

Aus der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik
Professur für Innere Krankheiten der Pferde
der Justus-Liebig-Universität Gießen
und
aus dem Institut für Virologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Nachweis von Antikörpern gegen
Equines Herpesvirus 1 (EHV1) und Equines Herpesvirus 4 (EHV4)
aus der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)
bei Pferden**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
DANIELA WEINBRENNER

Gießen 2004

Aus der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik
Professur für Innere Krankheiten der Pferde
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H.H.L. Sasse
und
aus dem Institut für Virologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

**Nachweis von Antikörpern gegen
Equines Herpesvirus 1 (EHV1) und Equines Herpesvirus 4 (EHV4)
aus der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF)
bei Pferden**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
DANIELA WEINBRENNER
Tierärztin aus Mülheim a.d. Ruhr (Nordrhein-Westfalen)

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.H.L. Sasse

2. Berichterstatter :

Prof. Dr. H.-J. Thiel

Tag der mündlichen Prüfung:

09.02.2004

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	VI
1.	Einleitung	1
2.	Literaturüberblick	3
2.1	Chronisch obstruktive Bronchitis (COB)	3
2.1.1	Geschichtlicher Hintergrund	4
2.1.2	Klinisches Bild	4
2.1.3	Pathomorphologie	5
2.1.4	Ätiologie	9
2.1.5	Pathogenese	11
2.1.6	Klinische Diagnostik	16
2.1.7	Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	16
2.2	Equine Herpesviren	18
2.2.1	Taxonomie	19
2.2.1.1	Herpesvirus-Subfamilien	20
2.2.1.2	Equine Herpesvirusspezies	22
2.2.2	Morphologie	23
2.2.3	Virusgenom und Virusproteine	26
2.2.4	Erregereigenschaften	27
2.2.5	Pathogenese und klinische Symptome	29
2.2.6	Epidemiologie	33
2.2.6.1	Übertragung des Virus	33
2.2.6.2	Geografische Verbreitung der Infektion	34
2.2.6.3	Infektionsbedingte erworbene Immunität	34
2.2.7	Prophylaxe	35
2.2.7.1	Vakzination	36
2.2.7.2	Management	38
2.2.8	Labordiagnostik	40
2.2.8.1	Erregernachweis	40
2.2.8.2	Antikörpernachweis	42

3.	Eigene Untersuchungen	44
3.1	Material und Methoden	44
3.1.1	Pferde	44
3.1.2	Untersuchungen	45
3.1.2.1	Klinische Untersuchung	45
3.1.2.2	Arterielle Blutgase	45
3.1.2.3	Serumproben	46
3.1.2.4	Tracheobronchoskopie	46
3.1.2.5	Patientenklassifizierung	48
3.1.2.6	Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	49
3.1.2.7	Konzentration der Bronchiallavage- flüssigkeit (BALF)	50
3.1.2.8	Inaktivierung des Untersuchungsmaterials	51
3.1.2.9	Neutralisationstest (NT)	51
3.1.2.10	Indirekter Immunfluoreszenztest (IF)	57
3.1.2.11	Harnstoffbestimmung und Ermittlung der BALF-Verdünnung	60
3.1.3	Zellkulturen	61
3.1.3.1	Vero-Zellen	61
3.1.3.2	ED-Zellen	61
3.1.4	Virusstämme	61
3.1.4.1	Equines Herpesvirus 1 (EHV1)	61
3.1.4.2	Equines Herpesvirus 4 (EHV4)	62
3.1.5	Kontrollseren	62
3.1.5.1	Positives Kontrollserum	62
3.1.5.2	Negatives Kontrollserum	62
3.1.6	Medium und Chemikalien	62
3.1.6.1	Gewebekulturmedium	63
3.1.6.2	Trypsin/EDTA-Lösung	63
3.2	Ergebnisse	65
3.2.1	Untersuchungsergebnisse bei den COB-Patienten einschließlich Bestimmung des Erkrankungsgrades	65
3.2.1.1	Ergebnisse der klinischen Untersuchung	66
3.2.1.2	Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse	66

3.2.1.3	Ergebnisse der Tracheobronchoskopie	67
3.2.1.4	Erreichte Rückgewinnungsraten	68
3.2.2	Ergebnisse der virologischen Untersuchungen	68
3.2.2.1	Statistische Auswertung	68
3.2.2.2	Ergebnisse der EHV1-Antikörpertiterbestimmungen mittels Neutralisationstest (EHV1-NT) aus BALF im Gruppenvergleich	70
3.2.2.3	Ergebnisse des EHV1-NT aus BALF innerhalb der COB-Patienten	72
3.2.2.4	Ergebnisse des EHV1-NT aus Serum im Gruppenvergleich	73
3.2.2.5	Ergebnisse des EHV1-NT aus Serum innerhalb der COB-Patienten	75
3.2.2.6	Ergebnisse des EHV1-NT innerhalb der COB-Patienten je nach Impfstatus	76
3.2.2.7	Korrelation der mittels EHV1-NT bestimmten Antikörpertiter zwischen BALF und Serum	78
3.2.2.8	Ergebnisse der EHV1-Antikörpertiterbestimmungen mittels indirektem Immunfluoreszenztest (EHV1-IF) aus BALF im Gruppenvergleich	79
3.2.2.9	Ergebnisse des EHV1-IF aus BALF innerhalb der COB-Patienten	81
3.2.2.10	Ergebnisse des EHV1-IF aus Serum im Gruppenvergleich	82
3.2.2.11	Ergebnisse des EHV1-IF aus Serum innerhalb der COB-Patienten	84
3.2.2.12	Ergebnisse des EHV1-IF innerhalb der COB-Patienten je nach Impfstatus	85
3.2.2.13	Korrelation der mittels EHV1-IF bestimmten Antikörpertiter zwischen BALF und Serum	87

3.2.2.14	Ergebnisse der EHV4-Antikörpertiterbestimmungen mittels Neutralisationstest (EHV4-NT) aus BALF im Gruppenvergleich	88
3.2.2.15	Ergebnisse des EHV4-NT aus BALF innerhalb der COB-Patienten	90
3.2.2.16	Ergebnisse des EHV4-NT aus Serum im Gruppenvergleich	91
3.2.2.17	Ergebnisse des EHV4-NT aus Serum innerhalb der COB-Patienten	93
3.2.2.18	Ergebnisse des EHV4-NT innerhalb der COB-Patienten je nach Impfstatus	94
3.2.2.19	Korrelation der mittels EHV4-NT bestimmten Antikörpertiter zwischen BALF und Serum	96
3.2.2.20	Ergebnisse der EHV4-Antikörpertiterbestimmungen mittels indirektem Immunfluoreszenztest (EHV4-IF) aus BALF im Gruppenvergleich	97
3.2.2.21	Ergebnisse des EHV4-IF aus BALF innerhalb der COB-Patienten	99
3.2.2.22	Ergebnisse des EHV4-IF aus Serum im Gruppenvergleich	100
3.2.2.23	Ergebnisse des EHV4-IF aus Serum innerhalb der COB-Patienten	102
3.2.2.24	Ergebnisse des EHV4-IF innerhalb der COB-Patienten je nach Impfstatus	103
3.2.2.25	Korrelation der mittels EHV4-IF bestimmten Antikörpertiter zwischen BALF und Serum	105

4. Diskussion	106
4.1 Patientengut und Patientenevaluation	106
4.2 Durchführung der BAL	107
4.3 Rückgewinnungsrate	108
4.4 Verfahren zum Nachweis von Herpesvirusantikörpern	109
4.4.1 Neutralisationstest (NT)	109
4.4.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IF)	109
4.5 Nachweisbarkeit von Antikörpern	110
4.6 Vergleich der Ergebnisse der Testverfahren	111
4.7 Vergleich der Gruppen	112
4.8 Vergleich der Faktoren Rasse, COB-Grad, A-aDO ₂ -Wert innerhalb der Gruppe der COB-Patienten	116
4.9 Vergleich des Impfstatus innerhalb der Gruppe der COB- Patienten	117
4.10 Zusammenhang zwischen BALF und Serum	120
4.11 Schlussfolgerungen	122
5. Zusammenfassung	123
6. Summary	125
7. Literaturverzeichnis	127
8. Anhang	152
8.1 Tabellenverzeichnis	152
8.2 Abbildungsverzeichnis	154
8.3 Tabellarischer Anhang	156

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A-aDO ₂	Alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BMDP	biomathical computer programmes
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlendioxid
COB	chronisch obstruktive Bronchitis
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
cpE	zytopathischer Effekt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ED	equine dermis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHV	Equines Herpesvirus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fc	fragment crystalline
FCS	fetales Kälberserum
FILT	Forschungsgesellschaft für Lungen- und Thoraxerkrankungen mbH, 13125 Berlin
gE	Glykoprotein E
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
h.s.	hoch signifikant
IBP	Infektiöse Balanoposthitis
IBR	Infektiöse Bovine Rhinotracheitis
IF	indirekter Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin

IPV	Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis
kbp	Kilobasenpaare
KBR	Komplementbindungsreaktion
kd	Kilodalton
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
k.N.	kein Nachweis
log	Logarithmus
m	Meter
M	Molarität
mAK	monoklonale Antikörper
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
nAK	neutralisierende Antikörper
n.s.	nicht signifikant
NT	Neutralisationstest
O ₂	Sauerstoff
Pa	arterieller Partialdruck
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Q	Quartil
RAO	recurrent airway obstruction
r _s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
slg	schleimhautlokalisierte Immunglobuline
s.s.	schwach signifikant
Tab.	Tabelle
TBS	Tracheobronchialsekret
TCID ₅₀	Gewebekulturinfektiöse Dosis 50 (tissue culture infective dose 50)
UV	ultraviolett
VGv	Virusgebrauchsverdünnung

1. Einleitung

Bei der chronisch obstruktiven Bronchitis (COB) des Pferdes handelt es sich um eine Atemwegserkrankung, die, unabhängig von der variablen Ätiologie, in eine sich selbst erhaltende Entzündung mit dem zentralen Ergebnis der bronchialen Obstruktion mündet (Hajer 1980, Schoon et Deegen 1982, Deegen et al. 1987). Diese ist im Bereich der kleinen Atemwege zu finden und entwickelt sich über verschiedene reversible Grade schließlich zu einer irreversiblen Form (Deegen 1992).

Das Krankheitsbild ist seit langer Zeit als Problem bei Stallhaltung bekannt (Köning 1983, Viel 1983) und war bereits 1955 in 8% der equinen Todesfälle ursächlich. Bis 1982 erhöhte sich dieser prozentuale Anteil auf 22% und gewann damit deutlich an Bedeutung (Köning 1983). Heute stellt die Erkrankung mit über 20% eine der Hauptursachen equiner Morbidität dar (Viel 1983). Trotz dieser großen Bedeutung ist auch heute die genaue Ätiologie der Erkrankung noch nicht aufgedeckt.

Schon früh wurde jedoch der Stellenwert der Infektion im Entstehungsprozeß der COB beschrieben (Dieckerhoff 1884, Dankmeyer 1902, Wester 1915, Hug 1937, Alexander 1959). Insbesondere den virusbedingten Infektionen kommt hierbei eine große Bedeutung zu (Mahaffay 1962, Schmidt et Primer 1975, Cook 1976, Robinson et Sorensen 1978, McPherson et al. 1979), da diese, gefolgt von bakteriellen Sekundärinfektionen, häufig am Anfang der Erkrankung stehen (Gerber 1968, Pick 1970, Kraft 1975). Eine große Bedeutung scheinen hierbei die ubiquitär vorkommenden Equinen Herpesviren 1 (EHV1) und 4 (EHV4) zu besitzen (Reif 1979, Allen 2002).

Obwohl es zahlreiche Daten zu Serum-Antikörpern gegen diese beiden Viren gibt, liegen nach Kenntnis der Autorin zur Zeit noch keine Untersuchungen über entsprechende Antikörpertiter in der Lunge vor, obwohl eine Kontrolle ihrer Konzentrationen zur Abklärung einer viralen Beteiligung an der Atemwegserkrankung bzw. zur Kontrolle von Impferfolgen durchaus sinnvoll erscheint.

Ziel der hier vorgelegten Untersuchungen war es, diese spezifisch gegen EHV1 und EHV4 gerichteten Antikörper in der broncheoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) nachzuweisen, ihren Bezug zu den entsprechenden im Serum gemessenen Antikörpertitern festzustellen, sowie eventuelle Korrelationen zwischen diesen Antikörperspiegeln und dem klinischen Erscheinungsbild und/oder dem Impfstatus aufzudecken.

Zu diesem Zweck kamen zwei Verfahren zum Einsatz: der Neutralisationstest (NT) und der indirekte Immunfluoreszenztest (IF). Dabei gingen Pferde drei verschiedener Gruppen in die Untersuchungen mit ein: Tiere der Gruppe der Klinikpatienten mit diagnostizierter COB (gegen EHV1 und EHV4 geimpfte und nicht geimpfte Tiere), der Gruppe der COB-freien Rennpferde (alle Tiere gegen EHV1 und EHV4 geimpft) und der Gruppe der ebenfalls COB-freien Fohlen (alle Pferde ungeimpft).

2. Literaturüberblick

2.1 Chronisch obstruktive Bronchitis (COB)

Für diese komplexe Erkrankung gibt es im Schrifttum zahlreiche Termini, die sich teils auf die klinisch wahrnehmbaren Krankheitssymptome, teils auf die pathologisch-anatomischen Veränderungen stützen. Rein symptomatische Bezeichnungen sind im deutschen Sprachraum die Ausdrücke „Lungendampf“ und „Lungendämpfigkeit“, im englischen „broken wind“ und „heaves“, im holländischen „dampigheid“ und im französischen „pousse“. In den Fachzeitschriften finden sich die Termini „chronisches Lungenemphysem“, „asthmatoides Syndrom“ und „chronische Bronchitis“ (Speck et Roost 1949, Littlejohn 1979, Geisel et Sandersleben 1987, Winder et v. Fellenberg 1988, Robinson et Wilson 1989, Derksen 1993, Dixon et al. 1995, Mair 1995, Hamann 1999, Wintzer 1999). Seit 1971 wird international der von Sasse aus der Humanmedizin übernommene Begriff „chronic obstructive pulmonary disease“ (COPD) verwendet (Littlejohn 1979, Geisel et Sandersleben 1987, Winder et v. Fellenberg 1988, Robinson et Wilson 1989, Derksen 1993, Dixon et al. 1995, Mair 1995, Hamann 1999, Wintzer 1999). Seit Ende der 80er Jahre spricht man auch von COB, eine Abkürzung, die gleichermaßen für den englischen Terminus „chronic obstructive bronchitis“ und für die deutschsprachige Bezeichnung „chronisch-obstruktive Bronchitis bzw. Bronchiolitis“ gelten kann (Geisel et Sandersleben 1987, Winder et v. Fellenberg 1988, Robinson et Wilson 1989, Derksen 1993, Dixon et al. 1995, Mair 1995, Hamann 1999, Wintzer 1999).

Neuerdings wird zunehmend der Begriff der „recurrent airway obstruction“ (RAO) genutzt, nachdem mehrere Autoren bei Pferden mit durch Heustaub auslösbaren Atemwegsobstruktionen eine Reversibilität bei Weidegang beobachteten (Robinson 2001). Da diese Bezeichnung den noch üblichen Terminus COB jedoch bisher nicht abgelöst hat, wird im Folgenden bei diesem verblieben.

2.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Erste Dokumentationen über chronische Lungenkrankheiten finden sich bereits bei Aristoteles 333 v. Christus. Mit zunehmender Domestikation des Pferdes und der damit verbundenen Aufstallung und Heufütterung wurde das klinische Bild der chronischen Bronchitis und die durch sie bedingten Todesfälle, wie bereits erwähnt, immer häufiger registriert (Alexander 1959, Cook et Rossdale 1963, Schatzmann et Gerber 1972, Köning 1983, Viel 1983). Derartige Krankheitszustände wurden in freilebenden Populationen nicht gefunden (Ehrmann 1780, Alexander 1959, Cook et Rossdale 1963, Schatzmann et Gerber 1972).

2.1.2 Klinisches Bild

Das klinische Bild der COB variiert sehr stark in Abhängigkeit der Schwere des Zustandes (Robinson et al. 1996). Betroffen sein können Pferde aller Rassen (Halliwell et Gorman 1989), beider Geschlechter und jeden Alters, wobei das Vorkommen deutlich mit zunehmendem Alter ansteigt (McPherson et Thomson 1983, Dixon et al. 1995).

Als typische Symptome sind Leistungsschwäche, Husten und Nasenausfluss bei ungestörtem Allgemeinbefinden zu betrachten (McPherson et al. 1978, Gray 1994), wobei insbesondere der zwar seltene, aber spontane Husten bereits bei geringgradig ausgeprägtem Krankheitsbild gezeigt wird. In der Ruhe sind die Auskultationsbefunde zunächst noch recht unauffällig (Robinson et al. 1996).

Mit fortschreitender Entwicklung der Erkrankung werden auch die pathologischen Befunde deutlicher und umfangreicher. Die Pferde zeigen einen fortschreitenden Leistungsabfall mit Tachypnoe und immer häufiger auftretendem Husten. Es stellt sich eine gemischte oder expiratorische Dyspnoe ein. Diese ist, zunächst nur nach Belastung, inspiratorisch durch Nüsternatmung, verstärkte costale Atmung mit Auswärtsstellen der Rippen und expiratorisch durch einen zu abdominalen Atmungstyp, teilweise mit „Afteratmen“ und späterer Dampfrinne, gekennzeichnet.

Bei hochgradiger Erkrankung zeigt sich die Dyspnoe bereits in der Ruhe (McPherson et al. 1978, Littlejohn 1980, Bracher et al. 1991).

Desweiteren kann es zu einer Zunahme der auskultatorisch wahrnehmbaren Atemgeräusche kommen mit Ausbildung von Rasselgeräuschen bis hin zu Giemen über der Trachea und dem Lungenfeld. Bei bereits ausgebildetem Lungenemphysem können auch knisternde Geräusche wahrgenommen werden. Das Lungenfeld stellt sich bei der Perkussion vergrößert dar und weist häufig Zonen mit überlautem Schall auf (Robinson et al. 1996).

2.1.3 Pathomorphologie

Bei der Auswertung pathomorphologischer Befunde sollte berücksichtigt werden, dass das Untersuchungsmaterial in der Regel erst bei weit fortgeschrittenem Krankheitsstadium des Pferdes und oftmals durch vorangegangene Therapien beeinflusst in die Untersuchung eingeht (Geisel et Sandersleben 1987).

So ist bei Patienten im Endstadium häufig das makroskopische Erscheinungsbild der Lunge von einem mehr oder weniger ausgeprägten, diffusen oder marginalen alveolären Emphysem geprägt, bei dem sich die veränderten Bereiche der Lungen groß und hell, von puffiger Konsistenz und mit trockener Schnittfläche darstellen. Dabei sind die kranialen Lappen in der Regel stärker verändert als die Kaudallappen und das Emphysem ist im allgemeinen alveolär. Nur selten kommt es zur Bildung größerer luftgefüllter Blasen. Da das interlobuläre Gewebe der Pferdelunge nur sehr schwach ausgebildet ist, wird eine Ansammlung von Luftblasen im interstitiellen Gewebe, wie man sie nach Alveolarwandeinrissen bei anderen Tierarten deutlich erkennen kann, kaum beobachtet (Geisel et Sandersleben 1987).

Die für die COB typische Veränderung, die sich regelmäßig findet, stellt jedoch die schon makroskopisch erkennbare Bronchiolitis bzw. Peribronchiolitis dar (Schoon et Deegen 1982, Viel 1983, Winder et Fellenberg 1986, 1988). So zeigen sich die kleineren Bronchien und Bronchiolen in vielen Fällen durch die Pleura pulmonalis hindurch und auf der Schnittfläche als trübglasige, graurötliche Knötchen, in deren

Zentrum mit der Lupe feinste Öffnungen erkennbar sind. Es handelt sich um die Proliferation peribronchiolitischer Infiltrate, die derart ausgeprägt sein kann, dass die Schnittfläche der Lunge mit kleinen Knötchen regelrecht übersät erscheint. Bei diesen Infiltraten handelt es sich um Entzündungszellen, meist Lymphozyten, die durch intraluminale Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten begleitet werden. Eosinophile Granulozyten werden hierbei, im Gegensatz zum humanen allergischen Asthma, nur selten angetroffen (Schoon et Deegen 1982, Viel 1983, Winder et Fellenberg 1988).

Zusammenfassend unterscheiden Geisel und Sandersleben (1987) drei Grundtypen der bei der COB des Pferdes ablaufenden entzündlichen, obstruktiv wirkenden Prozesse:

1. Eine Form der Bronchitis bzw. Bronchiolitis, bei der die Ansammlung von überwiegend mukösem Exsudat in den Bronchien und Bronchiolen, manchmal auch in den Alveolen, das Bild beherrscht. Diesem Exsudat sind mehr oder weniger viele neutrophile Granulozyten beigemischt. In der Schleimhaut selbst und auch in den übrigen Wandschichten ist lediglich eine dezente Infiltration mit Entzündungszellen anzutreffen.
2. Einen Bronchitis- bzw. Bronchiolitis-Typ, bei dem das Exsudat im Bronchus- bzw. Bronchioluslumen vorwiegend aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und desquamierten Epithelzellen besteht. Entzündliche Infiltrate in der Bronchuswand sind von Fall zu Fall unterschiedlich stark ausgebildet.
3. Einen Typ, bei dem die Endobronchitis, d.h. die Exsudatansammlung im Lumen der Bronchien und Bronchiolen ganz in den Hintergrund tritt und nur eine Peribronchitis bzw. Peribronchiolitis ausgebildet ist. Der Zellart nach handelt es sich meist um eine lymphozytäre bzw. plasmazelluläre Entzündung. Mitunter gelangen hier jedoch auch eosinophile Granulozyten zur Beobachtung.

Insgesamt stellt sich das Epithel von Bronchien und Bronchiolen oft hyperplastisch, z.T. metaplastisch dar (Geisel et Sandersleben 1987). Quantitative Messungen dokumentieren eine Zunahme der Wanddicke der kleinen Luftwege pro Millimeter der

Basismembran. An dieser Dickenzunahme sind sowohl glatte Muskulatur, Epithel als auch Submukosa beteiligt (Robinson et al. 1996).

In den Epithelien der größeren Luftwege zeigt sich ein fokaler Verlust an Zilien bzw. Ziliarzellen (Geisel et Sandersleben 1987). Hierbei kommt es bei geringgradig erkrankten Tieren zunächst nur zu herdförmigen Verlusten im Bereich der kleinen Bronchien, während bei Pferden mit hochgradiger chronischer Bronchitis diese Veränderungen auch in Trachea und Hauptbronchien anzutreffen sind. Hier finden sich dann statt eines gleichmäßigen Zilienrasens nur noch einzelne zilientragende Zellen, die zudem häufig lediglich Zilienreste aufweisen. Histologisch überwiegen dann Zellen mit oberflächlichem Mikrovillibesatz. Bei licht- und transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchung wird deutlich, dass es sich dabei um undifferenzierte Zellen handelt, die neben nekrobiotischen Zilienzellen im oberflächlichen Epithel liegen. In ihrer Struktur ähneln sie den Intermediärzellen, die Teilungsprodukte der Basalzellen mit polypotenter Ausdifferenzierungsmöglichkeit darstellen. Das Auftreten dieser Zellen ist daher als Zeichen für den fortschreitenden, rasch ablaufenden Zellersatz zu werten (Kaup et al. 1985).

Weitere Veränderungen finden sich an den Clarazellen. Hier kommt es bereits im Anfangsstadium bzw. bei geringgradiger Erkrankung zu Verlust der typischen Granulation. Neben diesen nekrobiotischen Clarazellen zeigen sich bereits erste Anzeichen für Fehldifferenzierungen von Clarazell-Vorläufern, wie stark vakuolisierte Zellen (Kaup et al. 1985, Robinson et al. 1996).

Auch Umwandlungen der Clarazellen zu Becherzellen können beobachtet werden. Während letztere üblicherweise nur in Trachea, Bronchien und den Anfangsbereichen der Bronchioli anzutreffen sind, können sie bei erkrankten Tieren bis zu den terminalen Bronchioli zu finden sein und damit auch in Abschnitten auftreten, in denen sie normalerweise fehlen (Geisel et Sandersleben 1987).

Weiterhin ist eine starke Vermehrung der Mastzellen im Epithel der luftleitenden Wege festzustellen, die dabei verschiedene Degranulationsstadien zeigen und auch intraalveolär angetroffen werden. Diese Beobachtungen könnten ein

morphologischer Hinweis für die unspezifische Hyperreagibilität der Bronchialschleimhaut sein (Kaup et al. 1985, 1990, Hoffman et al. 1998).

Desweiteren finden sich intraepitheliale lamellare Einschlusskörper (Kaup et al. 1985, Robinson et al. 1996). Diese Einschlüsse, die häufig Lagebeziehung zu eosinophilen Granulozyten und Mastzellen haben, wurden von Kaup et al. (1985) in größter Zahl bei Tieren mit hochgradiger chronisch obstruktiver Bronchitis festgestellt. Da ähnliche, allerdings extrazellulär gelagerte Kristalle auch im Bronchialsekret von Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis vorkommen, äußerten die Untersucher den Verdacht, dass es sich dabei um Charcot-Leyden-Kristalle handeln könnte. Diese wurden bisher nur für den Menschen beschrieben und stellen ein Zerfallsprodukt der Granula eosinophiler Granulozyten dar. Besonders bei Erkrankungen mit vermehrter Ansammlung eosinophiler Granulozyten in Sputum und Gewebe, wie Asthma bronchiale oder allergischer Rhinitis, treten diese auf (Kaup et al. 1985).

Bei Krankheitsbildern im Endstadium mit Emphysembildung finden sich entsprechend typische Veränderungen an den Alveolen. Die Alveolarsepten sind dünn und meist blutleer. Vielfach sind sie zerrissen, atrophisch und ragen nur mehr stummelförmig in das Alveolarlumen vor, das namentlich im Bereich der Alveolargänge zu großbuchtigen Hohlräumen umgestaltet ist. Die Kapillaren nehmen hierbei zahlenmäßig ab (Geisel et Sandersleben 1987).

Laut Geisel et Sandersleben (1987) wird im Schrifttum als Begleiterscheinung der COB wiederholt auf eine Fibrosierung des peribronchiolären und alveolären Gewebes hingewiesen. Derartige Erscheinungen gehören nach den Ergebnissen der genannten Autoren aber zu den weniger häufigen Befunden. Gegebenenfalls nimmt die Fibrosierung vom bindegewebigen Stützgerüst der Bronchiolen ihren Ausgang und strahlt in die Wände der benachbarten Alveolen ein. Hiermit ist dann eine Hyperplasie des Alveolarepithels verbunden, das die Alveolen vielfach als kubisches Epithel auskleidet (Geisel et Sandersleben 1987).

Anzeichen für eine Chronizität des Prozesses, wie interstitielle lymphozytäre Infiltrate, aber auch eine Hypertrophie der Bronchialmuskulatur, Epithelmetaplasie, Fibrose der Bronchialwände und angrenzenden Alveolen mit Hyperplasie des Epithels sind auch bei Bestehen der Erkrankung über mehrere Jahre nicht immer nachweisbar. Ebenso kann in den meist weit fortgeschrittenen Krankheitsprozessen häufig keine Aussage über die Ätiologie gemacht werden. Lediglich beim Nachweis von eosinophilen Granulozyten im peribronchialen Gewebe könnte auf eine parasitäre oder allergische Genese geschlossen werden (Geisel et Sandersleben 1987).

2.1.4 Ätiologie

Als Ursache der chronisch obstruktiven Bronchitis des Pferdes wird ein multifaktorielles Geschehen, bei dem noch nicht alle einzelnen Faktoren eindeutig geklärt sind, vermutet (Eyre 1972, Schmidt et Primer 1975, Thein 1981a).

Eine zumindest unterstützende Rolle in der Entstehung dieser Erkrankung wird von vielen Autoren den Haltungsbedingungen in Form von zunehmender Aufstallung in Boxen zugeschrieben (Eyre 1972, Sasse 1973, Schatzmann et al. 1974, Cook 1976, McPherson et al. 1979, McPherson et Thomson 1983, Thomson et McPherson 1984, Derksen et al. 1985b, Armstrong et al. 1986, Clarke et Madelin 1987, Beech 1989a,b, Gray et al. 1989, Grünig et al. 1989, Hartung et al. 1989, Kamphues 1989, Beech 1991, Clarke 1993, Derksen 1993, Fairbairn et al. 1993, McGorum et al. 1993, Clarke 1994, Dixon et al. 1995, Mair 1995, Tesarowski et al. 1996). Von großer Bedeutung sollen hierbei große Mengen Staubs, der reich an organischem Material ist, sein (Crichlow et al. 1980, Sasse et al. 1985, Clarke et Madelin 1987, Clarke et al. 1987, Webster et al. 1987, Woods et al. 1993). Empfängliche Tiere entwickeln eine Überempfindlichkeit der Atemwege gegenüber diesen Agentien und die anschließende Entzündung ist von einer klinisch relevanten Obstruktion der Luftwege begleitet. Diese Obstruktion kann wiederholt hervorgerufen werden, wenn diese Pferde aufgestallt und mit staub- und schimmelreichem Heu schlechter Qualität gefüttert werden (Derksen et al. 1985a, McGorum et al. 1993). Werden diese Tiere auf die Weide verbracht, verschwinden im Idealfall sowohl Obstruktion als auch

Entzündungserscheinungen bis hin zur klinischen Remission (Thomson et McPherson 1984, Derksen et al. 1985a, b, Gray et al. 1989, 1992a, Gray 1994).

Diesen Zusammenhang mit den Haltungsbedingungen bestätigen auch weitere Erhebungen: besonders in der nördlichen Erdhemisphäre mit langen Stallperioden und Heufütterung ist die COB häufig zu finden. Geografische Bereiche mit warmem, trockenem Klima, wie etwa Kalifornien oder Australien, sind dagegen kaum oder gar nicht betroffen (Robinson et al. 1996). So fanden sich insgesamt bei einer in Nord-Amerika durchgeführten Studie bei etwa 12% der stichprobenartig untersuchten Pferde entzündliche Bronchialveränderungen (Larson et Busch 1985). Eine in der Schweiz durchgeführte Studie stellte die Diagnose COPD jedoch bei 54% der untersuchten Tiere. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass bei den gewählten diagnostischen Parametern (Atemgeräusche und Neutrophilie im Tracheobronchealsekret) auch andere Erkrankungen mit eingeschlossen sein könnten (Bracher et al. 1991).

Desweiteren erwähnen bereits frühe Berichte familiäre Häufungen der COB (Thein 1981). Um solche Beobachtungen zu belegen, führten Marti et al. (1991) entsprechende Studien durch. Zu diesem Zweck wurde das Auftreten von COB in Familien zweier Gestüte, sowie innerhalb einer Gruppe von Halbgeschwistern, gezeugt von drei erkrankten und drei nicht-erkrankten Hengsten, untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Nachkommen zweier COB-Patienten eine größere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von COB aufwiesen (9 von 13 Nachkommen = 67%) als die Nachkommen gesunder Tiere (5 von 29 = 17%) bzw. nur eines betroffenen Elternteils (23 von 48 = 48%). Daraus entstand die Schlußfolgerung, dass es sich zwar um ein multifaktoriell bedingtes Geschehen handelt, welches jedoch auf genetischer Prädisposition basiert (Marti et al. 1991, Gray 1994).

Auch vorangegangene Virusinfektionen wurden bereits seit längerem als eine Ursache für die spätere Entwicklung einer COB verdächtigt (Derksen et al. 1985a, Armstrong et al. 1986, Klein et Deegen 1986, Derksen 1993, Fairbairn et al. 1993, Gray 1994) und stehen mit sekundären bakteriellen Infektionen häufig am Anfang der

Erkrankung (Gerber 1968, Pick 1970, Bagust 1971, Kraft 1975, Thein 1981). So diskutierten Thorsen et al. (1983) beispielsweise wiederholte oder latente Infektionen mit Influenza A equi 1 als mögliche Ursache einer COB. Sie stellten bei Untersuchungen von an COB erkrankten Pferden fest, dass diese einen höheren Antikörpertiter gegen das Virus zeigten als eine Kontrollgruppe gesunder Pferde. Auch Viel (1998) schließt eine Mitbeteiligung von Viren an der Entstehung der Erkrankung nicht aus, verdächtigt aber die durch sie verursachten Lungenveränderungen als Wegbereiter. So könnte es zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit in der Ausbildung einer Hypersensitivität infolge verringerter mukoziliärer Clearance kommen. Diese Clearance ist definiert als die Selbstreinigung der Bronchien mittels Mukus und Zilien, wobei die Schleimproduktion dem Haften von Fremdpartikeln in den Bronchien und die Zilien dem oral gerichteten Abtransport dieser dienen. Zusätzlich kann es zu gehemmten Funktionen der Alveolarmakrophagen und einer schließlich resultierenden erhöhten Empfänglichkeit für andere Noxen kommen.

Neben chemisch-physikalischen Reizen und inhalativen Umweltnoxen spielen aller Wahrscheinlichkeit nach also auch infektiöse Agentien wie Viren, Bakterien und Lungenwürmer eine wesentliche Rolle in der Ätiologie der chronisch obstruktiven Bronchitis des Pferdes (Eyre 1972, Schmidt et Primer 1975, Reif 1979).

2.1.5 Pathogenese

Auch wenn die Bedeutung der einzelnen ätiologisch in Betracht zu ziehenden Faktoren noch nicht geklärt ist, besteht dennoch einheitlich die Auffassung, dass die Obstruktion der kleinen Atemwege das zentrale Ereignis in dem klinischen Erscheinungsbild der COB darstellt (Hajer et Sasse 1980, Deegen et al. 1987, Sasse 1995, Hamann 1999). Diese Obstruktion wird sowohl durch einen Bronchospasmus als auch durch eine Anhäufung von Sekret in den Atemwegen bedingt (Robinson et al. 1996). Diese Sekretanhäufung ist sowohl Folge einer Hyper- bzw. Dyskrinie als auch einer gestörten mukoziliären Clearance. Desweiteren kommt es infolge Ödembildung und Gewebeproliferation im Rahmen einer entzündlichen

Schleimhautschwellung zu einer weiteren Lumeneinengung (Hajer 1980, Hajer et Sasse 1980, Raid et al. 1980, van den Ingh 1985, Turgut et Sasse 1989).

Zusammenfassend führen im wesentlichen folgende Pathomechanismen zur Bronchialobstruktion:

1. Spasmen der glatten Bronchialmuskulatur
2. Veränderung der Bronchialwände
3. Hyper- bzw. Dyskrinie
4. Herabgesetzte mukoziliäre Clearance

Eine mit entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Spasmen der glatten Bronchialmuskulatur fällt der Hyperreagibilität der Atemwege zu (Sasse et al. 1985, Deegen et al. 1987, Sasse 1995).

Bei der Hyperreagibilität handelt es sich um eine pathologisch erhöhte Reaktionsbereitschaft, also Reagibilität, der Atemwege. Dieser eigentlich physiologische Abwehrmechanismus verhindert durch Kontraktion glatter Bronchialmuskulatur, also durch Einengung der Atemwege, eine Inhalation z.B. größerer Partikel (Sasse 1995). Die Hyperreagibilität kann spezifischer, also allergenbedingter, oder unspezifischer Natur sein (Klein et Deegen 1986). Sie ist mittels eines Histamininhalations-Provokationstests nachweisbar, wobei an COB leidende Pferde bereits bei geringen Histamin-Konzentrationen mit einem Bronchospasmus reagieren (Klein et Deegen 1986, Hoffman et al. 1999, Mazan et al. 1999). Lungengesunde Pferde benötigten eine bis zu 1000-fach höhere Histamin-Konzentration zur Ausbildung desselben Effektes (Deegen et al. 1987).

Zur Entstehung dieser durch Hyperreagibilität bedingten Bronchokonstriktion existieren folgende Erklärungsversuche: Nach Sasse (1985) und Deegen et al. (1987) kommt es zunächst infolge einer Infektion mit Viren, Bakterien oder Parasiten bzw. einer Inhalation von Antigenen oder Endotoxinen zu einer spezifischen Hyperreagibilität. Diese ist Ergebnis einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren der intraepithelial vermehrt vorliegenden Mastzellen (Kaup et al. 1985, 1990).

Hoffman et al. (1998) konnten aufgrund von ihnen festgestellter Korrelationen zwischen Mastzellgehalt und Reaktivität der Atemwege diesen Zusammenhang nachweisen.

Aufgrund resultierender ständiger Schleimhautreizung zeigen sich die Interzellularspalten zwischen Epithelzellen hochgradig verbreitert mit Lösung von Zellverbindungen, den „tight junctions“. Die dadurch freigelegten „irritant receptors“ können nun durch inhalierte Partikel gereizt werden und führen so zu Bronchospasmen und auf diesem Wege zu einer unspezifischen Hyperreagibilität gegenüber potentiell brochokonstriktorisch wirkenden Substanzen, wie z.B. Staub (Nadel 1980, Deegen et al. 1987).

Neben der beschriebenen Hyperreagibilität sind die schwerwiegenden histologischen Veränderungen des Bronchialepithels von großer Bedeutung. Neben Hyperplasien der Epithelien treten weitere, in Kapitel 2.1.3 näher beschriebene Defekte auf. Hierbei sind die fokalen Verluste von Zilien bzw. Ziliarzellen und die Umwandlung von Clara- zu mukösen Schleim produzierenden Becherzellen bei der weiteren Pathogenese entscheidend. Infolge dieser veränderten Epithelzusammensetzung kommt es zur Produktion größerer Mengen Bronchialsekretes mit stärkerer Viskosität, der sogenannten Hyper- und Dyskrinie. (Turgut et Sasse 1989, Kaup et al. 1990, Deegen 1992, Dixon 1992). Diese erhöhte Viskosität ist Folge einer abnormen Zunahme der Gel-, gleichzeitiger Verringerung der Sol-Schicht des Bronchialschleims und Zunahme von Entzündungszellen, wodurch es als Folge zu Sekretstau und gestörtem Abtransport inhalierter Partikel kommt (Kaup et al. 1990, Deegen 1992, Dixon 1992).

Diese morphologischen Veränderungen sowie die sich hieraus ergebende Hyper- bzw. Dyskrinie bedingen die bereits erwähnte gestörte mukoziliäre Clearance (Kaup et al. 1985, Geisel et Sandersleben 1987, Sasse 1995). Diese ist neben dem Hustenreflex von großer Bedeutung bei der Reinigung der Atemwege (Sasse 1995). Basierend auf Flimmerbewegung zilientragender Zellen, physiologischer Schleimsekretion durch Becherzellen und submuköse Drüsen (Drommer et Kaup 1984), sowie zilienlosen, seröses Sekret produzierenden Clara-Zellen in den

terminalen Bronchien (Breeze et al. 1976, Drommer et Kaup 1984, Kaup et al. 1990, Dixon 1992) wird diese Clearance ermöglicht. Der dabei gebildete Mukus setzt sich aus zwei Schichten zusammen: einer oberflächlichen, viskösen Gel-Phase und einer dem Epithel nahen flüssigen Sol-Phase. Durch die oral gerichtete Bewegung der Zilien wird dieser Schleim mit in der Gel-Schicht haftenden Partikeln transportiert. Dabei tauchen die Zilien bei der oral ausgerichteten Bewegung in die Gel-Phase ein, bewegen sie somit vorwärts und schlagen in der Sol-Phase zurück (Drommer et Kaup 1984). Diese 15-20 mal pro Sekunde ablaufenden Zilienbewegungen bewirken einen Sekrettransport mit einer Geschwindigkeit von 20 bis 41 mm pro Minute (Turgut et Sasse 1989, Dixon 1992).

Diese mukoziliäre Clearance zeigt sich bei an COB erkrankten Pferden mit signifikant geringerer Rate als bei lungengesunden Pferden (Turgut et Sasse 1989, Kaup et al. 1990, Deegen 1992, Dixon 1992). Eine zusätzliche Störung dieser mukoziliären Clearance kann durch mangelnde körperliche Bewegung bedingt sein, da die durch Bewegung ausgelöste sympathoadrenerge Stimulierung der Zilien ausbleibt (Deegen 1992, Hamann 1999).

Die bisher geschilderten pathogenetischen Prozesse führen alle zu dem bereits angesprochenem Phänomen der Lumeneinengung bzw. Obstruktion der Atemwege, welche Auswirkungen sowohl auf die Ventilation als auch auf Lungenfunktionsparameter, die Lungenvolumina, den Gasaustausch, die Atmungstechnik und die Lungenperfusion hat (Denac-Sikiric 1970, Robinson 1979).

Desweiteren ist ein spontaner und vollständiger Verschuß kleinerer Bronchioli bei an COB erkrankten Pferden möglich, so dass distal der Verschlüsse Luft fixiert wird („air trapping“). Ursächlich hierfür ist eine Erhöhung des intrathorakalen Druckes. Da durch die Obstruktion, vor allem der kleineren Atemwege, die Expiration, die bei lungengesunden Pferden hauptsächlich durch die Elastizität der Lunge erreicht wird, zu lange dauern würde, wird durch ein aktives Kontrahieren der Bauchmuskulatur der intrathorakale Druck erhöht. Hiermit soll die expiratorische Strömungsgeschwindigkeit der Atemluft beschleunigt werden. Durch diese Zunahme des intrathorakalen Druckes bei der Ausatmung kann es zur Zusammenfaltung

kleinerer, nicht von Knorpelspannen stabilisierter Atemwege kommen. Bei vorliegender COB kommt es nun durch die Bildung zähen und adhäsiven Schleims zu Verklebungen der Bronchiolen. Eine weitere Möglichkeit scheint ein Mangel an Surfactant darzustellen. Hierbei handelt es sich um den sogenannten Atelektasefaktor, der ein Gemisch von Lipoproteinen darstellt, die in Pneumozyten vom Typ II der Alveolen gebildet werden. Im Bereich der kleinen Bronchien verhindert er ein Aneinanderkleben der Bronchialwände. Die Beeinträchtigung der Atmung durch hochgradiges „air trapping“ ist während der Expiration besonders erheblich. Es kommt zum Aufbau eines hohen intrathorakalen Druckes, wobei der expiratorische maximale Druck im Thorax über den atmosphärischen Druck steigen kann. Das umgebende Lungengewebe kann in extremen Fällen gegen die veränderten Bereiche gepresst werden. Dies kann zur Kompression knorpelgestützter Bronchien bis hin zu den Hauptbronchien sowie zu Zerreißung von Alveolen, also zur Ausbildung eines Lungenemphysems, führen (Deegen et Müller 1983, Deegen et al. 1987).

Infolge dieser Obstruktionen kommt es zur Hypoventilation in den betroffenen Bereichen, zu deren Ausgleich andere Lungenbereiche hyperventiliert werden, so dass im Gesamtbild die Lungenventilation ungleichmäßig erfolgt (Spörri et Denac 1970). Als Folge der Hypoventilation und dem daraus resultierenden, lokal verminderten alveolären O_2 -Partialdruck kommt es über den Euler-Liljestrand-Reflex in diesen Bereichen zusätzlich zur Gefäßkonstriktion und damit zu einer kompensatorischen Minderdurchblutung. Reicht die Hyperventilation anderer Lungenbereiche in Kombination mit diesem Kompensationsmechanismus nicht mehr aus, führt dies schon schnell zu einer Hypoxämie, in ernsten Fällen zu einer zusätzlichen Hyperkapnie des arteriellen Blutes (Spörri et Denac 1970).

Die beschriebenen intrathorakalen Druckveränderungen führen zu einer sichtbaren Veränderung der Atemmechanik (Spörri et Zerobin 1964, Sasse 1971, 1973). Dieses äußert sich klinisch in abdominal betonter, verlängerter Ausatmung, doppelschlägiger Expiration, Afteratmen bis hin zur Ausbildung einer Dampf Rinne (Deegen et Klein 1987).

2.1.6 Klinische Diagnostik

Ergänzend zur herkömmlichen klinischen Untersuchung haben sich mehrere weitergehende Untersuchungsmethoden in der Diagnostik der COB etabliert. Insbesondere die Bronchoskopie und die Entnahme tracheobronchialen Sekretes (TBS), kommen hierbei häufig zum Einsatz. Die Blutgasanalyse und die aufgrund des hohen apparativen Aufwandes selten durchgeführte Lungenfunktionsprüfung spielen in der Routinediagnostik keine Rolle (Denac-Sikiric 1970, Sasse 1971, 1973, Müller et Deegen 1982). Ähnliches trifft bislang auf die Gewinnung von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) zu, die jedoch immer häufiger als zusätzliches Diagnostikum genutzt wird (Wenisch 2001).

Für ein genaues Verständnis bzw. für eine bessere Diagnose von Lungenerkrankungen ist die Untersuchung direkt aus der Lunge stammenden Materials von Vorteil. Um Proben aus tiefer liegenden Lungenbereichen, wie in der vorliegenden Studie bezweckt, zu erhalten, wurde die Gewinnung von BALF eingesetzt. Da dieses Verfahren im deutschen Sprachraum bislang nur selten durchgeführt wird, wird dieses weiterführende diagnostische Mittel im Folgenden kurz erläutert.

2.1.7 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Bereits 1961 wurde die bronchoalveoläre Lavage von Myrvik et al. an isolierten Lungen von Kaninchen durchgeführt (zitiert nach Viel 1983). 1983 wurde sie von Viel erstmals am lebenden, allgemein anästhesierten Pferd angewandt (Viel 1983). Seitdem wird die BAL bei dieser Tierart ohne Allgemeinanästhesie immer häufiger als zusätzliche diagnostische Möglichkeit bei Lungenerkrankungen genutzt.

Vor der Durchführung der BAL erfolgt meist eine Sedation der Pferde mit 0,4-0,8 mg/kg Xylazin (Sweeney et Beech 1991, Sweeny et al. 1992, Moore et Cox 1996), bzw. Xylazin und zusätzlich Acepromazin (Clark et al. 1995), 10-30 µg/kg Butorphanol (Lapointe et al. 1994) oder 10 µg/kg Detomidinhydrochlorid und 10

µg/kg Butorphanol (McGorum et Dixon 1994). Fogarty (1990) arbeitete dagegen ohne Sedation, nutzte jedoch meist eine Nasenbremse.

Die Durchführung der BAL kann prinzipiell mit oder ohne Sichtkontrolle erfolgen. Eine kostengünstige und einfach durchzuführende Möglichkeit der Probengewinnung ist die Entnahme mittels Kunststoffkatheter. Hierzu wird zunächst ein Polypropylenkatheter durch den ventralen Nasengang bis ins obere Drittel der Trachea geschoben. Durch diesen ersten Katheter wird im Anschluß ein zweiter mit geringerem Durchmesser und größerer Länge geführt, bis dieser auf leichten Widerstand trifft und sich eingekeilt in einen kleinen Bronchus, in der sogenannten „wedge position“ befindet (Liu et al. 1987, Fogarty 1990, Sweeney et Beech 1991, McGorum et Dixon 1994, Moore et Cox 1996). Diese Methode soll eine Gewinnung von Material aus den tieferen Atemwegen ohne bakterielle Kontamination aus oberen Bereichen ermöglichen. Ein Nachteil des Verfahrens stellt jedoch die Gefahr des Umknickens des relativ elastischen dünnlumigeren Katheters infolge heftiger Hustenanfälle dar, wonach eine BAL unmöglich durchführbar wäre. Desweiteren kann keine gezielte Spülung bestimmter Lungenlappen erfolgen (Schusser et al. 1999). Für eine ähnliche Durchführung werden im Handel auch BAL-Sonden angeboten, die durch einen angebrachten Ballon in der „wedge position“ zusätzlich arretiert werden können. Auch bei diesem Verfahren wird jedoch ohne Sichtkontrolle gearbeitet.

Bei der BAL unter Sichtkontrolle wird ein flexibles Endoskop eingesetzt. Dieses wird ebenfalls über den ventralen Nasengang in die Trachea und an der Carina vorbei in einen Hauptbronchus vorgeschoben, bis es aufgrund des Durchmessers arretiert und sich in der „wedge-position“ befindet. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit, gezielt bestimmte Lungenareale zu spülen (Burns et al. 1983, Lam et al. 1985, Crystal et al. 1986, Sweeney et Beech 1991, Lapointe et al. 1994, McGorum et Dixon 1994, Clark et al. 1995, Frank et Loddenkemper 1995, Moore et Cox 1996). In dieser Position erfolgt die Instillation von Flüssigkeit, welche sofort wieder aspiriert wird. Erst wenn dieses Aspirat Surfactant in Form von feinem weißen Schaum enthält und somit sichergestellt werden kann, dass die Spülflüssigkeit bis in die Alveolen vorgedrungen

ist, ist die BAL als erfolgreich zu bewerten (Viel 1998). Im Anschluß wird das Endoskop wieder entfernt.

Bei beiden Methoden wird als Spülflüssigkeit sterile, warme, isotonische Kochsalzlösung oder sterile, warme Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer eingesetzt, wobei die instillierte Menge je nach Autor zwischen 180 ml und 300 ml, eingesetzt als Bolus oder in jeweils 60 ml Fraktionen, variiert (Young et Reynolds 1984, Sweeney et al. 1992).

Die durchschnittliche Rückgewinnung liegt bei lungengesunden Pferden laut Literatur zwischen 50% (Lapointe et al. 1994, McGorum et Dixon 1994) und 90%, kann aber bei Pferden mit Erkrankungen der Atemwege je nach Schweregrad auf bis zu durchschnittlich 31% absinken (Lapointe et al. 1994), wobei die Ursache dieser reduzierten Rückgewinnung bislang nicht beschrieben wurde.

Die rückgewonnene BALF wird zur Reinigung von eventuell vorhandenem Mukus durch mehrere Lagen Gaze (Lam et al. 1985, Sweeney et Beech 1991) filtriert und es erfolgt eine Kühlung auf 4°C.

2.2 Equine Herpesviren

Bereits seit längerem ist bekannt, dass virale Infektionen häufig am Anfang der COB stehen (Gerber 1968, Pick 1970, Kraft 1975, Reif 1979, Sasse et al. 1985, Herbst et al. 1992). Eine der häufigsten Ursachen für Atemwegserkrankungen stellen hierbei die equinen Herpesviren 1 (EHV1) und 4 (EHV4) dar (Bachmann et al. 1972, Fitzer 1972, Teufel 1977, Herbst et al. 1992, Brunner et al. 1998).

EHV1, auch als „Stutenabort-Virus“ bezeichnet, besitzt, wie der Name schon sagt, besondere Bedeutung als Erreger des Virusaborts bei Stuten, kann aber auch zu neurologischen und respiratorischen Symptomen führen (Brunner et al. 1998, Rolle et Mayr 2002).

EHV4 wird auch als Rhinopneumonitisvirus bezeichnet, da es vorwiegend mit Erkrankungen des oberen Respirationstraktes, wie Rhinopharyngitis und Tracheobronchitis, ätiologisch in Verbindung gebracht wird (Brunner et al. 1998, Rolle et Mayr 2002).

Weitere klinische Symptome bedingende Herpesvirusspezies stellen EHV3 und EHV2 dar. EHV3 führt durch venerische Übertragung zur Ausprägung des Koitalexanthems der Pferde (sogenannter Bläschenausschlag), einer Deckinfektion in der Genitalschleimhaut bei Stuten und Hengsten (Thein 1994, Brunner et al. 1998, Rolle et Mayr 2002). Die Rolle des EHV2 in der Entstehung von Krankheiten ist noch nicht gänzlich geklärt. Es lässt sich sowohl bei gesunden Pferden als auch bei solchen mit verschiedener Symptomatik, wie Keratokonjunktivitis und respiratorischen Störungen, isolieren (Thein 1994, Brunner et al. 1998, Rolle et Mayr 2002) und wird als Erreger der Keratitis superficialis verdächtigt (Thein et Böhm 1976, Thein 1994, Verter et al. 1999).

2.2.1 Taxonomie

Bei den equinen Herpesviren handelt es sich um DNS-Viren der Familie der Herpesviridae (Falke 1999b, Murphy et al. 1999, Modrow et Falke 2002b, Rolle et Mayr 2002). Diese wird aufgrund ihrer Pathogenität, der Zelltypen, die infiziert werden und der Vermehrungseigenschaften der Viren in drei Subfamilien unterteilt: die Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae und Gammaherpesvirinae. Eine weitere Einordnung in verschiedene Genera erfolgt aufgrund der Sequenz der Virus-DNS, des Genomaufbaus und der immunologischen Verwandtschaft bestimmter Virusproteine. Viele der in den letzten Jahren isolierten Herpesviren konnten jedoch noch nicht soweit charakterisiert werden, dass sie sich in die Subfamilien bzw. in die bisher definierten Genera einordnen ließen (Murphy et al. 1999, Gärtner et Müller-Lantzsch 2002, Fields et al. 2002, Modrow et Falke 2002b, Rolle et Mayr 2002). Neben den allgemein gebräuchlichen Virusnamen werden die Herpesvirustypen nach ihrem jeweiligen Wirt bezeichnet und chronologisch in der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert (Modrow et Falke 2002b).

2.2.1.1 Herpesvirus-Subfamilien

Den Prototyp der Subfamilie Alphaherpesvirinae stellt das humane Herpesvirus 1, das früher als Herpes-simplex-Virus bezeichnet wurde, dar. Viren aus der Subfamilie Alphaherpesvirinae weisen ein breites Wirtsspektrum auf, wachsen rasch, lysieren infizierte Zellen und führen zu latenten Infektionen meist in sensorischen Ganglien (Murphy et al. 1999, Modrow et Falke 2002b, Rolle et Mayr 2002). Über einige der beim Menschen und bei häufig vorgestellten Haus- und Nutztieren auftretenden Vertreter dieser Subfamilie verschafft Tabelle 1 einen kurzen Überblick.

Tab. 1: Genera und einige Spezies der Subfamilie Alphaherpesvirinae (zusammengefasst aus: Mohanty et Dutta 1999, Verter et al. 1999, Wintzer 1999, Fields et al. 2002, Modrow et Falke 2002b, Rolle et Mayr 2002).

Genus	Spezies	Name/Erkrankung
Simplexvirus	Humanes Herpesvirus 1	Herpes simplex
	Bovines Herpesvirus 2	Bovine Mammilitis
Varicellovirus	Humanes Herpesvirus 3	Varizellen/Zoster
	Equines Herpesvirus 1	Stutenabort
	Equines Herpesvirus 3	Koitalexanthem
	Equines Herpesvirus 4	Rhinopneumonitis
	Equines Herpesvirus 6	Eselherpesvirus 1
	Equines Herpesvirus 8	Eselherpesvirus 3
	Bovines Herpesvirus 1	IBR-IPV-IBP
	Bovines Herpesvirus 5	Bovine Enzephalitis
	Suines Herpesvirus 1	Aujeszkysche Krankheit

Die Subfamilie Betaherpesvirinae besitzt ein enges Wirtsspektrum, welches in der Regel auf nur eine Spezies beschränkt ist, die Organmanifestation jedoch zeigt sich sehr variabel (Murphy et al. 1999, Rolle et Mayr 2002). Ihr Prototyp stellt das humane Cytomegalievirus (CMV) dar. Der Replikationszyklus ist relativ langsam und Zelllyse

zeigt sich erst einige Tage nach erfolgter Infektion (Murphy et al. 1999). Die infizierten Zellen erscheinen deutlich vergrößert (Modrow et Falke 2002b). Latente oder persistierende Virusinfektionen finden sich in Speicheldrüsen, Lymphgewebe, ZNS und Nieren (Murphy et al. 1999, Rolle et Mayr 2002). Einige Spezies dieser Subfamilie sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Genera und einige Spezies der Subfamilie Betaherpesvirinae (zusammengefasst aus: Mohanty et Dutta 1999, Verter et al. 1999, Wintzer 1999, Fields et al. 2002, Modrow et Falke 2002b, Rolle et Mayr 2002).

Genus	Spezies	Name/Erkrankung
Cytomegalovirus (CMV)	Humanes Herpesvirus 5	Humanes CMV
	Cercopithezines Herpesvirus 8	Rhesusaffen-CMV
Muromegalovirus	Murines Herpesvirus 1	Mäuse-CMV
	Murines Herpesvirus 2	Ratten-CMV
Roseolovirus	Humanes Herpesvirus 6	Exanthema subitum
	Suines Herpesvirus 2	Einschlusskörperchen- rhinitis

In der Subfamilie Gammaherpesvirinae sind lymphotrope Herpesviren zusammengefasst. Prototyp stellt hier das Epstein-Barr-Virus des Menschen dar. Das Wirtsspektrum dieser Subfamilie ist eng begrenzt (Murphy et al. 1999, Rolle et Mayr 2002) und eine Virusvermehrung, deren Dauer sich bei verschiedenen Virustypen unterscheidet (Modrow et Falke 2002b), nicht immer mit einer Zelllyse verbunden. Vertreter dieser Gruppe weisen eine Affinität für B- und T-Lymphozyten auf. In diesen Zellen und anderem lymphatischen Gewebe können sie persistieren (Murphy et al. 1999, Rolle et Mayr 2002). Einige typische Beispiele finden sich in Tabelle 3.

Tab. 3: Genera und einige Spezies der Subfamilie Gammaherpesvirinae (zusammengefasst aus: Mohanty et Dutta 1999, Verter et al. 1999, Wintzer 1999, Fields et al. 2002, Modrow et Falke 2002b, Rolle et Mayr 2002).

Genus	Spezies	Name/Erkrankung
Lymphocryptovirus	Humanes Herpesvirus 4	Epstein-Barr-Virus
	Pongines Herpesvirus 2	Orang -Utan-Herpesvirus
	Ovines Herpesvirus 2	Bösartiges Katarrhalfieber
Rhadinovirus	Equines Herpesvirus 2	Equines Zytomegalie-Virus
	Equines Herpesvirus 5	
	Equines Herpesvirus 7	Eselherpesvirus 2

Weitere Herpesviren wurden bei Reptilien (Schildkröte, Kobra, Boa, Leguan, Eidechsen), Amphibien (Frösche, Lurche) und Fischen (Salmoniden, Steinbutt, Hecht, Waller, Karpfen) isoliert (Murphy et al. 1999, Rolle et Mayr 2002).

2.2.1.2 Equine Herpesvirusspezies

Bei Equiden konnten bisher neun Herpesviren, EHV1 bis EHV9, identifiziert werden. Sechs davon (EHV1, EHV3, EHV4, EHV6, EHV8 und EHV9) gehören der Subfamilie Aphaherpesvirinae, die restlichen drei (EHV2, EHV5 und EHV7) der Subfamilie Gammaherpesvirinae an (Mayr et al. 1984, Goerlich 1988, Schmitz 1993, Telford et al. 1993, Reubel et al. 1995, Schlocker et al. 1995, Wintzer 1999).

Als Ursache spezifischer Erkrankungen beim Pferd sind zur Zeit vier verschiedene equine Herpesviren bekannt: EHV1, EHV3 und EHV4 aus der Subfamilie Alphaherpesvirinae (Thein 1994, Brunner et al. 1998, Rolle et Mayr 2002) sowie EHV2 aus der Subfamilie Gammaherpesvirinae (Thein 1994, Verter et al. 1999).

Große Bedeutung kommt dabei dem EHV1 zu, welches 1949 von Manninger als serologisch einheitlich angesehen wurde (zitiert nach Shimuzu et al. 1959).

Quantitative Unterschiede im Kreuz-Neutralisationstest zwischen verschiedenen Isolaten wiesen jedoch bald auf das Vorkommen von zwei Subtypen hin (Shimuzu et al. 1959). Bereits 1965 wiesen Mayr et al. nach, dass sich die in aller Welt gesammelten EHV1-Virusstämme aus dem Genital- und Respirationstrakt nicht nur aufgrund ihres Tropismus unterscheiden, sondern dass zwischen den Vertretern dieser zwei Gruppen, trotz enger immunologischer Verwandtschaft, keine völlige Kreuzimmunität besteht. Sie schlugen deshalb eine Differenzierung in den Subtyp 1 (Stutenabort) und Subtyp 2 (Rhinopneumonitis) vor. Bei Subtyp 1 handelte es sich meist um Isolate aus Feten, während Subtyp 2 nahezu ausschließlich von respiratorisch erkrankten Tieren isoliert wurde (Mayr et al. 1965, Burrows et Goodridge 1973). Diese Systematik galt bis Anfang der 80er Jahre, als es möglich wurde, durch gentechnologische und serologische Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern die Herpesviren genauer zu charakterisieren (Brunner et al. 1998, Verter et al. 1999). Durch DNS-Analysen („molecular fingerprinting“) konnte nun festgestellt werden, dass die DNS der beiden „Subtypen“ nur eine unvollständige Homologie von ca. 80% aufweist und sich in markanten Abschnitten unterscheidet (Allen et Turtinen 1982, Allen et al. 1983, Allen et Bryans 1986, Thein et al. 1987, Telford et al. 1992, Nagy et al. 1997, Brunner et al. 1998, Telford et al. 1998). Dies erklärt die Unterschiede in den biologischen Eigenschaften und führte zu einer Korrektur der Systematik. Die beiden Subtypen gelten inzwischen als eigenständige Herpesviruspezies der Subfamilie Alphaherpesvirinae, Genus Varicellovirus, mit den Bezeichnungen EHV1 (ehemaliger Subtyp 1) und EHV4 (ehemaliger Subtyp 2) (Fitzpatrick et Studdert 1984, Thein et al. 1987).

Bei EHV6 bis EHV8 handelt es sich um asinine Herpesviren, die bei Eseln isoliert wurden (Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002).

2.2.2 Morphologie

Bei den Herpesviren handelt es sich um 120 – 200 nm große behüllte DNS-Viren (O`Callaghan et al. 1983, Falke 1999a, b, Murphy et al. 1999, Verter et al. 1999, Gärtner et Müller-Lantzsch 2002, Rolle et Mayr 2002). Sie bestehen aus insgesamt mehr als 30 Strukturproteinen (Modrow et Falke 2002b). Morphologisch sind die

klinisch bedeutsamsten Spezies EHV1 und EHV4 mit elektronenmikroskopischen Möglichkeiten nicht voneinander zu unterscheiden und gleichen den Herpesviren anderer Spezies (Brunner et al. 1998, Murphy et al. 1999, Modrow et Falke 2002a).

Im Inneren der Partikel findet man das sogenannte Virus-Core. Dabei handelt es sich um eine fibrilläre Proteinmatrix, mit der das doppelsträngige, lineare DNS-Genom assoziiert ist (Brunner et al. 1998, Murphy et al. 1999, Modrow et Falke 2002a). Im Elektronenmikroskop ähnelt es einer Spule, um welche die DNS wie ein Draht aufgewickelt zu sein scheint (Murphy et al. 1999, Modrow et Falke 2002b).

Das Core ist von einem ikosaedrischen, im Durchmesser etwa 100 nm großen, Nukleokapsid umgeben (Falke 1999a, b, Murphy et al. 1999, Modrow et Falke 2002b). Dieses Kapsid besteht aus 162 Kapsomeren (O`Callaghan et al. 1983, Falke 1999a, Murphy et al. 1999, Verter et al. 1999, Modrow et Falke 2002b), wobei jeweils sechs Kapsidproteinmoleküle ein sogenanntes Hexon bzw. Hexamer bilden. Diese sind zu tubulären Strukturen mit Öffnungen an der oberflächenexponierten Seite zusammengesetzt, reichen aber nicht bis in das Kapsidinnere. An den zwölf Ecken des Ikosaeders sind sogenannte Pentone bzw. Pentamere angebracht (Modrow et Falke 2002b), so dass schließlich 150 Hexamere und 12 Pentamere am Aufbau beteiligt sind (Murphy et al. 1999).

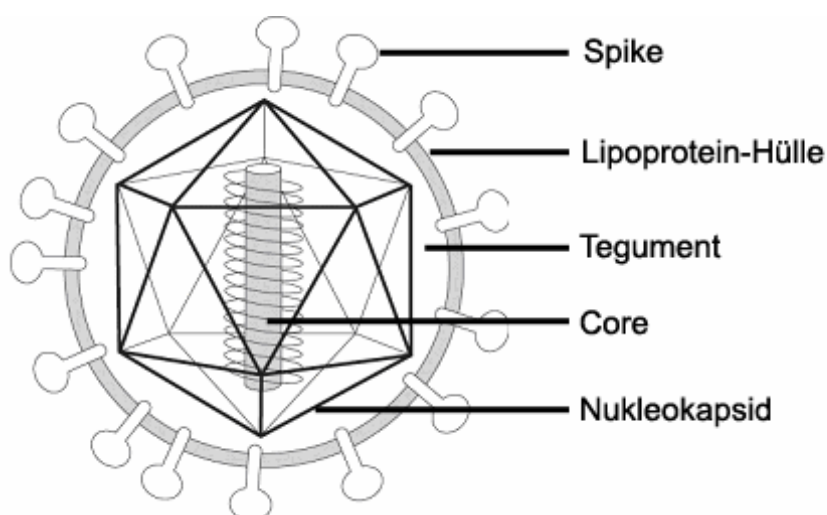
Umgeben wird dieses Nukleokapsid vom sogenannten Tegument, welches zwischen Kapsid und Virusmembran lokalisiert ist (O`Callaghan et al. 1983, Falke 1999a, Murphy et al. 1999, Verter et al. 1999, Gärtner et Müller-Lantzsch 2002, Modrow et Falke 2002b). Dieser Bereich kann unterschiedlich groß sein und verursacht damit den leicht variablen Durchmesser der Partikel (Murphy et al. 1999, Modrow et Falke 2002b). Das Tegument stellt sich nicht als einzelne Membran, sondern als eine Schicht amorphen Materials dar (O`Callaghan et al. 1983, Verter et al. 1999), bei der es sich um unstrukturierte Proteinmatrix, die bis zu 20 Virusproteine enthält, handelt. Für einige der Tegumentproteine des humanen Herpes-simplex-Virus sind wichtige, regulatorische Funktionen während der Frühphase des Replikationszyklus beschrieben (Modrow et Falke 2002b). Die Proteine, die man in den morphologisch den Herpes-simplex-Viren sehr ähnlichen Virionen der anderen Herpesviren findet,

haben teilweise vergleichbare Molekulargewichte und Funktionen (Modrow et Falke 2003b).

Das Tegument wiederum wird von einer Lipoprotein-Hülle mit zahlreichen kleinen Glykoprotein-Aufsätzen, sogenannten Spikes oder Peplomeren, eingeschlossen (Falke 1999a, b, Murphy et al. 1999, Allen 2002, Gärtner et Müller-Lantzsch 2002). Diesen Hüllproteinen, die sich teilweise als Proteinvorsprünge auf der Virusoberfläche darstellen (Gärtner et Müller-Lantzsch 2002, Modrow et Falke 2002b), kommt eine entscheidende Rolle bei der Infektion der Zellen zu (Nicolson et Onions 1990, Gärtner et Müller-Lantzsch 2002). Sie erfüllen wichtige Funktionen bei der Adsorption der Partikel an die Wirtszellrezeptoren und beim Eintritt des Virus in die Zelle. Besondere Beachtung verdient auch ihre Funktion bei der Induktion einer den Wirt schützenden, neutralisierenden Antikörperantwort (Modrow et Falke 2002a), da sie durch den Wirtsorganismus als Antigene erkannt werden (Nicolson et Onions 1990).

In Abbildung 1 wird anhand einer Grafik der schematische Aufbau eines Herpesvirus dargestellt.

Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Herpesvirus (zusammengestellt aus Falke 1999a, Braun 2002)



2.2.3 Virusgenom und Virusproteine

Die Genome der Herpesviren liegen in den Virionen als lineare, doppelsträngige DNS vor und sind zwischen 120 und 235 Kilobasenpaaren (kbp) lang (Verter et al. 1999, Allen 2002, Gärtner et Müller-Lantzsch 2002, Modrow et Falke 2002b). Die DNS von EHV1 und EHV4 besteht aus etwa 150 kbp (Telford et al. 1992). Bei allen Virustypen findet man einmalig vorkommende (unique) und wiederholte (repeat) Sequenzabschnitte, die bei den Vertretern der jeweiligen Genera in unterschiedlichen Mustern angeordnet sind. Bei der Infektion wird die lineare DNS in ein zirkuläres Molekül überführt, das dann als sogenanntes Episom im Zellkernplasma vorliegt (Modrow et Falke 2002b).

Nicht nur bei der Größe, sondern auch in der Zusammensetzung des Genoms finden sich bemerkenswerte Variationen innerhalb der Familie der Herpesviren. So variiert der Anteil von Guanin und Cytosin zwischen 32 und 74% und übertrifft damit deutlich die Variabilität der DNS aller Eukaryoten (Murphy et al. 1999).

Die Herpesvirusgene werden in drei Kategorien unterteilt, abhängig von der Art der Proteine, die sie codieren. Die erste Gruppe ist für die Codierung von an der Virusreplikation beteiligten Proteinen zuständig, eine weitere codiert Strukturproteine. Die letzte Gengruppe setzt sich aus einer heterologen Reihe optionaler Gene zusammen, die nicht in allen Herpesviren gefunden wurden. Ihre Funktion ist nicht vollständig geklärt, für die Replikation in Zellkulturen sind sie jedoch nicht notwendig (Murphy et al. 1999, Gärtner et Müller-Lantzsch 2002).

Bei den an der Replikation beteiligten Proteinen findet sich eine große Anzahl von Polypeptiden, die verschiedene Schritte des Nukleinsäurestoffwechsels katalysieren und somit bei der DNS-Synthese aktiv sind. Quantitativ überwiegen die sogenannten β - oder delayed early-Proteine, deren Bezeichnung auf dem Zeitpunkt, zu dem diese Proteine in der Zelle gebildet werden, beruht. So folgen sie zeitlich den α - bzw. immediate early-Proteinen und sind von deren Präsenz in der Zelle abhängig. Die meisten dieser immediate early-Proteine der Herpesviren sind Transaktivatoren, die den Ablauf der lytischen Infektion regulieren, indem sie die Expression der delayed

early- und der noch später gebildeten Proteine aktivieren (Gärtner et Müller-Lantzsch 2002, Modrow et Falke 2002b).

Bei diesen später gebildeten Proteinen (γ - oder late-Proteine) handelt es sich um Strukturproteine. Mehr als 30 dieser Proteine sind in Herpesvirus-Virionen enthalten, wobei sechs von ihnen im Nukleokapsid und zwei DNS-assoziiert vorliegen. Die Glykoproteine, von denen etwa 12 existieren, sind in der Hülle lokalisiert, wo die meisten in Form von sogenannten Peplomeren oder Spikes aufsitzen. Eines dieser peplomerisch vorliegenden Glykoproteine, Glykoprotein E (gE), besitzt Fc-Rezeptor-Aktivität und bindet Immunglobulin G (IgG) (Murphy et al. 1999).

Einige der wachstumsregulierenden und immunmodulierenden Proteine, die weder für die Virusreplikation noch für die Reifung in Zellkulturen notwendig sind, entsprechen zellulären Genen, die für Wachstumsregulation der Zelle und Modulation der Immunantwort zuständig sind. Diese viruskodierte Proteine spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Herpesvirusinfektionen (Murphy et al. 1999).

2.2.4 Erregereigenschaften

Wegen der lipidhaltigen Hülle ist das Virus empfindlich gegenüber Detergentien und Lipidlösungsmitteln. Der Erreger ist hitze- und säurelabil und wird bei 56°C innerhalb von 5-10 Minuten inaktiviert (Zellkulturvirus), im Bereich von 20-40°C bleibt es mehrere Tage vermehrungsfähig. An Oberflächen behält das Virus unter Ausschluß von UV-Bestrahlung und in Abhängigkeit vom Feuchtigkeitsgrad der Trägersubstanz im Temperaturbereich von 22-35°C seine Infektiosität bis zu 48 Tage, im Temperaturbereich um 4°C bis 7 Monate. Fäulnis sowie pH-Werte unter 4 und über 10 inaktivieren das Virus rasch (Verter et al. 1999).

Virusanzüchtung und –vermehrung bereiten heutzutage keine methodischen Schwierigkeiten. Der zytopathische Effekt (lytische Vermehrung) ist charakterisiert durch die Bildung intranukleärer Einschlusskörper, Synzytien- und Riesenzellbildung. Quantitative Unterschiede entstehen durch stammspezifische Viruseigenschaften, Passagezahl, Ausgangstitel und beimpfte Zellart (Verter et al. 1999).

Zu den charakteristischen Erregereigenschaften gehört die latente Virusinfektion, die über Monate, Jahre oder lebenslang bestehen bleibt (Edington 1991, Patel et al. 1992, Welch et al. 1992, Edington 1994, Kydd et al. 1994, Slater et al. 1994, Blunden et al. 1995, Schrag et al. 1997, Brunner et al. 1998, Falke 1999a, Rolle et Mayr 2002). In dieser Zeit befindet sich das Virusgenom nicht integriert sowohl in Ganglienzellen, wie z.B. den sensorischen Neuronen der Trigeminus-Ganglien, als auch in T-Lymphozyten des lymphatischen Gewebes des oberen Respirationstraktes, wie z.B. den Lymphonoduli submandibulares, retropharyngeales und bronchialen Lymphknoten (Edington 1991, Patel et al. 1992, Welch et al. 1992, Edington 1994, Kydd et al. 1994, Slater et al. 1994, Blunden et al. 1995). Während dieser Latenz liegt die Virus-DNS in den Zellen als extrachromosomales Episom in unterschiedlicher, aber stabiler Kopienzahl im Kernplasma vor. Sie wird zusammen mit dem Zellgenom durch die zelluläre DNS-Polymerase repliziert und an Tochterzellen weitergegeben. Mehrere unterschiedliche Mechanismen unterdrücken in dieser Phase die Produktion infektiöser Partikel. Hierbei sind jedoch die molekularen Vorgänge und Regulationsprozesse bei der Etablierung und der Aufrechterhaltung der Latenz sowie bei der erneuten Reaktivierung zur lytischen Replikation weitgehend unverstanden (Wintzer 1999, Modrow et Falke 2002b).

Eine solche Reaktivierung des Virus aus diesem reversiblen Stadium ist allerdings jederzeit möglich (Gibson et al. 1992 a, b). Ein Zusammenhang besteht z.B. mit Phasen von Immunsuppression durch Stress oder Kortikosteroid-Verabreichungen (Edington et al. 1985, Browning et al. 1988, Schrag et al. 1997). Da Stress unter anderem bei operativen Eingriffen, Stallwechsel, längeren Transporten, Geburt, Absetzen oder Laktation auf den Wirt einwirken kann, können also sehr vielfältige Situationen zu einer Reaktivierung des Virus führen. Die damit verbundene Virusvermehrung und –ausscheidung ist häufig nicht von klinischen Symptomen begleitet (Slater et al. 1994).

Die Fähigkeit zur latenten Infektion erklärt sich auch aus einer mangelnden Erkennbarkeit des Virus für das Immunsystem. Daher kommt es zu keiner immunologisch bedingten Selektion, wie es z.B. für das equine Influenzavirus charakteristisch ist, so dass beide equinen Herpesviren antigenetisch sehr stabil sind

und bislang keine allmählich fortschreitenden Veränderungen der Epitopstruktur ihrer Oberflächenproteine zeigen (Allen 2002).

2.2.5 Pathogenese und klinische Symptome

Sowohl für EHV1 als auch für EHV4 stellt der Respirationstrakt die natürliche Eintrittspforte dar und das Epithel der Atemwege bildet das primäre Infektionsgewebe (Allen et Bryans 1986, Gibson et al. 1992b).

Die Inkubationszeit ist mit zwei bis fünf (Gibson et al. 1992b, Kydd et al. 1994) bzw. drei bis zehn Tagen (Thein 1994, Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002) angegeben. Eine sich anschließende Virusausscheidung kann insbesondere bei erstmals infizierten Pferden während einer Phase von bis zu 14 Tagen erfolgen (Gibson et al. 1992b, Kydd et al. 1994). Der Höhepunkt der Virusausscheidung liegt innerhalb der ersten Tage nach Beginn des Nasenausflusses und fällt somit mit der fieberhaften Periode der Infektion zusammen (Gibson et al. 1992b, Kydd et al. 1994).

Im Rahmen der Infektion kommt es zu charakteristischen Veränderungen des nasopharyngealen Epithels mit fokaler, zytolytischer Destruktion und Exfoliation bis hin zur Basalmembran. Weiterhin findet sich eine massive Sekretion der respiratorischen Drüsen und eine starke entzündliche Reaktion, die durch eine Infiltration der Lamina propria unterhalb der zerstörten Epithelien mit mononukleären Zellen gekennzeichnet ist (Gibson et al. 1992b, Kydd et al. 1994).

Im Laufe der rasch folgenden Replikation in den Epithelien der oberen Atemwege werden die Viren mittels migrierender dendritischer Zellen und Makrophagen in die abführenden Lymphknoten transportiert (Kydd et al. 1994). Hier kommt es zur Infektion mononukleärer Leukozyten durch EHV1 bzw. in seltenen Fällen auch durch EHV4, infolge dessen es zu einer Virämie, die für einige Tage bestehen bleibt, kommen kann (Gibson et al. 1992a, Rolle et Mayr 2002).

Die klinischen Symptome werden häufig nur von jungen Pferden im Alter von bis zu zwei Jahren gezeigt, da bei älteren Tieren die klinisch nicht relevanten,

persistierenden Infektionen dominieren (Mohanty et Dutta 1999, Thein 1994, Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002). Kommt es jedoch zur Ausbildung typischer Symptome, äußern sie sich zunächst in einer akuten Rhinitis mit typischem beidseitigen Nasenausfluß, der zumindest zu Beginn rein seröser Natur ist und häufig unbemerkt bleibt (Mohanty et Dutta 1999, Thein 1994, Schrag et al. 1997, Murphy et al. 1999, Allen 2002). Dieses seröse Sekret weist hohe Titer an infektiösem Virus auf. Bereits nach etwa zwei bis drei Tagen wechselt der Charakter des Sekretes von wässrig zu mukös, weist eine weißliche Farbe auf und beinhaltet Leukozyten und desquamierte respiratorische Epithelzellen. Kommt es nach etwa vier bis fünf Tagen zu bakteriellen Sekundärinfektionen, ändert sich der Charakter des Nasenausflusses erneut und er stellt sich gelblich und mukopurulent dar (Thein 1994, Murphy et al. 1999, Allen 2002).

Neben dieser Rhinitis, die initial mit einer kurzzeitigen monophasischen Temperaturerhöhung einhergeht und über etwa ein bis fünf Wochen bestehen bleiben kann (Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002), kann es zu einer Pharyngitis/Laryngitis, mit dem typischen Symptom des Hustens, kommen. Es besteht die Möglichkeit zur Ausbreitung in tiefere Atemwege, wo sich eine Tracheobronchitis, Bronchiolitis und/oder Pneumonie entwickeln kann (Allen et Bryans 1986, Bryans et Allen 1989, Kydd et al. 1994, Murphy et al. 1999, Rolle et Mayr 2002). Kommt es zu einer Beteiligung der tieferen Atemwege, sei sie viral oder sekundär bakteriell bedingt, finden sich neben Husten entsprechende Symptome, z.B. unphysiologische Auskultationsbefunde (Allen 2002).

Während die Replikation des EHV4 und die daraus resultierenden Folgen gewöhnlich auf Epithelien der Atemwege und dazugehörige regionale Lymphgewebe beschränkt bleiben, können gesundheitliche Folgen einer EHV1-Infektion auch über den Respirationstrakt hinaus auftreten. Hierbei kann es, sogar ohne dass Symptome an den Atemwegen auffällig werden, zu fünf weiteren, schwerwiegenden Krankheitsbildern kommen: Abort, neonataler Fohlentod, Myeloenzephalopathie, pulmonale vaskulotrope Infektion und Augenerkrankungen (Patel et al. 1992).

Bereits seit 1932 sind Spätaborte infolge von Herpesvirusverbreitung in fetales Gewebe als eine der Hauptursachen für Fohlenverluste bekannt (Bryans et Allen 1989). Meist verläuft die vorangegangene Atemwegsinfektion der Stute asymptomatisch und es kommt zwei Wochen bis vier Monate nach der eigentlichen Infektion (Wintzer 1999, Rolle et Mayr 2002) zu einem plötzlichen Abort (Thein 1994, Schrag et al. 1997, Murphy et al. 1999, Allen 2002). Diese Aborte erfolgen im allgemeinen nicht vor dem 5. Trächtigkeitsmonat, sondern zu etwa 65% während des achten und bei 35% im neunten bis zehnten Trächtigkeitsmonat (Thein 1994, Rolle et Mayr 2002). Experimentell lassen sie sich jedoch auch schon im 3. und 4. Monat provozieren (Wintzer 1999).

In einem späteren Stadium infizierte Feten können noch lebend geboren werden, sind jedoch entweder bereits erkrankt oder erkranken innerhalb der ersten zwei Lebensstage (Dixon et al. 1978, Hartley et Dixon 1979, McCartan et al. 1995, Murphy et al. 1999, Rolle et Mayr 2002). Dabei zeigen sich die Fohlen schwach, unfähig zu trinken, werden lethargisch und entwickeln Lymphopenie, Hypoxie und schwere Atembeschwerden. Bei solchen, bereits im Uterus infizierten Fohlen, verschlechtert sich der klinische Zustand rapide und die Prognose ist immer als ungünstig zu bezeichnen (Allen 2002).

Eine weitere ungewöhnliche aber schwerwiegende Folge einer Infektion mit EHV1 stellt die Myeloenzephalopathie dar (Thein 1994, Schrag et al. 1997, Wilson 1997), wobei vereinzelt auch EHV4 als Ursache identifiziert werden konnte (Verheyen et al. 1998). Der zeitliche Abstand zwischen initialer Herpesvirusinfektion des Respirationstraktes und den folgenden neurologischen Symptomen beträgt etwa sechs bis zehn Tage (Allen 2002). Dabei erkranken die betroffenen Tiere zum Teil im Zusammenhang mit fieberhaften Allgemeinsymptomen, auch mit Atemwegsaffektionen, zum Teil aber beschränken sich die Symptome ausschließlich auf das Nervensystem (Kraft et al. 1982, Petzold et al. 1982, Edington et al. 1986, Thein et Brown 1988, Matsumara et al. 1994, McCartan et al. 1995). Diese neurologischen Symptome können sehr verschieden ausfallen. Ein häufig ausgeprägtes Bild stellt sich jedoch mit Ataxie der Hintergliedmaßen, begleitet von Kot- und Urinabsatzstörungen, dar. Diese infolge thrombotischer, ischämischer

Vaskulitis der kleinen Blutgefäße insbesondere des Rückenmarkes bei Hauspferden auftretenden Symptome erscheinen sehr plötzlich (Murphy et al. 1999, Allen 2002). Ihren Höhepunkt erreichen sie meist innerhalb der ersten zwei bis drei Tage nach Beginn der Erscheinungen (Allen 2002) und unter dem klinischen Bild wechselnder Paresen wird sie nicht selten von tödlich verlaufenden Paralysen gefolgt (Verter et al. 1999). Bei wilden Equiden konnte EHV1 an den Neuronen selbst nachgewiesen werden (Kahrman et al. 1993), ansonsten ist ein Isolieren des Virus aus Nervengewebe nicht geglückt; als Auslöser für die Vaskulitis werden Virus-Antikörper-Komplexe verdächtigt (Murphy et al. 1999).

Ein erst kürzlich beschriebenes Syndrom äußert sich in generalisierten, perakuten Infektionsverläufen bei jungen erwachsenen Pferden auf eine EHV1-bedingte Erkrankung des Respirationssystems folgend. Dieses Krankheitsbild wird auch als pulmonale vaskulotrope EHV1-Infektion bezeichnet (Allen 2002) und wurde in wenigen Fällen beschrieben (Del Piero et Wilkins 2001). Hierbei kommt es charakteristischerweise zu hohem Fieber, Anorexie, schwerer Depression, Atembeschwerden und hoher Mortalität. Der progressive Verlauf bis hin zum Tod wird von multisystemischer Vaskulitis, insbesondere der kleinen Blutgefäße der Lunge begleitet (Allen 2002).

Begleitend zu schweren Verläufen respiratorischer EHV1-Infektionen bei Fohlen können Augenerkrankungen auftreten, die sich als Uveitis und/oder Chorioretinitis manifestieren (Slater et al. 1992). Im schlimmsten Fall kann es zu massiver Zerstörung der Retina kommen, die bis hin zur Blindheit führen kann (McCartan et al. 1995).

2.2.6 Epidemiologie

Insbesondere im Hinblick auf rationale Entscheidungen zur Bekämpfung bzw. Prävention von Erkrankungen durch EHV1 und EHV4 bedarf es einer möglichst genauen Kenntnis der Übertragungswege der Viren sowie über ihr Vorkommen und die Verbreitung (Rolle et Mayr 2002).

2.2.6.1 Übertragung des Virus

Für die Übertragung des EHV1 und EHV4 spielt die Virusausscheidung über das Nasensekret eine bedeutende Rolle (Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002). Daneben kommen insbesondere bei EHV1 auch Vaginalsekret, Nachgeburt und abortierte Feten als Infektionsquelle in Frage. Die aerogene Übertragung, durch Aerolisierung bei hustenden Pferden, ist neben dem direkten Kontakt als der wichtigste Faktor für die Weiterverbreitung des Virus innerhalb eines Bestandes anzusehen, da aufgrund seiner relativ geringen Tenazität indirekte Übertragungen über virusinfizierte Vektoren eine geringere Rolle spielen (Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002).

Epidemiologisch bedeutsam sind latent infizierte Tiere, die unter bestimmten Bedingungen (Stresseinwirkung, immunsuppressive Therapie) zu Virusausscheidern werden (Burrows et Goodridge 1984, Edington et al. 1985, Allen et Bryans 1986, Browning et al. 1988, Gibson et al. 1992b, Brunner et al. 1998, Murphy et al. 1999, Rolle et Mayr 2002). Hierbei können bereits Fohlen in einer frühen Lebensphase trotz vorhandener maternalen Antikörper infiziert werden (Allen et Bryans 1986).

Eintrittspforten sind die Schleimhäute sowohl des Respirations- als auch des Genitaltraktes. Desweiteren ist eine intrauterine Übertragung ebenfalls möglich (Verter et al. 1999).

2.2.6.2 Geografische Verbreitung der Infektion

Unter natürlichen Bedingungen sind Pferde, Esel und Maultiere für EHV1 bzw. EHV4-Infektionen empfänglich. In Einzelfällen wurde darüber hinaus über die Isolierung von EHV1 bei Hirsch, Alpaka, Gazelle, Antilope, Lama, Zebra und Rind berichtet (Montali et al. 1985, Chowdhury et al. 1988, Crandell et al. 1988, House et al. 1991, Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002).

Über klinisch manifest und mit Aborten verlaufende Ausbrüche virologisch gesicherter EHV1-Infektionen liegen zahlreiche Berichte aus unterschiedlichen Ländern vor (Bürki et al. 1984, Maxie 1986, Frank 1989, Paweska et al. 1991, Matsumura et al. 1992, Zientara 1993). In Deutschland wurde zwischen 1972 und 1993 bei bis zu 49 % der untersuchten Fohlenaborte EHV1 nachgewiesen (Steinhagen 1988, Kaaden et al. 1993). Das klinische Bild der Rhinopneumonitis des Pferdes ist ebenfalls weltweit verbreitet (Verter et al. 1999).

Sowohl EHV1 als auch EHV4 finden sich ubiquitär und enzootisch in den meisten Populationen domestizierter Pferde (Mohanty et Dutta 1999, Allen 2002). Antikörper-Prävalenzraten beider Spezies bis nahezu 100 % werden in Europa beschrieben (Bagust 1971, Maglione et al. 1991). Auch in Deutschland (BRD) wurde über ähnlich hohe Raten seropositiver Tiere berichtet (Teufel 1977, Steinhagen 1988, Herbst et al. 1992). Eine Unterscheidung in Impftiter und natürlich erworbene Immunität erfolgte jedoch in keinem der untersuchten Fälle.

2.2.6.3 Infektionsbedingte erworbene Immunität

Die infolge einer Infektion natürlich erworbene Immunität gegen EHV1 schützt zusätzlich gegen eine EHV4-Infektion und umgekehrt. Nach dem Verschwinden lokaler Schleimhautimmunität, bestehend aus schleimhautlokalisiertem Immunglobulin A (IgA) und spezifischen T-Zellen, kann sich Feldvirus, trotz Gegenwart humoraler Immunität, erneut an den Schleimhäuten ansiedeln und zu Viruspersistenz führen (Verter et al. 1999).

Die zelluläre Immunität setzt bereits zwei Tagen nach erfolgter Infektion an den Schleimhäuten ein, erreicht nach sieben bis 15 Tagen ihren Höhepunkt und nimmt ab der sechsten bis achten Woche wieder rasch ab. Die humorale Immunität hingegen beginnt erst nach 14 bis 21 Tagen, wobei die Antikörper etwa in der vierten Woche nach Infektionsbeginn einen Höhepunkt erreichen, durchaus aber auch bis etwa in den fünften oder sechsten Monat post infectionem persistieren können. Eine Korrelation zwischen der Höhe der Antikörpertiter und der Qualität der zellulären Immunität besteht nicht. Für die Infektionsabwehr besitzt die zelluläre Immunität die größte Bedeutung (Verter et al. 1999).

Saugfohlen nehmen bereits mit dem Kolostrum maternale Antikörper auf. Diese virusneutralisierenden Antikörper vom Typ Immunglobulin G (IgG), gelegentlich auch IgM, werden von der Mutterstute bis zum zweiten Tag post partum in der Quantität ihrer eigenen Serumantikörper mit der Milch ausgeschieden. Um eine ausreichende Versorgung des Fohlens mit diesen Antikörpern zu gewährleisten, muss es innerhalb der ersten 16 Lebensstunden optimal mit Kolostrum versorgt werden. Bei genügender Aufnahme sind im Fohlenserum bereits vier Stunden nach der Geburt Antikörpertiter in gleicher Höhe wie im Kolostrum nachweisbar.

Diese passiv erworbenen Antikörper werden in der Regel bis zur sechsten bzw. achten Lebenswoche wieder abgebaut. Mit einer eigenen, voll belastbaren Immunität kann allerdings kaum vor dem sechsten bis achten Lebensmonat gerechnet werden, woraus sich die Häufung klinisch manifester Infektionen bei jungen Pferden erklären lässt (Verter et al. 1999).

2.2.7 Prophylaxe

Eine vollständige Elimination des Herpesvirus aus ganzen Herdenbeständen ist aufgrund der Erregereigenschaften praktisch unmöglich. Die beste Strategie zur Vermeidung der Infektionsfolgen liegt sowohl in der prophylaktischen Immunisierung als auch in der Durchführung präventiver Managementmaßnahmen (Thein 1994, Allen 2002, Rolle et Mayr 2002).

2.2.7.1 Vakzination

Die Vakzination gegen EHV1- und EHV4-bedingte Erkrankungen ist als Teil eines präventiven, gesunderhaltenden Programmes für alle Pferde, die dem Risiko ausgesetzt sind, eine solche Infektion zu erwerben, zu betrachten (Wilson 1995). Hierbei helfen routinemäßige Impfprogramme den wirtschaftlichen Schaden, der durch die klinische Manifestation entsteht, zu begrenzen (Brunner et al. 1998).

Praktisch alle Fohlen weisen messbare spezifische Antikörper gegen EHV1 und EHV4 nach Aufnahme von Kolostrum auf. Diese von der Mutter übertragenen Antikörper verfallen aber exponentiell mit einer Halbwertszeit von 26 Tagen, so dass diese Fohlen schließlich seronegativ und deshalb mit einem Lebensalter von fünf bis sechs Monaten maximal infektionsgefährdet sind. Aus diesem Grund sollten die Vakzination und die folgenden Booster zeitlich so gewählt werden, dass ein maximaler Schutz der jungen Pferde insbesondere vor dem zu erwartenden Stress durch Absetzen, Transporte, Integration in neue soziale Gruppen, beginnendes Training und ähnlichem erreicht wird (Allen 2002). Tragende Stuten sollten, entsprechend der Herstellerinformationen der gewählten Vakzinen, zum Schutz vor EHV1-bedingten Aborten und zur Erreichung hoher maternaler Antikörperspiegel rechtzeitig geimpft werden (Bryans et Allen 1986).

Bei den ersten Herpesvirus-Impfstoffen, die auf den Markt kamen, handelte es sich um EHV1-Impfstoffe (Thein 1974, Mayr et al. 1978, Mayr et al. 1979, Mumford et Bates 1984, Thein 1994). Der bereits damals verwandte Impfstamm RacH, der in Europa und Amerika bis heute eingesetzt wird, wurde durch fortlaufende Passagen in primären Schweinenierenzellen attenuiert. Der Stamm ist genetisch stabil und seine Unschädlichkeit und Wirksamkeit haben sich wiederholt im Tierversuch und durch den langen Einsatz in der Praxis bestätigt. Bislang war der Grund für die Unschädlichkeit des Impfvirus RacH unbekannt. Erst kürzlich gelang es, ein bestimmtes Gen, das IR6-Gen, für den Verlust der Virulenz verantwortlich zu machen (Brunner et al. 1998). Desweiteren ist der Stamm RacH im DNS-Muster nach Restriktionsenzymanalyse bzw. elektrophoretischer Auftrennung eindeutig von Feldisolaten unterscheidbar (Meyer et al. 1994, Osterrieder et al. 1994).

Einige Jahre nach der Einführung von Lebendvakzinen wurden auch EHV1-Impfstoffe aus inaktivierten Erregern angeboten, die vor allem eine definierte Sicherheit versprachen. Challengeversuche haben aber schnell die Grenzen dieser Produkte aufgezeigt, insbesondere bei der Immunprophylaxe gegen den Virusabort. Nachdem man EHV1 und EHV4 serologisch und biologisch voneinander differenzieren und als eigenständige equine Herpesviren klassifizieren konnte, wurden bei der weiteren Entwicklung inaktivierter Impfstoffe auch EHV4-Stämme berücksichtigt. In einem Experiment wurde gezeigt, dass im Virusneutralisationstest nach Immunisierung mit einer inaktivierten EHV4-Vakzine auch kreuzreaktive, neutralisierende Antikörper gegen EHV1 gebildet wurden. Dagegen ließen sich keine Antikörper gegen EHV4 nach Verwendung der entsprechenden EHV1-Vakzine nachweisen. Die hervorgerufene zellvermittelte Immunität dagegen war nach Applikation beider inaktivierter Viren gleichermaßen kreuzreaktiv, wie durch in-vitro-Lymphozytenstimulation nachgewiesen wurde (Thein 1994, Brunner et al. 1998). In der Annahme, dass EHV4-Vollantigenimpfstoffe gegen die homologe Infektion einen besseren Schutz bieten als die heterologe Immunisierung mit EHV1-Stämmen, wurden ab 1991 in den USA, seit 1992 auch in Deutschland bivalente Vakzinen (EHV1 und EHV4 kombiniert) zum Schutz gegen den Rhinopneumonitiskomplex entwickelt (Thein 1994, Brunner et al. 1998).

Heute stehen zur Immunprophylaxe der durch EHV1- und EHV4-Infektionen hervorgerufenen Symptome in Deutschland sowohl inaktivierte als auch Lebendvakzinen zur Verfügung (Allen et Bryans 1986, Steinhagen 1986, Becker et Unger 1987, Babinski 1988, Bürki et al. 1989a, b, 1990, 1991a, b, Paweska et al. 1991, Brunner et al. 1998, Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002). Sie können als Einzelimpfstoffe verwendet werden oder in Kombinationsimpfstoffen gegen mehrere Infektionserreger integriert sein (Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002).

Die Anwendung dieser bereitstehenden Impfstoffe sollte immer nach Anweisung des Herstellers durchgeführt werden, folgt aber praktisch gleichen Schemata. Die Impfung besteht aus der Grundimmunisierung im vierten und sechsten/siebten Lebensmonat, aus der Auffrischungsimpfung sechs Monate nach der Grundimmunisierung mit Antigenimpfstoffen (inaktiviert) bzw. nach neun Monaten bei

Verwendung von Lebendvakzinen sowie aus Wiederholungsimpfungen nach jeweils sechs Monaten. Das Intervall von sechs Monaten bei den Wiederholungsimpfungen gilt für alle Impfstoffarten (Verter et al. 1999, Rolle et Mayr 2002).

Zur besseren Effizienz der Impfprogramme muss eine vorschriftsmäßige, regelmäßige Vakzination des gesamten Bestandes gewährleistet sein (Brunner et al. 1998). Eine so durchgeführte Vakzination kann zwar eine Infektion mit dem Virus nicht verhindern, verringert aber deutlich die Intensität klinischer Symptome, sowie Menge und Dauer der Virusausscheidung, so dass der Schweregrad der respiratorischen Erkrankung verringert, die Ausbreitung reduziert und Aborte meist verhindert werden können (Allen 2002, Rolle et Mayr 2002).

Häufig wird jedoch über niedrige Antikörpertiter nach der Impfung berichtet (Allen et Bryans 1986, Steinhagen 1986, Becker et Unger 1987, Babinski 1988, Bürki et al. 1989a, b, 1990, 1991a, b, Paweska et al. 1991). In Bezug auf die Vermeidung von Aborten kommt es zwar insgesamt bei konsequenter Impfung zu einer Senkung der Abortrate, in Einzelfällen sind jedoch Verfohlungen nicht zu verhindern. Als Ursache für die Impfdurchbrüche werden genetische Varianten des Virus diskutiert. Auch ein Zusammenhang mit schlechten Haltungsbedingungen der betroffenen Tiere ist nicht auszuschließen (Allen et Bryans 1986, Steinhagen 1986, Becker et Unger 1987, Babinski 1988, Bürki et al. 1989a, b, 1990, 1991a, b, Paweska et al. 1991). Vakzinationsversuche mit Resequin plus® (Intervet) im österreichischen Lippizanergestüt Piber, in dem es 1983 zu einem EHV1-Ausbruch kam, weisen darauf hin, dass der Erfolg der Vakzination von der endemischen Situation und konsequenten Beachtung von Impfprogrammen abhängig ist (Bürki 1993).

2.2.7.2 Management

Zur Prävention einzusetzende Management-Maßnahmen stützen sich auf die Unterteilung der Pferde eines Anwesens in kleine Gruppen, Betrachtung und Behandlung dieser Gruppen als isolierte Einheiten und Reduktion von Stress (Allen 2002). Diese Gruppen sollten in Bezug auf Alter, Gestationsstatus, Nutzung und

Häufigkeit der Entfernung einzelner Tiere aus der Gruppe möglichst homogen gewählt werden.

Besondere Sorgfalt sollte für das Verbringen neuer bzw. zeitweise mit anderen Pferden in Kontakt getretener Tiere in den Bestand gelten. Hier sollte vor der Integration solcher Pferde in eine geschlossene Gruppe eine Quarantäne von mindestens 21 Tagen eingehalten werden. Erkrankte Tiere müssen sofort isoliert werden (Verter et al. 1999, Allen 2002).

Eine weitere Möglichkeit der Prävention besteht in der Reduktion von Stress, der zur Reaktivierung und erneuten Verbreitung von Virus durch latent infizierte Pferde führen kann. Als solche Stressfaktoren, die es zu minimieren gilt, könnten z.B. Überbelegung der Stallungen, schlechter Ernährungszustand, starke parasitäre Besiedlung, lange Transporte, Trennung bestehender sozialer Gruppen, andere Grunderkrankungen u.ä. betrachtet werden (Allen 2002).

Eine weitere grundlegende Maßnahme liegt im Hygienemanagement (Thein 1994), wie z.B. gründlicher Desinfektion im Falle eines bereits begonnenen Ausbruches der Erkrankung (Vickers et Powell 2001). Insbesondere bei eingetretenen Aborten sind nicht nur die abortierenden Stuten zu isolieren. Auch das abortierte Material, sowie das Stroh sind zu entfernen und die Boxen gründlich mit handelsüblichen Präparaten zu desinfizieren (Wintzer 1999).

Bestände, in denen es zu Virusaborten gekommen ist, sollten für die Dauer von acht Wochen nach dem jeweils letzten Abortfall für jeden Pferdeverkehr gesperrt werden. Einzelne Zuchtverbände verlangen die Meldung solcher Aborte zur zentralen Erfassung und schreiben entsprechende Vorsorgemaßnahmen vor, leider konnte sich jedoch nicht auf eine in Deutschland einheitliche Einführung solcher Maßnahmen geeinigt werden (Verter et al. 1999).

2.2.8 Labordiagnostik

Aufgrund klinischer Symptome ist eine eindeutige Differenzierung der Herpesviren von anderen in Betracht zu ziehenden Erregern nicht möglich, da pathognomonische Anzeichen fehlen (Verter et al. 1999). Die Diagnose muss deshalb durch Laboruntersuchungen gesichert werden. Üblicherweise wird als Untersuchungsmaterial nasopharyngeales Sekret, venöses Blut (Allen 2002) und im Abortfall Abortmaterial (Rolle et Mayr 2002) eingesetzt, wobei im letzten Fall bedacht werden muss, dass fetales Gewebe bei ursächlicher Veränderung an der Uteruswand nicht infiziert sein muss (Wintzer 1999).

Sollte Nasensekret für den direkten Virusnachweis als Untersuchungsmaterial zum Einsatz kommen, so wird der größte Erfolg bei einem Entnahmezeitpunkt innerhalb der ersten 48 Stunden nach Beginn der Erkrankung erzielt, während der Patient noch Fieber aufweist und das Nasensekret von serösem Charakter ist. Für den Erregernachweis aus venösem Blut sollte dieses zwischen dem vierten und zehnten Tag nach Beginn der respiratorischen Symptome gewonnen werden (Allen 2002). Für die zuverlässige serologische Diagnose einer akuten equinen Herpesvirusinfektion sind gepaarte Serumproben notwendig (Thomson et al. 1976). Die erste Probe sollte hierzu zwischen dem zweiten und dritten Tag des Krankheitsbeginns, die zweite etwa drei Wochen später gewonnen werden (Allen 2002).

2.2.8.1 Erregernachweis

5 Direkter Virusnachweis

Die Isolierung von EHV1 und EHV4 in der Routinediagnostik erfolgt durch Anzüchtung in der Zellkultur (Verter et al. 1999). Hierzu sind sowohl Nasopharyngeal- bzw. Konjunktivaltupferproben, Organhomogenate des Fetus und der Plazenta einsetzbar. Lediglich EHV1 kann auch aus Blutproben isoliert werden. Zahlreiche Zelllinien sind empfänglich für EHV1. EHV4-Feldvirus vermehrt sich jedoch nur auf von Pferden stammenden Zellen und Schweinenierenzellen (Bryans 1980, O`Callaghan et al. 1983, Allen et Bryans 1986).

6 Antigennachweis

Unter Verwendung der direkten oder indirekten Immunfluoreszenz-, Immunperoxidase- und Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Technik können EHV1 und EHV4 an formalinfixierten Paraffinschnitten oder Gefrierschnitten von Organen diagnostiziert werden. Die Vorteile liegen in der hohen Spezifität und Sensitivität sowie der relativ leichten Durchführbarkeit der Methoden. Desweiteren sind retrospektive Studien möglich (Gimeno et al. 1987, Jönsson et al. 1989, Gunn 1991, Whitwell et Blunden 1992, Schultheiss et al. 1993). Der Einsatz monoklonaler Antikörper (mAK) erlaubt hierbei eine Differenzierung von EHV1 und EHV4 (Edington et al. 1987).

Ein von Sinclair und Mumford (1992) entwickelter ELISA zum Antigennachweis aus Nasentupferproben zeigte im Vergleich zur üblichen Zellkulturtechnik lediglich eine Sensitivität von 68 % und eine Spezifität von 100 %.

7 Nachweis des Virusgenoms

Über die Verwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bei der Diagnostik von EHV1- und EHV4-Infektionen ist bereits mehrfach berichtet worden (Ballagy-Pordany et al. 1990, O'Keefe et al. 1991, Khun et al. 1992, Welch et al. 1992). Als Vorteil erwies sich die höhere Sensitivität und Schnelligkeit der PCR gegenüber der Virusisolierung aus Nasentupfern von natürlich infizierten Pferden. Außerdem kann EHV1 von EHV4 unterschieden werden (Hardt et al. 1992, Sharma et al. 1992, Wagner et al. 1992, Gilkerson et al. 1994). Retrospektive Untersuchungen von bereits formalinfixierten und in Paraplast eingebetteten Gewebeschnitten, die bis zu drei Jahre gelagert wurden, sind möglich. Hierbei stimmten die Ergebnisse der PCR gut mit den zuvor durchgeführten Untersuchungen (Virusisolierung, Pathohistologie) überein (Hardt et al. 1992, Hardt 1994, O'Keefe et al. 1994).

Mit der DNS-DNS-Hybridisierung gelang die Differenzierung von Feldisolaten und Impfvirus (Meyer et al. 1992) sowie eine Unterscheidung zwischen EHV1 und EHV4. Die Ergebnisse stimmten in hohem Maße mit der zum Vergleich herangezogenen Immunhistologie überein (Hardt 1994).

2.2.8.2 Antikörpernachweis

8 Neutralisationstest

Für den indirekten Virusnachweis wird vor allem der Serumneutralisationstest eingesetzt (Verter et al. 1999), der die historisch älteste und immer noch eindeutigste Methode zur Überprüfung der Immunität darstellt (Doerr et Braun 2002). Auch in der vorliegenden Studie kam dieses Verfahren zum Einsatz. Das Prinzip besteht in der Bildung eines Virus-Antikörper-Komplexes nach erfolgtem Zusammentreffen homologer Antikörper mit außenliegenden Epitopen des Virions. Hierdurch werden die Außenstrukturen, mit deren Hilfe sich das Virus an die Wirtszellmembran bindet, sterisch blockiert. Als Folge kommt es zum Verlust der Infektiosität, der sogenannten Virusneutralisation (Falke 1999a).

Die Höhe der Titer neutralisierender Antikörper nach einer Infektion mit EHV1 bzw. EHV4 ist u.a. abhängig von vorausgegangenen Infektionen und der Impfanamnese. Das Ergebnis des Neutralisationstests wird von dem als Antigen verwendeten EHV1-Stamm, seiner Passagezahl und dem Zellsystem beeinflusst (Bernhardt 1993). Die serologische Diagnostik von akuten EHV1- und EHV4-Infektionen, nicht aber ihre Unterscheidung, ist anhand einer Serokonversion oder eines Titeranstieges um mindestens drei Titerstufen innerhalb von 2 bis 3 Wochen möglich.

Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR)

Die KBR wurde früher häufig zur serologischen Diagnostik von EHV1- und EHV4-Infektionen verwendet. Ein Titeranstieg um das 4-8fache gilt als positiv. Da KBR-Titer im Vergleich zu Neutralisationstern schneller absinken, ist die KBR für die Untersuchung akuter Infektionen besonders geeignet (Thomson et al. 1976, Mumford et al. 1987).

9 ELISA

Antikörper gegen EHV1 bzw. EHV4 können mit guter Übereinstimmung zum Neutralisationstest auch im ELISA bestimmt werden. Die Anwendung beschränkt sich bisher jedoch auf experimentelle, wissenschaftliche Untersuchungen (Hohdatsu et al. 1986). Ein immundominanter Anteil des Glykoproteins GP14 von EHV1 wurde

als Antigen zum Nachweis von Antikörpern gegen EHV1 und EHV4 im ELISA erfolgreich eingesetzt. Eine Differenzierung von EHV1 und EHV4 war jedoch nicht sicher möglich (Sinclair et al. 1993).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Pferde

Die Untersuchungen der insgesamt 97 Pferde fanden im Zeitraum von November 1999 bis November 2001 statt. 40 der untersuchten Pferde waren männlich, 25 männlich kastriert und 32 weiblich. Es handelte sich um 37 Warmblüter, 28 Vollblüter und 32 Ponys, wobei Kleinpferde der Rassen Isländer (n=9) und Haflinger (n=3) der Gruppe der Ponys zugeordnet wurden.

53 Tiere standen aufgrund einer Erkrankung des Respirationstraktes, im Sinne einer chronisch obstruktiven Bronchitis, in der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik (Innere Krankheiten der Pferde) der Justus-Liebig-Universität in Gießen und wurden als Gruppe der COB-Patienten bezeichnet. 28 dieser Pferde waren innerhalb der letzten sechs Monate gegen EHV1 und EHV4 geimpft, bei 25 Tieren erfolgte diese Impfung nicht oder lag länger als sechs Monate zurück, so dass diese Patienten als nicht geimpft definiert wurden. Von 24 Vollblütern, die aus Rennställen stammten und regelmäßig, maximal 3 Monate zuvor zuletzt geimpft wurden, wurden BALF- und Serum-Proben sowie notwendige Daten von den untersuchenden Tierärzten bereitgestellt. Diese Tiere bildeten die Gruppe der Rennpferde. 20 Ponys, im Alter von etwa sechs Monaten, stammten aus einem Tierversuch des Instituts für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen und wurden in der Gruppe der ungeimpften Fohlen zusammengefasst.

Das Alter der COB-Patienten lag im Mittel bei 10,6 Jahren, die Spannbreite lag zwischen 2,5 und 20 Jahren. Die Rennpferde waren im Mittel 3,5 Jahre alt bei einer Spannbreite von 2 bis 6 Jahren. Das Alter der Fohlen betrug etwa 6 Monate.

3.1.2 Untersuchungen

3.1.2.1 Klinische Untersuchung

Die in der Klinik eingestellten Patienten wurden sowohl in Ruhe als auch nach Belastung klinisch untersucht. Es erfolgte die Ermittlung der Körperinnentemperatur, der Puls- und Atemfrequenz. Eingeschlossen wurden nur Pferde mit physiologischer Körperinnentemperatur, da es infolge der Lavage in seltenen Fällen zu einem leichten Anstieg der Körpertemperatur kommen kann (Fogarty 1990, McGorum et Dixon 1994, Sweeney et Beech 1991). Im weiteren wurden bei der speziellen klinischen Untersuchung Schwerpunkte auf den Atmungsapparat und das Herz-Kreislaufsystem gesetzt. Von besonderem Interesse war hierbei die Feststellung des Atemtyps, einer evtl. vorliegenden inspiratorischen und/oder expiratorischen Dyspnoe, spontanen oder auslösbaren Hustens, eventuell vorliegenden Nasenausflusses und des Perkussionsbefundes der Lunge. Desweiteren erfolgte die Auskultation der Lunge und der Trachea sowohl in Ruhe als auch nach etwa 10-minütiger Belastung an der Longe im Trab und Galopp. Bei einem Pferd mit starker Ruhedyspnoe wurde auf die Belastung verzichtet.

3.1.2.2 Arterielle Blutgase

Die arterielle Blutentnahme bei den in der Klinik eingestellten Pferden erfolgte in Ruhe vor der Belastung aus der rechten Arteria carotis communis. Die Punktion wurde etwa 10 cm über dem rechten Buggelenk in der Drosselrinne am Hals-Brust-Übergang durchgeführt. Die so gewonnene Blutprobe wurde in heparinisierten Glaskapillaren aufgefangen und umgehend mittels eines Blutgasanalysators (AVL 995-Hb, Firma AVL Biomedical Instruments, Graz, Österreich) untersucht. Nach Eingabe der aktuell gemessenen Rektaltemperatur wurden folgende Parameter mit Hilfe des Analysators ermittelt: Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck, aktueller atmosphärischer Druck, Hämoglobingehalt, pH-Wert und Basenüberschuss. Dabei wurden pro Patient drei Kapillaren gemessen und die Ergebnisse arithmetisch gemittelt.

Im Anschluss erfolgte die Berechnung der Alveolo-arteriellen Sauerstoff-Partialdruck-Differenz (A-aDO₂) anhand folgender Formel (Tisi 1985):

$$A-aDO_2 = (P_b - 47) \times 0,2095 - P_aCO_2 - P_aO_2 \text{ [mmHg]}$$

P _b	=	aktueller Barometerdruck [mmHg]
47	=	Wasserdampfpartialdruck bei 37°C [mmHg]
0,2095	=	prozentualer Anteil des Sauerstoffs in der Luft
P _a CO ₂	=	gemessener arterieller Kohlendioxidpartialdruck [mmHg]
P _a O ₂	=	gemessener arterieller Sauerstoffpartialdruck [mmHg]

3.1.2.3 Serumproben

Zur Gewinnung der Serumproben wurden unmittelbar vor Durchführung der Tracheobronchoskopie venöse Blutproben aus der Vena jugularis im Bereich des vorderen Halsdrittels entnommen. Etwa 10 ml Blut wurde in einem Glasröhrchen aufgefangen, wobei durch direkten Kontakt des Kanülenkonus mit der Röhrchenwand und dem so bedingten gleichmäßigen Einfließen der Probe eine Zerstörung von Blutzellen verhindert werden sollte. Das so gefüllte Röhrchen wurde für etwa 10 Stunden zur Gerinnung stehen gelassen, anschließend der seröse Überstand mittels Pipette überführt und bei –20 °C bis zu der unter 3.1.2.11 erläuterten Bestimmung des Harnstoffgehaltes gelagert.

3.1.2.4 Tracheobronchoskopie

Bei 52 der in der Klinik eingestellten Patienten wurde im Anschluss an die Belastung die Tracheobronchoskopie durchgeführt, bei einem der Patienten wurde auf eine vorherige Belastung verzichtet. Im Untersuchungsstand erfolgte unmittelbar nach der Blutentnahme eine Sedation mit 0,01 mg/kg KM Detomidin-hydrochlorid (Domosedan®, Pfizer GmbH, 76139 Karlsruhe, Deutschland). Die Bronchoskopie wurde mit Hilfe eines 2,20 m langen, flexiblen Endoskops mit einem Durchmesser von 13 mm (Firma Wolf, 75438 Knittlingen, Deutschland) vorgenommen. Es erfolgte die Beurteilung des Pharynx, des Larynx, der Trachea mit ihrer Bifurkation sowie der

Hauptbronchien. Zudem wurde auf Schleimhautschwellung, -rötung und das Vorliegen von Sekreten geachtet. Die Sekretmenge und –konsistenz wurde jeweils beurteilt und anhand der von Dickmann (1987) vorgeschlagenen Skala bewertet (siehe Tabelle 4) und gingen in die Auswertung mit ein.

Tab. 4: Endoskopie-Score nach Dickmann (1987)

Sekretmenge		Sekretviskosität	
0 =	keine Sekretansammlungen keine Sekretflocken	0 =	Schleimhaut feucht, nur geringe Mengen wässrigen Sekretes aspirierbar
1 =	keine Sekretansammlungen einzelne Sekretflocken	1 =	Schleimhaut feucht, einzelne feine Sekretflocken in wässrigem Sekret, leicht aspirierbar
2 =	flache ventrale Sekretansammlung einzelne größere Sekretflocken	2 =	Schleimhaut feucht, seromuköses Sekret ventral gelegen, homogen, leicht aspirierbar
3 =	deutliche ventrale Sekretansammlung reichlich Sekretflocken	3 =	Schleimhaut feucht, seromuköses Sekret mit einzelnen konsistenteren Sekretflocken, ventral gelegen, leicht aspirierbar
4 =	durchgehende ventrale Sekretstraße Sekretseebildung	4 =	Schleimhaut feucht/pappig, muköses bis mukopurulent Sekret, einige dorsale Schleimflocken, deutlich erschwerter Aspiration
5 =	mehr als 1/4 des Tracheallumens füllende(r) Sekretstraße(-see)	5 =	Schleimhaut pappig/trocken, muköses bis purulentes Sekret, reichlich dorsale Schleimflocken, teilweise spinnenwebenartige Schleimformationen, erschwerte Aspiration (kaum noch möglich)

3.1.2.5 Patientenklassifizierung

Um die Befunde der oben genannten, bei den Klinikspatienten durchgeführten Untersuchungen zusammenzufassen, wurde das Score-System nach Ohnesorge et al. (1998) genutzt. Dieses wurde jedoch geringfügig modifiziert, da keine zytologische Untersuchung des Tracheobronchialsekretes erfolgte, wie in der genannten Untersuchung vorausgesetzt. Infolgedessen sank die maximal erreichbare Punktzahl, die ein hochgradig erkranktes Pferd erreichen konnte, von 14 auf 11 Punkte (siehe Tabelle 5).

Die von der Autorin nicht selbst untersuchten Rennpferde wurden aufgrund der Befunde der Untersucher und der Rennleistung der Pferde als frei von COB beurteilt. Als ebenfalls COB-frei wurden die Fohlen aufgrund ihres Alters definiert.

Tab. 5: Score-System zur Einteilung der Pferde in Gruppen mit unterschiedlichem Krankheitsgrad einer COB nach klinischen Befunden

Untersuchungsparameter	Ergebnis	Score
Husten	vorberichtlich, spontan oder auslösbar	1
Ruhedyspnoe	verstärkt abdominal	1
	Nüsternblähen und/oder Dampf rinne	3
Auskultation	Rasseln und Giemen	2
Perkussion des Lungenfeldes	> 1-handbreit erweitert	1
	> 2-handbreit erweitert	2
A-aDO ₂	7 bis 14 mmHg	1
	> 14 mmHg	2
Bifurcatio tracheae	deutlich verdickt	1

Anhand dieses modifizierten Score-Systems erfolgte eine Unterteilung der Pferde in drei Gruppen (siehe Tabelle 6): ohne besonderen Befund, geringgradige COB, mittel- bis hochgradige COB.

Tab. 6: Einteilung des Erkrankungsgrades nach dem leicht modifizierten Score-System von Ohnesorge et al. (1998)

Gruppe	Score	Grad der Erkrankung
1	0-1	gesund
2	2-5	geringgradige COB
3	6-11	mittel-bis hochgradige COB

3.1.2.6 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die Durchführung der Bronchiallavage erfolgte bei den in der Klinik eingestellten Pferden im Anschluss an die Tracheobronchoskopie, ebenfalls im Untersuchungsstand. Hierzu wurde ein 2,20 m langes Endoskop mit einem Durchmesser von 13 mm (Firma Wolf, 75438 Knittlingen, Deutschland) genutzt. Durch den ventralen Nasengang wurde es unter Sichtkontrolle bis zum Kehlkopf, über die Trachea, an der Bifurkation vorbei in einen Bronchus des kaudodorsalen Lungenbereiches eingebracht, bis das Endoskop im Lumen eines Bronchus, in der sogenannten „wedge-position“, arretierte.

So fixiert wurde über den Arbeitskanal des Endoskops ein Volumen von 60 ml/100 kg KM einer sterilen, körperwarmen isotonen Kochsalzlösung mittels 60ml-Spritzen über den Biopsiekanal des Endoskops instilliert. Im Anschluß an die letzte Spritze erfolgte eine sofortige Aspiration unter gleichmäßigem, sanftem Zug.

Die so gewonnene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wurde durch eine zweilagige Gazeschicht in einen bereits von Kühlakkus umgebenen 500ml Kunststoffbecher gegeben, wobei grobe Schleimbeimengungen und schaumige

Surfactantbestandteile abgetrennt wurden. Die Menge der rückgewonnenen Spülflüssigkeit wurde bestimmt, die BALF zu Aliquots von 10 ml in verschließbare Kunststoffröhrchen überführt und umgehend bei -20°C eingefroren.

Die Entnahme der BALF bei den 20 Fohlen erfolgte innerhalb von 5 Minuten nach der Tötung ohne Sichtkontrolle mit einem flexiblen Katheder, wobei sich das weitere Verfahren nicht von dem bereits beschriebenen unterschied.

Die BALF der 24 Rennpferde wurde nach dem für die Klinikspatienten beschriebenen Schema gewonnen, filtriert, überführt und gelagert. Der Transport erfolgte gekühlt und die Proben wurden bis zu ihrer Untersuchung bei -20°C gelagert.

3.1.2.7 Konzentration der Bronchiallavageflüssigkeit (BALF)

Die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wurde vor dem Einsatz in den jeweiligen Testverfahren um den Faktor zehn konzentriert, wobei Probenbeimengungen bis zu einer Größe von 30 kD durch die Filtersysteme reduziert wurden. Größere Inhalte, wie etwa Immunglobuline, wurden somit in stärkerer Konzentration zurückbehalten. Da das zunächst eingesetzte Filtersystem (siehe unten) im Laufe der Untersuchungen nicht mehr im Handel erhältlich war, wurde ein zweites Verfahren für die restlichen Proben genutzt. Zur Kontrolle wurden drei Proben mit Hilfe beider Systeme konzentriert und auf ihren Antikörpergehalt mit den später beschriebenen Testverfahren getestet, wobei sich jeweils identische Ergebnisse zeigten.

12 der von den Fohlen gewonnenen sowie 14 den Klinikspatienten entnommene Proben wurden mittels konischer Filtermembranen Centriflo® CF25 (30 kD, Firma Amicon, Houston, USA) bearbeitet. Dazu wurden die Filtermembranen für 1 h in sterilem Wasser eingeweicht. Im Anschluss wurden die Membranen mit Hilfe einer sterilen Pinzette in einen Kunststofftrichter eingesetzt. Dieser wurde auf die Öffnung eines 50 ml fassenden Blue Cups (Firma Falcon, 3460 Birkerød, Dänemark) gesetzt und zunächst mit 7 ml der zu konzentrierenden Probe mittels Glaspipette befüllt.

Nach Abdeckung der Röhrchen mit Parafilm erfolgte eine Zentrifugation bei 1700 g und 5°C für 10 Minuten (Zentrifuge: Labofuge 400 R, Firma Heraeus, 63450 Hanau, Deutschland). Die Röhrchen wurden mit weiteren 3 ml aufgefüllt und bis zur Konzentration auf 1 ml weiter zentrifugiert.

Die restlichen Proben wurden mit Hilfe von Omega-Membranen 30 kD (Macrosep®, Firma Pall, 63303 Dreieich, Deutschland) nach Herstelleranleitung aufgearbeitet. Hierzu erfolgte zunächst eine Zentrifugation von 10 ml sterilen Wassers für 10 Minuten bei 3940 g (Labofuge 400 R, auf 45° fixierte Winkel, Firma Heraeus, 63450 Hanau, Deutschland). Im Anschluß daran wurden für 90 bis 180 Minuten 10 ml jeder Bronchiallavageprobe bei ebenfalls 3940 g und 5°C zentrifugiert und bis auf 1 ml eingeeengt. Das so gewonnene Konzentrat wurde mittels 1000 µl Eppendorf-Pipette für den weiteren Einsatz entnommen und bei –20 °C gelagert.

3.1.2.8 Inaktivierung des Untersuchungsmaterials

Die Serum- und konzentrierten BALF-Proben wurden im Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten erhitzt. Hierdurch erfolgte eine Inaktivierung unspezifischer thermophiler Inhibitoren (z.B. Komplement), die ansonsten die Virusneutralisation beeinflussen könnten.

3.1.2.9 Neutralisationstest (NT)

Der Neutralisationstest basiert auf der Fähigkeit neutralisierender Antikörper (nAK) zur in-vitro-Bindung viraler Antigene. Binden diese nAK an außenliegende Epitope des Virus, kommt es zur sterischen Blockade von Außenstrukturen, die für die Infektion der Wirtszelle notwendig sind. Infolge dessen kommt es zum Verlust der Infektiosität des Virus und damit zur sogenannten Virusneutralisation (Falke 1999b). Der bei intaktem Virus eintretende zytopathische Effekt (cpE) wird somit unterbunden und der Verlust der Infektiosität mikroskopisch sichtbar gemacht (siehe Abbildung 2).

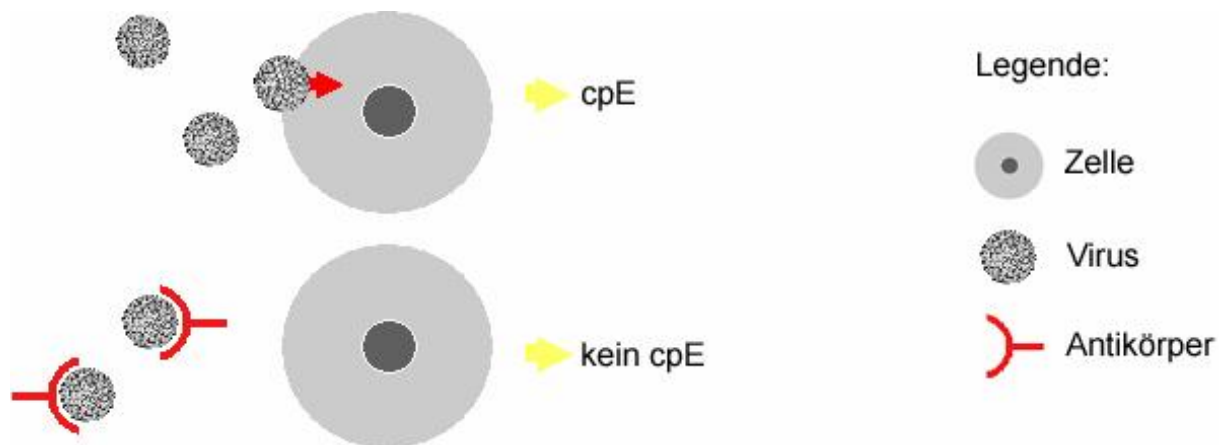


Abb. 2: Testprinzip des Neutralisationstests (nach Rolle et Mayr 2002)

Die Durchführung des Neutralisationstests erfolgte an einer Sicherheitswerkbank Klasse II (Herasafe, Firma Heraeus, Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau) auf Kunststoffplatten aus Polypropylen mit 96 Vertiefungen, sogenannten 96well Mikrotiterplatten (Microwell™, Firma NUNC, 4000 Roskilde, Denmark). In diese erfolgte zunächst eine Gewebekulturmedium-Vorgabe (siehe 8.4.1) von je 100 µl in die für die zu testenden Proben vorgesehenen Wells und 150 µl in die für die spätere Virustitration und die Zellkontrolle genutzten Vertiefungen (siehe Abbildung 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

■ je 150 µl
□ je 100 µl

Abb. 3: Vorlage des Gewebekulturmediums

Von dem positiven und negativen Kontrollserum (siehe 3.1.5) sowie den zu testenden Proben wurde jeweils ein Doppelansatz mit 50 µl in 2 x 2 der Wells vorgelegt (siehe Abbildung 4 als Beispiel einer Probe). Um eine Aussage über die Quantität der Antikörper machen zu können, erfolgte mit Hilfe einer Multikanalpipette aus 2 der Wells je Probe bzw. Kontrollserum die Herstellung von Verdünnungsreihen in log 3-Schritten. Hierzu wurden je Verdünnungsstufe 50 µl nach 8-fachem Mischen durch Aufziehen und Ausstoßen übertragen, die letzten 50 µl wurden verworfen (siehe Abbildung 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abb. 4: Vorlage einer Probe

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B					↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C					↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
D					↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
E					↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
F					↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G					↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
H					↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Abb. 5: Herstellen der Verdünnungsreihen

Zu diesen abgestuften Proben- und Kontrollserenmengen wurde eine konstante Virusmenge in Form von jeweils 50 µl der auf 100 TCID₅₀ (Tissue Culture Infective

Dose 50, Gewebekultur infektiöse Dosis 50) eingestellten Virusgebrauchsverdünnung (VGV) des entsprechenden Virus mit Hilfe einer automatischen Dispensierpipette pipettiert. Ausgespart wurden dabei die nicht weiter verdünnten 2 Kontroll-Wells der Proben und Kontrollseren, die Wells zur späteren Zellkontrolle sowie die Vertiefungen zur Virusrücktitration (siehe Abbildung 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abb. 6: Zugabe der Virusgebrauchsverdünnung

Zur Kontrolle der Virusgebrauchsverdünnung erfolgte in jedem Test die Rücktitration des eingesetzten Virus. Hierzu wurden 4 Vertiefungen mit jeweils 50 µl der VGV gefüllt und diese ebenfalls in log 3-Schritten nach 8-fachem Mischen titriert. Nach jeder Überführung einer Verdünnungsstufe erfolgte ein Wechsel der Pipettenspitze. Die vier letzten verbleibenden Wells der Platte wurden zur Nutzung als spätere Zellkontrolle ausgespart (siehe Abbildung 7).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	↓	↓	↓	↓								
B	↓	↓	↓	↓								
C	↓	↓	↓	↓								
D	↓	↓	↓	↓								
E	↓	↓	↓	↓								
F	↓	↓	↓	↓								
G	↓	↓	↓	↓								
H												

Abb. 7: Virustitration

Im Anschluss wurden die Platten nach leichtem Rütteln für 24 h bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% in einen befeuchteten Gewebekulturinkubator gegeben (Firma Heraeus, 63450 Hanau, Deutschland).

Vor der Zugabe der Indikatorzellen erfolgte deren Vorbereitung. Für die Untersuchung auf Antikörper gegen EHV1 wurde die Zelllinie Vero (siehe 3.1.3.1), für die entsprechende Untersuchung gegen EHV4 die Zelllinie ED (siehe 3.1.3.2) eingesetzt.

Nach mikroskopischer Beurteilung der Indikatorzellen wurde zunächst das Gewebekulturmedium der in Petrischalen angezüchteten Zellen mittels einer Glaspipette abgenommen. 10 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (siehe 3.1.6.2) wurde auf den Zellrasen gegeben und nach kurzem Schwenken wieder abgenommen. Die gleiche Menge der Lösung wurde erneut zugegeben und bis zum Beginn der mikroskopisch sichtbaren Abrundung der Zellen belassen. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde wiederum mittels einer Glaspipette entfernt und die Schalen für etwa 5 Minuten in den Gewebekulturinkubator bei 37°C gegeben. Zeigten sich bei der anschließenden mikroskopischen Kontrolle einzeln vorliegende Zellen, wurden die Zellen in 10 ml Gewebekulturmedium resuspendiert. Zur Ermittlung der Zahl lebender Zellen je ml Suspension wurden 200 µl der Zellsuspension in 800 µl Trypanblaulösung (0,2%ig) gegeben und nach Mischen mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und wie folgt berechnet:

Mittelwert aus 4 großen Quadraten x Verdünnungsfaktor 5 = Zellzahl x 10⁴/ml

Für die Untersuchung auf nAK gegen EHV1 wurde eine Vero-Zellzahl von 1,5 x 10⁴/50 µl eingestellt und entsprechend mit Hilfe der Zellsuspension und des Gewebekulturmediums angesetzt. Für die entsprechende Untersuchung gegen EHV4 wurden 1,0 x 10⁴/50 µl ED-Zellen benötigt und entsprechend suspendiert.

Je 50 µl dieser Zellsuspension wurden mittels automatischer Dispensierpipette zunächst als Zellkontrolle in die 4 bisher ungenutzten Vertiefungen der Well-Platten gegeben. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Suspension in die titrierten Proben

bzw. Kontrollseren von oben nach unten und in die Virustitration von unten nach oben, ohne den Rand der Vertiefungen mit der Pipettenspitze zu berühren. Die Platten wurden zur Durchmischung der Virussuspension mit den Verdünnungen der Proben vorsichtig an die flache Hand geklopft und es erfolgte eine weitere Inkubation im Gewebekulturinkubator bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% für 86 h.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch bei einem Okular von 6,3-facher und einem Objektiv von 10-facher Vergrößerung. Es wurde die gesamte Oberfläche aller Vertiefungen betrachtet und der Zellrasen auf gleichmäßiges Wachstum überprüft. Zytotoxische Einflüsse der Kontrollseren bzw. Testseren und BALFs wurden im Protokoll vermerkt. Vertiefungen, in denen eine mikrobielle Kontamination beobachtet wurde, wurden als nicht auswertbar gekennzeichnet. Das Vorliegen bzw. Fehlen des zytopathischen Effektes (cpE) wurde protokolliert (+ cpE vorhanden, - kein cpE).

Hierbei wurden zunächst die Titration der Virusgebrauchsverdünnung und die Zellkontrolle, dann die Kontrollseren begutachtet. Im Anschluß erfolgte die Untersuchung der zu testenden Proben im Hinblick auf zytopathische Effekte, mit deutlichen Lücken im geschlossenen Zellrasen, bzw. deren Ausbleiben (siehe Abbildung 8).

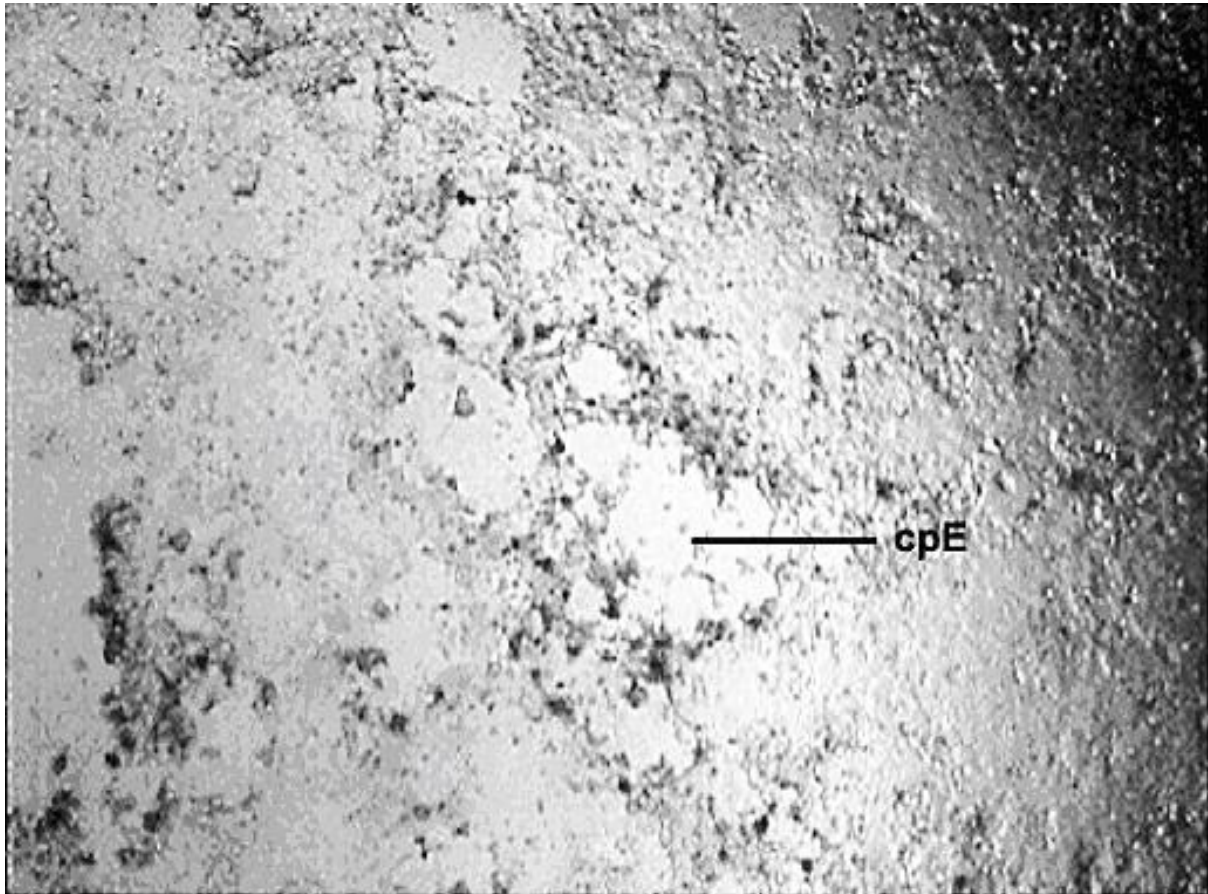


Abb. 8: Mikroskopische Darstellung eines cpE (Okular 6,5 x, Objektiv 10 x)

Der Test war auswertbar, wenn die Zellkontrollen einen gleichmäßig geschlossenen Zellrasen aufwiesen, der Titer der VGV zwischen 30 und 300/50 μ l Gewebekulturinfektionsdosis (Tissue culture infectious dose TCID₅₀; Virusmenge, die in 50% der Fälle eine Infektion auslöst) lag, sich der Titer des negativen Kontrollserums unterhalb der Nachweisgrenze befand und der Titer des positiven Kontrollserums nicht von den vorher ermittelten Werten abwich.

Als Neutralisationstiter wurde derjenige Verdünnungsfaktor der Serum- bzw. BALF-Probe angegeben, welche die Virusvorlage im Hinblick auf ihre Infektiosität gänzlich unwirksam machte, so dass es zu keiner Ausbildung eines cpE kam (Falke 1999a). Die Titerberechnung erfolgte nach dem Verfahren von Spearman und Kaerber:

$$M = x_i + d/2 - d \sum R_i$$

- M = Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen
 x_i = Logarithmus der kleinsten Serumverdünnung, die die eingesetzte Virusmenge vollständig neutralisiert (Neutralisation)
d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors
 R_i = Reaktionsrate: positive Reaktion in einer Verdünnungsstufe

Die Angabe der Titerhöhe erfolgt in der sich aus dieser Rechnung ergebenden Einheit $\log D_{50}$. Ein Titer von $> 0,2 \log D_{50}$ (1:1,7) wurde als positiv beurteilt.

3.1.2.10 Indirekter Immunfluoreszenztest (IF)

Die Immunfluoreszenz dient dem Nachweis von Virusproteinen in infizierten Zellen. Die infizierten Zellen werden auf Objektträger getropft, fixiert und mit alkoholischen Lösungsmitteln oder Detergentien behandelt, um die Zellmembranen für Antikörper durchlässig zu machen. Danach inkubiert man sie mit Antikörpern, die spezifisch mit den gesuchten Virusantigenen reagieren. In einem zweiten Schritt werden sekundäre Immunglobuline zugegeben, die gegen den Fc-Teil der verwendeten Immunglobuline gerichtet und mit fluoreszierenden, chemischen Substanzen (beispielsweise Fluorescein-Isothiocyanat) konjugiert sind, dem sogenannten Anti-Speziesglobulin-Konjugat. Die Abbildung 9 veranschaulicht das Testprinzip. Nicht gebundenes Konjugat wird anschließend abgespült. Diese Markierung ermöglicht es, die Virusproteine in unterschiedlichen Kompartimenten wie dem Zellkern, dem Cytoplasma oder den Membranen sichtbar zu machen (Modrow et Falke 2002b).

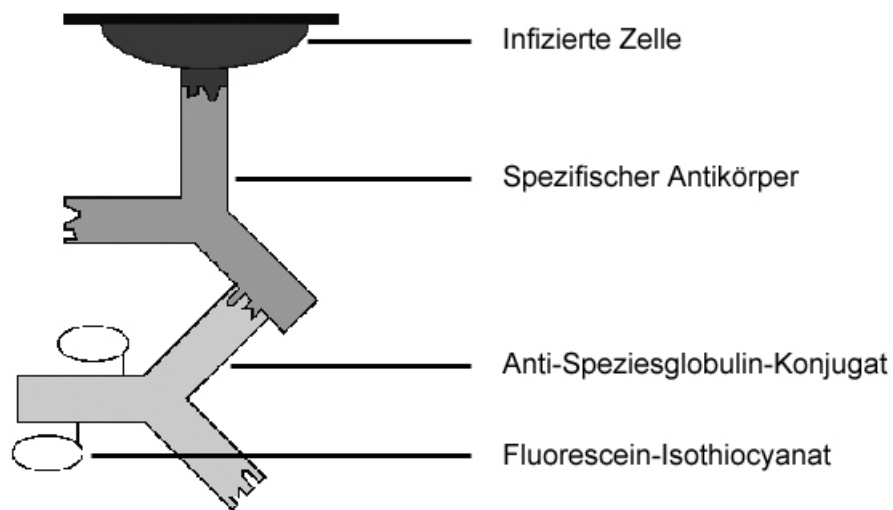


Abb. 9: Testprinzip der indirekten Immunfluoreszenz

Für die Testdurchführung mussten zunächst spezielle Objektträger aus Glas mit 8 vorgegebenen Kammern (Chamber Slide™, Lab-Tek®, NUNC GmbH & Co. KG, 65203 Wiesbaden-Biebrich, Deutschland) und Deckel vorbereitet werden. In die 8 Kammern wurden je 100 µl Gewebekulturmedium (siehe 3.1.6.1) mittels Eppendorf-Pipette vorgelegt. Zur Beschickung der Kammern mit Zellen erfolgte nach dem unter 3.1.2.9 erläuterten Prinzip das Erstellen einer Zellsuspension. Hierbei wurde für den Nachweis von Antikörpern gegen EHV1 eine Zellsuspension der Vero-Zellen mit einer Zelldichte von $7,0 \times 10^4/100 \mu\text{l}$, für den entsprechenden EHV4-Test eine ED-Zellen-Suspension mit einer Dichte von $8,0 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ eingesetzt. Je Kammer wurden 100 µl der jeweiligen Zellsuspension zugegeben. Zu diesen Zellen wurden je Kammer 50 µl der jeweiligen Virusverdünnung gegeben (EHV1: 50 TCID₅₀/50 µl; EHV4: 100 TCID₅₀/50 µl). Eine Inkubation im befeuchteten Zellkulturinkubator bei Gegenwart von 5% CO₂ schloss sich bei EHV1 für 48 h, bei EHV4 für 30 h an.

Nach Ablauf der Inkubation wurde eine mikroskopische Kontrolle der Chamber Slides durchgeführt und bei vorliegendem cpE erfolgte die Fixation. Hierzu wurden die Aufsätze der Chamber Slides vorsichtig entfernt. Jeder Objektträger wurde einmal in ein mit PBS (Phosphate buffered Saline) und in ein mit demineralisiertem Wasser

gefülltes Becherglas getaucht, und anschließend in eine Glasküvette mit auf -20°C gekühltem Aceton (Firma Carl Roth GmbH & Co., 76185 Karlsruhe, Deutschland) gestellt. Die Küvette mit den Objektträgern wurde für mindestens 30 Minuten bei -20°C gekühlt. Anschließend wurden die Chamber Slides entnommen, vorsichtig an der Unterseite und den Bereichen ohne Kammern mit einem Papiertuch trockengetupft, für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen und für mindestens 10 Minuten bzw. bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Sowohl von den Proben als auch von der mitgeführten Positiv- und Negativkontrolle (siehe 3.1.5) wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Hierzu erfolgte die Verdünnung der Proben in Zweierpotenzen in einer 20%igen Lösung aus fetalem Kälberserum (FCS) in PBS.

Die vorbereiteten Chamber Slides wurden in PBS getaucht und horizontal, ohne sich gegenseitig zu berühren, in feuchte Kammern (bestehend aus Kunststoff-Maxischalen mit befeuchteter Zellstoffunterlage) gegeben. Je Kammer wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ der zu testenden Verdünnungsstufe einpipettiert. Eine anschließende Inkubation innerhalb der feuchten Kammern erfolgte für 30 Minuten im Zellkulturinkubator bei 37°C . Im Anschluß wurde der Überstand mittels Unterdruckkompressor abgesaugt (Firma KNF Neuberger, 79112 Freiburg, Deutschland). Die Chamber Slides wurden erneut in PBS getaucht, für 5 Minuten in eine mit PBS gefüllte Küvette abgestellt, anschließend abgetropft und zurück in die feuchten Kammern gegeben.

Im Anschluß erfolgte die Zugabe von $50\text{ }\mu\text{l}$ je Kammer der Anti-Spezies-Antikörper [Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-horse IgG (H+L), Firma Jackson Immuno Research Laboratories, West Baltimore, USA]. Nach erneuter Inkubation in feuchten Kammern im Zellkulturinkubator wurden die Chamber Slides in ein mit demineralisiertem Wasser gefülltes Becherglas getaucht, in eine ebenfalls damit gefüllte Küvette für 5 Minuten abgestellt, anschließend vorsichtig trockengetupft und im Dunkeln zur Trocknung für etwa 45 bis 90 Minuten stehen gelassen.

Zur Auswertung wurde das auf den Objektträgern befindliche Silikongitter mittels Pinzette vollständig entfernt. Die Chamber Slides wurden mit 3% Glycerin in PBS überschichtet und mit Deckgläsern versehen. Die Objektträger wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Firma Olympus, 20097 Hamburg, Deutschland) ausgewertet, wobei der angegebene Titer der Verdünnungsstufe entsprach, bei der noch eine deutliche, antigenspezifische Fluoreszenz feststellbar war.

3.1.2.11 Harnstoffbestimmung und Ermittlung der BALF-Verdünnung

Die Harnstoffbestimmung aus den Serumproben wurde mit Hilfe des Autoanalyzers Cobas Mira-S (Firma Hoffman LaRoche, Grenzach-Wyhlen) durchgeführt.

Die Bestimmung des Harnstoffgehaltes der gewonnenen BALF-Proben erfolgte in einem Fremdlabor (FILT GmbH, 13125 Berlin, Deutschland). Dort erfolgte die Analyse mittels Berthelot-Verfahren. Dazu wurde ein modifiziertes Standardsystem Merckotest® (Firma E. Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet und die Analysen als Doppelbestimmung durchgeführt, deren arithmetische Mittelwerte verwendet wurden.

Unter anderem kommt es im Rahmen der BALF-Gewinnung durch die eingesetzte Spülflüssigkeit zu einer starken Verdünnung der gewonnenen Lungensekrete. Um diese zu korrigieren und die Ausgangskonzentration in der Lungenflüssigkeit zu berechnen, erfolgte die Rückrechnung mit Hilfe der ermittelten Harnstoffgehalte. Hierzu erfolgte die Multiplikation des im jeweiligen Test ermittelten Antikörpertiters der entsprechenden BALF mit dem Quotienten der Harnstoffwerte des Serums und der BALF. Dieses Verfahren beruht auf der Theorie der semipermeablen Eigenschaft der respiratorischen Membran, die nach Rennard et al. (1986) den identischen Harnstoffgehalt in Serum und Lunge sicherstellt.

3.1.3 Zellkulturen

Sowohl im Neutralisationstest als auch in der indirekten Immunfluoreszenz wurde mit zwei verschiedenen permanenten Zelllinien gearbeitet.

3.1.3.1 Vero-Zellen

Bei den Vero-Zellen handelt es sich um eine etablierte Zelllinie aus Affen-Nierengewebe (African green monkey kidney) der Spezies *Cercopithecus aethops* (afrikanische grüne Meerkatze). Diese wurden von Herrn Dr. W. Herbst, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, bereitgestellt.

3.1.3.2 ED-Zellen

Die eingesetzten ED (equine dermis)-Zellen wurden von Herrn Dr. H. Gerbermann, Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleissheim, zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Virusstämme

Es wurden sowohl im Neutralisationstest als auch im indirekten Immunfluoreszenztest zwei verschiedene Virusstämme eingesetzt.

3.1.4.1 Equines Herpesvirus 1 (EHV1)

Bei dem eingesetzten EHV1 handelt es sich um das Impfvirus RacH, welches von Herrn Dr. W. Eichhorn, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt wurde.

3.1.4.2 Equines Herpesvirus 4 (EHV4)

Bei dem genutzten EHV4 handelt es sich um das Virus mit der Bezeichnung EHV4: 2252 (Behring), welches ebenfalls von Herrn Dr. W. Eichhorn, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Ludwig-Maximilians-Universität München, zur Verfügung gestellt wurde.

3.1.5 Kontrollseren

Zur Kontrolle wurden sowohl im Neutralisationstest als auch in der indirekten Immunfluoreszenz positive und negative Kontrollseren mitgetestet.

3.1.5.1 Positives Kontrollserum

Bei dem positiven Kontrollserum handelte es sich um ein Instituts-internes Standardserum gegen EHV1 und EHV4. Seren von mehreren Pferden zusammen, die im Serumneutralisationstest einen Titer von jeweils $> 1,2 \log D_{50}$ aufwiesen, wurden hierfür in einem Pool zusammengefasst.

3.1.5.2 Negatives Kontrollserum

Bei dem negativen Kontrollserum handelte es sich um ein Instituts-internes negatives Kontrollserum. Es setzte sich aus einem Pool von mehreren Pferdeseren zusammen, die im Serumneutralisationstest einen Titer von jeweils $< 0,2 \log D_{50}$ aufwiesen.

3.1.6 Medium und Chemikalien

Einige der verwendeten Substanzen wurden im vorangehenden Text noch nicht ausreichend erläutert. Ihre nähere Definition schließt sich im Folgenden an.

3.1.6.1 Gewebekulturmedium

Zur Erstellung des Gewebekulturmediums wurde zunächst eine Aminosäurestammlösung angesetzt. Hierzu erfolgte die Auflösung der folgenden Substanzen und Mengen bei 60°C in 800 ml Aqua bidest.:

L-Alanin	0,712 g
L-Asparaginsäure	1,200 g
Glycin	2,800 g

L-Glutaminsäure	3,000 g
L-Prolin	1,000 g

Desweiteren erfolgte der Ansatz eines Vitaminzusatzes. Für diesen wurde 0,01 g des Vitamins Biotin in einem Liter Aqua bidest. gelöst. Das Pulvermedium Dulbecco's MEM (Firma Gibco, Karlsruhe, Deutschland) vermischte man mit 100 ml der Vitaminlösung und 200 ml der Aminosäurestammlösung. Daraufhin wurden 0,25 g Hypoxanthin zusammen mit 4 ml 1 N HCl heiß in ca. 130 ml Aqua bidest. in Lösung gebracht und anschließend mit Aqua bidest. auf 260 ml aufgefüllt. Diese Hypoxanthin-Lösung und 37 g NaHCO₃ wurden zu der vorbereiteten Pulvermediummischung gegeben und mit Aqua bidest. auf 10 Liter aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte in lichtschützenden Glasflaschen im Kühlschrank.

3.1.6.2 Trypsin/EDTA-Lösung

Zur Herstellung der Trypsin/EDTA-Lösung wurden zunächst folgende Substanzen gemischt:

NaCl	8,0 g
KCl	0,20 g
Na-Phosphat	1,44 g
Trypsin 1 :250 in Aqua bidest	2,50 g
Versen (EDTA)	1,23 g
Phenolrot	0,016 g

Im Anschluss erfolgte die Einstellung mit 1 N HCl (ca. 0,85 ml) auf pH 7,4. Die abschließende Endfiltration wurde mit einem Durchmesser von 0,1 µm (Millipore) durchgeführt.

3.2 Ergebnisse

In die virologischen Untersuchungen gingen sowohl Serum- als auch Bronchiallavageflüssigkeits- (BALF) Proben von insgesamt 97 Pferden ein. Diese Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt: die Gruppe der COB-Patienten (n=53), die der Rennpferde (n=24) und die Gruppe der Fohlen (n=20). Die Ergebnisse sowohl der klinischen als auch der virologischen Untersuchungen werden im Folgenden dargestellt.

3.2.1 Untersuchungsergebnisse bei den COB-Patienten einschließlich Bestimmung des Erkrankungsgrades

Bei den 53 Patienten der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik (Innere Krankheiten der Pferde) der Justus-Liebig-Universität in Gießen wurde vor Entnahme der Proben die Diagnose der chronisch obstruktiven Bronchitis (COB) gestellt. Die Ergebnisse einer Eingangsuntersuchung und die daraus folgende Einteilung des Schweregrades der COB mit Hilfe des – wie in Kapitel 3.1.2.5 (Patientenklassifizierung) angegeben – leicht modifizierten Score-Systems nach Ohnesorge et al. (1998) werden im Folgenden aufgeführt. Bei 26 der Patienten handelte es sich um geringgradig (2-5 Punkte) und bei 27 um mittel- bis hochgradig (6-11 Punkte) an COB erkrankte Pferde. Die Einteilung in Erkrankungsgruppen erfolgte durch Addition der Punkte, die für Befunde der klinischen Untersuchung, der Blutgasanalyse und der Tracheobronchoskopie vergeben wurden, wie im Methodenkapitel ausgeführt. In Tabelle 7 sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen zur Gesamtbewertung aufgelistet.

Tab. 7: Einteilung in Erkrankungsgrade nach dem Gesamtscoresystem (arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen)

Erkrankungsgrad		Gesamtscore
geringgradig	(n=26)	4,3 ± 0,9
mittel- bis hochgradig	(n=27)	7,3 ± 1,1

3.2.1.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchung

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung bei den COB-Patienten gingen wie in Tab. 6 Seite 49 beschrieben in das Score-System nach Ohnesorge et al. (1998) ein. Die Verteilung der klinischen Symptome je nach Erkrankungsgraden wird in Tabelle 8 dargestellt. Mit zunehmendem Grad der Erkrankung findet sich erwartungsgemäß eine Häufung der Befunde.

Tab. 8: Ausprägung und Verteilung der klinischen Symptome je nach Erkrankungsgrad (Anzahl der Patienten)

Ausprägung des Erkrankungsgrades	Husten (Punktzahl)		Ruhedyspnoe (Punktzahl)			Auskultation (Punktzahl)		Perkussion (Punktzahl)		
	0	1	0	1	3	0	2	0	1	2
geringgradig (n=26)	3	23	4	22	0	22	4	26	0	0
mittel- bis hochgradig (n=27)	0	27	0	10	17	6	21	23	2	2

3.2.1.2 Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse

Der berechnete Mittelwert des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (P_{aO_2}) aller COB-Patienten liegt mit $88,9 \pm 9,7$ mmHg deutlich unterhalb des Referenzbereiches von 100 ± 5 mmHg (Sasse 1971, Deegen 1983). Die geringgradig erkrankten Tiere unterscheiden sich dabei jedoch mit einem Mittelwert von $94,3 \pm 6,2$ mmHg von der Gruppe der mittel- bis hochgradig erkrankten Patienten, die einen Mittelwert von $86,2 \pm 6,0$ mmHg aufweisen. Bei allen COB-Patienten befindet sich der Mittelwert des arteriellen Kohlendioxidpartialdruckes (P_{aCO_2}) im Referenzbereich von 40 ± 5 mmHg (Sasse 1971).

Die Alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz ($A-aDO_2$) liegt bei den untersuchten COB-Patienten mit einem Mittelwert von $14,3 \pm 10,1$ mmHg oberhalb des Referenzbereiches von $5,4 \pm 5,1$ mmHg (Klein und Deegen 1986). Hierbei zeigen die

geringgradig erkrankten Tiere einen näher am Referenzbereich liegenden Mittelwert von $8,0 \pm 5,8$ mmHg. Die mittel- bis hochgradig erkrankten Pferde besitzen einen erhöhten Mittelwert von $20,3 \pm 9,8$ mmHg. Alle genannten Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Arterielle Blutgaswerte nach Erkrankungsgrad aufgeteilt (arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen)

Erkrankungsgrad	P _a O ₂ (mmHg)	P _a CO ₂ (mmHg)	A-aDO ₂ (mmHg)
gesamt (n=53)	$88,9 \pm 9,7$	$45,3 \pm 2,9$	$14,3 \pm 10,1$
geringgradig (n=26)	$94,3 \pm 6,2$	$45,8 \pm 2,9$	$8,0 \pm 5,8$
mittel- bis hochgradig (n=27)	$86,2 \pm 6,0$	$44,9 \pm 2,9$	$20,3 \pm 9,8$

3.2.1.3 Ergebnisse der Tracheobronchoskopie

Die Bewertung der Endoskopiebefunde erfolgte nach dem Endoskopie-Score nach Dickmann (1987), wie in Tab. 4 auf Seite 47 beschrieben. Die arithmetischen Mittelwerte der erhaltenen Gesamtpunktzahlen werden in der folgenden Tabelle 10 in Abhängigkeit vom Erkrankungsgrad aufgeführt.

Tab. 10: Endoskopiebefunde in Abhängigkeit vom Erkrankungsgrad (arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen)

Erkrankungsgrad	Endoskopiescore (Gesamtpunktzahlen)
gesamt (n=53)	$5,0 \pm 2,0$
geringgradig (n=26)	$4,3 \pm 2,1$
mittel- bis hochgradig (n=27)	$5,7 \pm 1,8$

3.2.1.4 Erreichte Rückgewinnungsraten

Die Volumina der bei der Durchführung der BAL zurück gewonnenen Spülflüssigkeit wurden bei den Patienten und Fohlen jeweils bestimmt, wie in Kapitel 3.1.2.7 näher beschrieben. Der Mittelwert lag insgesamt bei 47,67% mit einer Standardabweichung von 13,27. Hierbei zeigten die COB-Patienten jedoch mit einem Durchschnitt von $38,77 \pm 16,65\%$ deutlich niedrigere Mengen als die Fohlen mit einem Mittelwert von $56,56 \pm 9,98\%$. Über die Rückgewinnungsraten der Rennpferde lagen keine Daten vor.

3.2.2 Ergebnisse der virologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der virologischen Untersuchungen wurden zur besseren Übersicht nach Virusspezies sowie Testverfahren aufgeteilt und werden in den nächsten Abschnitten dargestellt. Die Angabe der Antikörpertiterhöhe erfolgt in der üblichen Einheit ($\log D_{50}$), wie in Kapitel 3.1.2.9 erläutert.

Für Proben, in denen keine Antikörper nachgewiesen werden konnten, wurde der Wert der halben Nachweisgrenze eingesetzt und wie die restlichen Daten logarithmiert. Hierbei ergab sich ein Wert von $-0,1 \log D_{50}$.

3.2.2.1 Statistische Auswertung

Sowohl die Datenauswertung als auch die Erstellung der Grafiken im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7,0 (Dixon 1993) durchgeführt. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm PlotIT für Windows Version 3.20h (Eisensmith 1994) erzeugt.

Zur beschreibenden statistischen Auswertung der logarithmisch transformierten Daten wurden mit dem Programm BMDP1D arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Minimum und Maximum berechnet. Bei den semiquantitativen Variablen erfolgte die Datenbeschreibung mit Hilfe des Programms BMDP2D durch die Angabe der Mediane ($\bar{x}$), der Quartile (Q_1) und (Q_3) sowie der kleinsten ($x_{\min}$) und größten ($x_{\max}$) Beobachtungen. Die Darstellung erfolgte im Box-and-Whisker-Plot, welches in Abbildung 10 näher erläutert wird.

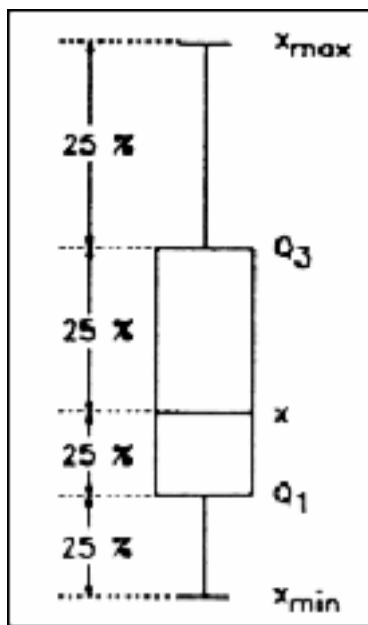


Abb. 10: Darstellung eines Box-and-Whisker-Plots

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanzen wurde bei den annähernd normalverteilten Merkmalen eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit dem Programm BMDP2V durchgeführt. Bei signifikantem Resultat wurden die Merkmale mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests mit anschließendem Vergleich nach Nemenyi unter Verwendung des Programms BMDP3S verglichen.

Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Regressionsgraden ($y = m \cdot x + b$) bzw. mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s).

Bei der Benennung von Signifikanzen wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

$p \leq 0,001$	hoch signifikant (***)
$p \leq 0,01$	signifikant (**)
$p \leq 0,05$	schwach signifikant (*)
$p > 0,05$	nicht signifikant (n.s.)

3.2.2.2 Ergebnisse der EHV1-Antikörperbestimmungen mittels Neutralisationstest (EHV1-NT) aus BALF im Gruppenvergleich

Die ermittelten Titer in der BALF wurden im Hinblick auf die Unterschiede zwischen den Gruppen verglichen. Bei 23 Tieren, darunter die gesamte Gruppe der Fohlen (n=20) sowie drei COB-Patienten, konnten keine Antikörper nachgewiesen werden.

Die ermittelten Titer gegen EHV1 aus der BALF mit Hilfe des Neutralisationstests ergaben ausschließlich hoch signifikante ($p < 0,0001$) Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

In der Gruppe der Fohlen konnten bei keinem Tier Antikörper nachgewiesen werden. Bei den Rennpferden gelang der Nachweis in allen Fällen, so dass ein Mittelwert von $2,2 \log D_{50}$ ermittelt werden konnte. Der niedrigste Titer in dieser Gruppe lag bei $1,6 \log D_{50}$, der höchste bei $2,6 \log D_{50}$. Die Hälfte der Tiere zeigte dabei Titer zwischen $2,1 \log D_{50}$ und $2,5 \log D_{50}$. Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten fanden sich ebenfalls hohe Titer, jedoch mit deutlich größerer Streuung. Der Mittelwert lag hier bei $1,1 \log D_{50}$ mit einem Minimum von $-0,1 \log D_{50}$ (also kein Antikörper-Nachweis) und einem Maximum von $2,5 \log D_{50}$. 50% der Tiere wiesen Titer in der unteren Hälfte der ermittelten Titerhöhen auf ($Q1 = 0,9$; $Q3 = 1,5$).

Zur besseren Visualisation wurden die Daten mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots in Abbildung 11 dargestellt.

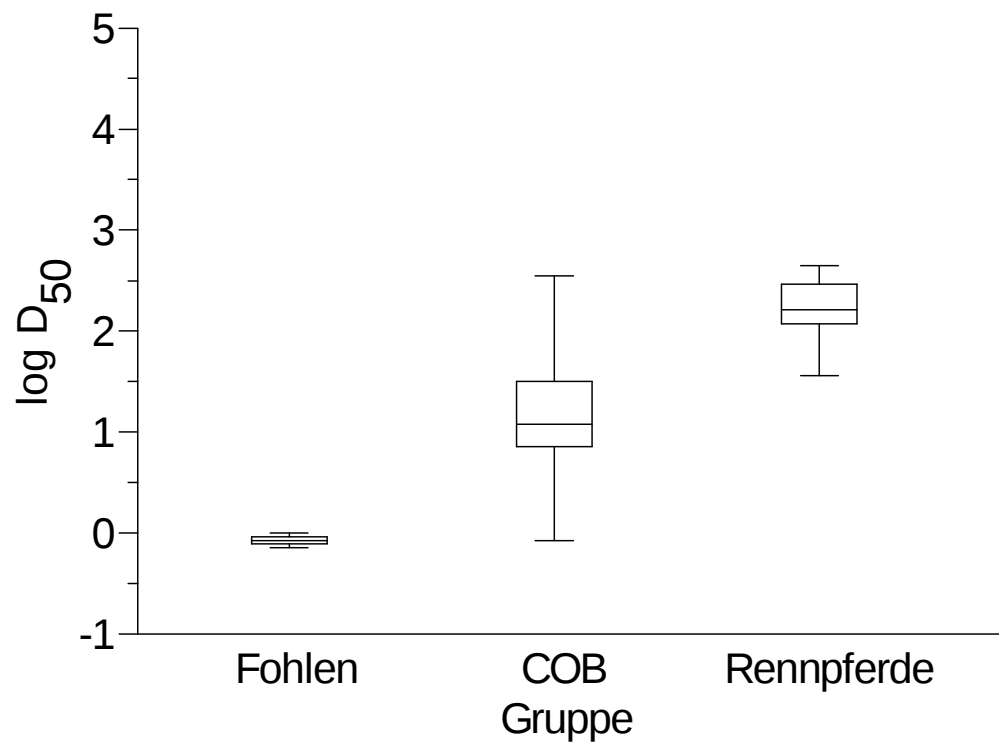


Abb. 11: Gruppenvergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV1 aus BALF

Signifikanzgrade:

Fohlen vs. COB: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

Fohlen vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

COB vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

3.2.2.3 Ergebnisse des EHV1-NT aus BALF innerhalb der COB-Patienten

Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten wurden die Ergebnisse auf statistische Differenzen hinsichtlich Grad der COB, Rasse, A-aDO₂ und Impfstatus geprüft. Es ergaben sich in keinem Fall signifikante Unterschiede. Die Daten können im Einzelnen der Tabelle 11 entnommen werden. Die Ergebnisse bezüglich des Impfstatus werden gesondert in Kapitel 3.2.2.6 dargestellt.

Tab. 11: Ergebnisse des EHV1-NT aus BALF innerhalb der COB-Patienten

Parameter		MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
COB- Grad	ggr.	1,1	-0,1	2,5	0,9	1,4	26
	mgr. – hgr.	1,2	-0,1	2,4	0,7	1,6	27
Rasse	Warmblut	1,1	-0,1	2,4	0,8	1,5	37
	Vollblut	1,0	0,9	1,2	0,9	1,2	4
	Pony	1,1	0,9	2,5	0,9	1,8	12
A-aDO ₂ [mmHg]	< 7	1,1	0,7	2,5	0,9	1,4	13
	7-15	0,9	-0,1	1,9	0,8	1,2	19
	>15	1,3	0,5	2,4	0,8	1,7	21

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

3.2.2.4 Ergebnisse des EHV1-NT aus Serum im Gruppenvergleich

Die ermittelten Titer gegen EHV1 aus dem Serum ergaben jeweils hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) zwischen den einzelnen Gruppen.

Bei 12 Fohlen konnten, im Gegensatz zu den BALF-Proben, Antikörper nachgewiesen werden. Bei 8 Fohlen gelang dies jedoch auch im Serum nicht. Der Mittelwert lag bei $1,2 \log D_{50}$, das Minimum bei $-0,1 \log D_{50}$ und der Maximaltiter bei $2,1 \log D_{50}$. Die Hälfte der ermittelten Titer lagen im Bereich zwischen $-0,1 \log D_{50}$ (Q1) und $1,7 \log D_{50}$ (Q3). Bei den COB-Patienten gelang der Nachweis in allen Fällen. Es konnte ein Mittelwert von $2,4 \log D_{50}$ ermittelt werden. Der niedrigste Titer lag bei $1,4 \log D_{50}$, der höchste bei $3,3 \log D_{50}$. 50% der Ergebnisse verteilten sich zwischen $1,9 \log D_{50}$ (Q1) und $2,9 \log D_{50}$ (Q3). Innerhalb der Gruppe der Rennpferde fanden sich nochmals höhere Titer als bei den COB-Patienten. Der Mittelwert lag hier bei $3,3 \log D_{50}$ mit einem Minimum von $1,6 \log D_{50}$ und einem Maximum von $3,8 \log D_{50}$. Die Hälfte der Tiere wiesen einen Titer zwischen $2,9 \log D_{50}$ (Q1) und $3,6 \log D_{50}$ (Q3) auf.

Zur Verdeutlichung wurden die Daten mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots in Abbildung 12 dargestellt.

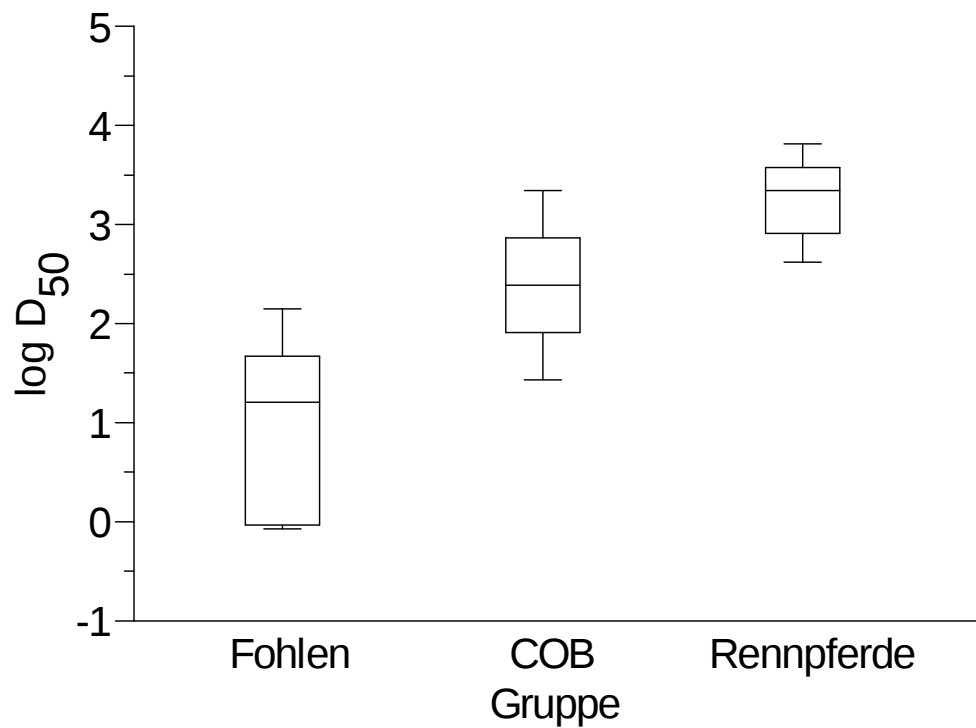


Abb. 12: Gruppenvergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV1 aus Serum

Signifikanzgrade:

Fohlen vs. COB: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

Fohlen vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

COB vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

3.2.2.5 Ergebnisse des EHV1-NT aus Serum innerhalb der COB-Patienten

Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten wurden auch die Ergebnisse aus den Serumuntersuchungen auf statistische Differenzen hinsichtlich Grad der COB, Rasse, A-aDO₂ und Impfstatus geprüft. Es ergaben sich in keinem Fall signifikante Unterschiede. Die Daten können im Einzelnen der Tabelle 12 entnommen werden. Die Ergebnisse bezüglich des Impfstatus werden gesondert in Kapitel 3.2.2.6 dargestellt.

Tab. 12: Ergebnisse des EHV1-NT aus Serum innerhalb der COB-Patienten

Parameter		MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
COB- Grad	ggr.	2,4	1,4	3,3	1,9	2,9	26
	mgr. – hgr.	2,4	1,4	3,3	1,9	2,9	27
Rasse	Warmblut	2,4	1,4	3,3	1,9	2,9	37
	Vollblut	2,6	1,9	3,0	2,0	3,0	4
	Pony	2,6	1,7	3,3	2,0	3,0	12
A-aDO ₂ [mmHg]	< 7	2,1	1,4	3,3	1,9	2,9	13
	7-15	2,4	1,4	3,3	1,9	2,9	19
	>15	2,4	1,4	3,3	2,0	3,0	21

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

3.2.2.6 Ergebnisse des EHV1-NT innerhalb der COB-Patienten je nach Impfstatus

Sowohl die Ergebnisse aus den Untersuchungen der BALF als auch aus dem Serum ergaben bei Pferden aus der Gruppe der COB-Patienten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Impfstatus der Patienten. Die Daten sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Ergebnisse des EHV1-NT innerhalb der COB-Patienten unter Berücksichtigung des Impfstatus (bezüglich EHV1 und EHV4)

Proben-material	Impfstatus	MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
BALF	geimpft	1,1	-0,1	2,4	0,9	1,6	25
	nicht geimpft	1,1	-0,1	2,5	0,9	1,5	28
Serum	geimpft	2,9	1,4	3,3	2,4	3,0	25
	nicht geimpft	2,4	1,4	3,3	1,9	2,6	28

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

Um einen übersichtlicheren Vergleich der Daten zu ermöglichen, erfolgt deren grafische Darstellung in den Abbildungen 13 (BALF) und 14 (Serum).

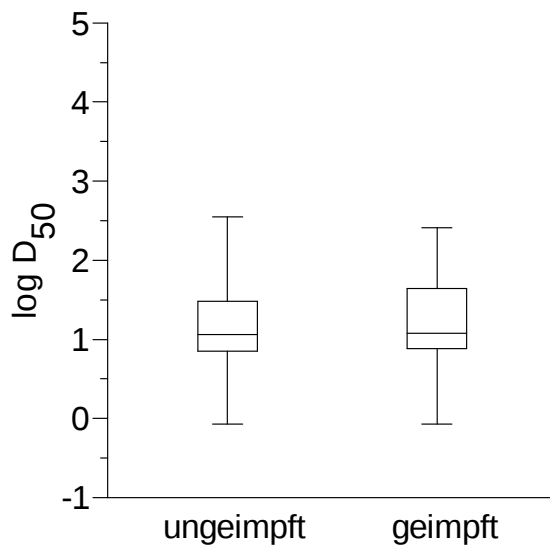


Abb. 13: Vergleich der mit Hilfe des EHV1-NT ermittelten Titer aus BALF bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (nicht signifikant)

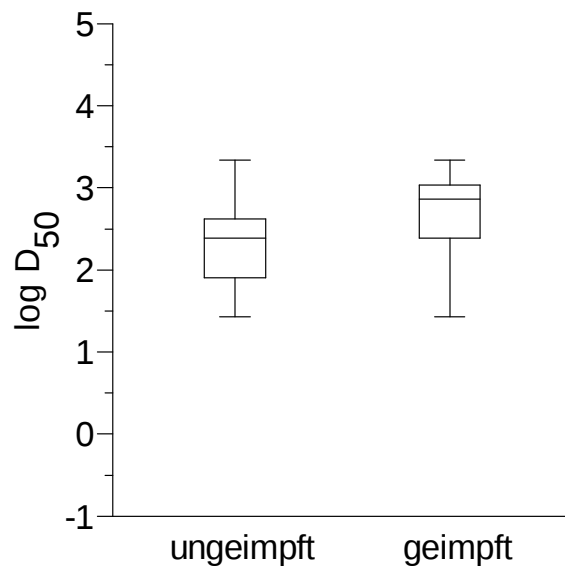


Abb. 14: Vergleich der mit Hilfe des EHV1-NT ermittelten Titer aus Serum bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (nicht signifikant)

3.2.2.7 Korrelation der mittels EHV1-NT bestimmten Antikörpertiter zwischen BALF und Serum

Bei der Betrachtung der Korrelation zwischen den mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Antikörper-Titern gegen EHV1 in BALF und Serum konnte ein hoch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) festgestellt werden. Bei der Grafik in Abbildung 15 erfolgt die Darstellung in Form einer Punktwolke. Die errechnete Regressionsgerade ($y = 1,316 + 0,871 \cdot x$) wurde eingezeichnet. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient lag bei 0,797.

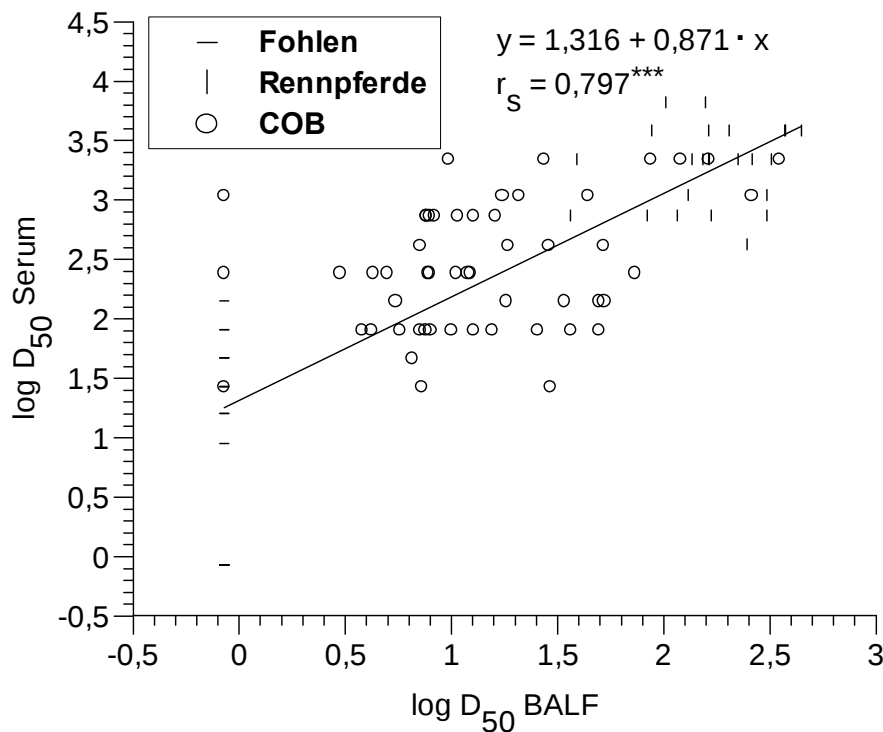


Abb. 15: Korrelation zwischen mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titern aus BALF und aus Serum gegen EHV1

3.2.2.8 Ergebnisse der EHV1-Antikörpertiterbestimmungen mittels indirektem Immunfluoreszenztest (EHV1-IF) aus BALF im Gruppenvergleich

Die ermittelten Titer in der BALF wurden ebenfalls im Hinblick auf die Unterschiede der Pferde-Gruppen verglichen. Ein Nachweis von Antikörpern gelang mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztestes in allen Lavageproben.

Die aus der BALF ermittelten Titer gegen EHV1 ergaben nicht signifikante bis hoch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die Unterschiede zwischen Fohlen und COB-Patienten waren als nicht signifikant zu bezeichnen ($p = 0,3$), die der Fohlen und Rennpferde erwiesen sich dagegen als signifikant ($p = 0,008$). Der Unterschied zwischen den COB-Patienten und Rennpferden wurde als hoch signifikant ($p < 0,0001$) berechnet.

So konnten bei den Fohlen im Mittel Antikörpertiter von $1,3 \log D_{50}$ bei Maximalwerten von $1,9 \log D_{50}$ und Minimalwerten von $0,9 \log D_{50}$ nachgewiesen werden. 50% der Werte befanden sich zwischen $1,2 \log D_{50}$ (Q1) und $1,4 \log D_{50}$ (Q3). Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten fanden sich etwas weiter gestreute Titerhöhen mit einem Mittelwert von $1,5 \log D_{50}$. Das Maximum befand sich bei $2,4 \log D_{50}$ und das Minimum bei $0,8 \log D_{50}$. 50% der Tiere wiesen einen Titer zwischen $1,3 \log D_{50}$ (Q1) und $1,9 \log D_{50}$ (Q3) auf. Die Ergebnisse der Rennpferde zeigten sich in geringerer Spannbreite mit höheren Titern bei einem Mittelwert von $2,5 \log D_{50}$. Der höchste ermittelte Wert war $3,0 \log D_{50}$, der niedrigste $2,0 \log D_{50}$, wobei die Hälfte der Tiere Antikörperspiegel zwischen $2,3 \log D_{50}$ (Q1) und $2,7 \log D_{50}$ (Q3) zeigten.

Die Daten wurden mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots in Abbildung 16 dargestellt.

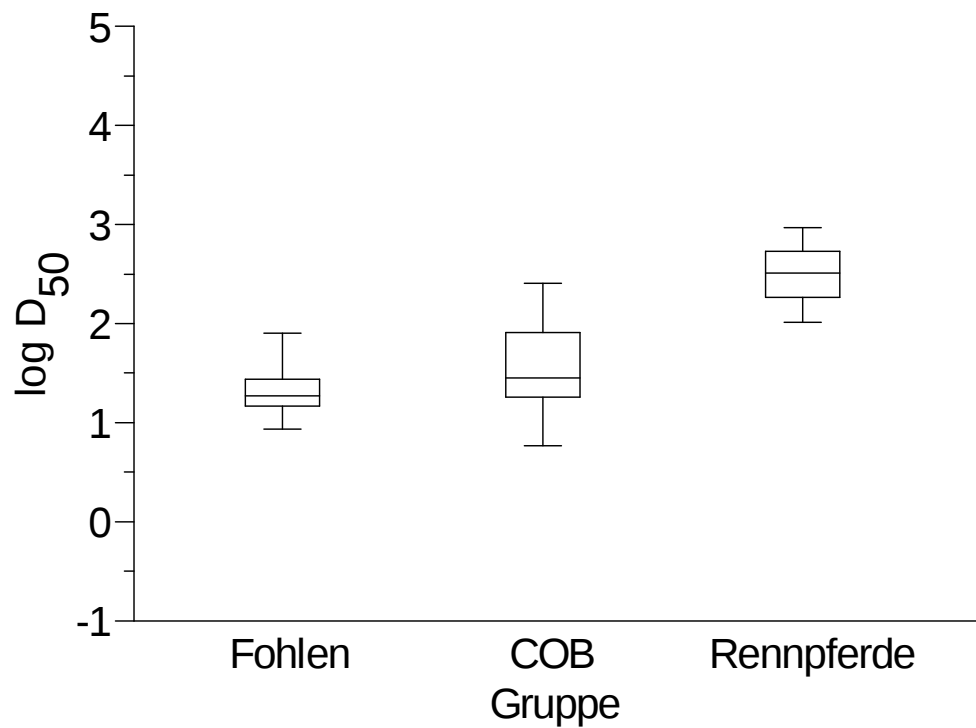


Abb. 16: Gruppenvergleich der mit Hilfe der Immunfluoreszenz ermittelten Titer gegen EHV1 aus BALF

Signifikanzgrade:

Fohlen vs. COB: nicht signifikant ($p = 0,3$)

Fohlen vs. Rennpferde: signifikant ($p = 0,008$)

COB vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

3.2.2.9 Ergebnisse des EHV1-IF aus BALF innerhalb der COB-Patienten

Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten wurden die Ergebnisse des indirekten Immunfluoreszenztests auf statistische Differenzen hinsichtlich Grad der COB, Rasse und A-aDO₂ geprüft. Es ergaben sich in keinem Fall signifikante Unterschiede. Die Daten können im Einzelnen der Tabelle 14 entnommen werden. Die Ergebnisse bezüglich des Impfstatus werden gesondert in Kapitel 3.2.2.12 dargestellt.

Tab. 14: Ergebnisse des EHV1-IF aus BALF innerhalb der COB-Patienten

Parameter		MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
COB- Grad	ggr.	1,4	1,1	2,1	1,3	1,7	26
	mgr. – hgr.	1,6	0,8	2,4	1,1	2,0	27
Rasse	Warmblut	1,5	0,8	2,3	1,2	1,9	37
	Vollblut	1,4	1,3	1,7	1,3	1,6	4
	Pony	1,5	1,1	2,4	1,3	2,1	12
A-aDO ₂ [mmHg]	< 7	1,4	1,1	2,1	1,3	1,7	13
	7-15	1,4	0,9	2,1	1,3	1,6	19
	>15	1,6	0,8	2,4	1,1	2,0	21

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

3.2.2.10 Ergebnisse des EHV1-IF aus Serum im Gruppenvergleich

Die ermittelten Titer im Serum wurden ebenfalls im Hinblick auf die Unterschiede zwischen den Gruppen verglichen. Der Antikörpernachweis mittels indirektem Immunfluoreszenztest gelang in allen Fällen.

Die ermittelten Titer gegen EHV1 aus dem Serum ergaben hoch signifikante ($p < 0,0001$) Unterschiede zwischen der Gruppe der Fohlen und COB-Patienten sowie der Fohlen und Rennpferde. Die Unterschiede zwischen der Gruppe der COB-Patienten und Rennpferde zeigten sich ebenfalls als hoch signifikant ($p = 0,0002$).

Der Mittelwert der bei den Fohlen ermittelten Daten lag bei $1,6 \log D_{50}$, das Minimum bei $0,7 \log D_{50}$ und der Maximaltiter bei $2,5 \log D_{50}$. Die Hälfte der ermittelten Titer lagen im Bereich zwischen $0,7 \log D_{50}$ (Q1) und $2,1 \log D_{50}$ (Q3). Bei den COB-Patienten lagen die Ergebnisse deutlich höher. Es konnte ein Mittelwert von $3,1 \log D_{50}$ ermittelt werden. Der niedrigste Titer lag bei $1,9 \log D_{50}$, der höchste bei $4,0 \log D_{50}$. 50% der Ergebnisse verteilten sich zwischen $2,5 \log D_{50}$ (Q1) und $3,4 \log D_{50}$ (Q3). Innerhalb der Gruppe der Rennpferde fanden sich nochmals höhere Titer als bei den COB-Patienten. Der Mittelwert lag hier bei $3,7 \log D_{50}$ mit einem Minimum von $3,1 \log D_{50}$ und einem Maximum von $4,3$. Die Hälfte der Tiere wies einen Titer zwischen $3,4 \log D_{50}$ (Q1) und $3,7 \log D_{50}$ (Q3) auf.

Zur Verdeutlichung wurden die Daten mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots in Abbildung 17 dargestellt.

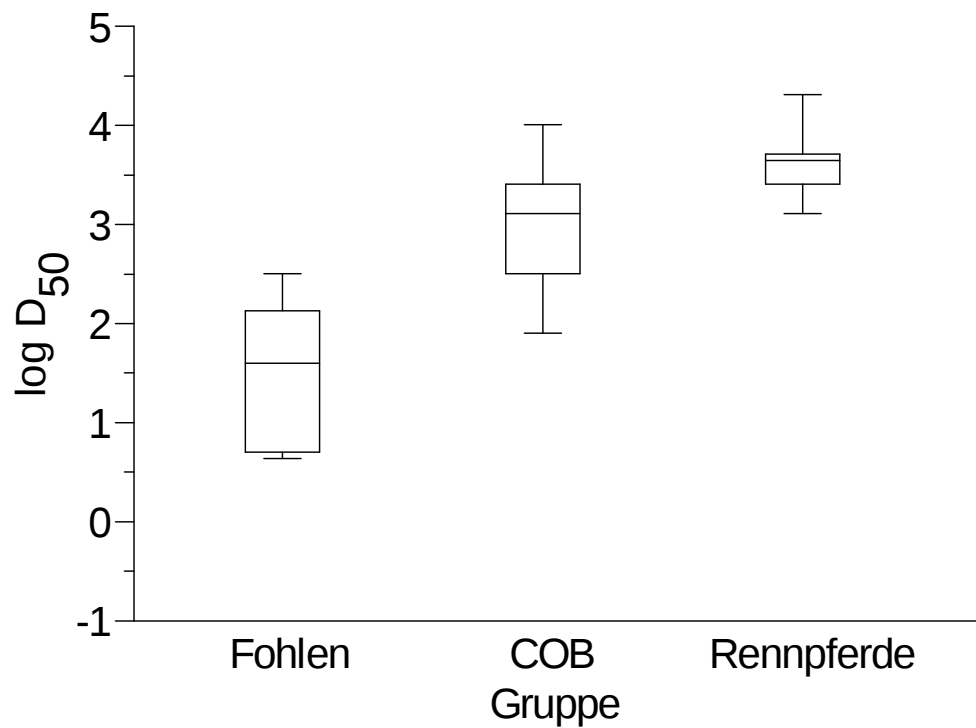


Abb. 17: Gruppenvergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV1 aus Serum

Signifikanzgrade:

Fohlen vs. COB: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

Fohlen vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

COB vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p = 0,0002$)

3.2.2.11 Ergebnisse des EHV1-IF aus Serum innerhalb der COB-Patienten

Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten wurden die Ergebnisse auf statistische Differenzen hinsichtlich Grad der COB, Rasse, A-aDO₂ und Impfstatus geprüft. Es ergaben sich in keinem Fall signifikante Unterschiede. Die Daten können im Einzelnen der Tabelle 15 entnommen werden. Die Ergebnisse bezüglich des Impfstatus werden gesondert in Kapitel 3.2.2.12 dargestellt.

Tab. 15: Ergebnisse des EHV1-IF aus Serum innerhalb der COB-Patienten

Parameter		MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
COB- Grad	ggr.	3,0	2,2	4,0	2,5	3,4	26
	mgr. – hgr.	3,1	1,9	3,7	2,5	3,4	27
Rasse	Warmblut	2,8	1,9	4,0	2,5	3,3	37
	Vollblut	3,3	2,5	3,4	2,7	3,4	4
	Pony	3,1	2,2	3,7	2,5	3,4	12
A-aDO ₂ [mmHg]	< 7	2,8	2,2	3,7	2,5	3,1	13
	7-15	3,1	1,9	4,0	2,5	3,4	19
	>15	3,1	2,2	3,7	2,5	3,4	21

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

3.2.2.12 Ergebnisse des EHV1-IF innerhalb der COB-Patienten je nach Impfstatus

Sowohl die Ergebnisse aus den Untersuchungen der BALF als auch aus dem Serum mittels indirektem Immunfluoreszenztest ergaben keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Impfstatus. Die Daten sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tab. 16: Ergebnisse des EHV1-IF innerhalb der COB-Patienten unter Berücksichtigung des Impfstatus (bezüglich EHV1 und EHV4)

Proben-material	Impfstatus	MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
BALF	geimpft	1,6	0,9	2,1	1,2	1,9	25
	nicht geimpft	1,4	0,8	2,4	1,3	1,9	28
Serum	geimpft	3,4	1,9	3,7	3,1	3,7	25
	nicht geimpft	2,8	2,2	4,0	2,5	3,1	28

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

Um einen übersichtlicheren Vergleich der Daten zu ermöglichen, erfolgt auch hier die grafische Darstellung der Ergebnisse aus den Untersuchungen der BALF in Abbildung 18 und aus den Untersuchungen der Seren in Abbildung 19.

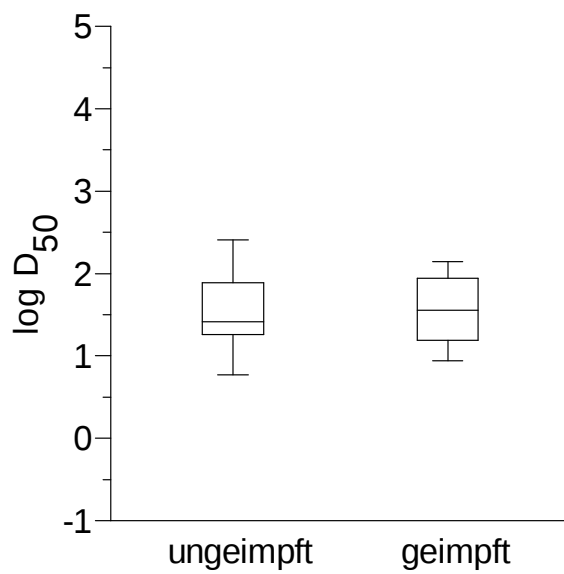


Abb. 18: Vergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV1 aus BALF bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (nicht signifikant)

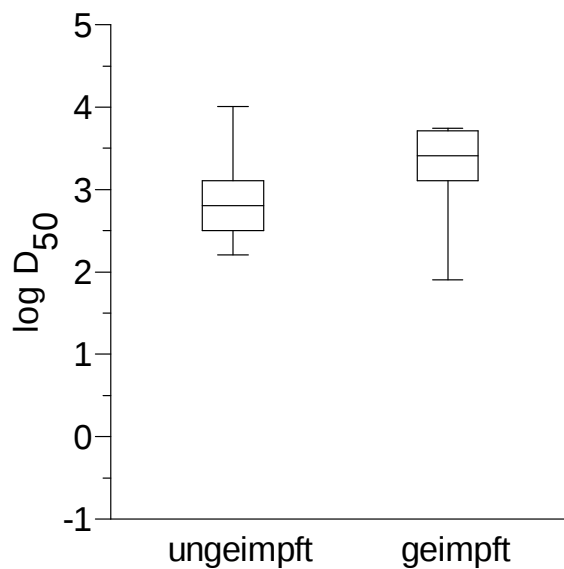


Abb. 19: Vergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV1 aus Serum bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (nicht signifikant)

3.2.2.13 Korrelation der mittels EHV1-IF bestimmten Antikörpertiter zwischen BALF und Serum

Bei der Betrachtung der Korrelation zwischen den mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztestes ermittelten Antikörper-Titern gegen EHV1 in BALF und Serum konnte ein hoch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) festgestellt werden. Bei der Grafik in Abbildung 20 erfolgt die Darstellung in Form einer Punktwolke. Die errechnete Regressionsgrade ($y = 1,143 + 0,965 \cdot x$) wurde eingezeichnet. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient lag bei 0,639.

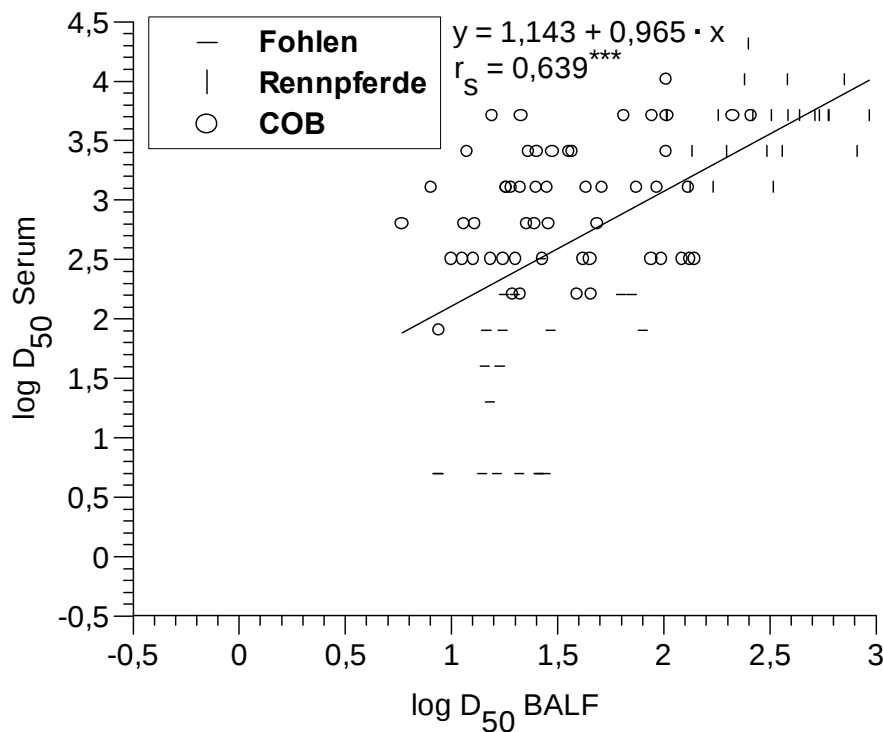


Abb. 20: Korrelation zwischen mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests ermittelten Titern aus BALF und aus Serum gegen EHV1

3.2.2.14 Ergebnisse der EHV4-Antikörpertiterbestimmungen mittels Neutralisationstest (EHV4-NT) aus BALF im Gruppenvergleich

Die ermittelten Titer gegen EHV4 in der BALF wurden im Hinblick auf die Unterschiede der Gruppen verglichen. In 14 Fällen gelang kein Nachweis von Antikörpern in der BALF, davon stammten 7 Proben von COB-Patienten und 7 Proben von Fohlen.

Die Ergebnisse zeigten unterschiedliche Signifikanzgrade bei Vergleich der einzelnen Gruppen. Während der Gruppenunterschied zwischen Fohlen und COB-Patienten nicht signifikant ausfiel ($p = 0,3$), zeigte er sich signifikant zwischen Fohlen und Rennpferden ($p = 0,008$) sowie hoch signifikant bei dem Vergleich von COB-Patienten mit Rennpferden ($p < 0,0001$).

So konnten bei der Gruppe der Fohlen Antikörperspiegel zwischen $-0,1 \log D_{50}$ (gleichbedeutend mit keinem Nachweis) und $2,8 \log D_{50}$ ermittelt werden. Der Mittelwert lag hier bei $1,8 \log D_{50}$, wobei 50% der Tiere einen Spiegel zwischen $-0,1 \log D_{50}$ (Q1) und $2,1 \log D_{50}$ (Q3) aufwiesen. Bei den COB-Patienten konnte ein etwas geringerer Mittelwert von $1,2 \log D_{50}$ nachgewiesen werden. Der niedrigste Titer lag auch hier bei $-0,1 \log D_{50}$, der höchste bei $2,2 \log D_{50}$. Die Hälfte der Patienten zeigte einen Titer zwischen $0,8 \log D_{50}$ (Q1) und $1,6 \log D_{50}$ (Q3). Bei den Rennpferden gelang der Nachweis in allen Fällen. Der Mittelwert lag hier bei $2,1 \log D_{50}$ mit einem Minimum von $1,3 \log D_{50}$ und einem Maximum von $2,9 \log D_{50}$. 50% der Tiere wiesen Titer innerhalb einer geringen Spannbreite von $2,0 \log D_{50}$ (Q1) und $2,2 \log D_{50}$ auf.

Zum sichtbaren Vergleich wurden die Daten mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots in Abbildung 21 dargestellt.

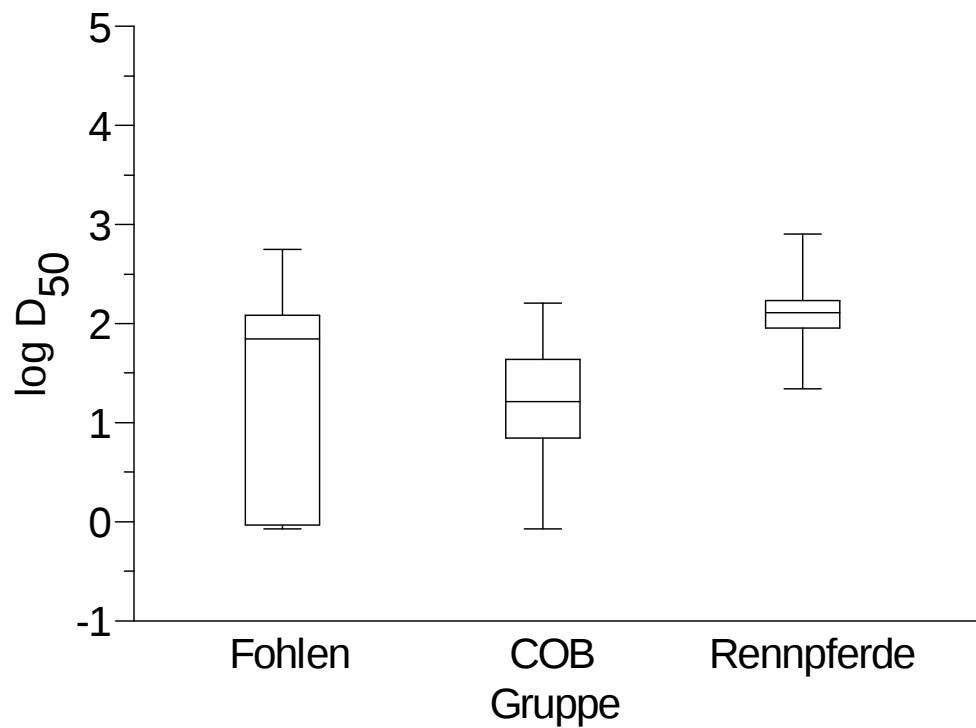


Abb. 21: Gruppenvergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV4 aus BALF

Signifikanzgrade:

Fohlen vs. COB: nicht signifikant ($p = 0,3$)

Fohlen vs. Rennpferde: signifikant ($p = 0,008$)

COB vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

3.2.2.15 Ergebnisse des EHV4-NT aus BALF innerhalb der COB-Patienten

Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten wurden die Ergebnisse des Neutralisationstests auf statistische Differenzen hinsichtlich Grad der COB, Rasse und A-aDO₂ geprüft. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den BALF-Proben. Auffällig niedrig zeigt sich hier jedoch der für die Rasse der Vollblüter innerhalb der Gruppe der COB-Patienten festgestellte Mittelwert. Die Daten können im Einzelnen der Tabelle 17 entnommen werden. Die Ergebnisse bezüglich des Impfstatus werden gesondert in Kapitel 3.2.2.18 dargestellt.

Tab. 17: Ergebnisse des EHV4-NT aus BALF innerhalb der COB-Patienten

Parameter		MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
COB- Grad	ggr.	1,2	-0,1	2,2	0,8	1,6	26
	mgr. – hgr.	1,1	-0,1	2,2	0,9	1,7	27
Rasse	Warmblut	1,2	-0,1	2,2	0,9	1,8	37
	Vollblut	0,4	-0,1	1,2	0,0	1,1	4
	Pony	1,3	-0,1	1,3	0,9	1,5	12
A-aDO ₂ [mmHg]	< 7	1,1	-0,1	2,0	0,7	1,5	13
	7-15	1,3	-0,1	2,2	1,0	1,7	19
	>15	1,1	-0,1	2,2	0,7	1,6	21

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

3.2.2.16 Ergebnisse des EHV4-NT aus Serum im Gruppenvergleich

Die ermittelten Antikörper-Titer gegen EHV4 im Serum wurden im Hinblick auf die Unterschiede der Gruppen verglichen. Die Ergebnisse zeigten verschiedene Signifikanzgrade zwischen den einzelnen Gruppen. So waren die Unterschiede zwischen Fohlen und COB-Patienten als signifikant zu bezeichnen ($p = 0,007$). Die Ergebnisse zwischen Fohlen und Rennpferden zeigten sich hoch signifikant ($p < 0,0001$). Der Unterschied zwischen COB-Gruppe und Rennpferden erwies sich als nicht signifikant ($p = 0,1$).

Der Mittelwert der Antikörperspiegel lag bei der Gruppe der Fohlen bei $2,4 \log D_{50}$, das Minimum bei $-0,1 \log D_{50}$ und der Maximaltiter bei $2,9 \log D_{50}$. Bei einem Fohlen gelang der Antikörperrnachweis nicht. Die Hälfte der ermittelten Titer lagen im Bereich zwischen $1,9 \log D_{50}$ (Q1) und $2,4 \log D_{50}$ (Q3). Bei den COB-Patienten gelang der Nachweis in allen Seren. Es konnte ein Mittelwert von $2,6 \log D_{50}$ ermittelt werden. Der niedrigste Titer lag bei $1,4 \log D_{50}$, der höchste bei $3,6 \log D_{50}$. 50% der Ergebnisse verteilten sich zwischen $2,4 \log D_{50}$ (Q1) und $2,9 \log D_{50}$ (Q3). Innerhalb der Gruppe der Rennpferde fanden sich ebenfalls hohe Titer. Der Mittelwert lag hier bei $2,9 \log D_{50}$ mit einem Minimum von $2,1 \log D_{50}$ und einem Maximum von 3,8. Die Hälfte der Tiere wiesen einen Titer zwischen $2,7 \log D_{50}$ (Q1) und $3,0 \log D_{50}$ (Q3) auf.

Zur Verdeutlichung wurden die Daten mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots in Abbildung 22 dargestellt.

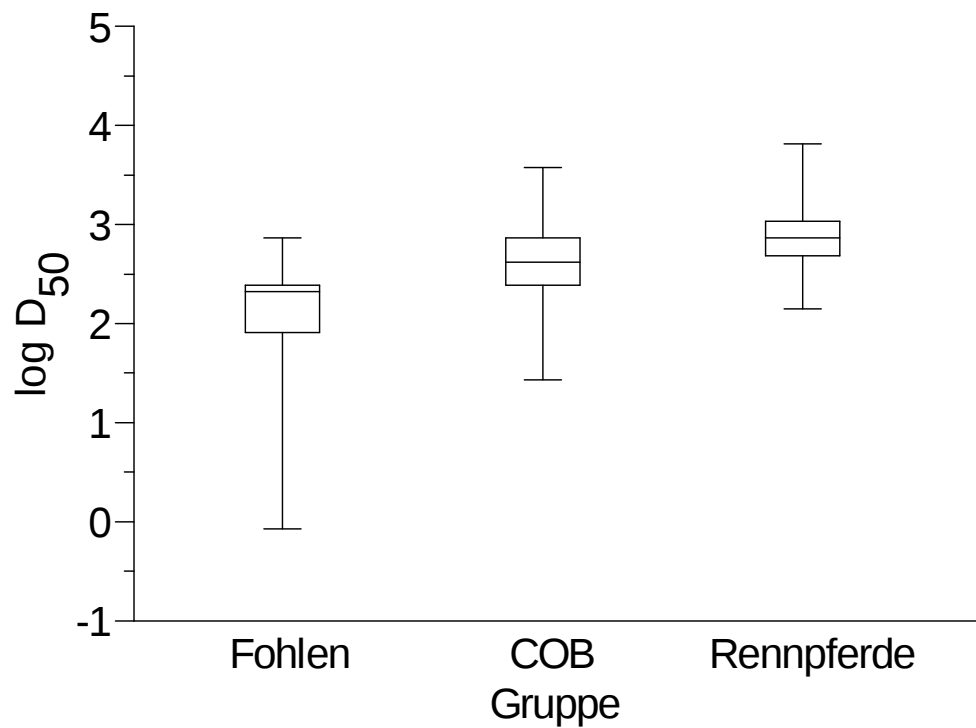


Abb. 22: Gruppenvergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV4 aus Serum

Signifikanzgrade:

Fohlen vs. COB: signifikant ($p = 0,007$)

Fohlen vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

COB vs. Rennpferde: nicht signifikant ($p = 0,1$)

3.2.2.17 Ergebnisse des EHV4-NT aus Serum innerhalb der COB-Patienten

Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten wurden die Ergebnisse der Neutralisationstests der Seren auf statistische Differenzen hinsichtlich Grad der COB, Rasse und A-aDO₂ geprüft. Es ergaben sich in keinem Fall signifikante Unterschiede. Die Daten können im Einzelnen der Tabelle 18 entnommen werden. Die Ergebnisse bezüglich des Impfstatus werden gesondert in Kapitel 3.2.2.18 dargestellt.

Tab. 18: Ergebnisse des EHV4-NT aus Serum innerhalb der COB-Patienten

Parameter		MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
COB- Grad	ggr.	2,6	1,7	3,3	2,4	2,9	26
	mgr. – hgr.	2,9	1,4	3,6	2,4	3,3	27
Rasse	Warmblut	2,9	1,4	3,6	2,4	3,0	37
	Vollblut	2,4	2,9	2,4	2,7	1,2	4
	Pony	2,5	2,1	3,3	2,4	2,9	12
A-aDO ₂ [mmHg]	< 7	2,4	1,4	3,3	2,4	3,0	13
	7-15	2,6	1,7	3,3	2,4	2,9	19
	>15	2,9	1,9	3,6	2,4	3,3	21

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

3.2.2.18 Ergebnisse des EHV4-NT innerhalb der COB-Patienten je nach Impfstatus

Sowohl die Ergebnisse aus den Untersuchungen der BALF als auch aus dem Serum ergaben bei den COB-Patienten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Impfstatus. Die Daten sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tab. 19: Ergebnisse des EHV4-NT innerhalb der COB-Patienten unter Berücksichtigung des Impfstatus (bezüglich EHV1 und EHV4)

Proben-material	Impfstatus	MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
BALF	geimpft	1,3	-0,1	2,2	0,2	1,8	25
	nicht geimpft	1,2	-0,1	2,1	0,9	1,5	28
Serum	geimpft	2,9	2,4	3,3	2,6	3,3	25
	nicht geimpft	2,4	1,4	3,6	2,4	2,9	28

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

Um einen übersichtlicheren Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen, erfolgt die grafische Darstellung der Daten aus in den Abbildungen 23 (BALF) und 24 (Serum).

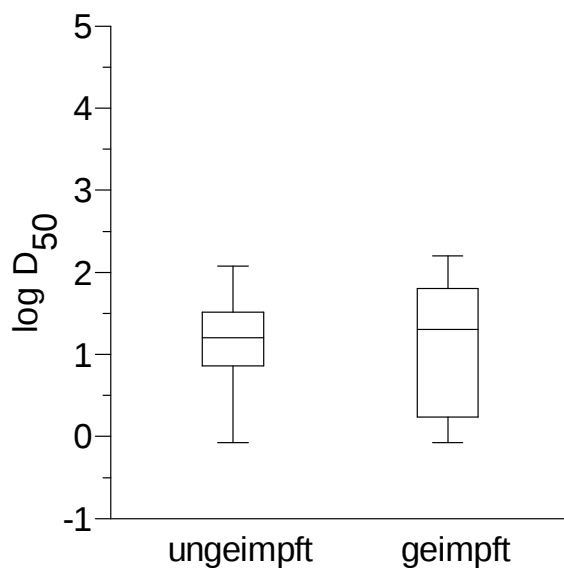


Abb. 23: Vergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV4 aus BALF bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (nicht signifikant)

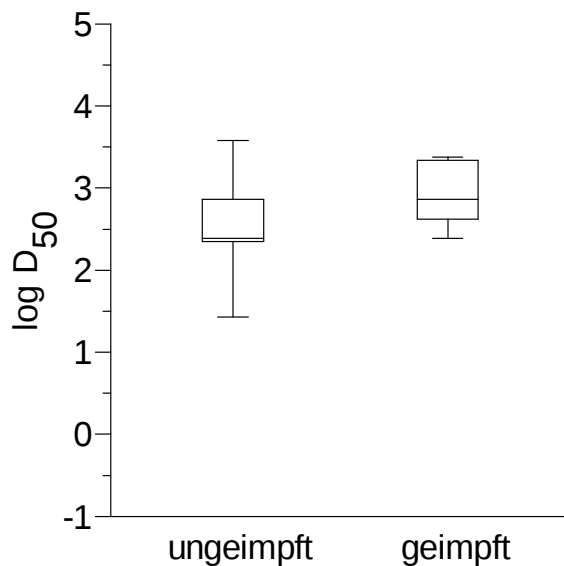


Abb. 24: Vergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV4 aus Serum bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (nicht signifikant)

3.2.2.19 Korrelation der mittels EHV4-NT bestimmten Antikörpertiter zwischen BALF und Serum

Bei der Betrachtung der Korrelation zwischen den mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Antikörper-Titern gegen EHV4 in BALF und Serum konnte ein hoch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) festgestellt werden. Bei der Grafik in Abbildung 25 erfolgt die Darstellung in Form einer Punktwolke. Die errechnete Regressionsgrade ($y = 2,228 + 0,293 \cdot x$) wurde eingezeichnet. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient lag bei 0,386.

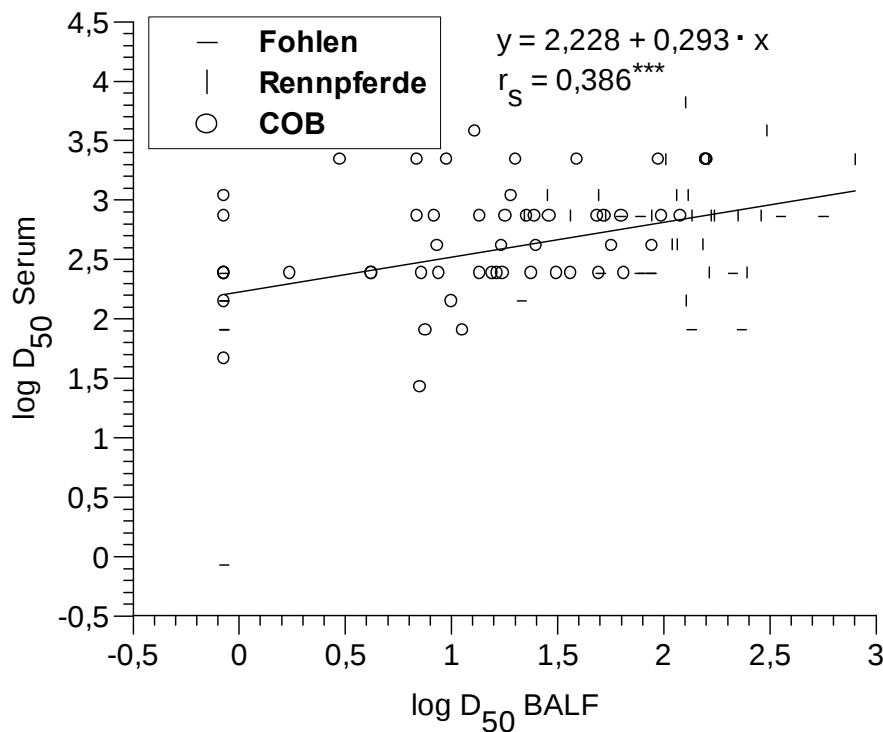


Abb. 25: Korrelation zwischen mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titern aus BALF und aus Serum gegen EHV4

3.2.2.20 Ergebnisse der EHV4-Antikörpertiterbestimmungen mittels indirektem Immunfluoreszenztest (EHV4-IF) aus BALF im Gruppenvergleich

Auch EHV4-Antikörper-Titer wurden mittels indirekter Immunfluoreszenztests der Lavageproben im Hinblick auf die Unterschiede der Gruppen verglichen. Der Nachweis von Antikörpern gegen EHV4 gelang in allen untersuchten BALF-Proben.

Der Vergleich der mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV4 aus der BALF ergab folgende Unterschiede: zwischen Fohlen und COB-Patienten bestand keine signifikante Differenz ($p = 0,7$), ebenso nicht zwischen Fohlen und Rennpferden ($p = 0,5$). Der Unterschied zwischen der Gruppe der COB-Patienten und Rennpferde erwies sich dagegen als hoch signifikant ($p = 0,0005$).

Im Einzelnen konnten bei den Fohlen im Mittel Antikörpertiter von $2,0 \log D_{50}$ bei Minimalwerten von $0,9 \log D_{50}$ und Maximalwerten von $2,7 \log D_{50}$ nachgewiesen werden. 50% der Werte befanden sich zwischen $1,2 \log D_{50}$ (Q1) und $2,4 \log D_{50}$ (Q3). Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten fand sich ein Mittelwert von $1,7 \log D_{50}$. Das Minimum befand sich bei $1,1 \log D_{50}$ und das Maximum bei $2,6 \log D_{50}$. 50% der Tiere wiesen einen Titer zwischen $1,6 \log D_{50}$ (Q1) und $2,1 \log D_{50}$ (Q3) auf. Die Ergebnisse der Rennpferde zeigten sich mit etwas höheren Titern und ergaben einen Mittelwert von $2,1 \log D_{50}$. Der niedrigste Wert betrug $1,8 \log D_{50}$, der höchste war $2,9 \log D_{50}$, wobei die Hälfte der Tiere Antikörperspiegel zwischen $2,0 \log D_{50}$ (Q1) und $2,5 \log D_{50}$ (Q3) zeigten.

Die Daten wurden mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots in Abbildung 26 dargestellt.

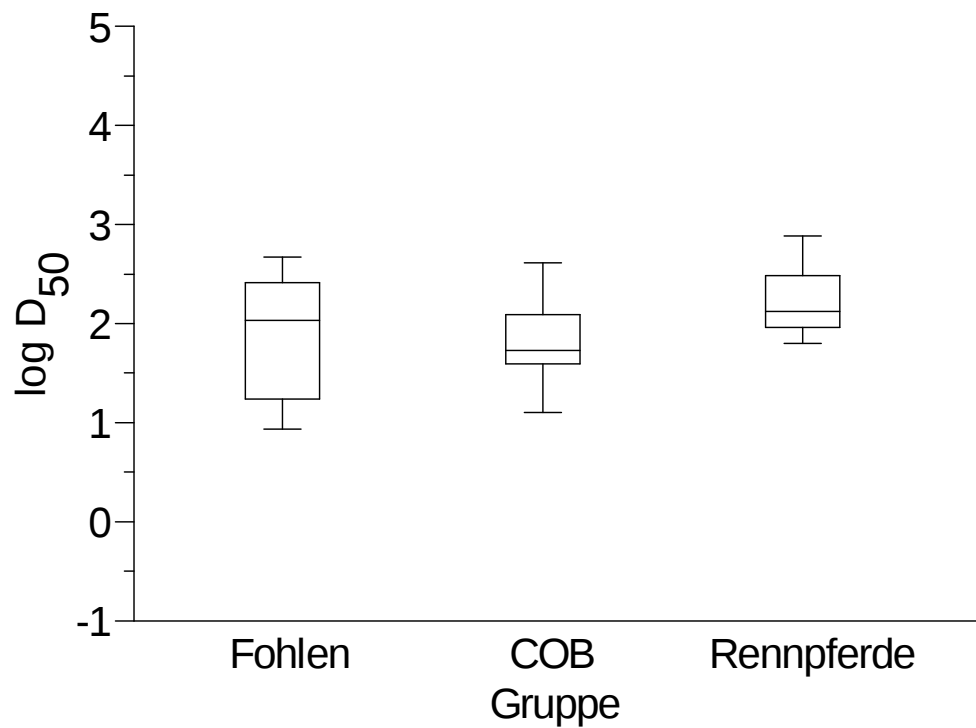


Abb. 26: Gruppenvergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV4 aus BALF

Signifikanzgrade:

Fohlen vs. COB:	nicht signifikant ($p = 0,7$)
Fohlen vs. Rennpferde:	nicht signifikant ($p = 0,5$)
COB vs. Rennpferde:	hoch signifikant ($p = 0,0005$)

3.2.2.21 Ergebnisse des EHV4-IF aus BALF innerhalb der COB-Patienten

Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten wurden die Ergebnisse der indirekten Immunfluoresztests der BALF-Proben auf statistische Differenzen hinsichtlich Grad der COB, Rasse, A-aDO₂ und Impfstatus geprüft. Es ergaben sich in keinem Fall signifikante Unterschiede. Die Daten können im Einzelnen der Tabelle 20 entnommen werden. Die Ergebnisse bezüglich des Impfstatus werden gesondert in Kapitel 3.2.2.24 dargestellt.

Tab. 20: Ergebnisse des EHV4-IF aus BALF innerhalb der COB-Patienten

Parameter		MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
COB- Grad	ggr.	1,7	1,2	2,5	1,6	2,1	26
	mgr. – hgr.	1,8	1,1	2,6	1,6	2,1	27
Rasse	Warmblut	1,8	1,1	2,6	1,6	2,2	37
	Vollblut	1,7	1,7	1,9	1,7	1,9	4
	Pony	1,8	1,2	2,2	1,5	2,1	12
A-aDO ₂ [mmHg]	< 7	1,7	1,1	2,5	1,6	1,9	13
	7-15	1,9	1,2	2,4	1,6	2,2	19
	>15	1,8	1,3	2,6	1,6	2,1	21

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

3.2.2.22 Ergebnisse des EHV4-IF aus Serum im Gruppenvergleich

Die im Serum nachgewiesenen Antikörperspiegel gegen EHV4 wurden im Hinblick auf die Unterschiede der Gruppen verglichen. Der Nachweis gelang in allen untersuchten Seren.

Die ermittelten Titer ergaben hoch signifikante ($p = 0,0007$) Unterschiede zwischen der Gruppe der Fohlen und COB-Patienten sowie der Fohlen und Rennpferde ($p < 0,0001$). Die Unterschiede zwischen der Gruppe der COB-Patienten und Rennpferde zeigte sich nicht signifikant ($p = 0,2$).

Der Mittelwert der bei den Fohlen ermittelten Daten lag bei $2,8 \log D_{50}$, das Minimum bei $1,0 \log D_{50}$ und der Maximaltiter bei $3,1 \log D_{50}$. Die Hälfte der ermittelten Titer lagen im Bereich zwischen $2,5 \log D_{50}$ (Q1) und $2,8 \log D_{50}$ (Q3). Bei den COB-Patienten zeigten sich etwas höhere Ergebnisse. Es konnte ein Mittelwert von $3,1 \log D_{50}$ ermittelt werden. Der niedrigste Titer lag bei $1,9 \log D_{50}$, der höchste bei $3,7 \log D_{50}$. 50% der Ergebnisse verteilten sich zwischen $2,8 \log D_{50}$ (Q1) und $3,4 \log D_{50}$ (Q3). Innerhalb der Gruppe der Rennpferde fanden sich nochmals höhere Titer als bei den COB-Patienten. Der Mittelwert lag hier bei $3,4 \log D_{50}$ mit einem Minimum von $2,5 \log D_{50}$ und einem Maximum von $4,3 \log D_{50}$. Die Hälfte der Tiere wies einen Titer zwischen $3,1 \log D_{50}$ (Q1) und $3,6 \log D_{50}$ (Q3) auf.

Zur Verdeutlichung wurden die Daten mit Hilfe von Box-and-Whisker-Plots in Abbildung 27 dargestellt.

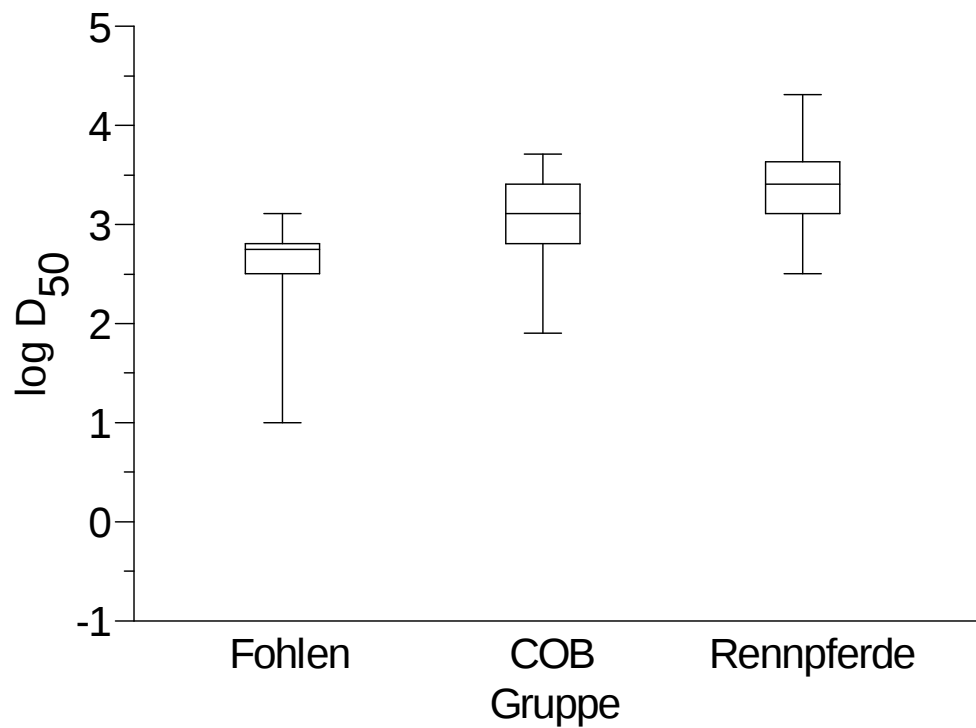


Abb. 27: Gruppenvergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV4 aus Serum

Signifikanzgrade:

Fohlen vs. COB: hoch signifikant ($p = 0,0007$)

Fohlen vs. Rennpferde: hoch signifikant ($p < 0,0001$)

COB vs. Rennpferde: nicht signifikant ($p = 0,2$)

3.2.2.23 Ergebnisse des EHV4-IF aus Serum innerhalb der COB-Patienten

Innerhalb der Gruppe der COB-Patienten wurden die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenztests der Seren auf statistische Differenzen hinsichtlich Grad der COB, Rasse, A-aDO₂ und Impfstatus geprüft. Es ergaben sich in keinem Fall signifikante Unterschiede. Die Daten können im Einzelnen der Tabelle 21 entnommen werden. Die Ergebnisse bezüglich des Impfstatus werden gesondert im folgenden Kapitel 3.2.2.24 dargestellt.

Tab. 21: Ergebnisse des EHV4-IF aus Serum innerhalb der COB-Patienten

Parameter		MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
COB- Grad	ggr.	3,1	2,2	3,7	2,8	3,4	26
	mgr. – hgr.	3,1	1,9	3,7	2,8	3,4	27
Rasse	Warmblut	3,1	1,9	3,7	2,8	3,4	37
	Vollblut	3,0	2,8	3,4	2,8	3,3	4
	Pony	3,0	2,5	3,7	2,8	3,4	12
A-aDO ₂ [mmHg]	< 7	3,1	1,9	3,7	2,8	3,4	13
	7-15	3,1	2,2	3,7	2,8	3,4	19
	>15	3,4	2,5	3,7	2,8	3,6	21

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

3.2.2.24 Ergebnisse des EHV4-IF innerhalb der COB-Patienten je nach Impfstatus

Sowohl die Ergebnisse aus den Untersuchungen der BALF als auch aus dem Serum ergaben schwach signifikante Unterschiede mit $p = 0,03$ in der BALF und $p = 0,05$ im Serum, wobei die geimpften Tiere erwartungsgemäß höhere Titer aufwiesen. Die Daten sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tab. 22: Ergebnisse des EHV4-IF innerhalb der COB-Patienten unter Berücksichtigung des Impfstatus (bezüglich EHV1 und EHV4)

Proben-material	Impfstatus	MW [log D ₅₀]	Min [log D ₅₀]	Max [log D ₅₀]	Q1 [log D ₅₀]	Q3 [log D ₅₀]	n
BALF	geimpft	2,1	1,3	2,6	1,7	2,3	25
	nicht geimpft	1,7	1,1	2,5	1,5	2,0	28
Serum	geimpft	3,4	2,8	3,7	3,1	3,7	25
	nicht geimpft	3,1	1,9	3,7	2,8	3,4	28

MW: Mittelwert

Min: Minimum

Max: Maximum

Q1: erstes Quartil

Q3: drittes Quartil

n: Anzahl

Um einen anschaulicheren Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen, erfolgt die grafische Darstellung der Daten aus den Untersuchungen der BALF in Abbildung 28. Die ermittelten Werte aus den Untersuchungen im Serum werden in Abbildung 29 aufgezeigt.

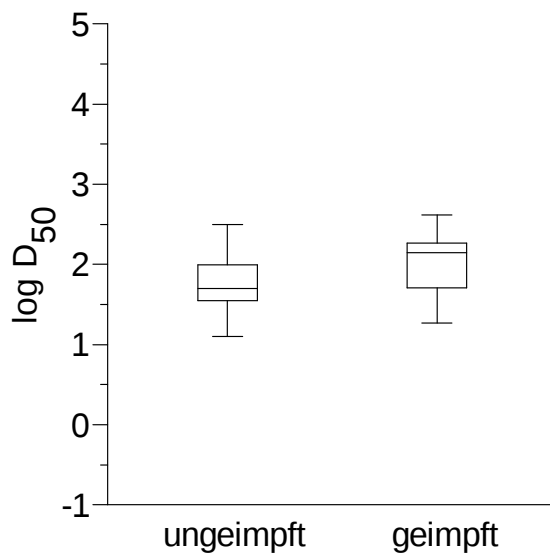


Abb. 28: Vergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV4 aus BALF bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (schwach signifikant mit $p = 0,03$)

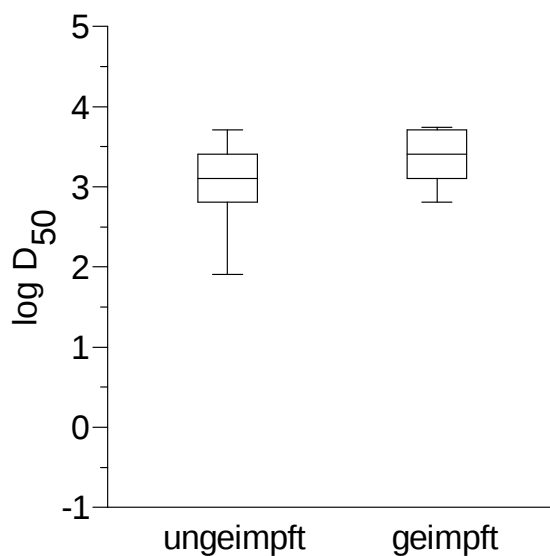


Abb. 29: Vergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV4 aus Serum bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (schwach signifikant mit $p = 0,05$)

3.2.2.25 Korrelation der mittels EHV4-IF bestimmten Antikörpertiter zwischen BALF und Serum

Bei der Betrachtung der Korrelation zwischen den mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Antikörper-Titern gegen EHV4 in BALF und Serum konnte ein hoch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) festgestellt werden. Bei der Darstellung in Abb. 30 erfolgt die Abbildung in Form einer Punktwolke. Die errechnete Regressionsgrade ($y = 2,18 + 0,463 \cdot x$) wurde eingezeichnet. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient lag bei 0,385.

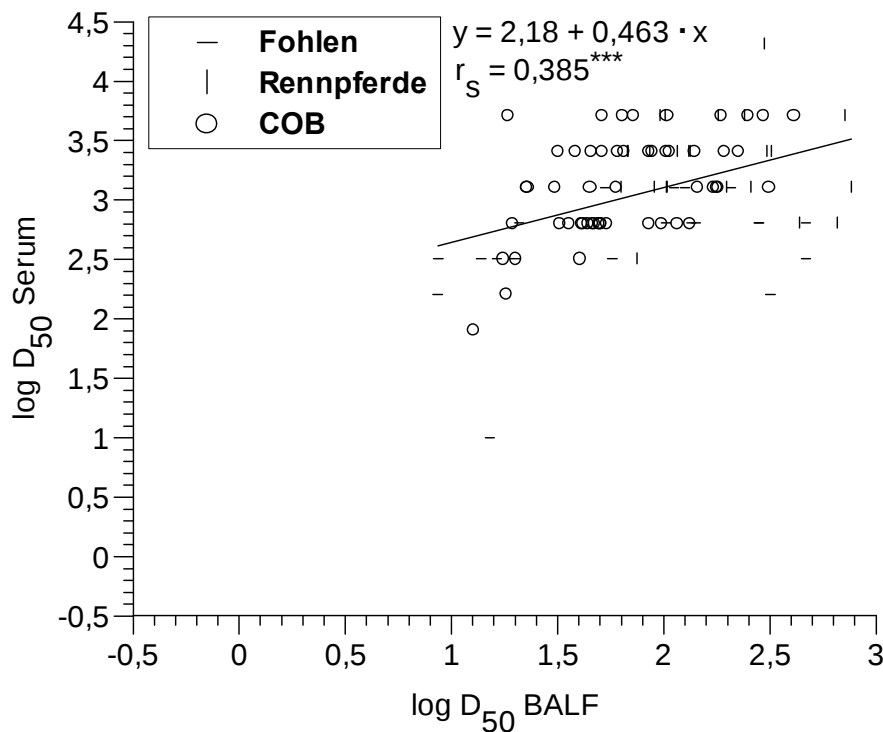


Abb. 30: Korrelation zwischen mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests ermittelten Titern aus BALF und aus Serum gegen EHV4

4. Diskussion

4.1 Patientengut und Patientenevaluation

Die untersuchten Tiere setzten sich aus drei Gruppen zusammen – der Gruppe der COB-Patienten, den Rennpferden und der Gruppe der Ponys.

Die Gruppe der COB-Patienten bestand aus 53 Pferden. Bei diesen Tieren handelte es sich um Patienten der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik (Innere Krankheiten der Pferde) der Justus-Liebig-Universität Gießen. Diese Pferde des Patientengutes wurden untersucht und mit der Diagnose der chronisch obstruktiven Bronchitis (COB) zwischen November 1999 und November 2001 stationär aufgenommen. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse sowohl aus der klinischen als auch aus weiterführenden Untersuchungen erfolgte die Einteilung in die Gruppen geringgradig (n = 26) und mittel- bis hochgradig (n = 27) an COB erkrankt.

Die Schweregradeinteilung wurde mit Hilfe des leicht modifizierten Score-Systems nach Ohnesorge et al. (1998) vorgenommen. Dieses berücksichtigt, wie auch die von Rotinsulu (1995) und Schütz (1999) entwickelten Methoden, klinische Aspekte (Husten, Dyspnoe, Auskultation, Perkussion), Tracheobronchoskopiebefunde (Sekretmenge, Sekretviskosität) sowie die Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse. Die bei Ohnesorge et al. (1998) ebenfalls hinzugezogenen Parameter Perkussionsbefund und mikroskopische Beurteilung des Tracheobronchialsekretes (Anteil an Makrophagen und neutrophilen Granulozyten) werden bei den Score-Systemen von Rotinsulu (1995) und Schütz (1999) nicht für die Patientenklassifizierung mit herangezogen. Die Tracheobronchialsekret-Beurteilung wurde auch in der vorliegenden Arbeit nicht mit aufgenommen, da die sonstigen erhobenen Befunde als ausreichend für die Feststellung des Schweregrades der Erkrankung angesehen wurden.

Ein grundsätzliches Problem bei der Anwendung von Score-Systemen liegt in der Subjektivität des Untersuchers bei der Befunderhebung. Da jedoch bislang bei den

genannten Untersuchungen keine objektiven Messgrößen erhoben werden können, stellt die Bewertung mit Hilfe von Score-Systemen momentan die einzige Möglichkeit dar, die erwähnten Parameter mit in eine Beurteilung einfließen zu lassen.

Die zweite in den eigenen Untersuchungen berücksichtigte Gruppe bestand aus 24 regelmäßig geimpften, im Sport eingesetzten englischen Vollblütern aus einem Rennstall. Bei diesen Pferden erfolgte sowohl die Probenentnahme als auch die Erhebung der benötigten Daten durch eine ehemalige Mitarbeiterin der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik (Innere Krankheiten der Pferde) der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Die Probenentnahme wurde nach dem gleichen System wie bei den in der Klinik untersuchten Patienten durchgeführt.

Die Gruppe der 20 Fohlen stammte aus einer Studie des Instituts für Parasitologie der Justus-Liebig Universität in Gießen. Vor ihrer Tötung wurden alle Fohlen zusammen in einer Herde gehalten. Dies birgt die Gefahr, dass eventuell festgestellte Viruskontakte dieser einen Population nicht repräsentativ für andere Fohlen sein müssen. Das Alter der Tiere betrug mindestens sechs Monate, so dass bei den bereits immunkompetenten Tieren maternale Antikörper nicht mehr vorhanden sein sollten (Verter et al. 1999). Da hier jedoch fließende Übergänge bestehen, kann in individuellen Fällen die Gegenwart dieser Antikörper nicht sicher ausgeschlossen werden.

4.2 Durchführung der BAL

Die Durchführung der BAL erfolgte nach einem bereits seit 1997 etablierten und in der Abteilung für Innere Krankheiten der Pferde der Justus-Liebig Universität in Gießen routinemäßig eingesetzten Verfahren. Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit nur noch kurz darauf eingegangen werden.

Die Spülung der Lunge erfolgte über den Arbeitskanal eines flexiblen Endoskopes, wie in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Damiano 1980, Lam et al. 1985, Sweeney et Beech 1991, Lapointe et al. 1994, McGorum et Dixon 1994, Clark et al. 1995, Moore et Cox 1996). Mit diesem Verfahren konnte vor Entnahme der BALF die

Trachea auf Schleimhautschwellung, -rötung und Sekretansammlung untersucht werden sowie die Sekretkonsistenz beurteilt werden. Drei der sediert untersuchten Tiere zeigten aufgrund heftiger Hustenanfälle bereits makroskopisch Blutbeimengungen in der BALF, was zum Ausschluss aus der Studie führte. Hier scheint die Empfehlung von Sweeney und Beech (1991) angemessen, zur Gewinnung ohne Blutkontamination die Entnahme unter Allgemeinanästhesie vorzunehmen. Da alle in die Studie einbezogenen Proben im Rahmen der klinischen Diagnostik an Patienten gewonnen wurden, ist eine solche Allgemeinanästhesie jedoch als nicht praktikabel zu betrachten.

4.3 Rückgewinnungsrate

Die bei der Durchführung der BAL zurück gewonnene Spülflüssigkeit, die so genannte Rückgewinnungsrate, liegt in der Literatur bei lungengesunden Pferden zwischen 50 und 90% (Lapointe et al. 1994, McGorum et Dixon 1994). Diese Raten wurden in der vorliegenden Studie jedoch nur bei der Gruppe der Fohlen mit $56,6 \pm 10\%$ erreicht. Die durchschnittliche Rückgewinnung lag in dieser Arbeit somit lediglich bei 47,7%, wobei die Gruppe der Rennpferde nicht berücksichtigt wurde, da hier keine Daten zur Verfügung standen. Dieser geringere Durchschnitt ist dadurch bedingt, dass es sich bei den restlichen hier untersuchten Pferden um lungenkranke Tiere handelte, deren Rückgewinnungsrate bei durchschnittlich $38,8 \pm 16,6\%$ lag. Derart verringerte Mengen werden auch in der Literatur beschrieben, wobei es laut Lapointe et al. (1994) zu Verringerungen bis zu durchschnittlich 31% kommen kann. Die Ursache hierfür ist noch nicht gänzlich geklärt. Es wird vermutet, dass die Spülflüssigkeit aufgrund einer vorliegenden Obstruktion der kleinen Atemwege aus der Lungenperipherie nicht wieder aspiriert werden kann, da der für die Aspiration erforderliche Unterdruck zum Kollaps der Bronchioli führt. Da bereits in der Literatur die Angaben über den benötigten Unterdruck zur Aspiration stark schwanken, wie z.B. 30-100 mmHg (Lapointe et al. 1994) bzw. 600-660 mmHg (Sweeney et al. 1992, Moore et Cox 1996), könnte es auch aufgrund verschiedener Unterdrücke zu variierenden Rückgewinnungsraten kommen. Da in der vorliegenden Studie die Erzeugung des Unterdrucks unter sanfter manueller Aspiration erfolgte, bewegt sich dieser Druck sicherlich im unteren Bereich der in der Literatur erwähnten Angaben.

4.4 Verfahren zum Nachweis von Herpesvirusantikörpern

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Probenmaterialien Serum und BALF mit zwei verschiedenen Testverfahren auf Antikörper gegen EHV1 und EHV4 untersucht: dem Neutralisationstest und dem indirekten Immunfluoreszenztest.

4.4.1 Neutralisationstest (NT)

Nach der Entwicklung des Testverfahrens 1955 erfolgte bereits 1957 der routinemäßige Einsatz in der immunologischen Diagnostik (zitiert nach Schultheiss 1993). Auch in der vorliegenden Studie hat sich das Verfahren des Neutralisationstestes als geeignet zum Nachweis von Antikörpern gezeigt und lieferte gut reproduzierbare Ergebnisse, die bei Dreifachbestimmungen von sechs Proben, die jeweils zur Ermittlung der gleichen Titerhöhe führte, belegt werden konnten.

Relativ zeitaufwändig war zu Beginn zunächst die Einstellung von Zellzahl, Virusmenge und Inkubationszeiten, um einen optimal infizierten Monolayer zu erhalten, wie in Kapitel 3.1.2.9 beschrieben. Im Anschluss konnte die ermittelte Kombination jedoch ohne weitere Variation beibehalten werden.

4.4.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IF)

Auch der indirekte Immunfluoreszenztest war für die vorliegende Studie gut geeignet. Er lieferte ebenfalls sehr gut reproduzierbare Ergebnisse, die anhand von Dreifachbestimmungen von sechs Proben, die jeweils die gleiche Titerhöhe zeigten, bestätigt wurden. Neben dem quantitativen Nachweis von Antikörpern ist mit Hilfe der Immunfluoreszenz zusätzlich die Darstellung der Lokalisation (zytoplasmatisch oder intranukleär) der Antigen-Antikörper-Reaktion möglich. Ein Nachteil liegt jedoch in der subjektiven Beurteilung der Fluoreszenz (Voller et De Savigny 1981). Da der Immunfluoreszenztest aller Proben von der Autorin selbst durchgeführt wurde, wurde dieser Faktor jedoch soweit wie möglich minimiert. Eine weitere Fehlerquelle des Immunfluoreszenztests kann in der Belastung des Untersuchers beim Auswerten der

Proben liegen (Voller et De Savigny 1981). Da die Untersuchung der Proben in einem abgedunkelten Raum an einem Fluoreszenzmikroskop stattfindet, kann es bei einem hohen Probenaufkommen zu einer starken Ermüdung der Augen kommen und somit zu einer eventuellen Ungenauigkeit beim Beurteilen der Proben. Dieser Faktor kam jedoch bei der vorliegenden Arbeit nicht zum Tragen, da maximal 16 Proben pro Durchgang untersucht wurden.

4.5 Nachweisbarkeit von Antikörpern

Die Quantifizierung von Immunglobulinklassen im Bereich des Respirationstraktes, insbesondere aus der BALF, wurde bereits mehrfach durchgeführt (Delacroix et al. 1985, Mair et al. 1987, 1988, Peebles et al. 1995). Der Nachweis von spezifischen Antikörpern aus der BALF des Pferdes stellt eine Besonderheit dar, über die, nach Kenntnis der Autorin, bislang nur im Rahmen einer Dissertation über den Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* (Schmallenbach 1997) berichtet wurde.

Der in dieser Arbeit durchgeführte Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen EHV1 und gegen EHV4 war grundsätzlich aus Serum und BALF möglich, wobei Überlegungen zu deren Ursprung in Kapitel 4.10 erläutert werden. Es zeigten sich Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Testverfahren, auf die im folgenden Kapitel 4.6 eingegangen wird.

Mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests (IF) gelang der Nachweis in beiden Probenmaterialien sowohl gegen EHV1 als auch gegen EHV4 in 100% (n = 97) der Fälle. Bei Einsatz des Neutralisationstests (NT) gelang der Nachweis von Antikörpern gegen beide Virusspezies im Serum bei den adulten Tieren (n = 77) wie erwartet ebenfalls zu 100%. Dieses Verfahren wird seit längerer Zeit als Standardmethode zur Kontrolle von Antikörperspiegeln genutzt (Verter et al. 1999, Doerr et Braun 2002). Auch bei den Untersuchungen in der BALF konnten in den meisten Fällen Antikörper mittels NT nachgewiesen werden. So ließen sich gegen EHV1 bei Adulten in 97% (n = 74) der BALF-Proben und gegen EHV4 in 91% (n = 70) Antikörpernachweise führen.

Bei den ungeimpften Fohlen ($n = 20$), die aufgrund ihres Alters gesondert zu betrachten sind, gelang ein Nachweis in Seren mittels NT bei 60% ($n = 12$) gegen EHV1 und zu 95% ($n = 19$) gegen EHV4. In der BALF war dies in 65% ($n = 13$) der Proben gegen EHV4 und in keinem Fall gegen EHV1 möglich. Auf diese Besonderheiten wird im Kapitel 4.7 im Rahmen des Gruppenvergleichs näher eingegangen.

4.6 Vergleich der Ergebnisse der Testverfahren

Beim Vergleich der ermittelten Daten der beiden verschiedenen Testverfahren fanden sich recht deutliche Unterschiede sowohl in der Nachweisbarkeit von Antikörpern als auch in der Höhe der Titer.

So konnten mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests (IF) in einigen Proben Antikörper nachgewiesen werden, die im NT keinen Titer zeigten (siehe Tab. 26 auf Seite 156 im Anhang). Hierbei könnte die für den Neutralisationstest gewählte erste Verdünnungsstufe mit 1:3 zu hoch gewählt worden sein. Da sich jedoch auch die restlichen mittels IF gemessenen Antikörperspiegel im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem Neutralisationstest im Mittel um den Faktor 2,9 erhöht zeigten, müssen als Ursache auch die verschiedenen Prinzipien der eingesetzten Tests in Betracht gezogen werden.

Der Neutralisationstest mit seiner hohen Sensitivität und Spezifität stellt die historisch älteste und nach Doerr und Braun (2002) immer noch eindeutigste Methode zur Überprüfung der humoralen Immunität dar. Die im indirekten Fluoreszenztest ermittelten höheren Titer könnten durchaus für eine höhere Sensitivität dieses Testverfahrens sprechen (Gimeno et al. 1987, Jönsson et al. 1989, Gunn 1991, Whitwell et Blunden 1992, Schultheiss et al. 1993).

Die Differenz der Ergebnisse könnte ihre Ursache in unterschiedlichen Eigenschaften der Antikörper haben. So ermöglicht der Neutralisationstest ausschließlich den Nachweis neutralisierender Antikörper, die direkt proportional den sichtbaren zytopathischen Effekt inhibieren (Falke 1999b). Der Nachweis von Antikörpern mit

Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests ist von dieser Eigenschaft unabhängig. So könnte die Titer-Differenz zwischen beiden Methoden durch Antikörper gebildet werden, die in-vitro keinen neutralisierenden Effekt aufweisen.

Eine weitere Auffälligkeit ist darin zu sehen, dass Proben mit Antikörperspiegeln in hohen Titerbereichen sich im indirekten Immunfluoreszenztest um deutlich größere Faktoren erhöht zeigten als Proben mit niedrigen Titern (vergleiche Tab. 25 auf Seite 156 und Tab. 26 auf Seite 158 im Anhang). Hierbei handelt es sich allerdings um ein methodisch bedingtes Problem, dessen Ursache in den für die Immunfluoreszenz erstellten Verdünnungsreihen zu finden ist. Durch die große Anzahl an Verdünnungsstufen in Zweierpotenzen ergaben insbesondere in den oberen Verdünnungsbereichen große Stufen, die nicht differenzierter verdünnt wurden.

4.7 Vergleich der Gruppen

Die ermittelten Antikörper-Titer zeigten zum überwiegenden Teil hoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der Fohlen, der COB-Patienten und der Rennpferde. Die Mittelwerte aller durchgeführten virologischen Tests sind für alle Gruppen zur besseren Übersicht in Tabelle 23 dargestellt.

Bei Betrachtung der Gruppe der Fohlen ($n = 20$) zeigten sich in Seren und BALF deutlich höhere Titer gegen EHV4 als gegen EHV1. Auffällig war hierbei im NT die hohe Anzahl an Tieren, bei denen kein Nachweis (k.N.) von Antikörpern gegen EHV1 gelang (BALF: $n = 20$, Serum: $n = 8$). Auch bei Verwendung des IF konnte bei 7 Tieren (BALF) bzw. 1 Tier (Serum) kein Titer festgestellt werden (siehe Tab. 23). Da aufgrund der Haltung dieser Fohlen in einer Gruppe davon auszugehen ist, dass alle Tiere Kontakt zu EHV1 und EHV4 hatten, könnte ursächlich hierfür das noch nicht voll entwickelte Immunsystem einzelner junger Pferde sein.

Tab. 23: Übersicht über die Mittelwerte der Antikörperspiegel aller Tests im Gruppenvergleich

Test	Mittelwerte [$\log D_{50}$]			Signifikanz- grade
	Fohlen (n=20)	COB-Patienten (n=53)	Rennpferde (n=24)	
EHV1-NT (BALF)	- 0,1 (n=20 k.N.)	1,1	2,2	a = h.s. b = h.s. c = h.s.
EHV1-NT (Serum)	1,2 (n=8 k.N.)	2,4	3,3	a = h.s. b = h.s. c = h.s.
EHV1-IF (BALF)	1,3	1,5	2,5	a = n.s. b = s.s. c = h.s.
EHV1-IF (Serum)	1,6	3,1	3,7	a = h.s. b = h.s. c = h.s.
EHV4-NT (BALF)	1,8 (n=7 k.N.)	1,2 (n=7 k.N.)	2,1	a = n.s. b = s.s. c = h.s.
EHV4-NT (Serum)	2,4 (n=1 k.N.)	2,6	2,9	a = s.s. b = h.s. c = n.s.
EHV4-IF (BALF)	2,4	2,6	2,9	a = n.s. b = n.s. c = h.s.
EHV4-IF (Serum)	2,8	3,1	3,4	a = h.s. b = h.s. c = h.s.

a = Signifikanz zwischen Fohlen und COB-Patienten

b = Signifikanz zwischen Fohlen und Rennpferden

c = Signifikanz zwischen COB-Patienten und Rennpferden

k.N. = kein Nachweis

Infolge der Kolostrumaufnahme kommt es zunächst beim Neugeborenen zur Behinderung der Bildung eigener Antikörper infolge eines negativen Feedback-Mechanismus der passiv übertragenen maternalen Antikörper (Hoffmann et Wagner 1990). Bis zur sechsten oder siebten Lebenswoche werden diese passiv erworbenen Antikörper in der Regel wieder abgebaut (Verter et al. 1999), so dass ihr Einfluss hier

ausgeschlossen werden kann. Eine eigene, voll belastbare Immunität ist allerdings erst mit dem sechsten bis achten Lebensmonat ausgebildet (Verter et al. 1999). Da alle Fohlen ein Alter von etwa sechs Monaten aufwiesen, befanden sie sich damit exakt in dieser Zeitspanne. Demzufolge wiesen sie zwar eine gewisse Immunkompetenz auf, diese könnte aber ihre volle Leistungsfähigkeit noch nicht erreicht bzw. individuell verschieden weit ausgereift sein. Desweiteren muss berücksichtigt werden, dass die beiden verschiedenen Virusspezies als unterschiedliche Antigene auf dieses eventuell noch nicht vollständig ausgereifte Immunsystem wirken. So könnte ein Antigen früher durch das juvenile Abwehrsystem erkannt werden als ein geringgradig anders strukturiertes (Hoffmann et Wagner 1990).

Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in einem erfolgten Viruskontakt mit EHV4. Etwa 14 bis 21 Tage nach erfolgter Infektion setzt die humorale Immunität ein, wobei die Antikörper im Serum etwa in der vierten Woche nach Infektionsbeginn einen Höhepunkt erreichen, durchaus aber auch bis etwa in den fünften oder sechsten Monat post infectionem persistieren können (Verter et al. 1999). Dieser EHV4-Infektion könnte sowohl zusätzlich ein EHV1-Kontakt gefolgt sein, so dass die niedrigeren Titer gegen EHV1 ihre Ursache in der zeitlich bedingten geringeren Antikörperproduktion haben. Eine wahrscheinlichere Erklärung für die niedrigen bzw. nicht nachweisbaren EHV1-Titer bei den Fohlen liegt aber auch in einer ausschließlichen EHV4-Infektion, bei der es zur Produktion von einigen kreuzreaktiven Immunglobulinen gegen EHV1 kam (Thein 1994, Brunner et al. 1998).

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Fohlen mit den Daten der anderen Gruppen zeigten sich die bei den Fohlen ermittelten Antikörperspiegel fast ausschließlich niedriger als die der COB-Patienten und Rennpferde (siehe Tab. 23). In Abbildung 11 auf Seite 69 wurde die typische Gruppenverteilung der Titerhöhen am Beispiel des Neutralisationstests dargestellt. Eine mögliche Ursache für die nachgewiesenen niedrigen Antikörperspiegel bei den Fohlen ist sicherlich darin zu sehen, dass bei keinem der Fohlen eine Impfung gegen EHV1 oder EHV4 erfolgte. Auch ist aufgrund des geringen Lebensalters die zeitliche Möglichkeit zum natürlichen Kontakt mit den

genannten Viren deutlich geringer als bei adulten Tieren. Einzige Ausnahme der generell niedrigeren Titer bei den Fohlen bilden die Ergebnisse des EHV4-NT aus der BALF. Hier zeigten sich die Titer der Fohlen höher als die der COB-Patienten. Auch dieses Ergebnis scheint den Verdacht einer in der Fohlenpopulation erfolgten Infektion mit EHV4 zu bestätigen.

Die Titer der Gruppe der COB-Patienten waren, mit Ausnahme der gerade erwähnten Antikörper gegen EHV4 in der BALF, also höher als bei der Gruppe der Fohlen (siehe Tab. 23). Da es sich bei allen Patienten um adulte Tiere handelte, kann Immunkompetenz vorausgesetzt werden. Desweiteren sind diese höheren Titer wahrscheinlich Folge einer deutlich größeren Anzahl von Viruskontakten zu EHV1 und EHV4 bei den zum Teil ungeimpften Tieren ($n = 28$) der Gruppe. Diese Infektionen führten bereits zu natürlich erworbener humoraler Immunität, deren Antikörper bis fünf oder sechs Monate post infectionem noch nachweisbar sein können (Verter et al. 1999). Der restliche Teil dieser Patienten wurde bereits über Jahre mehrfach geimpft ($n = 25$), so dass durch regelmäßige Wiederholungsimpfungen ein relativ hoher Titer erhalten wurde (Allen et Bryans 1986, Steinhagen 1986, Becker et Unger 1987, Babinski 1988, Bürki et al. 1989a, b, 1990, 1991a, b, Paweska et al. 1991). Die Impftiter werden im Kapitel 4.9 näher diskutiert.

Ein nochmals höherer Antikörperspiegel ließ sich bei der Gruppe der Rennpferde nachweisen (siehe Tab. 23). Die Erklärung könnte in den deutlich kürzeren Intervallen der Wiederholungsimpfungen bei den Rennpferden liegen, wie bereits in Kapitel 3.1.1 erwähnt. Diese führen durch den so genannten Booster-Effekt zu höheren Antikörperspiegeln, zusätzlich ist aber auch der Abstand zwischen letzter Impfung und Probenentnahme damit zum großen Teil kürzer als bei den COB-Patienten. Ein weiterer Aspekt könnte der durch das Einsatzgebiet der Rennpferde bedingte häufigere Kontakt zu fremden Pferden und potentiellen Virusreservoirs sein, in dessen Folge es ebenfalls zum Erhalt eines hohen Antikörperspiegels kommen kann.

4.8 Vergleich der Faktoren Rasse, COB-Grad, A-aDO₂-Wert innerhalb der Gruppe der COB-Patienten

Bereits Halliwell und Gorman (1989) haben festgestellt, dass Pferde aller Rassen von der COB betroffen sein können. In der vorliegenden Studie zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der Rassenzugehörigkeit, wie im Einzelnen in den jeweiligen Kapiteln des Ergebnisteiles aufgeführt. Hierbei sollte aber die teilweise geringe Größe der Rassengruppen mit 37 Warmblütern, 4 Vollblütern und 12 Ponys (siehe Kapitel 3.11) bedacht werden.

Die große ätiologische Bedeutung von virusbedingten Infektionen, insbesondere durch EHV1, EHV4 und den folgenden bakteriellen Sekundärinfektionen bei der Entstehung der COB wird bereits seit langem postuliert (Mahaffay 1962, Gerber 1968, Pick 1970, Kraft 1975, Schmidt et Primer 1975, Cook 1976, Eickmeier 1977, Littlejohn 1978, Robinson et Sorensen 1978, McPherson et al. 1979, Reif 1979, Allen 2002). Von weiterem Interesse ist nun die Frage, inwiefern die Herpesviren das klinische Erscheinungsbild im weiteren Verlauf der COB beeinflussen. Insbesondere die Eigenschaft der Latenz und Reaktivierbarkeit beider Herpesviruspezies könnte für eine Verschlechterung des Krankheitsbildes und somit für eine Erhöhung des COB-Grades verantwortlich sein (Edington et al. 1985, Browning et al. 1988, Gibson et al. 1992 a, Slater et al. 1994, Schrag et al. 1997). Hierbei konnte jedoch weder mit Hilfe der Betrachtung des COB-Grades noch des A-aDO₂-Wertes, als zusätzlicher Versuch der Einteilung des Schweregrades der COB, ein signifikanter Einfluss auf die Höhe der Antikörperspiegel beobachtet werden. Betrachtet man diesen als Maß für den Antigenkontakt mit EHV1 oder EHV4, so konnte keine Beeinflussung des Schweregrades der Erkrankung festgestellt werden – weder in Serum- noch in BALF-Proben. Die ätiologische Bedeutung von Infektionen mit EHV1 und EHV4 scheint sich somit also auf eine initiale Rolle zu beschränken.

4.9 Vergleich des Impfstatus innerhalb der Gruppe der COB-Patienten

Da das Herpesvirus praktisch nicht vollständig aus ganzen Herdenbeständen eliminiert werden kann, stellt eine prophylaktische Immunisierung neben präventiven Managementmaßnahmen die wohl beste Strategie zur Vermeidung der Infektionsfolgen dar (Thein 1994, Wilson 1995, Allen 2002, Rolle et Mayr 2002). Diese Vakzination kann zwar eine Infektion mit dem Virus nicht verhindern, verringert aber deutlich den wirtschaftlichen Schaden (Brunner et al. 1998), da die Intensität klinischer Symptome, sowie Menge und Dauer der Virusausscheidung verringert und somit die Ausbreitung reduziert wird (Allen 2002, Rolle et Mayr 2002). In der vorliegenden Arbeit stammte der Großteil der Impfanamnesen lediglich aus Angaben der Besitzer einzelner Pferde und letztere konnten nur selten mit Hilfe eines Impfausweises nachgeprüft werden. Somit muss davon ausgegangen werden, dass vermutlich in mehreren Fällen fehlende Impfungen als durchgeführt angegeben wurden. Hierin kann sicherlich, neben im Folgenden weiteren diskutierten Aspekten, die Ursache für das Ausbleiben signifikanter Unterschiede zwischen geimpften und nicht geimpften Patienten liegen.

Die nachgewiesenen Antikörpertiter zeigten zum überwiegenden Teil keine signifikanten Unterschiede zwischen geimpften und nicht geimpften COB-Patienten, wie aus der Zusammenfassung in Tabelle 24 ersichtlich. Die Aufstellung der einzelnen Testergebnisse finden sich in den Tabellen 13 auf Seite 74 (EHV1-NT), 16 auf Seite 83 (EHV1-IF), 19 auf Seite 92 (EHV4-NT) und 22 auf Seite 101 (EHV4-IF) des Ergebnisteils.

Tab. 24: Übersicht über die Mittelwerte (MW), Minimum (min), Maximum (max) und Signifikanzen der Antikörperspiegel aller Tests bezüglich des Impfstatus (gegen EHV1 und EHV4) innerhalb der COB-Patienten

Test	Material	Impfstatus	MW [log D ₅₀]	min [log D ₅₀]	max [log D ₅₀]	Signifikanz- grad
EHV1-NT	BALF	geimpft	1,1	-0,1	2,4	n.s.
	BALF	ungeimpft	1,1	-0,1	2,5	n.s.
	Serum	geimpft	2,9	1,4	3,3	n.s.
	Serum	ungeimpft	2,4	1,4	3,3	n.s.
EHV1-IF	BALF	geimpft	1,6	0,9	2,1	n.s.
	BALF	ungeimpft	1,4	0,8	2,4	n.s.
	Serum	geimpft	3,4	1,9	3,7	n.s.
	Serum	ungeimpft	2,8	2,2	4,0	n.s.
EHV4-NT	BALF	geimpft	1,3	-0,1	2,2	n.s.
	BALF	ungeimpft	1,2	-0,1	2,1	n.s.
	Serum	geimpft	2,9	2,4	3,3	n.s.
	Serum	ungeimpft	2,4	1,4	3,6	n.s.
EHV4-IF	BALF	geimpft	2,1	1,3	2,6	s.s.
	BALF	ungeimpft	1,7	1,1	2,5	s.s.
	Serum	geimpft	3,4	2,8	3,7	s.s.
	Serum	ungeimpft	3,1	1,9	3,7	s.s.

Zur Visualisation sei an dieser Stelle auf die grafischen Darstellungen im Ergebnisteil verwiesen (EHV1-NT: Seite 75, EHV1-IF: Seite 84, EHV4-NT: Seite 93, EHV4-IF: Seite 102). Ursächlich für die ähnlich hohen Titer bei geimpften und ungeimpften COB-Patienten könnte ein relativ niedriger Antikörpertiter trotz Impfung sein, wie häufig berichtet wird (Allen et Bryans 1986, Steinhagen 1986, Becker et Unger 1987, Babinski 1988, Bürki et al. 1989a, b, 1990, 1991a, b, Paweska et al. 1991). Im Falle der laut Anamnese ungeimpften Pferde kommt eine natürlich erworbene Immunität gegen die ubiquitär vorkommenden Viren EHV1 und EHV4 (Reif 1979, Allen 2002) in Betracht, die also zu mit der Impfung vergleichbar hohen Titern führt.

Die einzige Ausnahme, mit ausschließlich schwach signifikant höheren Titern bei den geimpften Tieren im Vergleich zu den ungeimpften, stellt der Nachweis von Antikörpern gegen EHV4 mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests, sowohl in Serum- als auch in BALF-Proben, dar. Während die maximalen Titer bei ungeimpften und geimpften Tieren gleiche Höhen erreichen, zeigen sich sowohl der Mittelwert als auch die niedrigsten Antikörperspiegel bei den ungeimpften Patienten mit deutlich kleineren Werten. Als mögliche Erklärung könnte es zu einem weniger häufigen Antigenkontakt der Tiere mit somit geringeren Titern gekommen sein. Ebenfalls könnte es aber auch in Folge einer natürlichen Infektion aufgrund geringerer Antigenmenge zur Ausbildung niedrigerer Titer als nach einer Impfung kommen (Thein 1878, Steinhagen 1986). Die natürlichen Viruskontakte könnten allerdings durchaus auch zu ähnlich hohen Antikörperspiegeln führen und nur bereits länger zurückliegen als die erfolgten Impfungen. Desweiteren ist auch bei den geimpften Pferden selbstverständlich ein Viruskontakt nicht ausgeschlossen, so dass es hier zu einem natürlichen Booster-Effekt auf den bereits hohen Titer infolge der Impfung kommen konnte. Da die schwach signifikant höheren Impftiter nur mittels indirektem Immunfluoreszenztest nachgewiesen wurden, muss ebenfalls die Produktion nicht neutralisierender Antikörper nach einer Impfung in Betracht gezogen werden.

Auch bei den Ergebnissen der anderen Tests zeigen sich, wenn auch statistisch nicht signifikant, die Mittelwerte und das Minimum der ungeimpften Tiere meist etwas niedriger als bei den geimpften. Einzige Ausnahme hiervon bilden die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Antikörpern gegen EHV1 mittels IF im Serum. Diese zeigen höhere Spiegel bei den ungeimpften Tieren an. Auch hier könnte es sich um nicht neutralisierende Antikörper handeln, die deshalb mit Hilfe des NT nicht nachgewiesen werden konnten. Es könnte auch relativ kurz vor den Probenentnahmen zu Infektionen der einzelnen Patienten mit EHV1 gekommen sein oder der Impftiter in seiner Höhe nicht stark vom natürlich erworbenen abweichen.

Auch bei den statistisch nicht signifikanten Ergebnissen zeigt sich die Tendenz des möglichen Schutzes zumindest einiger ungeimpfter Tiere mit Titern im unteren Bereich durch eine Impfung. Da durch den Antikörperschutz nicht nur die einzelnen Tiere, sondern durch Verringerung der Menge und Dauer der Virusausscheidung

(Allen 2002, Rolle et Mayr 2002) auch die anderen Tiere des Bestandes geringeren Erkrankungsrisiken ausgesetzt sind, ist die Notwendigkeit der Impfung zur Verringerung der Ausbreitung unbestritten. Desweiteren muss bedacht werden, dass den natürlich erworbenen Antikörperspiegeln der ungeimpften Pferde in jedem Fall ein natürlicher Viruskontakt mit folgender Infektion vorangegangen ist. Diese Infektion ohne vorherigen Impfschutz birgt selbstverständlich neben der Ausbreitung der Infektion auch die Gefahr von höhergradig ausgeprägten klinischen Infektionsverläufen, die vermeidbaren wirtschaftlichen Schaden und individuelles Leid zur Folge haben können.

4.10 Zusammenhang zwischen BALF und Serum

Bei Betrachtung der Titerhöhen finden sich im Serum regelmäßig höhere Werte als in der BALF. Desweiteren zeigen die Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten (r_s) für den Zusammenhang der Antikörpertiter in Serum und BALF gegen EHV1 eine deutliche Korrelation mit einem Faktor von 0,80 (NT) bzw. von 0,64 (IF). Eine nahe liegende Erklärung scheint die Annahme eines Bildungsortes der Antikörper außerhalb der Lunge mit folgendem Transport der Immunglobuline über das Blut in die Lunge zu sein. Desweiteren müssen bei der vorliegenden Arbeit Verfälschungen der BALF durch bei der Probenentnahme eingebrachte systemische Antikörper aus dem Blut kleinerer Verletzungen in Betracht gezogen werden. So wurden zwar alle makroskopisch mit Blutbeimengungen verunreinigten Lavageflüssigkeiten nicht in die Untersuchung mit eingeschlossen, eine mikroskopische Beimengung von Blut und somit auch von darin zirkulierenden Immunglobulinen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Demgegenüber stehen jedoch die Ergebnisse der anderen untersuchten Herpesviruspezies EHV4. Hier zeigen sich Zusammenhänge der Titer in beiden Probenmaterialien unabhängig voneinander mit einer Rangkorrelation von 0,39 in NT und IF. Aufgrund dieser niedrigen Korrelation liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den in der BALF gegen EHV4 nachgewiesenen Antikörpern um lokal produzierte handelt, wie bereits seit Längerem von mehreren Autoren theoretisch in Betracht gezogen wird (McGuire et Crawford 1972, Widders et al. 1984, Mair et al. 1987,

1988). Diese lokale Antikörperproduktion lässt sich auch logisch mit der meist auf den Respirationstrakt beschränkten Infektion durch EHV4 begründen. Dagegen erfolgt in der Regel nur durch EHV1 eine Infektion mononukleärer Leukozyten, infolge derer es neben der Bildung von lokalen Antikörpern meist auch zur Ausbildung systemischer Immunglobuline kommt (Gibson et al. 1992a, Rolle et Mayr 2002). Theoretisch könnte der Ursprung der Antikörper gegen EHV4 im Einzelfall auch einmal systemisch zu suchen sein. Ein Transport aus dem Serum in die Lunge wäre somit durchaus bei beiden Virusspezies denkbar. Der Unterschied zwischen den Antikörpern gegen EHV1 und EHV4 könnte in diesem Falle durch einen selektiven Transport aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften der Virusspezies erklärbar sein (Mair et al. 1988).

Unabhängig vom tatsächlichen Bildungsort der Antikörper könnten die sowohl bei EHV1 als auch bei EHV4 nachgewiesenen höheren Serum- als BALF-Titer ähnliche Ursachen haben. Im Falle der geimpften Tiere kann davon ausgegangen werden, dass es im Anschluss an die intramuskulär durchgeführte Impfung zunächst zu einer Bildung von Antikörpern außerhalb der Lunge kommt. In diesem Falle müsste sich zumindest zunächst der Titer im Serum höher als in der BALF zeigen. Bei einem späteren Transport dieser Globuline in die Lunge bzw. einer lokal in der Lunge einsetzenden, evtl. auch langsamer ablaufenden Antikörperproduktion müssen aber noch andere Mechanismen die Unterschiede der Titerhöhen bedingen. So könnte es in der Lunge durch Faktoren wie die lokale Sekretion zur Verdünnung der Antikörperkonzentration aus dem Serum kommen. Im Falle von an COB erkrankten Patienten kommt es, wie in Kapitel 2.1.3 bereits beschrieben, zu histologischen Veränderungen am Epithel des Respirationstraktes. Infolge dieser veränderten Epithelzusammensetzung erfolgt die Produktion größerer Mengen Bronchialsekretes mit stärkerer Viskosität, der sogenannten Hyper- und Dyskrinie (Turgut et Sasse 1989, Kaup et al. 1990, Deegen 1992, Dixon 1992). Hierin könnte neben den bereits erwähnten Aspekten ein weiterer Erklärungsansatz für die Unterschiede in der Höhe der Antikörperspiegel zwischen den COB-Patienten und den Rennpferden bestehen.

Zu einer weiteren Abklärung des Bildungsortes der Antikörper wäre sicherlich zusätzlich eine Klassifizierung der nachgewiesenen Immunglobuline von Interesse

gewesen. So finden sich im Bereich der Lunge überwiegend Antikörper der Klasse Immunglobulin (Ig) G, IgA und minimale Mengen an IgM (Mair et al. 1987, Winder et Fellenberg 1986). Dieses Vorkommen freier Immunglobuline spiegelt die histologisch nachgewiesene Verteilung von Plasmazellen, die spezifisch die jeweiligen Antikörperklassen produzieren, wieder (Mair et al. 1988), so dass auch im vorliegenden Fall davon ausgegangen werden kann, dass es sich um eine zumindest zusätzliche lokale Produktion handelt.

4.11 Schlussfolgerungen

- Mit beiden hier beschriebenen Methoden ist der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen EHV1 und EHV4 sowohl in BALF als auch in Seren möglich.
- Das indirekte Immunfluoreszenz-Verfahren ermittelte höhere Antikörper-Titer als der Neutralisationstest.
- Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Antikörper-Spiegel und dem Schweregrad der COB konnte nicht nachgewiesen werden.
- Ein Unterschied in der Höhe der Antikörpertiter aufgrund erfolgter Impfung konnte nicht nachgewiesen werden.
- Ein Zusammenhang der Serum- mit der BALF-Antikörpertiterhöhe ließ sich für EHV1 mit $r_s = 0,80$ (NT) bzw. $r_s = 0,64$ (IF) nachweisen, betrug für EHV4 aber lediglich $r_s = 0,39$ (NT und IF).

5. Zusammenfassung

Chronische Atemwegserkrankungen stellen bei der Stallhaltung von Pferden ein großes Problem dar. Von Bedeutung ist hier insbesondere die chronisch obstruktive Bronchitis (COB), die mit mehr als 20% eine der Hauptursachen equiner Morbidität darstellt. Trotz dieser großen Bedeutung ist auch heute die Ätiologie der Erkrankung noch nicht aufgedeckt.

Schon früh wurde jedoch der Stellenwert der virusbedingten Infektion im Entstehungsprozess der COB beschrieben, da diese, gefolgt von bakteriellen Sekundärinfektionen, häufig am Anfang der Erkrankung stehen. Eine große Bedeutung scheinen hierbei die ubiquitär vorkommenden Equinen Herpesviren 1 (EHV1) und 4 (EHV4) zu besitzen.

Ziel der hier vorgelegten Untersuchungen war es, spezifisch gegen EHV1 und EHV4 gerichtete Antikörper in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) nachzuweisen, ihren Bezug zu den entsprechenden im Serum gemessenen Antikörpertitern festzustellen, sowie eventuelle Korrelationen zwischen diesen Antikörperspiegeln und dem klinischen Erscheinungsbild und/oder dem Impfstatus aufzudecken. Hierzu wurden drei verschiedene Gruppen von Pferden untersucht: 53 Patienten der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, bei denen die Diagnose COB gestellt wurde, 20 Fohlen im Alter von etwa sechs Monaten sowie 24 gegen EHV1 und EHV4 geimpfte Rennpferde. Zur Klärung kamen zwei Verfahren zum Einsatz: der Neutralisationstest (NT) und der indirekte Immunfluoreszenztest (IF).

Mit beiden Testverfahren war der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen EHV1 und EHV4 sowohl in BALF als auch in Seren prinzipiell möglich. Generell ermittelte der IF höhere Antikörper-Titer als der NT. Dabei gelang der Nachweis mittels IF in 100% der Proben. Bei adulten Tieren (n= 77) war der Nachweis mit Hilfe des NT im Serum ebenfalls zu 100% möglich. In der BALF ist dies in 97% (gegen EHV1) bzw. in 91% (gegen EHV4) der Proben gelungen. Bei der Gruppe der nicht geimpften Fohlen konnten mittels NT in den Seren in 95% (gegen EHV4) bzw. in

60% (gegen EHV1) der Proben Antikörpertiter ermittelt werden. Aus der BALF gelang dies in der Fohlengruppe nur in 60% gegen EHV4, in keinem Fall gegen EHV1. Dabei konnte mit keinem der beiden Verfahren ein Zusammenhang zwischen Höhe der Antikörper-Spiegel und dem Schweregrad der COB im Falle der Klinikpatienten nachgewiesen werden, sodass die ätiologische Bedeutung von Infektionen mit EHV1 und EHV4 auf eine initiale Rolle beschränkt zu sein scheint.

Eine Korrelation der Serum- mit der BALF-Antikörpertiterhöhe ließ sich für EHV1 mit einem Rangkorrelationskoeffizienten (r_s) von $r_s = 0,80$ (NT) bzw. $r_s = 0,64$ (IF) nachweisen, sodass ein Transport systemischer Antikörper in die Lunge in Betracht kommt. Für EHV4 betrug der Zusammenhang lediglich $r_s = 0,39$ (NT und IF). Es scheint hier eine lokale Produktion von Antikörpern in der Lunge gegen diese Virusspezies vorzuliegen.

Bei den 53 COB-Patienten wurden die ermittelten Antikörpertiter zusätzlich auf ihren Zusammenhang mit dem Impfstatus der Tiere überprüft. Hierbei zeigten sich fast ausschließlich nicht signifikante Unterschiede zwischen den gegen EHV1 und EHV4 geimpften ($n = 25$) und den nicht geimpften ($n = 28$) Patienten. Lediglich im Falle der Untersuchung auf Antikörper gegen EHV4 mittels IF zeigten sich die Titer der geimpften Pferde schwach signifikant höher als die der ungeimpften. Dies deutet auf Induktion nicht neutralisierender Antikörper durch die Impfung hin, da diese allein vom IF erfasst werden. Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass der Großteil der Impfanamnesen lediglich auf Angaben der Besitzer beruht und nur selten mit Hilfe von Impfausweisen nachgeprüft werden konnte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass vereinzelt fehlende oder bereits länger zurückliegende Impfungen als durchgeführt angegeben wurden. Hierin kann sicherlich die Ursache für das Ausbleiben signifikanter Unterschiede zwischen geimpften und nicht geimpften Patienten liegen. Desweiteren könnten hohe Titer bei den ungeimpften Patienten infolge natürlicher Infektionen auftreten.

6. Summary

Chronic airway disorders in stabled horses are recognised as a serious health problem for a long time. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in equine medicine, nowadays also known as recurrent airway obstruction (RAO), causes more than 20% of all cases of equine morbidity. However, despite the high case load, the etiology of this disease is still not clarified.

It has been hypothesized since a long time, that viral infections of the respiratory tract, followed by secondary bacterial infections, may initiate the chronic airway disease in the horse. Ubiquitous viruses like equine herpes virus 1 (EHV1) and 4 (EHV4) are considered to be especially important in this context.

The first aim of this study was to demonstrate specific antibodies against EHV1 and EHV4 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of horses suffering from COPD. Further evaluations concerning correlations of antibody-titers between BALF and serum, antibody levels and clinical grade respectively vaccination status followed. 3 different groups of horses were examined: 53 patients of the Medical and Forensic Clinic of the Justus-Liebig-University Giessen, which were diagnosed as suffering from COPD; 20 non vaccinated foals, aged about 6 months and 24 against EHV1 and EHV4 vaccinated racing thoroughbreds. To measure antibody titers, two different methods were used: the neutralisation test (NT) and the indirect immunofluorescence test (IF).

Both methods detected specific antibodies against EHV1 and EHV4 in BALF as well as in serum samples. In general, the IF determined higher antibody titers than the NT. Using IF, antibodies against both virus species were shown in all BALF and serum samples. By using NT, antibody titers were detectable in sera of all adult horses (n=77) too. In BALF, 97% showed specific antibodies against EHV1, and in 91% of all adult BALF samples, antibodies against EHV4 were detectable concurrently by NT. A correlation of clinical importance between the level of antibodies and the severity of COPD could not be proven with either test method. In conclusion, an etiological importance of infections with EHV1 and EHV4 for the

development of COPD in the horse seems to be of minor importance or limited to an initial role only.

Looking at the unvaccinated foals (n=20), 95% of the serum samples were positive for antibodies against EHV4. In 60% of the foal sera, antibodies against EHV1 were found. Testing BALF, 60% of the foals showed antibody titers against EHV4, but in none of the youngsters, antibodies against EHV1 were detectable.

Between serum and BALF antibody titers against EHV1, correlation coefficients (Spearman rank) of $r_s = 0.80$ (NT) and $r_s = 0.64$ (IF) were calculated. Possibly, this is due to a transport of systemic antibodies from the blood into the lungs. However, the correlation coefficient for EHV4 between BALF and serum was only 0.39 (NT and IF). The disproportion in these coefficients leads to the hypothesis, that a local production of antibodies against EHV4 takes place in the lungs.

Within the 53 COPD horses, antibody titers were evaluated for their relationship to the status of vaccination. There were no significant differences between antibody titers in vaccinated (n = 25) versus non vaccinated (n = 28) horses. Statistically, slightly significant higher levels of antibodies in vaccinated horses were only detected against EHV4 by using IF. Probably, this difference was caused by non neutralizing antibodies, which are detected by IF additionally.

However, low antibody titers in spite of vaccination may result from owner information. Presumably, some patient owners have mentioned vaccinations, which were not accomplished at all or took place before the time of interest - vaccination documents were rarely available. On the other hand, relatively high titers due to natural infections within the unvaccinated horses could have biased the results too.

7. Literaturverzeichnis

ALEXANDER, A.F. (1959)

Chronic alveolar emphysema in the horse

Am. Rev. Respir. Dis. 80, 141-146

ALLEN, G.P., TURTINEN, L.W. (1982)

Assessment of the base sequence homology between the two subtypes of equine herpesvirus 1

J. Virol. 44, 249-255

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, 263-271

ALLEN, G.P., BRYANS, J.T. (1986)

Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections

In: Prog. Vet. Microb. Immun. 2, Karger Verlag, Basel, 78-144

ALLEN, G.P. (2002)

Respiratory infections by equine herpesvirus types 1 and 4

In: Equine Respiratory Diseases, Hrsg. P. Lekeux, International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA

ARMSTRONG, P.R., DERKSEN, F.J., SLOCOMBE, R.F., ROBINSON, N.E. (1986)

Airway responses to aerosolized metacholine and citric acid in ponies with recurrent airway obstruction (heaves)

Am. Rev. Resp. Dis. 133, 357-361

BABINSKI, J. (1988)

Abortions in mares vaccinated with the „Resequin F“ vaccine against equine rhinopneumonitis

Medyc. Wet. 44, 622

BACHMANN, P.A., HÄRTEL, G., THEIN, P., BIBRACK, B., MAYR, A. (1972)

Über das Vorkommen und die Verbreitung von Virusarten beim Pferd in der Bundesrepublik Deutschland, die bei respiratorischen Erkrankungen mitbeteiligt sein können

Zentralbib. Vet. Med. B 19 (10), 801-813

BAGUST, T.J. (1971)

The equine herpesviruses

Vet. Bulletin 41, 79-92

- BALLAGI-PORDANY, A., KLINGEBORN, B., FLENSBURG, J., BELAK, S. (1990)
Equine herpesvirus type 1: Detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction
Vet. Microb. 22, 373-381
- BECKER, W., UNGER, G. (1987)
Blutserologische Überwachung des Impferfolges nach wiederholter Anwendung von Resequin® im Hessischen Landgestüt Dillenburg
Tierärztl. Umschau 42, 223-228
- BEECH, J. (1989a)
Diagnosing COPD
Vet. Med., June, 614-619
- BEECH, J. (1989b)
Managing horses with COPD
Vet. Med., June, 620-624
- BEECH, J. (1991)
Chronic obstructive pulmonary disease
Vet. Clin. North Am.: Equ. Practice 7, 79-91
- BERNHARDT, D. (1993)
In-vitro-Testung von equinen Herpesviren (EHV 1 und 4)
Tierärztl. Umschau 48, 67-72
- BLUNDEN, A.S., SMITH, K.C., BINNS, M.M., ZHANG, L., GOWER, S.M., MUMFORD, J.A. (1995)
Replication of equid herpesvirus 4 in endothelial cells and synovia of a field case of viral pneumonia and synovitis in a foal
J. Comp. Pathol. 112, 133-140
- BRACHER, V., VON FELLEBERG, R., WINDER, C.N., GRUENIG, G., HERMANN, M. (1991)
An investigation of the incidence of chronic obstructive disease (COPD) in random populations of Swiss horses
Equine Vet. J. 23, 136-141
- BREEZE, R.G., WHEELDON, E.B., PIRIE, H.M. (1976)
Cell structure and function in the mammalian lung: the trachea, bronchi and bronchioles
Vet. Bull. 46, 319-337
- BROWNING, G.H., BULACH, D.M., FICORILLI, N., ROY, E.A., THORB, B.H., STUDDERT, M.J. (1988)
Latency of equine herpesvirus 4 (equine rhinopneumonitis virus)
Vet. Rec. 123, 518-519

BRUNNER, R., NEUBAUER, A., EICHHORN, W. (1998)
Equine Herpesvirus-Infektionen
Tierärztliche Umschau 12, 708-712

BRYANS, J.T. (1980)
Herpesviral disease affecting reproduction in the horse
Vet. Clin. North Am.: Large Anim. Pract. 2, 303-312

BRYANS, J.T., ALLEN, G.P. (1986)
Control of abortigenic herpesviral infections
Curr. Ther. Theriogenol. 2, 711-714

BRYANS, J.T., ALLEN, G.P. (1989)
Herpesviral diseases of the horse.
In: Herpesviral diseases of cattle, horses and pigs, Hrsg. G. Wittmann, Kluwer Academic Publishers, Boston, 176-229

BÜRKI, F., NOWOTNY, N., HINAIDY, B., PALLAN, C. (1984)
Die Ätiologie der Lipizzanerseuche in Piber 1983: Equines Herpesvirus 1
Wiener Tierärztl. Mschr. 71, 312-320

BÜRKI, F., NOWOTNY, N., ROSSMANITH, W., PALLAN, C., MÖSTL, K. (1989a)
Training the immune system of foals against equine rhinopneumonitis infection by frequent inoculation of commercially available vaccines
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 96, 162-165

BÜRKI, F., PALLAN, C., NOWOTNY, N. (1989b)
Unbefriedigende Antikörperbildung nach Österreich zugekaufter Lipizzaner-Stuten anlässlich ihrer Grundimmunisierung mit ERP-Markerimpfstoffen
Wien. Tierärztl. Mschr. 76, 137-142

BÜRKI, F., ROSSMANITH, W., NOWOTNY, N., PALLAN, C., MÖSTL, K., LUSSY, H. (1990)
Viraemia and abortions are not prevented by two commercial Equine Herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horses
Vet. Quarterly 12, 80-86

BÜRKI, F., NOWOTNY, N., HOFER, A. (1991a)
Jahresantikörperprofile von Pferdegruppen eines isoliert gehaltenen Bestandes nach unterschiedlich terminierter Anwendung eines Kombinationsimpfstoffes
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 98, 77-116

BÜRKI, F., NOWOTNY, N., OULEHLA, J., SCHMEHLIK, O., MÖSTL, K., PALLAN, C., ROSSMANITH, W. (1991b)
Attempts to immunoprotect adult horses, specifically pregnant mares with commercial vaccines against clinical disease induced by equine herpesvirus 1
J. Vet. Med. 38, 432-440

BÜRKI, F. (1993)

Der „Wiener Impfplan 1991“ für Zucht- und Reitpferde
Tierärztl. Umschau 48, 3-10

BURNS, D.M., SHURE, D., FRANCOZ, R., KALAFER, M., HARRELL, J., WITZTUM, K., MOSER, K.M. (1983)

The physiologic consequences of saline lobar lavage in healthy human adults
Am. Rev. Resp. Dis. 127, 695-701

BURROWS, R., GOODRIDGE, D. (1973)

In vivo and in vitro studies of equine rhinopneumonitis virus strains
Equine Inf. Dis. 3, 306-321

BURROWS, R., GOODRIDGE, D. (1984)

Studies of persistent and latent equine herpesvirus 1 and herpesvirus 3 infections in the Pirbright pony herd

In: Latent herpesvirus infections in veterinary medicine, Hrsg. Wittmann, Nijhoff, Boston, 307-319

CHOWDHURY, S.I., LUDWIG, H., BUHK, H.J. (1988)

Molecular biological characterization of equine herpesvirus type1 (EHV 1) isolates from ruminant hosts

Virus Res. 11, 127-139

CLARK, C.K., LESTER, G.D., VETRO, T., RICE, B. (1995)

Bronchoalveolar lavage in horses: effect of exercise and repeated sampling on cytology

Aust. Vet. J. 72, 249-252

CLARKE, A.F., MADELIN, T. (1987)

Technique for assessing respiratory health hazards from hay and other source materials

Equine Vet. J. 19, 442-44

CLARKE, A.F., MADELIN, T., ALPRESS, R.G. (1987)

The relationship of air hygiene in stables to lower airway disease and pharyngeal lymphoid hyperplasia in two groups of thoroughbred horses

Equine Vet. J. 19, 524-530

CLARKE, A.F. (1993)

Stable dust – threshold limiting values, exposures variables and host risk factors

Equine Vet. J. 25, 172-174

CLARKE, A.F. (1994)

Stables

In: Livestock housing, Hrsg. C.M. Wathes, 379-403

COOK, W.R., ROSSDALE, P.D. (1963)

The syndrome of „broken wind“ in the horse

Proc. R. Soc. Med. 56, 972-977

- COOK, W.R. (1976)
Chronic bronchitis and alveolar emphysema in the horse
Vet. Rec. 99, 448-451
- CRANDELL, R.A., ICHIMURA, H., KIT, S. (1988)
Isolation and comparative restriction endonuclease DNA fingerprinting of equine herpesvirus-1 from cattle
Am. J. Vet. Res. 49, 1807-1813
- CRICHLLOW, E.C., YOSHIDA, K., WALLACE, K. (1980)
Dust levels in a riding stable
Equine Vet. J. 12, 185-188
- CRYSTAL, R.G., REYNOLDS, H.Y., KALICA, A.R. (1986)
Bronchoalveolar lavage: The report of an international conference
Chest 90, 122-131
- DANKMEYER, H. (1902)
Studien und Betrachtungen über Bronchitis und Dämpfigkeit der Pferde
Diss. Med. Vet., Bern
- DEEGEN, E., MÜLLER, P. (1983)
Die Bedeutung „air trapping“ bei Pferden mit chronisch-obstruktiver Bronchitis
Tierärztl. Praxis 11, 77-84
- DEEGEN, E., DROMMER, W., KLEIN, H.J., KAUP, F.J. (1987)
Zur Pathogenese der chronisch obstruktiven Bronchitis beim Pferd: Klinische und funktionelle Parameter sowie licht- und elektronenmikroskopische Befunde
17. Kongress der DVG, Bad Nauheim, 242-255
- DEEGEN, E., KLEIN, H.-J. (1987)
Interpleuraldruckmessungen und Bronchospasmodolysetests mit einem transportablen Ösophagusdruckmessgerät beim Pferd
Pferdeheilkunde 3, 213-221
- DEEGEN, E. (1992)
Entwicklung der Therapie obstruktiver Atemwegserkrankungen des Pferdes in den letzten 20 Jahren
Ventipulmin 2000, Symposium, Bingen, 1-15
- DELACROIX, D.L., MARCHANDISE, F.X., FRANCIS, C. (1985)
Alpha-2-macroglobulin, monomeric and polymeric immunoglobulin A and immunoglobulin M in bronchoalveolar lavage
Am. Rev. Respir. Dis. 132(4), 829-835
- DEL PIERO, F., WILKINS, P.A. (2001)
Pulmonary vasculotropic EHV-1 infection in equids
Vet. Pathol. 38, 474-475

- DENAC-SIKIRIC, M. (1970)
 Untersuchung der Dehnbarkeit (Compliance) des Lungengewebes bei gesunden und emphysemkranken Pferden
 Schweiz. Veterinärmed. Reihe A 15, 494-498
- DERKSEN, F.J., ROBINSON, N.E., ARMSTRONG, P.J., STICK, J.A., SLOCOMBE, R.F. (1985a)
 Airway reactivity in ponies with recurrent airway obstruction (heaves)
 J. Appl. Physiol. 58, 598-604
- DERKSEN, F.J., SCOTT, J.S., MILLER, D.C., SLOCOMBE, R.F., ROBINSON, N.E. (1985b)
 Broncho-alveolar lavage in ponies with recurrent airway obstruction (heaves)
 Am. Rev. Resp. Dis. 132, 1066-1070
- DERKSEN, F.J. (1993)
 COPD (heaves) as an inflammatory condition
 Equine Vet. J. 25, 257-258
- DICKMANN, M.P. (1987)
 Zur Wirksamkeit von Ambroxolhydrochlorid (Mucovent) bei lungenkranken Pferden. Klinische, funktionelle und zytologische Untersuchungen
 Diss. Med. Vet., Hannover
- DIECKERHOFF, W. (1884)
 Die Lungenemphyseme und ihr Verhältnis zur Dämpfigkeit des Pferdes
 Wochenschr. Tierheilkd. Viehzucht 1884, 357-381
- DIXON, P.M. (1992)
 Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease and its pharmaceutical modification
 Vet. Rec. 131, 229-235
- DIXON, P.M., RAILTON, D.I., MCGORUM, B.C. (1995)
 Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 1: Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses
 Equine Vet. J. 27, 416-421
- DIXON, R.J., HARTLEY, W.J., HUTCHINS, R.D. (1978)
 Perinatal foal mortality associated with a herpesvirus
 Aust. Vet. J. 54, 103-105
- DIXON, W.J. (1993)
 BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2.
 University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
- DOERR, H.W., BRAUN, R.W. (2002)
 Virologische Labordiagnostik
 In: Medizinische Virologie, Thieme-Verlag, Doerr, H.W., Gerlich, W.H. (Hrsg.), 71-92

- DROMMER, W., KAUP, F.J. (1984)
Morphologische Reaktionen der Lunge auf inhalierte Substanzen
DVG-Tagungsbericht: Dust in animal houses
Symposium der Int. Society of Animal Hygiene, Hannover, 120-125
- EDINGTON, N., BRIDGES, C.G., HUCKLE, A. (1985)
Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV1) following the administration of corticosteroids
Equine Vet. J. 17, 369-372
- EDINGTON, N., BRIDGES, C.G., PATEL, J.R. (1986)
Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused bei Equid Herpesvirus-1: equine stroke
Arch. Virol. 90, 11-124
- EDINGTON, N., BRIDGES, C.G., BROED, S.C. (1987)
Rapid diagnosis and characterization of equid herpesvirus 1 using monoclonal antibodies
Tierärztl. Prax. Suppl. 2, 37-40
- EDINGTON, N. (1991)
Latency of equine herpesviruses
Equine infectious diseases VI, 195-200
- EDINGTON, N., WELCH, H.M., GRIFFITHS, L. (1994)
The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abbatoir horses
Equine Vet. J. 26, 140-142
- EHRMANN, J.C. (1780)
Praktische Versuchung in dem Dampf der Pferde
Diss. Med. Vet., Frankfurt a.M.
- EISENSMITH, S.P. (1993)
PlotIT for Windows
Scientific Programming Enterprises, Haslett, MI 48840 USA
- EYRE, P. (1972)
Equine pulmonary emphysema: a bronchopulmonary mould allergy
Vet. Rec. 91, 134-140
- FAIRBAIRN, S.M., LEES, P., PAGE, C.P., CUNNINGHAM, F.M. (1993)
Duration of antigen induced hyperresponsiveness in horses with allergic respiratory disease and possible links with early airway obstruction
J. Vet. Pharm. Ther. 16, 469-476
- FALKE, D. (1999a)
Herpes-Gruppe
In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer-Verlag, Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann (Hrsg.), 629-655

- FALKE, D. (1999b)
 Labormethoden der Virologie
 In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer-Verlag, Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann (Hrsg.), 518-528
- FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., CHANACK, R.M., MONATH, T.P., MELNICK, J.L., ROIZMAN, B., STRAUS, S.E. (2002)
 Fields Virology
 Lippincott Williams & Wilkins Publishers
- FITZER, H. (1972)
 Untersuchungen über das Vorkommen von Serumantikörpern gegen Influenza-, Rhinopneumonitis-, Rhino- und Parainfluenza-3-Virus bei Pferden
 Diss. Med. Vet., München
- FITZPATRICK, D.R., STUDDERT, M.J. (1984)
 Immunologic relationship between equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus)
 Am. J. Vet. Res. 45, 1947-1952
- FOGARTY, U. (1990)
 A bronchoalveolar lavage technique for routine diagnostic purposes
 Equine Vet. Educ. 2, 102-104
- FRANK, C. (1989)
 Equine herpesvirus outbreaks
 Vet. Rec. 29, 471
- FRANK, W., LODDENKEMPER, R. (1995)
 Moderne Untersuchungsverfahren in der Pneumologie
 Versicherungsmedizin 47, 191-200
- GÄRTNER, B., MÜLLER-LANTZSCH, N. (2002)
 Herpesviren: allgemein
 In: Medizinische Virologie, Thieme-Verlag, Doerr, H.W., Gerlich, W.H. (Hrsg.), 370-372
- GEISEL, O., SANDERSLEBEN, J. VON (1987)
 Pathomorphologie der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung beim Pferd
 Tierärztl. Prax. Suppl. 2, 52-56
- GERBER, H. (1968)
 Zur Therapie chronischer Respirationskrankheiten des Pferdes
 Schweiz. Arch. Tierheilkd. 110, 139-153
- GIBSON, J.S., NEILL, T.O., THRACKRAY, A., HANNANT, D., FIELD, H.J. (1992a)
 Serological responses of specific pathogen-free foals to equine herpesvirus-1: primary and secondary infection and reactivation
 Vet. Microb. 32, 199-214

- GIBSON, J.S., SLATER, J.D., AWAN, A.R., FIELD, H.J. (1992b)
Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation
Arch. Virol. 123 (3-4), 351-366
- GILKERSON, J., JORM, L.R., LOVE, D.N., LAWRENCE, G.L., WHALLEY, J.M. (1994)
Epidemiological investigation of equid herpesvirus-4 (EHV-4) excretion assessed by nasal swabs taken from thoroughbred foals
Vet. Microb. 39, 275-283
- GIMENO, E.J., NOSETTO, E.O., MARTIN, A.A., GALOSI, C.M., ANDO, Y., ETCHEVERRIGARAY, M.E. (1987)
Demonstration of equine herpesvirus 1 in histo-sections and tissue culture by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique
J. Vet. Med. 34, 740-742
- GOERLICH, P. (1988)
Serologische Untersuchungen auf Virus-Antikörper bei Atemwegserkrankungen des Pferdes
Diss. Med. Vet., Gießen
- GRAY, P. (1994)
Chronisch-Obstruktive Bronchitis (COB)
In: Atemwegserkrankungen des Pferdes, Kosmos-Verlag, 110-119
- GRAY, P.R., DERKSEN, F.J., ROBINSON, N.E., CARPENTER-RAYO, L.J., JOHNSON, H.G., ROTH, R. (1989)
The role of cyclooxygenase products in the acute airway obstruction and airway hyperreactivity of ponies with heaves
Am. Rev. Resp. Dis 140, 154-160
- GRAY, P.R., DERKSEN, F.J., BROADSTONE, R.V., ROBINSON, N.E., JOHNSON, H.G., OLSON, N.C. (1992)
Increased pulmonary production of immunoreactive 15-hydroxyeicosatetraenoic acid in an animal model of asthma
Am. Rev. Resp. Dis. 145, 1092-1097
- GRÜNIG, G., HERMANN, M., HOWARD, B., WINDER, C., VON FELLEBERG, R. (1989)
Partial divergence between airway inflammation and clinical signs in equine pulmonary disease
Equine Vet. J. 21, 145-148
- GUNN, H.M., (1991)
A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus
Irish Vet. J. 44, 37-40

- HAJER, R., SASSE, H.H.L. (1980)
Zur Ätiologie, Diagnostik und Therapie der COPD
7. Arb.-Tagg der Fachgruppe Pferdekrankheiten, DVG, Hamburg, 30-35
- HALLIWELL, R.E.W., GORMAN, N.T. (1989)
Veterinary Clinical Immunology
W.B. Saunders Co., Harcourt Brace Jovanovich, Inc., London
- HAMANN, J. (1999)
Krankheiten der Atmungsorgane
In: Dietz, O., Huskamp, B.: Handbuch der Pferdepraxis
2. Auflage, Stuttgart: Enke-Verlag 1999, 333-337
- HARDT, M., TEIFKE, J.P., WEISS, E. (1992)
Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von DNA der Equinen Herpesviren 1 und 4
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 105, 52-55
- HARDT, M. (1994)
Die Polymerasekettenreaktion (PCR) und in situ Hybridisierung zum Nachweis des Equinen Herpesvirus 1 und 4
Diss. Med. Vet., Gießen
- HARTLEY, W.J., DIXON, R.J. (1979)
An outbreak of foal perinatal mortality due to equid herpesvirus type 1: pathological observations
Equine Vet. J. 11, 215-218
- HARTUNG, J., KLINCKMANN, G., ADRIAN, U. (1989)
Untersuchung des Staub- und Keimgehaltes in einem Pferdestall bei Einsatz eines Staubbindemittels
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 96, 368-370
- HERBST, W., GÖRLICH, P., DANNER, K. (1992)
Virologisch-serologische Untersuchungen bei Pferden mit Atemwegserkrankungen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 105, 49-52
- HOFFMAN, A.M., MAZAN, M.R., ELLENBERG, S. (1998)
Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance
Am. J. Vet. Res. 59(2), 176-181
- HOFFMAN, A.M., COUETIL, L.L., MILLER, C.J. (1999)
Airway response to histamine aerosol in clinically normal foals
Am. J. Vet. Res. 60(8), 965-968
- HOFFMANN, B., WAGNER, W.C. (1990)
Entwicklung der Immunität beim neugeborenen Tier
In: Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere, Hrsg.: Walser, K., Bostedt, H.
35 -37

- HOHDATSU, T., EIKI, T., YAMAGISHI, H. (1986)
Enzyme-linked-immuno-sorbent assay for the detection of antibodies to equid herpesvirus type 1 (EHV-1)
Jpn. J. Vet. Sci. 5, 1045-1048
- HOUSE, J.A., GREGG, D.A., LUBROTH, J., DUBROVI, E.J., TORRES, A. (1991)
Experimental equine herpesvirus-1 infection in llamas (Lama glama)
J. Vet. Diagn. Invest. 2, 137-143
- HUG, A. (1937)
Über chronische Atembeschwerden des Pferdes
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 79, 251-280
- JÖNSSON, L., BECK-FRIIS, J., RENSTRÖM, L.H.M., NIKKILÄ, T., THEBO, P., SUNDQUIST, B. (1989)
Equine herpesvirus (EHV 1) in liver, spleen and lung as demonstrated by immunohistology and electron microscopy
Acta. Vet. Scand. 30, 141-146
- KAADEN, O.-R., OSTERRIEDER, N., EICHHORN, W. (1993)
Möglichkeiten und Grenzen der ätiologischen Differenzierung der equinen Herpesvirusinfektionen
Prakt. Tierarzt 74, 25-26
- KAHRMANN, B., DÄMMRICH, K., GÖLTENBOTH, R. (1993)
Neurologische Verlaufsform der EHV-1-Infektion bei Wildequiden des Zoologischen Gartens Berlin und immunhistochemischer Antigennachweis im Zentralnervensystem
Pferdeheilkd. 9, 207-214
- KAMPHUES, J. (1989)
Feinanteile und Staub in Futtermitteln – quantitative und qualitative (Pilze, Bakterien und LPS) Aspekte
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 102, 418-421
- KAUP, F.-J., DROMMER, W., IREGUI, C., DEEGEN, E., SCHOON, H.-A. (1985)
Licht- und elektronenmikroskopische Befunde bei Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis
9. Arb.-Tagg. d. Fachgruppe Pferdekrankheiten, Hannover 1985
- KAUP, F.J., DROMMER, W., DEEGEN, E. (1990)
Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region
Equine Vet. J. 22, 349-355
- KHUN, H., GRIFFAIS, R., THIBON, M., JAQUET, A. (1992)
Improved diagnosis of equine rhinopneumonitis with the polymerase chain reaction
In: Quoi de neuf en matière d'études et de recherches sur le cheval?, 13ème Journée de la recherche chevaline, Paris, Frankreich

- KLEIN, H.J., DEEGEN, E. (1986)
Histamine inhalation provocation test: method to identify nonspecific airway reactivity in equids
Am. J. Vet. Res. 47, 1796-1800
- KÖNING, B. (1983)
Vergleichende Untersuchungen über das Alter, die Versicherungsdauer und die Abgangsursachen versicherter Pferde bei Eintritt des Schadenfalles auf der Grundlage von Schadenstatistiken verschiedener Versicherungen und Jahre
Diss. Med. Vet., Gießen
- KRAFT, H. (1975)
Folgeerscheinungen nach Virusinfektionen der Luftwege beim Pferd
Tierärztl. Umschau 28, 273-274
- KRAFT, W., GRABNER, A., FIEBIGER, I. (1982)
EHV-1 Myeloencephalitis des Pferdes
Berl. Münch. Tierärztl. Wsch. 95, 321-325
- KYDD, J.H., SMITH, K.C., HANNANT, D., LIVESAY, G.J., MUMFORD, J.A. (1994)
Distribution of Equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity
Equine Vet. J. 26, 470-473
- LAM, S., LERICHE, J.C., KEIJEK, K. (1985)
Effect of filtration and concentration on the composition of bronchoalveolar lavage fluid
Chest 87, 740-742
- LAPOINTE, J.M., VRINS, A., LAVOIE, J.P. (1994)
Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses
Equine Vet. J. 26, 227-229
- LARSON, V.L., BUSCH, R.H. (1985)
Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathological findings
Am. J. Vet. Res. 46, 144-146
- LITTLEJOHN, A. (1978)
Studies on the physiopathology of chronic obstructive pulmonary disease in the horse
Thesis D.V.S.C., University of Pretoria 1978
- LITTLEJOHN, A. (1979)
Chronic obstructive pulmonary disease in horses
Vet. Bull. 49, 907-917

- LITTLEJOHN, A. (1980)
Studies on the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease in horses.
I. Clinical signs
Onderstepoort J. Vet. Res. 47, 159-162
- LIU, I.K., WALS, E.M., BERNOCO, M., CHEUNG, A.T. (1987)
Bronchoalveolar lavage in the newborn foal
J. Reprod. Fertil. Suppl. 35, 587-592
- MAGLIONE, E., ROSATI, S., FERRARI, A., MASOERO, L., TEODORO, P., FELLI, A. (1991)
Serum neutralization tests for diagnosing equine rhinopneumonitis and discussion of positive titres
Annali Fac. Med. Vet. Di Torino 33, 65-74
- MAHAFFAY, L.W. (1962)
Respiratory condition in horses
Vet. Rec. 74, 1295-1311
- MARTI, E., GERBER, H., ESSICH, G., DULEHLA, J., LAZARY, S. (1991)
The genetic basis of equine allergic disease. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis
Equine Vet. J. 23, 457-460
- MAIR, T.S., STOKES, C.R., BOURNE, F.J. (1987)
Quantification of immunoglobulins in respiratory tract secretions of the horse
Vet. Immunol. Immunopathol. 14(2), 197-203
- MAIR, T.S., STOKES, C.R., BOURNE, F.J. (1988)
Immunohistochemical study of the local humoral immune system of the equine respiratory mucosa
Res. Vet. Sci. 45(2), 160-165
- MAIR, T.S. (1995)
Changing concepts of COPD
Equine Vet. J. 27, 402-403
- MATSUMURA, T., SUGIURA, T., IMAGAWA, H., FUKUNAGA, L., KAMADA, M. (1992)
Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations
J. Vet. Med. Sci. 54, 207-211
- MATSUMURA, T., YOKOLA, S., IMAGAWA, H., SUGIURA, T., WADA, R., KANEMARU, T., NANBU, M., KIRISAWA, R., KAMADA, M. (1994)
Sero- and molecular-epizootiological studies on equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection among racehorses: An occurrence of respiratory disease with nervous disorders
J. Equine Sci. 5, 59-67

- MAXIE, G. (1986)
Etiological agent or condition associated with abortion in horses, VLS, Guelph, 1983-1985
Can. Vet. J. 27, 112
- MAYR, A., BOHM, H.O., BRILL, J., WOYCIECHOWSKA, S. (1965)
Characterization of an equine abortion virus from poland and comparison with known equine rhinopneumonitis virus strains
Arch. gesamte Virusforsch. 17(2), 216-230
- MAYR, A., THEIN, P., SCHEID, R. (1978)
Immunization experiments with inactivated Equine Herpesvirus 1
Equine Infectious Diseases, 4, 57-68
- MAYR, A., EISSNER, G., MAYR-BIBRACK, B. (1984)
Rhinopneumonitis des Pferdes (EHV-1-Infektion)
In: Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 645-655
- MAZAN, M.R., HOFFMAN, A.M., MANJEROVIC, N. (1999)
Comparison of forced oscillation with the conventional method for histamine bronchoprovocation testing in horses
Am. J. Vet. Res. 60 (2), 174-180
- McCARTAN, C.G., RUSSELL, M.M., WOOD, J.L.N. (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, 7-12
- McGORUM, B.C., DIXON, P.M., HALLIWELL, R.E.W. (1993)
Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens
Equine Vet. J. 25, 261-267
- McGORUM, B.C., DIXON, P.M. (1994)
The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology
Equine Vet. Educ. 6, 203-209
- McGuire, T.C., CRAWFORD, T.B. (1972)
Identification and quantitation of equine serum and secretory immunoglobulin A
Infect. Immun. 6(4), 610-615
- McPHERSON, E.A., LAWSON, G.H.K., MURPHY, J.R., NICHOLSON, J.M., FRASER, J.A., BREEZE, R.G., PIRIE, H.M. (1978)
Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of affected horses
Equine Vet. J. 10, 47-53

- McPHERSON, E.A., LAWSON, G.H.K., MURPHY, J.R., NICHOLSON, R.G., BREEZE, R.G., PIRIE, H.M. (1979)
COPD: factors influencing the occurrence
Equine Vet. J. 11, 167-171
- McPHERSON, E.A., THOMSON, J.R. (1983)
Chronic obstructive pulmonary disease in the horse 1: Nature of the disease
Equine Vet. J. 22, 194-197
- MEYER, H., HÜBERT, P., SCHWEND, C., EICHHORN, W. (1992)
Rapid identification and differentiation of the vaccine strain RacH from EHV1 field isolates using a non radioactive DNA probe
Vet. Microb. 1, 12-20
- MEYER, H., HÜBERT, P.H., EICHHORN, W. (1994)
Molekularbiologisches Nachweisverfahren zur Differenzierung des in Deutschland als Lebendimpfstoff verwendeten equinen Herpesvirus-Stammes RacH
Tierärztliche Umschau 49, 624-628
- MODROW, S., FALKE, D. (2002a)
Labormethoden zum Nachweis von Virusinfektionen
In: Molekulare Virologie, 2. Auflage, Akademischer Verlag, 114-124
- MODROW, S., FALKE, D. (2002b)
Herpesviren
In: Molekulare Virologie, 2. Auflage, Akademischer Verlag, 540-611
- MOHANTY, S.B., DUTTA, S.K. (1999)
Equine Viruses
In: Veterinary Virology, Verlag Lea & Febiger, 158-164
- MONTALI, R.J., ALLEN, G.P., BRYANS, J.T. (1985)
Equine herpesvirus type 1 abortion in an onager and suspected herpesvirus myelitis in a zebra
J. Am. Vet. Med. Assoc. 187, 1248-1249
- MOORE, B.R., COX, J.H. (1996)
Diagnostic use of bronchoalveolar lavage in horses
Equine Pract. 18, 7-15
- MUMFORD, J., BATES, J. (1984)
Trials of an inactivated equid herpesvirus 1 vaccine: Challenge with a subtype 2 virus
Vet. Rec. 114, 375-381
- MUMFORD, J.A., ROSSDALE, P.D., JESSET, D.M., GANN, S.J., OUSEY, J., COOK, R.F. (1987)
Serological and virological investigation of equid herpesvirus 1 (EHV1) abortion storm on a stud farm in 1985
J. Reprod. Fertil. Suppl. 35, 730-731

MUMFORD, J.A., SINCLAIR, R., HANNANT, D., WITHWELL, K.E., SMITH, K.C. (1989)

The development of diagnostic techniques for EHV1
Anim. Health Trust Sci. Report, 15-16

MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J. (1999)

Herpesviridae

In: Veterinary Virology, Academic Press, California, 3. Edition, 301-326

MÜLLER, P., DEEGEN, E. (1982)

Über den Einfluß der Belastung auf die Atemmechanik bei lungengesunden und lungenkranken Pferden

8. Arb.-Tagg. der Fachgr. Pferdekrankheiten, DVG, Freiburg, 138-150

MYRVIK, Q.M., LEAK, E.S., FARISS, B. (1961)

Studies on alveolar macrophages from the normal rabbit: a technique to procure them in a high state of purity

J. Immunol. 86, 133-136

NADEL, J.A. (1980)

Pathophysiology of asthma: Neural effects on airway smooth muscle, submucosal glands, breathing and cough

Prog. Resp. Res. 14, 1-8

NAGY, E., IDAMAKANTI, N., CARMAN, S. (1997)

Restriction endonuclease analysis of equine herpesvirus-1 isolates recovered in Ontario, 1986-1992, from aborted, stillborn and neonatal foals

J. Vet. Diagn. Invest. 9, 143-148

NICOLSON, L., ONIONS, D.E. (1990)

The nucleotide sequence of the equine herpesvirus 4 gC gene homologue

Viol. 179, 378-387

O'CALLAGHAN, D.J., GENTRY, G.A., RANDALL, C.C. (1983)

The equine herpesviruses

In: Comprehensive virology, Vol. 2: The herpesviruses 2, Hrsg. B. Roizmann, Plenum Publishing Corp. New York, 215-318

OHNESORGE, B., TRÖTSCHER, C., DEEGEN, E. (1998)

Bestimmung von Totraum und expiratorischem Mischluftvolumen zur Diagnostik chronischer Lungenerkrankungen beim Pferd

Pferdeheilkunde 14(6), 450-455

O'KEEFE, J.S., MURRAY, A., WILKS, C.R., MORIARTY, K.M. (1991)

Amplification and differentiation of the DNA of an abortogenic (type 1) and a respiratory (type 4) strain of equine herpesvirus by the polymase chain reaction

Res. Vet. Sci. 50, 349-351

- O'KEEFE, J.S., JULIAN, A., MORIARTY, K., MURRAY, A., WILKS, C.R. (1994)
A comparison of the polymerase chain reaction with standard laboratory methods for the detection of EHV-1 and EHV-4 in archival tissue samples
New Zeal. Vet. J., 93-94
- OSTERRIEDER, N., HÜBERT, P.H., EICHHORN, W. (1994)
A touchdown PCR for the differentiation of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) field strains from the modified live vaccine strain Rach
J. Virol. Methods 50, 129-136
- PATEL, J.R., EDINGTON, N., MUMFORD, J.A. (1992)
Variation in cellular tropism between isolates of equine herpesvirus-1 in foals
Arch. Virol. 74, 41-51
- PAWESKA, J., GOLNIK, W., DZIK, W., STARONIEWICZ, Z. (1991)
Effectiveness of vaccinations in the course of enzootic equine viral abortions
Medyc. Wet. 47, 154-156
- PEEBLES, R.S., LIU, M.C., LICHTENSTEIN, L.M. (1995)
IgA, IgG and IgM quantification in bronchoalveolar lavage fluids from allergic rhinitics, allergic asthmatics and normal subjects by monoclonal antibody-based immunoenzymetric assays
J. Immunol. Methods 179(1), 77-86
- PETZOLD, K., ROSENBRUCH, M., THEIN, P., MERKT, H., SCHULZE-SPÜNTRUP, J. (1982)
Ein Ausbruch von Paresen und Virusabort in einem deutschen Vollblutgestüt
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95, 81-85
- PICK, M. (1970)
Erste Erfahrungen in der Therapie der chronischen Erkrankungen des Respirationstraktes der Pferde mit Triamcinolon-Acetonid®
Tierärztl. Umschau 25, 195-200
- RAIDT, J., FISCHER, J., PETZOLDT, K., DEEGEN, E. (1980)
Ein neuer Aspekt bei der Diagnostik allergischer Atemwegserkrankungen
7. Arb.-Tagg. d. Fachgruppe Pferdekrankheiten, DVG, 1.-3. Oktober, Hamburg
- REIF, J.S. (1979)
Epidemiology of equine infectious respiratory diseases
Vet. Clin. North. Am.: Large Animal Practice 1, 3-15
- RENNARD, S., BASSET, G., LECOSSIER, D., O'DONNELL, K., MARTIN, P., CRYSTAL, R.G. (1986)
Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution
J. Appl. Physiol. 60, 532-538

- REUBEL, G.H., CRABB, B.S., STUDDERT, M.J. (1995)
Diagnosis of equine gammaherpes-virus 2 and 5 infections by polymerase chain reaction
Arch. Virol. 140, 1049-1060
- ROBINSON, N.E., SORENSON, P.R. (1978)
Pathophysiology of airway obstruction in horses: a review
J. Am. Vet. Med. Assoc. 172, 299-303
- ROBINSON, N.E. (1979)
Functional abnormalities caused by upper airway obstruction and heaves: their relationship to the etiology of epistaxis
Vet. Clin. North Am.: Large animal practice, 17-34
- ROBINSON, N.E. (1986)
Pathophysiology of coughing
Proc. Am. Ass. Equ. Pract. 32, 291-297
- ROBINSON, N.E., WILSON, R. (1989)
Airway obstruction in the horse
J. Equine vet. Sci. 9, 155-159
- ROBINSON, N.E., DERKSEN, F.J., OLSZEWSKI, M.A., BUECHNER-MAXWELL, V.A. (1996)
The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses
Br. Vet. J. 152, 283-306
- ROBINSON, N.E. (2001)
International Workshop on Equine Chronic Airway Disease
Equine Vet. J. 33, 5-19
- ROLLE, M., MAYR, A. (2002)
Herpesviridae
In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage, Enke-Verlag, 177-183
- ROTINSULU, F.D. (1995)
Nachweis der Wirksamkeit der peroralen Überwässerungstherapie bei Pferden mit chronisch-obstruktiver Bronchitis (COB)
Diss. Med. Vet., Gießen
- SASSE, H.H.L. (1971)
Some pulmonary function tests in horses. An aid to an early diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease (heaves) in horses
Diss. Med. Vet., Utrecht
- SASSE, H.H.L. (1973)
Lungenfunktionsprüfung beim Pferd
Tierärztl. Praxis 1, 49-59

SASSE, H.H.L., BOERMA, S., SMOLDERS, E.A.A. (1985)
Zur Ätiologie chronischer Atemwegserkrankungen beim Pferd –
Veterinärmedizinische und landwirtschaftliche Aspekte in Großmanegen
8.Arb.-Tagg. d. Fachgruppe Pferdekrankheiten, Münster/Westfalen, 79-86

SASSE, H.H.L. (1995)
C.O.B.-Prognose und Behandlungsmaßnahmen
Collegium Veterinarium 25: XXV, 66-69

SCHATZMANN, U., GERBER, H. (1972)
Untersuchungen zur Ätiologie chronischer Lungenkrankheiten des Pferdes
Zentralbib. Vet. Med. A 19, 89-101

SCHATZMANN, U., STRAUB, R., GERBER, H. (1974)
Die Elimination von Heu und Stroh als Therapie chronischer Lungenerkrankungen
des Pferdes
Tierärztl. Praxis 2, 207-214

SCHLOCKER, N., GERBER-BRETSCHER, R., VON FELLEBERG, R. (1995)
Equine herpesvirus 2 in pulmonary macrophages
Am. J. Vet. Res. 56, 749-754

SCHMALLENBACH, K.H. (1997)
Local pulmonary and systemic antibody response against *Aspergillus fumigatus*
antigens in horses affected with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)
Diss. Med. Vet., Gießen

SCHMIDT, O.P., PRIMER, G. (1975)
Chronische Bronchitis: Ätiologie und Pathogenese
Therapiewoche 3, 180-190

SCHMITZ, H.C. (1993)
Serologische Untersuchungen auf Antikörper gegen equines Herpesvirus 2 beim
Pferd mit chronischer Lungenkrankheit
Diss. Med. Vet., Zürich

SCHOON, H. A., DEEGEN, E. (1982)
Ein Beitrag zur Histopathologie der chronisch-obstruktiven Bronchitis bei klinisch
manifest erkrankten Pferden
8. Arb.-Tagg. d. Fachgruppe Pferdekrankheiten, DVG, Freiburg, 130-137

SCHRAG, D., FLOSS, G., KOENE, M. (1997)
Wirksamkeit und Verträglichkeit der intranasalen Frühimmunisierung von Fohlen mit
Prevaccinol®
Prakt. Tierarzt 2, 108-109

SCHULTHEISS, P.C., COLLINS, J.K., CARMAN, J. (1993)
Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in
formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues
J. Vet. Diag. Inv. 5, 12-15

- SCHUSSER, G.F., WIEGAND, M., RUHLAND, A. (1999)
Technik und Differentialzellbild der bronchoalveolären Lavage bei Pferden mit COPD
Prakt. Tierarzt 80, 601-604
- SCHÜTZ, M. (1999)
Vergleich der Fütterung von Heu und einer Grasanwelksilage (Horse Hage®) hinsichtlich der Staubfreisetzung und des Krankheitsverlaufs von Pferden mit chronisch obstruktiver Bronchitis (COB)
Diss. Med. Vet., Gießen
- SHARMA, P.C., CULLINANE, A.A., ONIONS, D.E., NICOLSON, L. (1992)
Diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 by polymerase chain reaction
Equine Vet. J. 1, 20-25
- SHIMUZU, M., ISHAZAKI, R., KAWAKAMI, Y., KALI, T., SUGIMURA, K., MATUMOTO, M. (1959)
Isolation of equine abortion virus from natural cases of equine abortion in horse kidney cell culture
Jap. J. exp. Med. 29, 643-649
- SINCLAIR, R., MUMFORD, J.A. (1992)
Rapid detection of equine herpesvirus type-1 antigens in nasal swab specimens using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay
J. Virol. Methods 39(3), 299-310
- SINCLAIR, R., BINNS, M.B., CHIRNSIDE, E.D., MUMFORD, J.A. (1993)
Detection of antibodies against equine herpesvirus types 1 and 4 by using recombinant protein derived from an immunodominant region of glycoprotein B
J. Clin. Microb. 31, 265-271
- SLATER, J.D., GIBSON, J.S., BARNETT, K.C. (1992)
Chorioretinopathy associated with neuropathology following infection with equine herpesvirus-1
Vet. Rec. 131, 237-239
- SLATER, J.D., BORCHERS, K., THACKRAY, A.M., FIELD, H.J. (1994)
The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse
J. General Virol. 75, 2007-2016
- SPECK, W., ROOST, E. (1949)
Zur Pathogenese der chronischen Bronchiolitis beim Pferde
Schweiz. Arch. Tierheilk. 91, 427-436
- SPÖRRI, H., ZEROBIN, K. (1964)
Zur Physiologie und Methodik der Lungenfunktionsprüfung
Tierärztl. Umschau 19, 285-292

SPÖRRI, H., DENAC, M. (1970)

Zur Diagnostik intrapulmonaler Ventilationsstörungen

Schweiz. Arch. Tierheilkd. 112, 409-419

STEINHAGEN, P. (1986)

Zur Problematik der Equinen Herpesvirus 1 (EHV1)-Infektion und ihrer Bekämpfung mit Hilfe von Impfstoffen

Tierärztl. Umschau 41, 260-266

STEINHAGEN, P. (1988)

Zur Situation der Equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV 1) – Infektion in der Warmblutzucht Schleswig-Holsteins

Tierärztl. Umschau 43, 348-349

SWEENEY, C.R., BEECH, J. (1991)

Bronchoalveolar lavage

In: Equine respiratory disorders, Hrsg: Beech, J., Lea and Ferbiger, Philadelphia, 55-61

SWEENEY, C.R., ROSSIER, Y., ZIEMER, E.L., LINDBORG, S.R. (1992)

Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses

Am. J. Vet. Res. 53, 1376-1379

TELFORD, E.A.R., WATSON, M.S., McBRIDE, K., DAVISON, A.J. (1992)

The DNA sequence of equine herpesvirus-1

Viol. 189, 304-316

TELFORD, E.A.R., STUDDERT, M.J., AGINS, C.T., WATSON, M.S., AIRD, H.C., DAVISON, A.J. (1993)

Equine herpesviruses 2 and 5 are γ -herpesviruses

Viol. 195, 492-499

TELFORD, E.A.R., WATSON, M.S., PERRY, J. (1998)

The DNA sequence of equine herpesvirus 4

J. Gen. Virol. 79, 1197-1203

TESAROWSKI, D.B., VIEL, L., McDONELL, W.N. (1996)

Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves)

Am. J. Vet. Res. 57, 1214-1219

TEUFEL, P. (1977)

Untersuchungen zur Rhinovirusinfektion des Pferdes

Prakt. Tierarzt 58, 50-53

THEIN, P. (1974)

Schutzimpfung gegen Rhinopneumonitis unter besonderer Berücksichtigung der Virusausscheidung

Tierärztl. Umschau 7, 363

- THEIN, P. (1976)
Virusbedingte Keratitis beim Pferd
11. Kongressbericht der DVG, Zbl. Vet. Med. Fortschritte der Vet. Med. 25, 235-240
- THEIN, P., BÖHM, D. (1976)
Ätiologie und Klinik einer virusbedingten Keratokonjunktivitis beim Fohlen
Zentralbib. Vet. Med. B, 23, 507-519
- THEIN, P. (1981)
Infection of the central nervous system of horses with equine herpesvirus serotype 1
J. S. Afr. Vet. Med. Ass. 52, 239-241
- THEIN, P. (1981a)
Virusinfektionen und chronische Bronchitis des Pferdes
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 65-68
- THEIN, P., LUDWIG, H., MEYER, H. (1987)
Beitrag zur molekularen Epizootiologie equiner Herpesviren
Tierärztl. Umschau 42 (1), 23-27
- THEIN, P., BROWN, K. (1988)
Infektion mit equinen Herpesviren und Manifestation am Zentralnervensystem beim Pferd
Tierärztl. Praxis 16, 295-302
- THEIN, P. (1994)
Therapieansätze bei Infektionen mit Pferdeherpesviren
Prakt. Tierarzt 75, 786-792
- THOMSON, J.R., MUMFORD, J.A., CAMPBELL, J., GRIFFITH, L., CLAPHAM, P. (1976)
Serological detection of equid herpesvirus 1 infections in the respiratory tract
Equine Vet. J. 8, 58-65
- THOMSON, J.R., McPHERSON, E.A. (1984)
Effects of environmental control on pulmonary function of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease
Equine Vet. J. 16-35-38
- THORSEN, J., WILLOUGHBY, R.A., McDONELL, W. (1983)
Influenza hemagglutination inhibiting activity in respiratory mucus from horses with chronic obstructive pulmonary disorders (heaves syndrome)
Can. J. Comp. Med. 47(3), 332-335
- TISI, G.M. (1985)
Klinische Lungenphysiologie
In: Pneumologische Notfälle, Hrsg. K.M. Moser, R.G. Spragg, Enke-Verlag

- TURGUT, K., SASSE, H.H.L. (1989)
Influence of clenbuterol on mucociliary transport in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease
Vet. Rec. 125, 526-530
- VAN DEN INGH, T.S.G.A.M. (1985)
Morphological aspects of bronchitis and bronchiolitis in the horse
In: Deegen, E., Beadle, R.E.: Lung function and respiratory diseases in the horse, Int. Symp., Hannover, 13-15
- VERHEYEN, K., NEWTON, J.R., WOOD, J.L.N. (1998)
Possible case of EHV-4 ataxia in warmblood mare
Vet. Rec. 143, 456
- VERTER, W., HAMANN, J., MAYR, A. (1999)
Rhinopneumonitis
In: Handbuch Pferdepraxis, Ditz, Huskamp, Enke-Verlag, 353-356
- VICKERS, M.L., POWELL, D.G. (2001)
Equine herpes virus abortions
Equine Dis. Quar. 10, 3-4
- VIEL, L. (1983)
Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease
Diss. Med. Vet., Guelph
- VIEL, L. (1998)
Lower airway disease: diagnosis and treatment
World equine airways symposium; Guelph, Ontario
- VOLLER, A., DE SAVIGNY, D. (1981)
Diagnostic serology of tropical parasitic diseases
J. Immunol. Methods 46(1), 1-29
- WAGNER, W.N., BOGDAN, J., HAINES, D., TOWNSEND, H.G.G., MISRA, V. (1992)
Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type-1 from type-4 by the polymerase chain reaction
Can. J. Microb. 38, 1193-1196
- WEBSTER, A.J.F., CLARKE, A.F., MADELIN, T.M., WATHES, C.M. (1987)
Air hygiene in stables 1: effects of stable design, ventilation and management on the concentration of respirable dust
Equine Vet. J. 19, 448-453
- 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, 261-268

- WENISCH, T. (2001)
Einfluß der Probenaufbereitung und der Lagerungsmethoden auf das
Differentialzellbild der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) beim Pferd
Diss. Med. Vet., Gießen
- WESTER, J. (1915)
Lungenemphysem bei Pferden
Tijdschr. Veearts. 42, 651
Ref. In: Jahresberichte Veterinärmed. 1915, 73
- WHITHWELL, K.E., BLUNDEN, A.S. (1992)
Pathological findings in horses during outbreak of the paralytic form of equid
herpesvirus type 1 (EHV 1) infection
Equine Vet. J. 24, 13-19
- WIDDERS, P.R., STOKES, C.R., DAVID, J.S. (1984)
Quantification of the immunoglobulins in reproductive tract secretions of the mare
Res. Vet. Sci. 37(3), 324-330
- WILSON, D. (1995)
Guidelines for vaccination of horses. The American Association of Equine
Practitioners Vaccination Guidelines Subcommittee of the AVMA Council on Biologic
and Therapeutic Agents
J. Am. Vet. Med. Assoc. 207, 426-431
- WILSON, W.D. (1997)
Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy
Vet. Clin. North Am.: Equine Practice, 13, 53-72
- WINDER, N.C., VON FELLEBERG, R. (1988)
Chronic small airway disease in the horse: Immunohistochemical evaluation of lungs
with mild, moderate and severe lesions
Vet. Rec. 122, 181-183
- WINTZER, H.J. (1999)
Krankheiten des Pferdes
Parey-Verlag 1999, 49-81
- WOODS, P.S.A., ROBINSON, N.E., SWANSON, M.C., REED, C.E., BROADSTONE,
R.V., DERKSEN, F.J. (1993)
Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different
management systems
Equine Vet. J. 25, 208-213
- YOUNG, K.R., REYNOLDS, H.Y. (1984)
Bronchoalveolar washings: Proteins and cells from normal lungs
In: Immunology of the lung and upper respiratory tract, Hrsg.: Bienenstock, J.
New York: McGraw-Hill, 157-173

ZIENTARA, S., PLATEAU, E., SAILLEAU, C., CRUCIERE, C. (1993)
Comparison of the restriction patterns of equine herpesvirus (EHV-1) strains isolated
for eight years in france

8. Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Genera und einige Spezies der Subfamilie Alphaherpesvirinae (zusammengefasst aus: Mohanty et Dutta 1999, Verter et al. 1999, Wintzer 1999, Fields et al. 2002, Modrow et Falke 2002b, Rolle et Mayr 2002).	20
Tab. 2:	Genera und einige Spezies der Subfamilie Betaherpesvirinae (zusammengefasst aus: Mohanty et Dutta 1999, Verter et al. 1999, Wintzer 1999, Fields et al. 2002, Modrow et Falke 2002b, Rolle et Mayr 2002).	21
Tab. 3:	Genera und einige Spezies der Subfamilie Gammaherpesvirinae (zusammengefasst aus: Mohanty et Dutta 1999, Verter et al. 1999, Wintzer 1999, Fields et al. 2002, Modrow et Falke 2002b, Rolle et Mayr 2002).	22
Tab. 4:	Endoskopie-Score nach Dickmann (1987)	47
Tab. 5:	Score-System zur Einteilung der Pferde in Gruppen mit unterschiedlichem Krankheitsgrad einer COB nach klinischen Befunden	48
Tab. 6:	Einteilung des Erkrankungsgrades nach dem leicht modifizierten Score-System von Ohnesorge et al. (1998)	49
Tab. 7:	Einteilung in Erkrankungsgrade nach dem Gesamtscoresystem (arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen)	65
Tab. 8:	Ausprägung und Verteilung der klinischen Symptome je nach Erkrankungsgrad (Anzahl der Patienten)	66
Tab. 9:	Arterielle Blutgaswerte nach Erkrankungsgrad aufgeteilt (arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen)	67
Tab. 10:	Endoskopiebefunde in Abhängigkeit vom Erkrankungsgrad (arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen)	67
Tab. 11:	Ergebnisse des EHV1-NT aus BALF innerhalb der COB-Patienten	72

Tab. 12:	Ergebnisse des EHV1-NT aus Serum innerhalb der COB-Patienten	75
Tab. 13:	Ergebnisse des EHV1-NT innerhalb der COB-Patienten unter Berücksichtigung des Impfstatus (bezüglich EHV1 und EHV4)	76
Tab. 14:	Ergebnisse des EHV1-IF aus BALF innerhalb der COB-Patienten	81
Tab. 15:	Ergebnisse des EHV1-IF aus Serum innerhalb der COB-Patienten	84
Tab. 16:	Ergebnisse des EHV1-IF innerhalb der COB-Patienten unter Berücksichtigung des Impfstatus (bezüglich EHV1 und EHV4)	85
Tab. 17:	Ergebnisse des EHV4-NT aus BALF innerhalb der COB-Patienten	90
Tab. 18:	Ergebnisse des EHV4-NT aus Serum innerhalb der COB-Patienten	93
Tab. 19:	Ergebnisse des EHV4-NT innerhalb der COB-Patienten unter Berücksichtigung des Impfstatus (bezüglich EHV1 und EHV4)	94
Tab. 20:	Ergebnisse des EHV4-IF aus BALF innerhalb der COB-Patienten	99
Tab. 21:	Ergebnisse des EHV4-IF aus Serum innerhalb der COB-Patienten	102
Tab. 22:	Ergebnisse des EHV4-IF innerhalb der COB-Patienten unter Berücksichtigung des Impfstatus (bezüglich EHV1 und EHV4)	103
Tab.23:	Übersicht über die Mittelwerte der Antikörperspiegel aller Tests im Gruppenvergleich	113
Tab. 24:	Übersicht über die Mittelwerte (MW), Minimum (min), Maximum (max) und Signifikanzen der Antikörperspiegel aller Tests bezüglich des Impfstatus (gegen EHV1 und EHV4) innerhalb der COB-Patienten	118
Tab. 25:	Ergebnisse aus dem Neutralisationstest	156
Tab. 26:	Ergebnisse aus dem indirekten Immunfluoreszenztest	158

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau eines Herpesvirus (zusammengestellt aus Falke 1999a, Braun 2002)	25
Abb. 2:	Testprinzip des Neutralisationstests (nach Rolle et Mayr 2002)	52
Abb. 3:	Vorlage des Gewebekulturmediums	52
Abb. 4:	Vorlage einer Probe	53
Abb. 5:	Herstellen der Verdünnungsreihen	53
Abb. 6:	Zugabe der Virusgebrauchsverdünnung	54
Abb. 7:	Virustitration	54
Abb. 8:	Mikroskopische Darstellung eines cpE (Okular 6,5 x, Objektiv 10 x)	56
Abb. 9:	Testprinzip der indirekten Immunfluoreszenz	58
Abb. 10:	Darstellung eines Box-and-Whisker-Plots	69
Abb. 11:	Gruppenvergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV1 aus BALF	71
Abb. 12:	Gruppenvergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV1 aus Serum	74
Abb. 13:	Vergleich der mit Hilfe des EHV1-NT ermittelten Titer aus BALF bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (nicht signifikant)	77
Abb. 14:	Vergleich der mit Hilfe des EHV1-NT ermittelten Titer aus Serum bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (nicht signifikant)	77
Abb. 15:	Korrelation zwischen mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titern aus BALF und aus Serum gegen EHV1	78
Abb. 16:	Gruppenvergleich der mit Hilfe der Immunfluoreszenz ermittelten Titer gegen EHV1 aus BALF	80
Abb. 17:	Gruppenvergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV1 aus Serum	83
Abb. 18:	Vergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV1 aus BALF bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten	86

Abb. 19:	Vergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV1 aus Serum bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten	86
Abb. 20:	Korrelation zwischen mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests ermittelten Titern aus BALF und aus Serum gegen EHV1	87
Abb. 21:	Gruppenvergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV4 aus BALF	89
Abb. 22:	Gruppenvergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV4 aus Serum	92
Abb. 23:	Vergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV4 aus BALF bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten	95
Abb. 24:	Vergleich der mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titer gegen EHV4 aus Serum bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften und nicht geimpften COB-Patienten	95
Abb. 25:	Korrelation zwischen mit Hilfe des Neutralisationstests ermittelten Titern aus BALF und aus Serum gegen EHV4	96
Abb. 26:	Gruppenvergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV4 aus BALF	98
Abb. 27:	Gruppenvergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV4 aus Serum	101
Abb. 28:	Vergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV4 aus BALF bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (schwach signifikant bei $p = 0,03$)	104
Abb. 29:	Vergleich der mit Hilfe des Immunfluoreszenztests ermittelten Titer gegen EHV4 aus Serum bei gegen EHV1 und EHV4 geimpften (n=25) und nicht geimpften (n=28) COB-Patienten (schwach signifikant bei $p = 0,05$)	104
Abb. 30:	Korrelation zwischen mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztests ermittelten Titern aus BALF und aus Serum gegen EHV4	105

8.3 Tabellarischer Anhang

Tab. 25: Ergebnisse aus dem Neutralisationstest

Pferd	Gruppe	EHV1-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV1-AK in Serum [log D ₅₀]	EHV4-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV4-AK in Serum [log D ₅₀]
01	COB	0,987	3,339	2,196	3,339
02	COB	1,208	2,862	1,685	2,863
03	COB	1,721	2,149	1,721	2,863
04	COB	0,919	2,862	1,397	2,620
05	COB	1,239	3,036	1,239	2,369
06	COB	1,029	2,862	1,498	2,369
07	COB	2,076	3,339	2,076	2,863
08	COB	0,885	2,862	1,131	2,369
09	COB	1,718	2,620	2,196	3,339
10	COB	0,544	2,386	1,754	2,620
11	COB	1,087	2,386	1,811	2,369
12	COB	1,078	2,386	1,802	2,863
13	COB	0,884	2,862	1,130	2,863
14	COB	1,192	1,908	1,192	2,369
15	COB	1,535	2,149	1,279	3,036
16	COB	1,106	2,862	1,352	2,863
17	COB	2,204	3,036	2,204	3,339
18	COB	-0,071	3,036	-0,071	2,369
19	COB	0,854	2,620	0,839	2,863
20	COB	1,260	2,149	1,987	2,863
21	COB	1,022	2,386	-0,071	2,369
22	COB	1,697	2,149	1,697	2,369
23	COB	1,003	1,908	1,003	2,149
24	COB	0,890	2,386	-0,071	1,672
25	COB	0,697	2,386	0,944	2,369
26	COB	0,816	1,672	-0,071	2,149
27	COB	0,899	2,386	-0,071	2,863
28	COB	0,897	2,862	0,241	2,369
29	COB	1,458	2,620	0,981	3,339
30	COB	0,477	2,386	0,477	3,339
31	COB	1,318	3,036	0,841	3,339
32	COB	2,209	3,339	1,258	2,863
33	COB	1,634	3,036	0,916	2,863
34	COB	0,577	1,908	1,055	1,908
35	COB	0,852	1,908	0,852	1,431
36	COB	0,900	1,908	1,377	2,369
37	COB	0,879	1,908	0,879	1,908
38	COB	1,436	3,339	-0,071	2,369
39	COB	1,269	2,620	1,973	3,339
40	COB	1,103	1,908	0,626	2,369

Pferd	Gruppe	EHV1-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV1-AK in Serum [log D ₅₀]	EHV4-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV4-AK in Serum [log D ₅₀]
41	COB	0,626	1,908	0,626	2,369
42	COB	1,939	3,339	1,462	2,863
43	COB	0,632	2,386	1,109	3,578
44	COB	1,866	2,386	1,389	2,863
45	COB	0,758	1,908	1,235	2,620
46	COB	0,861	1,431	0,863	2,369
47	COB	1,563	1,908	1,563	2,369
48	COB	1,467	1,431	1,945	2,620
49	COB	2,545	3,339	1,591	3,339
50	COB	1,692	1,908	1,215	2,369
51	COB	1,409	1,908	0,932	2,620
52	COB	0,738	2,149	-0,071	3,036
53	COB	-0,071	1,431	1,304	3,339
54	Fohlen	-0,071	-0,071	-0,071	2,369
55	Fohlen	-0,071	-0,071	-0,071	2,149
56	Fohlen	-0,071	-0,071	-0,071	1,908
57	Fohlen	-0,071	-0,071	1,798	2,863
58	Fohlen	-0,071	1,672	1,943	2,369
59	Fohlen	-0,071	-0,071	-0,071	2,149
60	Fohlen	-0,071	-0,071	-0,071	1,908
61	Fohlen	-0,071	-0,071	1,886	2,369
62	Fohlen	-0,071	-0,071	1,890	2,863
63	Fohlen	-0,071	1,204	1,331	2,149
64	Fohlen	-0,071	1,908	2,325	2,369
65	Fohlen	-0,071	1,672	2,752	2,863
66	Fohlen	-0,071	1,204	1,704	2,369
67	Fohlen	-0,071	1,431	1,940	2,369
68	Fohlen	-0,071	1,431	2,131	1,908
69	Fohlen	-0,071	2,149	2,552	2,863
70	Fohlen	-0,071	1,908	1,900	2,369
71	Fohlen	-0,071	1,431	2,367	1,908
72	Fohlen	-0,071	1,672	-0,071	1,908
73	Fohlen	-0,071	0,954	-0,071	-0,071
74	Rennpferde	2,185	3,339	2,185	2,620
75	Rennpferde	1,942	3,578	1,942	2,863
76	Rennpferde	2,416	3,339	1,693	3,036
77	Rennpferde	2,477	3,036	2,486	3,578
78	Rennpferde	1,921	2,862	1,452	3,036
79	Rennpferde	1,561	2,862	1,561	2,863
80	Rennpferde	2,484	2,862	2,238	2,863
81	Rennpferde	2,574	3,578	2,106	2,149
82	Rennpferde	2,062	2,862	2,062	2,620
83	Rennpferde	2,211	3,578	2,457	2,863
84	Rennpferde	1,591	3,339	1,344	2,863
85	Rennpferde	2,009	3,817	2,009	3,339

Pferd	Gruppe	EHV1-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV1-AK in Serum [log D ₅₀]	EHV4-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV4-AK in Serum [log D ₅₀]
86	Rennpferde	2,214	3,339	2,214	2,369
87	Rennpferde	2,569	3,578	2,101	3,817
88	Rennpferde	2,115	3,036	2,115	3,036
89	Rennpferde	2,213	3,339	2,213	3,339
90	Rennpferde	2,507	3,339	2,039	2,620
91	Rennpferde	2,134	3,339	2,134	2,863
92	Rennpferde	2,306	3,578	2,059	3,036
93	Rennpferde	2,349	3,339	2,349	2,863
94	Rennpferde	2,195	3,817	1,727	2,863
95	Rennpferde	2,224	2,862	2,224	2,863
96	Rennpferde	2,391	2,620	2,391	2,369
97	Rennpferde	2,647	3,578	2,902	3,339

Tab. 26: Ergebnisse aus dem indirekten Immunfluoreszenztest

Pferd	Gruppe	EHV1-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV1-AK in Serum [log D ₅₀]	EHV4-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV4-AK in Serum [log D ₅₀]
01	COB	1,191	3,709	2,395	3,709
02	COB	1,634	3,107	2,236	3,107
03	COB	2,147	2,505	2,147	3,408
04	COB	1,071	3,408	2,249	3,107
05	COB	1,365	3,408	1,666	2,806
06	COB	1,401	3,107	1,702	2,806
07	COB	2,326	3,709	2,025	3,408
08	COB	1,256	3,107	1,557	2,806
09	COB	1,968	3,107	2,269	3,709
10	COB	1,356	2,806	2,259	3,107
11	COB	1,459	2,806	2,061	2,806
12	COB	1,449	3,107	2,353	3,408
13	COB	1,556	3,408	2,158	3,107
14	COB	1,618	2,505	1,618	2,806
15	COB	2,086	2,505	1,785	3,408
16	COB	1,477	3,408	1,778	3,107
17	COB	2,012	3,408	2,614	3,709
18	COB	1,329	3,709	1,617	2,806
19	COB	1,279	3,107	1,581	3,408
20	COB	1,686	2,806	2,288	3,408
21	COB	1,394	2,806	1,695	2,806
22	COB	2,123	2,505	2,123	2,806
23	COB	1,429	2,505	1,730	2,806
24	COB	1,262	3,107	1,262	2,204
25	COB	0,768	2,806	1,671	2,806

Pferd	Gruppe	EHV1-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV1-AK in Serum [log D ₅₀]	EHV4-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV4-AK in Serum [log D ₅₀]
26	COB	1,242	2,505	1,242	2,505
27	COB	1,326	3,107	1,928	3,408
28	COB	1,403	3,408	1,704	2,806
29	COB	1,708	3,107	1,708	3,709
30	COB	0,903	3,107	1,806	3,709
31	COB	1,568	3,408	1,267	3,709
32	COB	2,408	3,709	1,505	3,408
33	COB	1,944	3,709	1,944	3,408
34	COB	1,003	2,505	1,606	2,505
35	COB	1,102	2,505	1,102	1,903
36	COB	1,326	2,204	1,928	2,806
37	COB	1,304	2,505	1,304	2,505
38	COB	1,811	3,709	1,509	2,806
39	COB	1,871	3,107	2,473	3,709
40	COB	1,654	2,505	1,654	3,107
41	COB	1,052	2,505	1,353	3,107
42	COB	2,013	4,010	2,013	3,408
43	COB	1,058	2,806	1,660	3,408
44	COB	2,116	3,107	1,815	3,408
45	COB	1,184	2,505	1,485	3,107
46	COB	1,287	2,204	1,287	2,806
47	COB	1,989	2,505	1,989	2,806
48	COB	1,592	2,204	2,495	3,107
49	COB	2,017	3,709	2,017	3,709
50	COB	1,942	2,505	1,641	2,806
51	COB	1,659	2,204	1,358	3,107
52	COB	1,109	2,806	1,712	3,408
53	COB	0,939	1,903	1,855	3,709
54	Fohlen	1,319	0,699	1,319	2,806
55	Fohlen	1,214	0,699	1,214	2,505
56	Fohlen	0,938	0,699	0,938	2,505
57	Fohlen	1,145	0,699	2,048	3,107
58	Fohlen	1,466	1,903	2,670	2,806
59	Fohlen	1,441	0,699	1,139	2,505
60	Fohlen	0,935	0,699	0,935	2,204
61	Fohlen	1,409	0,699	2,011	2,806
62	Fohlen	1,413	0,699	2,316	3,107
63	Fohlen	1,155	1,602	1,757	2,505
64	Fohlen	1,848	2,204	3,052	2,806
65	Fohlen	1,798	2,204	2,099	3,107
66	Fohlen	1,227	1,602	2,129	2,806
67	Fohlen	1,241	1,903	2,445	2,806
68	Fohlen	1,900	1,903	2,502	2,204
69	Fohlen	1,422	2,505	1,723	3,107
70	Fohlen	1,246	2,204	2,150	2,806

Pferd	Gruppe	EHV1-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV1-AK in Serum [log D ₅₀]	EHV4-AK in BALF [log D ₅₀]	EHV4-AK in Serum [log D ₅₀]
71	Fohlen	1,163	1,903	2,668	2,505
72	Fohlen	1,298	2,204	1,299	2,505
73	Fohlen	1,181	1,301	1,181	1,181
74	Rennpferde	2,255	3,709	1,954	3,107
75	Rennpferde	2,012	3,709	2,012	3,107
76	Rennpferde	2,967	3,709	2,064	3,408
77	Rennpferde	2,556	3,408	2,255	3,709
78	Rennpferde	2,125	3,107	2,125	3,408
79	Rennpferde	2,233	3,107	1,932	3,408
80	Rennpferde	2,910	3,408	2,007	3,709
81	Rennpferde	2,778	3,709	1,875	2,505
82	Rennpferde	2,133	3,408	1,831	3,408
83	Rennpferde	2,582	4,010	2,883	3,107
84	Rennpferde	2,017	3,709	2,017	3,107
85	Rennpferde	2,38	4,010	2,380	3,709
86	Rennpferde	2,639	3,709	2,639	2,806
87	Rennpferde	2,774	3,709	2,473	4,311
88	Rennpferde	2,487	3,408	2,487	3,408
89	Rennpferde	2,584	3,709	1,982	3,709
90	Rennpferde	2,711	3,709	2,410	3,107
91	Rennpferde	2,505	3,709	2,505	3,408
92	Rennpferde	2,732	3,709	1,829	3,408
93	Rennpferde	2,419	3,709	2,119	3,408
94	Rennpferde	2,399	4,311	1,797	3,107
95	Rennpferde	2,295	3,408	2,295	3,107
96	Rennpferde	2,516	3,107	2,817	2,806
97	Rennpferde	2,851	4,010	2,852	3,709

Danksagung

Für die Ermöglichung und die Unterstützung bei meiner Dissertation möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken.

Insbesondere Herrn Prof. Dr. H.H.L. Sasse und Frau Dr. K. Fey danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die immer freundliche Betreuung bei Fragen und Problemen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H.-J. Thiel für die Unterstützung beim virologischen Teil dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Frau E. Gottfried für die besonders nette Hilfe bei sämtlichen Tücken der virologischen Laborarbeiten bedanken.

Für die unermüdliche Erarbeitung der statistischen Auswertung danke ich Herrn Dr. K. Failing sowie Herrn H. Heiter.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben, sowie bei Steffen, der mir mit Engelsgeduld bei allen Höhen und Tiefen zur Seite stand.