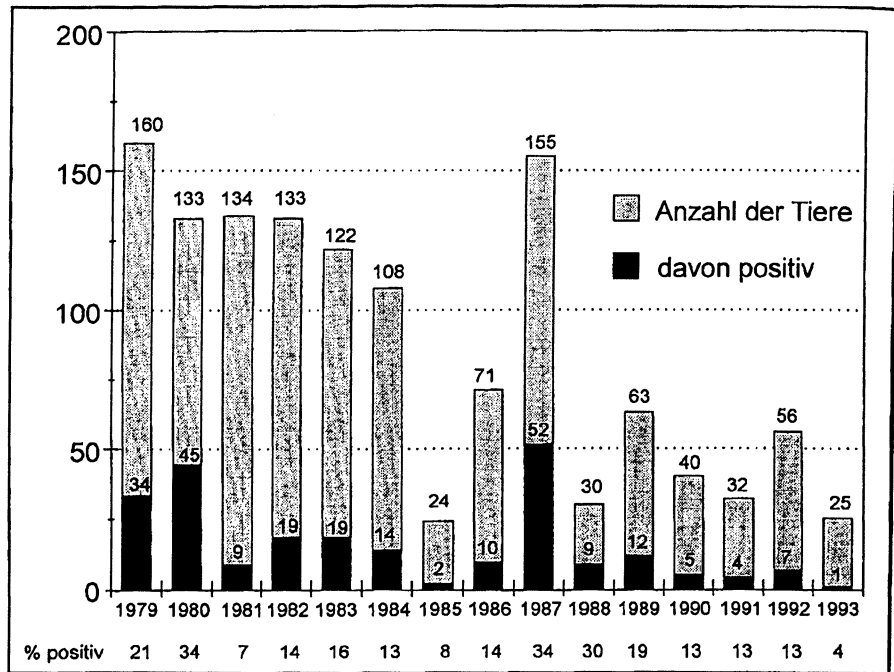


Abb. 1: EHV-1-Diagnostik aus abortierten Fohlen von 1979 bis 1993

deutig hervor, daß ab Mitte der 80er Jahre ein signifikanter Rückgang — mit Ausnahme des Jahres 1987 — EHV-1 bedingter Aborte zu verzeichnen ist. Diese erfreuliche Entwicklung ist ohne Zweifel auf die Einführung EHV-1- bzw. EHV-4-spezifischer Impfstoffe zurückzuführen. Die konsequente und regelmäßige Anwendung der EHV-Impfstoffe verringert nicht nur den Anteil virusbedingter Aborte bei Stuten, sondern reduziert auch die Verluste durch das paretisch-paralytische Syndrom. Dabei ist es nach eigenen Feststellungen relativ unerheblich, ob die Impfpfahaxe mit Lebendvakzinen oder mit inaktivierten Impfstoffen praktiziert wird.

Die Diagnose der EHV-1- und EHV-4-Infektionen kann durch einen Virusnachweis in der Zellkultur mittels Nasentupfer- bzw. Tracheaspülproben und anschließender Identifikation des Virus durch Immunfluoreszenz oder Virusneutralisationstest erzielt werden. Ein schneller Nachweis gelingt durch den fluoreszenzserologischen Antigennachweis in Leber, Lunge oder Milzproben abortierter Feten. Eine Differenzierung zwischen einer EHV-1- und EHV-4-Infektion ist mit routinemäßigen Methoden bislang nicht möglich. Hierfür muß gegebenenfalls eine Restriktionsanalyse mit viraler EHV-DNA eingesetzt werden (Studdert et al. 1981). Ergänzend wurde in unserem Institut eine PCR etabliert, die einen sensitiven und spezifischen Nachweis EHV-1-spezifischer DNA innerhalb von etwa 8 Stunden im Probenmaterial ohne Virusanzüchtung erlaubt (Osterricker et al. in Vorbereitung). Zugleich bietet dieses Verfahren die Möglichkeit der Differenzierung zwischen EHV-1-Feld- und -Impfvirus (Rach). Die bisherigen, an etwa 50 abortierten Feten durchgeführten vergleichenden Untersuchungen mit der Immunfluoreszenz, Virusanzüchtung und DNA-Nachweis durch PCR haben ergeben, daß eine hohe Korrelation zwischen den Resultaten der Virusanzüchtung und

der PCR besteht. Darüber hinaus haben sich in diesen Untersuchungen keine Hinweise für eine Beteiligung des Impfvirus am Abortgeschehen ergeben.

Ähnliche Einschränkungen bezüglich der Differenzierung zwischen EHV-1 und EHV-4 treffen auch für die homologen Antikörper zu. Gegenwärtig wird der EHV-spezifische Antikörpernachweis vorwiegend im Serumneutralisationstest durchgeführt. Dieses Verfahren erfordert den Einsatz von Zellkulturen, ist arbeitsintensiv und erbringt ein Resultat etwa in 6 bis 7 Tagen. Gegenwärtig erproben wir einen ELISA zum Nachweis EHV-spezifischer Antikörper, bei dem ein durch gentechnologische Verfahren in Insektenzellen exprimiertes Strukturprotein verwendet wird. Der Test ist in seiner Spezifität dem Serumneutralisationstest vergleichbar, erfordert keine Zellkulturtechnik und erbringt ein Ergebnis innerhalb weniger Stunden nach Probeneingang.

**Literatur**

1. AGIUS, C. T., H. S. NAGESHA und M. J. STUDDERT: Equine herpesvirus 5: Comparisons with EHV 2 (equine cytomegalovirus), cloning, and mapping of a new equine herpesvirus with a novel genome structure. *Virology* 191, 176—186 (1992).
2. ALLEN, G. P., and L. W. TURPINEN: Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of equine herpesvirus 1. *J. Virol.* 44, 249—255 (1982).
3. BLANCHARD, T. L., R. M. KENNEY and P. J. TIMONEY: Venereal disease. *Vet. Clinics of North America: Equine Practice*: 8, 191—203.
4. FRANCKI, R. B. I., C. M. FAUQUET, D. L. KNUDSON and F. BROWN: Classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2 (1991).
5. PASCOE, E. R., P. B. SPRADBROW und T. J. BAGUST: Equine coital exanthema. *Austr. Vet. J.* 44, 485 (1968).
6. ROIZMAN, B.: The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123, 425—449 (1992).
7. STUDDERT, M. J., T. SIMPSON und B. ROIZMAN: Differentiation of respiratory and abortogenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science* 214, 562—564 (1981).
8. THEIN, P., G. DARAI, W. JANSSEN, R. D. BERGLE, W. STRUBE und G. FLOSS: Neuere Erkenntnisse zur Ätiopathogenese der paretisch-paralytischen Verlaufsform der Herpesvirusinfektion des Pferdes. *Tierärztl. Praxis* 21, 445—450 (1993).

Anschrift der Verfasser: Veterinärstraße 13, 80539 München