



Höga och långvariga antikropps-nivåer hos hästar efter utbrott av ekvint herpesvirus typ 1 (EHV-1)

High and long-lasting levels of antibodies in horses after an outbreak of equine herpesvirus type 1 (EHV-1)

Sofie Lagerqvist

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2022



Höga och långvariga antikropps nivåer hos hästar efter utbrott av ekvint herpesvirus typ 1 (EHV-1)

High and long-lasting levels of antibodies in horses after an outbreak of equine herpesvirus type 1 (EHV-1)

Sofie Lagerqvist

Handledare: Mikael Berg, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Bitr. handledare: Gittan Gröndahl, Statens veterinärmedicinska anstalt, Avdelningen för djurhälsa och antibiotikafrågor
Examinator: Johanna Lindahl, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 hp
Nivå och fördjupning: A2E
Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod: EX0869
Program/utbildning: Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2022

Nyckelord: EHV-1, EHV-4, ekvin herpes myeloencefalopati, virusabort, seroprevalens, serologi ELISA, komplementbindningstest

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institution för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

<https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

EHV-1 och EHV-4 är vanligt förekommande bland hästar världen över. De orsakar främst respiratorisk sjukdom men infektion med EHV-1 kan också leda till abort och neurologisk sjukdom. EHV-4 har endast sporadiskt sett orsaka abort. Ett stort problem med bägge virusen är deras förmåga att orsaka latent infektion, som kan reaktiveras senare i livet och hästen kan utsöndra och sprida virus till mottagliga hästar. Immuniteten mot återinfektion anses vara kort (veckor-månader) men det finns ett par studier där antikroppar har kunnat detekteras upp till år efter utbrott av EHV-1.

Syftet med den här studien var att mäta antikropps nivåer vid ett akut utbrott och därefter undersöka nivåerna sex respektive 30 månader efter att hästar exponerats för EHV-1. Genom att jämföra analysresultat kan man dels få en uppfattning om hur smittspridningen skedde under det akuta utbrottet, dels undersöka om antikroppar kan detekteras vid sex respektive 30 månader. Proverna analyserades med två olika serologiska metoder, komplementbindningstest och en indirekt ELISA. Komplementbindningstest mäter IgM-antikroppar mot EHV-1/EHV-4. ELISA mäter IgG-antikroppar och kan skilja på IgG specifika för EHV-1 respektive EHV-4.

En hög seropositivitet mot EHV-1 observerades bland de 55 hästar som provtogs under det akuta utbrottet, där både symptomfria (n = 19) och sjuka (n = 34) samt två okategoriserade hästar ingick. Fler hästar var seropositiva vid analys med komplementbindningstest (72,7 %, n = 55) än vid analys med ELISA (69 %, n = 55) vid detta tillfälle. Vid analys hade även hästar (nio av 19) som inte uppvisat symptom, serokonverterat i ELISA och dessa individer var sannolikt smittade under utbrottet och bidrog till att smittspridningen fortsatte i stallet under flera veckor. IgG-antikroppar kunde detekteras hos sju av 12 hästar som varit kliniskt sjuka sex månader innan provtagning och hos 17 av 34 hästar vid provtagning 30 månader efter utbrottet. Bland de 17 hästarna fanns både individer som varit kliniskt sjuka under utbrottet och individer som förblev symptomfria. Det observerades ingen skillnad i hur höga antikropps nivåer som de kliniskt sjuka hästarna hade vid det akuta utbrottet, sex och 30 månader efter exponering.

Resultatet från studien visar att det kan vara fördelaktigt att utföra serologiska analyser under ett akut utbrott av EHV-1, som komplement till PCR-test, eftersom antikropparna är mätbara under en längre tid. Tidsfönstret för PCR är betydligt kortare än tiden som antikroppar kan detekteras, vilket gör att man riskerar att missa smittade hästar, speciellt om de är tysta smittbärare.

Nyckelord: EHV-1, EHV-4, ekvin herpes myeloencefalopati, virusabort, seroprevalens, serologi ELISA, komplementbindningstest.

Abstract

Infection with EHV-1 and EHV-4 are common in horses all over the world. Both viruses usually cause respiratory disease, but EHV-1 is also known to cause abortion and neurological disease. EHV-4 can also cause abortion, but more seldom. A major issue with the viruses is their ability to cause latency in neurons. The latent infection can be reactivated later in life and be the source of infection to other horses. Infection with EHV-1 leads to a short-lived immunity (weeks-months), but some studies have shown persisting antibodies after years from the outbreak.

The aim of this study was to analyze the antibody-response after an acute outbreak of EHV-1 and observe if antibodies could be detected six respectively 30 months after an outbreak. By comparing the results, conclusions about the spread during the acute outbreak could be made. The samples were analyzed with two serological methods, complement fixation test and an indirect ELISA. The complement fixation test measures IgM for EHV-1/EHV-4 and the ELISA measures IgG which is specific for EHV-1 respectively EHV-4.

The results showed a high seropositivity for EHV-1 during the acute outbreak, a little bit higher when analyzed by complement fixation test (72,7%, n = 55) than with the ELISA (69%, n = 55). After analysis of the samples, it was clear that a few horses (nine of 19) had seroconverted despite absence of clinical signs, and it is likely that these horses were silent carriers of the virus and contributed to the spreading of the virus. The study was able to detect antibodies of IgG-type in seven out of 12 horses, that all had shown clinical symptoms, six months prior to sampling. IgG was detected in 17 out of 34 horses that was tested 30 months after the outbreak, among these 17 horses there were both horses that remained asymptomatic and horses with clinical signs during the outbreak. Statistical analysis did not show any difference in the antibody response of the different groups during the acute outbreak, after six month or 30 months.

The conclusion of this study was that serological testing of horses suffering from an outbreak of EHV-1, is a useful complement to PCR-testing, since the antibodies are detectable for a longer time. The diagnostic window of PCR is much shorter than antibody detection, which can lead to silent carriers remains undetected.

Keywords: EHV-1, EHV-4, equine herpes myeloencephalopathy, virus abortion, seroprevalence, serology, ELISA, complement fixation test.

Innehållsförteckning

Förkortningar	9
1. Inledning.....	11
2. Litteraturoversikt	13
2.1. Herpesvirus	13
2.1.1. Ekvina herpesvirus.....	13
2.2. Ekvint herpesvirus typ 1 och 4	14
2.2.1. Smittspridning	15
2.2.2. Patogenes.....	16
2.2.3. Klinisk bild	18
2.3. Immunsvar vid infektion med EHV-1	20
2.3.1. Antikroppssvar	20
2.3.2. Övriga immunmekanismer.....	22
2.4. Prevalens och seroprevalens av EHV-1 och EHV-4	23
3. Material och metoder	27
3.1. Studiedesign	27
3.2. Studiepopulation och material	27
3.3. Metoder.....	28
3.3.1. Komplementbindningstest	29
3.3.2. ELISA.....	31
3.4. Statistisk analys.....	32
4. Resultat.....	34
4.1. Komplementbindningstest för IgM mot EHV-1/EHV-4	34
4.1.1. Studiepopulation A.....	34
4.2. ELISA för IgG mot EHV-1	36
4.2.1. Studiepopulation A.....	36
4.2.2. Studiepopulation B.....	38
4.2.3. Kontrollgrupp och jämförelser av grupper	38
4.3. Fallbeskrivningar från under det akuta utbrottet i studiepopulation A	39
4.3.1. Symtomfria smittbärare.....	39
4.3.2. Serokonvertering bland symtomfria hästar	40
4.3.3. Sjukdom utan serokonvertering	41

4.4.	Observerad seropositivitet och seroprevalens i studien.....	42
5.	Diskussion.....	43
5.1.	Smittspridning i studiepopulation A vid akut utbrott	43
5.1.1.	Symtomfria smittbärare.....	45
5.1.2.	Samband mellan serokonvertering, sjukdom och PCR-resultat?	46
5.2.	Hur länge kan antikroppar detekteras och hade den kliniska presentationen betydelse för antikroppssvaret?	47
5.3.	Observerad seropositivitet och seroprevalens	48
5.3.1.	EHV-1	48
5.3.2.	EHV-4	49
6.	Konklusion	51
	Referenser.....	52
	Populärvetenskaplig sammanfattning	58

Förkortningar

CF	Komplementfixerande antikroppar
CTL	Cytotoxiska T-lymfocyter
EHM	Ekvin herpes myeloencefalopati
EHV	Ekvint herpesvirus
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
Ig	Immunoglobulin
PCR	Polymerase chain reaction
pCTL	Prekursorceller till cytotoxiska T-lymfocyter
SVA	Statens veterinärmedicinska anstalt
VN	Virusneutraliserande antikroppar

1. Inledning

Ekvint herpesvirus typ 1 (EHV-1) är ett virus som kan orsaka allvarlig sjukdom hos hästar. Årligen orsakar viruset stora ekonomiska förluster inom hästnäringen, och det utgör ett hot mot hästars välfärd (Kydd *et al.* 2006). EHV-1 är inte det enda herpesviruset som orsakar sjukdom hos hästar utan det finns idag totalt nio kända herpesvirus som kan infektera hästdjur (Paillot *et al.* 2008). EHV-1 kan orsaka luftvägsinfektion, abort hos dräktiga ston eller neurologisk sjukdom (SVA, 2021). Det finns även beskrivet att EHV-1 kan orsaka neonatal död hos föl samt påverka ögonen, bland annat i form av korioretinopati (Slater *et al.* 2006). EHV-4 är närbesläktat med EHV-1 och orsakar i de flesta fall enbart luftvägsinfektion, men kastning förekommer också. Infektion med EHV-4 är vanligt och ger främst klinisk sjukdom hos unga hästar (Patel & Heldens 2005; Reed & Toribio 2005). EHV-1 och EHV-4 är de herpesvirus som varit mest problematiska inom hästnäringen då konsekvenserna av infektion kan bli allvarliga (Slater *et al.* 2006). Baserat på symtombilden som virusen orsakar benämns sjukdomen som EHV-1 och EHV-4 orsakar, ibland för rhinopneumonit eller virusabort.

EHV-1 har de senaste åren fått större uppmärksamhet på grund av allt oftare förekommande utbrott där hästarna utvecklade neurologiska symtom (Reed & Toribio 2005; Lunn *et al.* 2009). Trots att mycket forskning genomförts kvarstår många frågetecken kring virusets interaktion med immunförsvaret, vilket behöver studeras vidare för att få en klarare bild och för att kunna hantera framtida utbrott. Det var länge en utmaning att serologiskt kunna skilja infektion med EHV-1 från EHV-4 eftersom antikropparna korsreagerar i stor utsträckning (Crabb *et al.* 1995), men under 1990-talet gjordes stora framsteg och en ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) togs fram som kan särskilja antikropparna mot respektive virus (Crabb *et al.* 1995).

Syftet med denna studie var att undersöka hur hästar som exponerats av EHV-1 under ett utbrott utvecklar antikroppar mot viruset. Studien undersöker även om det var någon häst som serokonverterade utan att uppvisa kliniska tecken, eller om någon sjuk häst inte bildade antikroppar. Syftet var också att undersöka om serumantikroppar efter exponering av EHV-1 kan detekteras efter sex respektive 30 månader. Den här studien undersökte serumprover från hästar som exponerats för

EHV-1 i olika utbrott där feber och neurologisk sjukdom observerats och mätte antikropps nivåer med två olika metoder som mäter två olika antikroppar, IgM och IgG. Två olika grupper ingick i studien. En grupp provtogs först i samband med akut utbrott och uppföljande prover samlades in efter 30 månader. Den andra gruppen provtogs sex månader efter exponering. Genom att undersöka vilka hästar som serokonverterade och att jämföra analysresultat kan information om hur spridningen skedde vid det akuta utbrottet skapas.

2. Litteraturöversikt

2.1. Herpesvirus

Herpesvirus tillhör familjen *Herpesviridae* (Quinn *et al.* 2011). Det är en stor familj som består av fler än 100 olika virus och de kan infektera flera olika arter. Herpesvirus är uppbyggda av ett dubbelsträngat DNA och har en ikosahedral kapsid. Kapsiden omges av tegument bestående av proteiner och enzymer som har betydelse för viruset replikation. Herpesvirus är höljeförsedda och på höljet finns ett antal olika glykoproteiner, antalet varierar mellan olika virus men det finns minst 10. Glykoproteinerna är viktiga för att viruset ska kunna ta sig in i och infektera celler. Eftersom herpesvirus har ett hölje är de också känsliga, vilket gör att de överlever dåligt i miljön samt är känsliga mot många desinfektionsmedel. De inaktiveras således snabbt utanför kroppen och smittar framför allt via närkontakt (Paillot *et al.* 2008; Quinn *et al.* 2011).

En betydelsefull del i spridningen av herpesvirus är dess förmåga att orsaka latent infektion. Viruset lägger sig då vilande i bland annat nervceller och utsöndras inte aktivt, men det kan senare reaktiveras och orsaka klinisk sjukdom och utsöndring av virus. Om det finns mottagliga individer kan dessa smittas. Mekanismen bakom latens är inte helt klarlagd men virusen har förmåga att orsaka en livslång infektion med periodisk reaktivering (Quinn *et al.* 2011).

2.1.1. Ekvina herpesvirus

Inom familjen *Herpesviridae* finns tre subfamiljer som är av betydelse för veterinärmedicinen, *alfa-*, *beta-* och *gamma-herpesviridae* (Quinn *et al.* 2011). De nio olika herpesvirus som kan infektera hästdjur tillhör subfamiljerna *alfaherpesviridae* och *gammaherpesviridae* och benämns EHV-1 till EHV-9. EHV-1, -3, -4, -6, -8 och -9 är alfaherpesvirus och EHV-2, -5 och -7 är gammaherpesvirus (Paillot *et al.* 2008).

EHV-1 till EHV-5 har häst som värddjur, EHV-6 till EHV-8 har åsnor som värddjur och EHV-9 har bland annat gaseller som värddjur (Paillot *et al.* 2008). Virusen kan

ge olika typer av klinisk sjukdom hos värddjuren. EHV-1 och EHV-4 ger vanligen respiratorisk sjukdom men kan även orsaka abort, och EHV-1 kan orsaka neurologisk sjukdom. EHV-3 kallas även godartad beskällarsjuka och ger blåsor på yttre könsorganen hos både ston och hingstar. EHV-2 och EHV-5 är vanligt förekommande hos friska hästar och orsakar oftast inte klinisk sjukdom. De kan dock påverka immunförsvaret och predisponera för andra infektioner. EHV-5 har även identifierats hos hästar som diagnosticerats med luftvägsinflammationer och lungfibros (SVA, 2021). Åsnans EHV-6 orsakar liknande sjukdom som EHV-3 gör hos häst och EHV-7 är åsnans motsvarighet till EHV-2. EHV-8 och EHV-9 orsakar liknande sjukdom hos sina respektive värddjur som EHV-1 gör hos häst (Paillot *et al.* 2008). Av de herpesvirus som har häst som värddjur är EHV-1 och EHV-4 de som är av mest klinisk relevans samt viktigast ekonomiskt och epidemiologiskt (Patel & Heldens 2005).

2.2. Ekvint herpesvirus typ 1 och 4

Tidigare klassades EHV-1 och EHV-4 inte som två olika virus utan den allmänna uppfattningen var att EHV-4 var en typ av EHV-1-infektion. Virusen benämndes då EHV-1 subtyp 1 respektive subtyp 2, där nuvarande EHV-4 motsvarade subtyp 2 (Ostlund 1993). Under 1980-talet utfördes studier där DNA från olika virusisolat analyserades, och det upptäcktes att isolat som förekommit samband med aborter skiljde sig från isolat som hittats i samband med respiratorisk sjukdom. Slutsatsen drogs att det var två olika virus som låg bakom variationen i den kliniska bilden (Sabine *et al.* 1981; Studdert *et al.* 1981). Först flera år senare började EHV-1 subtyp 2 benämnas som EHV-4 och därefter klassades de som två skilda virus (Patel & Heldens 2005).

Hela DNA-genomet för EHV-1 och EHV-4 har sekvenserats för ett flertal stammar. Telford *et al.* (1998) sekvenserade virusen och såg att båda genomerna består av dubbelsträngat DNA på 145–150 kb som kodar för 76 unika gener. När virusen jämfördes var de till viss del lika trots att de numera klassas som två egna virus. DNA:t visade sig överensstämma till 55-84 % beroende vilken gen det rör sig om och aminosyrorna är i vissa sekvenser mellan 55-96 % lika för de bägge virusen (Telford *et al.* 1998).

EHV-1 och EHV-4 anses ha minst 13 olika glykoproteiner. De är viktiga för virusens förmåga att infektera celler och spridning mellan celler. Eftersom de sitter på virusets yta är glykoproteiner ofta det som immunförsvaret riktar in sig på och därför har glykoproteiner varit i fokus vid utveckling av effektiva vaccin (van Maanen 2002). Paillot *et al.* (2006) sammanfattar att det finns 11 kända glykoproteiner hos EHV-1 vars funktion har studerats (Paillot *et al.* 2008).

2.2.1. Smittspridning

Både EHV-1 och EHV-4 är enzootiska i de flesta hästpopulationer och det uppskattas att 80-90 % av den totala hästpopulationen har träffat på bägge virusen innan två års ålder (Allen 2002). Studier som utförts i Australien visar att föl smittas med EHV-1 redan den första månaden i livet, även om stona varit vaccinerade. Fölen infekteras troligen av stona (Gilkerson *et al.* 1999a; Foote *et al.* 2004). Patel & Heldens (2005) resonerar att baserat på den höga seroprevalensen för EHV-4 i flertalet studier smittas sannolikt hästarna i tidigt ålder, även om det saknas lika tydliga epidemiologiska studier för EHV-4 som för EHV-1 (Patel & Heldens 2005).

Smittspridning kan ske både direkt och indirekt. Infekterade hästar utsöndrar viruspartiklar via övre luftvägarna och de kan spridas till andra hästar genom hosta eller nysningar (Stokes *et al.* 1991; SVA, 2021). Hos ston som aborterar innehåller foster, fostervätskor och efterbörden stora mängder virus som kan smitta andra hästar genom direktkontakt eller genom att miljön kontaminerats. Smitta kan även överföras via föremål och människor (Oladunni *et al.* 2019; SVA, 2021).

Latent infektion

Infektion med både EHV-1 och EHV-4 kan leda till latent infektion, vilket anses vara en betydande del i spridningen av sjukdomen och något som försvårar kontrollen. I en studie (Welch *et al.* 1992) blev 80 % av hästarna latent infekterade efter experimentell infektion med EHV-1. Latent virus hittades framför allt i lymfoida vävnader som dränerar luftvägarna men även i cirkulerande lymfocyter i blodet. Latent infektion med EHV-4 påvisades hos samtliga hästar i studien även fast de inte exponerats för det i studien. EHV-4 antogs komma från tidigare infektion med naturligt cirkulerande virus. Även EHV-4 påvisades latent i lymfoid vävnad och i cirkulerande lymfocyter (Welch *et al.* 1992).

Slater *et al.* (1994) utförde en studie där föl infekterades intranasalt med olika typer av EHV-1. Den primära infektionen resulterade i feber, virusutsöndring i nosflödet och viremi. Två månader efter det primära infektionstillfället stimulerades reaktivering genom administrering av dexametason, cyklofosamid och ciklosporin A. De fyra fölen som tidigare infekterats med en vild-typ av EHV-1 började utsöndra virus i nosflödet igen medan de två kontrollhästarna som infekterats med en muterad variant av EHV-1 inte gjorde det. Ingen viremi sågs hos de fyra fölen. Studien kom fram till att fölen hade blivit latent infekterade eftersom det gick att framkalla virusutsöndring genom att stimulera med läkemedel. Därefter utfördes obduktion för att undersöka var latent virus kunde påvisas. Virus hittades då i sensoriska nervkroppar i trigeminusganglierna och slutsatsen drogs att viruset även kan lägga sig latent där (Slater *et al.* 1994)

Allen *et al.* (2008) undersökte prevalensen av latent infektion med EHV-1 i submandibularlymfknutorna hos 132 fullblodsston. Latent infektion hittades hos 54 % av hästarna och av de latent infekterade hästarna bar 17 % på en neurotrop biovar (stam som setts orsaka neurologisk sjukdom) av EHV-1 (Allen *et al.* 2008). Pusterla *et al.* (2010) undersökte förekomst av latent infektion med EHV-1 i submandibularlymfknutor och trigeminusganglier hos hästar som obducerades. Av de undersökta hästarna var 15 % latent infekterade och det var fler hästar som hade latent virus i trigeminusganglierna än i submandibularlymfknutorna. Det hittades både neurotropa och icke neurotropa stammar i studien. Den här studien visade på mycket lägre prevalens av latent infektion av EHV-1 än i studien av Allen *et al.* (2008), vilket författarna tror kan bero på att hästarna tillhörde olika populationer (Pusterla *et al.* 2010).

Latent virus kan reaktiveras när hästar utsätts för stress, till exempel i samband med transport, avvänjning, operationer, fölning m.m. (Allen 2002). Bannai *et al.* (2021) visade att immunförsvaret mot EHV-1 påverkades av 12 timmars transport. De såg att virusneutraliserande antikroppar mot viruset minskade i sekret från övre luftvägarna, vilket kan påverka första försvaret mot infektion. I studien påverkades inte antikropps nivåerna i serum av transport (Bannai *et al.* 2021).

Subklinisk infektion

EHV-1 och EHV-4 kan orsaka subklinisk infektion och vid upprepade återinfektioner verkar även de kliniska tecknen bli mindre och mindre allvarliga (van Maanen 2002). Studier har visat att föl blir subkliniskt infekterade med EHV-1 tidigt i livet (Gilkerson *et al.* 1999a; b; Foote *et al.* 2004). Kydd *et al.* (2006) belyser i sin sammanfattande artikel att det inte är fastställt om dessa subkliniska infektioner leder till viremi och till latent infektion. Om det skulle vara så att fölen så pass tidigt i livet riskerar att bli latent infekterade har vaccination ett väldigt kort tidsfönster att verka (Kydd *et al.* 2006). Fölen hade behövt bli vaccinerade innan de exponeras för viruset för att eventuellt kunna förhindra att viruset lägger sig latent och därefter riskerar att reaktiveras under livstiden. Trots att subklinisk infektion antas vara relativt vanligt sammanfattar Lunn *et al.* (2009) att flera studier indikerar att subkliniska hästar inte bidrar till en betydande smittspridning utan smitta drivs av kliniska fall hos vuxna hästar (Lunn *et al.* 2009).

2.2.2. Patogenes

Studier har visat att primär virusreplikation av EHV-1 sker i övre luftvägarna och lymfknutor kopplade till övre luftvägarna (Kydd *et al.* 1994a; b, 2006). I experimentella försök har Kydd *et al.* (1994a, 1994b) påvisat infektiöst virus och virusantigen i bronkiella lymfknutor och lymfknutor som dränerar övre luftvägarna inom 12 timmar efter infektionstillfället. Det tyder på att viruset ger upphov till

immunförsvar redan under det akuta sjukdomsförloppet. I de övre luftvägarna infekteras först epitelcellerna, vilket innebär att viruset förekommer intracellulärt och enklare kan komma undan immunförsvaret. Därefter kan det snabbt sprida sig vidare och infektera ett flertal olika celltyper. Kydd *et al.* (2006) sammanfattar att EHV-1 har hittats i endotelceller, lymfocyter och dendritiska celler. Infektionen som sprids via lymfocyter är orsaken till att en cell-associerad viremi uppstår (Kydd *et al.* 2006).

När EHV-1 infekterat epitelceller i övre luftvägarna kommer cellerna att lysas vilket är orsaken till nosflödet som kan ses. Nosflödet innehåller stora mängder virus som kan smitta vidare till andra hästar (Reed & Toribio 2005). Vid infektion med EHV-1 har ofta en bifasisk feber observerats, vilket verkar sammanfalla med när utsöndring av virus sker. Stokes *et al.* (1991) såg ökad virusutsöndring i samband med temperaturökning dag ett-två och dag fem efter infektionstillfället. En annan studie visade att i samband med första och andra febertoppen utsöndrades virus från övre luftvägarna och i samband med den andra febertoppen observerades viremi (Goehring *et al.* 2010). I ytterligare en studie rapporterades viremi som startade i samband med den andra febertoppen (Gibson *et al.* 1992).

Den viremi som viruset kan orsaka kan i sin tur leda till sekundär replikation av virus på andra ställen i kroppen, vilket man tror är vad som sker när abortform eller neurologisk sjukdom utvecklas (Kydd *et al.* 2006). Vid abortformen infekteras endotelceller i livmodern och det uppstår tromber där som påverkar cirkulationen och slutligen leder till att stoet kastar (Kydd *et al.* 2006). Edington *et al.* (1991) har identifierat förekomst av virus i endotelceller hos både stoet och fostret och har även sett lesioner i placentan som bidragit till kastning. Infektion av endotelceller i endometriet spelar en stor roll i patogenesen vid abortformen. (Edington *et al.* 1991).

Smith *et al.* (1996) undersökte om det sågs skillnader i lesioner som uppkommit efter infektion hos ston i tidig och sen dräktighet genom att de utsattes för experimentell infektion med EHV-1 i olika månader av dräktigheten. Hos de ston som infekterades i tredje dräktighetsmånaden sågs mindre skador på blodkärl men inte tromber eller ischemiska skador, medan större skador på kärl och trombbildning sågs hos ston som infekterades i senare dräktighet (femte till nionde månaden) (Smith *et al.* 1996). Det är samstämmigt med att det oftare är ston i sen dräktighet som kastar, eftersom det är då skadorna till följd av infektion med EHV-1 blir mer omfattande.

Vid den neurologiska formen är förloppet inte lika välkänt, men det involverar sannolikt också infektion av endotelceller, formation av immun-antigenkomplex

och inflammation i kärl i ryggmärgen (Kydd *et al.* 2006). I en studie infekterades åtta ston med ett isolat av EHV-1 som isolerats från ett neurologiskt fall (Edington *et al.* 1986). Efter fyra dagar avlivades två ston och vid obduktion noterades infekterade endotelceller och tromber i nosslemhinnan och i ryggmärgen. Blodanalys från övriga hästar visade en minskning av cirkulerande trombocyter och förekomst av immun-antigenkomplex. Immun-antigenkomplex tros kunna bidra till de lesioner som ses vid EHV-1-infektion. Hos tre hästar förekom varierande grad av koordinationssvårigheter och de avlivades 9–10 dagar efter injektionstillfället. Vid obduktion kunde en hög förekomst av virus i endotelceller, trombbildning och blödningar påvisas i ryggmärg och hjärna (Edington *et al.* 1986).

Även om EHV-1 och EHV-4 har många likheter orsakar trots allt EHV-1 oftast mer allvarlig sjukdom. En orsak till det kan vara virusens olika förmåga att infektera celler och sprida sig vidare i kroppen. I en studie sågs det att EHV-1 hade förmågan att sprida sig till leukocyter som förekom i både epitelceller och i bindväven under basalmembranet (Vandekerckhove *et al.* 2011). EHV-4 observerades främst i leukocyter i epitelcellerna men var mycket sällsynt i leukocyter i bindväven. Slutsatsen var att de här skillnaderna mellan EHV-1 och EHV-4 gör att viremi är mer ovanligt till följd av infektion med EHV-4 än vid infektion med EHV-1. Virusets förmåga att infektera mononukleära celler och orsaka en cell-associerad viremi med spridning till reproduktionsorganen och CNS anses vara en viktig del i patogenesen vid virusabort och ekvin herpes myeloencefalopati (EHM). Därför är det således ovanligt att EHV-4 orsakar abort eller EHM, på grund av begränsningar av att orsaka en cell-associerad viremi (Vandekerckhove *et al.* 2011). I Stokes *et al.* (1991) studie sågs ingen viremi till följd av infektion med EHV-4 (Stokes *et al.* 1991).

2.2.3. Klinisk bild

Både EHV-1 och EHV-4 kan orsaka mild eller till och med subklinisk infektion (van Maanen 2002). Vid återinfektion är de kliniska tecknen ofta mildare (van Maanen 2002) och med åldern minskar allvarlighetsgraden på symtomen eftersom återinfektion sker naturligt under hela livet (Patel & Heldens 2005).

EHV-4 orsakar främst respiratorisk sjukdom och är vanligast förekommande hos yngre hästar. Kliniska tecken som kan ses är feber, anorexi, svullna lymfknotor och näsflöde som kan vara allt från seröst till mukopurulent (Mizukoshi *et al.* 2002; van Maanen 2002). Infektionen läker av och de kliniska symtom avtar efter två-sju dagar (van Maanen 2002). Abort till följd av infektion med EHV-4 sker sporadiskt (Quinn *et al.* 2011).

EHV-1 förknippas med respiratorisk sjukdom, abort och neonatal död hos föl samt neurologisk sjukdom (Quinn *et al.* 2011). Det finns även rapporterat att EHV-1 kan påverka ögonen (Slater *et al.* 2006) och vid experimentell infektion sågs koriorretinopati (Hussey *et al.* 2013). Respiratorisk sjukdom ses främst hos unga hästar (Kydd *et al.* 2006; Paillot *et al.* 2007). Vid experimentell infektion med EHV-1 har man sett kliniska tecken i form av bifasisk feber, förstörade submandibularlymfknutor, samt seröst till mukopurulent nosflöde (Stokes *et al.* 1991; Gibson *et al.* 1992).

Abort- och neonatal form

Dräktiga ston kan kasta om de smittas av EHV-1. Abort kan ske från femte dräktighetsmånaden men är vanligast mellan åttonde månaden och till slutet av dräktigheten (Kydd *et al.* 2006). 95 % av de EHV-1-inducerade aborterna sker de fyra sista månaderna av dräktigheten (van Maanen 2002). Van Maanen (2002) beskriver att inkubationsperioden varierar kraftigt vid abortformen, från 9 dagar till 4 månader. Enligt artikeln kan abort till och med ske åratals efter smittotillfället om viruset reaktiveras. Om ett sto kastat till följd av naturlig infektion med EHV-1 är det ovanligt att hon kastar av samma orsak i kommande dräktigheter (Kydd *et al.* 2006). Ston som smittas väldigt nära fölning kan få levande föl, men fölen är väldigt svaga och överlever oftast inte (Murray *et al.* 1998).

Neurologisk sjukdom

Neurologisk sjukdom orsakad av EHV-1 kallas även för ekvin herpes myeloencefalopati (EHM). Inkubationstiden vid neurologisk sjukdom är 6–10 dagar från infektionstillfället (van Maanen 2002). Vid utbrott av EHV-1 med neurologisk sjukdom har kliniska tecken i varierande grad beskrivits. Allt från mild ataxi, bakbenspares eller paralyt till att hästarna förblir liggande och inte kan resa sig upp. Feber, blåsatoni och ödem på ventrala buken och benen har även förekommit. Respiratoriska symtom i form av nosflöde har också setts i samband med neurologisk sjukdom (van Maanen *et al.* 2001; Goehring *et al.* 2006; Allen 2008; Negussie *et al.* 2017). Ofta börjar utbrott där en del av hästarna senare utvecklar neurologisk sjukdom med mildare symtom som feber och nosflöde, innan de neurologiska symtomen ses (van Maanen *et al.* 2001; Goehring *et al.* 2006). Prognosen för hästar som blivit allvarlig påverkade av neurologisk sjukdom är avvaktande (van Maanen *et al.* 2001).

Det är i dagsläget inte helt klarlagt varför vissa hästar utvecklar neurologiska symtom medan andra inte gör det vid infektion med EHV-1. Nugent *et al.* (2006) har påvisat en punktmutation i genen för DNA-polymeras (ORF30), som har visat sig vara mer frekvent förekommande hos stammar förknippade med neurologisk sjukdom (Nugent *et al.* 2006). Även om sambandet mellan mutationen och

neurologisk sjukdom är starkt, finns det fall med neurologisk sjukdom där den specifika mutationen inte har setts, vilket tyder på att det är flera faktorer som avgör om EHM utvecklas (Perkins *et al.* 2009). Sannolikt förekommer det skillnad i patogenicitet mellan stammar, där vissa kan affektera CNS (centrala nervsystemet) i större utsträckning (Nugent *et al.* 2006). Goodman *et al.* (2007) beskrev också att den här mutationen i DNA-polymeras oftare var förknippad med EHM och även med högre nivåer av viremi (Goodman *et al.* 2007). Allen (2008) beskriver också att det är magnituden av viremi som avgör om EHM utvecklas eller inte (Allen 2008).

Det finns teorier om att inte bara virusets genotyp utan även både värd- och miljöfaktorer spelar in i om hästarna utvecklar neurologisk form eller inte. Flera studier har sett att äldre hästar i större utsträckning utvecklar EHM (Goehring *et al.* 2006; Allen 2008). Hästar med hög feber under flera dagar har större risk att drabbas av EHM (Henninger *et al.* 2007; Burgess *et al.* 2012). I en studie (van Maanen *et al.* 2001) av ett utbrott på en ridskola drabbades 20 av 41 hästar av neurologiska formen, ston och valacker drabbades i lika stor utsträckning men det observerades att ston utvecklade svårare ataxi och förblev liggande i högre grad än vad valacker gjorde. I det studerade utbrottet drabbades inte ponnyer och mindre raser av EHM i samma utsträckning som andra raser (van Maanen *et al.* 2001).

2.3. Immunsvaret vid infektion med EHV-1

Under lång tid har forskare studerat immunsvaret vid infektion med EHV-1 för att förstå sig på sjukdomen bättre samt kunna hantera fall och utbrott. Flera olika studier har gjorts bland annat på vilket antikroppssvar som infektion ger upphov till samt andra immunologiska svar som kan ha betydelse för bland annat utveckling av vaccin. En stor del av forskningen har fokuserat på vilket antikroppssvar som ses, hur länge antikroppar finns kvar och vilka som anses vara skyddande mot sjukdom.

2.3.1. Antikroppssvar

Breathnach *et al.* (2001) utförde en experimentell studie där föl infekterades med EHV-1. Resultatet visade att infektionen inducerar ett effektivt lokalt immunförsvar i slemhinnan i form av virus-specifika antikroppar av subtypen IgA (immunoglobulin A). Det visade sig att förekomst av IgA hade neutraliserande effekt på viruspartiklar samt bidrog till minskad utsöndring av virus i kombination med andra immunförsvarsmekanismer. Slutsatsen drogs att IgA spelar en stor roll i ett första försvar mot infektion med EHV-1 även om det inte ger ett fullständigt skydd mot infektion. I studien sågs det att IgA utsöndras under en kortare period (veckor) men att utsöndringsperioden ökar vid upprepade infektioner (Breathnach *et al.* 2001).

Gibson *et al.* (1992) undersökte det serologiska svaret efter infektion med EHV-1 hos specifikt patogenfria föl (SPF-föl). De studerade specifika antikroppar mot EHV-1 som förekommer i serum, virusneutraliserande- (VN) och komplementfixerande-antikroppar (CF) som mättes genom virusneutraliseringstest respektive komplementbindningstest. Nivåer av EHV-1-specifika IgM (immunoglobulin M) och IgG (immunoglobulin G) undersöktes också genom radioimmunologisk analys. IgM har komplementfixerande egenskaper och IgG kan verka neutraliserande på virus. Under studien infekterades fölen två gånger och antikroppssvaret jämfördes efter första och andra infektionstillfället. Andra infektionstillfället skedde dag 61. Efter den primära infektionen sågs höga titrar av specifika VN- och CF-antikroppar mot EHV-1. VN-antikroppar kunde detekteras dag 14 och låg kvar i minst åtta veckor och liknande resultat sågs för CF-antikroppar. Även IgG detekterades i höga titrar under samma tidsperiod som VN och CF. IgM steg efter det första infektionstillfället men hade inför andra infektionstillfället börjat sjunka och efter den andra infektionen sågs enbart en mindre ökning av IgM jämfört med första infektionstillfället. IgM nådde sin högsta nivå tidigare än IgG, vilket författarna resonerar skulle kunna användas för att detektera om en häst nyligen har exponerats för viruset. I den här studien låg CF-antikroppar kvar i minst åtta veckor, vilket är längre tid än i tidigare studier. Trots att antikroppar mot EHV-1 och EHV-4 korsreagerar i stor utsträckning vid den här typen av test sågs inget eller ett mycket litet serologiskt svar mot EHV-4 i den här studien. Virusen har minst fyra liknande glykoproteiner vilket kan vara en anledning till korsreagens. Författarna diskuterar att det låga immunförsvaret mot EHV-4 här kan bero på att SPF-fölen är helt oimmuniserade medan tidigare studier har gjorts på icke SPF-föl, som kan ha träffat på virusen eller liknande virus tidigare (Gibson *et al.* 1992).

Stokes *et al.* (1991) studerade det humoral immunsvaret vid infektion med EHV-1. Initialt ingick tre seronegativa hästar som exponerades för EHV-1 vid 18 månaders ålder och 18 dagar efter första tillfället. Efter det första infektionstillfället sågs virusspecifika antikroppar av subtypen IgM dag fem, de högsta nivåerna sågs dag nio och de låg kvar på samma nivå tills dag 20 då de började sjunka. Specifika antikroppar av subtyp IgG sågs efter sex dagar och nådde sitt högsta värde dag 18, då andra infektionstillfället skedde, och IgG förblev därefter på samma nivå, mätt fram till dag 33. Författarna konkluderar att det sannolikt beror på B-minnesceller som skapats under första infektionen. Virusneutraliserande antikroppar samt antikroppar kopplade till antikropsberoende cellmedierad cytotoxicitet sågs dag 10 och var fortsatt höga dag 54 när sista provtagningen skedde (Stokes *et al.* 1991).

Det finns studier där hästar provtagits år efter infektion och där man har hittat EHV-1-specifika antikroppar. Grabb *et al.* (1995) provtog 10 hästar fyra år efter abort till

följd av EHV-1 och då hade sju av de tio stona kvarstående titrar av IgG-antikroppar (Crabb *et al.* 1995). Van Maanen *et al.* (2001) studerade ett utbrott av EHV-1 på en ridskola där feber och neurologisk sjukdom hade observerats. Ett år efter utbrottet togs uppföljande serumprover från 29 hästar och av dessa hade 27 kvarstående IgG-antikroppar specifika mot EHV-1. Medelvärdet av antikroppstitrar låg strax över gränsvärdet för samtliga 29 hästar. Hos några hästar som varit klinisk sjuka observerades en markant minskning i antikropps nivåer ett år efter exponering (van Maanen *et al.* 2001).

Vilka antikroppar ger ett skyddande svar och vilka gör inte?

Hannant *et al.* (1993) utförde en vaccinstudie på ponnyer med ett vaccin som dessförinnan testats på hamstrar och som visat sig skydda hamstrarna mot allvarlig infektion med EHV-1. I studien gav vaccinet upphov till höga titrar av VN-antikroppar som även hade en lång duration, men det gav inget skydd mot ny infektion med EHV-1. Dock sågs det en signifikant minskning av kliniska tecken, virusutsöndring och viremi jämför med kontrollgruppen. Slutsatsen drogs att titrar av VN-antikroppar inte korrelerar med skydd mot infektion (Hannant *et al.* 1993). Det beror troligen på att infekterade celler vid viremi uttrycker mycket få eller inga virusantigen och därför inte kan identifieras av immunförsvaret (Slater *et al.* 2006).

Stokes *et al.* (1991) drar slutsatsen i sin studie där experimentell infektion med EHV-1 utfördes att virus bäst kontrolleras i kroppen när det förekommer antikroppar som kan neutralisera virus eller effektorceller som kan utföra antikropps-förmedlad destruktion av viruscellen (ADCC). Samtidigt i studien sågs det att en häst drabbades av mer allvarliga symtom än övriga hästar, trots att den hästen hade ett tidigt antikropps svar i form av IgM och förekomst av virusneutraliserande antikroppar, men anledningen till den här skillnaden var oklar. Författarna konkluderar ändå att VN-antikroppar verkar vara en del i skyddet mot sjukdom (Stokes *et al.* 1991).

Perkins *et al.* (2019) undersökte en potentiell vaccinkandidat mot EHV-1 samt vad som verkar ge hästarna en skyddande immunitet. Skyddande immunitet var starkt kopplad till en typ av specifika IgG-antikroppar, IgG4/7. Dessa kan verka neutraliserande redan i övre luftvägarna och högre halter i blodet var även förknippade med ett bättre skydd mot sjukdom, minskad virusutsöndring och mindre risker för att viremi uppstår (Perkins *et al.* 2019).

2.3.2. Övriga immunmekanismer

Coombs *et al.* (2006) undersökte cytokinsvar hos icke immuna ponnyer och ponnyer som hade utsatts för upprepade infektioner med EHV-1. De icke immuna ponnyerna visade kliniska tecken och utsöndrade virus efter intranasal infektion

medan den immuniserade gruppen varken utsöndrade virus eller visade sjukdomstecken. De immuniserade ponnyerna hade både innan och efter infektionstillfället ett högre cellmedierat immunsvår med interferon-gamma-producerande (IFN- γ) lymfocyter jämfört med de icke immuna ponnyerna som hade ett mer generellt cytokinsvar. När immunsvaret hos grupperna analyserades hade de immuniserade ponnyerna ett högre immunsvår som karakteriserades av Th-1-svar med cytokinsvar mest med IFN- γ medan de icke immuna ponnyerna hade ett mer generellt cytokinsvar med både IFN- γ och IL-4. Coombs *et al.* (2006) menar att det tyder på att hästar som har ett tydligt svar med IFN- γ är mer immuna och att det är något som kan användas vid utveckling av vaccin (Coombs *et al.* 2006).

Paillot *et al.* (2007) visade att äldre hästar hade ett mer IFN- γ -medierat immunförsvar vid EHV-1-infektion, vilket kan kopplas till att äldre hästar sannolikt har utsatts för flera naturliga infektioner under längre tid. Det kan vara en anledning till att äldre hästar i studien utvecklade mildare sjukdomstecken (Paillot *et al.* 2007).

Flera studier indikerar att hästar är skyddade mot infektion med EHV-1 och allvarlig sjukdom vid närvaro av virusspecifika cytotoxiska T-lymfocyter. Högre nivåer av prekursorer till EHV-1-specifika cytotoxiska T-celler (pCTL) har visat sig vara förknippat med kortare duration och lägre nivåer av viremi. Ston som hade högre pCTL hade ett bättre skydd mot abort än ston med lägre nivåer (Kydd *et al.* 2003). Allen (2008) visade att samtliga hästar som hade infekterats med ett känt neurologiskt isolat av EHV-1 utvecklade neurologiska tecken och samtliga hade en låg nivå av EHV-1 specifika pCTL. Slutsatsen var att hästarna därför inte kunde kontrollera den cell-associerade viremin (Allen 2008). Även O'Neill *et al.* (1999) visade i sin studie liknande resultat och att vaccin som stimulerar ett pCTL-svar kan ge bättre skydd än nuvarande vaccin som finns tillgängliga på marknaden (O'Neill *et al.* 1999).

2.4. Prevalens och seroprevalens av EHV-1 och EHV-4

Eftersom EHV-1 och EHV-4 har stor påverkan på hästsporten och hästnäringen har det varit av intresse att undersöka förekomsten av dessa virus. Det har gjorts flera olika studier där bland annat prevalens och seroprevalens har undersökts.

Under 2016–2020 inkom prover som testades positiva för EHV-1 till SVA (Statens veterinärmedicinska anstalt) från 6–33 svenska hästar per år i samband med luftvägssjukdom. Många fler fall kan förekomma, då alla förkylda hästar inte provtas. Från 2021 började positiva luftvägsprover att rapporteras till Jordbruksverket. Mellan 2016–2020 rapporterades årligen 4–8 indexfall av aborter orsakade

av EHV-1, men det förekommer säkerligen fler fall även här eftersom alla ston som kastar och deras kastade foster inte provtas.

För den neurologiska formen av EHV-1 rapporterades det mellan 1-5 indexfall under åren 2016-2019 (SVA, 2021). I Sverige undersöktes förekomsten av antikroppar mot EHV-1 och EHV-4 i samband med nedsatt prestation hos travhästar (Back *et al.* 2015). Serum undersöktes med komplementbindningstest, vilket detekterar IgM-antikroppar mot både EHV-1 och EHV-4 men kan inte skilja mellan dem. I studien ingick 66 hästar och de provtogs upprepade gånger under studiens tid. 64 prover hade en antikroppstiter på 1:8 eller högre. Av dessa 64 kom 14 prover från hästar som vaccinerats mot EHV-1/4 fyra-åtta veckor innan provtagning. Det var 10 hästar som hade en fyrfaldig titerstegring i parprover, varav åtta hade vaccinerats fyra veckor tidigare. Två hästar var PCR-positiva för EHV-4 (Back *et al.* 2015). Utifrån resultaten går det inte att tolka seroprevalensen, bland annat eftersom det saknas information om antal prover som analyserades med komplementbildningstest och från vilka individer.

På ett större stuteri i Australien undersöktes förekomsten av antikroppar mot EHV-1 och EHV-4 hos 229 ston och deras 61–183 dagar gamla, ej avvanda föl. En specifik ELISA (intern metod, ej kommersiellt kit) användes som skiljer mellan IgG-antikroppar mot de bägge virusen. Seroprevalensen för EHV-4 var över 99 % hos både ston och föl. Seroprevalensen för EHV-1 var 26 % hos stona och motsvarande siffra för fölen var 11 %. I studien drogs slutsatsen att de seropositiva fölen hade infekterats nyligen och att det sannolikt var en specifik grupp av ston som var orsaken till infektion bland fölen (Gilkerson *et al.* 1999b).

I Mongoliet undersökte Pagamjav *et al.* (2011) seroprevalensen för en rad olika virus hos landets hästpopulation, bland annat EHV-1. Metoden som användes var ett virusneutraliseringstest. I studien testades 276 hästar och 68 % av dem var seropositiva för EHV-1. Positiva resultat sågs hos hästar spridda över hela landet. I en region var seroprevalensen lägre än övriga, sannolikt på grund av att det var en yngre population som provtogs (Pagamjav *et al.* 2011).

I Nya Zeeland rapporterades det första utbrottet med EHM 2014 och därefter undersökte Dunowska *et al.* (2015) förekomsten av EHV-1 och IgG-antikroppar mot EHV-1 respektive EHV-4 hos hästar som skickats till ett slakteri. Vid undersökningen provtogs retrofaryngeala lymfknutor och trigeminusganglier för att undersöka förekomst av latent infektion. Resultatet visade att 17 av 52 hästar var PCR-positiva för EHV-1. Hos 16 av de positiva hästarna återfanns viruset i lymfknutorna och en häst testade positivt i trigeminusganglier. Vid den serologiska analysen användes ett kommersiellt ELISA-kit (Svanovir EHV1/EHV4-Ab).

Samtliga hästar hade antikroppar mot EHV-4 och 21 % var positiva för EHV-1-specifika antikroppar (Dunowska *et al.* 2015).

I Turkiet undersöktes förekomst av IgG-antikroppar för EHV-1 och EHV-4 hos hästar, åsnor och mulor. Den serologiska analysen av hästserum gjordes med ELISA (Svanovir EHV1/EHV4-Ab) och för åsnor och mulors serum utfördes virusneutraliseringstest. Individerna som provtogs var asymtomatiska, ovaccinerade och hade en medianålder på 9 år. Av hästarna som testades hade 14,5 % antikroppar mot EHV-1 och motsvarande siffror för mulor och åsnor var högre (37,2 % respektive 24,2 %). Seroprevalensen för EHV-4 hos hästar var 81,7 %. En viktig slutsats av studien är även att mulor och åsnor skulle kunna ha betydelse i spridningen av EHV-1 och EHV-4 (Ataseven *et al.* 2009).

I sydöstra Polen undersöktes seroprevalensen hos utvalda hästar från 23 stall med olika typ av hästpopulationer. Totalt samlades 650 prover in från hästar och föl och proverna analyserades med ELISA från Svanova (Svanovir EHV1/4-Ab). IgG-antikroppar mot EHV-1 hittades hos hästar på 17 av 23 gårdar och seroprevalensen på besättningsnivå var mellan 5–50 % med ett medelvärde på 13,5 %. Antikroppar mot EHV-1 hittades bara hos hästar över ett års ålder. Antikroppar mot EHV-4 hittades hos hästar i samtliga stall med seroprevalens för de olika stallen på mellan 75–100 %, medelvärde 91,8 %. Seroprevalensen för EHV-4 var högre hos yngre hästar. I studien sågs ett positivt samband mellan seroprevalens för både EHV-1 respektive EHV-4 och antal hästar på stallen (Grądzki & Boguta 2009).

Azab *et al.* (2019) undersökte prevalens av och seroprevalens för EHV-1 och EHV-4 inom olika populationer av arabiska fullblodshästar i Egypten. Serologisk analys av 103 prover från kliniskt friska hästar utfördes med VN-test och en specifik ELISA (intern metod, ej kommersiellt kit) som skiljer mellan IgG-antikroppar för de två virusen. PCR användes för virusdetektion i 192 prover insamlade från kliniska fall där aborter eller respiratorisk sjukdom observerats. Prevalensen var 44 % för EHV-1 och 4 % för EHV-4, bland sjuka hästar. Med VN-testet var 52 % och 73 % seropositiva för EHV-1 respektive EHV-4. Med ELISA var 61 % av proverna seropositiva för EHV-1 och 99 % av proverna för EHV-4 (Azab *et al.* 2019).

I Spanien undersöktes prover från 334 hästar med ELISA (Ingezim Rinoneumonitis 14.HVE.K1, Ingenasa) och serumneutraliseringstest. Denna ELISA kan inte differentiera mellan IgG-antikroppar mot EHV-1 och EHV-4. Vid undersökning med ELISA var 53,6 % positiva för antikroppar mot EHV-1 och/eller EHV-4. Prover som var positiva eller ottydliga analyserades därefter med serumneutraliseringstest, vilken skiljer på antikroppar mot EHV-1 och EHV-4. Den observerade seroprevalensen efter analys med serumneutraliseringstest var 27,7 % för EHV-1

och 2,7 % för EHV-4. Det var vanligare med antikroppar mot EHV-1 än EHV-4, vilket skiljer sig från flera andra studier av seroprevalens. Författarna menar att studier av seroprevalens alltid bör tolkas med försiktighet eftersom de både virusen är delvis lika och skulle kunna orsaka korsreaktion i tester, även om testerna säger sig kunna skilja på antikroppar mot respektive virus. Dessutom poängterar Cruz *et al.* (2016) att de studier som visar högre seroprevalens för EHV-4 än EHV-1 genomförts med samma typ av ELISA (Svanova), och författarna menar att den metoden verkar överskatta seroprevalensen för EHV-4 till nackdel för EHV-1. Cruz *et al.* (2016) påstår sig även ha sett att seroprevalensen av EHV-4 överskattades i ELISA från Svanova, när ponnyer infekterades experimentellt. Data från den analysen är dock hittills opublicerad (Cruz *et al.* 2016). Det förefaller ske viss korsreaktion trots att metoden uppges vara specifik och kunna differentiera mellan EHV-1 och EHV-4. Konklusionen är att serumneutraliseringstest är ett bättre alternativ för att uppskatta den verkliga seroprevalensen (Cruz *et al.* 2016).

Tabell 1: Översikt av studier som studerat seroprevalens för EHV-1 och EHV-4 i olika länder.
 1. Gilkerson *et al.* 1999b, 2. Azab *et al.* 2019, 3. Pagamjav *et al.* 2011, 4. Dunowska *et al.* 2015,
 5. Grądzki & Boguta 2009, 6. Cruz *et al.* 2016, 7. Back *et al.* 2015, 8. Ataseven *et al.* 2009

Land	Antal hästar	Analysmetod	Seroprevalens EHV-1	Seroprevalens EHV-4
Australien ¹	458	Specifik ELISA (intern metod)	11–26 %	>99 %
Egypten ²	103	Virusneutraliseringstest och ELISA (intern metod)	52–61 %	73–99 %
Mongoliet ³	276	Virusneutraliseringstest	68 %	-
Nya Zeeland ⁴	52	Specifik ELISA (Svanovir)	21 %	100 %
Polen ⁵	650	Specifik ELISA (Svanovir)	5–50 % (13,5 %)	75–100 % (91,8 %)
Spanien ⁶	334	ELISA (Ingezim) och serumneutraliseringstest	27,7 %	2,7 %
Sverige ⁷	66	Komplementbindningstest	-	-
Turkiet ⁸	290	Specifik ELISA (Svanovir)	15 %	82 %

3. Material och metoder

3.1. Studiedesign

Serumprover från hästar analyserades för antikroppar mot EHV-1 och EHV-4. Resultaten jämfördes mot demografi, kliniska symptom och tid efter utbrott av EHV-1.

3.2. Studiepopulation och material

Studiepopulationen bestod av två grupper av hästar (A och B) som varit exponerade för varsitt utbrott av EHV-1 där feber och neurologiska symptom förekommit, samt en kontrollgrupp av friska hästar från olika besättningar i Sverige.

Den ena kliniska gruppen (A) bestod av 55 hästar, där alla utom en kom från samma stall. Nya fall med sjuka hästar dök upp under en period av minst tre veckor under utbrottet 2019. Information om ålder, ras och kön saknades för nio hästar. Övriga 46 hästar var mellan 6 till 22 år (medel 12,2 år), det var 13 ston och 33 valacker, och de var av raserna varmblod, sportponny, shetlandsponny och fjordhäst. Ingen av hästarna var vaccinerad mot EHV-1. Uppgifter om kroppstemperatur och kliniska symptom i samband med utbrottet hade lämnats till SVA och där fanns också historiska resultat för PCR-analyser för EHV-1 från 143 nässvabbprover från 54 hästar att tillgå.

Studiepopulation A fördelades i olika grupper beroende på klinisk bild; symptomfria hästar ($n = 19$), hästar med feber ($n = 17$) och hästar med neurologisk sjukdom ($n = 17$). Två hästar passade inte in i någon klinisk grupp och uteslöts ur de deskriptiva och statistiska analyserna när hästarna delades in efter klinisk bild, men de ingick vid analys av den totala antikroppsförekomsten. För att kunna jämföra antikropptiter i förhållande till när i sjukdomsförloppet som hästarna provtagits fick alla hästar en indexdag. De symptomfria hästarna tilldelades en indexdag när första fallet med EHV-1 konstaterades med PCR i stallet. För hästar med feber och

neurologisk sjukdom sattes indexdag till dess första dag med kliniska tecken på sjukdom, vilket var feber eller neurologiska symtom.

Från dessa 55 hästar fanns dels frysta serumprover (n = 69) som samlats in av SVA under det akuta utbrottet av EHV-1 (2019), dels togs uppföljande blodprover (n = 34) 30 månader efter utbrottet från de 34 hästar som ännu stod kvar i stallet. De uppföljande proverna samlades in som en del av detta arbete. Under det akuta utbrottet provtogs 12 hästar två gånger och en häst provtogs tre gånger under det akuta utbrottet. Övriga 42 hästar provtogs en gång under den perioden. Av de 34 uppföljande proverna delades 32 prover in efter vilka kliniska tecken som hästarna hade uppvisat under utbrottet; hästar som uppvisat feber (n = 12), hästar som uppvisat neurologiska tecken (n = 11) och symptomfria hästar (n = 9). Två hästar uteslöts på grund av oklar symtombild eller avsaknad av data för kroppstemperatur.

Den andra kliniska gruppen (B) bestod av 12 hästar som hade varit exponerade för eller sjuka i ett utbrott av EHV-1 2021 och vars serumprover samlats in av SVA cirka sex månader efter utbrottet. Hästarna delas in i grupper efter klinisk bild; symptomfri (n = 1), feber (n = 9) och neurologiska symtom (n = 2). Hästarna var i ålder 6 till 17 år (medel 9,1 år) och av varmlodsraser. Fem hästar var ston, fem valacker och två hingstar. En av hästarna hade tidigare vaccinerats mot EHV-1, men för över 10 år sedan.

Kontrollgruppen bestod av 44 hästar som provtagits för hälsokontroll eller inför export under mars och april 2021 och vars serumprover fanns sparade i SVA:s serumbank. Hästarna var från olika besättningar i olika delar av Sverige, i åldern 3 till 21 år (medelålder 10,1 år) och av varierande raser med kallblod, halvblod, varmlod och ponnyer representerade. Majoriteten var hingstar och i övrigt ingick två ston och en valack. För fyra hästar saknades information om ålder eller ras. Vaccinationsstatus för hästarna var okänd.

3.3. Metoder

Komplementbindningstest utfördes på serumprover som samlats in i samband med det akuta utbrottet i grupp A (n = 69). Analys med indirekt ELISA genomfördes på prover tagna vid det akuta utbrottet (n = 69) och uppföljande prover cirka 30 månader efter utbrottets start (n = 34) i grupp A, prover cirka sex månader efter exponering från hästar i grupp B (n = 12) samt på serumprover från kontrollgruppen (n = 44). Totalt analyserades 159 prover med ELISA.

3.3.1. Komplementbindningstest

Komplementbindningstest utfördes för att analysera förekomsten av IgM-antikroppar mot EHV-1 och EHV-4 i hästserumprover. Antikroppar av IgM-typ kan detekteras redan vid tidig infektion men sjunker sedan snabbt (veckor-månader). Metoden kan inte differentiera mellan EHV-1 och EHV-4 eftersom antikropparna korsreagerar i stor utsträckning. Kydd *et al.* (2006) beskriver att CF-antikroppar är kortlivade och komplementbindningstest lämpar sig bäst för att analysera parprover för att se om infektion skett nyligen, i from av titerstegring i andra provet (Kydd *et al.* 2006)

Metoden genomfördes enligt protokoll på SVA och till analysen användes 96-håls U-plattor. Vid varje omgång sattes alltid en platta med kontrollprover för validering av resultaten.

Pos						S2						+
Pos						S2						-
Neg						S3						+
Neg						S3						-
S1						S4						+
S1						S4						-
Ag+						Ag-						
K	K	K	K	K	K	K	K	K	BK	BK	BK	

Figur 1: Layout för U-plattor med kontroller. Pos = positiv referensserum, Neg = negativ referensserum, S = serumprover, Ag+ = positiv antigenkontroll, Ag- = negativ antigenkontroll, K = komplementkontroll, BK = blodkontroll, + = positivt antigen tillsattes till hela raden, - = negativt antigen tillsattes till hela raden.

S1						S5						+
S1						S5						-
S2						S6						+
S2						S6						-
S3						S7						+
S3						S7						-
S4						S8						+
S4						S8						-

Figur 2. Layout för U-plattor när fler än en platta sattes per dag. S = serumprov, + = positivt antigen tillsattes till hela raden, - = negativt antigen tillsattes till hela raden.

Innan analysen påbörjades inaktiverades komplement i serumproverna genom att proverna inkuberades i 30 minuter i +56° C vatten. Därefter tillsattes veronalbuffert

till brunnarna, 75 µL till de tre brunnar med blodkontroll, 50 µL till de nio brunnar med komplementkontrollen och till antigenkontrollen samt resterande brunnar tillsattes 25 µL. Sedan tillsattes 25 µL av respektive serumprov till radens första brunn samt 25 µL av positiv och negativ kontroll till avsedda brunnar för kontrollprover. Därefter titrerades brunnarna med 25 µL och de kvarvarande 25 µL kasserades.

Positivt antigen späddes med veronalbuffert till koncentrationen 1:4. Negativt antigen, det vill säga enbart cellkulturen, späddes med veronalbuffert till koncentrationen 1:4. Därefter tillsattes 25 µL av spätt positivt antigen till avsedda brunnar och 25 µL av spätt negativt antigen tillsattes till avsedda brunnar. Till serumkontroller tillsattes i stället 25 µL veronalbuffert för att uppnå samma volym i samtliga brunnar. Till antigen-kontrollen tillsattes 25 µL spätt negativt och spätt positivt antigen till avsedda brunnar.

Marsvinskomplement (Bio Jet Services, Uppsala) späddes till en koncentration på 1:36, vilket baserades på fårblodet som användes till hemolytiska systemet och hade testats ut tidigare för att få en lämplig koncentration. 25 µL av det spädda marsvinskomplementet tillsattes till samtliga brunnar förutom blodkontrollen och komplementkontrollen. Till komplement kontrollen tillsattes ospätt komplement till de tre första brunnarna, därefter i koncentrationen 1:2 i nästkommande tre brunnar och slutligen i koncentrationen 1:4 i de tre sista brunnarna. Plattorna tejpades och förvarades i kyl över natten i +4° C.

Ett så kallat hemolytiskt system bereddes genom att 10 ml fårblod (Håtunalab Ab, Bro) fylldes upp i ett centrifugrör och centrifugerades i tio minuter i 3000 rpm. Supernatanten togs bort med pipett och centrifugröret fylldes upp med veronalbuffert innan det centrifugerades i ytterligare tio minuter. Supernatanten togs bort och kvarvarande vätska såg klar ut och ingen tvättning ansågs nödvändig. Blodet späddes med veronalbuffert till en 1 %-lösning i en glasflaska och därefter tillsattes amboceptor (AbNova Pab11352), vilket är en antikropp riktad mot fårblodet. Till en 100 ml-flaska med 1 % fårblodslösning tillsätts 50 µL amboceptor. Flaskan inkuberades i 37° C vatten i 30 minuter. Blandningen förvarades sedan i kyl +4° C inför användning.

Nästkommande dag togs plattan och hemolytiskt system ut ur kylan för att hållas i rumstemperatur i 30 minuter. Därefter tillsattes 50 µL av hemolytiskt system till alla brunnar. Plattorna tejpades och inkuberades i 37° C i en timme innan de centrifugerades i 600 rpm i sju minuter inför avläsning som skedde med hjälp av en plattläsare med spegel.

Tre prover fick behandlas och analyseras igen eftersom serumkontrollen blev positiv. De behandlades genom att 0,2 ml serumprov samlades upp i ett eppendorf-rör och till det tillsattes 0,05 ml veronalbuffert. Blandningen inaktiverades i 37° C vatten i 30 minuter. Därefter tillsattes 0,55 ml veronalbuffert och blandningen inkuberades i 56° C gradigt vatten i 30 minuter. Proverna sattes om på U-plattan likt tidigare.

På de 13 hästar där parprover fanns kördes proverna samtidigt för att resultaten skulle kunna jämföras på ett säkrare sätt.

Resultatet erhöles i en antikroppstiter i intervallet 1:4 till 1:64. I den här studien tolkades provet som positivt om en positiv antikroppstiter erhöles, d.v.s. >1:4.

3.3.2. ELISA

Hästserumproverna analyserades med ett kommersiellt indirekt ELISA-kit (Svanovir EHV1/EHV4-Ab, Svanova AB, Sverige) för påvisande av IgG-antikroppar specifika för EHV-1 respektive EHV-4. Testet skiljer mellan de två virusen genom att EHV-4 har ett glykoprotein som ger upphov till ett specifikt immunsvaret som skiljer sig från immunsvaret vid infektion med EHV-1. Metoden har i flera studier (Crabb *et al.* 1995; Hartley *et al.* 2005) visat sig kunna differentiera mellan IgG-antikroppar för EHV-1 och EHV-4, som annars ofta korsreagerar vid tester. Hartley *et al.* (2005) jämförde den här typen av metod med komplementbildningstest och virusneutraliseringstest och kom fram till att ELISA var bättre på att identifiera serokonvertering efter exponering för EHV-1 och EHV-4 samt kunde skilja antikroppar åt medan virusneutraliseringstest och komplementbindningstest gav större andel falskt positiva för EHV-1 när hästarna i studien infekterats med EHV-4. Efter analys av prover som tagits från hästar som infekterats med EHV-1 gav komplementbindningstest och virusneutraliseringstest positivt för båda virusen (Hartley *et al.* 2005).

Testen utfördes till största del enligt tillverkarens instruktioner. En del av proverna som analyserades var dock värmebehandlade för att inaktivera komplement, trots att värmebehandling inte bör användas enligt instruktionen. För att utröna eventuell effekt av värmebehandling analyserades sju prover med och utan värmebehandling, och en genomsnittlig faktor för skillnaden räknades ut. Resultatet för värmebehandlade prover justerades med denna faktor i statistiska analyser och redovisningen av slutligt resultatet.

En 96-hålsplatta som redan var belagd med icke-infektiöst EHV-1-antigen, EHV-4-antigen och kontrollantigen användes. Innan analysen påbörjades togs kittet fram från kylen för att alla reagenser skulle anta rumstemperatur.

Serumproverna späddes 1:100 med avsedd buffert innan de tillsattes till respektive brunn. Proverna sattes i tre rader enligt figuren nedan, för att mäta EHV-1, -4 och en negativ kontroll för varje prov. Positiv kontroll för EHV-1 respektive EHV-4 tillsattes till avsedda brunnar samt negativ kontroll. Plattorna tejpades sedan och inkuberades under skakning i rumstemperatur i två timmar. Därefter tvättades plattorna med tvättbuffert som späts med avjoniserat vatten, steget upprepades fyra gånger. Mellan varje tvättomgång, samt efter sista tvätten knackades brunnarna ur för att tömmas helt på vätska. Efter tvätt tillsattes spätt konjugat till samtliga brunnar innan plattan förseglades och inkuberades i ytterligare en timme i rumstemperatur under skakning. Plattan tvättades och knackades därefter ur fyra gånger igen. Substratlösning tillsattes till alla brunnar, vilket startar en reaktion som färgar lösningen i brunnarna korrelerat till mängden specifika IgG-antikroppar för EHV-1 respektive EHV-4. Efter att ha inkuberats i 10 minuter tillsattes stopplösningen i samma ordning som substratlösningen tillsattes för att stoppa reaktionen. Därefter mättes absorbansen med spektrofotometer vid 450 nm.

EHV1			S6			S14			S22		
EHV4			S7			S15			S23		
NEG			S8			S16			S24		
S1			S9			S17			S25		
S2			S10			S18			S26		
S3			S11			S19			S27		
S4			S12			S20			S28		
S5			S13			S21			S29		
1	4	K	1	4	K	1	4	K	1	4	K

Figur 3. Layout för plattor vid ELISA. EHV1 = positiv kontroll EHV-1, EHV4 = positiv kontroll EHV-4, NEG = negativ kontroll, S = serumprover, 1 = rad belagd med EHV-1-antigen, 4 = rad belagd med EHV-4-antigen, K = rad belagd med negativt kontroll-antigen.

Det korrigerade absorbansvärdet beräknades för EHV-1 och EHV-4 genom att subtrahera absorbansvärdet för korresponderande brunn innehållande kontroll-antigen. Prover med ett korrigerat absorbansvärde $>0,2$ räknades som positiva och prover med ett korrigerat absorbansvärde $<0,2$ räknades som negativa i den här studien.

3.4. Statistisk analys

Data från analyserna sammanställdes i Microsoft Excel (version 16:55). Vid statistisk analys användes programmet IBM SPSS Statistics (version 28.0.1.0).

Studiepopulationen delades in i grupper baserat på när proverna togs och klinisk bild. Samtliga titervärden i komplementbindningstestet och OD-värden hos alla grupper utom den symptomfria gruppen var inte normalfördelade, och transformerades därför till logaritmisk skala innan statistisk analys genomfördes. Grupper jämfördes med hjälp av envägs-ANOVA och ansågs signifikant om $p = <0,05$.

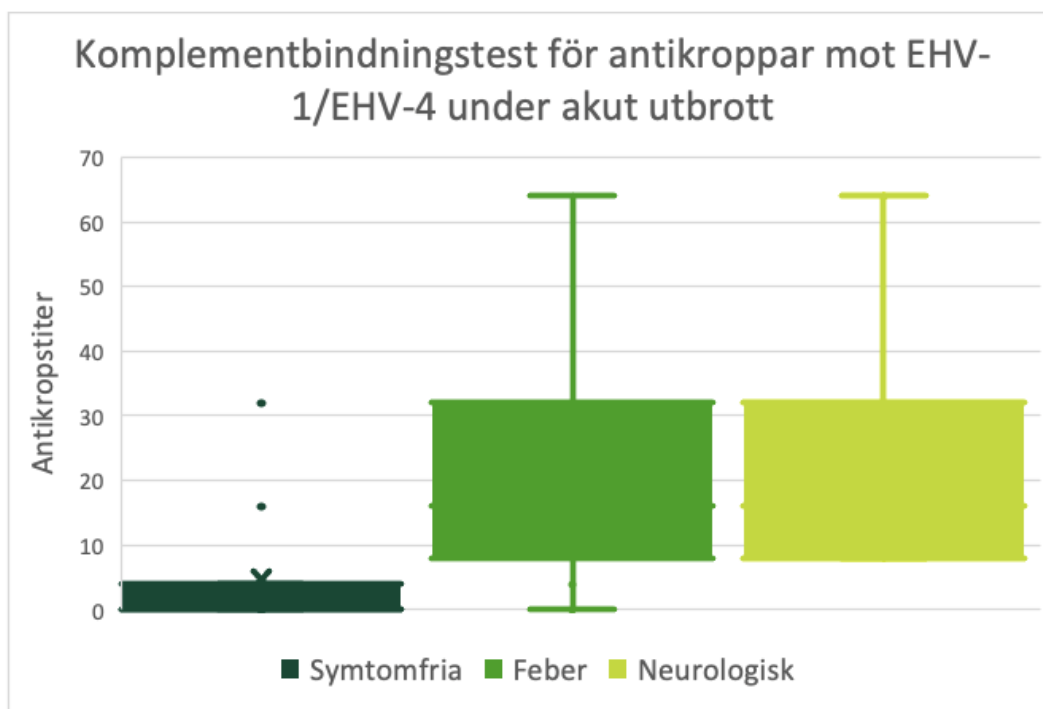
4. Resultat

4.1. Komplementbindningstest för IgM mot EHV-1/EHV-4

4.1.1. Studiepopulation A

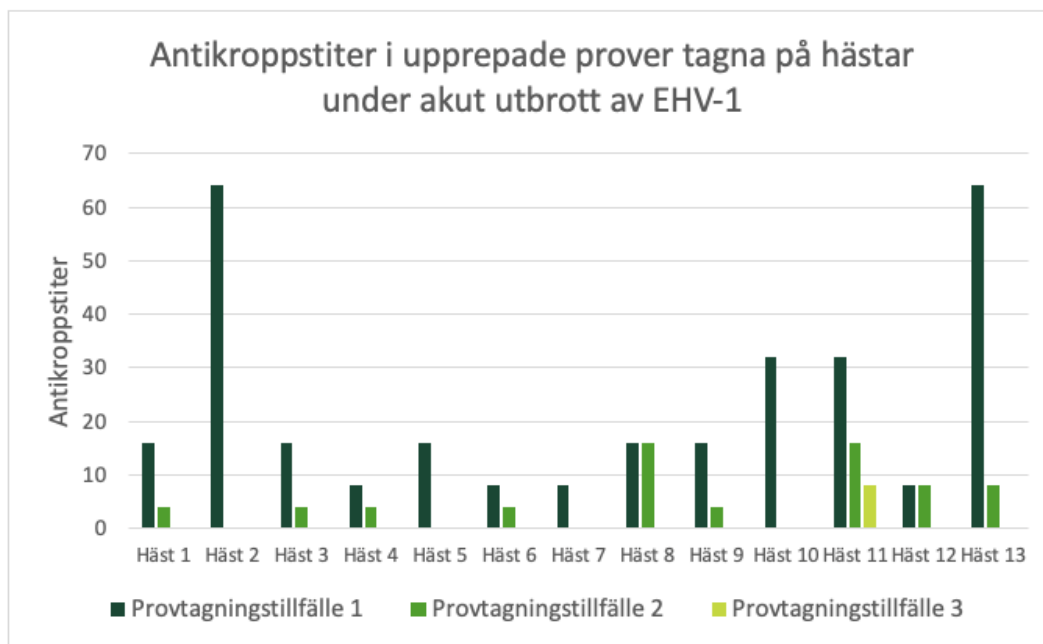
Från det akuta utbrottet analyserades 69 prover från 55 hästar i studiegrupp A med komplementbindningstest för IgM-antikroppar mot EHV-1/EHV-4. Totalt hade 50 prover från 40 hästar detekterbara antikroppar för EHV-1/EHV-4 med en antikroppstiter på 1:4 – 1:64.

Hästarna i den symtomfria gruppen provtogs dag 34 i förloppet, räknat från första positiva PCR-testet i stallet (från en häst med symtom). Dag 34 var 13 av 19 symtomfria hästar seronegativa för IgM mot EHV-1/EHV-4 och övriga sex hästar hade en IgM-antikroppstiter på 1:4-1:32. Median för den symtomfria gruppen var 0. Hästar med feber provtogs vid ett tillfälle dag 13 till 36 i förhållande till sin indexdag för första symtom. Två feberhästar var negativa för IgM-antikroppar och övriga 15 hästar hade en antikroppstiter på 1:4 till 1:64. Median för hela febergruppen var 1:16. Hästar med neurologisk sjukdom provtogs en gång var mellan dag 17 till 41 i sitt kliniska förlopp. IgM-antikroppar påvisades hos samtliga 17 neurologiska hästar med en antikroppstiter på 1:8 till 1:64. Median för den neurologiska gruppen var 1:16 (Figur 4). Statistisk analys visade att hästarna med kliniska tecken, feber respektive neurologisk sjukdom, hade högre IgM-antikroppstiter än den symtomfria gruppen ($p = <0,001$; $p = <0,001$ respektive). Det observerades ingen skillnad i IgM-antikroppstiter mellan hästar med feber och neurologisk sjukdom ($p = 0,192$).



Figur 4: Jämförelse av IgM-antikropstiter i serum analyserat med komplementbindningstest, hos hästar med olika klinisk bild under ett akut utbrott av EHV-1. Hästarna provtogs dag 13–41 i förhållande till sin symtomdebut (kliniska fall) eller från första påvisade fallet av EHV-1 i besättningen (symtomfria hästar).

Under det akuta utbrottet provtogs 13 hästar minst två gånger. Tio hästar tillhörde neurologiska gruppen, en häst tillhörde febergruppen och hos de övriga två observerades inga kliniska symtom men de testade positivt vid PCR. Hos 11 av 13 hästar sågs en minskning av IgM-antikropps nivåer analyserade med komplementbindningstest mellan provtagningsstillfällena (Figur 5). För alla hästar utom nummer 11 hade det gått 13–41 dagar från symtomdebut till första provtagningsstillfället och 51–75 dagar tills andra provtagningen. För häst nummer 11 var det 24 dagar mellan symtomdebut och första provtagningsstillfället, andra och tredje provet togs 41 respektive 60 dagar efter symtomdebut.



Figur 5: IgM-antikroppstiter mot EHV-1/EHV-4 hos 13 hästar vid olika provtagningstillfällena, analyserat med komplementbindningstest. Provtagningstillfälle 1: dag 13–41 efter symptomdebut; provtagningstillfälle 2: 34–36 dagar senare (dag 51–75 från symptomdebut) utom för häst 11, 17 dagar senare (dag 41 från symptomdebut); provtagningstillfälle 3: 36 dagar efter tillfälle 1 (dag 60 från symptomdebut). Häst 1–10 uppvisade neurologisk sjukdom, häst 11 hade feber och häst 12 och 13 var symptomfria

4.2. ELISA för IgG mot EHV-1

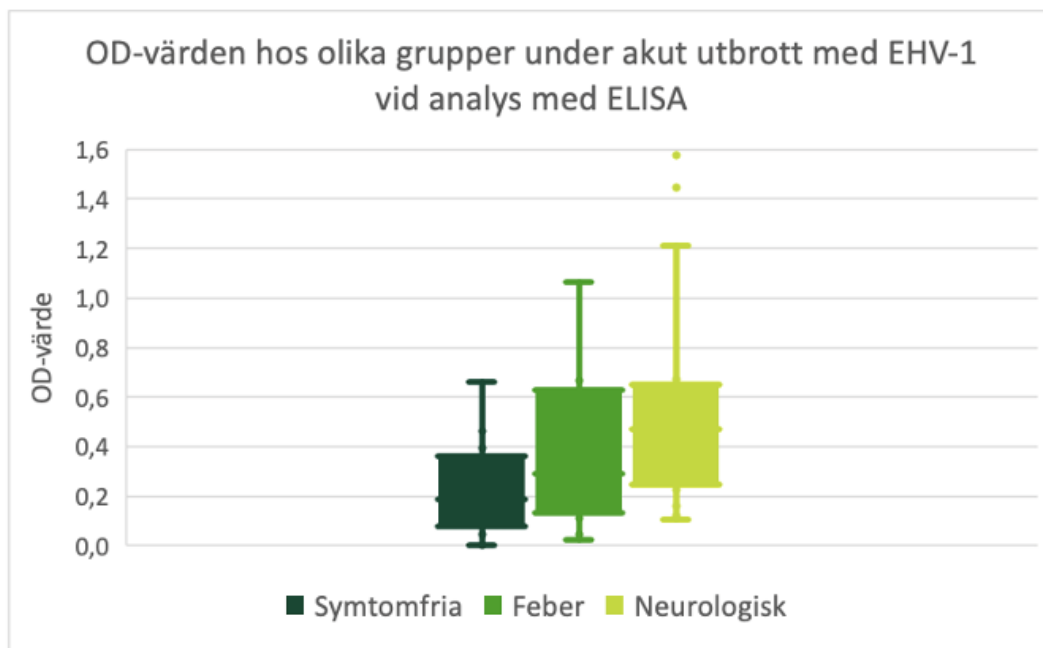
4.2.1. Studiepopulation A

En stor andel av serumproverna ($n = 69$) från det akuta utbrottet i grupp A hade värmebehandlats inför tidigare utförd komplementbindningstest när ELISA-analysen för IgG-antikroppar mot EHV-1 och EHV-4 genomfördes. Eftersom tillverkaren anger att ELISA-analysen ska utföras på icke värmebehandlade prover testades sju prover före och efter värmebehandling för att utröna effekten av densamma. Då värmebehandling visade sig ge cirka 20 % högre OD-värde justerades OD-värdena för EHV-1 på värmebehandlade prover ($n = 69$) ned med 20 %.

Akut utbrott

Den symptomfria gruppen hästar ($n = 19$), hade ett justerat OD-värde för IgG-antikroppar mot EHV-1 i serum mellan 0,002–0,662 (medelvärde 0,221) vid provtagning dag 34 efter indexdag (dagen med första konfirmerade PCR-resultat). Hästar med feber ($n = 17$) hade ett justerat OD-värde för antikroppar mot EHV-1 mellan 0,026–1,064 (medelvärde 0,376), vid provtagning dag 13–36 efter indexdag.

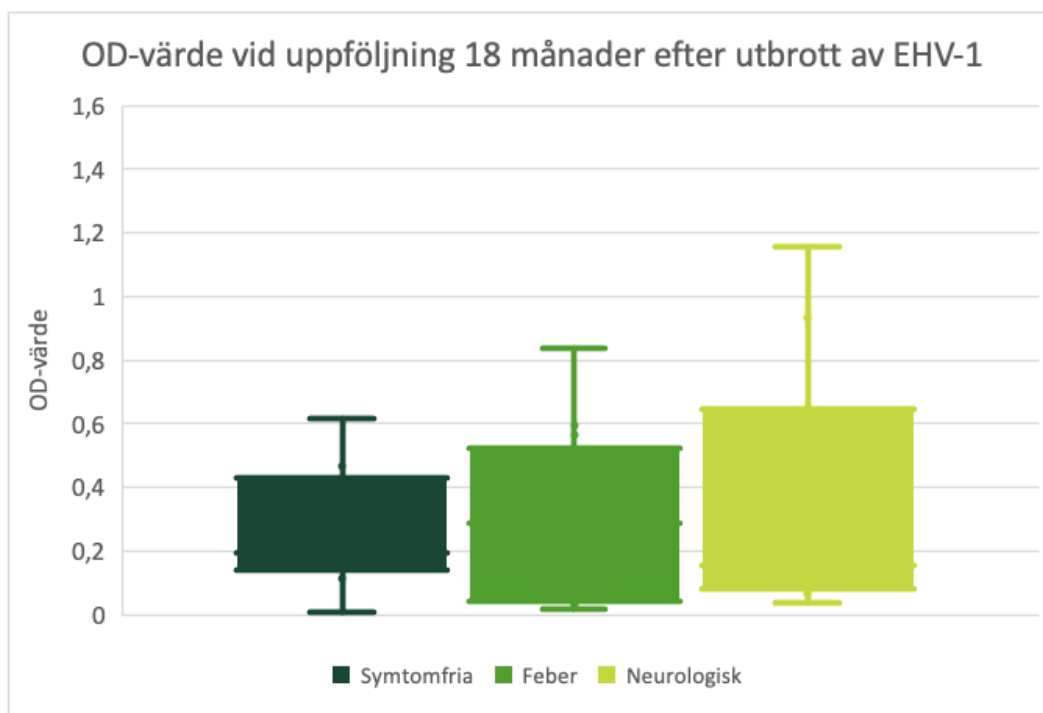
Hästar med neurologisk sjukdom ($n = 17$) hade ett justerat OD-värde för antikroppar mot EHV-1 mellan 0,106–1,575 (medelvärde 0,555), vid provtagning dag 17–41 efter indexdag (Figur 6). Statistisk analys visade att hästar med neurologisk sjukdom hade högre OD-värden än den symptomfria gruppen ($p = 0,015$) medan ingen skillnad sågs mellan den symptomfria gruppen och hästar med feber ($p = 0,151$) eller mellan hästar med feber och neurologisk sjukdom ($p = 0,592$). Vid jämförelse av OD-värden hos alla sjuka (feber plus neurologiska hästar) mot den symptomfria gruppen, hade de sjuka högre OD-värden ($p = <0,001$).



Figur 6: OD-värden enligt ELISA för IgG-antikroppar mot EHV-1 i serum från 53 hästar, dag 13–41 från symptomdebut eller första påvisade fallet av EHV-1. Symptomfria hästar, $n = 19$, hästar som haft feber, $n = 17$, hästar som haft neurologiska symptom, $n = 17$. Gränsen för positiv analys var $OD = 0,2$

30 månader efter utbrott

Vid uppföljning i grupp A 30 månader efter det akuta utbrottet fanns 34 av de tidigare provtagna hästarna tillgängliga, två uteslöts eftersom de inte kunde kategoriseras, och de övriga 32 uppvisade nu OD-värden för antikroppar mot EHV-1 mellan 0,009–1,155 (medel 0,310). Alla hästar var symptomfria vid uppföljningen. De hästar som hade varit symptomfria genom hela utbrottet hade nu OD-värden mellan 0,009–0,618 (medel 0,267; $n = 9$) vid uppföljning 30 månader senare. Hästarna från febergruppen hade nu OD-värden mellan 0,017–0,836 (medel 0,301; $n = 12$). De hästar som drabbades av neurologisk sjukdom under utbrottet hade nu OD-värden mellan 0,036–1,155 (medel 0,355; $n = 11$) (Figur 7). Det var nu ingen statistisk skillnad mellan OD-värdena hos de olika kliniska grupperna.



Figur 7: OD-värden enligt ELISA för antikroppar mot EHV-1 i serum hos 32 tillfrisknade hästar, 30 månader efter utbrott med EHV-1. Symtomfria hästar $n = 9$, hästar med feber $n = 12$, hästar med neurologisk sjukdom $n = 11$. Gränsen för positiv analys var satt till $OD = 0,2$.

4.2.2. Studiepopulation B

Hästarna i studiepopulation B som provtogs sex månader efter exponering för EHV-1 hade OD-värden för IgG-antikroppar mot EHV-1 i serum mellan 0,035–1,389 (medel 0,383; $n = 12$). En häst som aldrig hade uppvisat några symtom hade ett OD-värde för IgG-antikroppar mot EHV-1 på 0,174 vid uppföljningen. Hästarna som hade uppvisat feber hade OD-värden mellan 0,035–1,389 (medel 0,346; $n = 9$). Hästarna som hade visat neurologiska tecken hade OD-värden 0,513–0,795 (medel 0,654; $n = 2$). Det var ingen skillnad mellan OD-värden hos hästar som hade uppvisat enbart feber mot de som varit neurologiskt sjuka för 6 månader sedan ($p = 0,314$). På grund av att det bara ingick en symptomfri häst i studiepopulation B kan inga statistiska beräkningar genomföras för att jämföra de symptomfria mot de kliniskt sjuka hästarna.

4.2.3. Kontrollgrupp och jämförelser av grupper

Hos kontrollgruppen med 44 hästar från olika besättningar låg OD-värden för antikroppar mot EHV-1 mellan 0,001–0,602 (medel 0,092; median 0,037).

Nivåerna av IgG mot EHV-1 i serum var högre hos hästar som varit kliniskt sjuka (feber/neurologisk sjukdom) än hos kontrollgruppen vid samtliga tidpunkter; 13–41 dagar (grupp A; $p = <0,001$; $n=34$), sex månader (grupp B; $p = 0,002$; $n = 11$); respektive 30 månader efter symtomdebut (grupp A; $p = 0,002$; $n = 23$). Hos hästar som varit kliniskt sjuka fanns ingen signifikant skillnad i nivåerna av IgG mot EHV-1 i serum mellan tidpunkterna 13–41 dagar (grupp A), 6 månader (grupp B) respektive 18 månader (grupp A) efter symtomdebut.

Hästar från grupp A som aldrig visade kliniska symptom trots utbrott av EHV-1 i deras besättning hade ingen skillnad i nivåer av IgG mot EHV-1 i serum mot kontrollhästgruppen när de provtogs under dag 34 efter påvisat utbrott ($p = 0,135$; $n=23$), men vid uppföljningen 30 månader efter utbrottets start hade den symptomfria gruppen högre OD-värden jämfört med kontrollgruppen ($p = 0,029$; $n = 9$).

4.3. Fallbeskrivningar från under det akuta utbrottet i studiepopulation A

4.3.1. Symtomfria smittbärare

Häst X i studiepopulation A bodde i det stora stallet där hästar insjuknade kontinuerligt under flera veckors tid, men uppvisade inga tydliga kliniska tecken. Vid ett tillfälle, samma dag som det första positiva PCR-testet hade konstaterats, hade han 38,3 graders kroppstemperatur, vilket var exakt på gränsen som sattes i studien. Morgonen innan och morgonen efter hade häst X normal kroppstemperatur. Ett nässvabbprov som togs cirka en vecka senare, var positiv för EHV-1. Hästen antogs då vara en tyst smittbärare och flyttades till isolering. Tjugofem respektive 61 dagar efter det positiva testresultatet samlades serumprov in. Analys med komplementbindningstest på det första och andra serumprovet visade en IgM-antikroppstiter mot EHV-1/EHV-4 på samma nivå (1:8) vid båda tillfällena. Vid analys med ELISA för IgG mot EHV-1 av det första provet var det justerade OD-värdet 0,146 och till nästa provtagning Trettiosex dagar senare hade värdet sjunkit till 0,091, det vill säga under gränsvärdet 0,2. Vid uppföljning 30 månader efter utbrottet påvisades IgG mot EHV-1 med ELISA, med ett positivt OD-värde, 0,296.

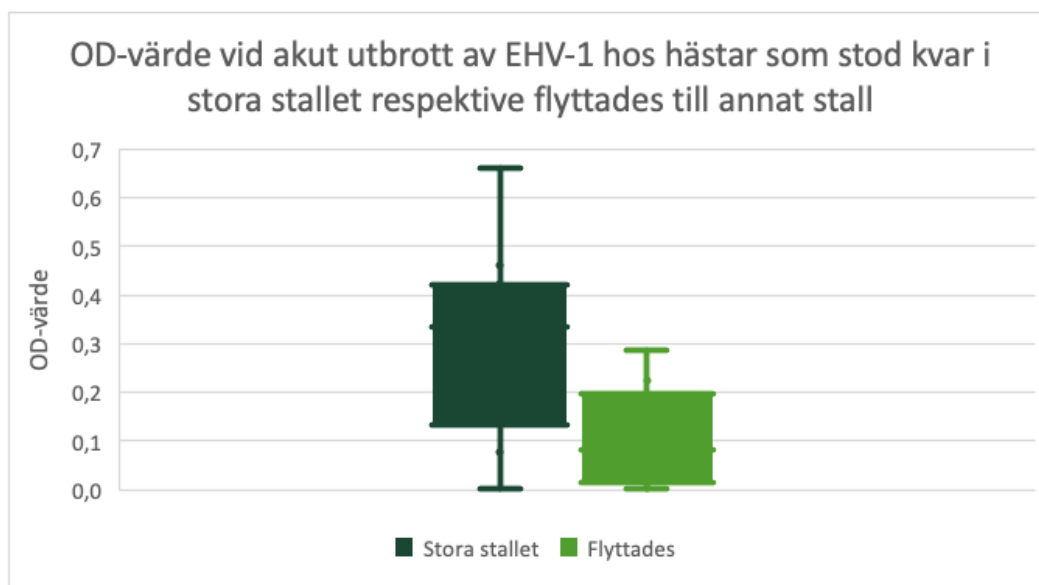
Ytterligare en häst klassades som symptomlös smittbärare under utbrottet, baserat på ett positivt PCR-svar från nässvabbprov. Av hanteringsorsaker gick det inte att kontrollera hästens kroppstemperatur utan data för det saknas. Analys med komplementbindningstest visade en IgM-antikroppstiter mot EHV-1/EHV-4 på 1:64 dag 25 efter det positiva PCR-provet medan nivån hade sjunkit till 1:8 dag 61. Vid analys med ELISA var det justerade OD-värdet för IgG-antikroppar mot EHV-

1 högt (1,4) dag 25 och dag 61 var det ännu högre (1,51). Vid uppföljning 30 månader efter utbrottet var OD-värdet fortsatt positivt, 0,483.

4.3.2. Serokonvertering bland symtomfria hästar

Nitton av de provtagna hästarna i studiepopulation A förblev symtomfria under hela utbrottet. Fem dagar efter att den första hästen konstaterades positiv på PCR flyttades åtta av dessa symtomfria hästar ut till ett isolerat stall där inga kliniska fall förekom. Resterande 11 stod kvar i det stora stallet där nya hästar fortsatte att insjukna under flera veckor.

Av de 19 provtagna, ständigt symtomfria hästarna var sex hästar seropositiva (1:4-1:32) i komplementbindningstest och nio hade IgG mot EHV-1 enligt ELISA, 34 dagar efter det första konfirmerade fallet. Samtliga sex som var positiva i KB-testet tillhörde den grupp av 11 ständigt symtomfria hästar som stod kvar i stora stallet, och fem av de hästarna plus två till från symtomfria gruppen som stod i stora stallet (n = 7) hade serokonverterat med IgG-antikroppar mot EHV-1 (OD 0,311–0,662, medel 0,421) vid tillfället. I den grupp av åtta symtomfria hästar som flyttat ut hade två av åtta hästar serokonverterat med IgG mot EHV-1, med OD-värden precis över gränsvärdet (0,223–0,286) dag 34. De ständigt symtomfria hästarna som stod kvar i stora stallet (n = 11) hade dag 34 i förloppet ett korrigerat OD-värde mellan 0,002–0,662 (medel 0,304) för IgG mot EHV-1 vilket var högre än för de hästar som flyttades ut (n = 8), 0,002–0,286 (medel 0,107) (p = 0,017; Figur 8).



Figur 8: OD-värden enligt ELISA för antikroppar mot EHV-1 i serum under ett akut utbrott av EHV-1 hos en grupp av med 11 hästar som stod kvar i stallet bland hästar där insjuknanden förekom samt en grupp med åtta hästar som flyttades ut till ett stall utan sjuka hästar ($p = 0,017$). Gränsen för positiv analys var satt till $OD = 0,2$.

4.3.3. Sjukdom utan serokonvertering

Under det akuta utbrottet var det tre av 17 hästar med neurologiska symtom som inte hade serokonverterat med IgG mot EHV-1 i det första serumprovet (insamlat dag 19–39 från indexdag) som analyserades med ELISA. Däremot hade alla tre detekterbara antikroppstitrar (IgM mot EHV-1/EHV-4; 1:8-1:32) enligt komplementbindningstest. En av de tre IgG-negativa hästarna hade testat positivt för EHV-1 med PCR på nässvabbprov 34 dagar innan serumprovet togs, och den hade serokonverterat med IgG när ett andra serumprov togs (73 dagar efter indexdag). En annan häst testade positivt (PCR, EHV-1) samma dag som serumprovet togs och för en häst saknas PCR-resultat.

Fem av 17 hästar som insjuknade med feber hade inte serokonverterat med IgG mot EHV-1 i ELISA trots att det gått 28–36 dagar sedan symtomdebut. Av de fem var dock fyra positiva i komplementbindningstest (1:4-1:16). Två hästar som var negativa i ELISA och PCR dag 28–36 efter symtomdebut, testade dock positivt på PCR senare, dag 71–79 i förloppet. Vid uppföljning 30 månader senare hade en av de två hästarna antikroppar över det positiva gränsvärdet.

4.4. Observerad seropositivitet och seroprevalens i studien

I tabell 2 redovisas den observerade seropositiviteten vid olika tillfällen för studiepopulation A och B. I tabell 3 redovisas den observerade seroprevalensen hos kontrollgruppen.

Tabell 2: Den observerade seropositiviteten för EHV-1 och EHV-4 (ELISA) i respektive studiegrupp och den observerade seropositiviteten för EHV-1/-4 (komplementbindningstest). ND, inga data.

Observerad seropositivitet	IgG mot EHV-1	IgG mot EHV-4	IgM mot EHV-1/-4
Studiepopulation A - akut utbrott (n = 55)	69%	100%	72,7%
Studiepopulation A - 30 månader efter utbrott (n = 34)	50%	100%	ND
Studiepopulation B - 6 månader efter utbrott (n = 12)	58,3%	91,6%	ND

Tabell 3: Den observerade seroprevalensen hos kontrollgruppen för EHV-1 och EHV-4 vid analys med ELISA. ND, inga data.

Observerad seroprevalens hos kontrollgrupp	IgG mot EHV-1 (95% KI)	IgG mot EHV-4	IgM mot EHV-1/-4
Kontrollgrupp (n = 44)	13,6% (6,4; 26,7)	100%	ND

5. Diskussion

Syftet med studien var att få en uppfattning om hur smittspridningen skedde under ett akut utbrott av EHV-1, genom att utföra serologiska analyser av serumprover, samt att undersöka hur lång tid efter exponering som serumantikroppar kan detekteras.

5.1. Smittspridning i studiepopulation A vid akut utbrott

Det sanna indexfallet och datum för det är i studiepopulation A oklart. När EHV-1 konfirmerades med PCR för första gången hade det funnits sjuka hästar med kortvarig feber och i ett par fall lindriga eller allvarliga neurologiska symtom upp till drygt 20 dagar tidigare, men ingen av dessa hade konstaterats ha EHV-1 genom analys med PCR. En av hästarna provtogs serologiskt och hade antikroppar mot EHV-1, och en provtogs negativ för EHV-1 i PCR-analys av ett nässvabbprov. Även om det kan antas att dessa sjuka hästar hade EHV-1, sattes indexfallet i den här studien till det första konfirmerade fallet. Smittspridningen i studiepopulation A var svår att få kontroll över trots att sjuka och/eller PCR-positiva hästar genast flyttades till en isolerad avdelning från den tidpunkt EHV-1 första gången hade konfirmerats. Smittspridningen fortsatte ändå i stallet under tre veckor.

Inga serumprover analyserades serologiskt under tiden utbrottet pågick. När serumproverna analyserades i efterhand, sågs det att det fanns hästar som serokonverterat mot EHV-1 och/eller EHV-4 under det akuta utbrottet trots att de förblev symtomfria. Några uppvisade höga antikropps nivåer långt över gränsvärdet. Dessa hästar kan ha varit symtomlösa smittbärare som rimligen har bidragit till att smittan fortsatte cirkulera trots att man försökte stoppa spridningen baserat på övervakning av kliniska tecken och PCR-resultat. Hade proverna analyserats serologiskt redan under utbrottets gång, hade sannolikt fler smittade och potentiellt smittspridande hästar kunnat identifieras och isoleras.

Komplementbindningstest som mäter IgM har beskrivits vara ett användbart test under pågående utbrott. Parprover tas med minst 14 dagars mellanrum och om det ses en fyrfaldigstegring av antikroppar i serum anses hästen nyligen varit infekterad

(Kydd *et al.* 2006). Det är viktigt att det första provet tas i ett tidigt skede av sjukdomsförloppet för att hamna inom fönstret innan antikropparna stiger för att i det parade provet kunna se en stegring som bevis på att hästen är smittad. Det beskrivs även vara användbart för hästar som är kliniskt friska men som varit i kontakt med smittade hästar, för att se om de har serokonverterat och då kan antas vara infekterade (Lunn *et al.* 2009). Gibson *et al.* (1992) nämner även att genom att mäta IgM och IgG kan man få en uppfattning om när hästen har exponerats för EHV-1. IgM når sin högsta nivå tidigare än IgG och har en högre nivå av IgM har den sannolikt infekterats nyligen (Gibson *et al.* 1992).

En fördel med serologisk analys jämfört med PCR är att antikroppar ligger kvar en längre tid (veckor-månader) (Kydd *et al.* 2006), medan fönstret för att detektera virus med PCR är betydligt kortare. PCR fångar bara upp hästar som aktivt utsöndrar virus, vilket i de flesta fall sker under ett fåtal dagar (Stokes *et al.* 1991; Goehring *et al.* 2010) och då gäller det att pricka in det för varje häst. I studien är det många hästar som testat positivt i serologiska tester men som inte var positiva vid de fåtal tillfällen när nässvabbprover undersöktes med PCR. Ett exempel i studien är en häst som hade antikroppar både i komplementbindningstest och ELISA men vid upprepade nässvabbprovtagningar var negativ vid PCR. Därför kan serologiska tester ge ett mer tillförlitligt svar på vilka hästar som har exponerats och smittats. Däremot behöver det kompletteras med PCR för att se om de fortfarande utsöndrar virus och är som mest smittfarliga.

I den här studien hade majoriteten av de parade hästserumproverna som analyserades med komplementbindningstest en avtagande antikroppstititer. Det indikerar att hästarna provtogs sent i förloppet, när de redan varit infekterade med viruset och hunnit få ett antikropsvar som redan är i avtagande. IgM-antikropparna anges i litteraturen (Stokes *et al.* 1991; Kydd *et al.* 2006) kunna sjunka snabbt, vilket stämmer överens med studiens resultat där antikroppstitern minskade eller försvann helt mellan provtagningstillfällena på drygt en månad. Det konfirmerade indexfallet vid utbrottet skedde 34–36 dagar innan de flesta hästserumproverna samlades in, men sannolikt tidigare, upp till 50 dagar innan den första provtagningen ägde rum för de flesta hästar. Resultatet indikerar att smittan hade cirkulerat i stallet och att hästarna exponerats och serokonverterat, kanske långt innan första serumprovtagning.

Komplementbindningstest skiljer inte på antikroppar mot EHV-1 och EHV-4, vilket är viktigt att komma ihåg. En del positiva prover kan vara positiva för enbart EHV-4, vilket är mycket vanligare än EHV-1. Sannolikt är dock många positiva till följd av EHV-1, eftersom vi vet att viruset cirkulerade bland hästarna genom

positiva PCR-svar från nässvabbprover samt kliniskt sjuka hästar med neurologiska symtom som stämmer överens för EHV-1.

Inom den symtomfria gruppen var det 11 hästar som stod kvar i stallet där smitta cirkulerade och som fick högre antikropps nivåer än de åtta hästar som flyttades ut. Det indikerar att det skedde en större smittspridning i det ursprungliga stallet än i det nya. Antingen fanns där tysta smittbärare eller så ”läckte” det smitta från den isolerade avdelningen i samma byggnad, via luft, människor, utrustning eller andra djur. Kanske hade ytterligare hästar klarat sig från smitta om det hade funnits möjlighet att skapa fler olika mindre separata grupper från början. Noggrann isolering av sjuka från friska hästar är ett effektivt sätt att hindra smittspridning (Lunn *et al.* 2009), men täcker inte för risken för symtomlösa smittbärare, där blir storleken på gruppen en faktor. Ju färre smittspridare en häst har i sin miljö desto lägre risk att hästarna utsätts för stora virusmängder och gör att de kanske klarar sig från klinisk sjukdom

5.1.1. Symtomfria smittbärare

Häst X i det akuta utbrottet klassades som en symtomfri smittbärare med anledning av ett positivt PCR-svar som analyserats på nässvabbprov. Serologiska analyser visar dock att de serumprover som togs en månad och 61 dagar efter det positiva PCR-resultatet var negativt för antikroppar i komplementbindningstest och ELISA, om hästen hade varit infekterad borde den rimligtvis ha serokonverterat när det andra provet togs 61 dagar efter PCR-resultatet. Den serologiska analysen tyder på att häst X inte var en äkta tyst smittbärare utan snarare att det positiva PCR-provet var falskt positivt på grund av kontamination. Men det går inte helt att utesluta att hästen var smittad med EHV-1, hästen kanske smittades men utan att immunförsvaret reagerade med att bilda antikroppar i serum. Vid uppföljning 30 månader efter utbrottet hade häst A en antikropps nivå strax över gränsvärdet. Antingen tog det längre tid än 61 dagar efter infektion för immunförsvaret att bilda antikroppar eller så har häst X serokonverterat senare till följd av ny smitta för att den flyttades till isoleringsstallet tillsammans med de sjuka hästarna. Serokonvertering sågs också hos många andra symtomfria hästar och det antas bero på att det fanns cirkulerande smitta även i det stall där enbart friska hästar skulle stå, vilket visades genom att nya fall uppkom dagligen.

Även en annan häst klassades som symtomfri smittbärare, men det kan vara en felaktig klassificering eftersom det saknas information om denna hästs kroppstemperatur. Analys av serumproverna visar att hästen har serokonverterat och hade höga antikropps nivåer. Sannolikt bidrog den hästen till att smittan spreds. Vid uppföljning 30 månader låg antikropps nivån högt över gränsvärdet. Den här hästen

genomgick högst troligt infektion, men om det var en symptomfri smittbärare eller hade klinisk sjukdom i form av feber vet vi inte.

5.1.2. Samband mellan serokonvertering, sjukdom och PCR-resultat?

De flesta hästar i studiepopulation A följde det klassiska mönstret, de exponerades och uppvisade kliniska tecken och serokonvertering kunde observeras i prover. Men det fanns även hästar som serokonverterade utan att visa symptom och hästar som hade symptom men som inte serokonverterade. Det var även en häst som testade negativt på upprepade PCR men som var positiv i de två serologiska testerna.

En häst med neurologisk sjukdom hade inte serokonverterat 39 dagar efter indexdagen, men i ett andra prov 73 dagar från indexdagen kunde antikroppar detekteras. Hästen var positiv i PCR på nässvabbprov en månad innan det första serumprovet togs. Resultatet tyder på att den här individens immunförsvar reagerade långsamt med att bilda antikroppar. Orsaken till det kan diskuteras, utsattes hästen för låg smittdos under längre tid så att tiden det tog att bilda antikroppar förlängdes eller fanns det faktorer hos den här individen som gjorde att ett tydligt immunsvaret saknades? Det är svårt att ta reda på i efterhand men av intresse att studera liknande individer i framtida utbrott för att lära sig mer om EHV-1.

En häst som uppvisade feber (upp till 39,1 grader) under flera dagar har inte serokonverterat alls och har inte heller testat positivt vid PCR. Berodde avsaknaden av antikropsvar på ett dåligt immunförsvar eller hade den här hästen drabbats av en annan infektion samtidigt som utbrottet pågick?

En annan häst som hade feber var negativ med ELISA i ett prov som togs 36 dagar efter dess indexdag och negativ vid uppföljning 30 månader senare. I komplementbindningstestet var antikroppstiter dock 1:32. Hästen var negativ vid PCR-undersökning. Var det här ytterligare en häst där immunförsvaret bildade antikroppar långsamt, och att om det funnits upprepade prover från det akuta utbrottet så hade vi sett serokonvertering? Och att antikropparna sedan sjunkit till uppföljning 30 månader senare? Eller berodde den här hästens symptom på EHV-4? Antikropps-nivåerna var så pass låga under det akuta utbrottet och 30 månader senare att det inte är sannolikt att hästen hade serokonverterat någon gång senare under det akuta utbrottet. Det fanns bara ett prov taget från hästen under det akuta utbrottet, varför det inte går att se om resultatet av komplementbindningstestet förändrades över tid, vilket skulle kunna indikera att hästen var smittad nyligen.

Att det fanns hästar som inte serokonverterade trots positiva PCR-svar eller som det tog lång tid för att serokonvertera, kan indikera att det är faktorer hos individen som avgör hur sjuk den blir samt vilket antikroppssvar som genereras och att det alltså inte enbart är virusets faktorer som styr. Det är därför fortsatt intressant att studera EHV-1 och dess interaktion med immunförsvaret. Dels för att få en bättre förståelse för viruset och vad det orsakar hos individen, dels förstå mer exakt vad det är som ger en skyddande immunitet eftersom viruset idag orsakar stora problem (Patel & Heldens 2005). Det är konstaterat att äldre hästar har ökad risk för att utveckla EHM när de smittas av EHV-1 (Goehring *et al.* 2006; Allen 2008) och att hästar med hög feber under flera dagar oftare utvecklar EHM (Henninger *et al.* 2007; Burgess *et al.* 2012). Några sådana faktorer har inte studerats i den här studien, dels på grund av att de sjuka hästarna behandlades med febernedsättande preparat som rimligen har påverkat magnituden av feber och vid analys hade gett ett falskt resultat. Det beskrivs även i litteraturen att neurologisk sjukdom till följd av EHV-1-infektion upplevs mer vanligt (Reed & Toribio 2005; Lunn *et al.* 2009). Eftersom det är en mycket allvarlig form som kan leda till döden är det av ännu större vikt för hästvälfärden att forska vidare för att öka förståelsen för sjukdomen och hur den bör hanteras.

5.2. Hur länge kan antikroppar detekteras och hade den kliniska presentationen betydelse för antikroppssvaret?

Nuvarande forskning hänvisar ofta tillbaka till att antikroppar mot EHV-1 är kortlivade (Reed & Toribio 2005; Kydd *et al.* 2006). Därför var det intressant att i den här studien visade resultatet att det finns hästar (50 %) som har antikroppar kvar 30 månader efter sjukdom. Det var ingen statistisk skillnad i antikropps nivåer hos hästar som hade varit sjuka med feber eller som hade varit neurologiskt påverkade. Det sågs heller ingen skillnad i antikropps nivåer vid provtagning sex månader respektive 30 månader efter utbrott av EHV-1, och den kliniska gruppen hade vid varje tillfälle högre antikropps nivåer än kontrollgruppen som antogs vara friska. I den här studien verkar det därför som att den kliniska presentationen inte är avgörande för hur höga nivåer av antikroppar som bildas, men att hästar som varit kliniskt sjuka får högre antikropps nivåer än de hästar som varit symptomfria.

Det finns ett fåtal studier publicerade där antikroppar har mätts en tid efter utbrott av EHV-1. Van Maanen *et al.* (2001) studerade ett utbrott av EHV-1 på en ridskola i Holland där feber och neurologisk sjukdom hade observerats. Ett år efter utbrottet togs uppföljande serumprover från 29 hästar och av dessa hade 27 kvarstående antikroppar mot EHV-1 (93 %). OD-medelvärdet låg strax över gränsvärdet för

samtliga 29 hästar, men hos några hästar som hade varit sjuka sågs en markant minskning i IgG-antikropps-nivåer ett år efter utbrottet (van Maanen *et al.* 2001). Det kan jämföras med att 11 av 23 hästar (47,8 %) som varit kliniskt sjuka var seropositiva för IgG mot EHV-1 30 månader efter utbrottet i den här studien, med ett medelvärde för de 11 seropositiva hästarna på nästan tre gånger gränsvärdet. Det var nio symptomfria hästar som provtogs vid uppföljningen 30 månader efter utbrottet och av dessa var fyra seropositiva för IgG mot EHV-1. Det finns flera gemensamma faktorer för det akuta utbrottet i den här studien och utbrottet på ridskolan i Holland. Båda utbrotten skedde på ridskolor och den kliniska presentationen var liknande. Prognosen för tillfrisknande efter att hästen blivit liggande till följd av neurologisk påverkan var dålig i van Mannen *et al.* (2001) studie. Under det akuta utbrottet avled 10 % till följd av neurologisk sjukdom, vid uppföljning fyra år efter utbrottet hade ytterligare fem hästar avlivats på grund av kvarstående symptom i form av ataxi och/eller urininkontinens. Flera av hästarna fick intensivvård och fick stöd att stå av så kallad hängmatta (van Maanen *et al.* 2001). I den här studiens studiepopulation A fick 19 % av hästarna med neurologisk sjukdom i stallet avlivas, trots att de fick stöd av så kallad hängmatta (Gröndahl, G., SVA, pers. medd., 2021).

Intressant att notera är att medelvärdet för antikropps-nivåer vid uppföljning 30 månader senare i föreliggande studie ligger mycket högre än i van Mannens *et al.* (2001), även om det var en lägre andel av de som varit sjuka som hade kvarstående antikroppar i den här studien. Även en annan studie har rapporterat kvarstående antikroppstitrar, Crabb *et al.* (1995) såg detta hos sju av 10 ston, fyra år efter ett utbrott med virusabort (Crabb *et al.* 1995). Även om flera publikationer (van Maanen 2002; Kydd *et al.* 2006) menar att antikroppar mot EHV-1 är kortlivade, talar resultatet i van Mannen *et al.* (2001) och i Crabb *et al.* (1995) samt resultatet i den här studien för att antikroppar kan detekteras flera år efter infektion.

5.3. Observerad seropositivitet och seroprevalens

5.3.1. EHV-1

Som förväntat var seropositiviteten för IgG mot EHV-1 hos hästar i stall som haft utbrott av EHV-1 (50–69 %) signifikant högre än hos de friska kontrollhästarna från olika stall i Sverige (13,6 %). Däremot skilde sig inte seropositiviteten för EHV-4 mellan grupperna, den var mycket hög i samtliga studerade grupper, 91,6–100 %. En avtagande andel av de studerade hästarna från utbrott var seropositiva över tid. Det var dock inte exakt samma hästar som provtogs vid de olika tillfällena. Antikropps-nivåer förväntas sjunka med tiden om ingen ny exponering sker men det

kunde inte påvisas någon sänkning av antikropps nivåerna (IgG mot EHV-1) under 30 månader för de hästar som varit kliniskt sjuka.

För kontrollpopulationen, vilket kan antas ge en bild av antikropps förekomsten hos den svenska hästpopulationen, var seroprevalensen för IgG för EHV-1 13,6 %. Resultatet är likvärdigt vad som observerats i studier från Turkiet (15 %) (Ataseven *et al.* 2009), Polen (13,5 %) (Grządziński & Boguta 2009) och Nya Zeeland, (21 %) (Dunowska *et al.* 2015). Seroprevalensen var lägre än i studier som använt virusneutraliseringstest (Pagamjav *et al.* 2011; Azab *et al.* 2019), vilket inte är orimligt då det förekommer korsreaktioner mellan antikroppar för EHV-1 och EHV-4 i testet. Hästarna i kontrollgruppen var inte randomiserat utvalda men kan ändå på flera sätt antas ge en adekvat bild av den svenska hästpopulationen då de var i varierande ålder (3–21 år), flera raser fanns representerade, och de kom från olika delar av landet. Dock var en stor del av hästarna hingstar.

5.3.2. EHV-4

I samtliga studiegrupper var den observerade seropositiviteten för IgG mot EHV-4 mycket hög, 91,6–100 %. Seroprevalensen för EHV-4 hos kontrollgruppen var 100 %. Det stämmer väl överens med rapporter om att EHV-4 är vanligt förekommande och att de flesta hästar har träffat på viruset (Allen 2002), det saknas dock nyare studier inom området. Flera andra studier av hästar i Australien (>99 %), Turkiet (82 %) och Nya Zeeland (100 %) (Gilkerson *et al.* 1999b; Ataseven *et al.* 2009; Dunowska *et al.* 2015) har rapporterat liknande resultat. Det finns dock en studie i Spanien (Cruz *et al.* 2016) med avsevärt lägre seroprevalens för EHV-4 (2,7 %) och där antikroppar mot EHV-1 var vanligare än antikroppar mot EHV-4. Det är tvärt emot tidigare nämnda andra studier (Gilkerson *et al.* 1999b; Ataseven *et al.* 2009; Dunowska *et al.* 2015). Cruz *et al.* (2016) har använt sig av en ELISA som inte skiljer mellan EHV-1 och EHV-4 och därefter utför ett SN-test på positiva eller oklara prover medan de andra (Gilkerson *et al.* 1999b; Ataseven *et al.* 2009; Dunowska *et al.* 2015) har använt sig av en ELISA från Svanova (Svanovir EHV-1/4-Ab), vilket även var samma metod som användes i den här studien. Cruz *et al.* (2016) menar att ELISA från Svanova överskattar förekomsten av EHV-4 till nackdel för EHV-1, och att den framför allt ger ett falskt högt värde för EHV-4. Fast att metoden påstås kunna differentiera antikroppar mot EHV-1 från EHV-4 menar författarna att det ändå sker korsreaktioner mellan antikropparna, baserat på opublicerad data från dem där ponnyer har utsatts för experimentell infektion med EHV-1 (Cruz *et al.* 2016). Det gjordes ingen utvärdering av olika testmetoder i studien, utan deras slutsats baserades enbart på den opublicerade data (Cruz *et al.* 2016). För att validera resultaten hade det varit intressant att gå vidare med andra tester, där man vet att antikroppar mot de olika virusen EHV-1 och EHV-4 kan särskiljas som till exempel serumneutraliserings- eller virusneutraliserings-test,

innan slutsatser dras om hur specifika metoderna är för antikroppar mot EHV-1 respektive EHV-4.

6. Konklusion

En konklusion är att serologiska tester, i form av komplementbindningstest och ELISA, är mycket användbara i arbetet med att identifiera smittade och potentiellt smittspridande hästar under ett akut utbrott av EHV-1. Fler smittade hästar fångades upp i de serologiska testerna än vad PCR-analysen vid ett enskilt tillfälle gjorde, men det fanns också motsatta resultat. Serologiska metoder kan användas som komplement till PCR, eftersom tiden antikroppar kan detekteras är betydligt längre än tidsfönstret för PCR.

Den andra konklusionen är att antikroppar kvarstår hos hästar, både sex och 30 månader efter utbrott med EHV-1 där feber och neurologisk sjukdom har förekommit. De flesta publicerade artiklar anger att antikroppar sjunker betydligt snabbare än så. Det gick inte att dra några slutsatser om att en specifik symtombild gav upphov till ett högre antikroppssvar än andra, men sjuka hästar fick ett högre svar än symtomfria hästar.

Referenser

- Allen, G.P. (2002). Respiratory infections by equine herpesvirus types 1 and 4. I: Lekeux, P (red). *Equine Respiratory Diseases*. International Veterinary Information Service
- Allen, G.P. (2008). Risk factors for development of neurologic disease after experimental exposure to equine herpesvirus-1 in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 69 (12), 1595–1600. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.12.1595>
- Allen, G.P., Bolin, D.C., Bryant, U., Carter, C.N., Giles, R.C., Harrison, L.R., Hong, C.B., Jackson, C.B., Poonacha, K., Wharton, R. & Williams, N.M. (2008). Prevalence of latent, neuropathogenic equine herpesvirus-1 in the Thoroughbred broodmare population of central Kentucky. *Equine Veterinary Journal*, 40 (2), 105–110. <https://doi.org/10.2746/042516408X253127>
- Ataseven, V.S., Dağalp, S.B., Güzel, M., Başaran, Z., Tan, M.T. & Geraghty, B. (2009). Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Research in Veterinary Science*, 86 (2), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.06.001>
- Azab, W., Bedair, S., Abdelgawad, A., Eschke, K., Farag, G.K., Abdel-Raheim, A., Greenwood, A.D., Osterrieder, N. & Ali, A.A.H. (2019). Detection of equid herpesviruses among different Arabian horse populations in Egypt. *Veterinary Medicine and Science*, 5 (3), 361–371. <https://doi.org/10.1002/vms3.176>
- Back, H., Penell, J., Pringle, J., Isaksson, M., Ronéus, N., Treiberg Berndtsson, L. & Ståhl, K. (2015). A longitudinal study of poor performance and subclinical respiratory viral activity in Standardbred trotters. *Veterinary Record Open*, 2 (1), e000107. <https://doi.org/10.1136/vetreco-2014-000107>
- Bannai, H., Takahashi, Y., Ohmura, H., Ebisuda, Y., Mukai, K., Kambayashi, Y., Nemoto, M., Tsujimura, K., Ohta, M., Raidal, S. & Padalino, B. (2021). Decreased virus-neutralizing antibodies against equine herpesvirus type 1 in nasal secretions of horses after 12-hour transportation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 103, 103665. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103665>
- Breathnach, C.C., Yeargan, M.R., Sheoran, A.S. & Allen, G.P. (2001). The mucosal humoral immune response of the horse to infective challenge and vaccination with equine herpesvirus-1 antigens. *Equine Veterinary Journal*, 33 (7), 651–657. <https://doi.org/10.2746/042516401776249318>
- Burgess, B.A., Tokateloff, N., Manning, S., Lohmann, K., Lunn, D.P., Hussey, S.B. & Morley, P.S. (2012). Nasal shedding of equine herpesvirus-1 from horses in an outbreak of equine herpes myeloencephalopathy in Western Canada. *Journal of*

Veterinary Internal Medicine, 26 (2), 384–392. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00885.x>

- Coombs, D.K., Patton, T., Kohler, A.K., Soboll, G., Breathnach, C., Townsend, H.G.G. & Lunn, D.P. (2006). Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111 (1–2), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.013>
- Crabb, B.S., MacPherson, C.M., Reubel, G.H., Browning, G.F., Studdert, M.J. & Drummer, H.E. (1995). A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Archives of Virology*, 140 (2), 245–258. <https://doi.org/10.1007/BF01309860>
- Cruz, F., Fores, P., Mughini-Gras, L., Ireland, J., Moreno, M.A. & Newton, J.R. (2016). Seroprevalence and factors associated with equine herpesvirus type 1 and 4 in Spanish Purebred horses in Spain. *Veterinary Record*, 178 (16), 398–398. <https://doi.org/10.1136/vr.103573>
- Dunowska, M., Gopakumar, G., Perrott, M.R., Kendall, A.T., Waropastrakul, S., Hartley, C.A. & Carslake, H.B. (2015). Virological and serological investigation of equid herpesvirus 1 infection in New Zealand. *Veterinary Microbiology*, 176 (3), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.016>
- Edington, N., Bridges, C.G. & Patel, J.R. (1986). Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Archives of Virology*, 90 (1–2), 111–124. <https://doi.org/10.1007/BF01314149>
- Edington, N., Smyth, B. & Griffiths, L. (1991). The role of endothelial cell infection in the endometrium, placenta and foetus of equid herpesvirus 1 (EHV-1) Abortions. *Journal of Comparative Pathology*, 104 (4), 379–387. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80148-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80148-X)
- Foote, C.E., Love, D.N., Gilkerson, J.R. & Whalley, J.M. (2004). Detection of EHV-1 and EHV-4 DNA in unweaned Thoroughbred foals from vaccinated mares on a large stud farm. *Equine Veterinary Journal*, 36 (4), 341–345. <https://doi.org/10.2746/0425164044890634>
- Gibson, J.S., O'Neill, T., Thackray, A., Hannant, D. & Field, H.J. (1992). Serological responses of specific pathogen-free foals to equine herpesvirus-1: primary and secondary infection, and reactivation. *Veterinary Microbiology*, 32 (3), 199–214. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90145-J](https://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90145-J)
- Gilkerson, J.R., Whalley, J.M., Drummer, H.E., Studdert, M.J. & Love, D.N. (1999a). Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. *Veterinary Microbiology*, 68 (1), 15–25. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00057-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00057-7)
- Gilkerson, J.R., Whalley, J.M., Drummer, H.E., Studdert, M.J. & Love, D.N. (1999b). Epidemiology of EHV-1 and EHV-4 in the mare and foal populations on a Hunter Valley stud farm: are mares the source of EHV-1 for unweaned foals. *Veterinary Microbiology*, 68 (1–2), 27–34. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00058-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00058-9)

- Goehring, L.S., Wagner, B., Bigbie, R., Hussey, S.B., Rao, S., Morley, P.S. & Lunn, D.P. (2010). Control of EHV-1 viremia and nasal shedding by commercial vaccines. *Vaccine*, 28 (32), 5203–5211. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.065>
- Goehring, L.S., van Winden, S.C., van Maanen, C. & van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S. (2006). Equine herpesvirus type 1-associated myeloencephalopathy in the Netherlands: A four-year retrospective study (1999–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (3), 601–607. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2006.tb02903.x>
- Goodman, L.B., Loregian, A., Perkins, G.A., Nugent, J., Buckles, E.L., Mercorelli, B., Kydd, J.H., Palù, G., Smith, K.C., Osterrieder, N. & Davis-Poynter, N. (2007). A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLOS Pathogens*, 3 (11), e160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030160>
- Grądzki, Z. & Boguta, L. (2009). Seroprevalence of EHV1 and EHV4 in the horse population of the southeastern part of Poland. *Medycyna Weterynaryjna*, 65, 188–193
- Hannant, D., Jessett, D.M., O’Neill, T., Dolby, C.A., Cook, R.F. & Mumford, J.A. (1993). Responses of ponies to equid herpesvirus-1 ISCOM vaccination and challenge with virus of the homologous strain. *Research in Veterinary Science*, 54 (3), 299–305. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90126-z](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90126-z)
- Hartley, C.A., Wilks, C.R., Studdert, M.J. & Gilkerson, J.R. (2005). Comparison of antibody detection assays for the diagnosis of equine herpesvirus 1 and 4 infections in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 66 (5), 921–928. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.921>
- Henninger, R.W., Reed, S.M., Saville, W.J., Allen, G.P., Hass, G.F., Kohn, C.W. & Sofaly, C. (2007). Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a University Equestrian Center. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (1), 157–165. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb02942.x>
- Hussey, G.S., Goehring, L.S., Lunn, D.P., Hussey, S.B., Huang, T., Osterrieder, N., Powell, C., Hand, J., Holz, C. & Slater, J. (2013). Experimental infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces chorioretinal lesions. *Veterinary Research*, 44 (1), 118. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-118>
- Kydd, J.H., Smith, K.C., Hannant, D., Livesay, G.J. & Mumford, J.A. (1994a). Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Veterinary Journal*, 26 (6), 470–473. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04052.x>
- Kydd, J.H., Smith, K.C., Hannant, D., Livesay, G.J. & Mumford, J.A. (1994b). Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. *Equine Veterinary Journal*, 26 (6), 466–469. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04051.x>
- Kydd, J.H., Townsend, H.G.G. & Hannant, D. (2006). The equine immune response to equine herpesvirus-1: the virus and its vaccines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111 (1–2), 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.005>
- Kydd, J.H., Watrang, E. & Hannant, D. (2003). Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against

- abortion following experimental infection of pregnant mares. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96 (3), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.08.004>
- Lunn, D.P., Davis-Poynter, N., Flaminio, M.J.B.F., Horohov, D.W., Osterrieder, K., Pusterla, N. & Townsend, H.G.G. (2009). Equine herpesvirus-1 consensus statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23 (3), 450–461. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x>
- van Maanen, C. (2002). Equine herpesvirus 1 and 4 infections: An update. *Veterinary Quarterly*, 24 (2), 57–78. <https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695126>
- van Maanen, C., van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S., Damen, E.A. & Derksen, A.G.P. (2001). Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Veterinary Journal*, 33 (2), 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2001.tb00600.x>
- Mizukoshi, F., Maeda, K., Hamano, M., Iwata, H., Matsumura, T., Kondo, T. & Sugiura, T. (2002). IgG antibody subclass response against equine herpesvirus type 4 in horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88 (1), 97–101. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00130-7)
- Murray, M.J., del Piero, F., Jeffrey, S.C., Davis, M.S., Furr, M.O., Dubovi, E.J. & Mayo, J.A. (1998). Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12 (1), 36–41. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1998.tb00494.x>
- Negussie, H., Gizaw, D., Tessema, T.S. & Nauwynck, H.J. (2017). Equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy, an emerging threat of working equids in Ethiopia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64 (2), 389–397. <https://doi.org/10.1111/tbed.12377>
- Nugent, J., Birch-Machin, I., Smith, K.C., Mumford, J.A., Swann, Z., Newton, J.R., Bowden, R.J., Allen, G.P. & Davis-Poynter, N. (2006). Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *Journal of Virology*, 80 (8), 4047–4060. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.8.4047-4060.2006>
- Oladunni, F.S., Horohov, D.W. & Chambers, T.M. (2019). EHV-1: A constant threat to the horse industry. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2668. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02668>
- O'Neill, T., Kydd, J.H., Allen, G.P., Watrang, E., Mumford, J.A. & Hannant, D. (1999). Determination of equid herpesvirus 1-specific, CD8+, cytotoxic T lymphocyte precursor frequencies in ponies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 70 (1), 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00037-9)
- Ostlund, E.N. (1993). The equine herpesviruses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 9 (2), 283–294. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30396-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30396-6)
- Pagamjav, O., Kobayashi, K., Murakami, H., Tabata, Y., Miura, Y., Boldbaatar, B. & Sentsui, H. (2011). Serological survey of equine viral diseases in Mongolia. *Microbiology and Immunology*, 55 (4), 289–292. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00312.x>

- Paillot, R., Case, R., Ross, J., Newton, R. & Nugent, J. (2008). Equine herpes virus-1: virus, immunity and vaccines. *The Open Veterinary Science Journal*, 2, 68–91. <https://doi.org/10.2174/1874318800802010068>
- Paillot, R., Daly, J.M., Luce, R., Montesso, F., Davis-Poynter, N., Hannant, D. & Kydd, J.H. (2007). Frequency and phenotype of EHV-1 specific, IFN-gamma synthesising lymphocytes in ponies: the effects of age, pregnancy and infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 31 (2), 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.05.010>
- Patel, J.R. & Heldens, J. (2005). Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *The Veterinary Journal*, 170 (1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.04.018>
- Perkins, G., Babasyan, S., Stout, A.E., Freer, H., Rollins, A., Wimer, C.L. & Wagner, B. (2019). Intranasal IgG4/7 antibody responses protect horses against equid herpesvirus-1 (EHV-1) infection including nasal virus shedding and cell-associated viremia. *Virology*, 531, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.03.014>
- Perkins, G.A., Goodman, L.B., Tsujimura, K., Van de Walle, G.R., Kim, S.G., Dubovi, E.J. & Osterrieder, N. (2009). Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 23-year retrospective analysis (1984–2007). *Veterinary Microbiology*, 139 (3), 375–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.033>
- Pusterla, N., Mapes, S. & Wilson, W.D. (2010). Prevalence of equine herpesvirus type 1 in trigeminal ganglia and submandibular lymph nodes of equids examined postmortem. *The Veterinary Record*, 167 (10), 376–378. <https://doi.org/10.1136/vr.c3748>
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S. & Hartigan, P.J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2. uppl. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Reed, S. & Toribio, R. (2005). Equine herpesvirus 1 and 4. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 20, 631–42. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2004.09.001>
- Sabine, M., Robertson, G.R. & Whalley, J.M. (1981). Differentiation of sub-types of equine herpesvirus i by restriction endonuclease analysis. *Australian Veterinary Journal*, 57 (3), 148–149. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1981.tb00495.x>
- Slater, J.D., Borchers, K., Thackray, A.M. & Field, H.J.Y. 1994 (1994). The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *Journal of General Virology*, 75 (8), 2007–2016. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-8-2007>
- Slater, J.D., Lunn, D.P., Horohov, D.W., Antczak, D.F., Babiuk, L., Breathnach, C., Chang, Y.-W., Davis-Poynter, N., Edington, N., Ellis, S., Foote, C., Goehring, L., Kohn, C.W., Kydd, J., Matsumura, T., Minke, J., Morley, P., Mumford, J., Neubauer, T., O’Callaghan, D., Osterrieder, K., Reed, S., Smith, K., Townsend, H., van der Meulen, K., Whalley, M. & Wilson, W.D. (2006). Report of the equine herpesvirus-1

- Havermeyer Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111 (1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.01.004>
- Smith, K.C., Mumford, J.A. & Lakhani, K. (1996). A comparison of equid herpesvirus-1 (EHV-1) vascular lesions in the early versus late pregnant equine uterus. *Journal of Comparative Pathology*, 114 (3), 231–247. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(96\)80045-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(96)80045-4)
- Stokes, A., Corteyn, A.H. & Murray, P.K. (1991). Clinical signs and humoral immune response in horses following equine herpesvirus type-1 infection and their susceptibility to equine herpesvirus type-4 challenge. *Research in Veterinary Science*, 51 (2), 141–148. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(91\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90004-8)
- Studdert, M.J., Simpson, T. & Roizman, B. (1981). Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science*, 214 (4520), 562–564. <https://doi.org/10.1126/science.6270790>
- SVA, (2021). *Virusabort (EHV-1) hos häst*. [https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/virusabort-ehv-1-hos-hast/\[2021-10-01\]](https://www.sva.se/amnesomraden/djursjukdomar-a-o/virusabort-ehv-1-hos-hast/[2021-10-01])
- Telford, E.A.R., Watson, M.S., Perry, J., Cullinane, A.A. & Davison, A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *Journal of General Virology*, 79 (5):1197-1203. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-5-1197>
- Vandekerckhove, A.P., Glorieux, S., Gryspeerdt, A.C., Steukers, L., Van Doorselaere, J., Osterrieder, N., Van de Walle, G.R. & Nauwynck, H.J. (2011). Equine alphaherpesviruses (EHV-1 and EHV-4) differ in their efficiency to infect mononuclear cells during early steps of infection in nasal mucosal explants. *Veterinary Microbiology*, 152 (1), 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.038>
- 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. *Journal of General Virology*, 73 (2), 261–268. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-2-261>

Populärvetenskaplig sammanfattning

EHV-1 och EHV-4 är vanligt förekommande bland hästar. Vid infektion ses vanligen luftvägssjukdom, men bägge virusen kan orsaka abort, även om det bara sker sporadiskt vid infektion med EHV-4. Ston kan smittas och bli latent infekterade långt innan dräktigheten, och om viruset reaktiveras under dräktigheten kan det leda till att stoet kastar. De flesta ston kastar i sen dräktighet, från åttonde till sista dräktighetsmånaden, men det kan även ske tidigare. EHV-1 kan ge upphov till neurologisk sjukdom, där hästarna uppvisar allt från milda koordinations-svårigheter till att de förblir liggande och får problem att urinera. Flera rapporter tyder på att utbrott med neurologisk sjukdom har blivit mer vanligt än innan, när den formen bara sågs sporadiskt. Luftvägssjukdom läker oftast ut snabbt och de flesta hästar uppvisar milda symtom. Vid abortformen och den neurologiska formen uppstår en cell-associerad viremi (när virus förekommer i blodet), vilket leder till sekundär replikation i reproduktionsorganen och nervsystemet. Det uppstår då skador på kärl som leder till skador i vävnaden till följd av syrebristen, vilket orsakar den kliniska presentationen. Riskfaktorer för att utveckla den neurologiska formen är bland annat hög ålder, flera dagar med hög feber och större raser drabbas oftare är ponnyer.

Det har genomförts många studier med fokus på att utröna vilket immunsvaret som ger en skyddande immunitet mot EHV-1. Nuvarande kunskap indikerar på att IgA-antikroppar i slemhinnan är ett bra första skydd mot infektion, vid närvaro av IgA kan de verka neutraliserande på viruspartiklar. Flera studier har sett att infektion med EHV-1 gör att immunförsvaret bildar virusneutraliserande (VN) antikroppar, men om dessa ger skydd mot återinfektion är oklart. Det har i studier sett att VN-antikroppar ger ett skydd medan andra har sett att det inte gav skydd mot återinfektion. Förekomst av en viss typ av IgG, IgG4/7, har dock visat sig vara starkt korrelerad med skydd mot EHV-1-infektion. Vid närvaro av IgG4/7 i blodet ger det både mindre risk för viremi och minskad virusutsöndring från övre luftvägarna. Andra studier har visat att hästar som hade ett immunsvaret med cytokinsvar av IFN- γ hade ett bättre skydd mot infektion samt att hästar som hade cytotoxiska T-celler (CTL) vid infektionstillfället får en kortare och lägre nivå av viremi än de som inte hade CTL.

I studien analyserades serumprover från ett akut utbrott av EHV-1 med syftet att jämföra analysresultaten för att få information om hur smittspridningen skedde. Hästar från det akuta utbrottet provtogs 30 månader efter utbrottet och hästar som varit med om ett annat utbrott av EHV-1 provtogs sex månader efter exponering. Dessa prover analyserades med syftet att undersöka om antikroppar kan detekteras efter sex respektive 30 månader efter exponering av EHV-1.

Proverna analyserades med två olika metoder som detekterar antikroppar. Samtliga prover analyserades med en indirekt ELISA (enzymkopplad immunadsorberande analys) och prover från det akuta utbrottet analyserades även med komplementbindningstest. Vid ELISA mättes IgG-antikroppar och vid komplementbindningstest mättes IgM. Specifika IgM-antikroppar stiger snabbt efter exponering men de avtar också fort (veckor-månader). Testet är framför allt användbart om hästen provtas tidigt i förloppet och följs upp med ett andra prov efter minst två veckor. Om resultatet visar en fyrfaldig titerstegring är det ett tecken på nyligen genomgången infektion. Specifika IgG-antikroppar bildas senare i förloppet men finns kvar under längre tid, upp till år. Vid komplementbindningstest sker kors-reaktioner mellan antikroppar mot EHV-1 och EHV-4 medan den indirekta ELISA som användes i studien skiljer mellan antikroppar mot EHV-1 och EHV-4.

Resultatet visade att det var många hästar som serokonverterade (bildade antikroppar) under det akuta utbrottet och att det inte bara var hästar med kliniska tecken utan även hästar som förblev symtomfria. I prover från det akuta utbrottet visade analys med komplementbindningstest att hästar med feber fick ett högre antikropsvar än symtomfria hästar, samma resultat sågs även vid jämförelse mellan hästar med neurologisk sjukdom och symtomfria hästar. Det var ingen skillnad i antikropsnivåer mellan febergrupper och neurologiskt sjuka hästar. Vid analys med ELISA på prover från det akuta utbrottet hade neurologiska hästarna ett högre IgG-antikropsvar än den symtomfria gruppen, men det observerades ingen skillnad mellan febergruppen och den symtomfria gruppen. Vid analys med ELISA observerades det att en del av hästarna som tidigare varit sjuka under utbrotten hade kvarstående antikroppar efter både sex och 30 månader. Det var ingen skillnad i antikropsnivåer beroende på om hästarna varit sjuka i feber eller drabbats av neurologisk sjukdom men sjuka hästar hade högre IgG-nivåer än hästarna i den symtomfria gruppen.

Studiens slutsats var att serologiska analyser under akut utbrott av EHV-1 är användbart när det kommer till att identifiera smittade hästar, framför allt de som är tysta smittbärare, eftersom antikroppar kan mätas under en längre tid än vad motsvarande fönster är för detektion via PCR-analys. Det var även intressant att så

pass många hästar hade höga IgG-antikroppar, både efter sex och 30 månader efter utbrott.