



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Vaccination mot virusabort – ett svenskt perspektiv

Agnes Sjö Dahl

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012: 53

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2012



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Vaccin mot virusabort – ett svenskt perspektiv

Vaccines against virusabortion – a Swedish perspective

Agnes Sjödahl

Handledare:

Mikael Berg, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator:

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2012

Omslagsbild: -

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2012: 53
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: EHV-1, EAV, virusabort, vaccin.

Key words: EHV-1, EAV, virus abortion, vaccine.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	4
Litteraturgenomgång	4
Ekvint herpesvirus-1	4
EHV-1 och immunförsvaret	4
Vaccin mot EHV-1	6
Avdödade vaccin	6
Attenuerade levande vaccin	7
DNA-vaccin	8
Vektorvaccin	8
Ekvint arterit virus.....	9
EAV i världen.....	9
Vaccin mot EAV	10
Avdödat vaccin.....	10
Attenuerat levande vaccin	10
DNA-vaccin	11
Diskussion	11
Referenser.....	13

SAMMANFATTNING

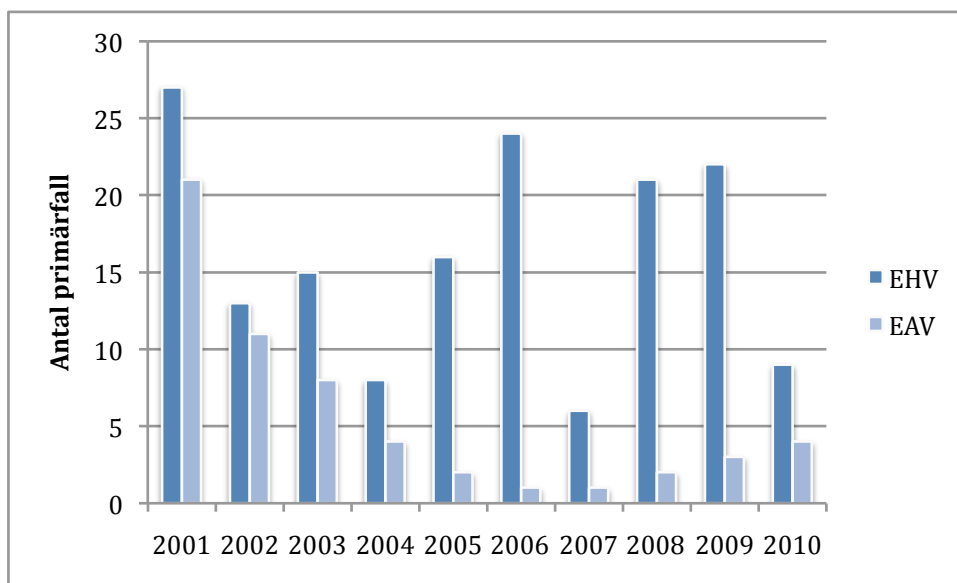
Abort som orsakas av virus förekommer hos hästar över hela världen, och skapar problem för uppfödare. De främsta bakomliggande virusen är ekvint herpesvirus 1 (EHV-1) och ekvint arterit virus (EAV). Fall inträffar till följd av båda virusen varje år i Sverige, och framförallt EHV-1 har varit föremål för mycket forskning för att hitta ett skyddande vaccin. Det finns i Sverige ett avdödat vaccin mot EHV-1 upptaget i FASS. EAV däremot vaccineras det i princip inte mot i landet, men utomlands finns och används i vissa länder både avdödade och attenuerade levande vaccin. I fallet med EHV-1 verkar det viktigt att vaccinet stimulerar det cellmedierade immunförsvaret för att få ett tillräckligt skydd mot sjukdom, medan specifika antikroppar verkar räcka mot EAV. Det kan även konstateras att inget vaccin ger hundra procent skydd mot sjukdom, så vaccination behöver kompletteras med skötselrutiner som förebygger smittspridning.

SUMMARY

Viral abortion occurs amongst horses all over the world, and is a big problem for breeders. The predominant agents are equine herpes virus 1 (EHV-1) and equine arteritis virus (EAV). In Sweden there are incidences of both viruses every year, but the prevalence of EHV-1 is higher. More research has been made considering EHV-1 and vaccine against it, than in the case of EAV. In Sweden there is one vaccine against EHV-1, meanwhile no routine vaccination against EAV is done. Abroad use of both killed and attenuated live vaccine exists. It seems that for protection from EHV-1 the cellmediated immunity plays a major role, whilst immunity against EAV seems to only depend on antibody response. Generally no vaccine induces 100 % protection, and therefore measurements of handling and keeping horses should be included when dealing with viral abortion.

INLEDNING

Abort hos häst är ett ekonomiskt men även känslomässigt problem för stoägare världen över. Planer och förhoppningar grusas i och med en förlust av avkomman. En av orsakerna till oplanerad abort är virus, främst ekvint herpesvirus 1 (EHV-1) men även ekvint arterit virus (EAV) kan orsaka abort. Abort till följd utav EHV-1 inträffar oftast i tredje trimestern, men fall har rapporterats inträffa så tidigt som i femte dräktighetsmånaden. Viruset förekommer enzootiskt i världens hästpopulationer. Det sker främst sporadiska abortfall, men EHV-1 kan orsaka abortstormar vilket är särskilt förödande för hästverksamhet. Även EAV verkar förekomma i hela världen, men med variationer mellan länder och olika hästraser. Även fall av equine virusarterit (EVA) är sporadiskt förekommande, men kan i värsta fall leda till abortstormar.



Figur 1: Statistik över svenska primärfall under senaste åren baserat på statistik från Jordbruksverket (jordbruksverket.se).

I Sverige inträffar ett antal fall per år av respektive sjukdom. Louise Treiberg Berndtsson vid Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) uppger att SVA anmält 11 fall av EHV-1 och 2 fall av EAV under 2011. Fallen varje år är sprida över flera av landets län. När det gäller EHV-1 är varje primärfall anmälningspliktigt till Jordbruksverket (SJVFS 2007:90). Misstanke om primärfall av EAV är anmälningspliktigt (SJVFS 2007:90, § 6). I samma föreskrift definieras primärfall som det första fallet av en sjukdom i en specifik djurgrupp eller besättning. Statistiken från Jordbruksverket kan därför förutsättas ge en bra bild av läget i Sverige, när det gäller antalet primärfall.

Det finns i Sverige ett preparat mot EHV-1 registrerat i FASS, Euquilis Resequin vet. Detta vaccin är av inaktiverad typ.

EAV vaccinerar man inte rutinmässigt mot i Sverige, på grund av omöjligheten att skilja vaccinerade individer från infekterade. I resten av världen finns både avdödade och

attenuerade levande vaccin, som används främst i Europa respektive USA (Treiberg Berndtsson, A., Statens veterinärmedicinska anstalt, pers. medd., 2012-02-28).

Min frågeställning i detta arbete är vilka är de huvudsakliga typerna av vaccin mot de två viktigaste agens som orsakar virusabort, EHV-1 och EAV, hur fungerar de och ger de ett fullgott skydd mot abort? Har vaccination relevans i Sverige? Tyngdpunkten ligger på EHV-1 eftersom viruset är en vanligare orsak till abort än EAV.

MATERIAL OCH METODER

För att hitta litteratur har Scopus, NCBI PubMed samt Science Direct använts. Sökord som equine*, horse*, abortion*, vaccine, equine virus artheritis och equine herpesvirus användes. Även intressanta referenser, relaterade artiklar och citerande artiklar har undersökts. Dessutom har personlig kontakt etablerats med Louise Treiberg Berndtsson, Statens veterinärmedicinska anstalt.

LITTERATURGENOMGÅNG

Ekvint herpesvirus-1

Ekvint herpesvirus 1 (EHV-1) är ett alfaherpesvirus inom familjen herpesviridae. Herpesviridae är dubbelsträngade linjära DNA virus. De har en ikosahedral kapsid samt ett hölje.

EHV-1 kan orsaka olika typer av problem, där respiratorisk sjukdom är primärt. Sekundärt kan sjukdomen utvecklas till neurologisk, eller ge abort hos dräktiga ston. Den primära respiratoriska infektionen kan vara subklinisk och märks inte alltid. Dessa subkliniska fall kan bidra till smittspridning, som sker via luften. EHV-1 har också förmågan att ligga latent hos hästar som någon gång utsatts för infektion, och kan reaktiveras i samband med stress av någon form.

Förekomsten av latent infektion i hästpopulationen anses vara stor. Holmes et al. (2006) uppmätte i samband med en vaccinationsstudie en förekomst av latent infektion hos 47 % av de 55 försökshästarna. En annan vaccinationsstudie observerade att 11 av 15 försökshästar var positiva för en latent EHV-1 infektion, samt att alla femton hästarna uppvisade förekomst av EHV-1 specifika antikroppar (Soboll et al., 2006).

EHV-1 orsakar främst abort i tredje trimestern, även om enstaka fall med tidigare kastning har rapporterats. De aborterade fostren är generellt inte autolytiska, utan kan uppvisa andra typer av skador.

EHV-1 och immunförsvaret

Eftersom smittan främst överförs via luften, så kommer de första cellerna som infekteras vara epitelcellerna i luftvägarnas slemhinnor. Den primära luftvägsinfektionen kan, som sagt, sedan övergå till de mer allvarliga komplikationerna som abort och neurologisk sjukdom. Detta sker genom infektion av perifera mononukleära celler, främst CD8⁺ T-celler och i andra

hand B-celler (Wilsterman et al., 2011). Dock verkar det som att alla subpopulationer av perifera monocyter blir infekterade fast i olika utsträckning, enligt studien, och kan därmed antas vara inblandade i den cellassocierade viremin (Wilsterman et al., 2011). Denna studie utfördes i tre grupper med hästar och ponnyer, med två olika EHV-stammar. Kvantitativ PCR användes för analysen, som enbart detekterar DNA från viruspartiklar och utesluter därmed eventuellt latent virus. Författarna tolkar utifrån sin kunskap sina resultat som att det finns en stor mängd virusgenom i ett fåtal mononukleära celler (Wilsterman et al., 2011).

Vid en respiratorisk infektion är den mest förekommande antikroppstypen med specificitet för EHV-1 immunoglobulin A (IgA), som utsöndras från nosslemhinnan (Breathnach et al., 2001; Soboll et al., 2006). Dolby et al. (1995) såg en skillnad i antikroppar i nosslemhinnan mellan kontrollgruppen och de vaccinerade grupperna, där det inte hittades antikroppar mot EHV-1 hos kontrollhästarna vid nässköljning efter att en testinfektion genomförts. Det observerades inget samband mellan förekomsten av antikroppar i blodet vid infektionstillfället och virusutsöndringen i nosslemhinnan (Dolby et al., 1995), medan Breathnach et al. (2001) drog slutsatsen att virusneutraliserande (VN) antikroppar sannolikt har betydelse för att begränsa virusreplikeringen, och därmed utsöndringen från slemhinnan av detsamma.

I serum är motsvarande antikroppstyper IgGa och IgGb (Soboll et al., 2006). Ett samband mellan mängden VN antikroppar och förekomsten av IgGb i blodet har setts (Soboll et al., 2006; Goehring et al., 2010). Hästar som hade över en viss nivå av serumantikroppar har visats vara skyddade mot cellassocierad viremi (Dolby et al., 1995; Hannant et al., 1993). Motsatsen har dock observerats i en annan studie, där man inte kunde hitta något samband mellan förekomsten av VN antikroppar vid tillfället för testinfektionen och följderna av den (Patel et al., 2003).

Två febertoppar brukar observeras under sjukdomsförloppet. Den första sammanfaller med virusutsöndring från den primärinfekterade slemhinnan, medan den andra febertoppen inträffar i samband med viremi (Goehring et al., 2010). Eftersom viremin är associerad till infektion av cirkulerande monocyter, som på så sätt sprider viruset i hela värdjuret, så har det antagits att det krävs ett cellmedierat immunsvaret för att full immunitet ska uppnås.

För att kunna få ett resultat som mer liknar det naturliga, gjordes test med intranasal infektion av Kydd et al. (2003). Det visade sig att ston som utsatts för upprepade infektioner med EHV-1 inte hade någon signifikant ökning av förekomsten av komplementfixerande antikroppar, före och efter testinfektionen, jämfört med kontroller och vaccinerade ston. Däremot hade de ston som gick tiden ut och födde levande föl en signifikant högre förekomst av cytotoxiska T-lymfocyter (CTL) i blodet innan testinfektionen genomfördes. De ston som utsatts för flera infektioner visade inga kliniska symptom efter testinfektionen, och alla tre fölade enligt planen. Det sågs dock ingen skillnad på durationen av cellassocierad viremi hos ston som aborterade jämfört med de som fölade. Det gjordes ingen kvantitativ mätning av viremin, vilket skulle kunna visa på skillnader. Ett av stona som aborterade ingick i den vaccinerade gruppen. Detta sto var ungt, och uppvisade inga tecken på att ha utsatts för någon naturlig EHV-1 infektion, samt hade låga halter av både specifika komplementfixerande antikroppar och CTL. Det konstaterades även att nivåerna hos hästarna av CTL i blodet hos hästarna sjönk

under en sex månaders period, om ingen ytterligare stimulering skett. Slutsatsen blev att CTL förekomsten påverkar skyddet mot abort, och dessutom mot klinisk sjukdom samt virusreplikation (Kydd et al., 2003). Det har även påvisats tidigare att förekomsten av specifika CD8⁺ CTL precursorceller i cirkulationen påverkar immuniteten, ju större mängd desto bättre skydd (O'Neill et al., 1999). Förekomsten ökar efter infektion av mottagliga djur. En ökning av andel perifera blodmonocyter med produktion av interferon γ (IFN- γ) har visats sammanfalla med detekterbar antikroppsproduktion, CTL-aktivitet samt en efterföljande minskning av virusutsöndring från nosslemhinnan (Paillot et al., 2006).

Vaccin mot EHV-1

Avdödade vaccin

När man inaktiverar virus eftersträvar man en sådan liten förändring av partikeln som möjligt, för att inte förstöra för mycket av antigeniteten som ger immuniteten. Viruspartikeln berövas förmågan att infektera och replikera sig i värdcellerna. Därmed är det exogent antigen, vilket generellt leder till ett immunsvaret med betoning på CD4⁺ T-hjälparceller typ 2. Fördelen med avdödat vaccin är lättare att förvara. Som namnet antyder är viruspartiklarna redan döda och kräver inte lika stor försiktighet. Risken för att vaccinet ska orsaka sjukdom är mycket mindre än med attenuerat vaccin. Men det krävs ofta tillsats av adjuvans för att tillräcklig stimulering av immunsvaret ska ske, och det inducerade immunsvaret kanske inte blir optimalt för att motverka infektion med naturligt agens. Adjuvanset ger risk för motreaktioner. En studie visade på motreaktioner mot avdödat vaccin, bland annat lokala reaktioner vid injektionsplatsen och feber (Goehring et al., 2010).

Avdödade vaccin verkar främst stimulera produktionen av specifika antikroppar (Kydd et al., 2003; Heldens et al., 2001). Lokala antikroppar i slemhinnan i nos och svalg verkar inte påverkas förrän efter testinfektion, trots intramuskulär vaccination (Breathnach et al., 2001). Eftersom slemhinneantikroppar mot EHV-1 i samma studie visats minska plaquebildning in vitro, skulle de kunna spela en roll för minskad virusutsöndring i samband med infektion. Det har visats att förekomsten av cytotoxiska T-lymfocyter var större hos ston som vaccinerats med avdödat vaccin än hos kontrollerna innan testinfektion, men orsaken till detta torde vara en tidigare infektion snarare än en effekt av vaccinet i sig (Kydd et al., 2003). Prevalensen för kliniska symptom samt abortfrekvensen var lägre hos vaccinerade ston jämfört med kontrollerna (Heldens et al., 2001). Det visade sig dessutom vara signifikant skillnad i mängden virus som utsöndrades nasalt under tredje dagen, trots att durationen var den samma mellan grupperna (Heldens et al., 2001). Hos de foster som aborterades trots att mödrarna hade vaccinerats kunde EHV-1 påvisas i testade organ. De organ som testades är de som anses vara predilektionsplats för viruset, det vill säga lungor, lever och mjälte (Heldens et al., 2001; Kydd et al., 2003). Stoet som aborterade i ena studien var ung och visade inga tecken på tidigare infektion med EHV-1 (Kydd et al., 2003). En studie med liknande observationer av antikroppsproduktion kunde dra slutsatsen att den skedde till följd av vaccinationen och inte en naturlig infektion, då samma förändringar inte sågs hos kontrollgrupperna (Holmes et al., 2006). Ökning i produktionen av IFN- γ har setts efter tredje vaccinationsdosen i samma

studie, och skulle kunna indikera stimulering av cellmedierat immunsvaret och därmed skydd mot abort (Holmes et al., 2006).

Avdödat helt virusvaccin verkade skydda mot cellassocierad viremi i en studie av Dolby et al. (1995), då inget virus kunde detekteras i blod. Tillskillnad från prov från slemhinneutsöndringar från näshålan, där även de vaccinerade hästarna visade sig utsöndra virus. Vaccinationen gav en signifikant ökning av VN samt CF antikroppar redan efter första dosen, vilket i sig tyder på att hästarna utsatts för tidigare EHV-1 infektion som primat immunförsvaret. Däremot fanns inga skillnader mellan de vaccinerade och kontrollgruppen när studien startades upp. Efter en andra vaccindos hade de vaccinerade hästarna utvecklat antikroppar mot alla viktiga glykoproteiner hos EHV-1 (Dolby et al., 1995).

I en randomiserad studie observerades att avdödat vaccin gav en minskad duration när det gäller viremi men att det bara delvis hjälper mot febern (Goehring et al., 2010). De kliniska symptomen minskades i viss utsträckning hos de vaccinerade hästarna.

De avdödade vaccinen som riktar sig enbart mot abort, innehåller större mängder antigen än de mot respiratorisk sjukdom. Det visades i en studie att antikroppssvaret gentemot abortvaccinen är mycket större än det mot vaccinen med avsikt att skydda mot respiratorisk sjukdom (Holmes et al., 2006). Slutsatsen utifrån detta blev att man generellt bör överväga att använda de vaccin som innehåller en högre koncentration av organismen, särskilt vid användning av avdödat vaccin, oavsett om målet med vaccination är skydd mot respiratorisk sjukdom eller abort (Holmes et al., 2006).

Attenuerade levande vaccin

Attenuerade levande vaccin innehåller viruspartiklar som på något sätt har försvagats, men ändå har kvar sin förmåga att infektera celler. Det gör att vid vaccinering fås en liten infektion som liknar den naturliga, och kan på så sätt inducera ett immunsvaret så likt det vid en naturlig infektion som möjligt, utan att för den skull orsaka sjukdom. Det är en balansgång som medför vissa risker. Riskerna för klinisk sjukdom till följd av vaccinet är större än med avdödat, eftersom partiklarna faktiskt har kvar sin förmåga att infektera målcellerna. Dessutom finns risk för mutationer som i värsta fall gör att viruset återgår till sin fullt virulenta form, och att det då utbryter sjukdom som smittar andra individer.

En studie visade att en vaccination med levande vaccin i 4 eller 5-6 dräktighetsmånaden räckte för att skydda nästan alla ston (83.3% respektive 80%) i de två grupperna från abort (Patel et al., 2003). Dock var en av aborterna som skedde till följd av *Streptococcus zooepidemicus*. Båda grupperna hade signifikant minskade kliniska symptom, där särskilt febern var märkbart minskad. Även virusutsöndring och viremin vid testinfektion minskades genom vaccinering. Endast ett av de 12 vaccinerade stona fick feber under en dag. Den framtagna, attenuerade stammen kallad C147, replikerar sig i värdjuret. Det ger en bra stimulering av specifikt immunsvaret med god effekt mot respiratorisk sjukdom, virusutsöndring, viremi och abort i samband med testinfektion (Patel et al., 2003). Även en annan studie visade att levande vaccin ger reduktion av kliniska symptom, feber och förkortning av tiden för virusutsöndring (Goehring et al., 2010).

DNA-vaccin

DNA-vaccin är en teknik som går ut på att föra in gener som kodar för antigena partiklar i en bakterieplasmid. Dessa kan inte replikera sig i värddjuret, men ger upphov till endogent antigen, via endocytos, som sedan presenteras av cellens MHC klass I receptorer. Endogent antigen kan ge upphov till både antikroppssvar och CTL. Det ingår även en stark promotor för avläsning i däggdjursceller, för att öka translationen i värdcellen. Det finns två sätt att administrera DNA-vaccin, intramuskulärt eller så kallad "gene gun". Med intramuskulär injektion är upptaget till muskelcellerna lågt. Med "gene gun" däremot, sker administreringen med flera små nålar i huden och därmed upptag direkt av dendritiska celler (DC). Ursprungsdelar av plasmiden kan i sig stimulera toll-like receptor 9 (TLR9), och ge extra aktivering av DC. Den teoretiska risken med plasmider är att det skulle ske en integrering i värdcellens eget DNA och som följd aktivering av onkogen alternativt blockering av supressorgener.

Det har gjorts försök med ett vaccin som innehåller plasmider med gener för glykoprotein gB, gC och gD från genomet hos EHV-1 (Minke et al., 2006). Utfallet blev en minskad virusutsöndring om man ser till tidsomfattning och viruskoncentration. Däremot rådde immunsvaret som inducerats av vaccinet inte på den cellassocierade viremin. Att ge DNA-vaccin visade sig ge en signifikant förbättring av produktionen av VN antikroppar, om det gavs i kombination med granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Minke et al., 2006). GM-CSF stimulerar mognaden av neutrofiler. Soboll et al. (2006) kunde inte observera någon signifikant uppreglering av CTL vid vaccinering med en plasmid med samma geninnehåll.

Vid vaccination med plasmider som kodade för immediate early (IE) gene och early gene UL5 sågs ingen signifikant stimulering av CTL, och ingen immunisering kunde registreras (Soboll et al., 2006).

Vektorvaccin

Vektorvaccin bygger på en rekombinering av DNA i en befintlig infektiös organism, där man för in gener för antigenicitet. Eftersom ursprungsorganismen, som rekombineringen skett i, fortfarande är intakt kan den replikera sig i värddjuret. En nackdel är då att organismen har stor potential för egen antigenicitet.

Det har gjorts en studie av frystorkat vaccin som innehåller rekombinerat canarypox virus (ALVAC) med gener för glykoprotein gB, gC och gD (Minke et al 2006). I kombination med karbopoladjuvans blev virusutsöndringen nästan obefintlig. Mängden virusneutraliserande antikroppar blev signifikant högre innan testinfektionen i denna grupp jämfört med gruppen som fick ALVAC utan adjuvans samt kontrollgruppen. Däremot kunde ingen av ALVAC-varianterna i studien förhindra den cellassocierade viremin. De två grupper som vaccinerades med ALVAC hade en svag produktion av CF antikroppar, medan referensgruppen som vaccinerades med avdödat vaccin hade höga nivåer av dessa antikroppar efter vaccination.

Men efter testinfektion serokonverterade alla hästar i grupperna, utom två (Minke et al., 2006).

Paillot et al. (2006) har gjort försök med NYVAC, ett rekombinerat virus baserat på en attenuerad vaccinstam. Det gjordes mätningar av CTL-förekomsten och IFN- γ . Vid upprepade vaccinationer observerades en ökad produktion av CTL samt IFN- γ jämfört med den grupp som endast vaccinerades en gång och kontrollgruppen. Hos de hästar som vaccinerats flertalet gånger var fenotypen hos CTL-cellerna förändrad, CD8 α^+ ökade i proportion jämfört med kontrollhästen där CD8 α^+ var vanligast förekommande. Vilken betydelse detta har är oklart. Utifrån resultaten drogs slutsatsen att det rekombinanta vaccinet verkade ge IFN- γ produktion, men att ingen klinisk effekt kunde påvisas då kontrollgruppen vid testinfektion inte utvecklade symptom i den utsträckning de borde ha gjort. Det spekulerades i att vaccineringen aktiverar specifika lymfocyter, som vid testinfektion ger en ökad produktion av IFN- γ och därmed uppreglering av MHC klass II receptorer (Paillot et al., 2006).

Vaccination med ett rekombinerat virus som bär på IE genen från EHV-1 gav skydd mot både klinisk sjukdom och cellassocierad viremi (Soboll et al., 2010). Det skedde en signifikant ökning av IFN- γ i gruppen med den rätta haplotypen, då studien var riktad mot hästar med en viss MHC klass I haplotyp. Därför är resultaten inte helt generella för hästpopulationen. En del av slutsatsen blev också att man behöver detektera målproteiner som stimulerar CTL även hos hästar med andra haplotyper (Soboll et al., 2010). Endast denna komponent i vektorn ger inget svar som inkluderar VN antikroppar, utan en kombination med gener för gB- och gC-proteiner föreslås för att även stimulera antikroppsproduktionen. En teori till varför antikropps svaret blev så svagt var att koncentrationen av antigen i vaccinet var för lågt, i jämförelse med motsvarande vaccin mot andra agens. Efter testinfektionen skedde en signifikant ökning av antikroppsproduktionen och det cellmedierade immunsvaret (Soboll et al., 2010).

Ekvint arterit virus

Ekvint arterit virus (EAV) tillhör familjen arteriviridae, och orsakar ekvin virusarterit (EVA). Virus i familjen är positiva enkelsträngade RNA virus, med en ikosahedral kapsid och ett hölje ytterst. Genomet är relativt kort.

EAV i världen

Vid naturlig infektion är sjukdomen oftast asymptomatisk och subklinisk. Eventuella symptom är typiska för arterit, till exempel ödem. Inkubationstiden är 3-14 dagar och abort inträffar oftast 10-30 dagar efter infektionen, någon gång mellan 3:e och 10:e dräktighetsmånaden. Spridningen sker lätt via aerosol, vilket leder till att ston som betäcks med en smittad hingst kan sprida vidare smittan under den akuta fasen, och ge abort hos andra ston i samma besättning. Förutom via aerosol, så kan EAV smitta via sperma. Det beror på att viruset har en testosteronberoende persistens i könskörtlarna hos smittade hingstar och utsöndras med sperman. Smitta kan därför ske även vid artificiell inseminering. Hingstar kan bära en persisterande infektion i allt från ett antal veckor till hela resten av livet.

Den första replikationen sker i alveolära makrofager och endotelceller vid luftburen smitta. Efter det sker spridning snabbt via de lokala lymfknutorna till blodet. Virusets kan även infektera en del epitel, mesotelium och glatt muskulatur i livmodervägen. Om det är viruset i sig eller inducerade cytokiner som orsakar endotelskadan är osäkert.

Oftast ses inga symptom innan en abort, utan fostret och dess hinnor stöts ut. Fostret bär sällan spår av typiska patologiska eller histopatologiska förändringar, utan är autolyserat. I en studie av Fukunaga et al. (1996) kunde man inte hitta något predilektionsställe för EAV i de aborterade fostren, men viruset återfanns i stora mängder i placenta. Fostren kom från mödrar vilka användes som kontroll i ett vaccinationsexperiment med testinfektion.

Det finns bara en känd serotyp av EAV, och har det producerats antikroppar kvarstår dessa under lång tid, åtminstone år, möjligen till och med hela resten av livet. Produktionen brukar ha kommit igång inom cirka en vecka, samtidigt som viruskoncentrationerna i blodet avtar. I en studie utförd av Fukunaga et al. (1990) sågs att mängden SN antikroppar i blodet verkar vara avgörande för skyddet mot testinfektion, även mot abort.

Vaccin mot EAV

Avdödat vaccin

Fukunaga et al. (1996) har i en studie undersökt förmågan hos avdödat vaccin att skydda mot EAV-infektion. Vaccinet i studien innehöll även ett adjuvans, aluminiumhydroxid. En grupp vaccin som hade lagrats i ett år, för att testa hållbarheten hos vaccinet. Den gruppen utvecklade högre titrar av serumneutraliserande (SN) antikroppar 1-2 veckor efter vaccination än gruppen som ett vaccin som inte lagrats men som var i övrigt likadant. Man observerade inga sidoeffekter av vaccinet, men antalet försökshästar var litet med sex hästar vardera i de två testgrupperna. Ingen signifikant ökning av SN antikroppar märktes efter testinfektion av de vaccinerade stona, jämfört med innan infektionen. Detta tyder på att de var skyddade av de antikroppar som producerats till följd av vaccinering. Slutsatsen är att avdödat vaccin kan ge tillräcklig produktion av SN antikroppar för att skydda mot abort hos dräktiga ston, även efter ett års lagring innan användning (Fukunaga et al., 1996).

I en av sina tidigare studier visade Fukunaga et al. (1990) att av 42 försökshästar visade 39 stycken inga motreaktioner gentemot ett avdödat vaccin. Det behövdes en relativt stor koncentration av viruset i vaccinet för att ge immunsvaret när inget adjuvans inkluderats. Efter grundvaccinering med två doser minskade de producerade SN antikropparna snabbt. Om åtminstone en vaccination utfördes, åtminstone två månader efter grunddoserna, blev svaret mer långvarigt. Då kvarstod tillräckliga antikropstitrar, i nivåer som beräknas ge skydd, i mellan 7 och 12 månader. Det är en indikation att upprepade vaccination bör ske med 6 eller 12 månaders mellanrum (Fukunaga et al., 1990).

Attenuerat levande vaccin

I en studie från 1986 konstaterade McCollum att virus som hade passerats ett antal gånger genom först njurceller från häst, sedan flertalet gånger i kaninnjurceller, och slutligen igenom

ekvina dermisceller, kunde användas som vaccin utan att inducera kliniska symptom. Hos alla de vaccinerade hästarna producerades serum neutraliserande antikroppar. 74 % av de vaccinerade försökshästarna visade inga tecken på virusarterit överhuvudtaget, medan nästan hälften av kontrollerna insjuknade akut och dog. Övriga hästar i kontrollgruppen blev ordentligt sjuka. Alla, även de vaccinerade hästarna, var mottagliga för testinfektionen men durationen var kortare hos dessa jämfört med kontrollgruppen. Försöket utfördes under ett år, och hela den tiden var de vaccinerade individerna skyddade vid testinfektion. Ett antal hästar ur vaccingruppen utsattes för infektion olika många månader efter vaccineringen. Jämfört med ett tidigare vaccin, som inte passerats lika många gånger innan användning, verkade dock detta vaccin vara mer attenuerat på grund av att det visades en del kliniska symptom trots vaccinering (McCollum, 1986).

DNA-vaccin

Med ett vaccin innehållandes ORF 2, 5 och 7 från EAV-genomet har en utveckling av neutraliserande antikroppar setts (Giese et al., 2002). Efter tre grunddoser fanns mätbara nivåer av neutraliserande antikroppar kvar hela ett år efter vaccination. Trots att ingen ökning av antikroppstitern observerades efter de två uppföljningsdoser så kan de ha betydelse för hur länge ett tillräckligt skydd håller i sig. Men ingen testinfektion ingick i studien. Slutsatsen att DNA-vaccinet verkade ge specifika B-minnesceller drogs i studien. Två sätt för administrering användes vid varje tillfälle och på varje häst (5 stycken). Det första var intramuskulär injektion, som antas ge en depåeffekt. Det andra sättet var såkallad ”gene gun” som injicerade vaccinet i huden, vilket kan ge ett bättre och snabbare immunsvaret och med att antigenet levereras direkt där de antigenpresenterande cellerna. Det observerades även att immunsvaret inte verkade bero på vare sig ålder, kön eller ras, utan alla individer utvecklade samma försvar (Giese et al., 2002).

DISKUSSION

Det är svårt med slutsatser om vaccin i vissa fall, då tidigare infektioner kan påverka hur förberett immunsvaret är. Tidigare infektioner ger en större chans till cellmedierat svar (Kydd et al., 2003) vid vaccinering och testinfektion. Eftersom det särskilt när det gäller EHV-1 verkar vara viktigt med bra specifikt cellmedierat svar, och herpesvirus dessutom kan ligga latent, är det särskilt intressant i det sammanhanget. Holmes et al. (2006) noterade att alla hästar som ingick i studien hade exponerats för EHV-1 tidigare, antingen genom naturlig infektion eller vaccinering.

Attenuerade vaccin har en starkare påverkan på immunsvaret, men ger som följd större risker för biverkningar i form av sjukdomssymptom. Det kan vara särskilt riskabelt vid användning på dräktiga ston då det finns risk att inducera abort. Ingen av de studier som ingår i den här genomgången har dock uppmärksammat detta i samband med sina undersökningar. Patel et al. (2003) anser utifrån sin studie att det är möjligt att framställa tillräckligt effektiva och säkra levande vacciner mot EHV-1.

Holmes et al. (2006) såg i sin studie att när den rekommenderade vaccinationsplanen följdes, en dos i femte, sjätte samt nionde dräktighetsmånaden skulle det ge otillräckligt skydd mot

abort större delen av dräktigheten, då immunitet inte uppnåddes förrän en tid efter sista dosen. Därför kan rutinerna behöva omvärderas.

För tillfället verkar attenuerat levande vaccin vara bästa alternativet för att uppnå önskat skydd mot EHV-1, då det är viktigt att även det cellmedierade immunsvaret aktiveras. Effekten av de avdödade vaccinen kan vara beroende av att en tidigare infektion med EHV-1 redan har skett, så att det cellmedierade immunsvaret stimulerats.

Det har även uppmätts virusutsöndring tillräckligt stor för att smittöverföring riskerar att ske trots vaccinering med levande eller avdödat vaccin mot EHV-1 (Goehring et al., 2010). I samma studie, där ett kommersiellt levande vaccin jämfördes med ett kommersiellt avdödat, konstaterades levande vaccin gav bättre skydd än det avdödade, trots att det avdödade gav upphov till högre koncentrationer av antikroppar. Teorin är att detta beror på att även cellmedierat immunförsvar spelar in (Goehring et al., 2010), och avdödade vaccin är generellt sämre på att inducera cellmedierat svar.

Den cellassocierade viremin antas som sagt ha avgörande roll för abort till följd av EHV-1. Kydd et al. (2003) gjorde en kvalitativ mätning av cellassocierad viremi, vilken gav samma resultat för ston som aborterade och dem som inte aborterade. Eftersom testet inte var kvantitativt kan man inte dra någon slutsats om förekomsten av virus var lika stor i båda grupperna, bara att durationen var lika. Metoden är dessutom ytterst känslig gör att minsta lilla virusförekomst registreras, trots att det kanske inte har någon klinisk betydelse. Det finns metoder för att genomföra kvantitativa mätningar men dessa är mycket omständiga och kostsamma om man inte har ett väldigt litet antal försöksdjur (Kydd et al., 2003).

Vektorvaccin, och även DNA-vaccin, mot EHV-1 bygger på identifiering av de proteiner som stimulerar immunförsvarets verkställande celler, B-celler och T-celler (Minke et al., 2006). Utvecklingen av denna typ av vaccin är inte klar, då mer täckande immunitet behövs. Därför är slutresultatet svårt att bedöma. I studien som utfördes med avseende på vektorvaccin mot EHV-1 av Soboll et al. (2010) sågs bra resultat. Men undersökningen var begränsat till hästar som hade en viss haplotyp av MHC klass I och de antigen som hittats för just denna haplotyp. Förslaget blev att andra antigen, som stimulerar de andra haplotyperna, ska hittas och sedan kombineras med de som redan detekterats, så att hela spektrat i populationen täckts in (Soboll et al., 2010). Detsamma gäller i princip för DNA-vaccin mot EAV, men där finns ännu inget som tyder på att haplotyper i MHC klass I har någon betydelse. Den forskning som finns verkar lovande, men mer behövs. Särskilt vektorvaccin verkar utifrån denna genomgång vara ett framtidshopp när det gäller skydd mot EHV-1.

En generell observation är att flertalet studier har en liten studiepopulation, vilket ger en dålig statistisk signifikans. Även detta försvårar för mer allmängiltiga slutsatser. Det ska även tas med i beräkningen att laboratorievirusstammar som injiceras under försöksomständigheter ofta ger mer virulenta infektioner än vid en naturlig infektion.

Eftersom inget vaccin än så länge är hundra procent säkert bör vaccinering kombineras med noggranna skötselrutiner så att smittinförsel till dräktiga ston undviks i så stor utsträckning som möjligt.

Vid vaccinering mot smittsamma sjukdomar kan det vara svårt att skilja på djur som fått antikroppar till följd av vaccinering och de djur som fått antikroppar på grund av naturlig infektion med viruset. Då blir kontroll av smittspridning via blodprov ett problem. I fallet med EAV i Sverige sker ingen vaccinering just på grund av detta. EAV ovanligt i Sverige, även om några fall per år förekommer, så det är bra att inte vaccinera. Istället får tyngdpunkten läggas på rutiner som förebygger smittspridning. Hingstar som ska tappas för seminverksamhet ska provtas för EAV (SVJFS 1999:113, 2 kap., 5§). Enligt samma paragraf får positiva hingstar verka via semin, men stoägare ska informeras. Skulle vaccination bli aktuellt i Sverige är avdödat vaccin ett bra alternativ, eftersom antikroppssvar är tillräckligt för att ge skydd samt att säkerheten är bättre än med attenuerat levande vaccin.

REFERENSER

- 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.
- Dolby, C. A., Hannant, D. & Mumford, J. A. (1995). Response of ponies to adjuvanted EHV-1 whole virus vaccine and challenge with virus of the homologous strain. *British Veterinary Journal* 151(1), 27–37.
- Fukunaga, Y., Wada, R., Kanemaru, T., Imagawa, H., Kamada, M. & Samejima, T. (1996). Immune potency of lyophilized, killed vaccine for equine viral arteritis and its protection against abortion in pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 16(5), 217–221.
- Fukunaga, Y., Wada, R., Matsumura, T., Sugiura, T. & Imagawa, H. (1990). Induction of immune response and protection from equine viral arteritis (EVA) by formalin inactivated-virus vaccine for EVA in horses. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B* 37(2), 135–141.
- Giese, M., Bahr, U., Jakob, N. J., Kehm, R., Handermann, M., Müller, H., Vahlenkamp, T., Spieß, C., Schneider, T., Schusser, G. & Darai, G. (2002). Stable and long-lasting immune response in horses after DNA vaccination against equine arteritis virus. *Virus Genes* 25(2), 159–167.
- 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.
- 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.
- Heldens, J. G. M., Hannant, D., Cullinane, A. A., Prendergast, M. J., Mumford, J. A., Nelly, M., Kydd, J. H., Weststrate, M. W. & Van den Hoven, R. (2001). Clinical and virological evaluation of the efficacy of an inactivated EHV1 and EHV4 whole virus vaccine (Duvaxyn EHV1,4). Vaccination/challenge experiments in foals and pregnant mares. *Vaccine* 19(30), 4307–4317.

- Holmes, M. A., Townsend, H. G. G., Kohler, A. K., Hussey, S., Breathnach, C., Barnett, C., Holland, R. & Lunn, D. P. (2006). Immune responses to commercial equine vaccines against equine herpesvirus-1, equine influenza virus, eastern equine encephalomyelitis, and tetanus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 111(1-2), 67–80.
- 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(3-4), 207–217.
- Minke, J. M., Fischer, L., Baudu, P., Guigal, P. M., Sindle, T., Mumford, J. A. & Audonnet, J. C. (2006). Use of DNA and recombinant canarypox viral (ALVAC) vectors for equine herpes virus vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 111(1-2), 47–57.
- 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(1-2), 43–54.
- Paillot, R., Ellis, S. A., Daly, J. M., Audonnet, J. C., Minke, J. M., Davis-Poynter, N., Hannant, D. & Kydd, J. H. (2006). Characterisation of CTL and IFN- γ synthesis in ponies following vaccination with a NYVAC-based construct coding for EHV-1 immediate early gene, followed by challenge infection. *Vaccine* 24(10), 1490–1500.
- Soboll, G., Breathnach, C. C., Kydd, J. H., Hussey, S. B., Mealey, R. M. & Lunn, D. P. (2010). Vaccination of ponies with the IE gene of EHV-1 in a recombinant modified live vaccinia vector protects against clinical and virological disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135(1-2), 108–117.
- Soboll, G., Hussey, S. B., Whalley, J. M., Allen, G. P., Koen, M. T., Santucci, N., Fraser, D. G., Macklin, M. D., Swain, W. F. & Lunn, D. P. (2006). Antibody and cellular immune responses following DNA vaccination and EHV-1 infection of ponies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 111(1-2), 81–95.
- Wilsterman, S., Soboll-Hussey, G., Lunn, D. P., Ashton, L. V., Callan, R. J., Hussey, S. B., Rao, S. & Goehring, L. S. (2011). Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Veterinary Microbiology* 149(1–2), 40–47.