

DVG-Konsiliarlabor für Equine Herpesviren

Aufgaben und diagnostisches Portfolio

Klaus Osterrieder, Jakob Trimpert

Das Institut für Virologie der Freien Universität (FU) Berlin ist seit seiner Ernennung durch die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) am 01.02.2016 Konsiliarlabor für Equine Herpesviren. Hier ein Überblick über die Aufgaben und das diagnostische Portfolio des Labors.

Equine Herpesviren

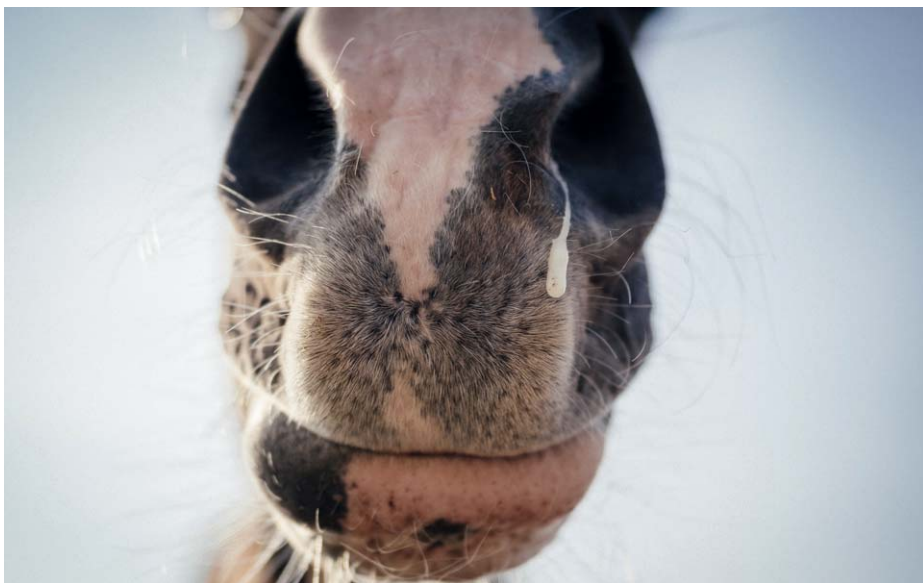
Die aktuelle Taxonomie fasst Herpesviren in einer neuen Ordnung, den Herpesvirales, zusammen, die in drei Familien unterteilt ist: *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae* und *Malacoh herpesviridae*. Die Familie *Herpesviridae*, die Säugetier-, Vogel- und Reptilienviren repräsentiert, besteht aus drei Unterfamilien: *Alpha-*, *Beta-* und *Gammaherpesvirinae*.

Bei Equiden wurden bisher neun Herpesviren identifiziert, von denen EHV-1 (Pferdeabortvirus), EHV-3 (Koital-Exanthem-Virus), EHV-4 (Rhino-pneumonitis-Virus), EHV-6 (Asinines Herpesvirus 1), EHV-8 (Asinines Herpesvirus 3) und EHV-9 (Gazelle-Herpesvirus 1) zum Genus *Varicellovirus* der Unterfamilie *Alphaherpesvirinae* gehören. Die anderen drei Viren, EHV-2, EHV-5 und EHV-7 (Asinines Herpesvirus 2), gehören zur Unterfamilie der *Gammaherpesvirinae*.

Das Pferd bzw. der Esel sind die definitiven Wirte aller equinen Herpesviren, mit Ausnahme des EHV-9, das ein neurotropes Virus ist und ursprünglich aus Gazellen isoliert wurde.

EHV-1 und EHV-4 sind wohl die relevantesten Herpesviren, die Equiden befallen, und wurden bis 1981 als Subtypen ein und derselben Virusart betrachtet. Wie alle Herpesviren besitzen sie ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom. Obwohl beide Viren einen hohen Grad an genetischer und damit antigenetischer Ähnlichkeit aufweisen, unterscheiden sie sich auffallend in ihrer Pathogenese. Während sich die EHV-4-Infektion in der Regel hauptsächlich auf die oberen Atemwege beschränkt, ist EHV-1 ein sich systemisch ausbreitendes Virus, das mehrere Organsysteme befällt und verschiedene Krankheitsbilder verursacht. Diese reichen von einer leichten Rhinopneumonitis bis hin zu Abort und tödlicher Myeloenzephalopathie.

Sowohl EHV-1 als auch EHV-4 haben erhebliche wirtschaftliche Auswirkungen auf die Pferdeindustrie. Trotz der weit verbreiteten Impfung verursachen die beiden Viren immer noch erhebliche Probleme. In den letzten Jahren wurden Anstrengungen unternommen, um



Nasenausfluss kann ein Indiz für eine EHV-Infektion beim Pferd sein.

die Mechanismen, die die Persistenz und die unterschiedliche Pathogenität der beiden Viren erklären könnten, umfassender zu verstehen und rationell Impfstoffe zu entwickeln.

Epidemiologie und Diagnose von EHV-1 und EHV-4

EHV-1 und EHV-4 sind ubiquitäre Erreger in Pferdepopulationen weltweit. Die wichtigste Aufgabe des Konsiliarlabors ist daher auch die Diagnose der Infektion, was nicht immer einfach ist, da Herpesviren eine vermutlich lebenslang andauernde Infektion setzen. Diese ist meist nicht produktiv, es kommt aber immer wieder zu Reaktivierungen, die dann die bekannten klinischen Bilder verursachen können.

Problematisch bei der serologischen Untersuchung auf diese beiden eng verwandten, aber unterschiedlichen Viren ist die umfangreiche antigene Kreuzreaktivität und das weitgehende Fehlen typspezifischer Antikörper. Serologische Erhebungen aus verschiedenen Ländern haben aber übereinstimmend gezeigt, dass EHV-4 eine signifikant höhere Prävalenz als EHV-1 zu haben scheint, was teilweise durch die Feststellung erklärt werden könnte, dass eine EHV-4-Infektion das ganze Jahr über auftreten kann, eine EHV-1-Infektion jedoch hauptsächlich in der Wintersaison (Trächtigkeit) auftritt. Dabei scheinen Stuten- und Fohlenpopulationen ein Reservoir für beide Viren zu sein und beide Viren, aber v. a. EHV-4, können

nach dem Absetzen und im Alter von nur 30 Tagen übertragen werden.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von PCR¹-basierten Verfahren zur Diagnose und Unterscheidung von EHV-1- und EHV-4-Infektionen aus verschiedenen klinischen Proben entwickelt. Es ist bekannt, dass EHV-1 und EHV-4 v. a. durch direkten Kontakt und Aerosole oder durch große Virusmengen übertragen werden, die in abortierten Föten und der Plazenta vorhanden sind. Das mögliche Risiko einer horizontalen Übertragung von EHV-1 und EHV-4 über das Sperma und den Einfluss auf die Hengstfruchtbarkeit wurde mithilfe von PCR-Verfahren untersucht. Es konnte etwa ab Tag 20 nach Infektion bei natürlich infizierten Hengsten eine EHV-1-Ausscheidung im Sperma nachgewiesen werden, die offenbar nicht direkt mit den Spermien assoziiert ist. Es muss betont werden, dass in keiner dieser Studien ein infektiöses Virus im Sperma nachgewiesen werden konnte, weshalb noch unklar ist, ob das Virus tatsächlich auf dem venerischen Weg verbreitet werden kann.

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass das Wirtsspektrum von EHV-1 im Gegensatz zu EHV-4 weit über Pferde hinausgeht. Es wurde berichtet, dass Nicht-Equiden, darunter Lamas (*Lama glama*), Alpakas (*Vicugna pacos*), Schwarzböcke (*Antelopa cervicapra*) und Thomson-Gazellen (*Eudorcas thomsoni*), gelegentlich

¹ polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion

mit EHV-1 oder EHV-1-verwandten Viren infiziert werden können. Kürzlich wurden neurotropische EHV-1-Stämme aus Schwarzbären (*Ursus americanus*), Thomson-Gazellen und Meerschweinchen (*Cavia porcellus f. dom.*) isoliert, die an schweren neurologischen Störungen litten. Darüber hinaus wurde eine rekombinante Variante zwischen EHV-1 und dem neuesten Pferde-Herpesvirus und nahen Verwandten von EHV-1, EHV-9, als tödliche Erreger bei Eisbären in deutschen Zoos gefunden. Das Virus scheint seinen Ursprung in Zebras gehabt zu haben, aber es ist derzeit unklar, ob die Rekombination bei Zebras in Gefangenschaft oder bei Wildzebras in natürlichen Lebensräumen vor der Einfuhr erfolgte. Die Rekombination führte zu einem für Eisbären tödlichen Erreger, während Zebras asymptomatisch bleiben und wahrscheinlich das Virus als definitiver Wirt tragen. Es ist noch unklar, ob die EHV-1/EHV-9-Rekombination ein einmaliges Ereignis ist oder häufiger auftritt. Eindeutig ist aber, dass von Zebras kommendes EHV-1 in Zoos weit verbreitet ist und seine möglichen Auswirkungen auf Nicht-Equiden und besonders gefährdete Tierarten in Betracht gezogen werden muss.

Bei Pferden können sowohl EHV-1 als auch EHV-4 nach einer Primärinfektion eine lebenslange Latenz etablieren und für die Immunantwort und damit die Eliminierung im Wirt sozusagen unsichtbar werden. Einige Studien zeigten, dass die Latenz v. a. in lymphatischen Geweben und zirkulierenden Lymphozyten etabliert und aufrechterhalten wird, während andere Studien die Latenz v. a. in den Trigeminalganglien etabliert sehen. Unabhängig von der biologisch relevanten Stelle der Latenz kann reaktiviertes Virus auf andere Pferde übertragen werden und klinische Erkrankungen und Virusausscheidung verursachen. Die Etablierung, Aufrechterhaltung und Reaktivierung aus der Latenz sind nicht nur für den Lebenszyklus des Virus von großer Bedeutung, sondern auch für die Epidemiologie von EHV-1 und EHV-4. Sie ist jedoch schwierig zu untersuchen und ein Großteil unseres Verständnisses beruht auf Vergleichen mit verwandten Viren.

Für den Nachweis Equiner Herpesviren bieten sich folgende Testverfahren an:

- quantitative PCR (qPCR) für die Equinen Herpesviren Typ 1 bis 5 und 9
- Gel-basierte PCR
- Serologie für die Equinen Herpesviren Typ 1 bis 5 und 9 basierend auf ELISA², Serumneutralisationstest und Western Blot
- Virusanzucht in den unterschiedlichsten Zellkultursystemen

Das Institut: Lehre, Forschung, Diagnostik und Beratung

Die Aufgaben des Instituts für Virologie an der FU Berlin sind neben der Lehre auch Forschung

² Enzyme-linked Immunosorbent Assay

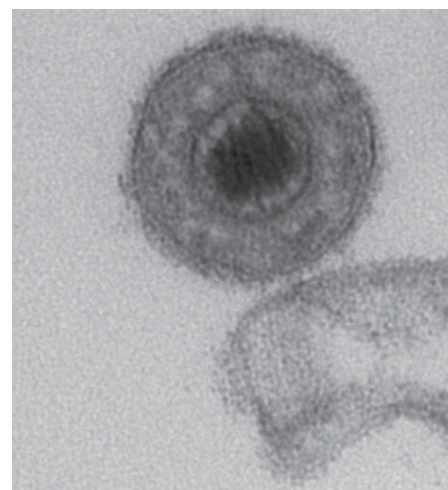
und Dienstleistung. In der **Forschung** werden in vier Arbeitsgruppen die molekularen und zellulären Grundlagen von tierischen und menschlichen Viruserkrankungen erforscht und neue Behandlungs- bzw. Prophylaxe gegen Virusinfektionen entwickelt. Thematische Schwerpunkte sind Herpesviren (Equine Herpesviren, Marek's Disease Virus, Varizella-zoster-Virus, Humanes Herpesvirus 6 – Arbeitsgruppen Osterrieder und Käufer), Corona- und Arteriviren (Arbeitsgruppen Trimpert, Veit und Osterrieder), Influenzaviren (Arbeitsgruppen Veit und Osterrieder) sowie Orthopockenviren (Arbeitsgruppe Osterrieder). Kooperationspartner des Instituts sind zahlreiche Laboratorien und Arbeitsgruppen in Deutschland und weltweit, v. a. in Europa, Asien (Kirgistan, China, Japan, Mongolei), Australien sowie in Nord- und Südamerika (USA, Kanada, Brasilien, Argentinien).

Im breiten Portfolio **diagnostischer Dienstleistung** liegt der Fokus des Instituts auf dem Nachweis von Virusinfektionen bei Pferden. Die ausgewiesene Expertise in dieser Diagnostik wird durch den von der Welt-Tiergesundheitsorganisation (Office International des Épizooties, OIE) im Jahre 2010 zuerkannten Status eines OIE-Referenzlabors für Equine Influenzaviren und Equine Herpesviren untermauert. Darüber hinaus wird für Zoologische Gärten und Zirkusse ein Nachweis der verschiedenen Elephantiden Endotheliotropen Herpesviren (EEHV) angeboten. Und vor Kurzem ist die Diagnose des neuen SARS-Coronavirus-2 bei Haus- und Heimtieren sowohl virologisch (qPCR und Virusanzucht) als auch serologisch (Serumneutralisationstest und ELISA) etabliert worden.

Das Institut für Virologie der FU Berlin bearbeitet pro Jahr insgesamt etwa 1000 Proben mit steigender Tendenz. Davon sind ca. 250 Proben von Tierärzten eingesandt mit dem Auftrag, EHV-Nachweise per Serologie oder qPCR durchzuführen. Darüber hinaus werden Gestüte exklusiv betreut. Proben aus diesen direkten und jahrelang etablierten Kooperationen bzw. aus Drittmittel-(Industrie-)geförderten Projekten werden nicht zur Routinediagnostik gezählt. Gleiches gilt für Kontrolluntersuchungen bei der Überwachung von Impftätigkeiten und Projekten bzw. Studien, die in Zusammenarbeit mit Tierärzten, anderen wissenschaftlichen Instituten und Pharmaunternehmen durchgeführt werden. Außerdem wird in Kooperation mit der Firma Boehringer seit mehreren Jahren eine Aktion mit Gutscheinen zur Diagnostik angeboten: Tierärzte können kostenlos Nasentupfer einschicken, die auf EHV und Influenza untersucht werden.

Etwa zwei Drittel des gesamten Probenaufkommens werden mittels qPCR getestet. Darunter fallen Blutproben, Tupferproben, Gewebeproben (Organe aus Aborten) und DNA-Proben von externen Laboratorien, für die eine Befundbestätigung bzw. -kontrolle durchgeführt wird.

Basierend auf den eigenen diagnostischen Untersuchungen werden die Einsender (Tier-



© Klaus Osterrieder

Elektronenmikroskopische Aufnahme von EHV-1.

ärzte) und Tierhalter beraten und Befundinterpretationen sowie Impf- bzw. Therapieempfehlungen gegeben.

In der **Qualitätssicherung** folgt unser Diagnostiklabor eigens für jeden Test und Erreger entwickelten „Standard Operating Procedures (SOP)“, die sich an die Testverfahren des Terrestrial Codes der OIE³ (Band 2, Kapitel 12) anlehnen. Die Validierung unserer Testsysteme erfolgt über regelmäßig getestete Standards, wobei die Validierung der qPCR-Nachweissysteme über klonierte Virusgenome mit definierten DNA-Mengen erfolgt. In der Serologie geschieht dies unter Nutzung laborinterner und über die Jahre gesammelter Referenzseren, für die entsprechende Titer in mehreren Testsystemen ermittelt wurden.

Wir führen regelmäßig Ringtests in der EHV-1- und EHV-4-Serologie mit verschiedenen nationalen und internationalen Laboratorien durch. In den Ringtests werden standardisierte Serumproben von Pferden an teilnehmende Laboratorien verschickt und die Testergebnisse verglichen. Teilnehmende Labore erhalten ihre Ergebnisse, eine Bewertung und eine Teilnahmebescheinigung.

³ <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-code/>

Anschrift der Autoren

Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder



Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Virologie, Robert von Ostertag-Str. 7–13, 14163 Berlin, no.34@fu-berlin.de

Dr. Jakob Trimpert



Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Virologie (s. o.), jakob.trimpert@fu-berlin.de