

Untersuchungen zur Stammvariabilität von Pferdeherpesviren des Typs EHV-4

P. Thein¹ und P. Huselstein²

¹Tierärztliche Fakultät München, ²Bundesministerium für Gesundheit, Bonn

Zusammenfassung

EHV-1 und EHV-4 weisen eine hohe Antigenverwandtschaft auf, sind aber nur bedingt kreuzreaktiv. Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, daß es beim EHV Typ 4 durchaus Unterschiede in der Ausprägung der Stärke der Kreuzreaktionen gibt und daß die Biovariabilität innerhalb der EHV-4 Stämme größer ist als bisher angenommen. Die möglichen Auswirkungen für die Entwicklung immunogener Vakzine werden besprochen.

Schlüsselwörter: Equines Herpesvirus Typ1 (EHV1), Equines Herpesvirus Typ4 (EHV-4), Homologie, Kreuzreaktionen, Antigenität, Stammauswahl für Impfstoffe

Investigations on the strain variability of Equine herpesviruses type 4

In spite of their high antigenic similarity EHV1 and EHV-4 are only crossreactive to a limited extent. The present work shows that there are differences in the distinction of the strength of the crossreaction and that the biovariability within the equine herpesvirus type 4 is bigger than assumed up to now. The possible consequences for the development of immunoprotective vaccines are discussed.

Keywords: Equine herpesviruses type 1 (EHV1), Equine herpesviruses type 4 (EHV-4), Homology, Cross Reactions, Antigenicity, Choice of strains for vaccines

Einleitung

Infektionen mit den beiden Virustypen Equines Herpesvirus 1 (EHV-1) und Equines Herpesvirus 4 (EHV-4) sind weltweit verbreitet. Sie kommen in allen Pferdezuchtgebieten meist in enzootischer Form vor (Mason *et al.*, 1989; Matumoto *et al.*, 1965; Thein, 1974; Thein, 1996) und verursachen nach wie vor wirtschaftliche Verluste.

Untersuchungen von Thein und Härtel (1977) zufolge, denen Serumpaarprouben von Pferden aus der gesamten Bundesrepublik zugrunde lagen, hatten sich etwa 70% der bundesdeutschen Pferde bis zum Ende ihres dritten Lebensjahres mit EHV-1 auseinandergesetzt.

Aus der gleichen Untersuchung geht hervor, dass der Anteil der an respiratorischen Erkrankungen beteiligten equinen Herpesviren EHV-1 und EHV-4 höher ist als der Anteil an Pferdeinfluenzaviren der Serotypen 1 (H7 N7) und 2 (H3 N8).

Die aktuelle Situation in der deutschen Vollblutpopulation geben die Ergebnisse von Wissing (1993) wieder. Danach liegt bei 7 bis 12 Monate alten ungeimpften Fohlen ein Durchseuchungsgrad von 15,3% mit EHV-4 und 7,7% mit EHV-1 vor. Bei nicht geimpften Rennpferden liegt der Durchseuchungsgrad dagegen bei etwa 70%.

Dass beide Virustypen ätiopathogenetisch für die genannten Erkrankungen – häufig auch in Kombination – in Frage kommen, kann mittlerweile als gesichert angesehen werden (Chowdhury *et al.*, 1986; Thein, 1974; Thein *et al.*, 1987; Thein und Brown, 1988; Thein, 1996). Es liegt daher auf der Hand, dass eine wirksame Impfpfrophylaxe nur durch Immunisierung mit Vakzinen, die ein möglichst breites Spektrum der Immunogene beider Virustypen enthalten, erfolversprechend

sein kann. Dass dabei der Auswahl der Virusstämme, die für eine Vakzine in Frage kommen, eine wichtige Rolle zukommt, kann einmal mehr aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden.

Material und Methoden

Insgesamt wurden 5 EHV-Stämme in die Untersuchungen einbezogen. Es handelte sich dabei um 4 Stämme, die von Thein bei früheren Untersuchungen in Deutschland isoliert worden waren, und einen aus den USA stammenden Virusstamm. Eine Übersicht ist in Tabelle 1 gegeben.

Virologische Untersuchungen

Die Virusanzucht erfolgte nach üblichen Methoden auf Equine derm (ED-Zellen) Gewebekulturen. Danach wurde das Virus-Zellgemisch durch Ultrazentrifugation im isopyknischen Dichtegradienten (15–45%ige Saccharoselösungen) aufgetrennt und die gereinigten Virionproteine mit Hilfe der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Lämmli (1970) aufgespalten.

Der elektrophoretische Transfer der in der SDS-Page aufgetrennten Proteine auf Transfermembran erfolgte nach dem von Burnette (1981) beschriebenen Prinzip.

Zur anschließenden Immunfärbung wurden Kaninchenhyperimmunseren aus eigener Herstellung eingesetzt.

Hybridisierungsexperimente

Equine Herpesviren der Serotypen 1, 2 und 4 wurden nach Anzucht auf Equine Derm Zellen bei 100% cpE (cytopathischer Effekt) geerntet und die Virus-DNA nach verschiedenen Zentrifugations- und Proteinverdauungsschritten mit eisgekühltem Ethanol (98%) ausgefällt und gelagert.

Durch Markierung mit Digoxigenin wurden eigene DNA-Sonden hergestellt und der Markierungserfolg mit Hilfe des DOT-Blotting Verfahrens überprüft.

Die sich anschließende Hybridisierung wurde entsprechend einer Modifikation der Southern-Technik (Southern, 1975) durchgeführt.

Tab. 1: Untersuchte Virusstämme

Investigated virus strains

Typ	Stamm	Herkunft	Quelle
EHV-1	MAR'87	abortiertes Fohlen	Thein BRD 1987
EHV-2	T400	untere Atemwege Fohlen	Thein BRD 1976
EHV-4	T252	Nasensekret Pferd	Thein BRD 1976
EHV-4	T473	Gehirn Pferd	Thein BRD 1977
EHV-4	NVSL	Nasensekret Pferd	National Veterinary Service Laboratory USA

Serologische Untersuchungen

Zur Herstellung von Hyperimmunseren wurden Kaninchen mit bandengereinigtem Virusmaterial (150 µg Virusprotein bei der Grundimmunisierung und je 100 µg Virusprotein bei den Boosterimmunisierungen) 3 x im Abstand von 2 Wochen und nach weiteren 6 Wochen noch 2 x in 6-wöchigem Abstand intracutan immunisiert. Vor jeder Immunisierung wurde Blut entnommen und mit Hilfe des Serumneutralisationstests (Mikrotitersystem) untersucht. Die Auswertung erfolgte nach Kärber (1931).

Ergebnisse

Glycoproteine von EHV-1 und EHV-4 Stämmen

Die Untersuchung der Proteinkomponenten erfolgte an extrazellulärem Virus mit Hilfe der SDS-Page.

Dabei zeigten sich sowohl für den EHV-1 Stamm MAR'87 als auch für die einzelnen EHV-4 Stämme unterschiedliche spezifi-

sche Muster, welche eine inter- und intrastammspezifische Zuordnung erlauben.

Stammspezifische Antigenmuster

Um Stammspezifitäten der nachgewiesenen antigenen Strukturen abzuklären, waren Kaninchenhyperimmunseren gegen verschiedene EHV-1 und EHV-4 Stämme hergestellt und als Antikörper bei der Immunfärbung eingesetzt worden. Hierbei handelte es sich um die Stämme EHV-1 MAR'87, EHV-4 NVSL und EHV-4 T252. Als antigene Strukturen wurden bei EHV-1 MAR'87 Proteine mit Molekulargewichten von 281, 269, 180, 151, 134, 125, 100, 63, 55, 42, 36 und 32 kDa, sowie bei EHV-4 NVSL von 270, 195, 186, 141, 120, 114, 104, 75, 63, 57, 48, 39, 30, 25 und 21 kDa durch das jeweils homologe Serum erkannt.

Das gegen EHV-4 T252 gerichtete Serum erkannte homologe Proteine von 254, 145, 133, 110, 85, 64, 55, 42, 33 sowie 23 kDa.

Trotz der relativ großen Übereinstimmung bei der unspezifischen Proteinfärbung im gesamten Proteinmuster zeigten sich somit deutliche Unterschiede hinsichtlich der antigen dominanten Bereiche.

Bei EHV-1 MAR'87 färbten sich Banden bei 180, 150, 100 und 63 kDa, bei EHV-4 NVSL bei 63, 47 und 39 kDa und bei EHV-4 T252 bei 145 und 85 kDa besonders deutlich an (siehe Tabelle 2).

Kreuzreaktionen zwischen dem EHV-1 Stamm und den EHV-4 Stämmen

Im Westernblot zeigten sich starke Kreuzreaktionen zwischen EHV-1 MAR'87 und den EHV-4 Stämmen T252, T473 und NVSL, wenn polyclonale Kaninchenhyperimmunseren gegen jedes Virus eingesetzt wurden (Abb. 1, 2, 3).

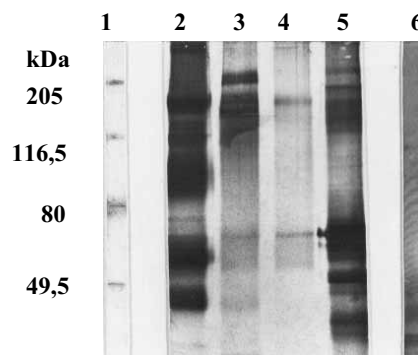


Abb.1: Immunfärbung mit Kaninchenserum gegen EHV-1 MAR'87
Immunostaining using rabbit serum against EHV-1 MAR'87

Dabei erkannte das gegen EHV-1 MAR'87 gerichtete Serum die gleichen Proteine wie die jeweils homologen Seren, so auch die Proteine des Stammes NVSL im niedermolekularen Bereich bei 61, 40 und 32 kDa. Durch diese unterscheidet sich der Stamm NVSL deutlich von den beiden anderen EHV-

4 Stämmen Beim Stamm T473 reagierten im Vergleich zu NVSL und T252 weniger Proteine, und deren Reaktion fiel darüber hinaus qualitativ schwächer aus (Abb.1).

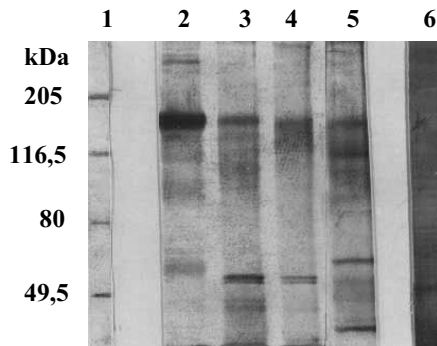


Abb. 2: Immunfärbung mit Kaninchenserum gegen EHV-4 T252
Immunestaining using rabbit serum against EHV-4 T252

Mit dem Kaninchenhyperimmunserum gegen den Stamm EHV-4 T252 ließen sich die antigenen Proteine des Stammes EHV-1 MAR'87 sämtlich anfärben. Beim Stamm EHV-4 NVSL wurden die stark antigenen Proteine im niedermolekularen Bereich, die sowohl homolog von EHV-4 NVSL als auch heterolog von EHV-1 erkannt worden waren, nicht dargestellt. Das Muster der antigenen Proteine des Stammes EHV-4 T473 entsprach dem des Stammes EHV-4 T252 (Abb.2).

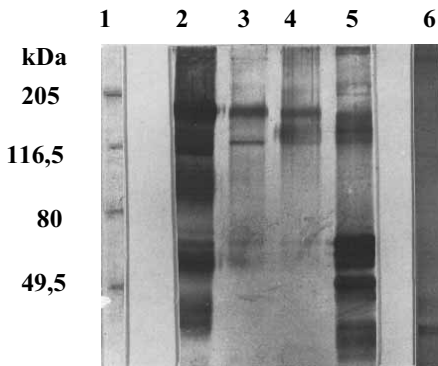


Abb. 3: Immunfärbung mit Kaninchenserum gegen EHV-4 NVSL
 Spur 1 Markerproteine Spur 2 EHV-1 MAR'87
 Spur 3 EHV-4 T252 Spur 4 EHV-4 T473
 Spur 5 EHV-4 NVSL Spur 6 Zellkontrolle

Immunestaining using rabbit serum against EHV-4 NVSL

Das Serum gegen den Stamm EHV-4 NVSL erkannte bei EHV-1 MAR'87 alle antigenen Strukturen. Die Immunfärbung der Proteine der Stämme EHV-4 T252 und EHV-4 T473 war zwar nicht so deutlich, doch auch hier wurden die antigen-dominanten Bereiche erkannt (Abb. 3).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Kreuzreaktionen zwischen den untersuchten EHV-Stämmen zeigt Tabelle 3.

Restriktionsenzymmuster verschiedener EHV-Stämme

Um abzuklären, ob sich die deutlichen Unterschiede im Proteinmuster der EHV-4 Stämme NVSL und T252 bzw. T473 auch

auf DNA Ebene wiederfinden, wurde die DNA dieser Stämme mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und untersucht.

Erwartungsgemäß wurde bei dieser Untersuchung bestätigt, dass die Wahl der Restriktionsenzyme die Unterscheidungsmöglichkeit der Stämme auf DNA Ebene stark beeinflusst.

Tab. 2: Antigenen Proteine verschiedener EHV Stämme nach Immunfärbung mit Hyperimmunkaninchenserum gegen EHV-4 NVSL/T252 und EHV-1 MAR'87

Antigenic proteins of different EHV-strains following immunestaining using hyperimmune rabbit serum against EHV-4 NVSL/T252 and EHV-1 MAR'87

Serum: Virus:	Kaninchen EHV-4 NVSL	EHV-4 T252	EHV-1 MARi87
270-280 kDa	+		+
245-254 kDa		+	
180-195 kDa	+		+
151-154 kDa			+
141-145 kDa	+	++	
133-134 kDa		+	+
120-125 kDa		+	+
110-114 kDa		+	+
100 kDa			+++
85-89 kDa		+++	
61-64 kDa	+++	+	+++
55-58 kDa	+	+	+
47-51 kDa	+++		
39-42 kDa	+++	+	+
36 kDa			+
30-33 kDa	+	+	+
23-25 kDa	+	+	

+ bis +++ unterschiedliche Intensität der Antigen-Antikörper Reaktion

Wie Abb.4 erkennen läßt, wird bei Verwendung von BGL II innerhalb der Bereiche von 23,1 kB bis 9,42 kB zwischen den EHV-4 Stämmen NVSL versus T252 und T473 unterschieden. Bei Verwendung von BAM HI dagegen lassen sich auch in diesen kB-Bereichen keine Differenzen im Schnittmuster nachweisen (Abb.5).

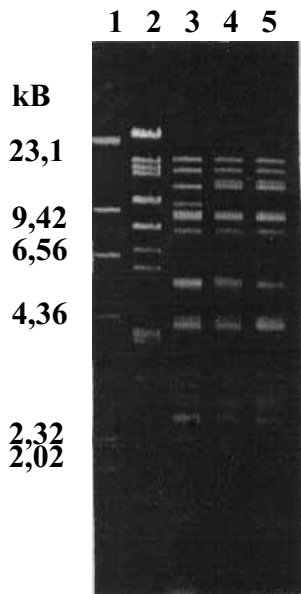


Abb. 4: BGL II
 Spur1 Markerproteine
 Spur 2+6 EHV-1 MAR'87
 Spur 4+8 EHV-4 T252

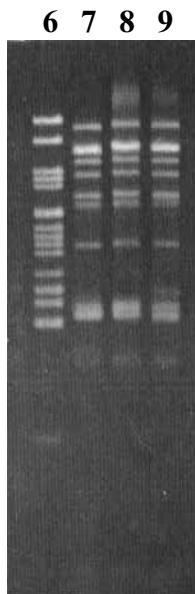


Abb. 5: BAM HI
 Spur 3+7 EHV-4 NVSL
 Spur 5+9 EHV-4 T473

Trotz vorhandener, immunologisch nachgewiesener Kreuzreaktionen des Stammes EHV-1 MAR'87 mit Immunsereen gegen die verschiedenen EHV-4 Stämme, zeigt dieser Stamm, unabhängig vom eingesetzten Enzym, ein deutlich anderes Schnittmuster als die EHV-4 Stämme.

Tab. 3: Homologien verschiedener EHV Stämme bei Immunfärbung.
Homologies of different EHV-strains following immunostaining

Antigen	Immunsereum gegen		
	EHV-1 MARi87	EHV-4 NVSL	EHV-4 T252
EHV-1 MARi87	+++	+++	+
EHV-4 NVSL	+++	+++	+
EHV-4 T252	++	+	+
EHV-4 T473	++	+	+

+ bis +++ unterschiedliche Intensität der Antigen-Antikörper Reaktion

Immunogenität der verschiedenen EHV-4 Stämme

Die unterschiedliche Antigenität der untersuchten Virusstämme als Resultat der bisher beschriebenen Versuche ließ erwarten, dass daraus auch eine qualitativ und quantitativ unterschiedliche Immunogenität abzuleiten wäre.

Um dies zu verifizieren, waren Kaninchen mit den beschriebenen Virusantigenen hyperimmunisiert und deren Seren im Kreuzneutralisationstest untersucht worden.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tab.4.

Tab. 4: Gehalt an kreuzreagierenden, neutralisierenden Antikörpern im Serum hyperimmunisierter Kaninchen

Content of crossreacting, neutralizing antibodies in sera of hyperimmunized rabbits

Antigen im Test	Gehalt an kreuzneutralisierenden Antikörpern im Serum		
	MARi87	NVSL	T252
EHV-1 MARi87	++++	+++	+
EHV-4 NVSL	+++	+++	+
EHV-4 T252	+	+++	+
EHV-4 T473	+	++++	+

+ bis +++ unterschiedliche Intensität der Antigen-Antikörper Reaktion

Unter Berücksichtigung der jeweils absolut höchsten Werte im Kreuzneutralisationstest innerhalb des Untersuchungszeitraumes von einem halben Jahr zeigte sich, dass die Seren der mit EHV-4 NVSL immunisierten Kaninchen den höchsten Gehalt an kreuzreagierenden, neutralisierenden Antikörpern gegenüber den anderen mituntersuchten Viren aufwiesen.

Die Kreuzreaktionen fielen gegen den EHV-1 Stamm MAR'87 mit 1:144 und gegen die Stämme EHV-4 T252 mit 1:144 und EHV-4 T473 mit 1:208 annähernd gleich stark aus.

Die Gehalte kreuzreagierender, neutralisierender Antikörper der Seren der mit EHV-1 MAR'87 immunisierten Kaninchen waren gegen EHV-4 NVSL mit 1:160 höher als gegen EHV-4 T252 mit 1:88 und gegen EHV-4 T473 mit 1:84.

Bei den mit EHV-4 T252 immunisierten Kaninchen fielen die Kreuzreaktionen mit 1:64 gegen EHV-1 MAR'87, 1:80 gegen EHV-4 T473 und 1:84 gegen EHV-4 NVSL am schwächsten aus.

Hybridisierung mit markierter EHV-1 DNA

Die Untersuchungen hatten bis hierhin gezeigt, dass in allen eingesetzten immunologischen Nachweisverfahren der Stamm EHV-4 NVSL immunologisch näher an EHV-1 lag als die beiden anderen EHV-4 Stämme.

Zur Klärung der sich daraus ergebenden Frage, ob NVSL zu EHV-1 eine engere Verwandtschaft aufweist als zu T252 und T473, wurde EHV-1 MAR'87 DNA mit Digoxigenin markiert und zur DNA-DNA Hybridisierung mit verschiedenen EHV-4 Stämmen, nach Restriktionsenzymverdau mit HIND III, als Sonde eingesetzt.

Die verwendete EHV-1 DNA reagierte quantitativ unterschiedlich mit der DNA der untersuchten EHV-4 Stämme. Vor allem die DNA des Stammes T473 scheint stärker mit der EHV-1 DNA zu reagieren, was aber auch auf eine grössere Menge an eingesetzter T473 DNA zurückgeführt werden kann (Abb.6 und Abb.7).

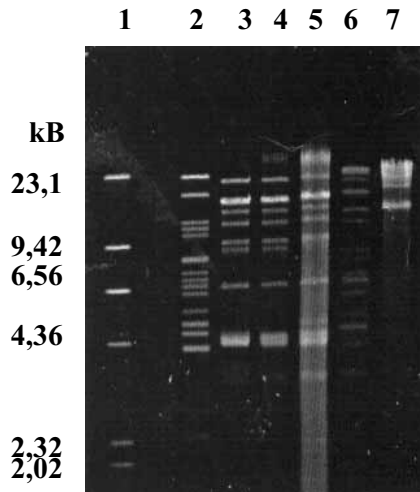


Abb. 6: HIND III Verdau
Spur 1+8 Marker proteine
Spur 3+10 EHV-4 NVSL
Spur 5+12 EHV-4 T473
Spur 7+14 BHV1-Schleswig Holstein

ne Subtypen mit bis zu 4 unterschiedlichen Epitopen vornehmen.

Dass EHV-1 und EHV-4 über gemeinsame und unterschiedliche Proteine verfügen, wurde bereits erwähnt; die sich daraus ergebenden Kreuzreaktivitäten sind in der Literatur mehrfach beschrieben (Allen *et al.*, 1982; Chowdury *et al.*, 1986; Crabb *et al.*, 1990; Crabb *et al.*, 1991; Lämmli, 1970; Meyer *et al.*, 1987; Studdert *et al.*, 1981; Turtinen, 1983; Wissing, 1993). Bei den hier vorliegenden Untersuchungen zur Kreuzreaktivität mit Hilfe polyklonaler Hyperimmunseren zeigten die gegen EHV-4 NVSL gerichteten Seren in der SDS-Page mit Proteinen des EHV-1 Stammes MAR'87 wesentlich stärkere Reaktionen als mit

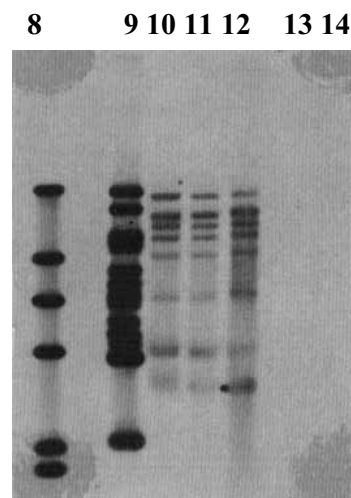


Abb. 7: Hybridisierung mit EHV-1 DNA
Spur 2+9 EHV-1 MAR'87
Spur 4+11 EHV-4 T252
Spur 6+13 EHV2 T400

Unspezifische DNA-Bindungen konnten durch Einsatz von DNA der Virusstämme EHV2 T400 und BHV 1 Schleswig Holstein als Kontroll-DNA bei der Hybridisierung ausgeschlossen werden.

Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Unterschiede in der Antigenität verschiedener Strukturproteine der Equinen Herpesviren vom Typ 1 und Typ 4 zu untersuchen.

Zwar sind die Vertreter der jeweiligen EHV-Typen 1 und 4 generell anhand ihrer Proteinstreifen eindeutig zuzuordnen, innerhalb eines Typs jedoch werden die Unterschiede auf Antigenenebene als eher gering eingestuft (Burrows and Goodridge, 1973; Thompson *et al.*, 1976; Turtinen, 1983).

Chowdhury *et al.* (1986) gelangen zu dem Ergebnis, dass es übereinstimmende und unterschiedliche Proteine bei den beiden EHV-Typen 1 und 4 gibt. Die von ihnen untersuchten EHV-1 Stämme wiesen innerhalb des Typs Homogenität bezüglich ihrer antigenen Proteine auf.

Eine gewisse Heterogenität innerhalb des EHV-Typs 1 wurde von Yeargan *et al.* (1985) nachgewiesen. Mit Hilfe einer Reihe monoklonaler Antikörper konnten sie eine Einteilung in verschiede-

Proteinen der Stämme EHV-4 T252 und T473. Auch umgekehrt reagierten gegen EHV-1 MAR'87 gerichtete Seren mit Proteinen des Stammes NVSL deutlicher als mit denen der beiden anderen EHV-4 Stämme.

Man geht heute davon aus, dass sich Pferdeherpesviren der Serotypen 1 und 4 von einem gemeinsamen Vorläufer durch unterschiedliche Evolution entwickelt haben. Dabei nimmt man an, dass es durch Rekombinationsereignisse, die eine Expansion oder Kontraktion der Inverted Repeat Region einschließen, zur Vereinnahmung oder zum Ausschluss ganzer Gene gekommen ist (Cullinane *et al.*, 1988), wie sie von Davison und McGeoch (1986) auch für HSV-1 und VZV beschrieben wurde. Die Tatsache, dass die beiden Stämme EHV-1 MAR'87 und EHV-4 NVSL in dieser Untersuchung stark kreuzreagieren, legt die Vermutung nahe, dass sich der Stamm EHV-4 NVSL auf seinem evolutionären Weg weniger weit von EHV-1 MAR'87 entfernt hat als die beiden EHV-4 Stämme T 252 und T 473. Allen und Turtinen (1982) fanden die Homologien zwischen EHV-1 und EHV-4 über das gesamte Genom verteilt und nicht auf bestimmte Regionen beschränkt. Höhere Grade an Kreuzhybridisierungen schrieben sie einer stärkeren Konservierung innerhalb des evolutionären Prozesses zu.

In Anlehnung an die Untersuchungen von Allen und Turtinen (1982) über Homologien auf dem Genom von EHV-1 und EHV-

4 wurde versucht, eine engere Verwandtschaft der im Immuno-blot stärker miteinander reagierenden EHV-Stämme nachzuweisen. Dazu wurde die komplette DNA eines der beiden Stämme markiert bei der Kreuzhybridisierung eingesetzt. Dass dieser Nachweis nicht gelang, ist insoweit zu relativieren, als die Gene, die Proteine codieren, nur einen geringen Teil des gesamten Virusgenoms ausmachen. Weitere Untersuchungen mit Hilfe von Gen-Sonden, die diese Gene spezifisch erkennen, wären an dieser Stelle zu fordern.

In dieser Untersuchung konnte mit Hilfe von Kaninchenimmunseren gegen den EHV-4 Stamm NVSL gezeigt werden, dass diese gegen alle im Serumneutralisationstest eingesetzten EHV-Viren, unabhängig von deren Zugehörigkeit zum Typ 1 oder 4, deutlichere Kreuzneutralisationen zeigten als Seren, die gegen den Stamm EHV-4 T252 hergestellt worden waren.

Durch exakte Proteinbestimmung des bandengereinigten Virusmaterials vor jeder Immunisierung konnten quantitative Unterschiede der zur Immunisierung verwendeten Antigenmengen ausgeschlossen werden.

Die stärkere heterologe Mitreaktion zwischen NVSL und MAR'87 kann wiederum als Indiz für eine engere antigene Verwandtschaft dieser beiden serologisch unterschiedlichen EHV-1 und EHV-4 Stämme angesehen werden.

Die gefundenen Unterschiede zwischen einzelnen EHV-4 Stämmen sind besonders im Hinblick auf die Auswahl geeigneter Impfvirusstämme für bivalente Impfstoffe (EHV-1 + EHV-4) von praktischer Relevanz. Dies insoweit, als bei der Auswahl von Impfstämmen solche zum Einsatz kommen sollten, welche aufgrund ihrer größeren Divergenz im antigenen Proteinbereich

eine größere Bandbreite auch nicht kreuzreagierender immunogener Proteine abdecken.

Die heute auf dem Markt befindlichen Impfstoffe auf der Basis von attenuiertem Lebendvirus oder inaktiviertem Virus bieten keinen kompletten Schutz gegen eine EHV-1/4 Infektion, da man bei ihrer Entwicklung der Stimulation der humoralen Abwehr vorrangige Bedeutung gegeben hatte (Thein, 1996).

Dabei wird weder den biologischen Verhaltensweisen der Herpesviren, zum Beispiel ihrer Fähigkeit, sich von Zelle zu Zelle unter Umgehung der humoralen Abwehr auszubreiten, noch der Komplexität der zur Induktion der Immunantwort im Pferd notwendigen Strukturen in ausreichendem Maße Rechnung getragen.

Auf die Unzuverlässigkeit der virusneutralisierenden Antikörpertiter als Indikator für einen immunologischen Schutz des Individuums haben verschiedene Autoren hingewiesen (Bryans, 1968; Mumford and Bates, 1984; Thein, 1996). Fest steht, dass auch hohe Titer von Serumantikörpern beim Pferd keine belastbare Immunität gegen Neuinfektionen bedingen. Vielmehr ist für deren Aufbau, wie bei Herpesviren allgemein, die zellvermittelte Immunität notwendig, zum Einen über antigengeprägte T-Lymphozyten (Thein, 1990), zum Anderen über eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (Mumford and Bates, 1984; Thein, 1996). Auch die Rolle der lokalen Immunität in den Schleimhäuten der natürlichen Eintrittspforten ist zumindest bei einer Erstinfektion nicht zu unterschätzen (Chong et al., 1992).

Diese Erkenntnisse sollten bei der Auswahl möglicher Impfstämme mitberücksichtigt werden, ebenso wie die Art des herzustellenden Impfstoffes und seiner nichtimmunogenen Inhaltsstoffe und die jeweilige Applikationsform.

Die Virusstrukturen, die eine Stimulierung der zellulären Abwehr bedingen, konnten zum Teil als diejenigen Glykoproteine identifiziert werden, die auch von Pferde-hyperimmunseren gegen EHV-1 bzw. EHV-4 in der SDS-Page erkannt werden. Namentlich ist hier das Glykoprotein VP 21/22 zu nennen (Bridges et al., 1988). Dieses Glykoprotein liegt in einem Molekulargewichtsbereich von 38–45 kDa, einem Bereich also, in dem der Stamm NVSL in der vorliegenden Untersuchung ausgeprägte Antikörperreaktionen induzierte. Ob es sich dabei um das Glykoprotein VP 21/22 handelt, kann nur durch Einsatz monoklonaler Antikörper überprüft werden.

Trotz der geringen Anzahl der untersuchten Stämme von Pferdeherpesviren des Typs 1 und 4 in der vorliegenden Arbeit läßt sich sagen, dass die Biovariabilität innerhalb der equinen Herpesviren vom Typ 4 größer zu sein scheint als bisher angenommen. Dies induziert weiterführende Untersuchungen, insbesondere hinsichtlich möglicher Unterschiede auch in der Immunogenität dieser Viren für das Pferd und ihrer Auswirkung auf die Induktion der immunologischen Abläufe im Wirtstier, an deren Ende eine komplexe Immunantwort steht.

Literatur

- Allen G.P. and L.W. Turtinen (1982): Assesment of the base sequence homology between the two subtypes of equine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 44, 249–255
- Bridges C.G., N. Ledgern and N. Edington (1988): The characterisation of equine herpes virus-1-infected cell polypeptides recognized by equine lymphocytes. *Imunol.*, 63, 193–198.
- Bryans J.T. (1968): On immunity to disease caused by equine herpes virus. *J. Am. vet. med. Assoc.*, 156, 294–304.
- Burnette W.N. (1981): "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112, 195–203.
- Burrows R. and D. Goodridge (1973): In vivo and in vitro studies on equine rhino-pneumonitis strains. *Proc. 3rd int. Conf. Equine Infectious Disease Paris 1972*, 306–321.
- Chong Y.C., W.P.H. Duffus and D. Hannant (1992): Natural killer cells in normal horses and specific-pathogen-free foals infected with equine herpesvirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 33, 103–113.
- Chowdhury S.I., W. Hammerschmidt, H. Ludwig, P. Thein and H.J. Buhk (1986): Rapid method for the identification and screening of herpesvirus by DNA fingerprinting combined with blot hybridisation. *J. of Virological Methods*, 14, 285–291.
- Crabb B.S. and M.J. Studdert (1990): Comparative studies of the proteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: antibody response of the natural hosts. *J. Gen. Virol.*, 71, 2033–2041.
- Crabb B.S., G.P. Allen and M.J. Studdert (1991): Characterization of the major glycoproteins of equine herpesvirus 4 and 1 and asinine herpesvirus 3 using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 72, 2075–2082.
- Cullinane A.A., F.J. Rixon and A.J. Davidson (1988): Characterization of the genome of equine herpesvirus 1 subtype 2. *J. Gen. Virol.*, 69, 1575–1590.
- Davison A.J. and D.J. McGeoch (1986): Evolutionary comparisons of the S segments in the genomes of Herpes Simplex type 1 and Varicell-Zoster virus. *J. gen. Virol.*, 67, 597–611.
- Fitzpatrick D.R. and M.J. Studdert (1984): Immunologic relationships between equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus). *Am. J. Vet. Res.*, 45, 1947–1952.
- Kaerber G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm.*, 162, 480.
- Lämml U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680–685
- Mason D.K., K.L. Watkins and C.M. Luk (1989): Hematological changes in two thoroughbred horses in training with confirmed equine herpesvirus 1 infection. *Vet. Rec.*, May, 503–504.
- Matumoto M., R. Ishizaki and T. Shimizu (1965): Serological survey of equine rhino-pneumonitis virus infection among horses in various counties. *Arch. ges. Virusforschung*, 50, 609–623.
- Mayr A. and P. Thein (1984): Aktuelle Viruskrankheiten des Pferdes: Fohlenkrankheiten und Atemwegsinfektionen. *Tierärztl. Prax.*, 12, 481–488.
- Meredith D. M., J.M. Stocks, G.R. Whittaker, J.W. Halliburten, B.W. Snowden and R.A. Killington (1989): Identification of the gB homologues of equine herpes virus types 1 and 4 as disulphide-linked heterodimers and their characterisation using monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, 70, 1161–1172.
- Meyer H., P.H. Hübert and W. Eichhorn (1987): Changes in restriction enzyme pattern of the equine herpes virus type 1 strain RAC-H DNA during attenuation. *J. Vet. Med.*, 34, 310–313.
- Mumford J. A. and J. Bates (1984): Trials of an inactivated equid herpesvirus 1 vaccine: challenge with a subtype 2 virus. *Veterinary Record*, 114, 375–381.
- Southern E.M. (1975): Detection of sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98, 503–17.
- Stokes A., A.H. Corteyn and P.K. Murray (1991): Clinical signs and humoral immune response in horses following equine herpesvirus type-1 infection and their susceptibility to equine herpesvirus type-4 challenge. *Research in Veterinary Science*, 51, 141–148.
- Studdert M. J., T. Simpson and B. Roizmann (1981): Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science USA*, 214, 562–564.
- Thein P. (1974A): Herpesvirus-bedingte Infektionen des Respirationstraktes beim Pferd. *Soc. Ital. Sc. Vet.*, Vol. XXVIII, 50–55.
- Thein P. und G. Härtl (1977): Untersuchungen zur Virusätiologie respiratorischer Erkrankungen beim Pferd. *Der praktische Tierarzt; Colleg. Vet.*, 24–29.
- Thein P. (1979): Aktuelles zur zentralnervösen Verlaufsform der Rhinopneumonitis-Virusinfektion. *Zbl. Vet. Med. B.*, 26, 570–576.
- Thein P. (1981): Infection of the central nervous system (CNS) of horses with equine herpesvirus serotype 1 (EHV-1). *J. South. Afr. vet. med. Ass.*, 52, 239–241.
- Thein P., H. Ludwig und H. Meyer (1987): Beitrag zur molekularen Epizootiologie equiner Herpesviren. *Tierärztl. Umschau*, 1, 23–27.
- Thein P. und K. Brown (1988): Infektion mit equinen Herpesviren und Manifestation am Zentralnervensystem beim Pferd. *Tierärztl. Prax.*, 16, 295–302.
- Thein P. (1990): Was ist los in den Pferdebeständen in Nordrhein-Westfalen? *Wochen-Renn-Kalender, Direktorium für Vollblutzucht und Rennen 20*, 1806–1807.
- Thein P. (1996): Herpesvirusinfektionen des Pferdes. *Handlexikon der Tierärztlichen Praxis Lieferung 198*, 349–349ze.
- Thompson G. R., H.A. Mumford, J. Campbell, L. Griffiths and P. Clapham (1976): Serological detection of equine herpesvirus 1 infection of the respiratory tract. *Equine Vet. J.*, 8, 58–65.
- Turtinen L.W. (1983): Studies on the antigenic and genetic variation between the two subtypes of equine herpesvirus 1. *Dissertation Abstracts International*, B 44, 6, 1742–1743.
- Turtinen L.W., G.P. Allen, R.W. Darlington and J.T. Bryans (1981): Serologic and molecular comparisons of several equine herpesvirus type 1 strains. *Am. J. Vet. Res.*, 42, 2099–2104.
- Wissing E. (1993): Vorkommen von Antikörpern gegen Herpesviren, Influenzaviren, Reoviren, Equines Rhinovirus, Equines Arteritisvirus und Streptococcus equi in der deutschen Vollblutpopulation. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn*.
- Yeargan M. R., G.P. Allen and J.T. Bryans (1985): Rapid subtyping of equine herpesvirus 1 with monoclonal antibodies. *J. of Clinical Microbiology*, 21, 694–697.

Die experimentellen Untersuchungen wurden im Institut für Biologische Forschung (Leitung Prof. Dr. Dr. habil. Peter Thein) Geschäftsbereich Veterinär, der Firma Bayer durchgeführt.
Prof. Dr. Dr. habil. Peter Thein
Lindenstr. 2, 85250 Altomünster
Tel./Fax: (08254) 82 33