

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
(komm. Vorstand: Prof. Dr. E. Märtlbauer)

Angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. Antonie Neubauer-Juric

**Etablierung einer Multiplex *real-time* PCR
zur Detektion und Differenzierung der equiden
Herpesviren 1 und 4**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Philipp Markus Spreyer
aus Bonn

München 2008

Meiner Familie

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Neubauer-Juric

Korreferent/en: Univ.Prof. Dr. Gerhards

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Die equiden Herpesviren Typ 1 (EHV-1) und Typ 4 (EHV-4)	2
2.1.1	Die Klassifizierung von EHV-1 und EHV-4	2
2.1.2	Die Struktur der Viruspartikel	2
2.1.3	Das Virusgenom	2
2.1.4	Das Glykoprotein D	3
2.1.5	Die latente Infektion der equinen Herpesviren	3
2.1.6	Die Pathogenese der EHV-1 und EHV-4-Infektionen	4
2.1.7	Die klinische Symptomatik der EHV-1 und EHV-4-Infektionen	6
2.1.8	Die Epidemiologie der EHV-1 und EHV-4-Infektionen	7
2.1.9	Die Bekämpfung und Prophylaxe	8
2.1.10	Die Diagnose einer EHV-1 oder EHV-4-Infektion	9
2.2	Das β 2-Mikroglobulin-Gen des Pferdes	11
2.3	Die quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion (QRT-PCR)	12
2.3.1	Einleitung	12
2.3.2	Detektionssysteme	12
2.3.2.1	Nicht spezifische Detektionssysteme	12
2.3.2.2	Spezifische Detektionssysteme	13
2.3.3	Die <i>real-time</i> Auswertung quantitativer PCRs	15
2.3.3.1	Relative Quantifizierung	17
2.3.3.2	Absolute Quantifizierung	17
3.	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.1.1	Zellen	18
3.1.2	Viren	18
3.1.3	Bakterielle Artifizielle Chromosomen	18
3.1.4	Primer und Sonden für die <i>real-time</i> PCR	18
3.1.5	Puffer, Lösungen und Reagenzien	19

3.1.6	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	22
3.2	Methoden	23
3.2.1	Zellen	23
3.2.1.1	Zellkultur	23
3.2.2	Virus	23
3.2.2.1	Virusvermehrung in Zellkultur	23
3.2.2.2	Virustitration	24
3.2.3	DNS	24
3.2.3.1	Präparation viraler DNS	24
3.2.3.2	Isolierung von bakterieller artifizierlicher Chromosomen-DNS aus Bakterien	25
3.2.3.3	DNS-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	25
3.2.3.4	DNS-Konzentrationsbestimmung und Berechnung der Genomkopien	25
3.2.3.5	Probenmaterial	26
3.2.3.6	Isolierung der DNS aus Organ-, Blut- und Nasentupferproben	26
3.2.4	PCR	27
3.2.5	Etablierung der <i>real-time</i> PCR	27
3.2.5.1	Primerdesign und Sondendesign	27
3.2.5.2	Master Mixes	29
3.2.5.3	Durchführung der <i>real-time</i> -TaqMan PCR	29
3.2.5.4	Quantifizierung mittels TaqMan-Technologie	30
3.2.6	Vergleich der Untersuchung von Probenmaterialien mit den verschiedenen EHV-1/-4 spezifischen PCR Verfahren	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Etablierung einer EHV-4-spezifischen quantitativen <i>real-time</i> PCR	32
4.1.1	Primer- und Sondenwahl	32
4.1.2	Primer- und Sondenoptimierung	34
4.1.3	Spezifitätsnachweis der EHV- <i>real-time</i> PCR	37
4.2	Optimierung der EHV-1- und β 2m-spezifischen <i>real-time</i> PCR	37
4.2.1	Primer- und Sondenoptimierung	38
4.2.2	Untersuchung des Einflusses des Gesamtvolumens der PCR-Reaktionen	38
4.3	Etablierung des <i>real-time</i> PCR Multiplexverfahrens zur gleichzeitigen Detektion und Quantifizierung von EHV-1 und EHV-4 DNS	39
4.3.1	Etablierung und Optimierung der möglichen Duplex-PCR-Kombinationen	39

4.3.2	Etablierung der Triplex-PCR-Kombinationen	42
4.4	Vergleich zweier DNA-Isolierungs-Kits	45
4.5	Vergleichende Untersuchung von Probenmaterial mit der konventionellen EHV-1/4-PCR und der <i>real-time</i> PCR	46
4.5.1	Untersuchung von Probenmaterial	46
4.5.2	Untersuchung von Nasentupfern aus Pferdebeständen im Raum München	52
4.6	Begleitende Untersuchungen mehrerer in einem süddeutschen Vollblutgestüt festgestellter EHV-1 bedingter Aborte	53
4.6.1	Gestütsaufbau	53
4.6.2	Zeitlicher Ablauf des Abortgeschehens und Probenentnahmedaten	54
4.6.3	Ergebnisse der virologischen (PCR) und serologischen Untersuchung	54
4.6.4	Virusisolate aus dem Gestüt	57
5.	Diskussion	59
5.1	Spezifität der EHV-4-spezifischen <i>real-time</i> PCR	59
5.2	<i>Real-time</i> PCR im Multiplex-Format	60
5.3	Vergleich konventionelle PCR und <i>real-time</i> PCR	61
5.4	Untersuchung von Nasentupfern aus Pferdebeständen im Raum München	63
5.5	Begleitende Untersuchungen mehrerer in einem süddeutschen Vollblutgestüt festgestellter EHV-1-bedingter Aborte	63
6.	Zusammenfassung / Summary	67
7.	Literaturverzeichnis	71
8.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	79
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

Die Equiden Herpesviren 1 und 4 (EHV-1 und EHV-4) sind der Familie der *Herpesviridae*, der Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* und dem Genus *Varizellovirus* zugeordnet. Sie gehören zu den wichtigsten viralen Krankheitserregern bei Pferden und kommen weltweit enzootisch vor. Sowohl Infektionen mit EHV-1 als auch mit EHV-4 verlaufen häufig subklinisch, können aber auch respiratorische Symptome verursachen. Vor allem durch EHV-1-Infektionen kann es zu Aborten im letzten Drittel der Trächtigkeit und in selteneren Fällen auch zu Myeloenzephalopathien kommen. Insbesondere als Aborterreger nimmt EHV-1 in der Pferdezucht weltweit eine wichtige Stellung ein und ist in Deutschland die häufigste infektiöse Abortursache.

Eine einfache, schnelle und zuverlässige Methode zur virologischen Diagnostik ist insbesondere nach Aborten oder Auftreten zentralnervöser Ausfallserscheinungen in einem Bestand sehr wichtig. Zusätzlich ist für epidemiologische Untersuchungen und für Verlaufskontrollen eine quantitative Bestimmung der Viruslast in Proben eines Einzeltieres oder eines Bestandes ein wichtiges Hilfsmittel.

Da die klinischen Bilder nach Infektionen mit EHV-1 nicht von denen nach Infektion mit EHV-4 zu unterscheiden sind und auch Doppelinfektionen mit EHV-1 und -4 nicht auszuschließen sind, war es Ziel der vorliegenden Arbeit eine Multiplex *real-time* PCR zur Detektion und Differenzierung von EHV-1 und EHV-4 zu etablieren. Als interne Kontrolle und um eine Quantifizierung von Virusgenomen relativ zur Kopienanzahl des Pferdegenoms zu ermöglichen, sollte die gleichzeitige Amplifizierung von Sequenzen des equinen β 2m-Gens herangezogen werden.

Die neu etablierte Methode sollte anhand von archivierten und aktuellen Proben getestet und die Ergebnisse mit denen einer etablierten konventionellen EHV-1/4 PCR verglichen werden. Durch die eingehende Beprobung und begleitende klinische Evaluierung der Tiere eines süddeutschen Vollblutgestüts im Laufe eines Abortausbruches sollten zudem neue Informationen über den Verlauf einer EHV-1-Infektion mit multipler Abortfolge erarbeitet werden.

2. Schrifttum

2.1 Die Equiden Herpesviren Typ 1 (EHV-1) und Typ 4 (EHV-4)

2.1.1 Die Klassifizierung von EHV-1 und EHV-4

Innerhalb der Familie der *Herpesviridae* existieren drei Subfamilien, die *Alpha-*, *Beta-*, und *Gammaherpesvirinae*. Diese Subfamilien werden nochmals in verschiedene Genera unterteilt. EHV-1 und EHV-4 werden zur Subfamilie der *Alphaherpesvirinae* gezählt, die sich unter anderem durch ein relativ variables Wirtsspektrum und gute Vermehrung in der Zellkultur auszeichnen. Innerhalb dieser Subfamilie werden EHV-1 und EHV-4 in das Genus *Varizellovirus* eingeordnet (FAUQUET et al., 2005).

2.1.2 Die Struktur der Viruspartikel

Die Virionen aller Herpesviren bestehen aus Core, Kapsid, Tegument und Hülle. Das Virus-Core im Inneren enthält die doppelsträngige, lineare DNA in Form eines Torus (BRUNNER et al., 1998; FAUQUET et al., 2005). Das Genom wird von einer partikulären Proteinstruktur, dem Kapsid umgeben. Dies besteht aus 162 Kapsomeren und besitzt icosaedrale Struktur mit einem Durchmesser von ca. 100 nm. Als Verbindung zwischen Membranhülle und Kapsid dient das Tegument, welches als amorphe Proteinmasse beschrieben wird, da es sich im Elektronenmikroskop ungleichmäßig verteilt darstellt. Die Virushülle besteht aus modifizierten zellulären Membranen mit verschiedenen viralen, häufig glykolisierten Membranproteinen (ROIZMANN und KNIPE, 2001).

2.1.3 Das Virusgenom

Das Genom von EHV-1 besteht aus 150,2 kbp, das von EHV-4 aus 145,6 kbp (TELFORD et al. 1998). Bei den Herpesviren finden sich einmalig vorkommende („*unique*“) und repetitive („*repeat*“) Sequenzabschnitte, die bei den jeweiligen Genera bzw. Virusgruppen in unterschiedlichen Mustern angeordnet sind. Das Genom der Varicelloviren besteht aus einer „Unique Long“ (U_L)- und einer „Unique Short“ (U_S)-Region. Zwischen diesen beiden liegt eine „Internal Repeat“ (IR)-Region. Diese iterativen Sequenzen wiederholen sich am 3'-Ende des Genoms als „Terminal Repeat“ (TR)-Region (ROIZMAN und KNIPE, 2001).

2.1.4 Das Glykoprotein D

Die Genome von EHV-1 und EHV-4 kodieren jeweils für mindestens 76 virale Proteine. Hierbei handelt es sich zum einen um Strukturproteine, die in das Virion eingebaut werden und zum anderen um Nichtstrukturproteine, die häufig regulatorische Funktionen während der Replikation erfüllen. Die Strukturproteine werden je nach Lokalisation als Hüll-, Kapsid- oder Tegumentproteine bezeichnet.

Bei EHV-1 sind 12 Glykoproteine in der Hülle nachgewiesen (gB, gC, gD, gE-gI, gH-gL, gM, UL49.5 und gp2), die entscheidend am Infektionsprozess beteiligt sind (OSTERRIEDER et al., 1999). Zu EHV-4 liegen noch deutlich weniger Daten vor, aufgrund der Sequenzhomologien kann aber angenommen werden, dass auch hier eine gleiche Anzahl an Glykoproteinen mit ähnlichen Funktionen vorhanden ist (TELFORD et al., 1998).

Das Glykoprotein D ist essentiell für die Viruspenetration und die direkte Ausbreitung der Infektion von Zelle zu Zelle („cell-to-cell-spread“) (CSELLNER et al., 2000). Glykoproteine von EHV-1 und EHV-4 sind relativ hochkonserviert, d.h. es sind auch wenig Veränderungen in der Nukleotidabfolge dieser Gene zwischen verschiedenen Stämmen zu erwarten. Somit eignen sich Glykoprotein-Gene wie das Glykoprotein D-Gen gut zum Nachweis von EHV-1 und EHV-4. Die gD-Gene von EHV-1 und EHV-4 enthalten zudem ausreichend unterschiedliche Sequenzen für eine Differenzierung (TELFORD et al., 1998; CSELLNER et al., 2000).

2.1.5 Die latente Infektion der equinen Herpesviren

Zu den besonderen Eigenschaften der Herpesviren und auch der equinen Herpesviren zählt die Etablierung latenter Infektionen, die in den meisten Fällen lebenslang bestehen (PATEL et al., 1992; KYDD et al., 1994; SLATER et al., 1994). Latente EHV-1 Virusgenome wurden in Ganglienzellen, wie z.B. in den Trigeminalganglien und vor allem in T-Lymphozyten des lymphatischen Gewebes des oberen Respirationstraktes, wie den Lymphonodi mandibulares oder retropharyngeales nachgewiesen (PATEL et al., 1992; KYDD et al., 1994; SLATER et al., 1994). In der Latenz liegt die virale DNS im Kernplasma der Zellen als extrachromosomales Episom in unterschiedlicher Kopienzahl vor. Hier wird sie zusammen mit dem Zellgenom durch die zelluläre DNS-Polymerase repliziert und an Tochterzellen weitergegeben. Unterschiedliche Mechanismen unterdrücken in dieser Phase die Produktion infektiöser Partikel, wobei die molekularen Vorgänge und Regulationsprozesse der Latenz

und vor allem der erneuten Reaktivierung noch kontrovers diskutiert werden. Eine Reaktivierung des Virus scheint jederzeit möglich (GIBSON, 1992a; VAN MAANEN, 2002) und kommt insbesondere bei Phasen von Immunsuppression durch Kortikosteroid-Verabreichungen oder Stress, wie bei Transporten, Trächtigkeit, Laktation, Absetzen oder Stallwechsel vor (EDINGTON et al., 1985; VAN MAANEN, 2002). Bei einer solchen Reaktivierung wird wieder Virus ausgeschieden, es treten aber häufig keine klinischen Symptome auf (SLATER et al., 1994).

2.1.6 Die Pathogenese der EHV-1 und EHV-4-Infektionen

Infektionen mit EHV-1 und 4 erfolgen meist durch direkten Kontakt oder aerogen über Tröpfcheninfektion. Die Ausscheidung der Viren erfolgt vor allem über das Nasensekret und in Abortfällen über die Frucht, das Fruchtwasser und die Plazenta. Als Eintrittspforte gilt vor allem der obere Respirationstrakt (ALLEN und BRYANS, 1986; ALLEN et al., 1999).

Die Inkubationszeit wird in der Literatur mit zwei bis acht Tagen angegeben (GIBSON et al., 1992b; KYDD et al., 1994; ALLEN et al., 1999). Die daran anschließende Virusausscheidung kann vor allem bei erstmals infizierten Pferden auch länger als 14 Tage dauern, wobei die Ausscheidung innerhalb der ersten Tage nach Beginn des Nasenausflusses am stärksten ist (GIBSON et al., 1992b; KYDD et al., 1994).

Die aufgenommenen Viruspartikel adsorbieren an die Zellen des respiratorischen Epithels (VAN MAANEN, 2002). Es folgt eine schnelle Virusreplikation in den Epithelzellen der oberen Atemwege und die Ausbreitung der infektiösen Nachkommenviren von Zelle zu Zelle. Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es zu charakteristischen Veränderungen des nasopharyngealen Epithels mit fokaler, zytolytischer Destruktion und Exfoliation bis hin zur Basalmembran. Außerdem zeigt sich eine starke Sekretion der respiratorischen Drüsen und eine inflammatorische Reaktion, wobei im histologischen Bild eine Infiltration der Lamina propria unterhalb der zerstörten Epithelzellen mit mononukleären Zellen auffällt (GIBSON et al., 1992b; KYDD et al., 1994).

Das Virus gelangt nach subepithelialer Invasion auch in die lokalen Lymphknoten (KYDD et al., 1994). Dort kommt es vor allem bei EHV-1 zu einer Infektion mononukleärer Leukozyten und damit zu einer Leukozyten-assoziierten Virämie, die für einige Tage bestehen bleibt (ALLEN et al., 1999), wohingegen eine Infektion mit EHV-4 meist auf den Respirationstrakt beschränkt bleibt (GIBSON et al., 1992b). Die Pathogenese einiger EHV-1 Aborte lässt sich durch die besonders endotheliotropen Eigenschaften der jeweiligen Virusstämme erklären.

Das Virus gelangt durch die zellassozierte Virämie auch in das Endothel der Blutgefäße des Endometriums. Dort kommt es infolge der Infektion und Replikation in Endothelzellen zu einer Entzündung mit Thrombosen und ischämischen Infarkten im Endometrium (EDINGTON et al., 1991). Das Virus kann aufgrund seiner hohen Affinität zu fetalem Gewebe diaplazentar, entweder über aufsteigende Infektionen über die Nabelgefäße oder mit migrierenden mononukleären Blutzellen zum Fetus gelangen, wobei auch andere Mechanismen diskutiert werden (ALLEN et al., 1999).

Hauptmanifestationsort im infizierten Fetus sind Leber, Lunge und Milz, daher eignen sich diese Organe auch sehr gut für einen Erregernachweis. Während Uterus und Eihäute nach einem Abort in der Regel ohne besonderen pathologischen Befund sind, ist das pathologische Bild der Feten gekennzeichnet durch eine Hyperämie der Schleimhäute, Ergüsse in Thorax und Bauchhöhle, interstitielle Lungenödeme, teilweise Fibrinausgüsse in Bronchien und Trachea, miliare, weißliche Nekroseherde in der Lunge und Leber und eine hochgradige follikuläre Hyperplasie der Milz. Histologisch fallen neben den schon erwähnten miliaren Nekrosen vor allem eosinophile intranukleäre Einschlusskörperchen in Lunge, Leber, Milz und Thymus auf, die als pathognostisch angesehen werden (FREY et al., 1990). Allerdings kommt es nicht bei allen Aborten zu einer Infektion des Fetus. So wurden auch Fälle beschrieben, bei denen die Feten virologisch negativ waren und nur die Plazenta infiziert war (SMITH et al., 1992), daher ist es sinnvoll bei Abortfällen auch die Plazenta zu untersuchen.

Vor kurzer Zeit wurde ein als pulmonale vaskulotrope EHV-1-Infektion bezeichnetes Syndrom beschrieben, welches bei jungen erwachsenen Pferden auf eine EHV-1-bedingte Erkrankung des Respirationstraktes folgt (ALLEN, 2002). Dieses Krankheitsbild wurde bisher aber nur in wenigen Fällen beschrieben (DEL PIERO und WILKINS, 2001). Pathologisch zeigt sich eine multisystemische Vaskulitis, vor allem im Bereich der kleinen Blutgefäße der Lunge mit Hämorrhagien, Ödemen und Fibrin in der Lunge (DEL PIERO und WILKINS, 2001; ALLEN, 2002). EHV-1 ist sowohl in Endothelzellen als auch in Monozyten nachweisbar (DEL PIERO und WILKINS, 2001).

Noch nicht vollständig geklärt ist die Pathogenese neurologischer Erkrankungen. Hier wird ein ähnlicher Verlauf wie beim Abortgeschehen vermutet, wobei infektiöses Virus über die zellassozierte Virämie in Endothelzellen von Blutgefäßen des zentralen Nervensystems gelangt. In der Folge kommt es zu Gewebsschädigungen nach einer thrombotisch, ischämischen Vaskulitis von Arteriolen und Venolen vor allem im Rückenmark. Diese Theorie wird durch die Beobachtung histopathologischer Veränderungen wie Vaskulitis, Thrombosen und petechiale Blutungen v. a. im Rückenmark und daraus resultierender

hypoxischer Degeneration im benachbarten neuronalen Gewebe unterstützt. Aber auch andere Theorien werden diskutiert, so auch eine direkte Infektion von neuronalen Zellen oder ein rein immunkomplex-bedingter Prozess, so dass hier noch Forschungsbedarf besteht (JACKSON et al., 1977; EDINGTON et al., 1986; SCHMIDT et al., 1994; WILSON, 1997; STIERSTORFER et al., 2002).

In diesem Zusammenhang muss noch einmal betont werden, dass bei den meisten Fällen von Myeloencephalopathie nur EHV-1 nachgewiesen werden konnte, so dass man EHV-4 kaum mit diesem Krankheitsbild in Verbindung bringt (KOHN et al., 1987; VAN MAANEN et al., 2001).

2.1.7 Die klinische Symptomatik der EHV-1 und EHV-4-Infektionen

Die klinische Symptomatik einer Infektion mit EHV-1 oder EHV-4 reicht von respiratorischen Erkrankungen und Aborten bei Stuten bis hin zu zentralnervösen Störungen.

Vor allem bei jungen Pferden im Alter von bis zu zwei Jahre kann es durch eine primäre Infektion vor allem mit EHV-4 zu akuten und fieberhaften Erkrankungen der oberen Atemwege kommen (VAN MAANEN, 2002). Die typische Symptomatik besteht in einer akuten Rhinitis mit beidseitigem Nasenausfluss, der in der Regel zu Beginn rein serös ist und häufig übersehen wird. In diesem Sekret finden sich hohe Titer an infektiösem Virus, daher stellen solche Tiere eine Hauptansteckungsquelle für andere Pferde dar. Nach einigen Tagen bildet sich ein eher muköses Sekret von weißlicher Farbe, welches vor allem Leukozyten und desquamierte respiratorische Epithelzellen enthält. In diesem Stadium besteht vor allem bei jungen oder immunsupprimierten Tieren die Gefahr bakterieller Sekundärinfektionen, so dass es zu gelblichem, mukopurulenten Nasenausfluss kommen kann (ALLEN, 2002). Zusätzlich kann es zu einer monophasischen Temperaturerhöhung kommen und zu einer Pharyngitis bzw. Laryngitis mit Husten als typischem Symptom sowie zum Anschwellen der Mandibularlymphknoten. Vor allem bei jungen Pferden besteht die Möglichkeit der Ausbreitung in tiefere Atemwege, wobei sich je nach Ausdehnung eine Tracheobronchitis, Bronchiolitis, schwere Pneumonie oder Pleuritis entwickeln kann (ALLEN und BRYANS, 1986; KYDD et al., 1994; SUTTON et al., 1998).

Bei schweren neurologischen Verläufen von EHV-1-Infektionen bei Jungtieren kann es zu Erkrankungen des Auges kommen, die sich als Uveitis oder Chorioretinitis manifestieren (SLATER et al., 1992). Hierbei kann es in besonders schwerwiegenden Fällen zu einer

vollständigen Zerstörung der Retina kommen, die zur Blindheit der betroffenen Pferde führt (McCARTAN et al., 1995).

Während Infektionen mit EHV-4 meist auf den Respirationstrakt beschränkt bleiben und nur in Einzelfällen Aborte oder eine neurologische Symptomatik hervorrufen, können bei Infektionen mit EHV-1 auch andere Organsysteme betroffen sein. Aborte nach EHV-1-Infektionen sind eine der Hauptursachen für virale Fohlenverluste in den USA (BRYANS et ALLEN, 1989). Häufig verläuft die vorangegangene Atemwegsinfektion der Stute asymptomatisch und es kommt nach einer Inkubationszeit von zwei Wochen bis zu vier Monaten zum plötzlichen Abort (VAN MAANEN, 2002). Diese Aborte sind in der Regel Spätaborte, d.h. sie erfolgen nicht vor dem fünften Trächtigkeitsmonat, sondern zu etwa 65 % während des achten und zu etwa 35 % im neunten oder zehnten Trächtigkeitsmonat (ALLEN et al., 1999).

Falls es in einem späteren Stadium der Trächtigkeit zur Infektion des Fetus kommt, können diese Fohlen lebend geboren werden, sie sind jedoch entweder lebensschwach oder erkranken in den ersten Lebenstagen und sterben meist (VAN MAANEN, 2002).

Eine andere weniger häufige, aber auch schwerwiegende Folge einer EHV-1-Infektion stellt die zentralnervöse Störung, bedingt durch eine Myeloenzephalopathie dar (WILSON 1997). Die Zeitspanne zwischen der initialen Infektion und der neurologischen Symptomatik beträgt etwa sechs bis zehn Tage (ALLEN, 2002). Die betroffenen Tiere erkranken in der Regel zunächst auch mit fieberhaften Allgemeinsymptomen oder respiratorischen Symptomen (EDINGTON et al., 1986; McCARTAN et al., 1995). Die neurologische Symptomatik reicht von leichten Paresen bis hin zu schweren Paralysen mit Festliegen der Tiere. Ein häufiges Bild sind Ataxien der Hintergliedmaßen, zusammen mit Urin- und Kotabsatzstörungen (VERTER et al., 1999; VAN MAANEN, 2002).

2.1.8 Die Epidemiologie der EHV-1 und EHV-4-Infektionen

Equine Herpesviren sind weltweit in der Pferdepopulation endemisch verbreitet (VAN MAANEN, 2002). Aus Deutschland existieren unterschiedliche Studien über Antikörper-Prävalenzen, wobei die ermittelten Werte für EHV-1 zwischen 50 und 70 % liegen und für EHV-4 zwischen 80 und 90 % (WOLFINGER, 1998). Zwischen EHV-1 und EHV-4 besteht allerdings eine Kreuzimmunität, weshalb mit den meisten serologischen Tests nicht zwischen EHV-1- und EHV-4-Antikörpern unterschieden werden kann (VAN MAANEN, 2000). Auch eine Unterscheidung zwischen Impftiter und natürlich erworbener Immunität erfolgte in

keiner der Untersuchungen über Antikörper-Prävalenzen. Über klinisch manifeste und mit Aborten verlaufende Ausbrüche liegen aus unterschiedlichen Ländern Berichte vor (BÜRKI et al., 1984; FRANK, 1989; MATSUMURA et al., 1992). In Deutschland wurden zwischen 1972 und 1993 bei fast 50 % der untersuchten Aborte EHV-1 nachgewiesen, wobei in dieser Studie eine anamnestiche Vorselektion stattfand (KAADEN et al., 1993).

Für die Verbreitung der Viren innerhalb eines Bestandes ist neben der Ausscheidung über das Nasensekret auch die Übertragung von EHV-1 über das Vaginalsekret, Nachgeburten und Abortmaterial von Bedeutung (VAN MAANEN, 2002). Indirekte Übertragungswege dürften aufgrund der geringen Tenazität der Viren eine wesentlich geringere Rolle spielen.

Für die Epidemiologie von besonderer Bedeutung sind latent infizierte Tiere, die unter Stresseinwirkungen bzw. Immunsuppression wieder zu Virusausscheidern werden und somit das Erregerreservoir für die Infektion anderer Pferde darstellen (ALLEN und BRYANS, 1986).

2.1.9 Die Bekämpfung und Prophylaxe

Equine Herpesviren vollständig aus ganzen Beständen zu eliminieren ist aufgrund der weiten Verbreitung praktisch unmöglich. Um jedoch Infektionsfolgen wie Aborte oder zentralnervöse Erscheinungen zu vermeiden und die Ausscheidung von Virus einzugrenzen, sind die besten Strategien die prophylaktische Schutzimpfung und präventive Managementmaßnahmen.

Zur Zeit sind in Deutschland sowohl mehrere inaktivierte als auch eine Lebendvakzine gegen EHV-1 und EHV-4 zugelassen, die als Einzelimpfstoffe oder als Kombinationsimpfstoffe verwendet werden (Liste des PAUL-EHRLICH-INSTITUTS vom 31.07.2006) .

Bei Fohlen ist der Impfbeginn so zu wählen, dass nach dem Abfall der maternalen Antikörper sechs bis acht Wochen nach der Geburt wieder ein maximaler Schutz besteht, da gerade bei jungen Pferden häufig Stresssituationen durch Transporte, Absetzen, neue Lebensräume oder beginnendes Training vorkommen (ALLEN, 2002). Trächtige Stuten sollten nach den Impfeempfehlungen der Herstellerfirmen rechtzeitig und oft genug geimpft werden, um das Abortrisiko zu senken und einen möglichst hohen Spiegel an maternalen Antikörpern zu erreichen (ALLEN und BRYANS, 1986).

Ein konsequentes Impfprogramm kann zu einer Abschwächung klinischer Symptome und zur Minderung der Menge und Dauer der Virusausscheidung führen (ALLEN, 2002). Einen

vollständigen Schutz vor einer Infektion, aber auch vor deren Folgen kann keine der Vakzinen gewährleisten (BÜRKI et al., 1990; VAN MAANEN, 2002).

Als weitere prophylaktische Maßnahmen gelten die Vermeidung von Stress und insbesondere in Gestüten oder größeren Ställen die Unterteilung der Pferde in Gruppen nach Alter, Gestationsstatus und Nutzung. Insbesondere das Verbringen neuer Tiere, oder der Kontakt zu anderen Tieren z.B. bei Turniereinsätzen oder Rennen stellt eine Gefahr zur Einschleppung des Virus dar. Hier kann eine Quarantäne von mindestens 21 Tagen helfen, die jedoch bei Turniereinsätzen oder Rennen nur schwer realisierbar ist (ALLEN, 2002).

Auch das Hygienemanagement vor allem in Gestüten spielt eine wichtige Rolle. So sollte nach einem Ausbruch eine gründliche Desinfektion durchgeführt werden, sämtliches Abortmaterial und die Einstreu entfernt werden und die betroffenen Stuten isoliert werden (FREY, 1990).

2.1.10 Die Diagnose einer EHV-1 oder EHV-4-Infektion

Da bei einer EHV-1 oder EHV-4-Infektion allein aufgrund der klinischen Symptomatik höchstens eine Verdachtsdiagnose gestellt werden kann, muss die Diagnose durch Laboruntersuchungen abgesichert werden. Als Untersuchungsmaterial wird meist Nasensekret, venöses Blut und bei Aborten Organmaterial verwendet, wobei am besten ein Organpool des abortierten Fohlens und die Plazenta untersucht werden sollte. Bei der Nasentupferentnahme ist darauf zu achten, dass diese innerhalb der ersten 48 Stunden nach Beginn der Erkrankung erfolgen sollte, wenn der Patient noch Fieber hat. Venöses Blut sollte zwischen dem vierten und zehnten Tag nach Beginn der respiratorischen Symptome genommen werden, da es zu diesem Zeitpunkt bereits zur Virusreplikation im oberen Respirationstrakt und zur Infektion mononukleärer Leukozyten gekommen ist und somit das Virus im Blut nachweisbar sein kann (ALLEN, 2002). Für eine serologische Diagnose sind gepaarte Serumproben im Abstand von 14-21 Tagen zu nehmen (ALLEN, 2002).

Direkter Virusnachweis:

Der direkte Erregernachweis erfolgt in der Routinediagnostik durch Anzucht in der Zellkultur und anschließende Beurteilung des cytopathischen Effektes (VERTER et al., 1999). Hierfür können Nasopharyngeal- und Konjunktivaltupferproben, Organmaterial des abortierten Fetus oder Plazenta und bei EHV-1 während der akuten Infektionsphase auch Blutproben verwendet werden (ALLEN und BRYANS, 1986). Vorteile der Virusanzucht sind eine gute Sensitivität und Spezifität, Nachteile sind die lange Dauer und der relativ hohe Aufwand.

Ein Antigennachweis kann durch Anwendung der direkten oder indirekten Immunfluoreszenz-, Immunperoxidase- und Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)-Technik an formalinfixierten Paraffinschnitten oder Gefrierschnitten von Organen erfolgen. Auch sind hiermit retrospektive Studien möglich (SCHULTHEISS et al., 1993). Ein 1992 entwickelter ELISA zum Antigennachweis aus Nasentupferproben zeigte im Vergleich zur übrigen Zellkulturtechnik nur eine Sensitivität von 68 % und eine Spezifität von 100 % (SINCLAIR und MUMFORD, 1992).

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises von EHV-1 und EHV-4-Infektionen ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit der Virus-DNS nachgewiesen wird.

Als Proben eignen sich EDTA-Blut, Nasentupfer, Organmaterial von abortierten Feten, Plazenta oder bei neurologischen Fällen das Rückenmark. Ein großer Vorteil der PCR ist die Automatisierbarkeit, Geschwindigkeit und die wesentlich höhere Sensitivität, gegenüber der Virusisolierung. Zudem ermöglicht sie eine sichere Unterscheidung von EHV-1 und EHV-4 (HARDT 1992; GILKERSON et al. 1994) oder auch von EHV-1-Feld- und Impfviren (OSTERRIEDER et al. 1994). Dabei stimmen die Ergebnisse gut mit anderen Untersuchungsmethoden wie Virusisolierung und Pathohistologie überein (HARDT 1994). Probleme können bei der PCR vor allem durch unerwünschte Kontaminationen auftreten, aufgrund der hohen Sensitivität muss sehr sauber gearbeitet werden. Außerdem muss bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden, dass Nukleinsäuren nachgewiesen werden und somit nicht immer sicher zwischen latenter und akuter Infektion unterschieden werden kann.

Als eine Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR sind mittlerweile auch verschiedene *real-time*-PCR-Protokolle als Nachweisverfahren sowohl für EHV-1 als auch für EHV-4 etabliert (DIALLO et al., 2005; ELIA G. et al., 2005; PUSTERLA et al., 2005; GOODMAN et al., 2006; HUSSEY et al., 2006; DIALLO et al., 2007).

Die *real-time*-PCR bietet alle Vorteile der konventionellen PCR, gleichzeitig aber eine nochmals höhere Sensitivität und Spezifität der Reaktion durch die Verwendung spezifischer Fluoreszenzsonden (MACKAY, 2002). So konnten bei EHV-1 selbst Virusmengen von 6 Genomkopien noch nachgewiesen werden (HUSSEY et al., 2006). Bei anderen *real-time*-PCR Protokollen konnten weniger als eine TCID₅₀ von EHV-1 und 0,15 pg EHV-1-DNA nachgewiesen werden (DIALLO et al., 2005) bzw. es konnten noch 10 Genomkopien des Virus nachgewiesen werden (ELIA et al., 2005).

Die Spezifität der *real-time*-PCR für EHV-1 lag in allen Fällen bei 100 %, sowohl andere Typen von equinen Herpesviren (EHV-2,-3 und -4) als auch verschiedene Bakterienstämme zeigten C_T-Werte vergleichbar mit negativen Proben (DIALLO et al., 2005).

Zusätzlich lässt sich mit Hilfe der *real-time*-PCR nicht nur eine qualitative Aussage treffen, sondern auch eine genaue Bestimmung der Virusmenge in einer Probe vornehmen. Gegenüber der konventionellen PCR ist der Wegfall der Gelelektrophorese wichtig. Damit sind weniger Arbeitsschritte nötig, der Umgang mit potentiell kanzerogenen Stoffen wie Ethidiumbromid entfällt, man erhält schneller ein Ergebnis und das Kontaminationsrisiko sinkt deutlich. Zusätzlich kann man die Viruslast in Patienten über einen bestimmten Zeitraum verfolgen, und somit eine Aussage über die virale Replikation und damit über den Verlauf der Erkrankung oder auch die Wirksamkeit einer Therapie machen (SCHUTTEN, 2001).

Indirekter Virusnachweis:

Der Antikörper-Nachweis erfolgt mit Hilfe von Serumneutralisationstests (SNT) oder ELISAs, wobei hier Serumpaare verwendet werden sollten (VERTER et al., 1999; DOERR und BRAUN, 2002). Ein hoher Antikörpertiter ist ohne klinische Symptomatik nicht aussagekräftig, weil häufig auch sehr hohe Titer ohne klinische Symptome über Monate hinweg persistieren können (LUDWIG et al., 1999). Außerdem erhält man erst nach zwei Wochen ein endgültiges Ergebnis über einen eventuellen Antikörper-Anstieg. Neben dem SNT wird am häufigsten ein Glykoprotein G (gG) -ELISA eingesetzt, mit welchem auch eine Differenzierung zwischen EHV-1 und EHV-4 möglich ist (CRABB und STUDDERT, 1995). Früher wurden häufig Komplement-Bindungs-Reaktionen (KBR) zur serologischen Diagnostik verwendet. Weil aber KBR-Titer schneller als Neutralisationstiter absinken, ist die KBR vor allem für die Untersuchung akuter Infektionen geeignet (MUMFORD et al., 1987). Auch andere ELISAs mit rekombinantem EHV-1-Glykoprotein sind zum Antikörpernachweis geeignet (SINCLAIR et al., 1992).

2.2 Das β_2 -Mikroglobulin-Gen des Pferdes

β_2 -Mikroglobulin ist ein niedermolekulares Protein und Bestandteil des MHC-I-Komplexes (Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. *major-histocompatibility-complex*), welcher sich aus Glykoprotein-Heterodimeren zusammensetzt. Diese bestehen aus vier extrazellulären Domänen, drei α -Ketten und einem β_2 -Mikroglobulin. MHC-Klasse-I Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren zytosolische Peptide, die dann von T-Zellen erkannt werden.

Das β_2 -Mikroglobulin-Gen ist in jeweils einer Kopie auf dem Pferdechromosom ECA 1 lokalisiert und die Genomsequenz bekannt (TALLMADGE, 2002). Damit ist diese Sequenz für die Quantifizierung von zellulärem Material gut geeignet.

2.3 Die quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (QRT-PCR)

2.3.1 Einleitung

Die Technik der quantitativen *real-time*-PCR kombiniert die Nukleinsäureamplifikation, d.h. die konventionelle PCR-Reaktion mit der Detektion und Sichtbarmachung des entstandenen Produkts in einem Reaktionsgefäß. Die Charakterisierung des PCR-Produkts erfolgt nicht wie beim traditionellen PCR-Verfahren erst am Ende der Reaktion durch Gelelektrophorese, sondern in Echtzeit mittels während jeden Zyklus gemessener Fluoreszenzintensität, die wiederum von der Produktmenge abhängig ist (HIGUCHI et al., 1993; HEID et al., 1996).

Die Sichtbarmachung der amplifizierten Sequenzen ist grundsätzlich mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzdetektionssystemen möglich. Beide Möglichkeiten beruhen auf der Tatsache, dass der Anstieg der Fluoreszenz proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes ist und erlauben somit auch eine Quantifizierung der Ausgangs-DNA.

2.3.2 Detektionssysteme

2.3.2.1 Nicht spezifische Detektionssysteme

Diese Detektionssysteme beruhen auf interkalierenden Farbstoffen, die sich zwischen die Nukleotidbasen der DNA einlagern, um das entstehende Amplikon sichtbar zu machen. Der heute am häufigsten verwendete Farbstoff ist SYBR Green™ (HIGUCHI et al., 1992, 1993). Nach Anregung durch energiereiches UV-Licht fluoresziert der in die Windungen der ds-DNA eingelagerte Farbstoff ungefähr 1000 mal stärker als der freie Farbstoff. Da diese Farbstoffe nicht sequenzspezifisch binden, können sie universell verwendet werden (BUSTIN, 2000), außerdem besitzen sie eine hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoffmoleküle bindet. Es kann jedoch zunächst nicht zwischen korrektem Amplifikationsprodukt und Artefakten, wie z.B. Primer-Dimeren unterschieden werden, da diese ebenfalls den Farbstoff binden und zu einem Fluoreszenzanstieg in negativen Proben führen (VANDESOMPELE et al., 2002).

2.3.2.2 Spezifische Detektionssysteme

Spezifische Detektionssysteme funktionieren mit Hilfe fluorogener Sonden, d.h. es werden zur PCR-Reaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotide, sogenannte Sonden (engl.: “*probes*“) gegeben. Diese sind meist zwischen 20 und 30 Basen lang und sollen während der Reaktion sequenzspezifisch zwischen den Primern hybridisieren. Erst durch die Hybridisierung an die gewünschte Zielsequenz wird Fluoreszenz emittiert.

Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe an unterschiedlichen Sondenprinzipien, die aber alle auf dem gleichen Prinzip beruhen, dem sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) (FÖRSTER, 1948; CARDULLO et al., 1988). Ein Fluoreszenzfarbstoff lässt sich demnach mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) anregen und strahlt anschließend die aufgenommene Energie als Licht einer anderen Wellenlänge (E1) wieder ab (Emission). Jeder Fluoreszenzfarbstoff verfügt über ein bestimmtes Anregungs- und Emissionsspektrum. Wenn man nun ein Fluorochrom (F1) in ausreichende Nähe, d.h. nicht mehr als 17-20 Basen Abstand, zu einem zweiten Fluorochrom (F2) bringt, dessen Anregungsspektrum (A2) dem Emissionsspektrum des ersten Fluorochroms (E1) entspricht, springt die Energie zwischen beiden über (CARDULLO et al., 1988). Die Energie wird dann nicht als Licht der Wellenlänge E1 abgestrahlt, sondern direkt an Fluorochrom 2 weitergeleitet. Man kann nun während der PCR die Fluoreszenz bei Wellenlänge E1 oder E2 verfolgen und so die räumliche Nähe der Fluorochrome beurteilen (SELVIN, 1994). Wenn E1 gemessen wird, bezeichnet man Fluorochrom 1 als *Reporter* oder Fluorophor und Fluorochrom 2 als *Quencher* (engl. to quench = löschen). Misst man dagegen E2, so ist F1 der Donor (lat.: = Spender) und F2 der Akzeptor (lat. =Empfänger).

Am häufigsten wird der Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) als *Reporter/Donor* eingesetzt. Es gibt jedoch noch einige andere Farbstoffe, die alle ein spezifisches Absorptions- und Emissionsspektrum haben, so dass es möglich ist, unterschiedliche Reporterfarbstoffe gebunden an verschiedene Sonden, gleichzeitig in einer Reaktion zu benutzen.

Tab. 1: Übersicht über die gebräuchlichsten Reporterfarbstoffe

Abkürzung	Farbstoff	Anregung (nm)	Emission (nm)
FAM	6-carboxy-Fluorescein	492	518
TET	Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein	521	538
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein	527	548
HEX	Hexachloro-6-carboxy-fluorescein	535	556
ROX	6-carboxy-X-Rhodamin	575	602
Cy5	Carbocyanin 5	635	665

Als *Quencher* verwendet man häufig den Fluoreszenzfarbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin). Neu entwickelte Quencher, sogenannte dark, black-hole oder non-fluorescent Quencher, wie Dabcyl oder Methylorange (NASARABADI et al., 1999) emittieren das aufgenommene Licht nicht als Licht anderer Wellenlänge, sondern stattdessen als Wärme und können im Vergleich zu anderen Quenchern, wie TAMRA die Lichtemission noch besser unterdrücken und interferieren auch nicht mit der Messung, so dass sie vor allem für die Multiplex-PCR und die Markierung von Molecular Beacons eingesetzt werden.

Tab. 2: Übersicht über die gebräuchlichsten Quencherfarbstoffe

Quencher	Adsorption (nm)	Emission (nm)
TAMRA	555	580
Methyl red	410	Wärme
ElleQuencher	650, 600	Wärme
Dabcyl	453	Wärme
Dabsyl	466	Wärme

Beim sogenannten **Double Dye Sonden Prinzip** sind zwei Fluorochrome an eine Sonde gekoppelt. Nach diesem Prinzip funktionieren auch die sogenannten TaqMan-Sonden. Der Reporterfarbstoff befindet sich am 5'-Ende, der Quencherfarbstoff am 3'-Ende. Zusätzlich hängt am 3'-Ende noch eine Phosphatgruppe, damit die Sonde bei der Elongation nicht als Primer fungieren kann (LIE, 1998). Solange die Sonde intakt ist, ist die Emission gering, weil fast die gesamte Lichtenergie, die nach der spezifischen Anregung des Reporters entsteht, aufgrund der räumlichen Nähe vom Quencher aufgenommen wird (WALKER, 2002). Dieser FRET-Effekt bleibt auch nach Bindung der Sonde an den komplementären DNA-Strang

erhalten. Während der Elongationsphase trifft die Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität (LIE, 1998). Nach der Hydrolyse der Sonde befindet sich der Reporterfarbstoff nicht mehr in räumlicher Nähe zum Quencher, wodurch es zu einer Abnahme der Löschung der Fluoreszenz und so zum Anstieg der Reporter-Fluoreszenz kommt. Dabei wächst das Reportersignal in Abhängigkeit von der Anzahl der freigesetzten Reportermoleküle (GIBSON et al., 1996; HEID et al., 1996).

Sogenannte **Minor Groove Binder (MGB) Sonden** sind zusätzlich mit einem Indolderivat modifiziert. Es besitzt eine Affinität zu der doppelsträngigen DNA, in welche es sich einlagert und bildet stabile Hybride (KUMAR et al., 1998). Zu dieser zusätzlichen Bindung kommt es erst bei exakter Bindung der Sonde. Dies ermöglicht eine erhöhte Spezifität und somit eine präzise Detektion von Punktmutationen (BUSTIN, 2002). Solche Sonden können somit bei gleicher Annealingtemperatur kürzer als herkömmliche *Double Dye Sonden* konstruiert werden (BUSTIN, 2002).

Außerdem gibt es noch sogenannte „**Molecular Beacons**“ und „**Skorpion-Sonden**“, bei welchen die Nukleotide am 5'-Ende denen am 3'-Ende komplementär sind, so dass sich eine charakteristische Sekundärstruktur ausbilden kann. In dieser Form zeigt der Reporterfarbstoff keine Fluoreszenz durch den geringen Abstand zum Quencher. Durch die Hybridisierung kommt es zur Öffnung dieser Haarnadelstruktur, damit zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher und zum Fluoreszenzanstieg (TYAGI und KRAMER, 1996; KOSTRIKIS et al., 1998; BUSTIN, 2000).

2.3.3 Die *real-time* Auswertung quantitativer PCRs

Die während des Amplifikationsprozesses gemessene native Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs wird als R bezeichnet. Wenn die gemessene Fluoreszenz um den Fluoreszenzwert der Basislinie korrigiert wird, so bezeichnet man diesen Wert als dR . Ein Referenzfarbstoff (meistens ROX oder HEX) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der zu allen Reaktionsansätzen in gleicher Menge gegeben wird und zur Abgleichung möglicher sondenspezifischer Fluoreszenzunterschiede dient, die aufgrund von unterschiedlichen Volumina (Pipettierfehlern) in den einzelnen Reaktionsgefäßen entstehen (R_n -Wert). Außerdem dient der Referenzfarbstoff zum Abgleich varrierender Fluoreszenzwerte, die dadurch entstehen, dass die optische Detektionseinheit von Reaktionsgefäß zu Reaktionsgefäß fährt und damit unterschiedliche Aberrationen des Lichts entstehen können. Wenn man die gemessene Fluoreszenz mit Basislinie und Referenzfarbstoff korrigiert, so entsteht der Wert dR_n (Stratagene Handbuch 2006).

Mit Hilfe einer entsprechenden Software wird aus den ermittelten Fluoreszenzwerten eine graphische Darstellung, eine sogenannte Amplifikationsgrafik erstellt. Dabei wird die gemessene Fluoreszenz auf der Ordinate gegen die Zyklenzahl auf der Abszisse aufgetragen. Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe eine gewisse Grundfluoreszenz (GF) aufweisen und die verwendeten Reaktionsgefäße bei Anregung eine gewisse Hintergrundfluoreszenz haben, ist der beim Start der Reaktion gemessene Fluoreszenzwert nicht gleich null. Bevor die Fluoreszenz ansteigt, bleibt sie einige Zyklen lang unverändert und verläuft so als gerade Linie parallel zur x-Achse und wird als Basislinie bezeichnet.

Damit man einen Wert erhält, ab welchem die gemessene Fluoreszenz einer Probe klar von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden ist und wo die Probe als positiv zu werten ist, wird ein Schwellenwert (*Threshold*) gesetzt. Dieser Punkt ist definiert als die Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz, gemessen zwischen Zyklus drei und fünfzehn, multipliziert mit dem Faktor 10 (GIBSON et al., 1996).

Als *Cycle-threshold* (C_T) oder *Crossing Point* (CP) bezeichnet man den Schnittpunkt zwischen den Fluoreszenzwerten und dem Schwellenwert projiziert auf die x-Achse. Dieser Schnittpunkt stellt den niedrigsten messbaren positiven Wert dar. Der C_T -Wert entspricht der Anzahl an PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Beim C_T -Wert befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Ein um eine Einheit geringerer C_T -Wert entspricht theoretisch der doppelten Menge an eingesetzter cDNA. Somit stellt der C_T -Wert die Grundlage für die Quantifizierung der *real-time* PCR Reaktion dar (GIBSON et al., 1996).

Das Prinzip der Quantifizierung der Ausgangsmenge an DNS unterscheidet sich grundlegend von dem der konventionellen RT-PCR, weil hier nicht die absolute Menge an PCR-Amplifikat, das bis zum Ende der Reaktion entsteht gemessen wird, sondern der C_T -Wert dafür genutzt wird. Dieser Wert verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an Nukleinsäure (HIGUCHI et al., 1993). So könnte man theoretisch anhand des C_T -Wertes auf die ursprüngliche DNS-Menge zurückschliessen, wenn man gleichzeitig die Vermehrungsrate der PCR kennen würde. Die Amplifikation wird aber von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst, so dass es nicht möglich ist, die genaue Vermehrungsrate einer Reaktion zu bestimmen (BUSTIN, 2000). Somit ist es einfacher, parallel zu den Untersuchungsproben, Proben mit bekannter Menge an DNS in Form eines Standards zu amplifizieren und die ermittelten C_T -Werte miteinander zu vergleichen. Die eigentliche Quantifizierung kann relativ oder absolut erfolgen.

2.3.4.1 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung handelt es sich um die Bestimmung des Verhältnisses der Nukleinsäuremenge in der zu untersuchenden Probe zu der bekannten Nukleinsäuremenge in einer Vergleichsprobe. Hierfür muss weder die Konzentration der Zielsequenz bekannt sein, noch eine Standardkurve mit bekannter Konzentration erstellt werden, weil nur ein Verhältnis beider Proben zueinander berechnet wird (BUSTIN, 2000).

Hierbei gibt es zwei Methoden der Berechnung der relativen Menge an Nukleinsäure, zum einen die Standardkurvenmethode, zum anderen die $\Delta\Delta C_T$ -Methode (LIVAK und SCHMITTGEN, 2001). Bei beiden Berechnungsmethoden wird neben der Zielsequenz auch noch ein Referenzgen, das sogenannte *housekeeping gene* oder nicht-reguliertes Gen als endogene Kontrolle amplifiziert.

2.3.4.2 Absolute Quantifizierung

Diese Methode erlaubt eine relativ genaue Bestimmung der Kopienzahl pro Zelle bzw. der Nukleinsäurekonzentration. Hierbei muss jedoch bei jedem Lauf eine Standardkurve erstellt werden. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe eines bekannten Standards mit definierten Konzentrationen an Nukleinsäure benötigt. Der Standard muss die gleiche Sequenz aufweisen und mit denselben Primern amplifiziert werden, wie die zu quantifizierende Zielsequenz.

Die ermittelten C_T -Werte der Standardverdünnung werden für die Standardkurve oder Regressionsgerade gegen ihre logarithmische Konzentration, z.B. die Kopienzahl aufgetragen. Für eine PCR sind linearisierte Plasmide mit einer klonierten Zielsequenz als Standard besonders geeignet und werden als rekombinante Standards bezeichnet (BUSTIN, 2000).

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

- Rk-13 (Kaninchennierenzellen, Zelllinie) ab der 67. Passage
- NBL-6-Zellen (Equine Hautzellen, Zelllinie) ab der 52. Passage
- Vero-Zellen (Grüne Meerkatze, Nierenzellen, Zelllinie) ab der 54. Passage

3.1.2 Viren

- RacL11 (Plaueisolat des auf embryonalen Schweinenierenzellen attenuierten EHV-1-Stammes RacH (MAYR et al., 1968), welches für Labortiere und Pferde pathogen ist.)
- Aktuelle EHV-1-Stämme (Isolate aus dem süddeutschen Raum, aus den Jahren 1999 bis 2006, die aus Organproben abortierter Fohlen bzw. einer nach Myeloenzephalopathie verendeten Stute isoliert wurden, STIERSTORFER et al., 2002; Neubauer und Eichhorn, unveröffentlicht.)
- EHV-4 (Isolat aus den USA, aus einem Nasentupfer eines an Rhinopneumonitis erkrankten Pferdes isoliert (ZIEGLER et al., 2005))

3.1.3 Bakterielle Artifizelle Chromosomen

- pRacL11, das Genom von RacL11 als bakterielles artifizielles Chromosom (BAC) kloniert, in *E. Coli* Stamm BW 25141 (RUDOLPH et al., 2002, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jens von Einem und Nikolaus Osterrieder)
- β 2m BAC (BAC Klon, der das equine β 2m-Gen enthält, TALLMADGE et al., 2002, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Rebecca Tallmadge und Dr. Douglas Antczak, Cornell)

3.1.4 Primer und Sonden für die *real time* PCR

- Primer (Fa. Applied Biosystems, UK; Fa. MWG Biotech, Ebersberg)
- Fluoreszenzsonden (Fa. Applied Biosystems, UK; Fa. MWG Biotech, Ebersberg)

3.1.5 Puffer, Lösungen und Reagenzien

- Aqua destillata (A. dest.)
- Aqua demineralisata (A. demin.)
- Agarose, peqGOLD Universal (Fa. Peqlab, Erlangen)
0,8 bis 2% (w/v) in 0,5 oder 1x Elektrophoresepuffer TAE
- Bromphenolblau (Fa. Merck, Darmstadt)
- BSE-Puffer 10x
0,25 % Bromphenolblau
70 mM EDTA, pH 8,0
5 % SDS (w/v)
50 % Sucrose (w/v)
- Chloroform (Fa. Merck, Darmstadt)
- EDTA, Ethylendiamintetraacetat (Fa. Serva, Heidelberg)
- Eisessig (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Elektrophorese-Puffer (für Agarose Gelelektrophorese) 50fach konzentriert TAE
2 M Tris
0,25 M Na-Acetat
0,005 M EDTA
in A. dest. mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt
- Ethanol, absolut (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid (Fa. Sigma, München)
- FKS, fetales Kälberserum (Fa. Seromed, Berlin)
- GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit
- Glucose
- Hank`s Medium
- Hank`s modified Eagle`s Medium
4,8 g/l Earle`s Medium
5,3 g/l Hank`s Medium
1,5 g/l NaHCO₃
120 mg/l Pyruvic Acid
- IAC: 1 Teil Isoamylalkohol und 24 Teile Chloroform
- Isoamylalkohol (Fa. Merck, Darmstadt)

- Isopropanol (Fa. Applichem, Darmstadt)
- KB-Leiter, 1 kb und 12 kb (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
- LB-Medium, Luria-Bertoni-Medium
 - 10 g/l Bacto Trypton (Fa. Difco, Detroit)
 - 5 g/l Bacto Yeast Extract (Fa. Difco, Detroit)
 - 5 g/l NaCl
 - auf pH 7,2 mit 1 N NaOH eingestellt
- LB-Amp-Nährbodenplatten
 - LB-Medium (Fa. Roche, Mannheim)
 - 100 µg/ml Ampicillin
 - 1,5 % Bacto-Agar
- LB-Kana-Nährbodenplatten
 - LB-Medium (Fa. Applichem, Darmstadt)
 - 50 µg/ml Kanamycin
 - 1,5 % Bacto-Agar
- LB-Chloramphenicol-Nährbodenplatten
 - LB-Medium (Fa. Sigma, München)
 - 30 µg/ml Chloramphenicol
 - 1,5 % Bacto-Agar
- LiCl, Lithiumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt)
- Master Mixes:
 - Für PCR: Pre-Aliquoted ReddyMix™ PCR Master Mix (Fa. Abgene, UK)
 - Für real-time PCR: TaqMan® Universal PCR Master Mix (Fa. Applied Biosystems)
 - PeqGOLD Hot Start-Mix “Real-Time” (Fa. Peqlab, Erlangen)
 - QiagenQuantiTect Multiplex PCR (Fa. Qiagen, Hilden)
- MEM, Minimal Essential Medium; mit Hank`s und Earle`s-Salzen, Pyruvat und NaHCO₃
- Methylcellulose (Fa. Sigma, München)
 - 25 g Methylcellulose, MC 4000 in A. dest.
 - ad 1000 ml
- PBS (Phosphate Buffered Saline; pH 7,4)
 - 8 g NaCl
 - 0,2 g KCl
 - 1,12 g Na₂HPO₄

0,2 g KH_2PO_4
0,1 g CaCl_2
0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml A. dest

- Phenol pH 8,0 (Fa. Applichem, Darmstadt)
- Proteinase K (Fa. Sigma, München)
- QIAEX II Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
- QIAamp® DNA Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
- Qiagen Plasmid Midi Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
- Restriktionsendonucleasen (Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.; Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
- RNAse A (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
100 mg RNAse A in 1 ml TE-Puffer, pH 8,0
- Sarkosylpuffer:
75 mM Tris-HCl, pH 8,0
25 mM EDTA
10 % (w/v) N-Lauroylsarkosin, Na-Salz
- SOG-Medium:
2 % Bacto Trypton (Fa. Difco, Detroit)
0,5 % Bacto Yeast Extract (Fa. Difco, Detroit)
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl_2
10 mM MgSO_4
2 % Glukose
- STV, Saline-Trypsin-Versene-Lösung:
100 ml Saline
50 ml Trypsin 1,25 % (w/v)
25 ml Versene
10 ml NaHCO_3
- TE-Puffer
10 mM Tris, pH 8,0
1 mM EDTA

- TEN-Puffer
 - 150 mM NaCl
 - 20 mM Tris.-HCl, pH 7,4
 - 1 mM EDTA
- Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Tris-HCl, pH 8,0
- Versene
 - 3 mM KCl
 - 1,5 mM KH_2PO_4
 - 140 mM NaCl
 - 10 mM Na_2HPO_4
 - mit A. dest. auf 100 ml
- Wizard Genomic DNA Purification Kit (Fa. Promega, USA)

3.1.6 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

- Baumwolltupfer (Fa. Sarstedt, Nürnberg)
- Blutentnahmesystem S-Monovette® (Fa. Sarstedt, Nürnberg)
- Eismaschine KF75 (Fa. KKS GmbH, München)
- Elektrophoresekammer Mupid-2 Cosmo (Fa. Bio Co, Tokio)
- Elektrophoresekammer (Fa. BioRad, München)
- Falcon tubes (Fa. Sarstedt, Nürnberg)
- Heizblock Thermostat 5320 (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Klebefolie für Mikrotiterplatten, Optical Adhesive Covers (Fa. Applied Biosystems, UK)
- Laborwaage, Präzisionswaage Navigator (Fa. Ohaus, Giessen)
- Mikrotiterplatten, MicroAmp® Optical 96-Well Plate (Fa. Applied Biosystems, UK)
- PCR-Thermocycler Gene Amp PCR System 2400 (Fa. Perkin Elmer, USA)
- PCR-Caps, MicroAmp® Optical Caps (Fa. Applied Biosystems, UK)
- PCR-Tubes, MicroAmp® Optical Tubes (Fa. Applied Biosystems, UK)
- Photometer Uvikon xs (Fa. Bio-Tek, Bad Friedrichshall)
- Pipetten, diverse Kolbenhubpipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Pipettenspitzen, aerosolgeschützt (Fa. Sarstedt, Nürnberg)
- Power Supply Power Pac 200 (Fa. Bio Rad, München)

- Real-time-PCR-Gerät Stratagene MxPro 3005P (Fa. Stratagene, USA)
- Thermomixer compact (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Vortex Genie™ (Fa. Scientific Industries, Puchheim)
- Wasserbad: Julabo SW-20 C (Fa. Julabo, Seelbach)
- Zellkulturplastikwaren: (Fa. Nunc, Wiesbaden)
Zellkulturflaschen (175 cm², 75 cm²)
24- und 96-Lochplatten
- Kühlzentrifuge Heraeus Suprafuge 22 (Fa. Heraeus, Hanau)
Rotor 12500 (Fa. Heraeus, Hanau)
Rotor SS34 (Fa. DuPont Sorvall, Bad Homburg)
- Kühlzentrifuge Sigma MK 202 (Fa. Sigma, München)
- Stock-Zentrifuge (Fa. Wilhelm Stock, Marburg)
- Ultrazentrifuge LE 80 K (Fa. Beckmann, Krefeld)
Rotor SW 28
Rotor SW 40

3.2 Methoden

3.2.1 Zellen

3.2.1.1 Zellkultur

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Rk13-Zellen, NBL-6-Zellen und Vero-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in Hanks Modified Eagles Medium mit 5 bis 10 % fetalem Kälberserum (FKS) in Plastik-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Die im Monolayer wachsenden Zellen wurden durch Ablösen mit STV und nachfolgender Resuspension eines Teils der Zellen in frischem Medium passagiert.

3.2.2 Virus

3.2.2.1 Virusvermehrung in Zellkultur

Der EHV-1 Stamm RacL11 wurde zunächst auf Rk13-Zellen, der EHV-4-Stamm auf Vero-Zellen oder NBL-6-Zellen vermehrt. Hierfür wurden frisch geteilte Zellen mit einer MOI von

0,1 infiziert und dem Zellkulturmedium nach 90 minütiger Inkubation bei 37 °C 2 % FKS zugegeben. Nachdem bei über 80 % der Zellen ein zytopathischer Effekt (zpE) aufgetreten war, wurden die Zellen zur Freisetzung intrazellulärer Virionen zweimal eingefroren und wieder aufgetaut und die Virussuspension anschließend zur Reinigung von zellulären Bestandteilen 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde portioniert, der Virustiter bestimmt und bei -70 °C gelagert.

3.2.2.2 Virustitration

Um die Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten pro ml Virussuspension (PbE/ml) zu bestimmen, wurden die Virussuspensionen in Hanks Medium von 10^{-1} bis 10^{-7} in 10er Schritten verdünnt und diese Verdünnungen in Doppelansätzen auf Rk13-Zellen in einer 24-Loch-Platte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 min bei 37 °C wurde die Virussuspension entfernt und durch Methylzellulose ersetzt, um so eine Ausbreitung der Nachkommen-Viren über das Nährmedium zu verhindern. 5 Tage nach der Infektion konnte die Anzahl der Plaques pro Verdünnungsstufe unter einem Mikroskop bestimmt werden und damit der Titer der Virussuspension errechnet werden.

3.2.3 DNS

3.2.3.1 Präparation viraler DNS

Jeweils zwei Zellkulturflaschen mit infizierten Zellen wurden nach Auftreten eines 100 %igen zytopathischen Effektes verwendet. Zelluläre Bestandteile und Virionen wurden durch 90 minütige Zentrifugation bei 25.000 rpm aus der Suspension pelletiert und das gewonnene Pellet in 900 µl TEN resuspendiert. Nachdem 300 µl Sarkosylpuffer hinzugegeben und für 15 min bei 65 °C inkubiert worden war, wurden 3 µl RNAse A (100 mg/ml) hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurde der Ansatz erst 3 h bei 56 °C und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNS von Protein- und Lipidkomponenten durch die Phenolextraktion getrennt. Hierfür wurde der Ansatz mit der gleichen Menge an Phenol versetzt und 100 mal geschwenkt. Zur Phasentrennung wurde der Ansatz dann erst für 20 min auf Eis stehen gelassen und danach für 10 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand mit der viralen DNS wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig abgenommen, um die

DNS nicht zu scheren, und der Vorgang wiederholt. Um danach auch den Überstand von Phenolresten zu reinigen, wurde er mit der gleichen Menge an IAC ausgeschüttelt. Durch Zugabe des doppelten Volumens an eiskaltem absoluten Ethanol und 1/10 des Volumens an 4 M LiCl wurde anschließend die virale DNS ausgefällt und 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das entstandene DNS-Pellet wurde zweimal mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und danach getrocknet, bevor es in A. dest. aufgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde.

3.2.3.2 Isolierung von bakterieller artifizierlicher Chromosomen-DNS aus Bakterien

Um aus Bakterien die low copy BAC-Plasmid-DNS zu isolieren wurden die Bakterien mit 400 ml LB-Bouillon und $1\mu\text{l/ml}$ Cloramphenicol ($30\text{ }\mu\text{g/ml}$) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht im Schüttelinkubator vermehrt. Die Kultur wurde in Sorvall-Zentrifugen-Becher gegeben und für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNS aus dem Pellet mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die gewonnene DNS wurde in $60\text{ }\mu\text{l}$ Aqua demin. resuspendiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.3.3 DNS-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung viraler DNS wurden die Restriktionsenzyme *Bam*-HI, *Eco*RI und *Hind*III verwendet. Diese wurden in Konzentrationen von 5 bis 10 Einheiten pro μg DNS mit den entsprechenden Puffern der Hersteller eingesetzt. Die virale DNS wurde für 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ verdaut. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in 0,8 % Agarosegelen bei einer angelegten Spannung von 40 Volt. Durch die nachfolgende Färbung mit Ethidiumbromid konnten die Fragmente unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und die Restriktionsfragmentlängen dokumentiert werden.

3.2.3.4 DNS-Konzentrationsbestimmung und Berechnung der Genomkopien

Die Konzentration der DNS, die in Aqua demin. gelöst war, wurde durch Messung der Absorption im Photometer bei 260 nm bestimmt. Hierfür wurde die DNS mit Aqua dest. in verschiedenen Konzentrationen (1:200, 1:300, 1:400) verdünnt und anschließend im Photometer der OD-Wert („optical density“) bestimmt. Jede Verdünnung wurde dreimal gemessen und daraus ein Mittelwert gebildet. Eine OD_{260} entspricht $50\text{ }\mu\text{g}$ doppelsträngiger

DNS/ml. Anhand der Genomgröße von EHV-1 (150.223 bp) bzw. EHV-4 (145.597 bp) in Basenpaaren wurde das Molekulargewicht des gesamten Virusgenoms bestimmt. Dieses Molekulargewicht wurde durch die Avogadrosche Zahl ($6,022 \times 10^{23}$) geteilt, um das Gewicht einer doppelsträngigen Genomeinheit zu erhalten.

3.2.3.5 Probenmaterial

Als Probenmaterial für die Etablierung und die initiale Validierung der EHV-1/-4-spezifischen *real-time* PCR dienten Blutproben, Nasentupferproben und Organproben. Die Blutproben wurden durch Punktion der Vena jugularis externa von 23 Vollblutstuten eines süddeutschen Gestüts zweimal im Abstand von 14 Tagen entnommen, mit Kalium-EDTA versetzt und sofort gekühlt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Leukozytenzahl der einzelnen Proben im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München mittels Durchflusszytometrie mit dem Cell-Dyn[®] 3500 R der Fa. Abbott.

Die Nasentupfer wurden mit sterilen trockenen Baumwolltupfern möglichst tief aus der Nase entnommen und trocken in ein steriles Falcon Probengefäß verbracht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden diese bei -70 °C gelagert. Die Organproben stammten aus dem Institut für Tierpathologie und waren zur virologischen Untersuchung an das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin weitergeleitet worden.

3.2.3.6 Isolierung der DNS aus Organ-, Blut- und Nasentupferproben

Die DNS wurde bei allen Proben mit Hilfe des Wizard Genomic DNA Purification Kit nach Herstellerangaben isoliert. Entsprechend der Herstellerangaben wurde von der Milz 10 mg und von allen anderen Organproben 25 mg verwendet. Aus einem Teil der Proben wurde zusätzlich mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit nach Herstellerangaben die DNS isoliert. Bei den Blutproben wurde das verwendete Volumen an die vorher im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München mittels Durchflusszytometrie gemessenen Leukozytenzahlen angepasst und lag zwischen 20 und 70 µl. Die Nasentupfer wurden abgeschnitten, in Eppendorf-Röhrchen verbracht und anschließend nach dem jeweiligen Herstellerprotokoll behandelt. Die gewonnene DNS wurde, nachdem sie resuspendiert war, bei -20 °C aufbewahrt. Es wurden jeweils 5 µl der gelösten DNS in die PCR-Reaktion eingesetzt. Um den Erfolg der DNS-Isolierung aus den verschiedenen Probenmaterialien zu kontrollieren, falsch-negative Ergebnisse auszuschliessen und die Quantifizierung der viralen

DNS in Relation zur Zellzahl beurteilen zu können, wurde das β 2-Mikroglobulin-Gen als „housekeeping gene“ und Standard mitgeführt und ebenfalls amplifiziert und quantifiziert.

3.2.4 PCR

Alle Proben, die in der *real-time* PCR getestet wurden, wurden vorher mit einer konventionellen EHV-1/-4 PCR untersucht, die in der Diagnostik des Instituts etabliert ist und in der Routine eingesetzt wird.

Als Positivkontrollen dienten die in Zellkultur vermehrten EHV-1 (RacL11) und EHV-4-Stämme. Der gebrauchsfertige Master Mix lag in Portionen von jeweils 45 μ l vor, hierzu wurden die Primer jeweils zu einer Endkonzentration von 0,4 μ M zugegeben. Das eingesetzte Proben-DNS-Volumen betrug 3 μ l, so dass das finale Reaktionsvolumen bei 50 μ l lag. Die einzelnen Ansätze wurden anschließend in einen Thermocycler eingesetzt. Nach einer ersten Denaturierung bei 94 °C für 5 min. folgten 35 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung bei 94 °C für 45 s., dem Annealing bei 53 °C für 45 s. und der Extensionsphase bei 72 °C für 45 s. (OSTERRIEDER et al., 1995).

Die Proben wurden nach Amplifikation über ein 2 %iges Agarosegel aufgetrennt. Zur Kontrolle der Bandengröße wurde ein kb-Standard mitgeführt. Anschließend wurden die Gele für 15 Minuten in ein Ethidiumbromidbad gegeben und unter UV-Licht (302 nm) die aufgetrennte DNS sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.2.5 Etablierung der *real-time* PCR

3.2.5.1 Primerdesign und Sondendesign

Für die Amplifizierung von Sequenzen aus dem gD-Gen von EHV-1 und dem equinen β 2m-Gen, das als Referenz für Probenqualität, Aufbearbeitung und Zellzahl verwendet wurde, wurden publizierte Primer- und SONDENSEQUENZEN übernommen bzw. die Informationen von Goodman und Osterrieder freundlicherweise zur Verfügung gestellt (GOODMAN et al., 2006; GOODMAN et al., 2007). Für die Amplifizierung von Sequenzen aus dem gD-Gen von EHV-4 wurden die Primer in Abstimmung mit der Sonde mit Hilfe des Softwareprogramms Primer Express 2.0 der Firma Applied Biosystems ausgewählt. Die gewählten Sequenzen wurden dann mit Hilfe des GCG Softwarepackage HUSAR, Heidelberg in den gängigen Datenbanken auf Homologien mit anderen Sequenzen überprüft, um unspezifische

Amplifikationen aus dem Probenmaterial zu vermeiden. Die Sequenzen der Primer sind der untenstehenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 3: Sequenzen der Primer für die *real-time* PCR

Primer:	Sequenz:
EHV-1-gD F-Primer:	TCG CGA TCT TGA GCG TTG T (GOODMAN et al., 2006)
EHV-1-gD R-Primer:	CCG CAC GCT TGG CTT T (GOODMAN et al., 2006)
EHV-4-gD F-Primer:	CGG AGA CAG ACG ACG AAC TTG
EHV-4-gD R-Primer:	CGC GCC TAT ACA GTC CAG AGT A
β 2m-F-Primer:	TCT TTC AGC AAG GAC TGG TCT TT (GOODMAN et al., 2007)
β 2m-R-Primer:	CAT CCA CAC CAT TGG GAG TAA A (GOODMAN et al., 2007)

Bei der Sonde für das gD-Gen von EHV-1 handelt es sich um eine „minor-groove-binder-Sonde“ (MGB-Sonde) mit dem Reporterfarbstoff 6-carboxy-fluorescein (FAM) am 5`-Ende und einem Quencherfarbstoff mit MGB-Molekül am 3`-Ende. Als Sonde für das gD-Gen von EHV-4 wurde eine TaqMan-Sonde mit dem Reporterfarbstoff Carbocyanin 5 (Cy5) am 5`-Ende und einem black-hole-Quencher 2 (BHQ2) am 3`-Ende gewählt. Die Sonde für das β 2m-Gen besaß den Reporterfarbstoff VIC bzw. Hexachloro-6-carboxy-fluorescein (HEX) am 5`-Ende und ebenfalls einen Quencherfarbstoff mit MGB-Molekül am 3`-Ende. Die Sequenzen der Fluoreszenzsonden sind der untenstehenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 4: Sequenzen der Fluoreszenzsonden für die *real-time* PCR

Fluoreszenzsonde:	Farbstoff und Sequenz:
EHV-1-gD-probe:	6-FAM-TCT CTT GTG GAA CAT GC-MGB (GOODMAN et al., 2006)
EHV-4-gD-probe:	Cy5-TTG TAT TGG CCT CCC CTG CCC ATA G-BHQ2
β 2m-probe:	VIC-ATC TTC TGG TCC ATA CTG A-MGB (GOODMAN et al., 2007)

3.2.5.2 Master Mixes

Für die *real-time* PCR wurden drei verschiedene Master Mixes verwendet. Zum einen der TaqMan® Universal PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems, der als Referenzfarbstoff ROX enthält und zum anderen der PeqGold Hot Start-Mix Real-Time der Firma Peqlab ohne Referenzfarbstoff und der QuantiTect Multiplex PCR Master Mix der Firma Qiagen, der ebenfalls ROX enthält und vom Hersteller speziell für die Verwendung in Multiplex-PCR- Reaktionen empfohlen wird. Die Qualität der verschiedenen Master Mixes erwies sich im Laufe der Experimente als vergleichbar, so dass alle Master Mixes zum Einsatz kamen. Dem PeqGold Hot Start Mix Real Time kann bei Bedarf Rox zugesetzt werden.

3.2.5.3 Durchführung der *real-time* TaqMan PCR

Für die *real-time* PCR wurden die Primer jeweils auf eine Konzentration von 100 μM eingestellt. Hiervon wurden aus jeweils 10 μl des Forward und des Reverse-Primers eine Primer-Mischung (Primermix) mit einer Konzentration von 50 μM hergestellt, welcher dann für die PCR, wie in Tabelle 5 angegeben verwendet wurde. Die Fluoreszenzsonden wurden auf eine Konzentration von 10 μM eingestellt und ebenfalls portioniert. Als Reaktionsvolumen wurden zunächst 20 μl verwendet.

Tab. 5: Reaktionsvolumina und –konzentrationen der einzelnen Reagenzien für die einzelnen *real-time* PCRs

Reagenz:	Volumen (μl):	Konzentration:
Master Mix	10	2fach konzentriert
Primermix (F+R-Primer für EHV-1)	1,5	3,75 μM
Primermix (F+R-Primer für EHV-4)	1	2,5 μM
Primermix (F+R-Primer für β2m)	1	2,5 μM
Fluoreszenzsonde (EHV-1)	1	0,5 μM
Fluoreszenzsonde (EHV-4)	1	0,5 μM
Fluoreszenzsonde (β2m)	1,8	0,9 μM
Aqua depc.	ad 20 μl	
DNS	5	

Als Reaktionsgefäße dienten entweder 8er *stripes* oder 96-Loch-Platten der Firmen Applied Biosystems oder PeqLab, die speziell für den Gebrauch in der *real-time* PCR hergestellt werden. Diese besitzen keine störende Autofluoreszenz, weil die Außenseite dieser Tubes aufgeraut ist. Der Verschluss erfolgte bei den Tubes mit speziell geschliffenen optischen Deckeln und bei den Mikrotiterplatten mit einer hitzebeständigen Klebefolie. Zusätzlich musste hier noch ein Kompressionskissen aufgelegt werden, um ein Ablösen der Folie während der Reaktion zu vermeiden und einen gleichmäßigen Kontakt zwischen Heizdeckel und Mikrotiterplatte sicher zu stellen. Die Reaktionsgefäße wurden dann in die *real-time* PCR Maschine MX 3005 P der Firma Stratagene eingesetzt. Das Thermoprofil der Reaktion bestand aus zwei Segmenten, wobei das erste Segment nur einen Zyklus von 10 Minuten bei 95 °C beinhaltete und der primären Denaturierung der Proben-DNS diente. Im zweiten Segment mit 60 Zyklen erfolgten pro Zyklus ein Denaturierungs-Schritt mit 30 Sekunden bei 95 °C und ein Primer-*Annealing*-Schritt von 60 Sekunden bei 60 °C. Dieses Segment war für die Etablierung der PCR zunächst auf die überhöhte Anzahl von 60 Zyklen festgesetzt worden, um mögliche unspezifische Reaktionen zu späten Zykluszahlen beurteilen zu können. Die einzelnen Reaktionen wurden mit einer Halogenlampe angeregt und die Fluoreszenzemission bei jedem Zyklus gemessen. Bei jedem Reaktionslauf wurden *no template controls* (NTC), also Reaktionsansätze ohne Proben-DNS mitamplifiziert. Um Kontaminationen während der Probenaufbereitung zu erkennen, wurden entsprechende Extraktionskontrollen mitgeführt. Zusätzlich wurde in einigen Experimenten Proben-DNS von in der konventionellen EHV-1/4-PCR als negativ eingestuften Proben als Negativprobe verwendet. Als Positivkontrollen bzw. Standards zur absoluten Quantifizierung der Virusgenome dienten Standardverdünnungsreihen von pRacL11-DNS, DNS des EHV-4-Isolates bzw. der β 2m-BAC-DNS.

3.2.5.4 Quantifizierung mittels TaqMan-Technologie

Die spezifischen Amplifikate wurden absolut quantifiziert. Dafür wurden als Standard zum einen Sequenzen des equinen β 2-Mikroglobulin-Gens und zum anderen der EHV-1 bzw. EHV-4 DNS parallel amplifiziert. Diese Standards wurden in Form von Verdünnungsreihen in 10 er Potenzen von definiert 10^2 bis 10^8 Genomkopien verwendet. Dafür wurde die isolierte DNS gründlich gemischt und log 10 Verdünnungen in TE-Puffer angefertigt. Anschließend wurden die einzelnen Verdünnungen nochmals gemischt und dann im Verhältnis 1+4 mit Aqua depc. verdünnt und als Gebrauchsverdünnung verwendet. Bei jedem

Probenlauf wurde eine solche Standardverdünnungsreihe im Doppelansatz amplifiziert. Mittels der Software der Firma Stratagene wurde aus den ermittelten C_T -Werten und der Anzahl der Genomkopien in der Verdünnungsreihe eine Standardkurve errechnet. Anhand dieser Standardkurve konnte dann eine Quantifizierung der Virusgenome in einer Probe erfolgen und durch die Amplifikation der $\beta 2m$ -Sequenzen auch in Relation zur Zellzahl gesetzt werden.

3.2.6 Vergleich der Untersuchung von Probenmaterialien mit den verschiedenen EHV- 1/-4 spezifischen PCR Verfahren

Alle Organ-, Blut- und Nasentupferproben wurden sowohl mit der konventionellen EHV-1/-4-PCR als auch mit der *real-time* PCR in Singleplex-Reaktionen auf EHV-1 und EHV-4 getestet. Bestanden zweifelhafte Ergebnisse oder deckten sich die Ergebnisse der konventionellen und der *real-time* PCR nicht, wurde die *real-time* PCR wiederholt. Lag eine mangelhafte DNS-Isolierung vor, wurde diese wiederholt. Zur Quantifizierung wurden bei jedem Lauf die entsprechenden Standards im Doppelansatz amplifiziert. Um Kontaminationen zu detektieren, wurden bei jedem Ansatz *no template controls* (NTCs), Extraktionskontrollen und bei einigen Experimenten Proben-DNS von in der konventionellen EHV-1/4-PCR als negativ eingestuften Proben als Negativkontrollen mitamplifiziert.

Zusätzlich wurden alle Proben in der EHV-1 und -4 Multiplex-Reaktion getestet und die Ergebnisse mit denen der Singleplex-Reaktionen verglichen.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung einer EHV-4-spezifischen quantitativen *real-time*-PCR

4.1.1 Primer- und Sondenwahl

Viele Glykoproteine von EHV-1 und EHV-4 sind relativ hochkonserviert und es sind wenig Veränderungen in der Nukleotidabfolge dieser Gene zwischen verschiedenen Stämmen zu erwarten. Auch deswegen eignen sich Sequenzen aus dem Glykoprotein D-Gen gut zum Nachweis von EHV-1 und EHV-4. Die gD-Gene von EHV-1 und EHV-4 enthalten zudem bei einer Aminosäureidentität von 76,6 % (TELFORD et al., 1998) ausreichend Unterschiede für eine sichere Differenzierung.

Die Primer- und Sondensequenzen für die Amplifizierung eines 72 bp langen Bereiches des gD-Gens von EHV-4 wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Primer Express 2.0 bestimmt (sh. 3.2.5.1). Die Primer wurden zuerst in einer konventionellen PCR mit isolierter DNS von in equiner Zellkultur (NBL-6-Zellen) vermehrtem EHV-1- und EHV-4 getestet. Dabei konnte nur aus der isolierten EHV-4-DNS ein PCR-Produkt in der erwarteten Größe amplifiziert werden. Aus der isolierten zellulären DNS (NBL6), aus EHV-1-DNS, aus Proben-DNS, die in der konventionellen EHV-1/4-PCR als negativ eingestuft worden waren (Organpool) und aus No template Kontrollen (NTC) waren teilweise zwar verschiedene unspezifische Amplifikate nachweisbar, die jedoch anhand der Größe deutlich von der spezifischen Reaktion zu unterscheiden waren und in der Anwesenheit von EHV-4-DNS durch die spezifische Reaktion verdrängt wurden (Abb. 1). Die negativen Organproben und DNS aus nicht infizierten, equinen Zellkulturzellen wurden eingesetzt, um festzustellen, ob aus dem Pferdegenom unspezifische Amplifikate entstehen.

In einem weiteren Vorexperiment wurde die PCR-Reaktion im *real-time* Verfahren mit einer TaqMan-Sonde mit dem Reporterfarbstoff Carbocyanin 5 (Cy5) am 5`-Ende und einem black-hole-quencher 2 am 3`-Ende überprüft. Als Proben wurden vier verschiedene in NBL6-Zellen vermehrte EHV-1-Isolate und ein EHV-4-Isolat eingesetzt. In der *real-time* PCR war eine deutliche, sondenspezifische Vermehrung der EHV-4-DNS darzustellen (Abb. 2), während die Fluoreszenzen weder in der NTC, der Extraktionskontrolle, den Testansätzen mit der DNS der EHV-1-Isolate, der DNS aus nicht infizierten NBL6 Zellen, noch mit der Proben-DNS, die in der konventionellen EHV-1/4-PCR als negativ eingestuft worden waren, über den Basiswert stiegen.

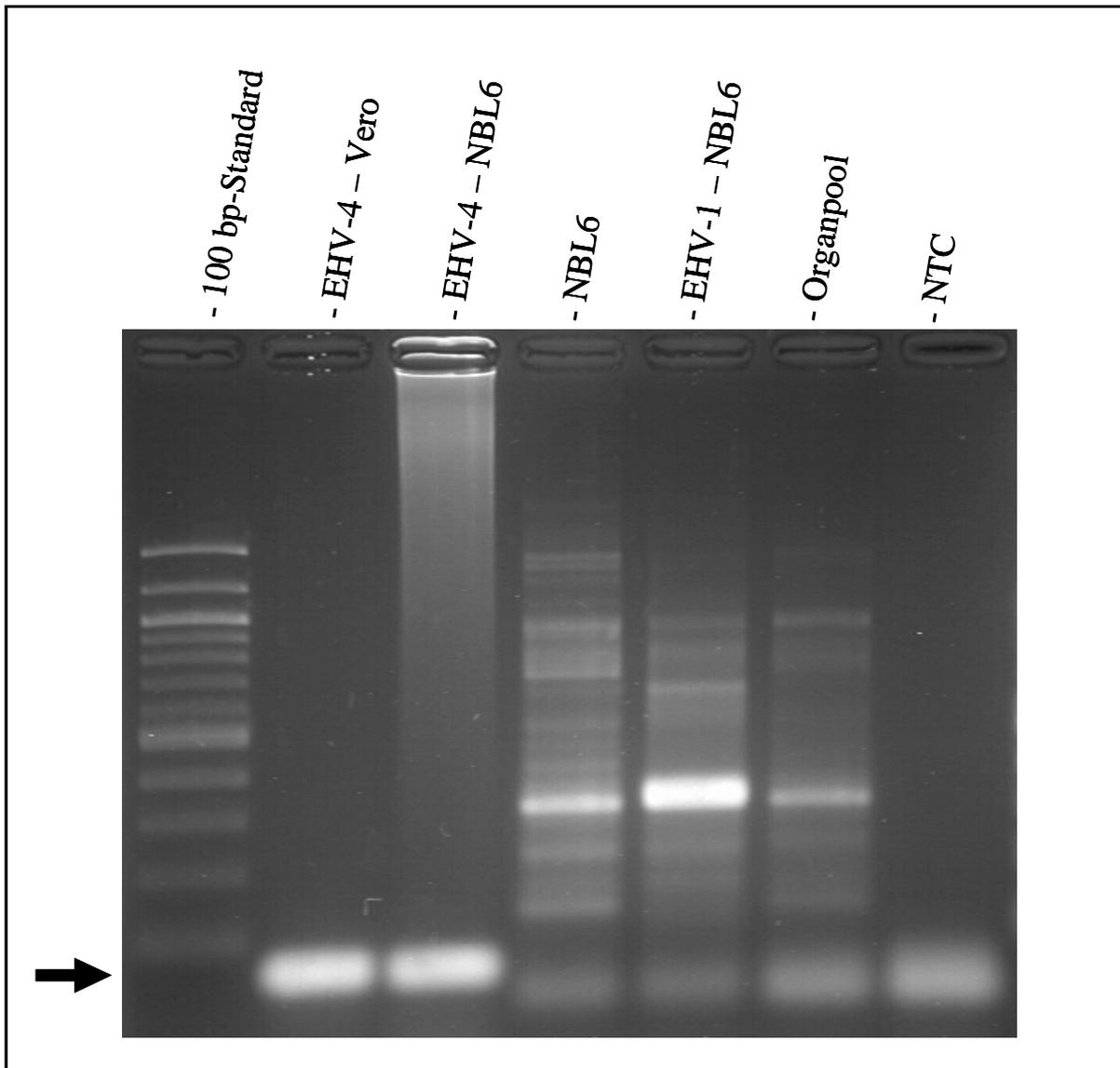


Abb. 1: Agarosegelanalyse (2 %) der nach EHV-4-PCR erhaltenen DNA-Amplifikate: Mittels EHV-4-spezifischer Primer wurden Amplifikate der erwarteten Größe (72 bp, Pfeil) ausschließlich in Probenmaterial, das EHV-4 DNS enthielt detektiert. Zur Größenbestimmung wurde ein 100 bp DNA Standard eingesetzt.

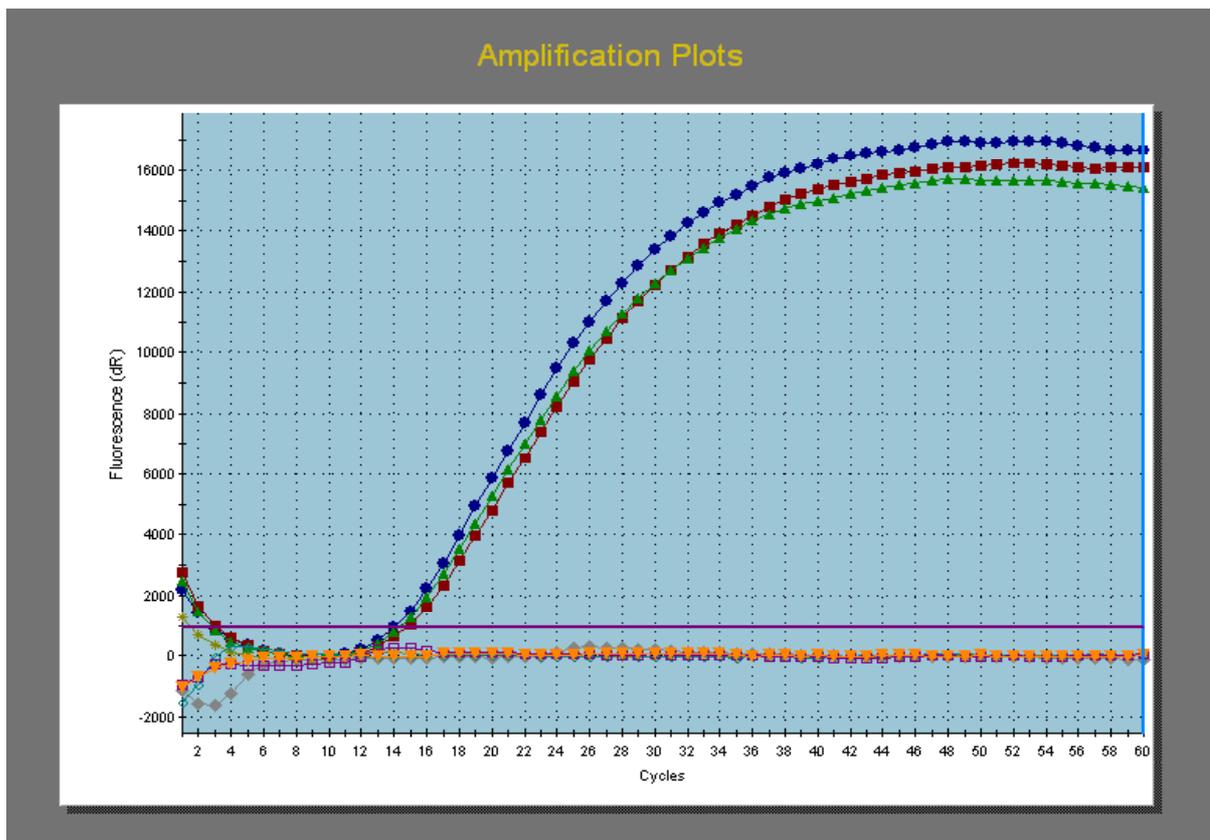


Abb. 2: Darstellung der Reaktionskurven der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR: Während jeden Zyklus wird die Sondenbindung nach dem Taqmanprinzip fluorimetrisch erfasst und dargestellt. Die blaue, rote und grüne Kurve zeigt den Reaktionsverlauf mit der aus infizierten NBL6-Zellen isolierten EHV-4-DNS. Die Analyse keiner weiteren Probe, weder einer der verschiedenen angezüchteten EHV-1-Stämme, noch der equinen zellulären DNS, resultierte in einem messbaren Anstieg der sondenspezifischen Fluoreszenz.

4.1.2 Primer- und Sondenoptimierung

Um die optimale Konzentration und das optimale Verhältnis der Primer zueinander für die EHV-4-spezifische *real-time* PCR zu ermitteln, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zunächst wurden Konzentrationen der Primer von 1,25 μM , 2,5 μM , 3,75 μM , 5 μM , 6,25 μM , 7,5 μM und 10 μM bei einem Primerverhältnis von 1+1 und konstanter Sondenkonzentration (0,5 μM) in der *real-time* PCR getestet. Für diese Experimente wurden konstante und definierte Mengen an EHV-4-Genomkopien verwendet. Die individuellen Reaktionen wurden anhand der ermittelten C_T -Werte und der Verläufe der Reaktionskurven beurteilt. Ziel war es eine optimale PCR-Sensivität zu erreichen und zugleich eine möglichst geringe Primer- und Sondenkonzentration für den späteren kostengünstigen Einsatz in der Routinediagnostik zu ermöglichen. Die optimalen Reaktionen wurden bei

Primerkonzentrationen von 2,5 μM beobachtet. Geringere Primerkonzentrationen führten zum Verlust der Sensitivität. Höhere Primerkonzentrationen brachten keinen erkennbaren Vorteil im Verlauf der Reaktionskurve und keine niedrigeren C_T -Werte und somit keine höhere Sensitivität.

Um das optimale Verhältnis der Konzentrationen der Primer zueinander festzustellen, wurden unterschiedliche relative Konzentrationen des Forward und des Reverse Primers ausgetestet. Lediglich durch extreme Verhältnisse der Primerkonzentrationen von 1:8 wurden die Ergebnisse beeinflusst und die Sensitivität reduziert. Bei allen anderen Konzentrationsverhältnissen ergaben sich vergleichbare C_T -Werte (Abb. 3). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine identische Konzentration des Forward und des Reverse Primers von 1,25 μM für die weiteren Versuche gewählt.

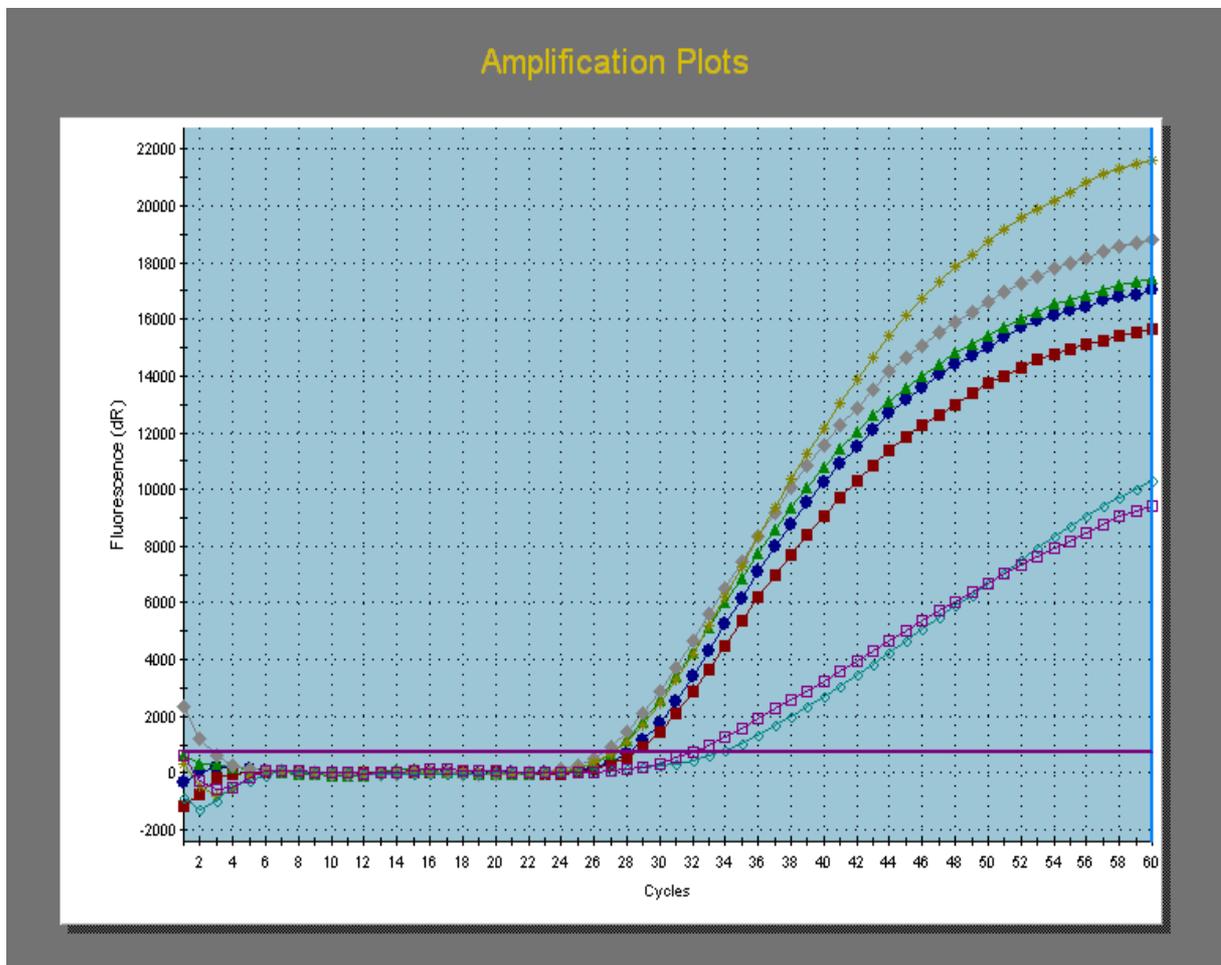


Abb. 3: Darstellung der Reaktionskurven der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR: Während jeden Zyklus wird die Sondenbindung nach dem Taqmanprinzip fluorimetrisch erfasst und dargestellt. Dargestellt ist der Reaktionsverlauf mit unterschiedlichen Konzentrationen des Forward und des Reverse Primers. Nur durch extreme Verhältnisse der Primerkonzentrationen von 1:8 wurde die Sensitivität deutlich reduziert (türkise und lila Kurven). Alle Proben wurden im Doppelansatz untersucht und der Mittelwert aus beiden Kurven ist gezeigt.

Zur Ermittlung der optimalen Sondenkonzentration für die EHV-4-spezifische *real-time* PCR wurde analog vorgegangen und verschiedene Konzentrationen (0,25 μM , 0,5 μM , 0,9 μM , 1,8 μM) bei konstanter Primerkonzentration (2,5 μM) getestet und die Kombination gewählt, die die höchste Sensitivität zeigte. Diese ausgewählte Sondenkonzentration lag bei 0,5 μM . Geringere Konzentrationen führten zu höheren C_T -Werten und einem extrem geringen Anstieg der Fluoreszenz. Höhere Sondenkonzentrationen brachten keine weitere Verbesserung (Abb. 4).

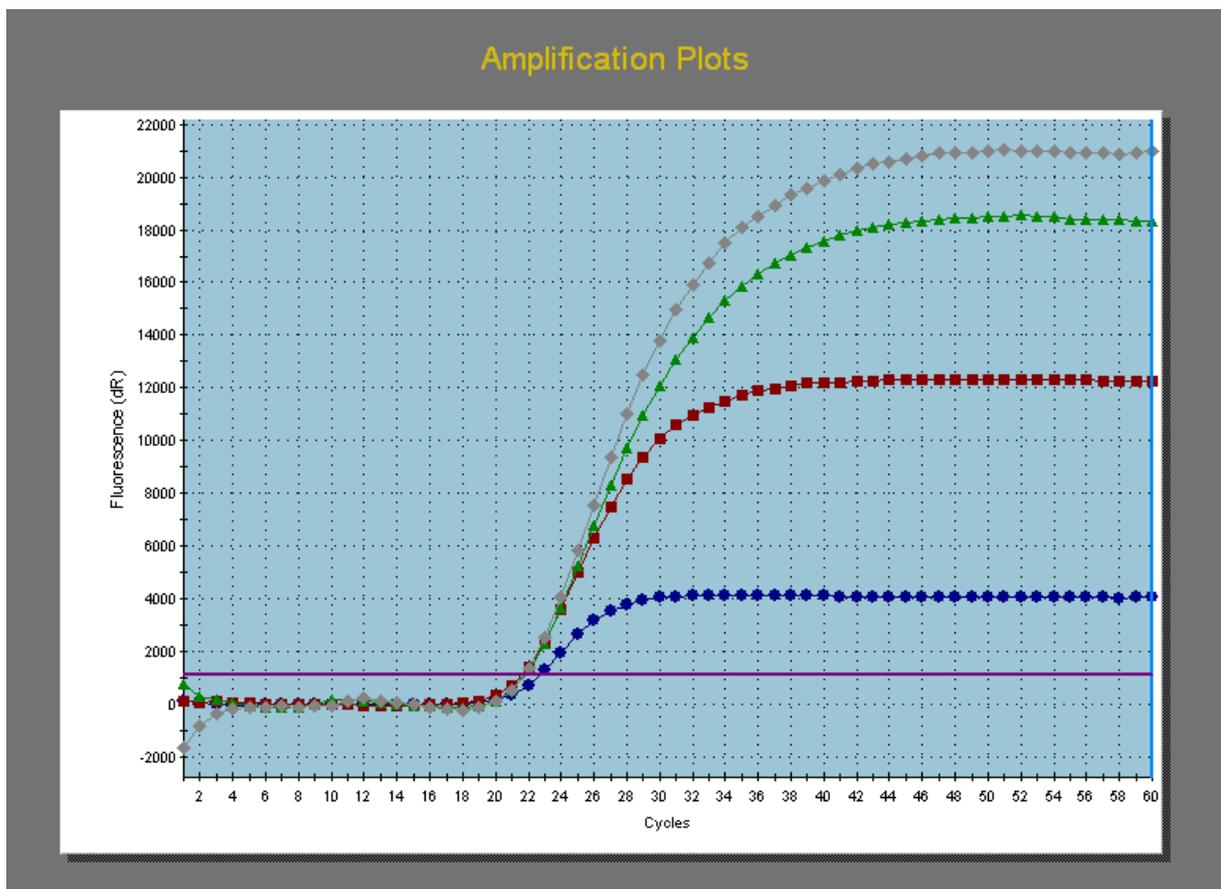


Abb. 4: Darstellung der Reaktionskurven der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR: Während jeden Zyklus wird die Sondenbindung nach dem Taqmanprinzip fluorimetrisch erfasst und dargestellt. Dargestellt ist der Reaktionsverlauf (Mittelwert aus Doppelansatz) mit einer Sondenkonzentration von 0,5 μM (rote Kurve), 0,9 μM (grüne Kurve), 1,8 μM (graue Kurve) und 0,25 μM (blaue Kurve). Die Sondenkonzentration von 0,25 μM ergab einen höheren C_T -Wert und einen sehr flachen Verlauf der Reaktionskurve.

4.1.3 Spezifitätsnachweis der EHV-*real-time* PCR

Um unspezifische Reaktionen der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR mit Probenmaterial auszuschliessen, wurden Präparationen von Pferdeorganen und Nasentupfern, die in der konventionellen EHV-1/-4-PCR negativ befundet worden waren, verschiedene EHV-1 Isolate aus dem süddeutschen Raum und verschiedene Bakteriengenera, mit deren Präsenz in Probenmaterialien gerechnet werden muss, in der *real-time* PCR getestet. Aus keinem der EHV-1 Isolate konnte DNS amplifiziert werden, ebenso wenig wie aus den zuvor als negativ eingestuften Probenmaterialien. Somit konnte auch klar gezeigt werden, dass die in der Agarosegelelektrophorese detektierten unspezifischen Reaktionen, die nach Amplifikation mit den EHV-4 spezifischen Primern aus equinem Organ- oder Zellmaterial beobachtet worden waren, mit Hilfe der EHV-4 spezifischen Sonde klar von EHV-4 spezifischen Produkten abgegrenzt werden können.

Auch nach Verwendung von isolierter DNS der getesteten Stämme von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi* spp. *equi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Rhodococcus equi* und *Salmonella abortusequi* als Template waren keine Amplifikate zu detektieren.

Eine vergleichbare Serie von Experimenten zur Bestätigung der Spezifität der in dieser Arbeit angewandten EHV-1-spezifischen *real-time* PCR wurde ebenfalls durchgeführt und unspezifische Reaktionen konnten auch hier mit den verwendeten Probenmaterialien ausgeschlossen werden.

4.2 Optimierung der EHV-1- und β 2m-spezifischen *real-time* PCR

Die EHV-1-spezifische *real-time* PCR wurde aus der Literatur übernommen und die Informationen für die β 2m-spezifische PCR von Nikolaus Osterrieder und Laura Goodman zur Verfügung gestellt (GOODMAN et al., 2006; GOODMAN et al, 2007), da diese Protokolle sich als spezifisch und sensitiv erwiesen hatten. Das Glykoprotein D-Gen von EHV-1 enthält ausreichend unterschiedliche Sequenzen für die Differenzierung von EHV-1 und -4. Mit Hilfe der β 2m-spezifischen *real-time* PCR ist zusätzlich nicht nur eine Quantifizierung der Virusgenome in einer Probe in Relation zur Pferde-Chromosomen Anzahl möglich, sondern auch eine Beurteilung der Probenqualität und der Effizienz der Nukleinsäureextraktion.

4.2.1 Primer- und Sondenoptimierung

Um die optimale Primerkonzentration für die Anwendung der EHV-1- und β 2m-spezifischen *real-time* PCR in dieser Studie zu ermitteln, wurden analog zu den unter 4.1.2 beschriebenen Experimenten verschiedene Primerkonzentrationen (1,25 μ M, 2,5 μ M, 3,75 μ M, 5 μ M, 6,25 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M) bei konstanter Sondenkonzentration (0,9 μ M) getestet. Diese Sondenkonzentration wurde zunächst von Godman und Osterrieder übernommen (GOODMAN et al., 2006; GOODMAN et al, 2007). Die individuellen Reaktionen der EHV-1- und der β 2m-spezifischen *real-time* PCR wurden wieder anhand vom Verlauf der Reaktionskurven und der ermittelten C_T -Werten beurteilt. Die niedrigsten C_T -Werte und damit die höchste Sensitivität für die EHV-1-spezifische PCR wurden bei einer Primerkonzentration ab 3,75 μ M bei einem Primerverhältnis von 1+1 gemessen. Für die β 2m-spezifische PCR lag die optimale Primerkonzentration bei 2,5 μ M und einem Primerverhältnis von 1+1. Geringere Primerkonzentrationen führten zum Verlust der Sensitivität. Höhere Primerkonzentrationen brachten keinen deutlichen Vorteil im Verlauf der Reaktionskurven und keine höhere Sensitivität.

Zur Ermittlung der optimalen Sondenkonzentration für die EHV-1- und die β 2m-spezifische PCR wurden verschiedene Sondenkonzentrationen (0,25 μ M, 0,5 μ M, 0,9 μ M, 1,8 μ M) mit einer konstanten Primerkonzentration von 3,75 μ M (EHV-1) bzw. 2,5 μ M (β 2m) in der *real-time* PCR getestet. Die optimale Sondenkonzentration für die EHV-1-spezifische PCR lag bei 0,5 μ M und für die β 2m-spezifische PCR bei 0,9 μ M. Geringere Konzentrationen führten zu höheren C_T -Werten und damit zum Verlust der Sensitivität. Höhere Sondenkonzentrationen brachten keinen Vorteil im Verlauf der Reaktionskurven und keine höhere Sensitivität.

4.2.2 Untersuchung des Einflusses des Gesamtvolumens der PCR-Reaktionen

Um Master-Mix in der *real-time* PCR einzusparen und damit die PCR-Reaktion günstiger zu machen, wurde versucht das Gesamtvolumen der PCR-Reaktion von 20 μ l auf 10 μ l zu halbieren. Der Einfluss des Endreaktionsvolumens auf die Ergebnisse wurde mit jeweils zwei Verdünnungsreihen der jeweiligen DNS mit 10^8 , 10^6 , 10^4 und 10^2 Genomkopien im Doppelansatz verglichen. Die Halbierung des verwendeten Endvolumens von 20 auf 10 μ l resultierte für die β 2m-spezifische PCR in einem deutlichen Sensitivitätsverlust (Bis zu vier C_T -Werte). Außerdem verliefen die Reaktionskurven deutlich flacher. Bei der EHV-1- und der EHV-4-spezifischen PCR dagegen resultierte die Halbierung des Endvolumens in einem

geringeren Sensitivitätsverlust (ca. ein C_T) . Der Reaktionskurvenverlauf war aber auch hier deutlich flacher. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Versuche ein Gesamtvolumen von 20 μ l für die *real-time* PCR verwendet.

4.3 Etablierung eines *real-time* PCR Multiplexverfahrens zur gleichzeitigen Detektion und Quantifizierung von EHV-1 und EHV-4 DNS

Da die klinischen Bilder der Infektionen mit EHV-1 nicht klar von denen der Infektionen mit EHV-4 zu unterscheiden sind, häufig also sowohl EHV-1 als auch EHV-4 als auslösendes Agens in Frage kommt und auch Mischinfektionen nicht ausgeschlossen werden können, ist es sinnvoll in einer Reaktion sowohl EHV-1 als auch EHV-4-DNS nachweisen zu können und gleichzeitig eine absolute Quantifizierung der Virusgenome in einer Probe durchführen zu können.

4.3.1 Etablierung und Optimierung der möglichen Duplex-PCR-Kombinationen

Durch Kombination der EHV-1-spezifischen PCR mit der EHV-4- bzw. β 2m-spezifischen PCR in einem Reaktionsgefäß sollte untersucht werden, inwiefern sich die Einzelreaktionen bzw. ihre jeweiligen Primer und Fluoreszenzsonden gegenseitig beeinflussen.

Mit Hilfe der Kombination der EHV-1- bzw. EHV-4- mit der β 2m-spezifischen PCR sollte es möglich sein, eine absolute Quantifizierung der Virusgenome von EHV-1 bzw. -4 in einer Probe relativ zur eingesetzten Zellzahl durchzuführen. Die Kombination der EHV-1- und der EHV-4-spezifischen PCR sollte den gleichzeitigen Nachweis aus einer Probe in einer Reaktion ermöglichen.

Der Einfluss der Kombination der einzelnen PCRs auf die Sensitivität der Einzelergebnisse wurde durch den Vergleich der C_T -Werte der Einzelreaktionen (Singleplex) mit den C_T -Werten in den PCR-Kombinationen (Duplex-PCR) verglichen. Es wurden sowohl Duplex-Reaktionen mit isolierter Standard-DNS von EHV-1, -4 und β 2m durchgeführt, als auch Duplex-Reaktionen mit isolierter Proben-DNS aus Organmaterial, Blutleukozyten und Nasentupferproben. Die Primer- und Sondenkonzentrationen der Singleplex-*real-time* PCRs wurden beibehalten, ebenso das Temperaturprofil und das Reaktionsvolumen.

Die C_T -Werte der Singleplex- und der Duplex-Reaktionen stimmten bei allen Kombinationen gut überein. Es konnten nur geringe Erhöhungen bis maximal 1,35 C_T -Werte in den Duplex-Reaktionen festgestellt werden, wenn identische Konzentrationen der isolierten DNS von

EHV-1 und EHV-4 bzw. β 2m als Template eingesetzt wurden (Tab. 6). Allerdings sind Schwankungen um einen C_T -Wert auch zwischen verschiedenen Experimenten mit gleicher Probe möglich. Alle Daten wurden im Doppelansatz erhoben und die Mittelwerte sind in Tabelle 6 gezeigt. Die Einzelwerte der Doppelansätze stimmten stets sehr gut überein. Bei der Wiederholung des gesamten Experimentes konnten vergleichbare C_T -Werte festgestellt werden.

Tab. 6: Vergleich der Duplex- und der Singleplex-Reaktionen mit isolierter DNS von pRacL11, EHV-4 und dem β 2m-Bacmid. Als Template wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen der Standard-DNS eingesetzt.

DNS:	Reaktionsansatz Duplex C_T -Werte:	Reaktionsansatz Singleplex C_T -Werte:
RacL11 10^8	15,12	14,88
EHV-4 10^8	19,73	19,78
RacL11 10^6	18,93	18,67
EHV-4 10^6	27,88	26,53
RacL11 10^4	25,02	24,42
EHV-4 10^4	30,05	29,80
RacL11 10^2	33,34	32,69
EHV-4 10^2	38,13	37,90
RacL11 10^2	33,73	32,91
β 2m 10^2	35,84	34,95
RacL11 10^4	25,24	25,16
β 2m 10^4	28,35	27,60
RacL11 10^6	18,83	18,75
β 2m 10^6	21,73	20,47
RacL11 10^8	15,29	15,02
β 2m 10^8	17,82	17,63

Wenn die DNS von zwei Reaktionspartnern in unterschiedlichen Konzentrationen als Template in den Duplex-Reaktionen eingesetzt wurde, kam es in den Duplex-Ansätzen bei der niedriger konzentrierten DNS zu Verschiebungen von bis zu 1,96 C_T -Werten nach oben gegenüber der Singleplex-Reaktion (Tab. 7).

Insgesamt zeigte sich, dass in allen Duplex-Reaktionen die C_T -Werte um bis zu einen Wert höher, als in den jeweiligen Singleplex-Reaktionen lagen. Bei der Wiederholung des gesamten Experimentes ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Es konnte nie eine so starke Hemmung eines Reaktionspartners in den Duplex-Reaktionen festgestellt werden, dass eine deutliche Erhöhung der C_T -Werte oder gar ein Nachweisverlust resultierte.

Tab. 7: Vergleich der möglichen Kombinationen an Duplex- mit den jeweiligen Singleplex-Reaktionen. Als Template wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen der Standard-DNS von pRacL11, dem EHV-4-Isolat und dem β 2m-Bacmid in gegenläufigen Konzentrationen eingesetzt.

DNS:	Reaktionsansatz Duplex C_T-Werte:	Reaktionsansatz Singleplex C_T-Werte:
RacL11 10^2	31,75	31,21
EHV-4 10^8	19,80	19,78
RacL11 10^4	27,86	26,08
EHV-4 10^6	30,61	28,65
RacL11 10^6	19,66	18,97
EHV-4 10^4	34,75	33,96
RacL11 10^8	15,74	14,88
EHV-4 10^2	37,89	36,74
RacL11 10^2	33,68	33,21
β 2m 10^8	19,27	18,87
RacL11 10^4	26,43	25,08
β 2m 10^6	26,36	24,98
RacL11 10^6	23,16	22,67
β 2m 10^4	32,32	30,36
RacL11 10^8	15,33	14,88
β 2m 10^2	35,76	34,54
EHV-4 10^2	37,83	36,74
β 2m 10^8	19,36	18,87
EHV-4 10^4	30,31	29,95
β 2m 10^6	26,34	24,98

EHV-4 10 ⁶	29,82	28,65
β2m 10 ⁴	31,25	30,36
EHV-4 10 ⁸	19,60	19,78
β2m 10 ²	35,96	34,54

4.3.2 Etablierung der Triplex-PCR-Kombinationen

Die Kombination der EHV-1-spezifischen PCR sowohl mit der EHV-4-, als auch mit der β2m-spezifischen PCR sollte eine gleichzeitige, kontrollierte Detektion, Differenzierung und im Einzelfall auch eine absolute Quantifizierung von EHV-1 und EHV-4 in einer Probe ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurden die Singleplex-Reaktionsansätze für die EHV-1-, EHV-4- und die β2m-spezifische PCR zusammen in einem Probengefäß als Triplex-Reaktion kombiniert. Es wurden sowohl Triplex-Reaktionen mit isolierter Standard-DNS von EHV-1, -4 und β2m durchgeführt, als auch Triplex-Reaktionen mit isolierter Proben-DNS. Dafür wurde die isolierte DNS aus Blutproben, Organproben und Nasentupfern eingesetzt, welche in der konventionellen EHV-1/4 PCR bzw. in der EHV-1-spezifischen Singleplex-PCR als positiv für EHV-1 befundet worden waren. Zusätzlich wurde die isolierte DNS aus Nasentupfern als Template eingesetzt, die in der EHV-4-spezifischen Singleplex-PCR als positiv befundet worden waren. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Experimente unter Verwendung von Standard DNS gezeigt. Die Standard-DNS zweier Reaktionspartner wurde zunächst in identischen Konzentrationen und die des dritten Reaktionspartners in variablen Konzentrationen verwendet, um auch den Einfluss extremer DNS-Verhältnisse in Probenmaterialien beurteilen zu können.

Die C_T-Werte der Singleplex- und der Triplex-Reaktionen stimmten in allen Reaktionen gut überein. Die C_T-Werte der Triplex-Reaktionen lagen um maximal 1,86 C_T-Werte höher, als die der korrespondierenden Singleplex-Reaktionen (Tab. 8). Bei der Wiederholung des Experimentes ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Wie in den Duplex-Experimenten traten auch in der im Triplex-Ansatz durchgeführten PCR nur so geringe Abweichungen der verglichenen C_T-Werte auf, dass geschlossen werden konnte, dass auch unter extremen DNS-Verhältnissen keine der Reaktionen einen deutlich negativen Einfluss auf die Sensitivität der parallel ablaufenden PCR-Reaktionen der anderen Komponenten hat. Die Mastermixkomponenten waren ausreichend, um auch bei stark positiven Einzelkomponenten noch die Detektion schwach positiver Komponenten zu erlauben. Es gab offensichtlich auch

keine wesentliche Beeinflussung der PCR-Reaktionen durch niedrig affine, unspezifische Bindungen von Primern und Sonden an die unspezifische Proben-DNS und auch dadurch keinen Sensitivitätsverlust.

Tab. 8: Vergleich der Triplex- und der Singleplex-Reaktionen mit isolierter DNS von pRacL11, EHV-4 und dem β 2m-Bacmid. Dabei wurden zwei Reaktionspartner in konstanten Konzentrationen und der dritte Reaktionspartner in variablen Konzentrationen eingesetzt.

DNS		Singleplex C _T -Werte:	Triplex C _T -Werte:
RacL11	10 ⁴	29,34	30,12
EHV-4	10 ⁴	32,91	33,89
β 2m	10 ²	43,52	44,73
RacL11	10 ⁴	29,34	29,85
EHV-4	10 ⁴	32,91	33,42
β 2m	10 ⁴	34,36	34,44
RacL11	10 ⁴	29,34	29,92
EHV-4	10 ⁴	32,91	32,93
β 2m	10 ⁶	25,22	25,83
RacL11	10 ⁴	29,34	29,71
EHV-4	10 ⁴	32,91	33,21
β 2m	10 ⁸	19,38	19,79
RacL11	10 ²	34,66	34,62
EHV-4	10 ⁴	32,91	33,15
β 2m	10 ⁴	34,36	34,62
RacL11	10 ⁴	29,34	29,85
EHV-4	10 ⁴	32,51	32,83
β 2m	10 ⁴	34,36	34,05
RacL11	10 ⁶	22,57	23,65
EHV-4	10 ⁴	32,91	33,52
β 2m	10 ⁴	34,36	35,50
RacL11	10 ⁸	16,20	16,79
EHV-4	10 ⁴	32,91	33,61
β 2m	10 ⁴	34,36	35,73

RacL11	10 ⁴	29,34	30,30
EHV-4	10 ²	41,06	42,92
β2m	10 ⁴	34,36	35,23
RacL11	10 ⁴	29,34	29,88
EHV-4	10 ⁴	32,91	32,84
β2m	10 ⁴	34,36	34,20
RacL11	10 ⁴	29,34	29,78
EHV-4	10 ⁶	26,61	26,73
β2m	10 ⁴	34,36	34,04
RacL11	10 ⁴	29,34	30,03
EHV-4	10 ⁸	19,85	19,97
β2m	10 ⁴	34,36	35,33

Im Laufe der Studie wurden drei verschiedene Master Mixes verwendet (sh. 3.2.5.2). In Tabelle 9 sind die Ergebnisse eines direkten Vergleiches des PeqGold Hot Start-Mix Real-Time (Peqlab) ohne Referenzfarbstoff und des QuantiTect Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), der als Referenzfarbstoff ROX enthält und speziell für die Verwendung in Multiplex-PCR-Reaktionen empfohlen wird, dargestellt. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Sensitivität und dem Reaktionsverlauf der Multiplex-PCR festgestellt werden (Tab 9). Aufgrund des günstigsten Preises wurde für alle weiteren Experimente der PeqGold Hot Start-Mix der Firma PeqLab verwendet.

Tab. 9: Vergleich der Triplex- und der Singleplex-Reaktionen mit Qiagen QuantiTect Multiplex PCR und PeqLab MasterMix. Als Template wurden verschiedene Verdünnungsstufen der Standard-DNS von pRacL11, dem EHV-4-Isolat und dem β2m-Bacmid eingesetzt.

DNS:	Reaktionsansatz	Reaktionsansatz	Reaktionsansatz
	Triplex Qiagen Master Mix	Triplex PeqLab Master Mix	Singleplex PeqLab Master Mix
	C _T -Werte:	C _T -Werte:	C _T -Werte:
RacL11 10 ⁸	20,85	20,73	19,94
EHV-4 10 ⁸	20,88	21,27	21,77
β2m 10 ⁸	18,03	19,45	17,88
RacL11 10 ⁶	23,19	23,58	23,10

EHV-4 10 ⁶	28,66	28,27	28,87
β2m 10 ⁶	25,22	26,50	24,97
RacL11 10 ⁴	26,68	26,87	26,91
EHV-4 10 ⁴	33,92	33,95	33,32
β2m 10 ⁴	30,87	32,77	30,36
RacL11 10 ²	32,51	32,82	32,68
EHV-4 10 ²	39,18	39,87	38,72
β2m 10 ²	35,68	36,20	34,70

4.4 Vergleich zweier DNA-Isolierungs-Kits

Es wurden zwei verschiedene DNA-Isolierungs-Kits (QIAamp® DNA Mini Kit und Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega) im Bezug auf ihre Handhabung, die isolierte DNA-Menge und die Kosten beurteilt.

Zuerst wurde die Durchführung und Handhabung der beiden DNA-Isolierungs-Kits beurteilt. Hierbei zeigte sich, dass das Qiagen-Kit deutlich einfacher zu handhaben war und eine wesentlich schnellere Durchführung der DNA-Isolierung erlaubte. Auch die Kontaminationsgefahr war bei diesem Kit deutlich geringer, da weniger Pipettierschritte notwendig waren. Da man am Ende der Durchführung kein DNA-Pellet erhielt, welches man resuspendieren musste, war auch die Gefahr des Pelletverlustes oder der Kontamination des Pellets mit Reagenzienrückständen nicht gegeben. Es konnten allerdings keine Unterschiede zwischen den beiden Kits in der isolierten DNA-Menge aus identischen Mengen an Organproben, EDTA-Blut und Nasentupfern festgestellt werden. Der größte Nachteil des Qiagen-Kits für die Routinediagnostik ist der Preis, da die DNA-Isolierung aus einer Probe mindestens doppelt so teuer ist wie beim Wizard Kit. Da man beim Wizard Genomic DNA Purification Kit im Gegensatz zum QIAamp® DNA Mini Kit auch deutlich geringere Mengen an Probenmaterial und damit auch an Reagenzien einsetzen kann, ergibt sich ein noch größerer Preisvorteil. Die Probenmenge beim Qiagen Kit ist dagegen durch die speziellen Reaktionsgefäße vorgegeben.

Bei sauberer und kontrollierter Anwendung ist das Wizard Genomic DNA Purification Kit für die Routinediagnostik aufgrund des Preisvorteils dem Kit der Firma Qiagen vorzuziehen.

4.5 Vergleichende Untersuchung von Probenmaterial mit der konventionellen EHV-1/4 PCR und der *real-time* PCR

4.5.1 Untersuchung von Probenmaterial

Zur Etablierung und initialen Validierung der EHV-1- bzw. -4-spezifischen *real-time* PCR wurden 110 Organproben von abortierten Feten und von Pferden mit ZNS-Problematik untersucht. Außerdem wurden 8 Nasentupfer von Pferden mit neurologischen Ausfallserscheinungen untersucht. Das Material stammte von Proben, die zwischen 1999 und 2006 für die Untersuchung auf EHV-1 oder -4 an die Diagnostikabteilung des Instituts geschickt worden waren. Die bereits vorliegenden Ergebnisse der konventionellen PCR und der Immunfluoreszenztechnik wurden mit denen der neu etablierten EHV-1- bzw. EHV-4-spezifischen *real-time* PCR verglichen (Tab. 10). Mit der konventionellen EHV-1/4 PCR konnte keine Differenzierung zwischen EHV-1 und EHV-4 erfolgen.

Gleichzeitig wurden alle Proben auch mit der β 2m-spezifischen-*real-time* PCR untersucht, um die eingesetzte Zellzahl in den einzelnen Proben zu bestimmen und somit eine Quantifizierung der Virusgenome relativ zur Zellzahl vornehmen zu können. In Abortfällen wurden Lunge, Leber und Milz des abortierten Fohlens und teilweise die Plazenta der Mutterstute untersucht, da auch Abortfälle beschrieben wurden, bei denen die Feten virologisch negativ waren und nur die Plazenta infiziert war (SMITH et al., 1992). In Fällen mit ZNS-Problematik wurde das Rückenmark und teilweise Lunge, Leber und Milz untersucht.

Da sowohl in der EHV-1- als auch in der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR C_T -Werte über 35 einer Anzahl von unter 10 Genomkopien/ μ l entsprachen und die *real-time* PCR ab einer Genomkopienzahl von unter zehn Genomkopien/ μ l keine sicheren und einwandfrei reproduzierbaren Ergebnisse erbrachte, wurden C_T -Werte über 35 als fraglich angesehen und die *real-time* PCR wiederholt. C_T -Werte unter 35 wurden als sicher positives Ergebnis gewertet.

Die Ergebnisse der konventionellen EHV-1/4 PCR und der EHV-1-spezifischen *real-time* PCR stimmten in den meisten Fällen gut überein, lediglich aus dem Material zweier Aborte lies sich mittels konventioneller PCR kein spezifisches Amplifikat darstellen, während die *real-time* PCR mit einem C_T von 38,20 wiederholt als fraglich bzw. 29,97 als positiv gewertet wurde. Auffallend waren im ersten Fall (E 470-472) die hohen C_T -Werte in der *real-time* PCR (38,20 bis 41,25). Der Reaktionskurvenverlauf war im ersten Fall extrem flach und aus drei

der vier Organproben konnte im Doppelansatz nur jeweils einmal ein Anstieg der Fluoreszenz registriert werden. Die Plazenta (E 473) ergab keinen C_T -Wert. Um in diesen Fällen Kontaminationen während der DNS-Isolierung aus den Organproben oder Pipettierfehler auszuschließen, wurde diese wiederholt und die *real-time* PCR anschließend ebenfalls wiederholt. Bei der Wiederholung der *real-time* PCR ergaben sich bei Leber und Lunge C_T -Werte über 40 und bei Milz und Plazenta keine C_T -Werte. Daher wurden diese Proben weiterhin als fraglich gewertet. Nur die Plazenta wurde negativ gewertet, da sich in beiden Experimenten keine C_T -Werte ergaben. Es kann aufgrund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und des Kurvenverlaufs angenommen werden, dass es sich tatsächlich um einen Nachweis von EHV-1 DNS handelt, die aber in so geringen Genomkopien vorliegt, dass die Detektionsgrenze der PCR erreicht ist. Im anderen Fall (E 621-623) ergaben sich auch bei der Wiederholung der *real-time* PCR C_T -Werte zwischen 29,85 und 34,27, so dass diese als positiv gewertet wurden.

In keinem der untersuchten Organe lies sich EHV-4-DNS mittels der spezifischen *real-time* PCR nachweisen.

Die Proben wurden nicht nur mit den EHV-1 bzw. EHV-4 spezifischen Einzel-PCRs untersucht, sondern wurden zusätzlich auch im Multiplex Ansatz beurteilt. Die EHV-1/-4-spezifische Multiplex-*real-time* PCR ergab für EHV-1 vergleichbare C_T -Werte wie in der Singleplex-Reaktion und auch in diesen Experimenten war EHV-4 nicht zu detektieren.

Tab. 10: Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen EHV-1/-4 Diagnostikmethoden: Immunfluoreszenz (IF), konventionelle PCR (Konv. PCR) und *real-time* PCR.

Probe	Organ	Vorbericht	IF	Konv. PCR	Real-time PCR (C_T)	Virus-genome/ μ l	β 2m-Kopien/ μ l
02.11.1999							
O 811	Lunge	Abort	Neg.	Pos.	Pos. 34,34	$1,931 \times 10^1$	$4,394 \times 10^5$
O 812	Leber		-	Pos.	Pos. 34,75	$1,473 \times 10^1$	$2,614 \times 10^5$
O 813	Milz		-	Pos.	Pos. 30,05	$3,439 \times 10^2$	$1,526 \times 10^5$
O 823	Lunge	Stute, 13 Jahre, ZNS-Symptomatik	-	Pos.	Pos. 29,74	$4,383 \times 10^2$	$7,377 \times 10^6$
O 824	Leber		-	Pos.	Pos. 31,83	$1,107 \times 10^2$	$6,513 \times 10^5$
O 825	Milz		-	Pos.	Pos. 30,40	$2,833 \times 10^2$	$1,455 \times 10^5$
O 826	RM		-	Pos.	Pos. 33,87	$2,888 \times 10^1$	$2,489 \times 10^4$

O 827	Lunge	Wallach,	-	Pos.	Pos. 28,52	$9,778 \times 10^2$	$4,563 \times 10^5$
O 828	Leber	18 Jahre,	-	Pos.	Pos. 34,25	$1,214 \times 10^1$	$2,616 \times 10^5$
O 829	Milz	ZNS-Sympt.	-	Pos.	Pos. 34,21	$1,082 \times 10^1$	$5,718 \times 10^3$
O 830	RM		-	Pos.	Pos. 28,28	$8,326 \times 10^2$	$2,721 \times 10^4$
26.11.1999							
O 990	RM		-	-	Pos. 34,52	$9,106 \times 10^1$	$9,106 \times 10^0$
03.01.2000							
Q 001	Lunge	Abort	Pos.	Pos.	Pos. 14,89	$7,723 \times 10^6$	$7,723 \times 10^6$
Q 002	Leber		Pos.	Pos.	Pos. 18,45	$7,409 \times 10^5$	$7,409 \times 10^5$
Q 003	Milz		Pos.	Pos.	Pos. 17,39	$1,489 \times 10^6$	$1,489 \times 10^6$
30.10.2000							
R 586	Lunge	Abort	Neg.	Pos.	Pos. 33,92	$7,077 \times 10^2$	$7,077 \times 10^2$
R 587	Leber		-	Pos.	Pos. 34,69	$1,687 \times 10^2$	$1,687 \times 10^2$
R 588	Milz		-	Pos.	Pos. 34,28	$3,510 \times 10^2$	$3,510 \times 10^2$
09.04.2001							
S 685	Lunge	Abort	Pos.	Pos.	Pos. 15,82	$8,380 \times 10^6$	$8,380 \times 10^6$
S 686	Leber		Pos.	Pos.	Pos. 23,51	$1,558 \times 10^5$	$1,558 \times 10^5$
S 687	Milz		Pos.	Pos.	Pos. 17,74	$3,098 \times 10^6$	$3,098 \times 10^6$
18.04.2001							
S 726	Lunge	Abort	Pos.	Pos.	Pos. 17,57	$3,388 \times 10^6$	$3,388 \times 10^6$
S 727	Leber		-	Pos.	Pos. 21,54	$4,316 \times 10^5$	$4,316 \times 10^5$
S 728	Milz		-	Pos.	Pos. 17,34	$3,817 \times 10^6$	$3,817 \times 10^6$
04.05.2001							
S 835	Lunge	Abort	Pos.	Pos.	Pos. 15,65	$3,722 \times 10^5$	$3,722 \times 10^5$
S 836	Leber		Pos.	Pos.	Pos. 21,83	$9,166 \times 10^6$	$9,166 \times 10^6$
S 837	Milz		Pos.	Pos.	Pos. 24,41	$9,761 \times 10^4$	$9,761 \times 10^4$
18.10.2001							
T 428	RM		Pos.	Pos.	Pos. 34,57	$1,236 \times 10^2$	$1,236 \times 10^2$

19.10.2001							
T 438	RM		Neg.	Neg.	Neg.	-	2,481x10 ²
10.12.2001							
T 759	Leber	Abort	Pos.	Pos.	Pos. 22,92	2,120x10 ⁵	2,120x10 ⁵
T 760	Milz		Pos.	Pos.	Pos. 23,65	2,020x10 ⁵	2,020x10 ⁵
T 761	Lunge		Pos.	Pos.	Pos. 16,84	4,950x10 ⁶	4,950x10 ⁶
21.01.2001							
U 166	Leber	Abort	-	Pos.	Pos. 33,68	6,014x10 ¹	6,014x10 ⁰
U 167	Milz		-	-	Pos. 34,32	1,551x10 ¹	1,551x10 ⁰
U 168	Lunge		-	-	Pos. 33,14	2,037x10 ¹	2,037x10 ⁰
U 169	Leber	Abort	Pos.	Pos.	Pos. 24,27	3,550x10 ⁴	3,550x10 ⁴
U 170	Milz		Pos.	Pos.	Pos. 26,74	1,249x10 ⁴	1,249x10 ⁴
U 171	Lunge		Pos.	Pos.	Pos. 23,53	1,619x10 ⁵	1,619x10 ⁵
28.01.2001							
U 260	Leber	Abort	Pos.	Pos.	Pos. 25,64	4,427x10 ⁴	4,427x10 ⁴
U 261	Milz			Pos.	Pos. 27,83	1,247x10 ⁴	1,247x10 ⁴
U 262	Lunge			Pos.	Pos. 24,91	8,630x10 ⁴	8,630x10 ⁴
26.01.2005							
C 214	Lunge	Wallach, 16 Jahre, ZNS-Sympt.	-	Pos.	Pos. 28,85	8,431x10 ²	6,893x10 ⁴
C 215	Leber		-	Pos.	Pos. 32,41	6,555x10 ¹	2,901x10 ⁵
C 216	Milz		-	Pos.	Pos. 33,59	2,819x10 ¹	3,919x10 ⁴
C 217	RM		-	Pos.	Pos. 31,09	1,695x10 ²	5,791x10 ⁵
14.03.2005							
C 567	Lunge	Abort	Neg.	Pos.	Pos. 27,61	2,049x10 ³	7,329x10 ⁴
C 568	Leber		Neg.	Pos.	Pos. 25,88	7,059x10 ³	6,543x10 ⁴
C 569	Milz		Neg.	Pos.	Pos. 34,65	1,320x10 ¹	3,643x10 ⁵
30.05.2005							
C 942	Lunge	Abort Traber	Neg.	Pos.	Pos. 34,97	4,183x10 ⁶	1,053x10 ⁰
C 943	Milz		Neg.	Pos.	Pos. 34,43	3,254x10 ⁷	21,80
12.01.2006							
E 113	Lunge	Abort	Pos.	Pos.	Pos. 20,38	3,621x10 ⁵	3,751x10 ⁶
E 114	Leber	8.	Pos.	Pos.	Pos. 27,03	3,097x10 ³	6,340x10 ⁷

E 115	Lunge	Trächt.monat	Pos.	Pos.	Pos. 21,10	$2,161 \times 10^5$	$2,698 \times 10^7$
20.01.2006							
E 176	Lunge	Abort	Neg.	Neg.	Neg.	-	$1,064 \times 10^6$
E 177	Leber		-	Neg.	Neg.	-	$1,007 \times 10^6$
E 178	Milz		-	Neg.	Neg.	-	$1,297 \times 10^6$
25.01.2006							
E 216	Lunge	Abort	Neg.	Pos.	Pos. 23,42	$4,097 \times 10^4$	$1,365 \times 10^6$
E 217	Leber	9.	-	Pos.	Pos. 23,47	$3,945 \times 10^4$	$5,326 \times 10^6$
E 218	Milz	Trächt.monat	-	Pos.	Pos. 26,45	$4,684 \times 10^3$	$3,261 \times 10^6$
13.02.2006							
E 470	Lunge	Abort	Neg.	Neg.	Fragl. 39,70	4,63	$2,855 \times 10^7$
E 471	Leber	9.	-	Neg.	Fragl. 38,20	6,97	$2,347 \times 10^7$
E 472	Milz	Trächt.monat	-	Neg.	Fragl. 41,25	2,63	$2,348 \times 10^7$
E 473	Plazen.		-	Neg.	Neg.	-	$3,527 \times 10^5$
20.02.2006							
E 573	Lunge	Abort	Pos.	Pos.	Pos. 20,83	$2,626 \times 10^5$	$3,691 \times 10^7$
E 574	Leber	10.	-	Pos.	Pos. 21,88	$1,239 \times 10^5$	$1,265 \times 10^7$
E 575	Milz	Trächt.monat	-	Pos.	Pos. 21,03	$2,271 \times 10^5$	$3,847 \times 10^6$
E 576	Plazen.		-	Pos.	Pos. 27,67	$1,953 \times 10^3$	$5,179 \times 10^4$
12.03.2006							
E 621	Lunge	Abort	-	Neg.	Pos. 31,42	$1,088 \times 10^2$	$5,782 \times 10^5$
E 622	Leber		-	Neg.	Pos. 29,97	$2,845 \times 10^2$	$1,814 \times 10^7$
E 623	Milz		-	Neg.	Pos. 33,40	$2,929 \times 10^1$	$4,496 \times 10^7$
16.03.2006							
E 697	Lunge	Abort	-	Pos.	Pos. 16,99	$4,095 \times 10^6$	$1,086 \times 10^6$
E 698	Leber		-	Pos.	Pos. 16,26	$6,885 \times 10^6$	$4,560 \times 10^6$
E 699	Milz		-	Pos.	Pos. 14,86	$7,874 \times 10^6$	$8,207 \times 10^6$
19.03.2006							
E 723	Lunge	Abort	Neg.	Neg.	Neg.	-	$5,521 \times 10^6$
E 724	Leber		Neg.	Neg.	Neg.	-	$6,318 \times 10^6$
E 725	Milz		Neg.	Neg.	Neg.	-	$1,164 \times 10^5$
26.03.2006							
E 752	Lunge	Abort	Neg.	Neg.	Neg.	-	$9,191 \times 10^6$

E 753	Leber		Neg.	Neg.	Neg.	-	1,721x10 ⁵
E 754	Milz		Neg.	Neg.	Neg.	-	1,226x10 ⁶
E 755	Plazen.		-	Neg.	Neg.	-	6,685x10 ⁶
02.04.2006							
E 796	Lunge	Abort	Neg.	Neg.	Neg.	-	1,492x10 ⁶
E 797	Leber		Neg.	Neg.	Neg.	-	1,274x10 ⁷
E 798	Milz		Neg.	Neg.	Neg.	-	1,263x10 ⁶
03.04.2006							
E 854	Lunge	Abort	-	Pos.	Pos. 16,15	3,365x10 ⁶	9,740x10 ⁵
E 855	Leber	10.	-	Pos.	Pos. 19,82	3,002x10 ⁵	2,183x10 ⁶
E 856	Milz	Trächt.monat	-	Pos.	Pos. 18,25	8,469x10 ⁵	5,194x10 ⁷
E 857	Plazen.		-	Pos.	Pos. 26,35	4,096x10 ³	4,110x10 ⁴
18.04.2006							
E 940	Lunge	Abort	Neg.	Neg.	Neg.	-	1,524x10 ⁶
E 941	Leber		-	Neg.	Neg.	-	2,749x10 ⁵
E 942	Milz		-	Neg.	Neg.	-	2,722x10 ⁶
24.04.2006							
E 976	Lunge	Abort	Neg.	Neg.	Neg.	-	1,501x10 ⁵
E 977	Leber		Neg.	Neg.	Neg.	-	2,238x10 ⁵
E 978	Milz		Neg.	Neg.	Neg.	-	6,306x10 ⁵
04.05.2006							
F 049	RM	Araber ZNS-Sympt.	-	Neg.	Neg.	-	2,390x10 ²
20.05.2006							
F 062	Lunge	Abort Esel	Neg.	Neg.	Neg.	-	1,457x10 ⁹
F 063	Leber			Neg.	Neg.	-	1,502x10 ⁴
F 064	Milz			Neg.	Neg.	-	1,882x10 ⁵
F 089	Plazen.			Neg.	Neg.	-	8,529x10 ⁵
28.05.2006							
F 118	Milz	Abort		Neg.	Neg.	-	4,325x10 ⁶
F 119	Plazen.			Neg.	Neg.	-	5,737x10 ⁵
09.06.2006							
F 217	RM	ZNS	-	Neg.	Neg.	-	2,674x10 ³

F 224	RM		-	Pos.	Pos. 33,82	1,894x10 ²	5,037x10 ⁵
17.06.2006							
F 241	Lunge	Abort	-	Neg.	Neg.	-	3,710x10 ⁵
F 242	Leber		-	Neg.	Neg.	-	3,253x10 ⁶
F 243	Milz		-	Neg.	Neg.	-	1,091x10 ⁷
F 313	Lunge	Stute, 12 Jahre	-	Neg.	Neg.	-	4,458x10 ⁵
F 314	RM	ZNS-Sympt.	-	Neg.	Neg.	-	1,089x10 ⁴
F 372	RM		-	Pos.	Pos. 34,79	1,537x10 ²	1,711x10 ³

4.5.2 Untersuchung von Nasentupfern aus Pferdebeständen im Raum München

Von 50 aus 18 Beständen im Raum München im Herbst und Winter 2006 gesammelten Nasentupfern ließen sich bei drei Nasentupfern in der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR spezifische Amplifikate nachweisen (Tab. 11). EHV-1-DNS war in keinem der Tupfer zu detektieren. Die Nasentupferproben, die in der EHV-4-spezifischen PCR reagierten, stammten alle von Jährlingen aus einem Bestand mit respiratorischer Symptomatik, die mit Fieber, Husten und Nasenausfluss aufgefallen waren. In diesem Bestand wurden insgesamt von zehn Tieren Nasentupfer untersucht, von denen sechs Fieber und Nasenausfluss gezeigt hatten. Davon zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung nur noch die drei Tiere Fieber, bei denen sich in der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR spezifische Amplifikate nachweisen ließen. Man kann nicht ausschließen, dass es bei den anderen Tieren des Bestandes schon vorher zu einer Virusausscheidung gekommen war.

In insgesamt neun von den 18 Beständen waren ein oder mehr Tiere mit Fieber und Nasenausfluss aufgefallen. Von den 50 untersuchten Tieren zeigten am Tag der Beprobung insgesamt 17 Tiere Fieber und 38 Nasenausfluss.

Tab. 11: Nachweis von EHV-4-DNS in Nasentupfern aus dem Raum München

Proben	C _T -Wert	Virusgenomkopien (EHV-4)/µl	Zellzahl (β2m)/µl
Jährling, Vollblut	32,74	2,063x10 ⁴	1,136 x 10 ³
Jährling, Vollblut	34,26	7,026 x 10 ³	8,120 x 10 ²
Jährling, Vollblut	34,84	5,803 x 10 ³	6,901 x 10 ²

4.6 Begleitende Untersuchungen mehrerer in einem süddeutschen Vollblutgestüt festgestellter EHV-1 bedingter Aborte

4.6.1 Gestütsaufbau

Das Gestüt existiert seit 1986. Die Hauptaufgabe des Gestüts liegt in der Zucht von Vollblutpferden, daneben existiert auch eine Warmblutzucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lag die Größe des Bestandes bei 40 Pferden teilweise mit Nachzucht. Hiervon waren vier Warmbluthengste, zehn Warmblutstuten, drei Vollbluthengste und 23 Vollblutstuten. Diese Gruppen wurden jeweils separat in unterschiedlichen Stallgebäuden und tagsüber auf separaten Koppeln ohne direkten Kontakt zueinander gehalten. Im Gestüt wurden die Vollblutstuten in zwei Stutengruppen gehalten, die sowohl auf der Weide als auch im Stall getrennt gehalten wurden. Die Aufstallung der Tiere erfolgte in Einzelboxen bei täglichem Weidegang. An einer Stelle grenzten die Gitterboxen der beiden Stutengruppen über eine Ecke aneinander, so dass hier ein direkter Kontakt zwischen zwei Stuten aus den beiden verschiedenen Gruppen möglich war. Das Pflegepersonal betreute beide Gruppen parallel und es erfolgte keine Trennung der Geräte, Kleidung oder eine Reinigung oder Desinfektion der Hände zwischen dem Handling der beiden Stutengruppen. Alle Pferde des Gestüts wurden nach Herstellerangaben mit einem Kombinationsimpfstoff gegen EHV-1 und EHV-4 grundimmunisiert und die Impfungen in regelmäßigen Abständen von sechs Monaten aufgefrischt.

In den vergangenen Jahren kam es 2005 zu einem Abort mit 3½-Monaten Trächtigkeitsdauer, wobei in der konventionellen PCR keine EHV-1-DNS amplifiziert werden konnte und auch die Immunfluoreszenz ein negatives Ergebnis ergab. Im April 2003 ereignete sich ein Abort bei einer eingestellten Warmblutstute, auch in diesem Fall konnte keine EHV-1-DNS in der PCR amplifiziert werden und auch die Immunfluoreszenz ergab ein negatives Ergebnis für den Nachweis von EHV-1.

Außer diesen gab es in den vergangenen Jahren keine Aborte im Gestüt. Auch im französischen Gestüt, wo ein Teil der Stuten im Jahr zuvor gedeckt worden war, gab es angeblich keine EHV-1 bedingten Aborte in den letzten Jahren. Die Abortfälle im Frühjahr 2006 ereigneten sich alle bei Vollblutstuten des Gestüts. Von den insgesamt 23 Vollblutstuten waren sechs Stuten im Jahr zuvor in einem französischen Gestüt gedeckt worden. Alle anderen Stuten waren im eigenen Gestüt gedeckt worden.

4.6.2 Zeitlicher Ablauf des Abortgeschehens und Probenentnahmedaten

Die ersten drei Aborte des Frühjahres 2006 am 11.01.06, am 25.01.06 und am 13.02.06 ereigneten sich alle bei Stuten der ersten Haltungsgruppe im achten bzw. neunten Trächtigkeitsmonat, die anderen drei Aborte am 19.02.06, 02.04.06 und am 12.04.06 bei Stuten aus der zweiten Haltungsgruppe im zehnten Trächtigkeitsmonat.

Insgesamt wurden aus dem Gestüt 100 Blutproben (jeweils Serum und EDTA-Blut) und 46 Nasentupferproben von Stuten zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Abb. 5). Dadurch sollte geklärt werden, ob anhand von Antikörper-Titern und Virusnachweis aus dem Blut bzw. aus Nasentupfern eine Aussage zu treffen war, welche Tiere sich wann infiziert haben könnten, wann vor einem Abort Virus im Blut nachzuweisen war oder sich die Antikörper-Titer veränderten und ob ein Zusammenhang zwischen Viruslast und Abortwahrscheinlichkeit zu finden war.

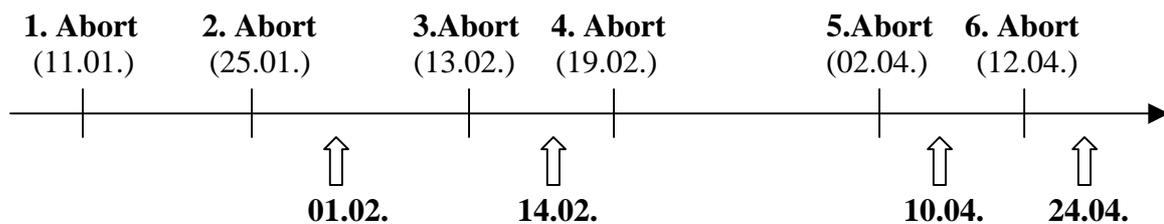


Abb. 5: Zeitliche Darstellung des Abortgeschehens. Am 01.02.06, 14.02.06, 10.04.06 und am 24.04.06 wurden jeweils EDTA- und Serum-Blutproben und Nasentupferproben von allen 23 Vollblutstuten des Gestüts genommen.

4.6.3 Ergebnisse der virologischen (PCR) und serologischen Untersuchungen

Insgesamt wurden 18 Proben von Organen der sechs Aborte und von den Plazenten der jeweiligen Mutterstuten sowohl mit der konventionellen EHV-1/4-PCR als auch mit der EHV-1- und der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR untersucht. Dabei konnte in der konventionellen EHV-1/4 PCR bei 12 Organproben und 4 Plazenten EHV-1/4-DNS amplifiziert werden. In der EHV-1-spezifischen *real-time* PCR ergaben sich ebenfalls bei 12 Organproben und 4 Plazenten C_T -Werte, die als positiv gewertet wurden (Tab. 12). Bei der Untersuchung des dritten Abortfalles vom 13.02.2006 ergaben sich bei allen Organproben (E 470-473) C_T -Werte über 35, wie unter 4.5.1 beschrieben.

Tab. 12: Untersuchung von Organen abortierter Fohlen bzw. von Plazentamaterial der jeweiligen Mutterstuten aus einem süddeutschen Vollblutgestüt. In dieser Tabelle sind Ergebnisse, die auch bereits in Tabelle 17 enthalten sind separat zusammengefasst.

Abortfall	Organ	Konventionelle EHV-1/4-PCR	EHV-1-spezif. <i>real-time</i> PCR	C_T-Wert	Virusgenom- kopien/μl
1. 11.01.2006 Bougainvillea	Lunge	Positiv	Positiv	19,90	3,63 x 10 ⁵
	Leber	Positiv	Positiv	25,96	4,56 x 10 ³
	Milz	Positiv	Positiv	20,44	2,45 x 10 ⁵
	Plazenta	Positiv	Positiv	25,73	5,12 x 10 ³
2. 25.01.2006 Mosogna	Lunge	Positiv	Positiv	22,90	4,16 x 10 ⁴
	Leber	Positiv	Positiv	22,07	3,96 x 10 ⁴
	Milz	Positiv	Positiv	25,81	5,09 x 10 ³
	Plazenta	Positiv	Positiv	26,91	1,92 x 10 ³
3. 13.02.2006 Margies Best	Lunge	Negativ	Fraglich	39,70	4,63
	Leber	Negativ	Fraglich	38,39	6,97
	Milz	Negativ	Fraglich	41,25	2,63
	Plazenta	Negativ	Negativ	Kein C _T	-
4. 20.02.2006 All time great	Lunge	Positiv	Positiv	20,33	2,65 x 10 ⁵
	Leber	Positiv	Positiv	21,20	1,42 x 10 ⁵
	Milz	Positiv	Positiv	20,42	2,50 x 10 ⁵
	Plazenta	Positiv	Positiv	27,40	1,62 x 10 ³
5. 02.04.2006 Eiszeit	Lunge	Positiv	Positiv	16,15	3,37 x 10 ⁶
	Leber	Positiv	Positiv	19,82	3,00 x 10 ⁵
	Milz	Positiv	Positiv	18,25	8,47 x 10 ⁵
	Plazenta	Positiv	Positiv	26,35	4,09 x 10 ³
6. 12.04.2006 Princess Nana	Lunge	Negativ	Negativ	Kein C _T	Kein C _T
	Leber	Negativ	Negativ	Kein C _T	Kein C _T
	Milz	Negativ	Negativ	Kein C _T	Kein C _T
	Plazenta	Negativ	Negativ	Kein C _T	Kein C _T

In den EDTA-Blutproben konnte zu keinem der vier Probenentnahmedaten in der EHV-1-spezifischen *real-time* PCR Amplifikationen mit einem C_T-Wert unter 40 nachgewiesen werden. Bei zwei Proben vom 14.02.06 ergab sich im Doppelansatz in jeweils einer Probe ein C_T-Wert über 40 (42,26 und 43,76) und ein extrem flacher Reaktionskurvenverlauf. Der

zweite Ansatz zeigte keinen C_T -Wert. Bei der Wiederholung des Experiments konnte bei keiner Blutprobe ein C_T -Wert ermittelt werden, weshalb alle Blutproben als negativ für EHV-1 gewertet wurden. Somit war bei keiner der Stuten, die abortierten zu den Zeitpunkten der Probennahme EHV-1-DNS aus Blutleukozyten eindeutig nachweisbar. Allerdings erfolgte die erste Probennahme erst eine Woche nach dem zweiten Abortfall. Daher lässt sich in den beiden ersten Abortfällen keine Aussage über eine vorangegangene Virämie machen. Zudem war der sechste Abort nicht auf eine EHV-1 Infektion zurückzuführen, so dass in diesem Fall auch nicht mit einer vorangehenden Virämie zu rechnen war.

In den Nasentupferproben ließ sich nur am 10.04.2006 bei zwei Stuten (Elegant as well und Princess Nana), die normal austrugen, in der konventionellen EHV-1/4 PCR ein spezifisches Amplifikat darstellen und interessanterweise ergab die EHV-4-spezifische *real-time* PCR C_T -Werte, die als positiv gewertet wurden (Tab. 13). Die EHV-1-spezifische *real-time* PCR ergab dagegen keine C_T -Werte. Am 01.02., 14.02. und 24.04.2006 ließ sich bei keiner Nasentupferprobe in der konventionellen EHV-1/4-PCR ein spezifisches Amplifikat darstellen und die EHV-1-spezifische *real-time* PCR ergab bei keiner Probe einen C_T -Wert, der als positiv gewertet wurde. Diese Ergebnisse zeigen wie wichtig es ist eine EHV-1 und EHV-4 Multiplex PCR zu etablieren, da in einem Bestand innerhalb kurzer Zeit der Nachweis beider Genome gelang.

Tab. 13: EHV-4-positive Nasentupferproben vom 10.04.2006 aus dem süddeutschen Vollblutgestüt

Stuten:	Konventionelle EHV-1/4 PCR:	EHV-4-spezifische real-time PCR (C_T):	Virusgenom-kopien/μl	Zellzahl/μl
Elegant as well	Positiv	Positiv (33,52)	$3,175 \times 10^3$	$1,834 \times 10^3$
Princess Nana	Positiv	Positiv (29,83)	$2,541 \times 10^4$	$1,927 \times 10^3$

Die Antikörpertiter wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der LMU München mit einem Serumneutralisationstest bestimmt. Die Antikörpertiter der Stuten, die abortierten, stiegen im Beobachtungszeitraum vom 01.02.2006 bis 24.04.2006 nicht an (Tab. 14). Von den beiden Stuten, die am 11.01.06 und am 25.01.06 abortierten lagen keine Blutproben vor und damit konnten auch keine Titeränderungen beobachtet werden. Bei den anderen Stuten, die abortierten, konnte kein Bezug zwischen dem Verlauf der Antikörpertiter, dem Nachweis viraler DNS aus Blutleukozyten oder Nasentupfern und den Aborten festgestellt werden. Aus diesen Daten kann entnommen

werden, dass zum Zeitpunkt der Aborte selber, keine akute EHV-1 Infektion und Replikation auftrat, sondern, dass diese bereits bevor die Beprobung begann stattgefunden haben musste.

Tab. 14: Antikörpertiter der Vollblutstuten des Gestüts. Die Stuten, die abortierten, sind fett markiert.

Stuten	01.02.06	14.02.06	10.04.06	24.04.06
1. Hold on	1: 128	1: 128	1:256	1: 256
2. Margies Best	1: 128	1: 128	1:128	1: 128
3. Arctic Ocean	1: 4	1: 4	1:8	1: 4
4. Britannia	1:128	1: 128	1:128	1: 64
5. Mysterix	1: 256	1: 256	1:128	1: 128
6. My special	1: 256	1: 64	1:64	1: 64
7. Born free	1: 256	1: 256	1:128	1: 128
8. Born to win	1: 2	1: 4	1:2	1: 2
9. Dawn dane	1: 256	1: 128	1:256	1: 128
10. Denial	1: 512	1: 512	1:256	1: 64
11. Borgia	1: 32	1: 64	1:64	1: 64
12. Elegante	1: 512	1: 1024	1:256	1: 64
13. Rose du Roi	1: 128	1: 128	1:256	1: 256
14. Eiszeit	1: 128	1: 256	1:128	1: 128
15. Northern Passage	1: 16	1: 8	1:8	1: 8
16. Elegant as well	1: 256	1: 256	1:512	1: 512
17. Grey Lilas	1:1024	1: 512	1:256	1: 64
18. Cresta	1: 128	1: 256	1:128	1: 64
19. All time great	1: 512	1: 512	1:256	1: 256
20. Princess Nana	1: 256	1: 256	1:128	1: 128
21. Dawn dew	1: 8	1: 4	1:8	1: 8
22. Navona	1:1024	1: 1024	1:512	1: 256
23. Hold off	1: 64	1: 32	1:32	1: 32

4.6.4 Virusisolate aus Gestüt

Aus vier der sechs Aborte des Gestüts wurde EHV-1 über die Zellkulturanzucht isoliert. Nach Vermehrung der Isolate über Rk13-Zellen wurde reine, virale DNS durch Phenolextraktion

präpariert. Die virale DNS wurde mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen (s. 3.2.3.3) gespalten, die Fragmente anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs) miteinander verglichen. Zum Vergleich wurden zu dem das Isolat O 834, das 1999 von einer an Myeloenzephalopathie verstorbenen Stute gewonnen worden war, und der EHV-1 Stamm RacL11 eingesetzt. (Abb. 6, gezeigt für zwei Enzyme).

Die RFLPs der verglichenen Abort-Isolate waren identisch. Erkennbare Abweichungen konnten nur gegenüber RacL11 und dem Myeloenzephalopathie-Isolat O 834 festgestellt werden. Somit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Aborte in diesem Bestand durch ein Virus ausgelöst wurden und eben nicht mehrere Einträge oder Reaktivierungen verschiedener latenter Viren stattgefunden hatten.

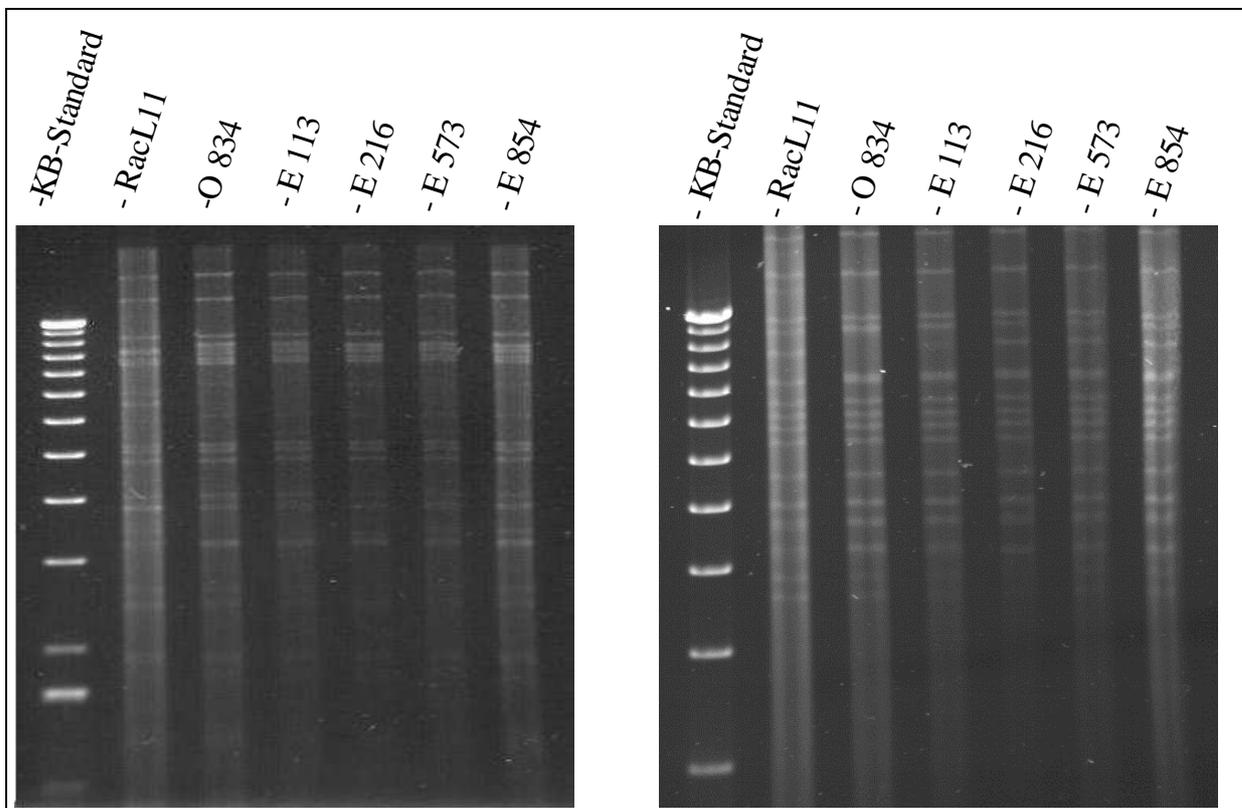


Abb. 6: Abbildung der Agarosegele nach Verdau der viralen DNS mit den Restriktionsenzymen *Hind*III (links) und *Bam*-HI (rechts). Zur Größenbestimmung wurde ein 12 kb DNA- Marker eingesetzt.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte eine quantitative *real-time* PCR zur Detektion und Differenzierung von EHV-1 und EHV-4 etabliert werden und diese mit einer für Sequenzen des equinen β 2m-spezifischen *real-time* PCR kombiniert werden. Damit sollte es möglich werden in einem Ansatz durch die parallele Amplifizierung von Standardverdünnungsreihen von definierter DNS von EHV-1, EHV-4 und den β 2m-Sequenzen zusammen mit der isolierten Proben-DNS eine absolute Quantifizierung der Virusgenome relativ zur eingesetzten Zellzahl vorzunehmen.

Insbesondere für epidemiologische Untersuchungen und Verlaufskontrollen, aber auch nach experimentellen Infektionen z.B. für Impfstofftests, stünde somit ein wertvolles Werkzeug zur Verfügung, um die Viruslast eines Einzeltieres oder einer Gruppe von Tieren durch eine exakte Quantifizierung der Genomkopien zu bestimmen.

Sowohl für EHV-1 als auch für EHV-4 sind in den letzten Jahren mehrere *real-time* PCR Protokolle beschrieben worden (PUSTERLA et al., 2005; DIALLO et al., 2006; ELIA G. et al., 2006; HUSSEY et al., 2006; PUSTERLA et al., 2007), unter anderem auch während diese Arbeit bereits lief, eine EHV-1/-4 Multiplex PCR, die aber keine exakte Quantifizierung erlaubt (DIALLO et al., 2007). In Folge einer Zusammenarbeit mit Dr. Nikolaus Osterrieder und Dr. Laura Goodman wurden für die Detektion von EHV-1 und für die Bestimmung der Kopienanzahl des Pferdegenoms über β 2m-Sequenzen die entsprechenden Primer und Sondensequenzen übernommen (GOODMAN et al., 2006; 2007), da sich diese als sensitiv und spezifisch erwiesen hatten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem eine entsprechende EHV-4-spezifische *real-time* PCR entwickelt und mit der Detektion von EHV-1 und β 2m in ein Multiplex-Protokoll kombiniert. Mit dieser PCR wurde ein Abortausbruch in einem süddeutschen Vollblutgestüt untersucht. Zusätzlich wurde eine Vielzahl von archivierten und aktuellen Routineproben auf EHV-1 und EHV-4 untersucht und die Ergebnisse mit denen der konventionellen PCR verglichen.

5.1 Spezifität der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die etablierte EHV-4-*real-time* PCR spezifisch für EHV-4 ist und es nicht zu unerwünschten Reaktionen mit dem Pferdegenom, verschiedenen EHV-1-Stämmen, einer Vielzahl EHV-1 positiver Proben oder möglichen bakteriellen Kontaminanten kommt. Letzteres ist besonders wichtig bei Nasentupferproben,

da bei respiratorischer Symptomatik bakterielle Sekundärinfektionen eine große Rolle spielen. Da nur ein EHV-4-Isolat und fünf EHV-4 positive Nasentupfer zur Validierung zur Verfügung standen, sollen in weiteren Versuchen noch andere EHV-4-Isolate, Referenzstämme und weitere Proben in der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR getestet werden und somit sichergestellt werden, dass auch potentielle Stammvarianten mit dieser PCR erfasst werden. Allerdings sind Herpesviren generell genetisch recht stabil und Variationen treten bevorzugt in bestimmten Regionen des Genoms auf. Durch die Wahl der gD-Sequenzen als Zielsequenz für die PCR wurde das Risiko solcher Stammvariationen von vornherein minimiert. Schließlich müssen in weiteren Experimenten noch mögliche unspezifische Reaktionen mit weiteren Herpesviren wie EHV-2, -3 und -5 sicher ausgeschlossen werden. Allerdings erlauben die vorab mit den zur Verfügung stehenden Sequenzen durchgeführten Sequenzvergleiche, eine Aussage darüber, dass eine unspezifische Amplifikation mit zusätzlicher spezifischer Sondenbindung auf der DNS dieser Viren als äußerst unwahrscheinlich einzustufen ist. Die zusätzliche Spezifität durch den Parameter Sonde ist ja auch einer der großen Vorteile der *real time* PCR.

5.2 *Real-time* PCR im Multiplex-Format

Eine Multiplex *real-time* PCR kann ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel sein, um in einem Reaktionsansatz zwischen zwei oder mehr infektiösen Erregern zu unterscheiden. Da bei Infektionen mit equiden Herpesviren häufig sowohl EHV-1 als auch EHV-4 als auslösendes Agens in Frage kommen, ist es zeit- und kostensparend in einer Reaktion sowohl EHV-1 als auch EHV-4-DNS nachweisen zu können. Zudem kann auf diese Weise das Risiko reduziert werden, dass das eingesendete und aufbereitete Probenmaterial nicht für alle geforderten Untersuchungen einschließlich nötiger Wiederholungen ausreicht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die EHV-1/4-Multiplex-*real-time* PCR geeignet ist, um aus verschiedenen Probenmaterialien die ausgewählten Sequenzen des Glykoprotein-D-Gens von EHV-1 bzw. EHV-4 nachzuweisen und zwischen diesen zu unterscheiden. Im Vergleich zu einer bereits veröffentlichten EHV-1/4 Multiplex *real-time* PCR (DIALLO et al., 2007), ist durch die hier beschriebene Kombination der EHV-1/4-spezifischen *real-time* PCR mit der β 2m-spezifischen *real-time* PCR im gleichen Reaktionsansatz eine Quantifizierung der Virusgenome im Verhältnis zur Pferdegenom-Kopienzahl möglich und der Erfolg der DNS-Isolierung aus den verwendeten Probenmaterialien kann sofort überprüft werden.

Die Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen EHV-1/4-Multiplex-*real-time* PCR ist einfach und schnell, einschließlich der DNS-Isolierung konnte man innerhalb von drei bis vier Stunden ein Ergebnis erhalten. Andere Autoren geben für ihre Protokolle vergleichbare Zeiten an (DIALLO et al., 2005 und 2007). Somit ist die EHV-1/4-Multiplex-*real-time* PCR auch besonders für den Einsatz in Laboren mit hohem Probendurchsatz geeignet.

Die in dieser Arbeit beschriebene *real-time* PCR kann als alleiniges diagnostisches Mittel zur Detektion und Differenzierung von EHV-1 und –4 eingesetzt werden. Allerdings ersetzt sie nur bedingt andere diagnostische Methoden wie die Virusanzucht und –isolation in der Zellkultur. Wie schon bei DIALLO et al. angemerkt wird, ist für eine weitere Charakterisierung von EHV-1 und EHV-4 eine Virusisolierung über die Zellkultur weiterhin unverzichtbar (DIALLO et al. 2007).

Die Multiplex-*real-time* PCR in dieser Arbeit war sensitiv und spezifisch. Die C_T -Werte der Duplex- und der Triplex-Reaktionen stimmten gut mit denen der Singleplex-Reaktionen überein. Zum Teil lagen sie gegenüber den jeweiligen Singleplex-Reaktionen um bis zu 1,96 C_T -Werte höher. DIALLO et al. beschreiben bei ihrem Multiplex-Ansatz C_T -Wert Erhöhungen von bis zu 0,89 (DIALLO et al. 2007). Allerdings wurden bei DIALLO et al. nur jeweils sechs Proben in der EHV-1- bzw. –4-spezifischen Singleplex-PCR und der Multiplex-PCR getestet, wohingegen in der vorliegenden Arbeit alleine über 100 Organproben getestet wurden. Die geringen Verschiebungen bei den C_T -Werten sind aber für den Einsatz der PCR in der Routinediagnostik unerheblich, da auch in verschiedenen Experimenten mit gleicher Probe Schwankungen um einen C_T -Wert möglich sind.

5.3 Vergleich konventionelle PCR und *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR bietet alle Vorteile einer konventionellen PCR, d.h. die Schnelligkeit der Durchführung, die Sensitivität und die Nutzbarkeit verschiedener Ausgangsproben. In einem geschlossenen System werden in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produktdetektion und –Quantifizierung kombiniert. Damit ist die *real-time* PCR um ein Vielfaches schneller als konventionelle PCR-Techniken, und das Risiko von Kontaminationen durch post-PCR-Manipulationen wird vermieden. Ein weiterer Vorteil ist der Wegfall der Agarose-Gel-Auswertung nach der eigentlichen PCR-Reaktion, was Zeit- und Arbeitsaufwand reduziert und keinen Umgang mit potenziell kanzerogenen Farbstoffen wie Ethidiumbromid nötig macht. So ist es möglich mit der *real-time* PCR schon nach 3-4 h, je nach verwendetem DNA-Isolierungs-Kit, ein Ergebnis zu erhalten.

Da bei der *real-time* PCR neben den beiden Primern mit der Sonde noch ein drittes Oligonukleotid hybridisiert, wird die Spezifität und Sensitivität erhöht. Laut BUSTIN und MACKAY ist die Sensitivität der quantitativen *real-time* PCR 100 bis 1000-fach höher als in der konventionellen PCR. Damit liegt die Nachweisgrenze eines Amplifikats im Agarose-Gel bei zwei bis vier Nanogramm, bei einer *real-time* PCR bei nur zwei bis zwanzig Pikogramm (BUSTIN 2000; MACKAY 2002). Die in dieser Arbeit beschriebene *real-time* PCR konnte sowohl als Singleplex- als auch als Multiplexansatz weniger als 10 Genomkopien pro μl sicher identifizieren. Damit ist die Sensitivität vergleichbar mit der anderer Protokolle. In anderen Arbeiten konnten Virusmengen von 6 Genomkopien (HUSSEY et al., 2006) und weniger als eine TCID_{50} von EHV-1 und 0,15 pg EHV-1-DNA nachgewiesen werden (DIALLO et al., 2005) bzw. es konnten noch 10 Genomkopien (ELIA et al., 2005) des Virus nachgewiesen werden. Da es bei Infektionen mit EHV-1 und -4 zu einer lebenslangen Latenz kommt (ALLEN und BRYANS, 1986), ist es wichtig latent infizierte Tiere frühzeitig zu erkennen, da sie häufig die Infektionsquelle für andere Tiere darstellen. Durch ihre hohe Sensitivität ist die *real-time* PCR prädestiniert für den Virusnachweis von latent infizierten Tieren, da diese meist nur sehr geringe Virusmengen ausscheiden (ELIA et al., 2005).

Der Vergleich der Ergebnisse von 110 Organproben in der konventionellen EHV-1/-4-PCR und der EHV-1- bzw. -4-spezifischen *real-time* PCR ergab eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Nur in einem Fall konnten in der EHV-1-spezifischen *real-time* PCR C_T -Werte unter 35 erreicht werden, obwohl sich in der konventionellen EHV-1/-4-PCR kein Amplifikat darstellen lies. Die C_T -Werte lagen dabei relativ hoch (29,97 bis 33,40) und die detektierte Virusmenge lag nur zwischen $2,845 \times 10^2$ und $2,929 \times 10^1$ Genomkopien pro μl , was im Vergleich zu anderen untersuchten Abortfällen relativ wenig war. In diesem Fall konnte man vermuten, dass die Sensitivität der konventionellen PCR nicht ausreichte, um diese Virusmenge zu detektieren. Da aber auch eine Wiederholung der *real-time* PCR vergleichbare C_T -Werte ergab, wurde die Probe als sicher positiv für EHV-1 gewertet.

Durch die parallel mitamplifizierten Standardverdünnungsreihen mit definierter EHV-1-, EHV-4- und $\beta 2\text{m}$ -DNS bereitete auch die exakte Quantifizierung der in einer Probe enthaltenen Virusgenomkopien keine Probleme. Da bei der *real-time* PCR im exponentiellen Bereich der Reaktion gemessen wird, erlaubt diese Technik eine wesentlich exaktere Quantifizierung als die Endpunktmessung der konventionellen PCR (MACKAY 2002).

Nachteile der *real-time*-Technik ist sicher noch der relativ hohe Einstiegspreis für die entsprechenden Geräte und Sonden, welche sich nur bei entsprechend hohem Probenaufkommen amortisieren (MACKAY 2002).

Auch die Auswertung der *real-time* PCR lässt noch Verbesserungen zu, denn durch die Verwendung unterschiedlichster Software und Betriebssysteme lassen sich manche Ergebnisse nur schwer miteinander vergleichen.

5.4 Untersuchung von Nasentupfern aus Pferdebeständen im Raum München

Die Untersuchung von insgesamt 50 Nasentupferproben aus 18 Beständen im Raum München aus dem Herbst und Winter 2006 ergab nur in einem Bestand bei drei Pferden ein spezifisches Amplifikat in der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR. Diese drei Tiere zeigten alle die für eine EHV-4-Infektion typische Symptomatik mit Fieber, Husten und serösem Nasenausfluss (ALLEN, 2002). Im betroffenen Bestand hatten zehn Tage vor der Probenentnahme von zehn untersuchten Tieren noch drei weitere Tiere Fieber und Nasenausfluss gezeigt. Laut Literatur kann die Virusausscheidung über einen Zeitraum von ein bis fünf Wochen andauern (VAN MAANEN, 2002). Somit könnten diese zuerst erkrankten Tiere vorher schon Virus ausgeschieden haben und die Virusausscheidung hielt offensichtlich nicht über die 10 Tage bis zur Probennahme an. Da die Inkubationszeit für eine Infektion mit EHV-4 in der Literatur mit zwei bis acht Tagen angegeben wird (ALLEN et al., 1999), könnte bei diesen Tieren die Virusausscheidung zu einer Infektion der anderen Tiere geführt haben. Die Nasentupfer waren gezielt aus Beständen mit respiratorischer Problematik und wenn möglich von Tieren mit Symptomen genommen worden. Es ist anzunehmen, dass noch mehr als die drei diagnostizierten Tiere eine EHV-4 Infektion um den Untersuchungszeitraum herum durchgemacht haben, da es sich hierbei um eine gerade bei Jungtieren in dieser Jahreszeit sehr weit verbreitete Infektion handelt. Dass nur aus drei Proben tatsächlich EHV-4 Genome nachgewiesen werden konnten, bei durch die eigentätige Probennahme garantiert gleich bleibender Qualität der Tupferproben, weist generell darauf hin, dass es relativ schwer ist eine sichere virologische Diagnose einer EHV-4 Infektion aus Nasentupfermaterial zu führen. Je nach Verlauf der Erkrankung ist es schwierig genau zum Zeitpunkt der Virusausscheidung zu beproben.

5.5 Begleitende Untersuchungen mehrerer in einem süddeutschen Vollblutgestüt festgestellter EHV-1 bedingter Aborte

Mit der etablierten EHV-1- und -4-spezifischen *real-time* PCR sollte das Abortgeschehen in einem süddeutschen Vollblutgestüt untersucht werden. Dadurch sollte geklärt werden, ob

anhand von Virusgenomnachweis aus dem Blut bzw. aus Nasentupfern und dem Verlauf der Antikörpertiter eine Aussage zu treffen war, welche Tiere sich wann infiziert haben, ob, wann und in welcher Anzahl vor einem Abort Virusgenome im Blut nachzuweisen waren und ob durch die neue Methode ein Zusammenhang zwischen Virusbelastung und Abortwahrscheinlichkeit herzustellen war.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Organproben der abortierten Feten und der Plazenten der Mutterstuten mit der konventionellen EHV-1/4-PCR und der EHV-1- bzw. EHV-4-spezifischen *real-time* PCR stimmten in allen Fällen überein. Nur in einem Abortfall ergaben sich bei drei Organproben (Leber, Lunge und Milz) C_T -Werte, die als fraglich eingestuft wurden (38,20 bis 41,25), im Doppelansatz konnte nur mit einer Probe ein C_T -Wert erreicht werden und die Plazenta ergab keinen C_T -Wert.

Allerdings führt die erneute Manipulation von Organmaterialien (Auftauen – Einfrieren) immer zu deutlichen Verlusten, so dass in der Regel aus Materialien mit geringer Viruslast, die Wahrscheinlichkeit eines Genomnachweises nach Reextraktion sinkt. Wie erwartet lies sich weder in der weniger sensitiven, konventionellen EHV-1/4-PCR ein spezifisches Amplifikat darstellen, noch in der relativ unsensitiven Immunfluoreszenz Antigen nachweisen. Auch das pathologische Bild der Organe zeigte keine typischen Hinweise auf eine EHV-1-Infektion. Da hingegen bei allen anderen Abortfällen die C_T -Werte deutlich niedriger (zwischen 16,15 und 27,40) lagen und sowohl die Immunfluoreszenz als auch die konventionelle EHV-1/4-PCR positiv waren, blieb dieser Fall fraglich eingestuft. Die ermittelten C_T -Werte (39,70 und 38,39) entsprächen einer detektierten Virusmenge von 4,63 bzw. 6,97 Genomkopien pro μl . In diesem Bereich stößt auch die beschriebene *real-time* PCR an ihre Nachweisgrenze. Ohne den epidemiologischen Zusammenhang wäre dieser Fall als EHV-1 negativ gewertet worden. In diesem Zusammenhang aber stellt sich die Frage, wie viele möglicherweise eben doch EHV-1 induzierte Abortfälle in Folge einer geringen Viruslast und einer fehlenden Pathologie unentdeckt bleiben. Auch hier wird wieder deutlich, wie wenig über die Auswirkungen von EHV-1 Infektionen im Einzelfall des Zusammenspiels Individuum – Virusstamm bekannt ist. Ebenso stellt sich die Frage, welche Faktoren außer der massiven Infektions-bedingten Schädigung von Plazenta und/oder Fetus im Zusammenhang mit einer EHV-1-Infektion noch zum Abort führen könnten.

Bei keinem Abortfall lies sich zu den Probenentnahmedaten bei einer betroffenen Stute vor dem Abort EHV-1-DNS aus Blutleukozyten nachweisen. Allerdings erfolgte die erste Probenahme erst eine Woche nach dem zweiten Abortfall. Daher lässt sich in den beiden ersten Abortfällen sicher keine Aussage über einen vorherigen Nachweis von EHV-1-DNS

aus Blutleukozyten oder Nasentupfern machen. Die Inkubationszeit für den Virusabort wird in der Literatur mit zwei Wochen bis zu vier Monaten angegeben (VAN MAANEN, 2002).

Die Probenentnahme konnte nur im relativ großen Abstand von mehreren Wochen erfolgen, daher ist es möglich, dass sowohl der Zeitpunkt einer zeitlich begrenzte Virusausscheidung als auch der einer zeitlich begrenzte Virämie verpasst wurde. Allerdings wurden zu jedem Untersuchungsdatum alle Stuten beprobt, was das Gesamtfenster für einen Virusgenomnachweis eigentlich deutlich erweitern sollte. Daher kann angenommen werden, dass die eigentlichen Infektions- und Virusreplikationszeitpunkte für die betroffene Stutenpopulation vor Beginn der Probennahmen lagen. Diese Annahme wird nicht nur durch die fehlenden Virusgenomnachweise über die ganze Gruppe, sondern auch durch die Betrachtung der Antikörpertiter unterstützt.

Die Antikörpertiter aller untersuchten Stuten stiegen im Beobachtungszeitraum vom 01.02.06 bis 14.02.06 und vom 10.04.06 bis 24.04.06 nicht mehr als um das 2-fache an. Aussagekräftig ist allerdings erst ein mindestens 4-facher Titeranstieg innerhalb von zwei Wochen (VERTER et al., 1999; DOERR und BRAUN, 2002). Auch hier lagen von den ersten beiden Abortfällen keine Blutproben zur Untersuchung vor, so dass in allen Fällen ein vorangegangener Titeranstieg nicht ausgeschlossen werden kann. Virusneutralisierende Antikörper sind frühestens eine Woche nach der Infektion nachweisbar, erreichen nach zwei bis drei Wochen ihren Höhepunkt und sind bis zu fünf Monate lang nachweisbar (VAN MAANEN, 2002). Da eine Infektion der betroffenen Stuten vermutlich vor dem ersten Abort am 11.01.2006 stattgefunden hat, ist anzunehmen, dass ein Anstieg der Antikörpertiter schon vor der ersten Probenentnahme am 01.02.2006 stattgefunden hat und somit nicht erfasst werden konnte. Die absolute Höhe der Antikörper kann nur bedingt als Kriterium herangezogen werden, da alle Stuten des Gestüts gemäß den Angaben der Herstellerfirma mit einem Kombinationsimpfstoff gegen EHV-1 und -4 geimpft wurden und somit nicht zwischen Impfantikörpern und infektionsbedingten Antikörpern unterschieden werden kann. Zudem reagieren einzelne Pferde sehr individuell auf eine Impfung (LUDWIG et al., 1999). Allerdings ist bekannt, dass die allgemein verwendeten Vakzinen in der Regel nur sehr niedrige Titer an neutralisierenden Antikörpern induzieren. Einige der untersuchten Stuten weisen auch entsprechend niedrige Titer von 1:4 bis 1:16/32 auf. Hier kann diskutiert werden, dass diese Tiere wahrscheinlich keine akute EHV-1-Infektion in den vergangenen Monaten durchgemacht haben, während Titer über 1:128/256 durchaus als hoch einzustufen sind und indirekt die Schlussfolgerung erlauben, dass doch deutlich mehr Stuten des Gestüts, als nur die die abortiert hatten, aktuell von der EHV-1-Infektion betroffen waren. Im vorliegenden Fall konnte wie in früheren

Untersuchungen auch gezeigt werden, dass auch mit einer konsequenten Impfung des gesamten Bestandes individuelle Aborte nicht sicher verhindert werden können, es aber nicht mehr wie früher zu den gefürchteten Abortstürmen, die alle tragenden Stuten betrafen kommt (BÜRKI et al., 1990; VAN MAANEN, 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Untersuchung der Blut- und Nasentupferproben und der Bestimmung der Antikörpertiter zu den vier verschiedenen Zeitpunkten nicht genau geklärt werden konnte, welche Tiere sich wann infiziert haben. Auch einen EHV-1-induzierten Abort im Vorfeld anhand des Verlaufs der Antikörpertiter, der Virusausscheidung oder einer Virämie zu erkennen, war im vorliegenden Fall nicht möglich.

Es ist, wie bereits oben ausgeführt, in dem untersuchten Ausbruch wahrscheinlich, dass für die ganze Gruppe betrachtet die akute EHV-1 Infektion bereits Wochen vor dem ersten Abort stattgefunden hat. Über die Untersuchung der Virusisolate und einem Vergleich der RFLP konnte ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen den verschiedenen Aborten hergestellt werden und eine individuelle Reaktivierung latenten Virus mit individueller Abortfolge weitgehend ausgeschlossen werden. Es muss sich also um den Eintrag eines Virus gehandelt haben. Auch andere Studien haben gezeigt, die allerdings weniger sensitive Methoden verwendeten, dass selbst bei regelmäßiger Probennahme über einen deutlich längeren Zeitraum keine sichere Aussage über einen bevorstehenden Abort getroffen werden kann. Sowohl die Virusausscheidung, als auch die Antikörpertiteranstiege vor und nach einem Abort sind individuell sehr unterschiedlich (LUDWIG et al., 1999).

6. Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

Die Equiden Herpesviren 1 und 4 (EHV-1 und -4) sind weltweit verbreitete Infektionserreger und wichtige Ursache für Aborte, Rhinopneumonien und Myeloencephalopathien bei Pferden. Eine sichere und schnelle virologische Diagnose ist bei einer EHV-1- oder EHV-4-Infektion die Grundlage für eine erfolgreiche Bekämpfung und entsprechende Hygiene- bzw. Quarantänemaßnahmen.

Ziel dieser Arbeit war es daher eine quantitative Multiplex *real-time* PCR zur Detektion und Differenzierung von EHV-1 und -4 zu etablieren. Für die Detektion von EHV-1 waren bereits verschiedene *real-time* PCR Protokolle in der Literatur beschrieben und in Folge einer Zusammenarbeit mit Dr. Nikolaus Osterrieder, Cornell, wurden sowohl die Primer- und SONDENSEQUENZEN für die EHV-1-Glykoprotein gD spezifische *real-time* PCR als auch die für die Detektion des Kontrollgens, des equinen β 2m-Gens, übernommen. Für den Nachweis von EHV-4 wurde entsprechend das gD-Gen als Zielgen ausgewählt. In einer ersten Serie von Experimenten wurden alle drei PCR-Reaktionen separat optimiert.

Zur initialen Validierung der EHV-1- und EHV-4-spezifischen *real-time* PCR dienten fünf in Zellkultur angezüchtete EHV-1-Isolate und ein EHV-4-Isolat, 110 Organproben, 100 Nasentupferproben und 46 Blutproben. Zur absoluten Quantifizierung der Virusgenome wurden Verdünnungsreihen der DNS des als BAC klonierten RacL11, pRac L11 und der viralen DNS des EHV-4-Isolates verwendet.

Die Ergebnisse der neu etablierten *real-time* PCR wurden kontinuierlich mit den Ergebnissen einer gut validierten, konventionellen EHV-1/-4 PCR verglichen.

Das verwendete EHV-4-Isolat zeigte nur in der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR, alle EHV-1-Isolate nur in der EHV-1 spezifischen PCR positive C_T -Werte. Alle Proben, bei denen in der konventionellen EHV-1/4 PCR spezifische Amplifikate nachgewiesen wurden, reagierten entweder in der EHV-1-spezifischen oder in der EHV-4-spezifischen *real-time* PCR.

Unspezifische Reaktionen mit in Probenmaterial potentiell vorkommenden Bakterienstämmen wurden in weiteren Experimenten ausgeschlossen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die EHV-1- und -4-spezifische Multiplex *real-time* PCR sensitiv und spezifisch ist und für eine gleichzeitige Detektion und Differenzierung von EHV-1 und -4 in verschiedenen Ausgangsmaterialien geeignet ist.

Zusätzlich ist in Kombination mit der β 2m-spezifischen *real-time* PCR eine absolute Quantifizierung der Virusgenome relativ zur Pferdegenom-Kopienanzahl möglich. Die C_T -Werte der Duplex- und der Triplex-Reaktionen stimmten gut mit denen der Singleplex-Reaktionen überein und es konnte kein relevanter Sensitivitätsverlust festgestellt werden.

In weiteren Experimenten sollte die neue Methode genutzt werden, um anhand aktueller Fälle neue Informationen über den Verlauf eines Abortausbruches in einem Bestand zu sammeln. Es zeigte sich, dass zu den gewählten Probenentnahmedaten, die zum Teil zwischen den einzelnen Aborten lagen, keine EHV-1-DNS aus EDTA-Blutproben oder Nasentupfern in der *real-time* PCR nachgewiesen werden konnte und auch kein bemerkenswerter Antikörpertiteranstieg mittels Serumneutralisationstest nachzuweisen war. Diese Daten unterstützen die Theorie, dass direkt vor einem Abort keine längere Virämie vorausgehen muss und die Wahrscheinlichkeit eines Abortes zum einem früh im Infektionsgeschehen eines Bestandes zum anderen durch noch nicht genau bekannte individuelle Faktoren der einzelnen Stuten determiniert wird.

Development of a multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 and 4

Summary

Equid Herpesvirus 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) are endemic in horses worldwide and cause for important diseases such as, rhinopneumonitis, abortion and myeloencephalopathy.

A safe and fast etiological diagnosis after an infection with EHV-1 or EHV-4 is essential for the prevention of further spread by adequate hygiene- and quarantine measures.

The aim of this study was therefore to develop a quantitative multiplex real-time PCR assay detect and differentiate EHV-1 and EHV-4. Several EHV-1 specific real-time PCR protocols had already been reported and in cooperation with Dr. Nikolaus Osterrieder, Cornell, primers and probes specific for the EHV-1-glycoprotein gD gene on the one hand and for the equine β 2m-gene on the other hand were transferred. To detect EHV-4, sequences of the gD-gene were chosen as target, accordingly. In a first series of experiments all three PCR assays were optimized separately.

To initially validate the EHV-1- and the EHV-4-specific real-time PCR assays five cell culture derived EHV-1-isolates and one EHV-4-isolate, 110 tissue samples, 100 nasal swabs and 46 blood samples were used. Dilutions of purified DNS from pRaCL11, a bacterial

artificial chromosome containing the genome of RacL11, and purified viral DNS of the EHV-4-isolate were employed for the absolute quantification of genome copies.

Results obtained with the new real-time PCR protocol were continuously compared to those of a thoroughly validated conventional EHV-1/-4 PCR.

The EHV-4 isolate reacted in the EHV-4 specific real time PCR only, whereas all EHV-1-isolates were specifically detected in the EHV-1 specific assay. All samples that had been classified as EHV-1/4 positive by conventional PCR reacted either EHV-1-specific or EHV-4-specific by real-time PCR. Unspecific amplification of several bacterial strains was excluded in further experiments.

Taken together, it could be shown in this study that the EHV-1- and EHV-4-specific multiplex real-time PCR was sensitive and specific and is suitable for the simultaneous detection and differentiation of EHV-1 and -4 in different kinds of samples. In combination with the β 2m-specific real-time PCR an absolute quantification of virus genomes in relation to the horse genome copy number became possible. There was a good agreement between the C_T -values of singleplex, duplex,- and triplex-reactions and the sensitivity remained comparable.

In another series of experiments the new method was used to gather information about the course of an outbreak of EHV-1 induced abortion in a breeding farm. At least at the time points of sampling, which was in part done in between individual abortions, EHV-1-DNS was neither detectable in EDTA-blood nor in nasal swabs by real-time PCR. In addition, no changes in antibody titers were registered by serum neutralization test. This data supports the theory that abortion is not necessarily directly preceded by viremia and that the individual risk of abortion is determined on the one hand early in an outbreak situation and on the other hand by as yet widely unknown factors specific to the individual mare.

7. Literaturverzeichnis

Allen G.P., Bryans J.T. (1986): Molecular Epizootology, Pathogenesis and Prophylaxis of Equine Herpesvirus-1 Infection. *Progresses in Veterinary Microbiology and Immunology*, Vol. 2. 78-144.

Allen G.P., Kydd J.H., Slater J.D., Smith K.C. (1999): Advances in Understanding of the Pathogenesis, Epidemiology and Immunological Control of Equine Herpesvirus Abortion. In: *Equine Infectious Diseases VIII, Proceedings of the Eighth International Conference, Dubai 1998*, R&W Publications (Newmarket) Limited.

Allen G.P. (2002): Respiratory infections by equine herpesvirus types 1 and 4. In: *Equine Respiratory Diseases*, Hrsg. P.Lekeux, International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA.

Bürki F., Nowotny N., Hinaidy B., Pallan C. (1984): Die Ätiologie der Lipizzanerseuche in Piber 1983: Equines Herpesvirus 1. *Wiener Tierärztl. Mschr.* 71, 312-320.

Bürki F., Rossmanith W., Nowotny N., Pallan C., Möstl. K., Lussy H. (1990): Viraemia and abortions are not prevented by two commercial Equine Herpesvirus-1 vaccines after experimental challenge of horses. *Vet. Quarterly* 12, 80-86.

Brunner R., Neubauer A., Eichhorn W. (1998): Equine Herpesvirus-Infektionen. *Tierärztl. Umschau* 12, 708-712.

Bustin S. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169-193.

Bustin S. (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 23-39

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

Cardullo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C., Wolf D.E. (1988): Detection of nucleic acid hybridisation by nonradioactive fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8790-8794.

Crabb B.S., Mac Pherson 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* (1995) 140: 245-258.

Csellner H., Walker C., Wellington J.E., McLure L.E., Love D.N., Whalley J.M. (2000): EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch Virol* (2000) 145: 2371-2385.

Del Piero F., Wilkins P.A. (2001): Pulmonary Vasculotropic EHV-1 Infection in Equids. *Vet. Pathol.* 38: 474.

Diallo I.S., Hewitson G., Wright L., Rodwell B.J., Corney B.G. (2005): Detection of equine herpesvirus type 1 using a real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virol. Methods* 131, 92-98.

Diallo I.S., Hewitson G., Wright L., Kelly M.A., Rodwell B.J., Corney B.G. (2007): Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Veterinary Microbiology* 123 (2007) 93-103.

Doerr H.W., Braun R.W. (2002): Virologische Labordiagnostik. In: *Medizinische Virologie*, Thieme-Verlag, Doerr H.W., Gerlich W.H. (Hrsg.), 71-92.

Edington N., Bridges C.G., Huckle A. (1985): Experimental reactivation of equid herpesvirus (EHV-1) following the administrations of corticosteroids. *Equine Vet. J.* 17, 369-372.

Edington N., Bridges C.G., Patel J.R. (1986): Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch. Virol.* 1986; 90 (1-2): 111-24.

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: 379-387.

Elia G., Decaro N., Martella V., Campolo M., Desario C., Lorusso E., Cirone F., Buonavoglia C. (2005): Detection of equine herpesvirus type 1 by real time PCR. *Journal of Virological Methods* 133 (1): 70-75.

Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (eds) (2005): *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Eighth Report of the International Comitee on the Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York.

Förster V. Th. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Anal. of Physics (Leipzig)* 2, 55-75.

Frank C. (1989): Equine herpesvirus outbreaks. *Vet. Rec.* 29, 471.

Frey R., Lieb A. (1990): Enzootic viral abortion on a stud farm in east Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 132 (7): 385-91.

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: 199-214.

Gibson J.S., Slater J.D., Awan A.R., Field H.J. (1992): Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch Virol.* 123 (3-4): 351-66.

Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M. (1996): A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*; 6: 995-1001.

Gilkerson J., Jorm L.R., Love D.N., Lawrence G.L., Whalley J.M. (1994): Epidemiological investigation of equid herpesvirus-4 (EHV-4) excretion assessed by nasal swabs taken from thoroughbred foals. *Vet. Microb.* 39, 275-283.

Goodman L. B., Wagner B., Flaminio M.J.B.F., Sussman K.H., Metzger S.M., Holland R., Osterrieder N. (2006): Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified-live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Vaccine* (2006) 24, 3636-3645.

Goodman L. B., Loregian A., Perkins G.A., Nugent J., Buckles E.L., Mercorelli B., Kydd J.H., Palu G., Smith K.C., Osterrieder N., Davis-Poynter N. (2007): A point mutation in a herpesvirus polymerase determines neuropathogenicity. *PLoS Pathog.* 2007 Nov; 3 (11): e160.

Hardt M., Teifke J.P., Weiss E. (1992): Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von DNA der Equinen Herpesviren 1 und 4. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift*; 105: 52-55.

Hardt M. (1994): Die Polymerasekettenreaktion (PCR) und in-situ-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis des equinen Herpesvirus 1 und 4. *Diss. Med. Vet. Gießen*

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6, 986-994.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10, 413-7.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11, 1026-30.

Hussey S.B., Clark R., Lunn K.F., Breathnach C., Soboll G., Whalley J.M., Lunn D.P. (2006): Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viraemia and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol 18, Issue 4, 335-342.

Kaaden O.R., Osterrieder N., Eichhorn W. (1993): Möglichkeiten und Grenzen der ätiologischen Differenzierung der equinen Herpesvirusinfektionen. *Prakt. Tierarzt* 75, 25-26.

- Kohn C.W., Fenner W.R. (1987): Equine herpes myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 3. 405-419.
- Kostrikis L.G., Tyagi S., Mhlanga M.M., Ho D.D., Kramer F.R. (1998): Molecular Beacons: Spectral Genotyping of Human Alleles. *Science*, Vol. 279, 5354: 1228-1229.
- Kumar S., Reed M.W.; Gamper H.B. JR, Gorn V.V., Lukhtanov E.A., Foti M., West J., Meyer R.B.JR, Schweitzer B.I. (1998): Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res*, 26, 831-8.
- Kydd J.H., Smith K.C., Hannant D., Livesay G.J., Mumford J.A. (1994): Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in respiratory tract associated lymphoid tissue: implications for cellular immunity. *Equine Vet J.* 26 (6): 470-3.
- Lie Y.S., Petropoulos C.J. (1998): Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr Opin Biotechnol*, 9, 43-8.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ Method. *Elsevier Science, Methods* 25, 402-408.
- Ludwig H., Borchers K., Glatzel P., Lange A., Schroer U. (1999): Die Bedeutung der Infektion mit dem equinen Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) in einem deutschen Vollblutgestüt: Impfung, Abortgeschehen und Diagnostik.“ *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 113, 53-59.
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. (2002): Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 30, 1292-305.
- Matsumura, T., Sugiura T., Imagawa H., Fukunaga Y., Kamada M. (1992): Epizootiological aspects of type 1 and type 4 equine herpesvirus infections among horse populations. *J Vet Science*, 54, 207-211.
- McCartan C.G., Russell M.M., Wood J.L., Mumford J.A. (1995) : Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm. *Vet. Rec.* 136, 7-12-

- Mumford J.A., Rosedale P.D., Jesset D.M., Gann S.J., Oussey J., Cook R.F. (1987): Serological and virological investigation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, 730-731.
- Nasaradabi S., Milanovich F., Richards J., Belgrader P. (1999): Simultaneous detection of TaqMan probes containing FAM and TAMRA reporter fluorophores. *Bio Techniques*, 27, 1116-1117.
- Osterrieder N., Hübert P.H., Eichhorn W. (1994): A touchdown PCR for the differentiation of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) field strains from the modified live vaccine strain RacH. *J. Virol. Methods*, 50, 129-136.
- Osterrieder N., Eichhorn W., Kaaden O.-R., Baines J.D. (1995): Vergleich verschiedener Nachweismethoden für die Equinen Herpesviren vom Typ 1 und Typ 4 (EHV-1 und EHV-4). *Tierärztl. Umschau* 50, 447-449.
- Osterrieder N. (1999): Construction and Characterization of an Equine Herpesvirus 1 Glykoprotein C Negative Mutant. *Virus Res.* 59, 165-177.
- Patel J.R., Edington N., Mumford J.A. (1992): Variation in cellular tropism between isolates of equine herpesvirus-1 in foals. *Arch. Virol.* 74, 41-51.
- Pusterla N., Leutenegger C.M., Wilson W.D., Watson J.L., Ferraro G.L., Madigan J.E. (2005): Equine herpesvirus-4 kinetics in peripheral blood leukocytes and nasopharyngeal secretions in foals using quantitative real-time TaqMan PCR. *J. Vet. Diagn. Inv.* 17 (6): 578-581.
- Roizmann B., Knipe D.M. (2001): Herpesviridae. In: Fields B.M., Knipe D.M., Howley P.M. (ed) *Fields Virology*, Vol 24th edn., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp 2381-2398.
- Schmidt P., Meyer H., Hübert P., Hafner A., Andiel E., Grabnerand A., Dahme E. (1994): In situ hybridization for demonstration of equine herpesvirus type 1 DNA in paraffin wax-embedded tissues and its use in horses with disseminated necrotizing myeloencephalitis. *Journal Comp. Pathol.* 110, 215-225.

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

Schutten M., Niesters H.G., (2001): Clinical utility of viral quantification as a tool for disease monitoring. *Expert Rev Mol Diagn*, 1, 153-162.

Selvin P.R., Hearst J.E. (1994): Luminescence energy transfer using a terbium chelate: Improvements on fluorescent energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10024-10028.

Sinclair R., Mumford J.A. (1992): Rapid detection of equine herpesvirus type-1 antigens in nasal swabs specimens using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods* 1992 Sep; 39 (3): 299-310.

Slater J.D., Gibson J.S., Barnett K.C. (1992): Chorioretinopathy associated with neuropathology following infection with equine herpesvirus-1. *Vet. Rec.* 131, 237-239.

Slater J.D., Borchers K., Thackray A.M., Field H.J. (1994): The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J. General Virol.* 75, 2007-2016.

Smith K.C., Whitwell K.E., Binns M.M., Dolby C.A., Hannant D., Mumford J.A. (1992): Abortion of virologically negative foetuses following experimental challenge of pregnant pony mares with equid herpesvirus 1. *Equine Veterinary Journal*; 24: 256-259.

Stiersdorfer B., Eichhorn W., Brandmüller C., Kaaden O.-R., Neubauer A. (2002): Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) Myeloencephalopathy: a Case Report. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, Vol. 49, 37-42.

Sutton G.A., Viel L., Carman P.S., Boag B.L. (1998): Pathogenesis and clinical signs of equine herpesvirus-1 in experimentally infected ponies in vivo. *Can J Ver Res.* 62 (1): 49-55.

Tallmadge R.L., Antczak D.F., Lear T.L., Johnson A.K., Carpenter S.L., Guerin G., Millon L.V. (2002): Characterization of the β_2 -microglobulin gene of the horse. *Immunogenetics* 54: 725-733.

Telford E.A., Watson M.S., Perry J., Cullinane A.A., Davidson A.J. (1998): The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *J. Gen. Virol.*, 79 : 1197-1203.

Tyagi S., Kramer F.R. (1996): Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, 14, 303-8.

Vandesompele J., de Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., de Paepe A., Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3, Research 0034.

Van Maanen C., Vreeswijk J., Moonen P., Brinkhof J., de Boer-Luijte E., Terpstra C. (2000): Differentiation and genomic and antigenic variation among fetal, respiratory and neurological isolates from EHV-1 and EHV-4 infections in the netherlands. *Veterinary Quarterly* 2000; 22: 88-93.

Van Maanen C., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M., Damen E.A., Derksen A.G. (2001): Neurological disease associated with EHV-1-infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Vet. J.* 33, 191-196.

Van Maanen C. (2002): Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet. Q.*; 24 (2): 58-78.

Verter W., Hamann J., Mayr A. (1999): Rhinopneumonitis. In: *Handbuch Pferdepraxis*, Dietz, Huskamp, Enke-Verlag, 353-356.

Walker N.J. (2002): A technique whose time has come. *Science*, 296, 557-9.

Wilson W.D. (1997): Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *Vet. Clin. North Am. Pract.* 13, 53-72.

Wolfinger U. (1998): Verbreitung und Bedeutung von Infektionen mit equinem Herpesvirus vom Typ 1,2 und 4 beim Pferd. Dissertation Berlin 1998.

Ziegler C., Just F.T., Lischewski A., Elbers K., Neubauer A. (2005): A glycoprotein M-deleted equid herpesvirus 4 is severely impaired in virus egress and cell-to-cell spread. J. Gen. Virol. 2005 Jan.; 86 (Pt 1): 11-21.

8. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata al.
alii	(Latein: andere)
BAC	“bacterial artificial chromosome”
BHQ2	black hole quencher 2
β2m	Beta2-Mikroglobulin
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
C _T	Schwellenwertzyklus (threshold cycle)
Cy5	Carbocyanin 5
d.h.	das heißt
DNA	(deoxyribonucleic-acid, Desoxyribonukleinsäure)
DNAse	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
Edmin 337	equine Hautzelllinie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
EHV-1	Equides Herpesvirus 1
EHV-4	Equides Herpesvirus 4
et. al.	und andere Autoren
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FAM	6-carboxy-Fluorescein
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g(p)	Glykoprotein
h	Stunde
HEX	Hexachloro-6-carboxy-Fluorescein
IAC	Isoamylalkohol-Chloroform-Gemisch

IF	Immunfluoreszenz
kbp	Kilo Basenpaar
l	Liter
log	Logarithmus
m	milli-
μ	Mikro
M	Mol
MGB	minor-groove-binder
min	Minute
nm	Nanometer
NTC	No template controll
PbE	Plaque-bildende Einheiten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Potentia hydrogenium
Rk 13	Rabbit Kidney-Zelllinie
RNA	ribonucleic-acid, Ribonukleinsäure
ROX	6-carboxy-X-Rhodamin
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s.	siehe
s	Sekunde
STV	Saline-Trypsin-Versene-Lösung
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
z.B.	zum Beispiel
zpE	zytopathischer Effekt
z.T.	zum Teil

Danksagung

Frau PD Dr. Antonie Neubauer-Juric danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die effektive Unterstützung und die wissenschaftliche Anleitung während der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Gestüt Ammerland danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeiten zur Probenentnahme.

Bei allen Kollegen des Instituts bedanke ich mich für die stets freundliche Unterstützung bei labortechnischen Fragen und die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen Werdegang ermöglicht haben und mich stets unterstützt haben, meiner Schwester Julia und ihrem Mann Ben und meiner Frau Felicia für ihre unermüdliche Hilfe.