

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Virologie  
(Leiter: Univ. Prof. Dr.vet.med. Till Rumenapf)

# **Entwicklung einer Duplex-RT-qPCR zur Diagnostik von RHDV-1 und RHDV-2**

**Diplomarbeit**

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Mayra Wozniak

Wien, im Februar 2022

Wissenschaftliche Betreuung:

Univ. Prof. Dr.vet.med. Till Rümenapf  
Institut für Virologie  
Department für Pathobiologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

Mit freundlicher Unterstützung von:

Dr.med.vet. Angelika Auer  
Institut für Virologie  
Department für Pathobiologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter:

Dr.med.vet. Priv.-Doz. Michael Leschnik  
Klinische Abteilung für Interne Medizin Kleintiere  
Department für Kleintiere und Pferde  
Veterinärmedizinische Universität Wien

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.</b>	<b>GESCHICHTE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.</b>	<b>DAS VIRUS</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3.</b>	<b>EPIDEMIOLOGIE</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4.</b>	<b>KLINISCHE SYMPTOME UND VERLAUFSFORMEN:</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4.1.</b>	<i>Perakute Form:</i> .....	<b>7</b>
<b>1.4.2.</b>	<i>Akute Form:</i> .....	<b>7</b>
<b>1.4.3.</b>	<i>Subakute Form:</i> .....	<b>7</b>
<b>1.4.4.</b>	<i>Asymptomatische Form:</i> .....	<b>8</b>
<b>1.4.5.</b>	<i>Tod:</i> .....	<b>8</b>
<b>1.5.</b>	<b>BEOBACHTETE BEFUNDE</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5.3.</b>	<b>PATHOGENESE</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5.4.</b>	<b>JUNGTIERRESISTENZ</b> .....	<b>10</b>
<b>1.6.</b>	<b>AUFTRETEN EINER NEUEN GENETISCHEN VARIATION – RHDV 2</b> .....	<b>12</b>
<b>1.7.</b>	<b>EUROPEAN BROWN HARE SYNDROME (EBHS)</b> .....	<b>14</b>
<b>1.8.</b>	<b>PROPHYLAXE</b> .....	<b>15</b>
<b>1.9.</b>	<b>DIAGNOSTIK</b> .....	<b>15</b>
<b>1.9.2.</b>	<i>Elektronenmikroskopie</i> .....	<b>16</b>
<b>1.9.3.</b>	<i>ELISA</i> .....	<b>16</b>
<b>1.9.4.</b>	<i>PCR und RT-PCR</i> .....	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b> .....	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1.</b>	<i>Validierung der Sonden in der Einzel-PCR:</i> .....	<b>22</b>
<b>3.2.</b>	<i>Validierung der neuen Duplex-PCR anhand einer standardisierten Verdünnungsreihe:</i> .....	<b>22</b>
<b>3.3.</b>	<i>Überprüfung der Duplex-PCR in der Standarddiagnostik</i> .....	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1.</b>	<i>Erstüberprüfung der Sonden in der Einzel-PCR</i> .....	<b>24</b>
<b>4.2.</b>	<i>Validierung der neuen Duplex-PCR anhand einer standardisierten Verdünnungsreihe</i> .....	<b>24</b>
<b>4.3.</b>	<i>Überprüfung der Duplex-PCR in der Standarddiagnostik</i> .....	<b>33</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>42</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>43</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1. Geschichte**

Das Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) trat das erste Mal im Jahr 1984 in der chinesischen Provinz Jiangsu bei einer Gruppe Angorakaninchen aus Deutschland auf und wurde noch im selben Jahr erstmals beschrieben. Schon damals war bekannt, dass es sich um ein kleines, rundes, ikosaedrisches, RNA-Virus handelte, das Erythrozyten agglutinieren konnte. Über die dadurch ausgelöste Krankheit wusste man nur, dass die Inkubationszeit 48-72 Stunden dauerte und als typisches Symptom Epistaxis auftrat. Oft verlief die Krankheit aber auch symptomlos. Als pathologische Befunde fand man Hämorrhagien im Atmungstrakt, Verdauungstrakt, der Leber, Milz und im Herzmuskel, manchmal auch in den Nieren. (Liu, et al., 1984)

Das Virus nannte man vorerst Viral Haemorrhagic Disease Virus und die dadurch ausgelöste Krankheit Viral Haemorrhagic Disease (VHD) (WY, 1991). Heute wird die Krankheit von der World Organisation for Animal Health (OIE) als „Rabbit haemorrhagic disease“ gelistet. (OIE, 2020)

In weniger als einem Jahr starben über 140 Millionen Kaninchen in China an dem neuen Virus (WY, 1991), das deswegen oft immer noch als „Chinaseuche“ (Schwarzmann, 2020) bezeichnet wird. Im November 1985 wurden bereits die ersten Fälle auch in Korea beobachtet und beschrieben, woraufhin man auch begann, an einem inaktivierten Impfstoff zu forschen (Park NY, 1987). Kurz darauf verbreitete sich das Virus weiter nach Europa - der erste große Ausbruch war 1986 in der Lombardei in Italien (F.M. Cancellotti, 1991) - und Amerika (Gregg D.A., 1991), (Anon., 2000).

In Australien, wo Wildkaninchen als Schädlinge gelten, da sie keine natürlichen Feinde haben und durch ihre rasante Vermehrung stark mit einheimischen Arten um Futter konkurrieren, (Lenz, 2015) wurde 1991 versucht, das Virus auf der Insel Wardang Island einzuführen, um die Kaninchenpopulation einzudämmen. Trotz verschiedener Quarantänemaßnahmen konnte es sich, wahrscheinlich durch Insekten übertragen, auch in Australien ausbreiten (Cooke B.D., 2002) - somit kann man also sagen, dass RHDV nun weltweit vorkommt.

Längere Zeit war es unklar, um was für ein Virus es sich handelte, das diese neuartige und plötzlich aufgetretene Erkrankung auslöste.

Man vermutete erst ein Parvovirus (Gregg & House, 1989) oder ein Picornavirus (Xu & Chen, 1989).

1990 schließlich wurde das RHD-Virus endgültig als ein Virus der Familie Caliciviridae (Ohlinger, et al., 1990) und der Gattung Lagovirus (Green, et al., 2000), mit einer einzelsträngigen, positiv geladenen RNA identifiziert (Ohlinger, et al., 1990).

2010 trat in Frankreich eine neue Variante des RHD-Virus auf, das seitdem als RHDV-2 bezeichnet wird (AGES, 2020), 2015 wurden dann die ersten Fälle von RHDV-2 auch in Deutschland nachgewiesen (FLI, 2020) und 2016 ebenfalls in Österreich (Veterinärmedizinische Universität, 2016).

## **1.2. Das Virus**

RHDV ist ein Lagovirus und gehört zur Familie der Caliciviren. Caliciviren sind durch eine einzelsträngige, lineare RNA charakterisiert, wovon das 5'-Ende an ein VPg-Protein gebunden ist und das 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz aufweist. Die RNA ist infektiös und fungiert sowohl als Genom, als auch als virale mRNA.

Caliciviren haben ein unbehülltes, ca. 27-40 nm großes Kapsid mit ikosaedrischer Symmetrie (ViralZone, 2011). Es ist aus einem einzigen Strukturprotein VP60 aufgebaut, welches in der Nähe des 3'-Endes der RNA kodiert wird. Der Name ist ebenfalls Programm: Das lateinische Wort calix bedeutet Kelch und steht für die namensgebenden becherförmigen Vertiefungen auf der Oberfläche des Kapsids (Green, et al., 2000).

Was das RHD-Virus betrifft, so ist es rund ikosaedrisch, hat einen Durchmesser von 27-35 nm, ist unbehüllt und zeigt 10 becherförmige Vertiefungen auf der Oberfläche. Das Strukturprotein des Kapsids ist 60 kDa schwer und ist auch das einzige Strukturprotein (Parra & Prieto, 1990).

Meyer et al. sequenzierte 1991 das Genom von RHDV-1 und fand 7437 Nukleotide und 2344 Codons, die im 5'-Bereich für Nichtstrukturproteine codieren und im 3'-Bereich für das Strukturprotein des Kapsid (Meyers, et al., 1991).

Das vollständig sequenzierte Genom von RHDV-1 ist bei GenBank unter der Nummer NC\_001543.1 einsehbar (GenBank, 2018), das Genom von RHDV-2 unter der Nummer MT586027 (GenBank, 2020). Vergleicht man die Sequenzen von RHDV und RHDV-2 auf Nukleotid-Ebene, so stimmen diese zu 89,2% überein (Le Gall-Reculé, et al., 2013).

### **1.3. Epidemiologie**

RHDV wird hauptsächlich von klinisch erkrankten und latent infizierten Kaninchen durch direkten Kontakt übertragen aber auch durch diverse Ausscheidungen von infizierten Tieren und unbelebte und belebte Vektoren, wie z.B. Futter, Fahrzeuge, Insekten, Tierpfleger etc.

Der Hauptinfektionsweg ist oral, aber auch über Bindehaut, Nasenschleimhaut und Hautverletzungen möglich, die Letalität ist bei oral infizierten Kaninchen aber deutlich am höchsten.

RHD tritt vor allem in Intensivhaltung auf und die Epidemien kommen hier hauptsächlich im Zeitraum von November bis März vor und dauern meist 7-13 Tage.

Die Inkubationszeit beträgt 20-48 Stunden und die Letalität liegt bei circa 90% (bei experimentell infizierten Kaninchen) bis zu 100% (unter natürlichen Bedingungen) (Xu & Chen, 1989). Infizierte Kaninchen sterben im Durchschnitt 26,5 bis 46 Stunden nach der Infektion (Kimura, et al., 2001).

## **1.4. Klinische Symptome und Verlaufsformen:**

Man unterscheidet vier verschiedene Verlaufsformen:

### **1.4.1. Perakute Form:**

Die perakute Form tritt auf, wenn das Virus das erste Mal in eine Kaninchenkolonie eingeschleppt wird - die Tiere versterben plötzlich scheinbar ohne vorangehende Symptome, manchmal beobachtet man Hämaturie, schaumigen Ausfluss aus der Nase oder vaginale Blutungen.

### **1.4.2. Akute Form:**

Die akute Form kommt in Gebieten vor, in denen das Virus bereits als endemisch gilt, die Tiere zeigen Bewegungsunlust, Anorexie, Apathie, wiederum schaumigen blutigen Ausfluss aus der Nase und im Anfangsstadium eine erhöhte Körpertemperatur, die dann zum Ende hin wieder absinkt, auch bis unter den Normalbereich. Oft sieht man auch Zyanose von Schleimhäuten und Haut und Tachypnoe oder Dyspnoe (bedingt vermutlich durch den Nasenausfluss), gelegentlich wurde bei einigen Tieren auch ein aufgeblähtes Abdomen sowie Durchfall oder Verstopfung beobachtet.

Später im Verlauf treten neurologische Symptome wie Seitenlage, Paddelbewegungen mit den Extremitäten, Krämpfe oder Opisthotonus auf. Infizierte Tiere versterben nach 12-36 Stunden, oft begleitet von Stöhnen und Schmerzáußerungen.

### **1.4.3. Subakute Form:**

Die subakute Form wird nur in späten Stadien einer Epidemie beobachtet. Die Kaninchen zeigen abgeschwächte Symptome einer akuten Form, wie zum Beispiel Bewegungsunlust, Anorexie, Apathie und eine erhöhte Körpertemperatur. Die Symptome dauern hierbei allerdings etwa 2-3 Tage an und die meisten Tiere überleben die Infektion auch und sind danach immun.

#### **1.4.4. Asymptomatische Form:**

Diese Form ist sehr selten und die Infektion verläuft dann oft ohne erkennbare Symptome.

#### **1.4.5. Tod:**

Der Tod schließlich erfolgt vermutlich infolge eines multiplen Organversagens durch Durchblutungsstörungen aufgrund von Fibrin-Thromben gepaart mit multifokalen Blutungen durch die Verbrauchskoagulopathie als Folge der extremen Lebernekrose.

Wenn sich Tiere von einer akuten Form erholen, zeigen sie aber manchmal noch mehrere Wochen danach einen hochgradigen Ikterus und können auch später erst an Leberversagen versterben. Auch Aborte wurden beschrieben (Marcato, et al., 1991), (Xu & Chen, 1989).

### **1.5. Beobachtete Befunde**

#### **1.5.1. Pathologische und histopathologische Befunde:**

Die wichtigsten pathomorphologischen und histologischen Befunde sind eine akute, nekrotisierende Hepatitis mit multiplen Nekroseherden vor allem in der Peripherie der Läppchen; die Leber ist vergrößert, blass beziehungsweise gelblich-gräulich, brüchig und feinlappig oder granulomatös.

In mehreren Organen, vor allem Nieren, Lunge und Milz findet man zahlreiche Fibrinthromben und petechiale Blutungen, die Organe sind geschwollen, gestaut und ödemisiert. Aber auch im zentralen Nervensystem, der Nebenniere, der Netzhaut und in der Harnblase wurden Thromben und Blutungen nachgewiesen. Außerdem konnte man auch eine Erweiterung der rechten Herzkammer beobachten (Kimura, et al., 2001), (Ueda, et al., 1992), (Marcato, et al., 1991), (Weissenböck & Fuchs, 1992).

Histopathologisch findet man ebenfalls vor allem Blutungen und Fibrinablagerungen, sowie zahlreiche Fibrin-Thromben in Milz, Lunge (Weissenböck & Fuchs, 1992) und Nieren.

In der Leber zeigen die nekrotischen Hepatozyten eine vakuoläre, fettige Degeneration, die Kerne sind pyknotisch oder karyolytisch, die Zellen schrumpfen und zeigen eine stark

ausgeprägte Hypereosinophilie, außerdem beobachtet man in den nekrotischen Herden eine heterophile Infiltration, vor allem durch Lymphozyten (Ueda, et al., 1992), (Marcato, et al., 1991), (Weissenböck & Fuchs, 1992).

Überraschenderweise findet man pathologische und histopathologische Veränderungen vor allem an der Leber, aber auch anderen Organen wie Nieren, Lunge und Milz, auch bei klinisch nur subakut erkrankten Tieren (Teifke, et al., 2002).

### **1.5.2. Hämatologische Befunde:**

Die signifikantesten und häufigsten hämatologischen Veränderungen sieht man oft erst in der Endphase eines Krankheitsverlaufs: als Folge zahlreicher Fibrin-Thromben im Rahmen der DIC und einer gestörten Synthese von Gerinnungsfaktoren in der Leber aufgrund der massiven Leberveränderungen nimmt die Thrombozytenzahl im Blut ab, weiters kommt es zu Hypofibrinogenämie und außerdem ist die Prothrombinzeit deutlich verlängert.

Interessanterweise kommt es zu keinen deutlichen Veränderungen der Hämatokritwerte und Erythrozytenzahlen, dafür sinkt die Gesamtleukozytenzahl besonders in der Endphase einer Erkrankung leicht ab (Ueda, et al., 1992).

### **1.5.3. Pathogenese**

Wie bereits oben beschrieben, sind die auffälligsten Befunde einer Infektion mit RHDV die akute, nekrotisierende Hepatitis und die zahlreichen Thromben und Blutungen in mehreren Organen infolge der intravasalen Koagulopathie (DIC).

In einer 2001 durchgeführten Studie, in der Kaninchen intramuskulär RHDV-1-RNA injiziert wurde, konnte nach ihrem Tod die virale RNA anschließend in Hepatozyten, Kupfferzellen, Makrophagen in der roten Pulpa der Milz und in den Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden (Kimura, et al., 2001). Die Viruskonzentration war allerdings in der Leber am höchsten, dann nachfolgend in Lunge, Nieren und Milz - wodurch man darauf schließen kann, dass das Virus als Zielorgan vor allem die Leber befällt (Xu & Chen, 1989). Das Virus repliziert, wie alle Caliciviren, im Zytoplasma (Park & Itakura, 1992).

Die Infektion der Makrophagen scheint dann eine Rolle bei der Verbreitung der Viren im gesamten Körper zu spielen und die Infektion der Kupfferzellen bei der Verbreitung innerhalb der Leber. Man geht davon aus, dass sich das Virus bei einer natürlichen Infektion, die normalerweise über Aerosole vor allem oral geschieht, zuallererst in den Alveolarmakrophagen vermehrt und dann über die Blutbahn in die Leber und auch andere Organe gelangt (Kimura, et al., 2001).

Die infizierten Zellen, vor allem die Hepatozyten, aber auch Makrophagen und Endothelzellen, reagieren auf die Infektion mit Apoptose. Die Apoptose der Hepatozyten löst eine akute hochgradige Hepatitis aus, die Apoptose der Endothelzellen und Makrophagen wurde gemeinsam mit dem Auftreten von Fibrinthromben beobachtet. Da eine Apoptose immer auch mit einer erhöhten prokoagulierenden Aktivität einhergeht, könnte das mit der Auslösung der DIC in Zusammenhang stehen (Alonso, et al., 1998), (Jung, et al., 2000). Man konnte allerdings keine Virusreplikation in den Endothelzellen an sich nachweisen, deswegen bleibt es offen, ob die DIC durch das Virus und die Endothelschäden an sich, oder erst infolge des Leberversagens entsteht (Kimura, et al., 2001). In humanmedizinischen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass es infolge einer akuten nekrotisierenden Hepatitis zu einer intravasalen Koagulopathie kommt (Hillenbrand, et al., 1974), (Rake, et al., 1970), wodurch man annehmen kann, dass das bei mit RHDV infizierten Kaninchen ebenfalls der Grund der massiven DIC sein könnte.

Durch die DIC kommt es schlussendlich zu Fibrin-Thromben in kleinen und mittelgroßen Gefäßen, was zu schweren Organschäden, insbesondere in der Niere, führt und mit großer Wahrscheinlichkeit dann auch die Todesursache von an RHD verstorbenen Kaninchen darstellt (Alonso, et al., 1998).

#### **1.5.4. Jungtierresistenz**

Erstaunlicherweise zeigen Jungtiere unter 2 Monaten eine natürliche Resistenz gegenüber dem Virus. In einem 1999 von Mikami, Park, Kimura, Ochiai und Itakura durchgeführten Experiment wurden jeweils einigen zwei und vier Wochen alten Kaninchen RHDV-1 injiziert und keines davon zeigte klinische Symptome. Zwar hatten sie leichte Leberveränderungen, diese waren aber anscheinend nicht ausreichend für eine klinische Erkrankung. Auch bei in

Freiheit lebenden Kaninchen wurde bei Jungtieren unter 2 Monaten noch nie eine klinische Erkrankung beobachtet. Bei dem Experiment erkrankten die Mütter der mit RHDV-1 infizierten Kaninchen allerdings trotzdem an RHD und starben, was eine eventuelle Immunität der Jungtiere durch maternale Antikörper sicher ausschließt. Ab einem Alter von 4 Wochen scheint die Resistenz allerdings etwas abzunehmen und es kommt wieder zu schwereren Leberveränderungen. Die Autoren der Studie vermuteten, dass es an einer Veränderung der Leberfunktion durch die Fütterungsumstellung von Muttermilch auf feste Nahrung und dadurch einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber dem Virus lag (Mikami, et al., 1999).

Die Ursache für diese Jungtierresistenz ist immer noch nicht vollständig geklärt, es gibt allerdings bereits zahlreiche Theorien und mögliche Hinweise.

Man fand beispielsweise heraus, dass RHD-Viren menschliche Erythrozyten, beziehungsweise genauer gesagt die A- und H-Typ-2-Antigene, agglutiniert; eben diese Antigene fand man auch auf Epithelzellen der Atemwege und des Verdauungstraktes erwachsener Kaninchen. Da das Virus ja unter natürlichen Bedingungen über die Atemwege in die Kaninchen gelangt, könnte eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein der Antigene auf den Epithelien und der Erkrankung bestehen, da bei jungen Kaninchen diese Antigene nicht oder kaum gefunden wurden und das Virus auch keine Agglutination auf der Trachea junger Kaninchen auslöste. Die Expression dieser Antigene auf den Epithelien steigt dann vom ersten bis dritten Lebensmonat progressiv an und ist mit der zwölften Lebenswoche dann so hoch wie bei erwachsenen Kaninchen – dies korreliert wiederum mit den beobachteten klinischen Erkrankungen, die erst ab der 12. Woche auftreten (Ruvoen-Clouet, et al., 2000).

Ein weiterer Punkt, der bei jungen Kaninchen besonders ist und ebenfalls zur Resistenz, beziehungsweise dem sehr milden Verlauf der Erkrankung beiträgt, ist die Tatsache, dass junge Kaninchen mit einer außergewöhnlich schnellen und starken Entzündungsreaktion auf das Virus reagieren. Es scheint, als würde das Virus eine sehr frühe Aktivierung von B-Lymphozyten induzieren, wodurch immer nur sehr wenige Hepatozyten mit dem Virus infiziert werden. Außerdem wurden auch bereits 7 Tage nach der Infektion Anzeichen von Regeneration der Hepatozyten beobachtet (Marques, et al., 2012).

Davon abgesehen bestätigten noch einige weitere Studien, dass junge infizierte Kaninchen nicht komplett resistent sind, sondern sehr wohl erkranken, allerdings eben nur sehr mild. Außerdem fand man auch bei erwachsenen, erkrankten Kaninchen in allen Organen ebenfalls virale RNA, eine akute und vorübergehende Abnahme von Neutrophilen im Blut und Leberschäden, die eben mit Neutrophilen und Monozyten infiltriert waren. Im Vergleich zu erwachsenen infizierten Kaninchen fielen sie allerdings nur sehr gering aus und erklärt deswegen auch die fehlenden klinischen Symptome. Außerdem waren erhöhte Werte von Lebertransaminasen im Blut feststellbar, die auch langfristig erhöht blieben, wodurch der Verdacht naheliegt, dass die Tiere persistente Träger und somit latente Überträger des Virus nach einer durchgestandenen Infektion als Jungtiere bleiben (Ferreira, et al., 2006), (Ferreira, et al., 2004), (Shien, et al., 2000).

#### **1.6. Auftreten einer neuen genetischen Variation – RHDV 2**

Im Oktober 2010 kam es im Norden und Nordwesten Frankreichs zu ungewöhnlich vielen plötzlichen Todesfällen von Wildkaninchen an RHD, aber auch von eigentlich gegen RHDV-1 geimpften Hauskaninchen. Die klinischen Anzeichen, Todesraten und post mortem pathologischen Befunde waren ident mit denen vom bereits bekannten RHDV-1. Nach der Analyse mehrerer Proben fand man heraus, dass der Erreger zwar sehr ähnlich zum bereits bekannten Virus war, es sich also mit Sicherheit um ein RHD-Virus handelte, allerdings unterschieden sie sich doch soweit, dass man erkannte, dass es sich um eine neu aufgetretene Variante von RHDV handelte (Le Gall-Recule, et al., 2011). Das neue Virus verbreitete sich daraufhin relativ rasch in Europa (Dalton, et al., 2012), (Neimanis, et al., 2017), (Abrantes, et al., 2013), (Westcott, et al., 2014) und sogar bis nach Australien (Hall, et al., 2015) und löste das vorige RHDV-1 weitestgehend ab (Mahar, et al., 2018), (Lopes, et al., 2015).

Zwar ist die Mortalität bei mit RHDV-2 experimentell infizierten Kaninchen geringer als bei RHDV-1 (Le Gall-Reculé, et al., 2013), im Gegensatz zum ursprünglichen RHDV-1, das nur bei älteren Kaninchen einen tödlichen Verlauf der Krankheit auslöste, verstarben bei diesem neuen Virus allerdings auch Jungtiere jeden Alters genauso schnell und plötzlich wie alle anderen Altersklassen auch. Man konnte beobachten, dass die für die Resistenz mitverantwortliche schnelle und starke Immunantwort des angeborenen Immunsystems von

Jungtieren auf RHDV-1 bei einer beziehungsweise durch eine Infektion mit RHDV-2 herunterreguliert wurde, wodurch Jungtiere auch für RHDV-2 anfällig sind (Neave, et al., 2018), (Dalton, et al., 2012).

In einer 2013 von Le Gall-Reculé et al. durchgeführten Studie trat bei RHDV-2 die Mortalität später (3-9 Tage nach Inokulation) und über einen längeren Zeitraum (5 Tage) anhaltend auf, im Gegensatz zum klassischen RHDV-1 mit 2-6 Tagen nach Inokulation und 3-4 Tage anhaltend. Insgesamt wurde auch häufiger ein subakuter oder chronischer Krankheitsverlauf als beim vorherigen Virus beobachtet (Le Gall-Reculé, et al., 2013).

Ein weiterer Unterschied zum ursprünglichen Virus, das streng speziesspezifisch war und an dem nur Kaninchen erkranken konnten, wurde die neue Variante aber auch bei Feldhasen nachgewiesen, wodurch die Verbreitung noch mehr gefördert wird (Hall, et al., 2017).

Die klinischen Symptome, pathologischen und histopathologischen Befunde bei dem neuen Virus sind allerdings ident mit denen, die bei erwachsenen Kaninchen beim klassischen RHDV-1 auftreten (Bonvehi, et al., 2019), (Neimanis, et al., 2018).

Die neue Variation des Virus scheint das klassische RHD-1-Virus beinahe vollständig ersetzt zu haben – das Problem dabei ist nun, dass die für RHDV-1 entwickelten Impfstoffe bei RHDV-2 nur eine Teilimmunität erzielen (Vet, 2019), (FLI, 2013). Es konnte nämlich gezeigt werden, dass verschiedene monoklonale Antikörper gegen das RHDV-1-Kapsid nicht mit RHDV-2 reagierten (Le Gall-Reculé, et al., 2013).

Auf nuklearer Ebene konnte in der Studie von Le Gall-Reculé et al. 2013 gezeigt werden, dass das Genom von mehreren Varianten RHDV-1 und RHDV-2 durchschnittlich zu 89,2% ident ist und die Varianten von RHDV-2 untereinander sich kaum voneinander unterscheiden. Somit wurde nachgewiesen, dass RHDV-2 eindeutig mit RHDV-1 verwandt ist und eine neue Variante des Virus darstellt (Le Gall-Reculé, et al., 2013).

Das VP60-Protein besteht aus 3 Domänen, einem N-terminalen Arm, einer Schale, die das Gerüst bildet, das die virale RNA schützt und eine flexible, herausstehende Domäne P an der

Kapsidoberfläche, die für die Virus-Wirt-Rezeptor-Interaktionen verantwortlich ist. Die P-Domäne kann weiters in P1- und P2- Subdomänen unterteilt werden (Bárcena, 2015).

Beim Vergleich vom VP60-Protein von RHDV-1 und RHDV-2 konnte 2019 gezeigt werden, dass RHDV-2 2 einzigartige N-Glykosylierungsstellen (aa 301, 362) hatte, dafür fehlten allerdings 3 N-Glykosylierungsstellen, die das klassische RHDV-1 aufweist (aa 45, 308, 474). Dieser Unterschied der N-Glykosylierungsstellen könnte die unterschiedliche Virulenz der Varianten beeinflussen (Qi, 2019). Außerdem sind die Helices der P1-Subdomäne leicht verschoben und einige Schleifen der P2-Subdomäne anders orientiert. Die Aminosäurenveränderung zwischen den beiden Kapsidproteinen konzentrieren sich dabei vor allem auf die Schleifenregionen, die sich an der äußeren Oberfläche der P2-Subdomäne befinden (Leuthold, et al., 2015).

Die geringere Virulenz von RHDV-2 scheint zudem ein selektiver Vorteil zu sein, sodass es sich umso schneller ausbreiten kann (Le Gall-Reculé, et al., 2013).

### **1.7. European Brown Hare Syndrome (EBHS)**

Wichtig zu erwähnen ist an dieser Stelle noch die Hasenpest bzw. das European Brown Hare Syndrome, da es bei Feldhasen eine der RDH sehr ähnliche Erkrankung auslöst. Es tritt vor allem in Gebieten mit intensiver Landwirtschaft auf, wo die Population der Feldhasen sehr hoch ist (Marcato, et al., 1991). Auslöser des EBHS ist das European Brown Hare Syndrome Virus, ebenfalls ein Calicivirus, das eng verwandt mit dem RHD-Virus ist. Das Genom von RHDV-1 und EBHSV ähnelt sich zu bis zu 60% und es konnte gezeigt werden, dass sie miteinander näher verwandt sind als mit anderen Caliciviren (Wirblich, et al., 1994), (Nowotny, et al., 1997).

Die meisten Tiere werden bereits tot aufgefunden, bei manchen wurden noch Symptome wie Blindheit, Gleichgewichtsstörungen, Opisthotonus, Bewegungsunfähigkeit, Krämpfe und Erschöpfung beobachtet. Es werden ebenfalls am stärksten die Atmungsorgane und die Leber befallen und die pathologischen Läsionen ähneln sehr denen von RHD. Die Leberschäden unterscheiden sich allerdings etwas, vor allem durch eine Verkalkung der Leber und die hämorrhagischen Stauungen sind meist stärker ausgeprägt als bei Kaninchenlebern. Ein weiterer entscheidender Unterschied ist, dass bei EBHS Mikrothromben und Blutungen

seltener, Anzeichen einer DIC nie beobachtet werden konnten (Marcato, et al., 1991), (Weissenböck & Fuchs, 1992).

### **1.8. Prophylaxe**

Zur Prophylaxe gegen RHDV-1 und RHDV-2 stehen Impfstoffe, basierend auf inaktiviertem RHDV aus Leberhomogenaten infizierter Kaninchen, zur Verfügung. Kaninchen können ab einem Alter von 4-6 Wochen grundimmunisiert werden, die 2. Impfung erfolgt dann 4 Wochen später und danach, je nach Expositionsrisiko, sollte die Auffrischung immer jeweils in einem Abstand von 6-12 Monaten erfolgen (Selbitz, et al., 2015), (Impfleitlinien der Österreichischen Tierärztekammer, 2017). Im November 2019 wurde erstmals ein Vektorimpfstoff von Nobivac namens Myxo-RHD PLUS auf den Markt gebracht. Dieser kann im Gegensatz zu den vorangegangenen Impfstoffen rein in vitro hergestellt werden und verwendet Myxomatose-Viren als Vektoren, die das Kapsidgen von RHDV-1 und RHDV-2 exprimieren, wodurch der Impfstoff sowohl gegen Myxomatose, als auch RHDV-1 und RHDV-2 immunisiert. Allerdings ist dabei zu beachten, dass Kaninchen, die bereits Antikörper gegen Myxomatose haben (durch hohe maternale Antikörperspiegel oder vorangegangene Impfungen mit einem Myxomatose-Mono-Impfstoff) möglicherweise nach der Impfung keine ausreichende Immunität gegen RHD entwickeln. Grundimmunisiert werden können Kaninchen ab einem Alter von 5 Wochen, danach folgt die Auffrischungsimpfung einmal jährlich (Produktbeschreibung Nobivac Myxo-RHD-plus, 2021).

### **1.9. Diagnostik**

Häufig kann durch die klinischen Symptome und die, wie oben beschrieben, für die Erkrankung sehr charakteristischen Befunde der pathologischen Untersuchung bereits eine richtungsweisende Verdachtsdiagnose gestellt werden. Zu deren objektiven Bestätigung stehen danach noch verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: Hämagglutinationstest, Elektronenmikroskopie, ELISA oder RT-PCR. Für die Diagnose werden Organproben, insbesondere die Leber, verwendet (Selbitz, et al., 2015), (Schirrmeier & König, 2019).

### **1.9.1. Hämagglutinationstest**

Einige Viren haben die Eigenschaften, Erythrozyten einer anderen Tierart als ihr Wirt zu binden bzw. zu agglutinieren. Diese Verklumpung kann man dann diagnostisch nutzen, bei einem positiven Ergebnis zeigt sich aufgrund der Agglutination ein netzartiges, granuläres Sediment, bei einem negativen Ergebnis sammeln sich die Erythrozyten durch das Fehlen der hämagglutinierenden Aktivität aufgrund der Ausverdünnung des Antigens als kleiner Knopf an. Der Hämagglutinationstest kann qualitativ oder quantitativ mittels einer Verdünnungsreihe durchgeführt werden, bei der Verdünnung, bei der es noch zu einer Hämagglutination kommt, liegt dann 1HAE vor, wenn dies also zum Beispiel bei einer Verdünnung von 1:64 so ist, dann waren in der verwendeten Ausgangsmenge 64 HAE enthalten.

Beim Nachweis von RHDV verwendet man in phosphatgepufferten isotonischen Salzlösungen homogenisiertes Lebermaterial und Humanerythrozyten der Blutgruppe 0.

Heutzutage wurde diese Methode in der Routinediagnostik allerdings zum großen Teil durch ELISA und RT-PCR abgelöst (Selbitz, et al., 2015), (Schirrmeier & König, 2019). Hinzu kommt, dass bei einigen RHDV-Ausbrüchen nicht hämagglutinierende Isolate des Virus gefunden, so dass der Test dann falsch negativ wäre (Chasey, et al., 1995).

### **1.9.2. Elektronenmikroskopie**

Mithilfe eines Elektronenmikroskops können Caliciviruspartikel in Leberproben im Negativkontrastverfahren nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt bei  $10^6$  Partikeln, diese Konzentration wird im Allgemeinen bei einer akuten Erkrankung allerdings meistens ohnehin erreicht (Schirrmeier & König, 2019).

### **1.9.3. ELISA**

Beim Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wird zuerst ein Virusantigen-spezifischer, primärer Antikörper an eine Platte gekoppelt und dann wird das zu untersuchende Material darauf pipettiert. Wenn in der Probe das virale Antigen enthalten ist, wird es an den Antikörper gebunden und nach einem Waschschriff wird ein sekundärer Antikörper, der mit

einem Enzym verbunden ist, hinzugefügt und dieser bindet nur, wenn vorhanden, an den Antikörper-Antigen-Komplex. Danach wird ein chromogenes Substrat hinzugefügt, das von diesem Enzym dann hydrolysiert wird, wodurch es im positiven Fall zu einem Farbumschlag kommt (Selbitz, et al., 2015). Für den Nachweis von RHDV-1 ist ein kommerziell erhältlicher Test verfügbar, der allerdings nicht zwischen RHDV-1 und EBHSV unterscheiden kann (Schirrmeier & König, 2019).

#### **1.9.4. PCR und RT-PCR**

Bei einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird eine geringe Menge DNA (Template) millionenfach vervielfältigt und dann analysiert. Grundsätzlich ähneln die Vorgänge der Vervielfältigung der DNA mittels PCR dem natürlichen Ablauf in der Zelle.

Dabei wird die DNA (PCR) oder RNA, die zuerst mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird (RT-PCR), mit einem Gemisch aller Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs), Primern, der DNA-Polymerase und einer Pufferlösung, in der die Reaktion stattfinden kann, versetzt.

Die Template-DNA wird im ersten Schritt der PCR durch thermische Denaturierung in einzelsträngige DNA überführt und daran binden dann die Primer (Annealing) am Anfang und Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes – dann wird ausgehend von den Primern ein neuer DNA-Strang durch die DNA-Polymerase zwischen den Primern angefügt. Dieser Zyklus wiederholt so oft, bis am Ende mehrere Millionen Kopien entstanden sind.

Primer sind synthetische DNA-Oligonucleotide und diese bestimmen stark die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit einer PCR. Möchte man also z.B. mehrere Primer in einer PCR kombinieren, müssen sie dieselbe Schmelztemperatur (Temperatur, bei der 50% der DNA bereits einzelsträngig vorliegt) besitzen und dürfen nicht miteinander wechselwirken. Ein Primer bindet nur an seine vollständig komplementäre Sequenz, da bei Fehlbindungen keine effiziente Doppelstrangbildung möglich ist.

Um die PCR-Produkte dann analysieren zu können, gibt es grundsätzlich 2 Möglichkeiten, die beide auf Markierung der PCR-Produkte basieren: entweder durch Elektrophoresesysteme, wobei man die PCR-Produkte in einem Gel durch Anlegen einer elektrischen Spannung der Größe nach auftrennt oder durch direkte Nachweissysteme, wie die real time-PCR.

Bei der real time-PCR (qPCR) oder real time-RT-PCR (RT-qPCR) können die PCR-Produkte schon während der Bildung in Echtzeit gemessen werden. Dabei kann man die PCR-Produkte auf verschiedene Arten markieren: durch Fluoreszenzfarbstoffe, die selbst an die DNA binden oder durch sequenzspezifische Sondenmoleküle, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und nur an das gewünschte PCR-Produkt binden.

Bei einer Sonden-basierten Multiplex-qPCR kann man dann die entsprechenden Sondenmoleküle mit verschiedenen Farbstoffen (z.B. FAM, HEX, Cy5) markieren und damit dann zwei oder mehrere PCRs in einem Ansatz laufen lassen (Thiemann, et al., 2014). Dabei kann man gleichzeitig mehrere Zielsequenzen in einer einmalig durchgeführten PCR quantitativ erfassen. Das bringt mehrere Vorteile mit sich: es werden weniger Reaktionen für die gleiche Anzahl an Analysen benötigt und man spart Material, wodurch es insgesamt zu einer Kostenersparnis kommt (Jansohn & Rothhämel, 2012).

Moderne Thermocycler haben verschiedene Farbkanäle, die über spezifische Anregung und Filter oder Prismen getrennt ausgelesen werden (Thiemann, et al., 2014). Anhand der in unterschiedlichem Spektrum emittierenden Sondenfarbstoffen kann so parallel zwischen der Amplifikation verschiedener PCR-Produkte unterschieden werden.

Die abgegebene Fluoreszenz wird bei jedem Zyklus gemessen und die Intensität ist dabei direkt proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte, sodass man daraus auf die Menge der produzierten DNA schließen kann. Der Zyklus, in dem zum ersten Mal ein vom unspezifischen Hintergrund signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal messbar ist, wird als  $C_T$ -Wert bezeichnet. Anhand des  $C_T$ -Werts einer Verdünnungsreihe einer Standardkurve kann dann im Vergleich zu den  $C_T$ -Werten von unbekanntem Proben die quantitative Menge der DNA in den Proben bestimmt werden (Jansohn & Rothhämel, 2012).

## **2. Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, aus zwei bestehenden, am Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien für RHDV-1 und RHDV-2 etablierten RT-qPCRs eine Duplex-RT-qPCR zu etablieren, um in einem Ansatz RHDV-1- und RHDV-2-spezifische RNA gleichzeitig nachweisen zu können. So sollten in Zukunft beide Viren unabhängig voneinander in einem PCR-Ansatz zeit- und kostensparend nachgewiesen werden können.

Die neu etablierte Duplex-PCR sollte dabei eine vergleichbare Spezifität und Sensivität im Vergleich zu den bereits vorhandenen Singleplex-PCRs aufweisen. Dies sollte anhand einer Verdünnungsreihe aus reinen RHDV-1-Plasmiden und RHDV-2-Plasmiden mit einer bekannten Konzentration im Singleplex- und danach im Duplex-Ansatz untersucht werden.

Mit dieser PCR sollten im Rahmen der Diagnostik bereits getestete Kaninchenproben der vergangenen Jahre nachuntersucht und die Ergebnisse auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft werden, um die Duplex-PCR auf ihren möglichen Einsatz in der täglichen Diagnostik zu testen.

### 3. Material und Methoden

Für die Etablierung der Duplex-RT-qPCR wurden die zwei Sonden, die bereits in der Diagnostik des Institutes für Virologie etablierten RT-qPCRs für RHDV-1- und RHDV2-Nachweise, angepasst. Verwendet wurde das Protokoll von Schirrmeier et König 2019, AVID-Methodensammlung: AVID-Methode-VIR01 – RHDV/EBHSV; Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems.

Wichtig zu beachten ist, beim Zusammenführen zweier Protokolle die Fluoreszenzsonden so auszuwählen, dass sie sich in ihrem Emissionsspektrum möglichst stark unterscheiden, sodass der Thermocycler sie besser auseinanderhalten kann und die Messungen genauer ausfallen, deswegen wurden hier die Farbstoffe Cy5 für RHDV-2 mit einem Spektrum von 643-667 nm und FAM für RHDV-1 mit einem Spektrum von 494-518 nm verwendet (Jansohn & Rothhämel, 2012).

Die PCR-Temperatur-Parameter der RT-qPCR-Protokolle für je RHDV-1 und RHDV-2, waren ident, sodass sie für die Duplex-RT-qPCR genauso übernommen werden konnten.

Primer- und Sondensequenzen für die Duplex-RT-qPCR (Schirrmeier & König, 2019):

Primer-F1 (Real-RHDV-F): 5'-ACYTGACTGAACTYATTGACG-3'

Primer-R1 (Real-RHDV-R): 5'-TCAGACATAAGAAAAGCCATTGG-3'

Sonde 1 (RHDV-Sonde): FAM-5'-CCAARAGCACRCTCGTGTTC AACCT-3'-TAMRA

Primer-F2 (Real-RHDV-2-F): 5'-ACTTGTCAGA ACTTGTTGACA-3'

Primer-R2 (Real-RHDV-2-R): 5'-TCAGACATAAGAAAAGCCATTAG-3'

Sonde 2 (RHDV-2-Sonde): Cy5-5'-CCACAAGCACGCTTGTGTACA ACTTG-3'-BHQ2

Es wurde das Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (NEB) verwendet und Mastermixe nach folgendem Schema hergestellt:

Angaben in $\mu\text{l}$	1x	8x (8,5**)	16x (17**)	24x (25**)	32x (33**)	40x (42**)
Luna RT-reaction Mix (2x)	10	85	170	250	330	420
Luna RT-enzyme Mix (20x)	1	8,5	17	25	33	42
RNAse freies H <sub>2</sub> O	7,4	62,9	125,8	185	244,2	310,8
Primer- F1(40 $\mu\text{M}$ )+R1(40 $\mu\text{M}$ )	0,2	1,7	3,4	5	6,6	8,4
Primer- F2(40 $\mu\text{M}$ )+R2(40 $\mu\text{M}$ )	0,2	1,7	3,4	5	6,6	8,4
Sonde 1 (20 $\mu\text{M}$ )	0,1	0,85	1,7	2,5	3,3	4,2
Sonde 2 (20 $\mu\text{M}$ )	0,1	0,85	1,7	2,5	3,3	4,2
Gesamtvolumen Mastermix	19	161,5	323	475	627	798
Zugabe Template	1					

Als Thermocycler wurde der Rotor-Gene Q mit der Software 2.3.4.3 verwendet.

Das Temperaturschema wurde ebenfalls von Schirrmeier und König übernommen und lautet wie folgt (Schirrmeier & König, 2019):

Reverse Transkription	50°C	30 min	} 45 Zyklen
Inaktivierung RT/Aktivierung Taq	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	30sec	
Annealing	55°C	45 sec	
Elongation	68 °C	45 sec	

### 3.1. Validierung der Sonden in der Einzel-PCR:

Im ersten Schritt mussten die neuen Sonden auf ihre Funktion überprüft werden. Dafür wurden beide Sonden mit einer positiv-Kontrolle aus der Diagnostik der Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien jeweils als Singleplex-PCR nach den bereits vorhandenen Protokollen angesetzt. Danach wurden die Sonden in einer ersten Duplex-qPCR mit je 1 µl der Positivkontrolle für RHDV-1 und RHDV-2 im neuen Duplex-Mastermix (siehe oben) erstmals getestet.

### 3.2. Validierung der neuen Duplex-PCR anhand einer standardisierten Verdünnungsreihe:

Um die Sensitivität der einzelnen RT-qPCRs mit jener der Duplex-PCR vergleichen zu können, wurden Plasmide generiert, welche die jeweiligen Zielsequenzen der beiden Primer- und Probe-Sets beinhalten. Bei Eurofins wurden DNA-Sequenzen mit je einem amplifizierten Gen-Bereich von RHDV-1 und RHDV-2 bestellt und dann in Plasmide hineinkloniert.

Der Target-Bereich für RHDV-1 beinhaltet die Sequenz 6941-7044:

```
acYtgactgaactYattgacgtacgccccgtgggaccagccatccaaRagcacRctcgtgttcaacctggggggcgagcca  
atggcttttcttatgtctga
```

Der Target-Bereich für RHDV-2 beinhaltet die Sequenz 6923-7026:

```
acctgcagaactgttgacatccgccctgtgggaccagaccgtccacaagcacgcttgtgtacaactggggggcacaactaatgg  
cttttcttatgtctga
```

Die Plasmide wurden dann auf eine Konzentration von je  $1 \cdot 10^{10}$  GE/µl verdünnt, sodass bei der späteren Zugabe von je 1 µl Plasmid pro Mastermix immer jeweils dieselbe Konzentration von beiden Plasmiden pro Verdünnung benutzt werden konnte. Danach wurde jeweils eine Verdünnungsreihe von RHDV-1 und RHDV-2 mit den Verdünnungen  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  erstellt, somit ergeben sich für die jeweiligen Verdünnungen folgende Mengen an enthaltenem

Template:

Verdünnung	Enthaltene GE/ $\mu$ l
$10^{-1}$	$10^9$
$10^{-2}$	$10^8$
$10^{-3}$	$10^7$
$10^{-4}$	$10^6$
$10^{-5}$	$10^5$
$10^{-6}$	$10^4$
$10^{-7}$	$10^3$
$10^{-8}$	$10^2$

Im weiteren Verlauf wurde dann jeweils ein Dreifachansatz der Verdünnungsreihen von RHDV-1 und RHDV-2 mit den Verdünnungen  $10^{-3}$  bis  $10^{-8}$  als Monoplex-qPCR sowie nochmals ein Dreifachansatz mit denselben Verdünnungsreihen als Duplex-qPCR durchgeführt, um die Sensitivität, als auch die Spezifität der Duplex-qPCR im Vergleich zu beiden Monoplex-qPCRs evaluieren zu können.

### 3.3. Überprüfung der Duplex-PCR in der Standarddiagnostik

In der letzten Phase ging es darum, Proben des Institutes für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, die bereits in der Vergangenheit mit den bisher angewandten Singleplex-PCRs auf RHDV-1 oder RHDV-2 positiv getestet wurden, mit der neuen Duplex-PCR nochmal neu nachzutesten. Es galt zu überprüfen, ob die Duplex-PCR auch im normalen Diagnostikalltag verlässlich anwendbar ist.

Dafür wurden alle für RHDV-1 oder RHDV-2 positiven Proben aus den Jahren 2016 bis Anfang 2020 nochmal aufgetaut. Insgesamt verwendet wurden 31 Proben, davon waren 26 RHDV-2 positiv und 5 RHDV-1 positiv. Diese wurden dann mit der neu entwickelten Duplex-PCR auf RHDV-1 und RHDV-2 nachgetestet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Erstüberprüfung der Sonden in der Einzel-PCR

Wie bereits weiter oben erwähnt, konnten in der ersten Phase die beiden Sonden mittels einer einfachen Monoplex-PCR mit Positivkontrollen validiert werden. Ebenso zeigte der erstmalige Duplex-Versuch, dass eine Zusammenführung der bereits bestehenden Singleplex-qPCRs zu einer Duplex-PCR aussichtsreich erscheint und die Anteile der Singleplex-PCRs im gemeinsamen Ansatz nicht miteinander negativ interagieren.

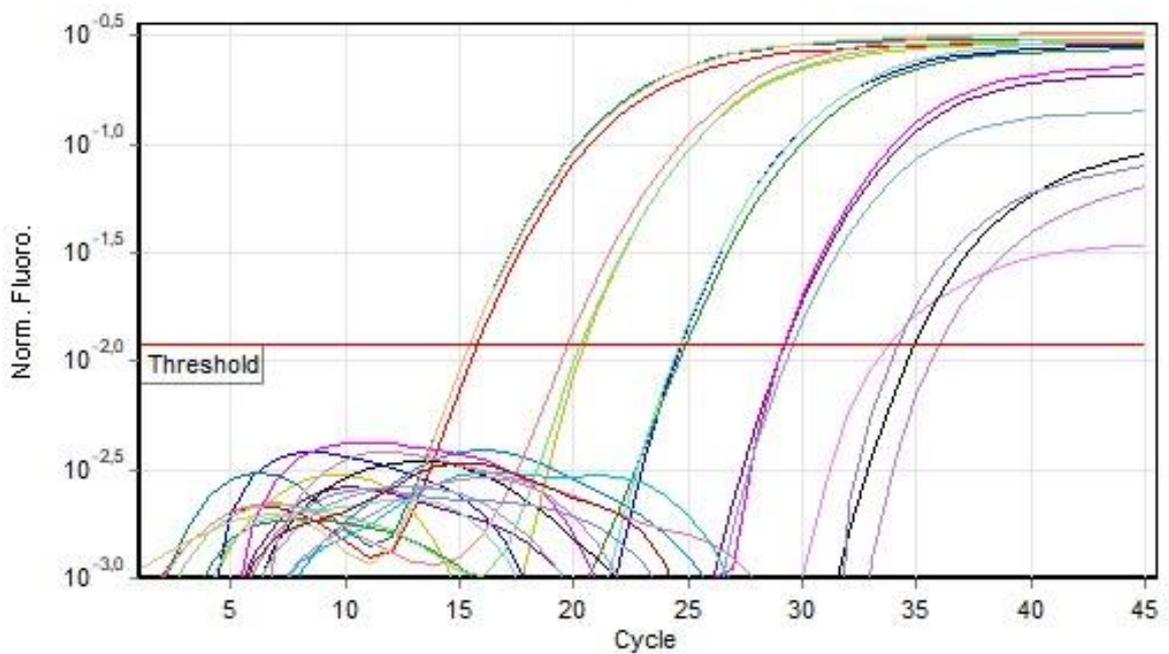
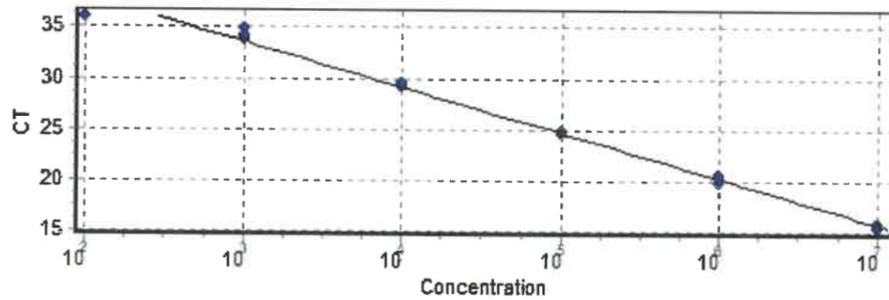
### 4.2. Validierung der neuen Duplex-PCR anhand einer standardisierten Verdünnungsreihe

#### 4.2.1. Dreifachansatz RHDV-1-Verdünnungsreihe Monoplex

#### Quantitation Information

Threshold	0,0119
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,225 \cdot \text{CT} + 10,537)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -4,453 \cdot \log(\text{conc}) + 46,924$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1)$ 0,67711
M	-4,45313
B	46,92429
R Value	0,99543
R <sup>2</sup> Value	0,99088
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light

### Standard Curve



RT-qPCR-Ergebnisse Verdünnungsreihe RHDV-1, gemessen im FAM-Kanal

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	Red	RHDV-1 10 <sup>-3</sup>	Standard	15,76	1,000E+07	9,976E+06
2	Yellow	RHDV-1 10 <sup>-4</sup>	Standard	20,47	1,000E+06	8,721E+05
3	Blue	RHDV-1 10 <sup>-5</sup>	Standard	24,65	1,000E+05	1,003E+05
4	Purple	RHDV-1 10 <sup>-6</sup>	Standard	29,22	1,000E+04	9,451E+03
5	Pink	RHDV-1 10 <sup>-7</sup>	Standard	33,74	1,000E+03	9,149E+02
6	Light Blue	RHDV-1 10 <sup>-8</sup>	Standard		1,000E+02	
7	Teal	RHDV-1 10 <sup>-3</sup>	Standard	15,41	1,000E+07	1,192E+07
8	Orange	RHDV-1 10 <sup>-4</sup>	Standard	19,75	1,000E+06	1,264E+06
9	Green	RHDV-1 10 <sup>-5</sup>	Standard	24,85	1,000E+05	9,056E+04
10	Magenta	RHDV-1 10 <sup>-6</sup>	Standard	29,20	1,000E+04	9,563E+03

11	■	RHDV-1 10 <sup>-7</sup>	Standard	34,88	1,000E+03	5,060E+02
12	■	RHDV-1 10 <sup>-8</sup>	Standard		1,000E+02	
13	■	RHDV-1 10 <sup>-3</sup>	Standard	15,43	1,000E+07	1,183E+07
14	■	RHDV-1 10 <sup>-4</sup>	Standard	20,31	1,000E+06	9,479E+05
15	■	RHDV-1 10 <sup>-5</sup>	Standard	24,58	1,000E+05	1,041E+05
16	■	RHDV-1 10 <sup>-6</sup>	Standard	29,56	1,000E+04	7,950E+03
17	■	RHDV-1 10 <sup>-7</sup>	Standard	34,12	1,000E+03	7,512E+02
18	■	RHDV-1 10 <sup>-8</sup>	Standard	35,97	1,000E+02	2,878E+02
19	■	ntc	NTC			
20	■	ntc	NTC			

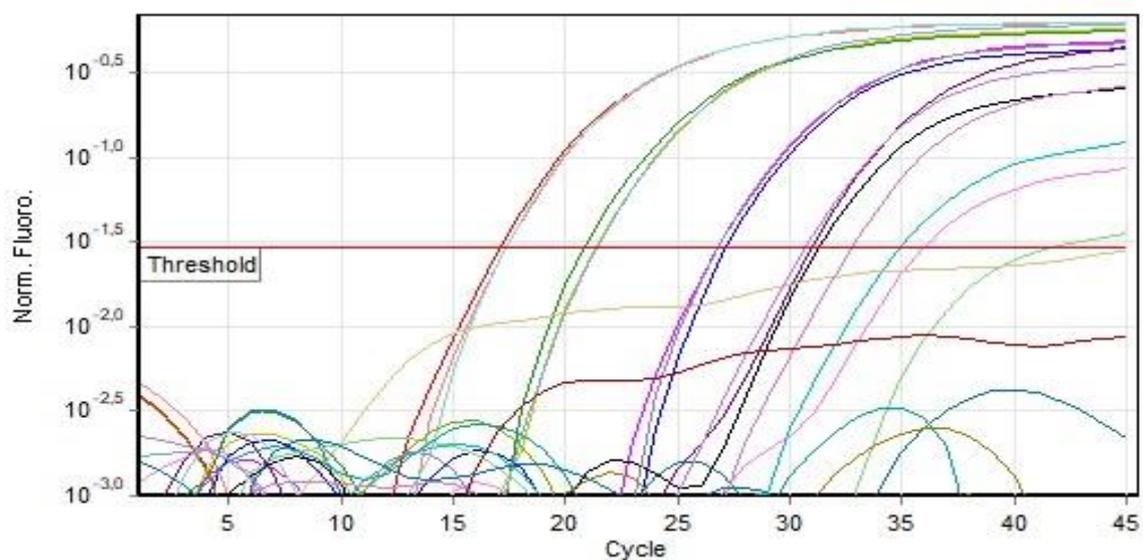
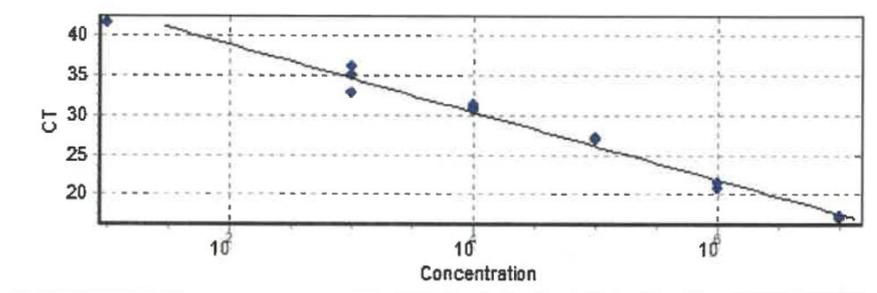
In allen drei Replikaten konnten 10<sup>3</sup> GE/Reaktion nachgewiesen werden, in zwei von drei Replikaten waren sogar 10<sup>2</sup> GE/Reaktion detektierbar.

#### 4.2.2. Dreifachansatz RHDV-2 Verdünnungsreihe Monoplex

##### Quantitation Information

Threshold	0,02896
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= 10 <sup>^</sup> (-0,236*CT + 11,152)
Standard Curve (2)	CT = -4,234*log(conc) + 47,224
Reaction efficiency (*)	(* = 10 <sup>^</sup> (-1/m) - 1) 0,72251
M	-4,23437
B	47,22358
R Value	0,99193
R <sup>2</sup> Value	0,98393
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light

### Standard Curve



RT-qPCR-Ergebnisse Verdünnungsreihe RHDV-2, gemessen im Cy5-Kanal

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	Red	RHDV-2 10 <sup>-3</sup>	Standard	17,04	1,000E+07	1,344E+07
2	Yellow	RHDV-2 10 <sup>-4</sup>	Standard	21,33	1,000E+06	1,301E+06
3	Blue	RHDV-2 10 <sup>-5</sup>	Standard	27,15	1,000E+05	5,492E+04
4	Purple	RHDV-2 10 <sup>-6</sup>	Standard	30,93	1,000E+04	7,044E+03
5	Pink	RHDV-2 10 <sup>-7</sup>	Standard	35,93	1,000E+03	4,649E+02
6	Light Blue	RHDV-2 10 <sup>-8</sup>	Standard		1,000E+02	
8	Light Red	RHDV-2 10 <sup>-3</sup>	Standard	17,32	1,000E+07	1,155E+07
9	Green	RHDV-2 10 <sup>-4</sup>	Standard	20,83	1,000E+06	1,711E+06
10	Magenta	RHDV-2 10 <sup>-5</sup>	Standard	26,79	1,000E+05	6,706E+04
11	Black	RHDV-2 10 <sup>-6</sup>	Standard	31,23	1,000E+04	5,971E+03

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
12		RHDV-2 10 <sup>-7</sup>	Standard	34,88	1,000E+03	8,223E+02
13		RHDV-2 10 <sup>-8</sup>	Standard		1,000E+02	
15		RHDV-2 10 <sup>-3</sup>	Standard	17,31	1,000E+07	1,163E+07
16		RHDV-2 10 <sup>-4</sup>	Standard	21,38	1,000E+06	1,271E+06
17		RHDV-2 10 <sup>-5</sup>	Standard	26,77	1,000E+05	6,760E+04
18		RHDV-2 10 <sup>-6</sup>	Standard	30,67	1,000E+04	8,137E+03
19		RHDV-2 10 <sup>-7</sup>	Standard	32,72	1,000E+03	2,665E+03
20		RHDV-2 10 <sup>-8</sup>	Standard		1,000E+02	
22		ntc	NTC			
23		ntc	NTC			
24		ntc	NTC			

In allen Replikaten waren 10<sup>3</sup> GE/Reaktion nachweisbar.

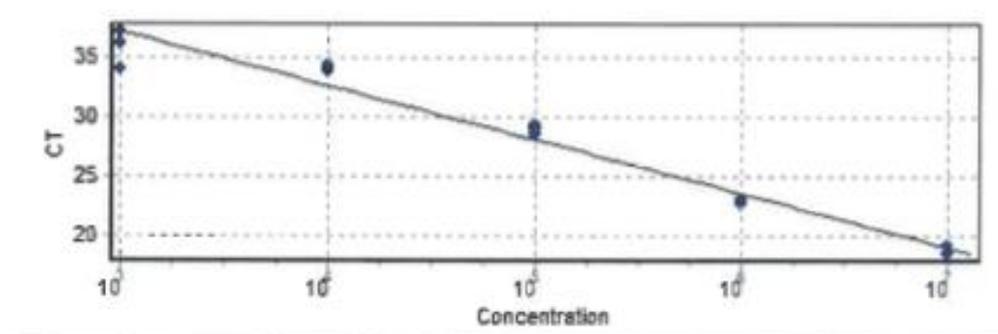
### 4.2.3. Dreifachansatz RHDV-1 und RHDV-2 Duplex-PCR Verdünnungsreihen

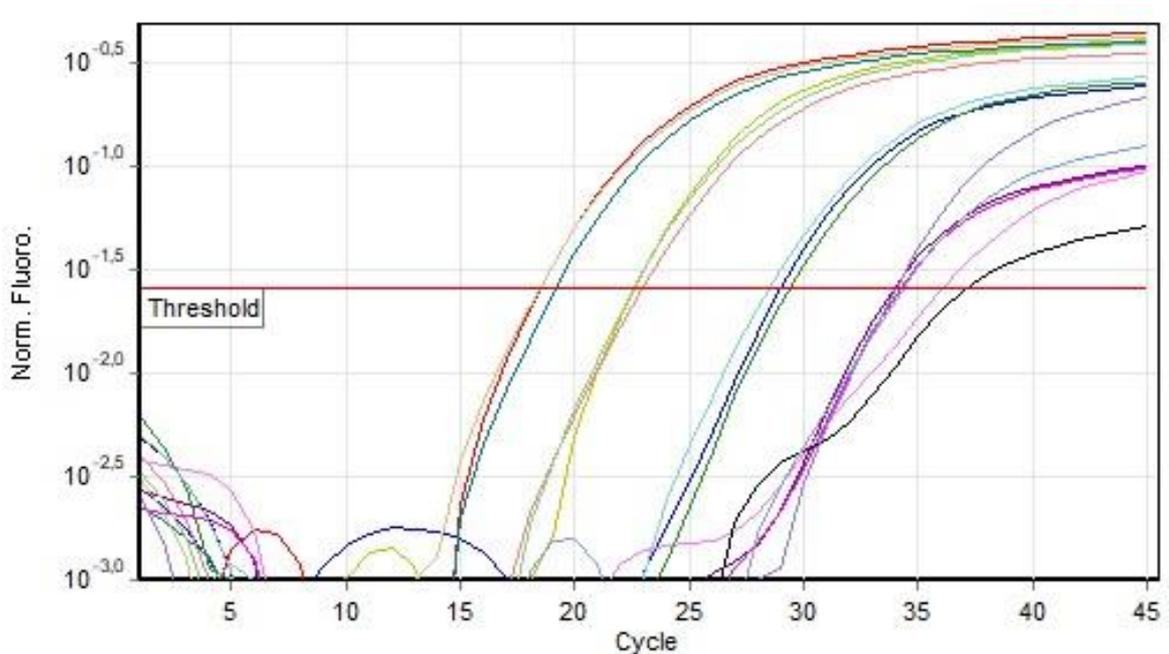
#### 4.2.3.1. Messung im FAM-Kanal

#### Quantitation Information

Threshold	0,02578
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,219 \cdot \text{CT} + 11,154)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -4,561 \cdot \log(\text{conc}) + 50,870$
Reaction efficiency (*)	$(* = 10^{(-1/m)} - 1) 0,65676$
M	-4,5608
B	50,87023
R Value	0,98156
R^2 Value	0,96347
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 3
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation

#### Standard Curve





RT-qPCR-Ergebnisse Verdünnungsreihe RHDV-1 und RHDV-2, gemessen im FAM-Kanal (Duplex-RT-qPCR)

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	Red	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-3</sup>	Standard	18,48	1,000E+07	1,266E+07
2	Yellow	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-4</sup>	Standard	22,60	1,000E+06	1,576E+06
3	Blue	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-5</sup>	Standard	29,02	1,000E+05	6,177E+04
4	Purple	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-6</sup>	Standard	33,92	1,000E+04	5,207E+03
5	Pink	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-7</sup>	Standard	36,12	1,000E+03	1,711E+03
6	Light Blue	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-8</sup>	Standard		1,000E+02	
7	Teal	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-3</sup>	Standard	19,17	1,000E+07	8,914E+06
8	Light Red	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-4</sup>	Standard	22,96	1,000E+06	1,315E+06
9	Green	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-5</sup>	Standard	29,39	1,000E+05	5,135E+04
10	Magenta	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-6</sup>	Standard	34,21	1,000E+04	4,497E+03
11	Black	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-7</sup>	Standard	37,21	1,000E+03	9,906E+02
12	Cyan	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-8</sup>	Standard		1,000E+02	
13	Gold	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-3</sup>	Standard	18,44	1,000E+07	1,292E+07
14	Light Green	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-4</sup>	Standard	22,58	1,000E+06	1,594E+06
15	Light Cyan	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-5</sup>	Standard	28,55	1,000E+05	7,842E+04
16	Light Blue	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-6</sup>	Standard	34,33	1,000E+04	4,232E+03
17	Light Purple	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-7</sup>	Standard	34,01	1,000E+03	4,968E+03
18	Light Purple	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-8</sup>	Standard		1,000E+02	

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
19	■	ntc	NTC			
20	■	ntc	NTC			

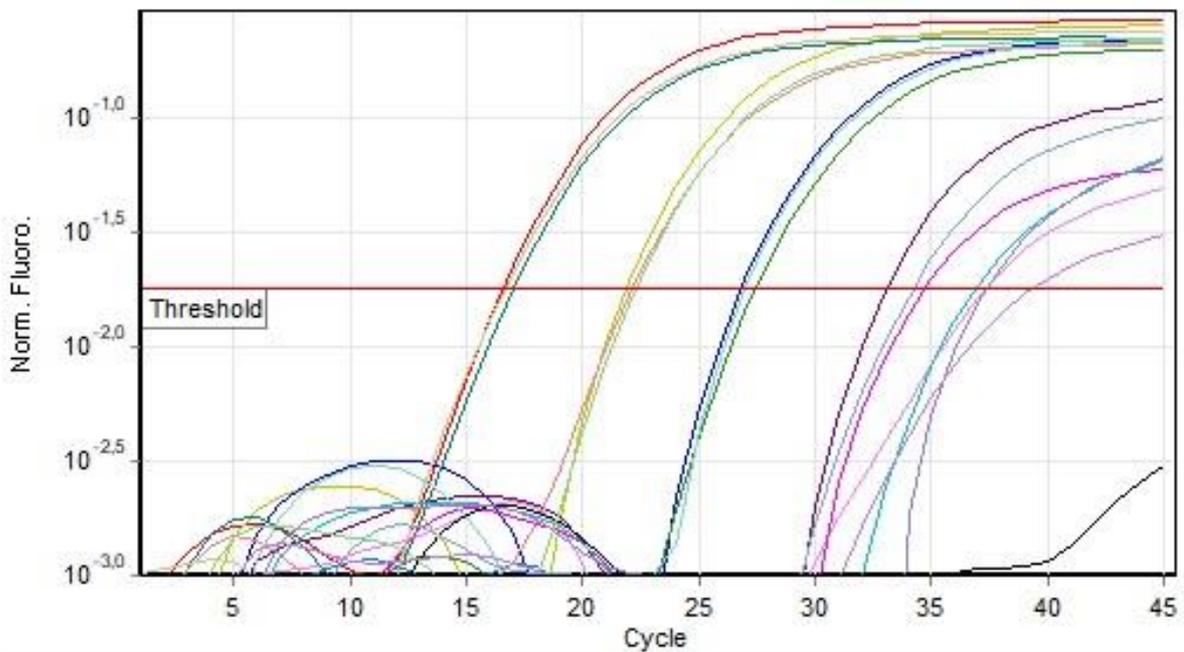
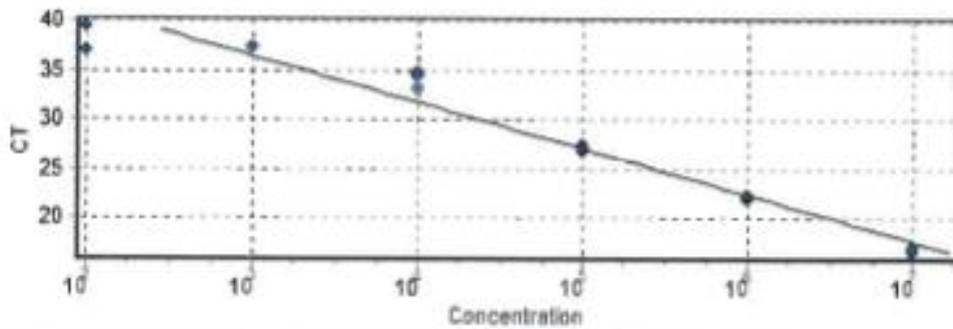
Alle Replikate waren bis zu einer Konzentration von  $10^3$  GE/Reaktion nachweisbar.

#### 4.2.3.2. Messung im Cy5-Kanal:

### Quantitation Information

Threshold	0,01805
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	$\text{conc} = 10^{(-0,214 \cdot \text{CT} + 10,783)}$
Standard Curve (2)	$\text{CT} = -4,674 \cdot \log(\text{conc}) + 50,398$
Reaction efficiency (*)	(* = $10^{(-1/m)} - 1$ ) 0,63655
M	-4,67384
B	50,39821
R Value	0,97817
R^2 Value	0,95682
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation

### Standard Curve



RT-qPCR-Ergebnisse Verdünnungsreihe RHDV-1 und RHDV-2, gemessen im Cy5-Kanal (Duplex-RT-qPCR)

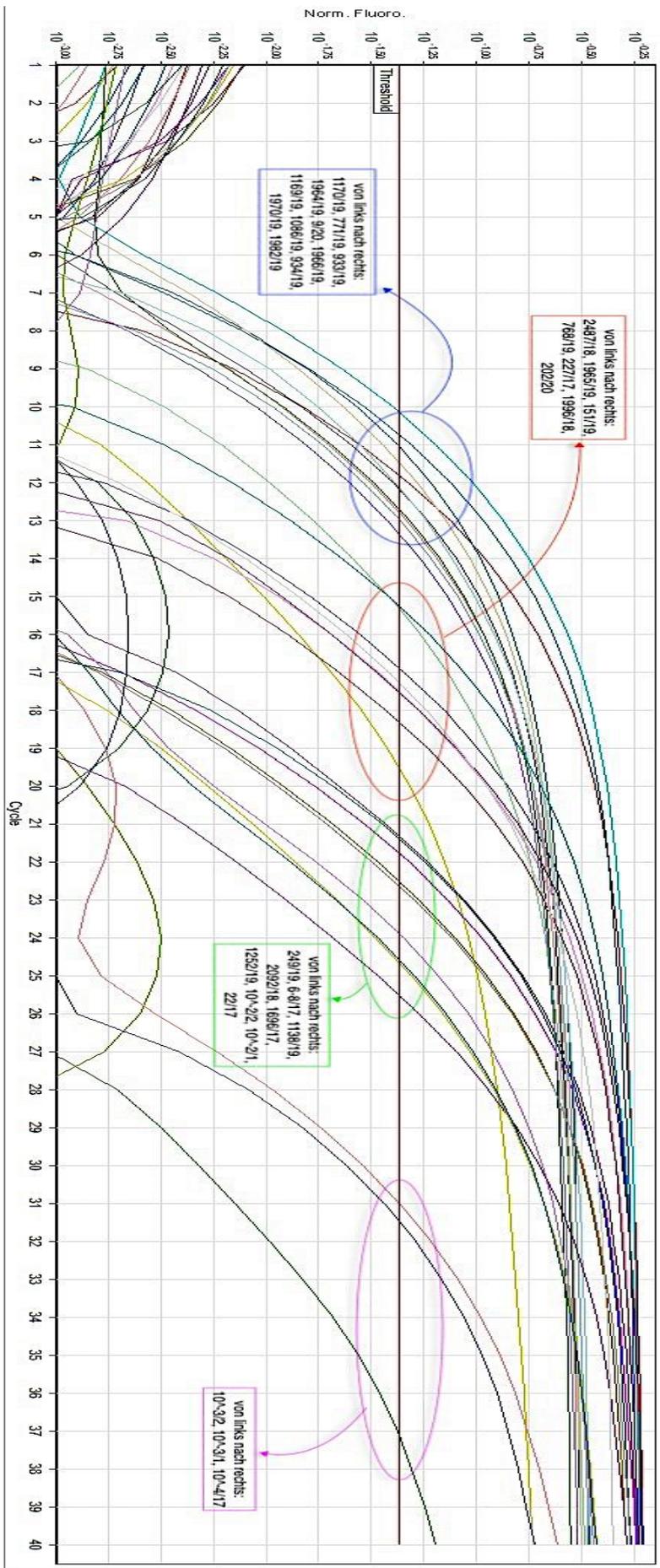
No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	Red	RHDV-1 + RHDV-2 $10^{-3}$	Standard	16,57	1,000E+07	1,727E+07
2	Yellow	RHDV-1 + RHDV-2 $10^{-4}$	Standard	21,91	1,000E+06	1,247E+06
3	Blue	RHDV-1 + RHDV-2 $10^{-5}$	Standard	26,85	1,000E+05	1,091E+05
4	Purple	RHDV-1 + RHDV-2 $10^{-6}$	Standard	33,07	1,000E+04	5,090E+03
5	Pink	RHDV-1 + RHDV-2 $10^{-7}$	Standard	37,39	1,000E+03	6,073E+02
6	Light Blue	RHDV-1 + RHDV-2 $10^{-8}$	Standard		1,000E+02	
7	Teal	RHDV-1 + RHDV-2 $10^{-3}$	Standard	17,02	1,000E+07	1,387E+07

No.	Color	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
8	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-4</sup>	Standard	22,16	1,000E+06	1,102E+06
9	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-5</sup>	Standard	27,47	1,000E+05	8,041E+04
10	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-6</sup>	Standard	34,75	1,000E+04	2,226E+03
11	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-7</sup>	Standard		1,000E+03	
12	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-8</sup>	Standard	36,95	1,000E+02	7,544E+02
13	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-3</sup>	Standard	16,68	1,000E+07	1,640E+07
14	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-4</sup>	Standard	22,30	1,000E+06	1,028E+06
15	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-5</sup>	Standard	27,01	1,000E+05	1,008E+05
16	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-6</sup>	Standard	34,24	1,000E+04	2,870E+03
17	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-7</sup>	Standard	37,40	1,000E+03	6,041E+02
18	■	RHDV-1 + RHDV-2 10 <sup>-8</sup>	Standard	39,39	1,000E+02	2,263E+02
19	■	ntc	NTC			
20	■	ntc	NTC			

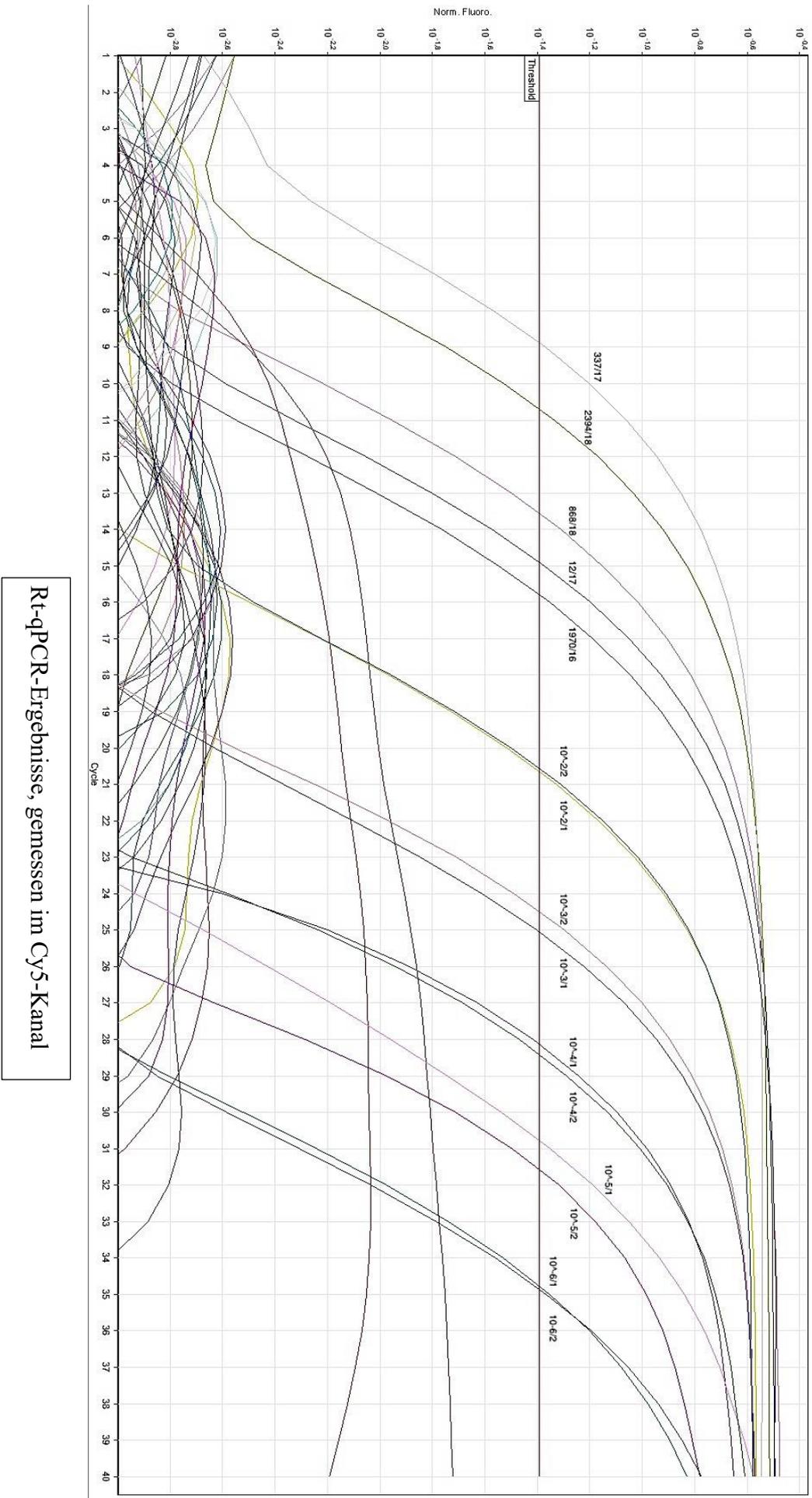
Bis zu einer Konzentration von 10<sup>4</sup> GE/Reaktion waren alle Replikate positiv. 10<sup>3</sup> GE/Reaktion war nur in zwei Replikaten nachweisbar und 10<sup>2</sup> ebenfalls in zwei Replikaten.

### 4.3. Überprüfung der Duplex-PCR in der Standarddiagnostik

Einunddreißig Nukleinsäureextrakte von Proben, die zwischen 2017 und 2020 im Rahmen der Routinediagnostik im Institut für Virologie mittels RT-qPCR (Monoplex) positiv auf RHDV-1 bzw. RHDV-2 getestet wurden, wurden mit der Duplex-RT-qPCR nachuntersucht. Alle Ergebnisse konnten reproduziert werden.



Rt-qPCR-Ergebnisse, gemessen im FAM-Kanal



Rt-qPCR-Ergebnisse, gemessen im Cy5-Kanal

**RHDV-1**

Probennummer	Ct-Wert
868/18	13,55
2394/18	10,68
12/17	14,9
337/17	8,89
1970/16	15,79

Ct-Werte der erfassten  
Proben im FAM-Kanal

**RDHV-2**

Probennummer	Ct-Wert
9/20	11,8
202/20	19,52
151/19	16,89
249/19	21,33
768/19	17,52
771/19	10,74
933/19	11,08
934/19	12,8
1086/19	12,71
1138/19	21,78
1169/19	12,19
1170/19	10,16
1964/19	11,48
1965/19	15,36
1966/19	12,15
1970/19	13
1982/19	13,36
1252/19	23,89
1996/18	18,32
2092/18	22,52
2487/18	15,28
6-8/17	21,39
22/17	25,52
227/17	17,54
232/17	17,29
1696/17	22,65

Ct-Werte der erfassten Proben im  
Cy5-Kanal

## 5. Diskussion

Leider kommt es heute trotz einer verfügbaren Impfung immer wieder noch zu plötzlichen massenhaften Todesfällen bei Heimkaninchen. Besonders betroffen ist auch die Wildpopulation (ORF-Online, 2020). Das größte Problem dabei ist, dass für RHD in Österreich keine Melde- oder Anzeigepflicht besteht und es somit ohne zentrale Erfassung der Infektionen keine validen Daten zu der tatsächlichen Infektionssituation geben kann (FLI, 2020). Eine Untersuchung einer Probe auf RHDV-1 bzw. RHDV-2 ist mit 30-50€ meist eine kostspielige Angelegenheit für Tierbesitzer, weil sie nur bei bereits toten Tieren verlässlich durchführbar ist (FLI, 2017). Die Motivation, bei jedem verstorbenen Tier Diagnostik zu betreiben, hält sich demnach oft in Grenzen, wodurch es leider kaum möglich ist, Infektionsherde zu finden und in Schach zu halten. Verendete Wildtiere werden nicht immer gefunden, zudem gibt es kaum wirksame Maßnahmen zum Schutz der Populationen. Beide Virusvarianten sind hoch infektiös und überleben lange in der Umwelt, Tiere, die die Infektion überleben, werden zu Dauerausscheidern und durch die intermittierende Ausscheidung ist der sichere Nachweis einer Infektion schwer (FLI, 2017) - all diese Faktoren machen es beinahe unmöglich, das Virus einzudämmen.

Heutzutage wurde das klassische RHD-1-Virus in Europa weitestgehend durch die neue Variante RHDV-2 abgelöst. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben weisen zwar auf eine Dominanz von RHDV-2 hin, wichtig nochmal anzumerken ist aber, dass es sich bei den hier getesteten Proben nicht um eine repräsentative Stichprobe handelt, sondern lediglich um die, in den letzten Jahren am Institut für Virologie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien eingelangten und bereits positiv getesteten Proben.

Da die neue Variante des RHD-Virus nicht nur Kaninchen, sondern auch Hasen infiziert (FLI, 2017), wäre es zukünftig wichtig, zum Schutz der Wildpopulationen von beiden Tierarten zu versuchen, die Ausbreitung der Viren einzudämmen. Dies könnte durch eine Impfflicht von draußen gehaltenen Kaninchen oder durch ein gezieltes Monitoring von Infektionsausbrüchen erreicht werden. Außerdem wäre es wichtig, Kaninchenhalter, Züchter sowie die Jägerschaft auf die Dringlichkeit des Problems aufmerksam zu machen und, in Bezug auf Prophylaxe, Diagnostik und Dekontamination, klare, einheitliche Empfehlungen zum Umgang mit dieser Tierseuche auszusprechen.

Jedenfalls sollte bei akuten und perakuten Todesfällen von Kaninchen immer auf beide Viren getestet werden, da sie sich anhand der Sektionsbefunde alleine nicht unterscheiden lassen und ein RNA-Nachweis den Sektionsbefund stets untermauern sollte. Gerade in solchen Fällen ist es immer von praktischer Relevanz, in einem qPCR-Ansatz direkt auf beide Viren testen zu können.

Durch die im Rahmen dieser Diplomarbeit etablierte Duplex-RT-qPCR zum gleichzeitigen Nachweis von RHDV-1 und RHDV-2, können Proben in Zukunft zu einem günstigeren Preis untersucht und somit kann hoffentlich dazu beigetragen werden, dass die Motivation zu testen etwas steigt und dadurch wiederum Infektionsherde früher erkannt und eliminiert werden können.

Die Etablierung einer Duplex-qPCR ist nicht immer möglich – es müssen viele Faktoren mitspielen, damit eine Duplex-qPCR auch erfolgreich durchgeführt werden kann: Die Temperaturen der einzelnen Phasen müssen bei den Protokollen, die man zusammenführen möchte, gleich, ähnlich oder zumindest noch zueinander anpassbar sein und danach immer noch funktionieren. Außerdem dürfen die Primer der verschiedenen Template-DNAs nicht miteinander interagieren oder Primer-Dimere bilden. Durch die erhöhte Menge an Primern kann es besonders in der ersten Aufheizphase des Thermocyclers zu einem unspezifischen Anlagern der Primer und dadurch zur Bildung von unspezifischen Produkten kommen.

Bedenken sollte man auch die vorliegenden Konzentrationen der einzelnen DNAs – unterscheiden sie sich stark, kann es passieren, dass eine DNA bevorzugt amplifiziert und eine andere inhibiert wird, dann muss man oft in mehreren Versuchen die Konzentrationen und Mengen der Primer, Polymerase, des Puffers etc. anpassen.

Im Fall dieser Arbeit stimmten die Annealingtemperaturen der beiden Protokolle von vornherein überein, was eine gute Voraussetzung für eine eventuell gut funktionierende Duplex-qPCR war. Bereits die ersten Vorversuche zeigten, dass eine Kombination der Primer- und SONDENSSETS grundsätzlich möglich sind.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde die maximal detektierbare verdünnte Konzentration der Singleplex-qPCRs im Vergleich zur Duplex-qPCR anhand einer

standardisierten Verdünnungsreihe überprüft. Es wurde eine Konzentration der Plasmide von  $10^{10}$  GE/ $\mu$ l hergestellt und daraus dann eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-8}$  erstellt. Damit waren, wie aus den Tabellen auf den Seiten 25-33 zu entnehmen, die Konzentrationen jeder Verdünnung bekannt und somit die beiden PCRs vergleichbar.

In den jeweils als Monoplex im Dreifachansatz durchgeführten PCRs erkannte die PCR sowohl bei RHDV-1, gemessen im FAM-Kanal, als auch bei RHDV-2, gemessen im Cy5-Kanal, stets bis zu einer Verdünnung von  $10^{-7}$  die Plasmide als positiv, die Verdünnung  $10^{-8}$  wurde nicht mehr erkannt und die Negativkontrollen blieben wie erwartet und gewünscht negativ. Man kann also festhalten, dass die Monoplex-PCR jeweils RHDV-1 und RHDV-2 bis zu einer Konzentration von  $10^3$  GE/ $\mu$ l sicher erkennt.

Die Duplex-PCR mit derselben Verdünnungsreihe konnte im FAM-Kanal ebenfalls bis zu einer Konzentration von  $10^3$  GE/Reaktion nachweisen und zeigte die Verdünnung  $10^{-8}$ , sowie die Negativkontrollen als negativ an.

Im Cy5-Kanal schwankten die gemessenen Ergebnisse der RHDV-2-Plasmide. Die Verdünnung  $10^{-7}$  konnte einmal nicht gemessen werden, dafür wurde die Verdünnung  $10^{-8}$  zweimal erkannt. Das zeigt wiederum, dass in diesem Bereich mit diesen geringen Konzentrationen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schwanken kann. Je mehr Replikate im Bereich des Detektionslimits einer PCR angesetzt werden, desto exakter kann dieses bestimmt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Duplex-qPCR vergleichbare Ergebnisse zu denen der Monoplex-PCRs lieferte und sich somit zur Diagnostik von RHDV-1 und RHDV-2 eignet. Die praktische Anwendung im Diagnostikalltag wurde dann aber nochmals überprüft.

Um die neu entwickelte Duplex-qPCR auf ihre Praxistauglichkeit und nochmal ihre Zuverlässigkeit zu testen, wurden die in den letzten Jahren im Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien eingelangten und bereits diagnostizierten Proben nochmals getestet, diesmal allerdings eben mit der neuen Duplex-qPCR. Da RHDV in den letzten Jahren immer mehr von RHDV-2 verdrängt wurde, gab es leider nur 5 für RHDV-1

positiv getesteten Proben. Für RHDV-2 wiederum konnten insgesamt 26 Proben genutzt werden.

Die Duplex-PCR lieferte bei allen Proben gleiche Ergebnisse wie die der Singleplex-PCRs: Jede positive Probe wurde als solche erkannt und konnte dem entsprechenden Virus zugeordnet werden und es wurde keine einzige Probe als falsch positiv oder falsch negativ von der Duplex-PCR gewertet, somit konnten alle Ergebnisse reproduziert werden.

Abschließend kann man also festhalten, dass mit dieser Arbeit gezeigt wurde, dass mit der neu etablierte Duplex-RT-qPCR für diagnostische Zwecke ausreichend aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden konnten und diese in Zukunft in der Diagnostik von RDHV-1 und RHDV-2 eingesetzt werden kann.

## 6. Zusammenfassung

Das Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) trat das erste Mal 1984 in China auf, führte zu sehr starken Verlusten in der dortigen Kaninchenpopulation und verbreitete sich von da an relativ rasant über mehrere Kontinente hinweg. 2010 wurde in Frankreich dann eine neue Variante des Virus entdeckt, die dieselben Symptome hervorrief, die ursprüngliche Form fast vollständig verdrängte und RHDV-2 genannt wurde.

Das RHDV-Virus gehört zur Familie der Caliciviridae und zur Gattung Lagovirus, ist ikosaedrisch, klein und besitzt eine einzelsträngige, positiv geladene RNA. Als unbehülltes Virus bleibt es in der Umwelt lange infektiös. Es wird von Tier zu Tier oder über unbelebte Vektoren übertragen und hat eine Mortalität von 90-100%. Kaninchen – bei RHDV-2 auch Feldhasen – versterben meist perakut oder akut aufgrund von Multiorganversagen begleitet von blutigen Ausflüssen, Anorexie und Apathie. Der pathologische Hauptbefund ist eine nekrotisierende Hepatitis.

Eine Besonderheit bei RHDV-1 ist die Jungtierresistenz bei Jungtieren unter 2 Monaten, die bei RHDV-2 nicht beobachtet werden kann. Grundsätzlich kann weder anhand des klinischen Bildes noch im Rahmen der pathologischen Untersuchung zwischen RHDV-1 und RHDV-2 unterschieden werden.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Duplex-RT-qPCR zum gleichzeitigen Nachweis RHDV-1- und RHDV-2-spezifischer Nukleinsäuren zu etablieren. Zudem wurden 31 RHDV-1 bzw. RHDV-2 positive Proben die in den vergangenen Jahren am Institut für Virologie untersucht wurden, mit dieser Duplex-RT-qPCR nachgetestet und die Ergebnisse zusammengefasst.

Es konnte gezeigt werden, dass die Duplex-RT-qPCR mit vergleichbarer Sensitivität die Viren detektierte und verlässlich voneinander unterscheiden kann, wie die bis dato verwendeten Singleplex-PCRs. Somit können RHDV-1 und RHDV-2-Nukleinsäurenachweise in Zukunft kostengünstiger angeboten werden. Von den 31 nachgetesteten Proben waren 5 RHDV-1 und 26 RHDV-2 positiv, alle Ergebnisse waren mit der neuen Methode reproduzierbar.

Um eine unkontrollierte Verbreitung von RHD-Viren in der Hauskaninchen-, Wildkaninchen- und Feldhasenpopulation zu verhindern, sind, neben einer kostengünstigen und effektiven Diagnostik, begleitende Maßnahmen wie Impfprophylaxe, Desinfektionsmaßnahmen und Wildtiermonitoring empfehlenswert.

## 7. Summary

Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV) first appeared in China in 1984, caused very heavy losses in the rabbit population there, and from then on spread relatively rapidly across several continents. In 2010, a new variant of the virus, RHDV-2, was discovered in France that caused the same symptoms and almost completely replaced the original form.

The RHD virus is a Calicivirus, genus Lagovirus, it is icosahedral, small, and has a single-stranded RNA. As a non-enveloped virus, it remains infectious in the environment for a long time. It is transmitted from animal to animal or by inanimate vectors and the mortality is 90-100 percent. Rabbits - including hares in the case of RHDV-2 - usually die peracutely or acutely due to multiorgan failure accompanied by bloody discharge, anorexia, and apathy. The main pathological finding is necrotizing hepatitis.

A distinctive feature of RHDV-1 is juvenile resistance in young animals under the age of 2 months, which is not observed in RHDV-2. Basically, no distinction can be made between RHDV-1 and RHDV-2 based on either the clinical picture or pathological examination.

The aim of this diploma thesis was to establish a duplex RT-qPCR for a simultaneous detection of RHDV-1- and RHDV-2-specific RNA. In addition, 31 RHDV-1 or RHDV-2 positive samples that were examined at the Institute of Virology of the University of Veterinary Medicine Vienna in the past years were retested with this new duplex RT-qPCR and the results were compared.

It could be shown that the duplex RT-qPCR detected and reliably distinguished the viruses with comparable sensitivity as the singleplex PCRs used to date. Thus, RHDV-1 and RHDV-2 RNA detections can be offered at a lower cost in the future. Of the 31 samples retested, 5 were RHDV-1 positive and 26 were RHDV-2 positive; all results were reproducible with the new method.

To prevent uncontrolled spread of RHD viruses in the domestic rabbit, wild rabbit and brown hare population, accompanying measures such as vaccination prophylaxis, disinfection measures and wildlife monitoring are recommended, in addition to low-cost and effective diagnostics.

## 8. Literaturverzeichnis

Abrantes, J. et al., 2013. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012-2013. *Emerg Infect Dis*, pp. 1900-1902.

AGES, 2020. *www.ages.at*. [Online]

Available at: <https://www.ages.at/themen/krankheitserreger/rhd-haemorrhagische-krankheit-der-kaninchen/tab/1/>

[Zugriff am 25 03 2020].

Alonso, C. et al., 1998. Programmed cell death in the pathogenesis of rabbit hemorrhagic disease. *Arch Virol*, pp. 321-332.

Anon., 2000. Rabbit calicivirus infection confirmed in Iowa rabbitry. *Journal of the American Veterinary Medical Association Vol. 216* , 15 May, pp. 1537-1537.

Bárcena, J. G. B. A. I. e. a., 2015. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and new RHDV2 virus antigenicity, using specific virus-like particles. *Vet Res 46*, 24 09.

Bonvehi, C. et al., 2019. Clinicopathologic findings of naturally occurring Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2 infection in pet rabbits. *Veterinary Clinical Pathology*, pp. 89-95.

Chasey, D. et al., 1995. Development of a diagnostic approach to the identification of rabbit haemorrhagic disease. *Vet Rec.*, 12 08, pp. 158-160.

Cooke B.D., F. F., 2002. Rabbit haemorrhagic disease and the biological control of wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in Australia and New Zealand. *Wildlife Research* , 30 12, pp. 689-706.

Dalton, K. et al., 2012. Variant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus in Young Rabbits, Spain. *Emerging Infections Diseases Vol. 18*.

F.M. Cancellotti, M. R., 1991. Epidemiology and current situation of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome in Italy. *Rev. Sci. Tech.* , pp. 409-422.

Ferreira, P., Costa-e-Silva, A. & Aguas, A., 2006. Liver disease in young rabbits infected by calicivirus through nasal and oral routes. *Research in Veterinary Science*, pp. 362-365.

Ferreira, P. et al., 2004. Transient decrease in blood heterophils and sustained liver damage caused by calicivirus infection of young rabbits that are naturally resistant to rabbit haemorrhagic disease. *Research in Veterinary Science* , pp. 83-94.

FLI, 2013. *Friedrich-Loeffler-Institut*. [Online]

Available at: [https://www.ljv-nrw.de/media/1399925596\\_fli\\_information\\_rhd\\_virus20131021.pdf](https://www.ljv-nrw.de/media/1399925596_fli_information_rhd_virus20131021.pdf)

[Zugriff am 12 09 2020].

FLI, 2017. *Friedrich-Loeffler-Institut*. [Online]

Available at:

[https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar\\_derivate\\_00002514/FLI-Information-FAQ-RHDV-2017-05-02.pdf](https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00002514/FLI-Information-FAQ-RHDV-2017-05-02.pdf)

[Zugriff am 14 09 2020].

FLI, 2020. *www.fli.de*. [Online]

Available at: [https://www.fli.de/de/aktuelles/tierseuchengeschehen/haemorrhagische-kaninchenkrankheit/?sword\\_list%5B0%5D=rhd](https://www.fli.de/de/aktuelles/tierseuchengeschehen/haemorrhagische-kaninchenkrankheit/?sword_list%5B0%5D=rhd)

[Zugriff am 25 03 2020].

FLI, 2020. *www.fli.de*. [Online]

Available at: <https://www.fli.de/de/aktuelles/tierseuchengeschehen/haemorrhagische-kaninchenkrankheit/>

[Zugriff am 14 09 2020].

GenBank, 2018. *GenBank*. [Online]

Available at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_001543.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001543.1)

[Zugriff am 14 04 2021].

GenBank, 2020. *GenBank*. [Online]

Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT586027>

[Zugriff am 19 04 2021].

Green, K. et al., 2000. Taxonomy of the caliciviruses.. *J Infect Dis.*, 05, pp. 322-30.

Gregg D.A., H. C. M. R. B. M., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in Mexico: epidemiology and viral characterization. *Rev. Sci. Tech.* , pp. 435-451.

Gregg, D. & House, C., 1989. Necrotic hepatitis of rabbits in Mexico: a parvovirus.. *The Veterinary Record*, 01 12, pp. 603-604.

Hall, R. et al., 2015. Emerging rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDVb), Australia. *Emerg. Infect. Dis.*, pp. 2276-2278.

Hall, R. et al., 2017. Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia. *Veterinary Record* , 04 02.

Hillenbrand, P., Parbhoo, S., Jedrychowski, A. & Sherlock, S., 1974. Significance of intravascular coagulation and fibrinolysis in acute hepatic failure. *Gut*, pp. 83-88.

Impfleitlinien der Österreichischen Tierärztekammer, 2., 2017. *Österreichische Tierärztekammer*. [Online]

Available at:

[https://www.tieraerztekammer.at/fileadmin/daten/downloads/DIV\\_Downloads\\_Umlage...\\_/Merkblaetter\\_Impfleitlinien\\_2017\\_OEFFENTLICH.pdf](https://www.tieraerztekammer.at/fileadmin/daten/downloads/DIV_Downloads_Umlage..._/Merkblaetter_Impfleitlinien_2017_OEFFENTLICH.pdf)

[Zugriff am 26 08 2020].

- Jansohn, M. & Rothhämel, S., 2012. *Gentechnische Methoden*. 5. Auflage Hrsg. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag .
- Jung, J. et al., 2000. Apoptosis in Rabbit Haemorrhagic Disease. *J. Comp. Path. Vol. 123*, pp. 135-140.
- Kimura, T. et al., 2001. Distribution of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus RNA in Experimentally Infected Rabbits. *J. Comp. Path. Vol. 124*, pp. 134-141.
- Le Gall-Reculé, G. et al., 2013. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Veterinary Research*, p. 81.
- Le Gall-Recule, G. et al., 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Veterinary Rabbit*, pp. 137-138.
- Lenz, M., 2015. Kaninchenkrieg in Australien. *Spektrum - Die Woche Nr. 14*, 02 04.
- Leuthold, M., Dalton, K. & Hansmann, G., 2015. Structural Analysis of a Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Binding to Histo-Blood Group Antigens. *Journal of Virology* 89, 02.
- Liu, S., Xue, H., Pu, B. & Qian, N., 1984. A new viral disease in rabbits. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine Vol. 16 No. 6*, pp. 253-255.
- Lopes, A. et al., 2015. Is the New Variant RHDV Replacing Genogroup 1 in Portuguese Wild Rabbit Populations?. *Viruses*, pp. 27-36.
- Mahar, J. et al., 2018. Rabbot Hemorrhagic Disease Virus 2 (RHDV2; GI.2) Is Replacing Endemic Strains of RHDV in the Australian Landscape within 18 Months of Its Arrival. *Journal of Virology*, pp. 1-15.

Marcato, P. et al., 1991. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome. *Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz. 10*, pp. 371-392.

Marques, R. et al., 2012. Early inflammatory response of young rabbits attending natural resistance of calicivirus (RHDV) infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , pp. 181-188.

Meyers, G., Wirblich, C. & Thiel, H.-J., 1991. Rabbit hemorrhagic disease virus - molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology, Volume 184, Issue 2*, October, pp. 664-676.

Mikami, O. et al., 1999. Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus. *Research in Veterinary Science 66*, pp. 237-242.

Neave, M. et al., 2018. Robust Innate Immunity of Young Rabbits Mediates Resistance to Rabbit Hemorrhagic Disease Caused by Lagovirus Europaeus GI.1 But Not GI.2. *Viruses*, p. 512.

Neimanis, A. et al., 2017. Arrival of rabbit haemorrhagic disease virus 2 to northern Europe: Emergence and outbreaks in wild and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Sweden. *Transbound Emerg Dis.*, pp. 1-8.

Neimanis, A. et al., 2018. Elucidation of the pathology and tissue distribution of Lagovirus europaeus GI.2/RHDV2 (rabbit haemorrhagic disease virus 2) in young and adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Research* , p. 46.

Nowotny, N. et al., 1997. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene. *Arch Virol* .

Ohlinger, V. F. et al., 1990. Identification and Characterization of the Virus Causing Rabbit Hemorrhagic Disease. *Journal of Virology*, 07, pp. 3331-3336.

OIE, W. O. f. A. H., 2020. *www.oie.int*. [Online]  
Available at: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>  
[Zugriff am 15 04 2020].

ORF-Online, h. W., 2020. *wien.orf.at*. [Online]  
Available at: <https://wien.orf.at/stories/3059440/>  
[Zugriff am 14 09 2020].

Park NY, C. C. K. J. C. S. C. Y. J. B. K. D. Y. J., 1987. An outbreak of viral haemorrhagic pneumonia (tentative name) of rabbits in Korea. *Journal of the korean veterinary medical association, Volume 23 Issue 9*, pp. 603-610.

Park, J. & Itakura, C., 1992. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in tissues by immunohistochemistry. *Research in Veterinary Science*, pp. 299-306.

Parra, F. & Prieto, M., 1990. Purification and Characterization of a Calicivirus as the Causative Agent of a Lethal Hemorrhagic Disease in Rabbits. *Journal of Virology*, 08, pp. 4013-4015.

Produktbeschreibung Nobivac Myxo-RHD-plus, M. 2., 2021. *MSD Tiergesundheit*. [Online]  
Available at: <https://www.msd-tiergesundheit.de/produkte/nobivac-myxo-rhd-plus/>  
[Zugriff am 07 09 2021].

Qi, R. Z. J. M. Q. e. a., 2019. Bioinformatics analysis of capsid protein of different subtypes rabbit hemorrhagic disease virus. *BMC Vet Res* 15, 27 11.

Rake, M., Flute, P., Pannell, G. & Williams, R., 1970. Intravascular coagulation in acute hepatic necrosis. *The Lancet Vol. 295*.

Ruvoen-Clouet, N. et al., 2000. Binding of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus to Antigens of the ABH Histo-Blood Group Family. *Journal of Virology* , pp. 11950-11954.

Schirrmeier, H. & König, P., 2019. *AVID-Methodensammlung: AVID-Methode-VIR01 - RHDV/EBHSV*. [Online]

Available at:

[http://avid.dvg.net/fileadmin/Bilder/PDF\\_AVID\\_Alt/website/Methoden\\_ab\\_2016/AVID-Methode\\_VIR01\\_RHDV\\_EBHSV\\_v\\_2019\\_07.pdf](http://avid.dvg.net/fileadmin/Bilder/PDF_AVID_Alt/website/Methoden_ab_2016/AVID-Methode_VIR01_RHDV_EBHSV_v_2019_07.pdf)

[Zugriff am 26 08 2020].

Schwarzmann, T., 2020. *Tierklinik Schwarzmann*. [Online]

Available at: <http://www.tierklinik.at/chinaseuche-bei-kaninchen-ein-neues-ernstzunehmendes-problem/>

[Zugriff am 12 09 2020].

Selbitz, H., Truyen, U. & Valentin-Weigand, P., 2015. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. 10. Auflage Hrsg. Stuttgart: Enke Verlag.

Shien, J., Shieh, H. & Lee, L., 2000. Experimental infections of rabbits with rabbit haemorrhagic disease virus monitored by polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science*, pp. 255-259.

Teifke, J., Reimann, I. & Schirrmeier, H., 2002. Subacute Liver Necrosis after Experimental Infection with Rabbit Haemorrhagic Disease Virus (RHDV). *J. Comp. Path.* , pp. 231-234.

Thiemann, F., Cullen, P. & Klein, H., 2014. *Molekulare Diagnostik - Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik*. 2. Auflage Hrsg. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Ueda, K., Park, J.-H., Ochiai, K. & Itakura, C., 1992. Disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbit haemorrhagic disease. *Japanese Journal of Veterinary Research*, pp. 133-141.

Velarde, R. et al., 2017. Spillover Events of Infection of Brown Hares (*Lepus europaeus*) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain. *Transboundary and Emerging Disease* , pp. 1750-1761.

Veterinärmedizinische Universität, W., 2016. [www.vetmeduni.ac.at](http://www.vetmeduni.ac.at). [Online]

Available at:

<https://www.vetmeduni.ac.at/de/infoservice/news/detail/artikel/2016/12/05/rhdv-2/>

[Zugriff am 25 03 2020].

Vet, S., 2019. *StIKo Vet*. [Online]

Available at: <https://stiko-vet.fli.de/de/empfehlungen/>

[Zugriff am 12 09 2020].

ViralZone, S. I. o. B., 2011. *ViralZone*. [Online]

Available at: <https://viralzone.expasy.org/32>

[Zugriff am 14 04 2021].

Weissenböck, H. & Fuchs, A., 1992. Comparative Histopathological Study of Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD) and European Brown Hare Syndrome (EBHS). *J. Comp. Path.* , pp. 103-113.

Westcott, D. et al., 2014. Incursion of RHDV2-like variant in Great Britain. *Veterinary Record*, p. 333.

Wirblich, C. et al., 1994. European Brown Hare Syndrome Virus: Relationship to Rabbit Hemorrhagic Disease Virus and Other Caliciviruses. *Journal of Virology* , 08, pp. 5164-5173.

WY, X., 1991. Viral haemorrhagic disease of rabbits in the People's Republic of China: epidemiology and virus characterisation. *Rev Sci Tech*, pp. 393-408.

Xu, Z. & Chen, W., 1989. Viral haemorrhagic disease in rabbits: A review. *Veterinary Research Communications*, pp. 205-212.