

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Virologie
(Leiter: Univ. Prof. Dr.vet.med. Hans Tillmann Rümenapf)

**Vergleich zweier RT-qPCRs zum Nachweis und zur Quantifizierung ECoV-
spezifischer Nukleinsäuren aus Kotproben von Pferden**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Victoria Steffel

Wien, im Juni 2022

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Hans Tillmann Rügenapf; Institut für Virologie, Leitung,
Veterinärmedizinische Universität Wien

Mitbetreuerin: Dr.ⁱⁿ med. vet. Angelika Auer; Institut für Virologie, Diagnostikabteilung,
Veterinärmedizinische Universität Wien

Mitbetreuerin: Dr.ⁱⁿ med. vet. Kerstin Seitz; Institut für Virologie, Arbeitsgruppe Rügenapf,
Veterinärmedizinische Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Klassifizierung	6
1.1.1. frühere Klassifizierung	8
1.2. Geschichte des Virus	9
1.2.1. Erstentdeckung von equinem Coronavirus bei Fohlen	9
1.2.2. Erstisolierung von ECoV bei Fohlen	10
1.3. Das Virion der Coronaviren	10
1.4. Das Genom von ECoV Stamm NC99	12
1.4.1. ORF 1a (Nukleotide 210-13499) und ORF 1b (Nukleotide 13478-21595)	12
1.4.2. ORF2 (Nukleotide 21610-22446)	12
1.4.3. ORF3 (Nukleotide 22458-23729)	13
1.4.4. ORF4 (Nukleotide 23744-27835)	13
1.4.5. ORF5 (Nukleotide 27825-27947)	13
1.4.6. ORF6 (Nukleotide 28076-28405)	14
1.4.7. ORF7 (Nukleotide 28392-28646)	14
1.4.8. ORF8 (Nukleotide 28661-29353)	14
1.4.9. ORF9a (Nukleotide 29363-30703)	15
1.4.10. ORF9b (Nukleotide 29424-30044)	15
1.5. Klinik	16
1.5.1. klinisches Erscheinungsbild	16
1.5.2. Differentialblutbild	16
1.5.3. Blutchemie	16
1.5.4. Übertragung	16
1.6. ECoV-Ausbrüche	17
1.6.1. Japan – Tokachi	17
1.6.2. USA – Kalifornien, Texas, Wisconsin, Massachusetts	18
1.6.3. USA – Kalifornien, Idaho	19
1.6.4. Österreich	20
1.6.5. Japan – Tokio	21
1.7. Auftreten von ECoV in nicht-Ausbruchssituationen	21
1.7.1. Europa – Frankreich	21

1.7.2.	Irland.....	22
1.7.3.	Vereinigtes Königreich	22
1.7.4.	USA – Washington	23
1.7.5.	USA – Washington	23
1.7.6.	USA – Kalifornien	24
1.7.7.	Israel	24
1.8.	Pathologische Befunde	25
1.9.	Ausscheidung	26
1.9.1.	Ausscheidung mit dem Kot	26
1.9.2.	Ausscheidung im Nasensekret.....	27
1.10.	Koinfektionen	27
1.11.	Fohlen.....	28
1.12.	Experimentelle Infektionen	29
1.13.	Diagnostik	32
1.13.1.	PCR	32
1.13.2.	bekannte PCRs zum Nachweis von ECoV	33
2.	Ziel der Arbeit.....	38
3.	Material und Methode.....	39
3.1.	BetaCoV1-RT-qPCR	39
3.2.	ECoV_N-Gen-RT-qPCR.....	41
3.3.	Herstellung eines RNA-Standards	42
3.3.1.	Durchführung einer konventionellen RT-PCR.....	42
3.3.2.	Aufreinigung des PCR-Produkts aus dem Gel	43
3.3.3.	T-Vektor Klonierung	44
3.3.4.	Plasmidpräparation (Minis).....	44
3.3.5.	Testverdau der Plasmid-DNA.....	45
3.3.6.	Sequenzierung	46
3.3.7.	Plasmidpräparation (Midis).....	46
3.3.8.	Linearisierung	47
3.3.9.	Transkription	47
3.3.10.	Aufreinigung der RNA.....	48
3.4.	Herstellung einer Verdünnungsreihe des Transkripts ECoV_N	49

3.5. Durchführung der BetaCoV1-RT-qPCR und ECoV_N-Gen-RT-qPCR zum Vergleich ECoV positiver Feldproben	49
3.5.1. BetaCoV1-RT-qPCR (Feldproben).....	50
3.5.2. ECoV-N_Gen-RT-qPCR (Feldproben).....	50
3.5.3. Quantifizierung der Feldproben (GE/g Probe).....	50
4. Ergebnisse	51
4.1. RT-qPCR der Verdünnungsreihen der Transkripte BetaCoV_TR und ECoV_N	51
4.1.1. RT-qPCR einer Verdünnungsreihe des Transkripts BetaCoV_TR im Doppelansatz.....	51
4.1.2. RT-qPCR einer Verdünnungsreihe des Transkripts ECoV_N im Doppelansatz.....	53
4.2. Vergleich der BetaCoV1-RT-qPCR und der ECoV_N-Gen-RT-qPCR anhand von 25 Feldproben	55
4.2.1. Analyse von 25 Feldproben unter Verwendung der BetaCoV1-RT-qPCR.....	55
4.2.2. Analyse von 25 Feldproben unter Verwendung der ECoV-N_Gen-RT-qPCR	57
5. Diskussion	61
6. Zusammenfassung	66
7. Abstract.....	67
8. Literaturverzeichnis	68

1. Einleitung

1.1. Klassifizierung

Vertreter der Genera *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* und *Gammacoronavirus* werden der Unterfamilie der *Orthocoronavirinae* zugeordnet. Diese wiederum geht aus der Familie der *Coronaviridae* hervor. Die Familie entstammt der Ordnung *Nidovirales*. Den vier beschriebenen Genera sind Subgenera zugeordnet, die sich wiederum in verschiedene Spezies und Vertreter aufteilen.

(NCBI Taxonomy Browser.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=2501931&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> Zugriff 09.02.2022).

Genus	Subgenus	Spezies	
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Duvinacovirus</i>	<i>Humanes Coronavirus</i> 229 E (HCoV-229E)	
	<i>Pedacovirus</i>	<i>Porzines</i> <i>epidemisches</i> <i>Diarrhoe Virus</i> (PEDV)	
	<i>Tegacovirus</i>	<i>Alphacoronavirus 1</i>	Canines Coronavirus (CCoV) Felines Coronavirus (FCoV) Transmissibles Gastroenteritisvirus (TGEV)

Betacoronavirus	<i>Embecovirus</i>	<i>Betacoronavirus 1</i>	Bovines Coronavirus (BCoV) Canines respiratorisches Coronavirus (CRCoV) Humanes Coronavirus OC43 (HCoV-OC43) Equines Coronavirus (ECoV) Porzines hämagglutinierendes Enzephalomyelitisvirus (PHEV)
		<i>Murines Coronavirus</i>	Murines Hepatitisvirus (MHV)
	<i>Sarbecovirus</i>	<i>Severe acute respiratory syndrom related coronavirus</i>	Severe acute respiratory syndrom related coronavirus (HCoV-SARS) Severe acute respiratory syndrom related coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
	<i>Merbecovirus</i>	<i>Middle east respiratory syndrom related coronavirus (MERS)</i>	
Deltacoronavirus	<i>Buldecovirus</i>	<i>Coronavirus HKU15</i>	Porzines Coronavirus HKU15

<i>Gammacoronavirus</i>	<i>Aviäres Coronavirus</i>	<i>Igacovirus</i>	Infektiöses Bronchitis Virus (IBV) Turkey Coronavirus (TCoV)
--------------------------------	--------------------------------	-------------------	--

Tab. 1: Einige Beispiele der Genera *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*- und *Gammacoronavirus*.

(NCBI Taxonomy Browser.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=2501931&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> Zugriff 22.02.2022).

1.1.1. frühere Klassifizierung

Die phylogentische Analyse von Coronaviren basierte auf den Aminosäuresequenzen von pp1a, pp1ab, S, E, M und N. Damit kam eine Unterteilung in drei große Gruppen, Gruppe 1 (*HCoV-229E*, *CCoV*, *FCoV*, *TGEV*, *PEDV*), Gruppe 2, die sich in Gruppe 2a (*MHV*, *HCoV-OC43*, *BCoV*, *PHEV*) und Gruppe 2b (*SARS-CoV*) aufteilte und Gruppe 3 (*IBV*, *TCoV*) zustande. *ECoV* ist am engsten mit *BCoV*, *HCoV-OC43* und *PHEV* verwandt und zählte somit zur Gruppe 2a (Zhang et al. 2007).

Einige Jahre später änderte das International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) die Bezeichnung von Gruppe 1 zu Genus *Alphacoronavirus*, von Gruppe 2 zu Genus *Betacoronavirus* und von Gruppe 3 zu Genus *Gammacoronavirus* (Woo et al. 2009).

1.2. Geschichte des Virus

1.2.1. Erstentdeckung von equinem Coronavirus bei Fohlen

Im Kot von Fohlen und adulten Pferden, die an intestinalen Erkrankungen litten, konnten bereits vor einigen Jahrzehnten coronavirusähnliche Strukturen detektiert werden (Guy et al. 2000).

Davis et al. veröffentlichte im Jahr 2000 den Fallbericht eines fünf Tage alten Quarterhorsefohlens, das seit dem zweiten Lebenstag schwere Diarrhoe zeigte. Des Weiteren wurden in der klinischen Untersuchung eine Dehydratation, Ödeme und eine Hypothermie der distalen Gliedmaßen festgestellt. Eine Blutuntersuchung ergab eine regenerative Linksverschiebung, Thrombozytopenie, Hypoproteinämie und Hypalbuminämie. Aufgrund dieser Befunde wurde als mögliche Ursache für das klinische Erscheinungsbild eine bakterielle oder virale Enterokolitis vermutet.

Der Kot des Fohlens wurde mittels Elektronenmikroskopie untersucht, hier konnten keine coronavirusähnlichen Strukturen identifiziert werden, ebenso fiel eine Bakterienkultur auf gastrointestinale Pathogene negativ aus. Ein Antigen-ELISA zum Nachweis des bovinen Coronavirus (BCoV) zeigte das Vorhandensein von Antigen im Kot an. Hierfür wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der BCoV (mit Spezifität für die Spike-Untereinheit) neutralisiert. Die serologische Untersuchung für equine Coronaviren ergab einen Titeranstieg von 1:25 auf 1:100 acht Tage nach der Erstmessung (Davis et al. 2000).

Da sich der Zustand des Fohlens verschlechterte und Komplikationen auftraten, wurde eine Euthanasie notwendig, dadurch wurde eine pathologische Untersuchung angeschlossen. Bei der immunhistochemischen Untersuchung des Dünndarms konnte coronavirales Antigen im Zytoplasma und in Zellkernen detektiert werden (Davis et al. 2000).

Es wurde vermutet, dass das gefundene Virus den *Betacoronaviren* (dazu wird unter anderem auch BCoV gezählt) angehört. Dafür hat der im ELISA eingesetzte Antikörper gesprochen, der nur mit *Betacoronaviren* reagiert. Auch die histopathologische Untersuchung, sowie ein vierfacher Anstieg des serologischen Titers, unterstützten diese Annahme (Davis et al. 2000).

1.2.2. Erstisolierung von ECoV bei Fohlen

Im Jahr 2000 konnte das equine Coronavirus erstmals isoliert werden. Im Kot eines zwei Wochen alten Fohlens, das an Fieber und wässrigem Durchfall litt, wurden durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung coronavirusähnliche Strukturen detektiert. Nach einer Virusanzucht konnte das Isolat NC99 gewonnen werden. Des Weiteren folgte ein Immun-Fluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT), bei dem Antiseren, spezifisch für BCoV und HCoV (Genus *Betacoronavirus*), verwendet wurden. Diese Untersuchung zeigte eine positive Fluoreszenz bei NC99. Bei Verwendung von TGEV- (Genus *Alphacoronavirus*) beziehungsweise IBV- (Genus *Gammacoronavirus*) spezifischen Antiseren konnte keine positive Fluoreszenz nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Die Primer der RT-PCR basierten auf der Sequenz des N-Gens von BCoV Mebus, anschließend folgte eine Klonierung und Sequenzierung des viralen Genoms. Der Vergleich der Sequenz des N-Gens von NC99 mit den Sequenzen von HCoV Stamm OC43 und den BCoV Stämmen Mebus und F15 ergab eine 89,0 bis 90,1%ige Übereinstimmung. Im Gegensatz dazu konnte bei den N-Gen-Sequenzen von TGEV (*Alphacoronavirus*) und IBV (*Gammacoronavirus*) im Vergleich mit NC99 eine Übereinstimmung von weniger als 25 % festgestellt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ECoV-NC99 den *Betacoronaviren* zugeordnet (Guy et al. 2000).

Sieben Jahre später wurde das gesamte Genom von ECoV Stamm NC99 entschlüsselt. Dazu wurden elf, sich überlappende, Fragmente des ECoV-Genoms mittels RT-PCRs amplifiziert und sequenziert (Zhang et al. 2007).

1.3. Das Virion der Coronaviren

Das Coronavirus ist ein behülltes Positivstrang-RNA-Virus (Miszczak et al. 2014, Oue et al. 2013, Zhao et al. 2019). Der Durchmesser beträgt etwa 80-160 nm (Guy et al. 2000).

Die Größe des Genoms beträgt etwa 27 bis 32 kb (Zhang et al. 2007). Die sequenzierten Genome der ECoV-Isolate NC99, Tokachi09, Obihro12-1 und Obihro12-2 betragen 30 992 (Zhang et al. 2007), 30 783, 30 916 beziehungsweise 30 916 Nukleotide ohne den 3'-Poly-A-Schwanz (Nemoto et al. 2015).

Am 5'-Ende befinden sich die, etwa zwei Drittel des gesamten Genoms eines Coronavirus umfassenden, open reading frames (ORF) 1a und 1b (Zhang et al. 2007). Diese kodieren die Replikase Polyproteine (pp) pp1a und pp1ab. Damit die Expression von pp1ab ablaufen kann, kommt es während der Translation zu einer ribosomalen Leserasterverschiebung. pp1a und pp1ab werden durch, von ORF1a kodierte, virale Proteasen verarbeitet, wodurch es zur Bildung von Nichtstrukturproteinen (nsp) kommt. Es entstehen dabei nsp1-16 (Zhang et al. 2007).

Das sich am 3'-Ende befindende proximale Drittel kodiert akzessorische Proteine und Strukturproteine (Zhang et al. 2007).

In allen Coronaviren kommen die Strukturproteine vom 5'- bis zum 3'-Ende in folgender Reihenfolge vor: S (Spikeprotein), E (Envelopeprotein), M (Membranprotein) und N (Nukleoprotein). Außerdem kann bei einigen Coronaviren das Strukturprotein HE (Hämagglutininesterase) auftreten. Dieses befindet sich dann vor dem Spikeprotein (Zhang et al. 2007).

Struktur- und akzessorische Proteine werden von, im Gegensatz zu den Replikaseproteinen, 3'-koterminalen subgenomischen mRNAs exprimiert. Diese mRNAs besitzen zusätzlich eine Sequenz, die vom 5'-Ende des Genoms abgeleitet ist (Zhang et al. 2007).

1.4. Das Genom von ECoV Stamm NC99

Das Genom von ECoV-NC99 umfasst ohne den 3'- Poly-A-Schwanz 30 922 Nukleotide. Am 5'- und 3'-Ende sind kurze, untranslatierte Regionen zu finden, der Bereich am 5'-Ende umfasst 209 Nukleotide und enthält ein kurzes ORF sowie vier Haarnadelstrukturen. Zwei dieser Strukturen sind als Signalgeber für die Replikation bei BCoV und anderen Viren der *Betacoronaviren* bekannt. Die Region am 3'-Ende umfasst 298 Nukleotide und enthält eine Haarnadelstruktur und einen Pseudoknoten, diese sind essentiell für die virale Replikation (Zhang et al. 2007).

Das Genom von ECoV-NC99 besteht aus elf open reading frames: 1a, 1b, 2-8, 9a und 9b. Die ORFs 1a und 1b kodieren die erwähnten Replikasepolyproteine pp1a und pp1ab, während die open reading frames 1-8, 9a und 9b strukturelle und akzessorische Proteine kodieren, die NS2, HE, S, p4.7, p12.7, E, M, N und I genannt werden (Zhang et al. 2007).

1.4.1. ORF 1a (Nukleotide 210-13499) und ORF 1b (Nukleotide 13478-21595)

Die ORFs 1a und 1b nehmen 21,4 kb (69 %) des Genoms von ECoV-NC99 ein. Durch die Translation von ORF1a wird ein Vorläufer von pp1a (bestehend aus 4429 Aminosäuren) generiert. Die Translation von ORF1b inkludiert eine ribosomale Leserasterverschiebung und generiert pp1ab, das aus 7128 Aminosäuren besteht. Diese Proteine werden durch virale Proteasen in 16 Nichtstrukturproteine (nsp1-16) verarbeitet und für die virale Replikation und Transkription benötigt. Im Vergleich mit anderen *Betacoronaviren* zeigt sich in nsp3 der größte Unterschied. Hier gibt es einige Insertionen und Deletionen (Zhang et al. 2007).

1.4.2. ORF2 (Nukleotide 21610-22446)

Das ORF 2 kodiert das, aus 278 Aminosäuren bestehende, nicht-sekretorische Protein NS2. Die Übereinstimmung der Aminosäuren von NS2 von ECoV mit anderen Viren der Spezies *Betacoronavirus 1*, wie BCoV, HCoV-OC43 und PHEV, schwankt zwischen 45 % und 67 % (Zhang et al. 2007).

1.4.3. ORF3 (Nukleotide 22458-23729)

Das aus 423 Aminosäuren bestehende Protein HE wird durch das ORF3 kodiert. Die verantwortliche Stelle für die Aktivität der Esterase befindet sich an den Positionen der Aminosäuren 36-39 (Zhang et al. 2007).

1.4.4. ORF4 (Nukleotide 23744-27835)

Das ORF 4 kodiert das aus 1363 Aminosäuren bestehende S-Protein. Ein Teil des S-Proteins befindet sich außerhalb der Zelloberfläche. Zwischen den Aminosäuren 768 und 769 besteht eine Spaltung, die das S-Protein in die Untereinheiten S1 und S2 unterteilt. Es wird vermutet, dass das S1-Protein eine Information für die Rezeptorbindung enthält, während das S2-Protein als Mediator für die Membranfusion dienen soll. Es wurden zwei Heptadenmuster-Regionen identifiziert, die in allen drei Gruppen der Coronaviren in ihrer Position und Sequenz konserviert sind. Diese sind essentiell für die Membranfusion. Außerdem wird vermutet, dass S2 ein Fusionsprotein besitzt. Die S-Proteine einiger Coronaviren besitzen außerdem wichtige neutralisierende Epitope. Des Weiteren sind Mutationen im S-Protein mit veränderter viraler Pathogenität und Immunogenität assoziiert (Zhang et al. 2007).

Ein Vergleich der Sequenz des S-Gens von Tokachi09 und NC99 ergab eine 99,0%ige Übereinstimmung bei den Aminosäuren und Nukleotiden, ebenso hatten sie eine identische Größe (Oue et al. 2011). Auch Oue et al. 2013 konnte im Vergleich mit anderen ECoV-Stämmen große Ähnlichkeiten (98,6-98,7 %) der Aminosäuresequenz des S-Proteins zeigen. Das spricht für eine hohe Konservierung dieses Bereichs.

1.4.5. ORF5 (Nukleotide 27825-27947)

Es wurde vorhergesagt, dass das ORF5 ein hypothetisches Protein entschlüsselt, das aus 40 Aminosäuren besteht und voraussichtlich ein molekulares Gewicht von 4,7 kDa hat. Dieses wurde als p4.7 Protein benannt, für das Protein konnte in BLASTP, PSI-BLAST oder FASTA keine nähere Übereinstimmung mit einem anderen Protein gefunden werden (Zhang et al. 2007).

Einige Jahre später konnte ein Vergleich von NC99 mit in Irland auftretenden equinen Coronaviren gezogen werden. Diese hatten im Gegensatz zu den p4.7 und folgenden Regionen von NC99 37 Deletionen. Verglichen mit Obihiro12-1, Obihiro12-2 und Tokachi09

hatten die irischen Stämme in dieser Region zwischen drei und 148 Nukleotid-Insertionen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angemerkt, dass die Regionen p4.7 und die folgende nicht-kodierende hilfreich für epidemiologische Untersuchungen sein können (Nemoto et al. 2019).

Das Isolat Tokachi09 zeigte eine Deletion von 185 Nukleotiden am 3'-Ende des S-Gens, was bedeutet, dass das ORF5, das das p4.7 Protein kodiert, nicht vorhanden war. Ob p4.7 eine Rolle in der viralen Pathogenität spielt, muss noch geklärt werden (Oue et al. 2011).

Ähnliches konnte ein Vergleich von Obihiro12-1 mit NC99 zeigen, hier waren 40 Nukleotid-Deletionen in der Region von p4.7 und den folgenden Regionen vorhanden. Es wurde schlussgefolgert, dass das p4.7-Gen nicht essentiell für die Virusverbreitung ist und außerdem für epidemiologische Untersuchungen nützlich sein kann (Oue et al. 2013).

1.4.6. ORF6 (Nukleotide 28076-28405)

Dieses ORF kodiert ein Protein, das aus 109 Aminosäuren besteht, entsprechend dem Nichtstrukturprotein p12.7 von BCoV. Es überlappen 15 Nukleotide mit dem folgenden ORF7 (Zhang et al. 2007).

Ein Aminosäuresequenzvergleich von Obihiro12-1 mit NC99 und Tokachi09 ergab eine Übereinstimmung von 99,1 %, diese Region scheint konserviert zu sein (Oue et al. 2013).

1.4.7. ORF7 (Nukleotide 28392-28646)

Das Protein E, bestehend aus 84 Aminosäuren, wird von ORF7 kodiert. Bei anderen Coronaviren gibt es deutliche Hinweise darauf, dass das E- und M-Protein gemeinsam eine Rolle in der Produktion von viralen Bestandteilen spielen. Außerdem sind diese Proteine wichtig beim Prozess des Zusammenbaus und der Ausschleusung neuer Viruspartikel aus der Wirtszelle (Zhang et al. 2007).

1.4.8. ORF8 (Nukleotide 28661-29353)

Das schon erwähnte M-Protein wird von ORF8 kodiert, es enthält 230 Aminosäuren. Das Protein ist ein großer Bestandteil der Virushülle und interagiert mit den Proteinen E, S, N und HE bei der Produktion viraler Bestandteile (Zhang et al. 2007).

1.4.9. ORF9a (Nukleotide 29363-30703)

Das N-Protein, bestehend aus 446 Aminosäuren, wird von ORF9a kodiert (Nukleotide 29363-30703). Dieses Protein ist in anderen Coronaviren multifunktional, es spielt zum Beispiel eine Rolle bei der Interaktion mit der viralen RNA zur Generierung eines viralen Nukleokapsids und interagiert mit dem M-Protein. Außerdem wird vermutet, dass das N-Protein Teil der Virusreplikation ist (Zhang et al. 2007).

Ein Vergleich des N-Gens von zwei in Irland auftretenden equinen Coronaviren ergab eine Übereinstimmung von 99,8 %. Auch der Vergleich mit Isolaten aus anderen Ländern ergab Ähnliches. Das bedeutet, dass diese Region hoch konserviert ist (Nemoto et al. 2019).

Auch in Japan kam man zu ähnlichen Ergebnissen. Die Sequenz des N-Gens des Isolats Tokachi09 zeigte eine identische Größe zu der von NC99, 98,0 % der Nukleotide beziehungsweise 97,3 % der Aminosäuren stimmten überein (Oue et al. 2011). Oue et al. 2013 kam zu einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 97,5 % (NC99) und 98,8 % (Tokachi09).

1.4.10. ORF9b (Nukleotide 29424-30044)

Das letzte open reading frame, ORF9b, liegt an den Nukleotidpositionen 29424-30044 und somit innerhalb des ORF9a. Es kodiert ein, aus 206 Aminosäuren bestehendes Protein, das als I-Protein bezeichnet wird. In einem anderen Coronavirus der *Betacoronaviren 1*, MHV, ist dieses Protein nicht essentiell für die virale Replikation oder Produktion (Zhang et al. 2007).

1.5. Klinik

1.5.1. klinisches Erscheinungsbild

Die klinischen Erscheinungen, die mit einer ECoV-Infektion einhergehen, sind vielfältig und unspezifisch.

Dazu zählen vor allem Fieber, Anorexie und Lethargie (Berryhill et al. 2019, Bryan et al. 2019, Kambayashi et al. 2021, Mattei et al. 2020, Nemoto et al. 2019, Pusterla et al. 2013, Pusterla et al. 2018). Außerdem können Koliksymptome (Auer et al. 2020, Berryhill et al. 2019, Bryan et al. 2019, Manship et al. 2019, Pusterla et al. 2018) und Veränderung der Kotkonsistenz beziehungsweise Durchfall (Auer et al. 2020, Manship et al. 2019, Mattei et al. 2020, Oue et al. 2013, Pusterla et al. 2013, Pusterla et al. 2018, Schaefer et al. 2018) auftreten.

1.5.2. Differentialblutbild

Als häufigste Veränderung im Differentialblutbild zeigt sich eine Leukopenie mit einer Lympho- und/oder Neutropenie (Berryhill et al. 2019, Bryan et al. 2019, Fielding et al. 2015, Manship et al. 2019, Oue et al. 2013, Pusterla et al. 2013, Pusterla et al. 2018). Außerdem ist eine Erhöhung der Serum-Amyloid-A Konzentration im Blut bemerkt worden (Berryhill et al. 2019, Nemoto et al. 2014).

1.5.3. Blutchemie

Fielding et al. 2015 maß bei insgesamt sechs Pferden die Ammoniumkonzentration im Blut, bei fünf Pferden lag diese im Referenzbereich, während sie bei einem Pferd, das später neurologische Symptome entwickelte und starb, deutlich erhöht war.

Auch Berryhill et al. konnte 2019 feststellen, dass die Ammoniumkonzentration von drei an ECoV erkrankten Pferden im Referenzbereich lag.

1.5.4. Übertragung

Die Übertragung des equinen Coronavirus erfolgt fäkal-oral (Nemoto et al. 2014, Schaefer et al. 2018).

1.6. ECoV-Ausbrüche

1.6.1. Japan – Tokachi

2004 wurde ein erster Ausbruch von ECoV im Obihiro Racecourse in Tokachi (Provinz Hokkaido, Japan) detektiert. Insgesamt waren 191 Pferde betroffen. (Oue et al. 2013).

Mitte Juni 2009 kam es erneut zu einem Auftreten von ECoV in dem erwähnten Stall, in dem circa 600 Kaltblutpferde eingestallt waren. Die Tiere zeigten Fieber und teilweise Diarrhoe. Hauptsächlich waren zwei bis vier Jahre alte Pferde betroffen. Insgesamt erkrankten bis Ende August 132 von circa 600 Pferden, die meisten Pferde erholten sich nach zwei bis vier Tagen wieder (Oue et al. 2011).

Die gesammelten Kot- und Nasenausflussproben wurden mittels RT-PCR auf das Vorkommen des N-Gens von ECoV untersucht. Während ECoV-RNA in den Kotproben detektiert werden konnte, fiel die RT-PCR aller Nasenausflussproben negativ aus. Danach konnte aus dem Kot nach mehreren Zellpassagen das Isolat Tokachi09 isoliert werden. Es war das erste Isolat, das von adulten Pferden, die an Fieber und intestinalen Störungen litten, gewonnen werden konnte (Oue et al. 2011).

Anschließend wurden die N- und S-Gene von Tokachi09 sequenziert. Das N-Gen von Tokachi09 zeigte eine 98,0%ige Übereinstimmung mit den Nukleotiden dieses Abschnittes von NC99, die des S-Gens lag bei 99,0 %. Die phylogenetische Analyse ergab eine engere Verwandtschaft von Tokachi09 mit NC99 als mit anderen Viren der Gruppe *Betacoronavirus 1* (zum Beispiel BCoV, HCoV und CRCoV) (Oue et al. 2011).

Zwischen Februar und April 2012 wurde im Obihiro Racecourse ein erneuter Ausbruch von ECoV festgestellt. Insgesamt zeigten 204 von circa 650 Pferden eine Erhöhung der inneren Körpertemperatur und Anorexie, einige Tiere zusätzlich Durchfall und/oder Kolik. Zwei der Pferde litten an schwerem, wässrigen Durchfall und starben. Das Alter der Pferde lag zwischen zwei und elf Jahren (Oue et al. 2013).

Kotproben, Nasentupfer und paarige Serumproben wurden von insgesamt zehn Pferden gewonnen, außerdem wurde EDTA-Blut von neun Pferden untersucht. In fünf der zehn Kotproben konnten mittels RT-PCR ECoV-spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen werden, die Ergebnisse der Nasentupfer fielen negativ aus. Die Analyse der EDTA-Blutproben ergab eine Leukopenie bei sieben Tieren. Von zwei Pferden, die wässrigen Durchfall zeigten, wurden

die Isolate Obihiro12-1 und Obihiro12-2 gewonnen. Ein Virusneutralisationstest ergab eine Serokonversion aller Serumproben zu Obihiro12-1 (Oue et al. 2013).

Die anschließende Aminosäuresequenzanalyse von Obihiro12-1 im Vergleich mit NC99 und Tokachi09 ergab eine 98,6%ige bzw. 98,7%ige Übereinstimmung mit dem N-Gen und eine 97,5%ige beziehungsweise 98,9%ige Übereinstimmung mit dem S-Gen von Obihiro12-1 (Oue et al. 2013).

Wie in 1.4.5. erwähnt, zeigte Tokachi09 im Vergleich mit NC99 eine 185 Nukleotide große Deletion, was bedeutet, dass p4.7 nicht vorhanden war. Das deutet darauf hin, dass Tokachi09 eine andere Abstammung als NC99 haben könnte (Oue et al. 2011).

Obwohl die Ursache des Ausbruchs von 2004 nicht festgestellt werden konnte, zeigte eine Analyse der genomischen Sequenz des N-Gens im Vergleich mit NC99 eine 97,8%ige Übereinstimmung. Beim Erreger von 2004 konnte eine 98,4%ige Übereinstimmung des N-Gens mit Tokachi09 und keine Deletionen in der Region von p4.7 festgestellt werden, was vermuten lässt, dass die Ausbrüche von 2004 und 2009 nicht vom gleichen Virusstamm ausgelöst wurden (Oue et al. 2011).

Unterschiede in der p4.7 Region von Obihiro12-1 und Tokachi09 zeigen, dass auch die Ausbrüche 2009 und 2011 von unterschiedlichen Stämmen verursacht wurden (Oue et al. 2013).

1.6.2. USA – Kalifornien, Texas, Wisconsin, Massachusetts

Zur etwa selben Zeit, zwischen November 2011 und April 2012, kam es in den US-Bundesstaaten Kalifornien, Texas, Wisconsin und Massachusetts zu ECoV-assoziierten Ausbrüchen, die jeweils etwa drei Wochen dauerten. Insgesamt waren 161 Pferde in die Ausbrüche verwickelt, 59 davon entwickelten klinische Symptome wie Anorexie, Fieber und Lethargie. Vier der Pferde verendeten, zwei davon entwickelten akute neurologische Störungen wie Ataxie und Festliegen, die beiden anderen wurden aufgrund schwerer Endotoxinämie euthanasiert. Die Anzahl der eingestellten Pferde in den vier Ställen betrug jeweils 28 bis 65, das durchschnittliche Alter lag bei 15 Jahren (1-29 Jahre) (Pusterla et al. 2013).

Zur Feststellung der Ursache der Symptome wurden von 44 kranken und 96 gesunden Tieren Kotproben gewonnen und mittels PCR auf einen 142 bp großen Abschnitt des N-Gens von

ECoV untersucht. So konnte festgestellt werden, dass 86 % (38 von 44) der getesteten Tiere, die eine Veränderung ihres klinischen Erscheinungsbildes zeigten, ECoV im Kot ausschieden, während bei 93 % der gesunden getesteten Pferde die PCR negativ ausfiel. Insgesamt wurde eine 91%ige Übereinstimmung mit dem klinischen Erscheinungsbild und der Detektion von ECoV in der PCR festgehalten. Die Viruslast der Tiere, die Symptome zeigten, lag zwischen 7 887 und $7,7 \times 10^7$ Äquivalenten pro Gramm Kot, die der gesunden zwischen 55 863 und $3,9 \times 10^6$ Äquivalenten pro Gramm Kot (Pusterla et al. 2013).

Anderere respiratorische Erreger (*equines Herpesvirus 1* und *4* [EHV-1, EHV-4], equines Influenzavirus [EIV], equines Arteritisvirus [EAV], *equines Rhinitis A* und *B Virus* [ERAB, ERBV]) und Pathogene des Darmtrakts (*Salmonella spp.*, *Clostridium difficile* Toxin A und B und *Neorickettsia risticii*) wurden als Ursache für das klinische Erscheinungsbild der Pferde ausgeschlossen (Pusterla et al. 2013).

Eine abschließende Sequenzanalyse eines 435 bp großen Abschnitts des N-Gens ergab eine 97,9%ige und 99,0%ige Übereinstimmung mit den Stämmen NC99 und Tokachi09 (Pusterla et al. 2013).

1.6.3. USA – Kalifornien, Idaho

Im Oktober 2013 konnten zwei ECoV-Ausbrüche in Ställen in Kalifornien und Idaho, in denen 19 beziehungsweise acht Pferde eingestallt waren, mit einer Teilnahme an der American Miniature Horse Association World Shown in Texas in Zusammenhang gebracht werden. Insgesamt 27 Kotproben von beiden Ställen wurden mittels PCR auf das Vorhandensein eines 142 bp großen Abschnitts des N-Gens von ECoV untersucht. In 56 % der Proben wurden ECoV-spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen. Kolik, Fieber, Lethargie und Inappetenz zeigten sich bei 67 % der positiv getesteten Pferde, sechs der Pferde gehörten dem Ausbruch in Kalifornien, vier dem in Idaho an (Fielding et al. 2015).

In dem Stall in Kalifornien wurden bei einem Pferd, ungefähr neun Tage nach Rückkehr von der Show, Fieber, Lethargie und Anorexie bemerkt. Innerhalb von fünf Tagen zeigten zwei weitere Pferde ähnliche Symptome. Trotz der darauffolgenden, ungefähr 14 Tage andauernden Quarantäne der drei Tiere, zeigten weitere Pferde drei Tage nach Ende der Isolation der symptomatischen Pferde eine Veränderung ihres klinischen Erscheinungsbildes. Schlussendlich konnte bei acht Pferden das equine Coronavirus im Kot nachgewiesen werden, sechs davon entwickelten variable klinische Symptome (Fielding et al. 2015).

Das Ergebnis der pathologischen Untersuchung der beiden verendeten Pferde ergab eine schwere, diffus-nekrotisierende Enteritis des einen und eine Alzheimer Typ II Astrozytose im cerebralen Kortex des anderen Pferdes. Im Inhalt des Dünndarms beider Pferde konnte mittels PCR ECoV nachgewiesen werden (Fielding et al. 2015). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der klinischen und pathologischen Untersuchungen ist unter 1.8. zu finden.

Im zweiten, mit der Show assoziierten, Ausbruch, der in Idaho festgestellt wurde, kam es zwei bis drei Tage, nachdem die vier Pferde, die an der Show teilgenommen hatten, zurückgekehrt waren, zur Entwicklung von Krankheitssymptomen bei einigen Pferden. Es wurde bei sieben von acht eingestellten Pferden ECoV nachgewiesen, 57 % davon litten an den oben erwähnten Symptomen. Die an der Show teilnehmenden Pferde zeigten zu keinem Zeitpunkt Veränderungen in ihrem klinischen Erscheinungsbild (Fielding et al. 2015).

Die Lethalität in diesen Ausbrüchen war besonders hoch und lag bei 27 % (vier Pferde) unter den positiv auf ECoV getesteten Pferden. Die Viruslast der verendeten Pferde (durchschnittlich $2,9 \times 10^7$ GE/g Kot) war signifikant höher als die der überlebenden (durchschnittlich $9,5 \times 10^4$ GE/g Kot), die aller positiv getesteten Pferde lag zwischen $1,2 \times 10^4$ und $2,4 \times 10^9$ GE/g Kot (Fielding et al. 2015).

Abschließend ist zu erwähnen, dass eine vergleichende Sequenzanalyse eines aus 435 Nukleotiden bestehenden Segment des N-Gens von Tieren aus den betroffenen Ställen in Kalifornien und Idaho eine 100%ige Übereinstimmung ergab. Diese Sequenzen hatten 97,9-99,0 % Ähnlichkeit zu den Stämmen NC99 und Tokachi09 (Giannitti et al. 2015).

1.6.4. Österreich

Auch in Österreich kam es zu einigen ECoV-assoziierten Ausbrüchen. Insgesamt wurden acht Ställe zwischen Februar 2018 und Februar 2020 beprobt. In den Ställen waren insgesamt 298 Pferde untergebracht, 54 (18 %) der Tiere zeigten Fieber, Diarrhoe oder Veränderung der Kotkonsistenz und Kolihsymptome, je nach Stall waren neun bis 69 % der Pferde davon betroffen. Mittels einer RT-qPCR zum Nachweis von *Betacoronaviren* (ursprünglich CRCoV), die für den Nachweis von ECoV validiert wurde, konnten Kotproben von 219 Pferden untersucht werden, bei 90 (41 %) gelang ein positiver Nachweis. Somit lag die Prävalenz von ECoV in den unterschiedlichen Ställen zwischen sechs und 100 %. Ein Vergleich des gesamten N-Gens mit einer 2013 analysierten Probe und einer Probe eines irischen Pferdes zeigte eine 100%ige Übereinstimmung. Es wird angenommen, dass ECoV in Österreich nicht

ubiquitär vorkommt, da eine Analyse von Kotproben von 31 Kontrollpferden aus vier unterschiedlichen Ställen negativ ausfiel (Auer et al. 2020).

1.6.5. Japan – Tokio

2020 zeigten im Tokyo Racecourse von 41 eingestellten Pferden 15, durchschnittlich 10,8 Jahre alte Pferde, Fieber, Lethargie, Anorexie und Durchfall. Drei Pferde aus diesem Stall hatten zwei Tage zuvor an einem Springturnier teilgenommen. Die aus diesem Grund folgende real time (q) RT-PCR von Kotproben zum Nachweis des N-Gens von ECoV ergab, dass 30 (73 %) Pferde ECoV-spezifische Nukleinsäuren ausschieden. Außerdem wurden ab dem ersten Tag der beschriebenen Symptomatik paarige Serumproben aller Pferde genommen, der Virusneutralisationstest zeigte eine Serokonversion aller 41 Tiere (Kabayashi et al. 2021).

Eine Sequenzanalyse eines Großteils des Genoms des gefundenen Isolats Tokyo2020 ergab große Ähnlichkeit (98,2-99,8 %) mit den Stämmen NC99, Tokachi09, Obihiro12-1 und Obihiro12-2 (Kabayashi et al. 2021).

1.7. Auftreten von ECoV in nicht-Ausbruchssituationen

Das Auftreten von ECoV wurde nicht nur während akuten Ausbrüchen, sondern auch retrospektiv beziehungsweise in nicht-Ausbruchssituationen untersucht.

1.7.1. Europa – Frankreich

In Europa konnte das equine Coronavirus im Winter 2011/2012 erstmals detektiert werden. In Frankreich wurden 395 Kot- und 200 Proben der Atemwege von Fohlen und adulten Pferden untersucht. Diese Proben waren für eine Routinediagnostik in ein Labor gesendet und auf das Vorhandensein von Viren, Bakterien und Parasiten getestet worden. Die Tiere litten an respiratorischen oder milden gastrointestinalen Erkrankungen. Zum Nachweis von bestimmten Gensequenzen von ECoV, dem M- und N-Gen, wurden zwei RT-qPCRs durchgeführt. Insgesamt konnten in elf Kotproben und in einer respiratorischen Probe ECoV-spezifische Nukleinsäuren gefunden werden. Diese positive Probe stammte aus den Atemwegen eines neun Monate alten Fohlens und war der erste Fall, bei dem ECoV in dieser Probenart gefunden

werden konnte. Die anderen Proben stammten von Fohlen, die an einer gastrointestinalen Erkrankung litten (Miszczak et al. 2014).

Außerdem ist anzumerken, dass ein Vergleich der RT-qPCRs eine höhere Sensitivität der RT-qPCR zur Detektion des M-Gens zeigte, die RT-qPCR zum Nachweis des N-Gens fiel in acht Proben positiv aus, während es bei der des M-Gens zwölf waren (Miszczak et al. 2014).

Von einigen der positiven Proben wurden anschließend Teile des S1-Gens sequenziert und ergaben eine 98,7-99,6%ige beziehungsweise 97,2-98,1%ige Übereinstimmung mit der S1-Sequenz von NC99 bzw. Tokachi09 (Miszczak et al. 2014).

1.7.2. Irland

In Irland wurden 424, zwischen 2011 und 2015 gesammelte, Kotproben und Rektaltupfer auf das equine Coronavirus untersucht. Die Proben stammten von Equiden, die an einer Störung des Gastrointestinaltraktes litten. In fünf der 424 Proben konnten ECoV-spezifische Nukleinsäuren (N-Gen) mittels RT-qPCR nachgewiesen werden. Vier der Proben stammten von Tieren, die an Diarrhoe litten (zwei Fohlen, zwei adulte Pferde), die fünfte Probe gehörte zu einem Esselfohlen (Nemoto et al. 2019).

1.7.3. Vereinigtes Königreich

Im Vereinigten Königreich wurden zwischen März 2015 und Juli 2017 insgesamt 381 Kotproben von adulten Pferden, Jährlingen, Fohlen und Eseln auf ECoV-spezifische Nukleinsäuren untersucht. Die Pferde gehörten zwei unterschiedlichen Gruppen an; Gruppe 1 bestand aus 156 Kotproben, für die ein Chirurg eine Testung anforderte, während bei Gruppe 2, bestehend aus 225 Kotproben, kein Verdacht auf eine ECoV-Infektion vorlag. Schlussendlich konnte in vier Proben (alle Gruppe 1) mittels qPCR ein 142 bp großer Abschnitt des N-Gens detektiert werden. Die Proben stammten von einem 19-jährigen Pferd sowie drei Jährlingen. Somit konnte von einer niedrigen Prävalenz von ECoV im Vereinigten Königreich ausgegangen werden (Bryan et al. 2019).

Die Hospitalisierungsdauer in Bryan et al. 2019 betrug vier bis zehn Tage. Dabei war bei drei Jährlingen, zusätzlich zu ECoV, eine larvale Cyansthostominose diagnostiziert worden. Entsprechend dieser Erkrankung wurden die Tiere intensiv therapiert, zwei der Jährlinge konnten nach sechs Tagen entlassen werden, der am schwersten betroffene nach zehn

Tagen. Die Autoren vermuten, dass ECoV als Koinfektion eine Rolle gespielt hat, während die larvale Cyanthostominose die klinischen Symptome verursacht hat.

1.7.4. USA – Washington

Mattei et al. 2020 untersuchte das klinische Erscheinungsbild von Pferden, bei denen im Kot mittels RT-PCR ECoV-spezifische Nukleinsäuren gefunden werden konnten. Der Nachweis von ECoV stand nicht nachweislich mit einem Ausbruch in Zusammenhang. Die Tiere wurden zwischen 2010 und 2018 im Washington State University-Veterinary Teaching Hospital vorgestellt und in die retrospektive Analyse integriert, wenn sie über ein Jahr alt waren, Symptome einer Kolitis zeigten und ECoV im Kot detektiert werden konnte. Insgesamt wurden fünf Pferde, zu denen die Kriterien passten, gefunden. Dass das equine Coronavirus bei diesen Pferden die wahrscheinlichste Ursache für die am häufigsten detektierten Veränderungen wie Anorexie, Fieber, Durchfall und Lethargie sein musste, zeigt der Ausschluss anderer für diese Symptome relevanter Pathogene durch diverse PCRs, ELISAs und Bakterienkulturen (Mattei et al. 2020).

1.7.5. USA – Washington

An derselben Universitätsklinik wurde zwischen Jänner 2016 bis Dezember 2017 die Ausscheidung von ECoV im Kot von adulten, gesunden Pferden, die für eine diagnostische Bildgebung anästhesiert wurden und bei Pferden mit gastrointestinalen Erkrankungen bei Ankunft an der Klinik und 48 Stunden danach untersucht. Die beiden Gruppen bestanden aus jeweils 65 Pferden. Die qPCR zum Nachweis eines 142 bp Abschnitts des N-Gens aller 258 Kotproben zeigte ein positives Ergebnis bei einem Pferd 48 Stunden nach Ankunft in der Klinik, das Fieber und Anorexie zeigte. Bei diesem Pferd wurde schlussendlich eine Kolitis und hepatische Lipidose aufgrund der länger dauernden Anorexie diagnostiziert. Im Verlauf entwickelte das Pferd Diarrhoe und Hypoproteinämie, konnte aber nach 20 Tagen Behandlung in der Klinik entlassen werden. Neben der PCR wurde eine Elektronenmikroskopie durchgeführt, bei dieser wurde bei neun (3,4 %) von 258 Proben coronavirusähnliche Partikel gefunden. Fünf der Proben stammten von Pferden, die für eine bildgebende Untersuchung an die Klinik gekommen waren. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Prävalenz von ECoV in adulten Pferden dieser Population niedrig war (Sanz et al. 2019).

1.7.6. USA – Kalifornien

Berryhill et al. 2019 untersuchte von März 2012 bis März 2018 retrospektiv das Vorkommen von equinen Coronaviren bei Pferden, die im UC Davis Veterinary Teaching Hospital behandelt wurden. Dabei wurden insgesamt 498 Pferde (aufgrund ihres klinischen Erscheinungsbildes) auf ECoV und andere Pathogene im Kot mittels qPCR getestet. Bei 33 der Pferde konnte ECoV im Kot nachgewiesen werden, drei der Pferde hatten zusätzlich eine Koinfektion mit *Salmonella spp.*, *Actinobacillus equuli* und/oder dem *Rhinits-B Virus*. Das durchschnittliche Alter der Pferde lag bei elf Jahren (2-37 Jahre). Das equine Coronavirus konnte vor allem in kühleren Monaten (64 %) im Kot nachgewiesen werden (Berryhill et al. 2019).

Hier waren 30 von 33 positiv auf ECoV getesteten Pferden hospitalisiert. Die Behandlungsdauer betrug bei Pferden mit einer ECoV Monoinfektion fünf, die jener mit einer zusätzlichen Koinfektion sieben Tage. Pferde, die der aus 33 Pferden bestehenden Kontrollgruppe angehörten und aufgrund ähnlicher Symptome in der Klinik behandelt wurden, waren durchschnittlich drei Tage hospitalisiert. Die Mortalität betrug unter den mit ECoV infizierten Tieren 3 % (ein Pferd). Das verendete Pferd litt vor Ankunft in der Klinik bereits sechs Tage an Fieber und Diarrhoe, des Weiteren konnte eine Leukopenie, ein erhöhter Laktatwert im Blut und ein erhöhter Hämatokrit festgestellt werden. Die nachfolgende pathologische Untersuchung ergab eine nekrohämorrhagische Kolitis und Enteritis mit vaskulären Thromben, Petechien an Herz und anderen Organen, sowie renale Infarkte. Im Gegensatz dazu überlebten zwei der 33 Kontrollpferde nicht, womit kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden konnte (Berryhill et al. 2019).

1.7.7. Israel

2018 wurden in Israel 333 Serumproben von gesunden Pferden aus 29 Ställen in ganz Israel mittels eines ELISAs, auf Basis des S1-Gens, analysiert. 12,3 % (41) der Pferde hatten ECoV-spezifische Antikörper, die Seroprävalenz betrug je nach Farm 0 bis 37,5 %. Außerdem wurde erwähnt, dass Pferde in Weidehaltung eine signifikant geringere Expositionsrate hatten, als Pferde, die in Zentral-Israel lebten (Schvartz et al. 2021).

1.8. Pathologische Befunde

Bei Fohlen, die sich in den ersten Lebenstagen mit einem Coronavirus infizieren, beginnt eine Coronavirusinfektion typischerweise im Dünndarm, diese breitet sich auf die Drüsen des Dickdarms aus. Das Coronavirus verbleibt etwa drei bis vier Tage nach Beginn des Durchfalls in den Zellen der Krypten, diese können teilweise hyperplastisch sein. Die Lamina propria wird mit Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert (Davis et al. 2000).

Drei der vier verendeten, sechs Monate bis elf Jahre alten, Tiere von den Ausbrüchen 2013 in Kalifornien und Idaho wurden pathologisch untersucht. Zusätzlich dazu wurde eine qPCR zum Nachweis eines 435 bp-Abschnitts des N-Gens von ECoV durchgeführt, es konnte bei allen drei untersuchten Tieren ECoV in Darmgewebe, -inhalt und/oder Kot nachgewiesen werden. In der Lunge, Milz und Leber einer sechs Monate alten Stute gelang ebenso ein Nachweis von ECoV-spezifischen Nukleinsäuren (Giannitti et al. 2015).

Coronavirusähnliche Strukturen konnten in der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Dünndarmgewebe eines Pferdes gefunden werden. Diese zeigten sich als im Durchmesser 112 nm große, kugelige, behüllte Virionen mit sich von der Oberfläche abhebenden Strukturen (Peplomer) (Giannitti et al. 2015).

Die Veränderung des klinischen Erscheinungsbildes der drei Tiere reichte von milden Koliksymptomen und Fieber bis hin zu Lethargie und akuten neurologischen Symptomen wie Kreisgehen, Kopfpresen und Nystagmus. Die Analyse des Blutes zeigte bei einem Tier eine Leukopenie sowie eine Hyperlaktämie und Hyperammonämie (Giannitti et al. 2015).

Die pathologische Untersuchung der Tierkörper ergab eine nekrotisierende Enteritis im Jejunum und Ileum mit teilweise bakterieller Kolonisation. In den LI. propriae und submucosae der Darmabschnitte konnte eine Infiltration mit Entzündungszellen festgestellt werden. Im Gehirn eines Tieres zeigte sich eine hyperammonämische Enzephalopathie mit geschwollenen und hypertrophierten Astrozyten (Alzheimer Typ II Astrozyten) (Giannitti et al. 2015).

Neben der pathologischen Untersuchung wurde eine immunhistochemische Untersuchung zur Detektion von coronaviralem Antigen durchgeführt. Verwendet wurde hierzu ein monoklonaler Antikörper gegen BCoV. In der Untersuchung eines Dünndarmabschnittes konnte eine Immunreaktivität in der oberflächlichen nekrotischen Schicht, im Zytoplasma der Enterozyten

der Krypten und in nicht-identifizierten Zellen vor allem in der L. propria, selten auch in der L. submucosa, nachgewiesen werden (Giannitti et al. 2015).

1.9. Ausscheidung

1.9.1. Ausscheidung mit dem Kot

In Berryhill et al. 2019 wurde die RT-qPCR bei 45 % der Pferde einige Tage nach dem positiven Nachweis von ECoV wiederholt und ergab, dass bei sieben Pferden (47 %) das Virus nach durchschnittlich drei Tagen (2-8 Tage) weiterhin ausgeschieden wurde, während bei acht Pferden (53 %) nach durchschnittlich sieben Tagen (5-16 Tage) keine Ausscheidung von ECoV mehr festgestellt werden konnte.

Ähnliches zeigte sich bei einem Ausbruch in den USA, hier wurde eine Serientestung (die Kotproben wurden ab dem ersten Tag, an dem die Tiere ein verändertes klinisches Erscheinungsbild zeigten, genommen) von sechs ECoV-positiven Pferden vorgenommen. Durchschnittlich lag die Ausscheidungsdauer bei 3,5 Tagen, ein Pferd schied das Virus im Kot elf Tage lang aus. Nach Ende der 14-tägigen Isolation der vermutlich initial infizierten Tiere zeigten einige Tage später weitere Pferde Symptome einer ECoV-Infektion. Deshalb wurde angenommen, dass die Ausscheidung auch länger als 14 Tage andauern kann. Außerdem konnte bei einem Pferd erst in der zweiten Kotprobe ECoV nachgewiesen werden, obwohl es schon bei der ersten Kotprobennahme ein verändertes klinisches Erscheinungsbild zeigte. Als Ursache dafür wurde ein möglicher Ileus und somit ein verzögerter Weitertransport des Fäzes angeführt (Fielding et al. 2015).

In vier Ausbrüchen in den USA betrug die durchschnittliche Ausscheidungsdauer vier Tage, ein Pferd schied neun Tage lang Virusmaterial aus (Pusterla et al. 2013).

Eine besonders lange Ausscheidung wurde 2020 im Tokyo Racecourse detektiert. Bei 30 von 41 Pferden fiel das Ergebnis der RT-qPCR positiv aus, fünf dieser Pferde schieden das Virus über einen Monat lang aus. Die längste Ausscheidungsperiode betrug 98 Tage. Da 26 Pferde keine Symptome zeigten, spielen subklinisch erkrankte Pferde eine wichtige Rolle als Überträger von ECoV. Besonders hervorzuheben ist, dass alle 41 Pferde eine Serokonversion gezeigt hatten. Diese Pferde schieden das Virus nicht kürzer aus als Pferde, die eine Veränderung ihres klinischen Erscheinungsbildes zeigten (Kambayashi et al. 2021).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Menge an ausgeschiedenem Virusmaterial positiv mit der Schwere von klinischen Symptomen der Pferde korreliert (Fielding et al. 2015, Schaefer et al. 2018).

Außerdem ist zu erwähnen, dass eine PCR Genommaterial nachweist und daher keine Aussagekraft über die tatsächliche Infektiosität des nachgewiesenen Virus hat.

1.9.2. Ausscheidung im Nasensekret

Der erste Nachweis von ECoV in einer Probe des Atmungstraktes gelang in Frankreich. Die Probe wurde während der Wintersaison 2011/2012 gewonnen und gehörte zu einem neun Monate alten Fohlen, das an einer Atemwegserkrankung litt. Ob ECoV die Ursache für die Symptomatik war, wurde nicht geklärt (Miszczak et al. 2014).

Um die Rolle von ECoV bei akut fieberhaften Pferden, die zusätzlich Lethargie, Anorexie, Nasenausfluss oder Husten zeigten, zu ermitteln, wurde Kot von 277 adulten Pferden auf ECoV und Nasensekret auf bekannte respiratorische Erreger (*EHV-4*, *EIV*, *Streptococcus equi* spp. *equi*, *ERAV*, *ERBV* und *EHV-1*) und ECoV mittels qPCR untersucht. Schlussendlich konnte in 7,2 % (20 Pferde) der Proben ECoV nachgewiesen werden. Bei vier dieser Pferde (1,4 %) fiel auch die Untersuchung des Nasenausflusses positiv aus. Da ECoV in Nasentupfern nur selten nachgewiesen werden kann, wird eine Untersuchung von Kotproben zur Detektion von ECoV empfohlen (Pusterla et al. 2019).

1.10. Koinfektionen

Neben ECoV konnten auch immer wieder andere Pathogene im Kot nachgewiesen werden.

So zeigten drei von 33, mit ECoV infizierten, adulte Pferde zusätzlich eine Koinfektion mit *Salmonella* spp., *Actionobacillus equuli* (Peritonitis) und dem *Rhinitis B Virus*. Es wurde vermutet, dass ECoV die Immunabwehr und die Abwehr des gastrointestinalen Mikrobioms herabsetzt und so eine Infektion mit anderen Erregern möglich macht (Berryhill et al. 2019).

Bei drei Jährlingen konnte, zusätzlich zu ECoV, eine gerade abaufende larvale Cyanthostominose diagnostiziert werden. Hier wurde vermutet, dass die larvale Cyanthostominose die Ursache für die vorherrschenden Symptome war und ECoV als Koinfektion vorlag. Im Kot eines Jährlings konnten, neben ECoV, mittels ELISA *Clostridium*

perfringens Enterotoxine und die Toxine A und B von *Clostridium difficile* festgestellt werden (Bryan et al. 2019).

In Frankreich konnte eine Koinfektion mit *Cryptosporidium spp.* bei zwei von zwölf ECoV-positiven Proben nachgewiesen werden (Miszczak et al. 2014).

1.11. Fohlen

Das erste erfolgreich isolierte equine Coronavirus, Stamm NC99, stammte von einem zwei Wochen alten Fohlen, das schon einige Tage wässrigen Durchfall und Fieber gezeigt hatte (Guy et al. 2000).

Zuvor wurde der Kot von einem fünf Tage alten Quarterhorse Fohlen, das an Enterokolitis litt, mittels Elektronenmikroskopie und ELISA untersucht. In der Elektronenmikroskopie wurden keine coronavirusähnlichen Strukturen gefunden, während der ELISA ein Vorhandensein von coronavirusalem Antigen im Kot zeigte. Diese Befunde wurden durch einen vierfachen Anstieg des Antikörperiters gegen Coronaviren und eine pathologischen Untersuchung ergänzt. In der immunhistochemischen Untersuchung des Darms konnte coronavirusales Antigen sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern von Zellen gefunden werden (Davis et al. 2000).

Einige Jahre später wurde versucht, die Ursache von Durchfall bei neonalen Fohlen festzustellen, dazu wurde der Kot von 37 gesunden und 51 kranken Fohlen, die wässrigen Durchfall, verminderte Milch-Aufnahme und Hinweise auf Enterokolitis im Ultraschall zeigten, mittels qPCR untersucht. Im Kot der gesunden Fohlen wurde am häufigsten ECoV (zehn Fohlen), *Rhodococcus equi* (*R. equi*) (fünf Fohlen) *Cryptosporidium spp.* (vier Fohlen) und *equines Rotavirus* (ein Fohlen) gefunden. Die kranken Fohlen zeigten am häufigsten eine Infektion mit equinen *Rotaviren* (18 Fohlen), gefolgt von ECoV (14 Fohlen) und *Cryptosporidium spp.* (14 Fohlen). Bei den kranken Tieren konnten außerdem signifikant mehr Koinfektionen detektiert werden. Die Wahrscheinlichkeit an einer Koinfektion zu erkranken, war bei Fohlen, bei denen ECoV in der qPCR detektiert worden war, höher als bei gesunden Fohlen, bei denen ebenfalls ECoV nachgewiesen werden konnte. Hier gab es nur zwei Tiere, die zusätzlich zu ECoV an *R. equi* oder *Cryptosporidien* erkrankt waren, während bei den 15 kranken Fohlen, bei denen ein Nachweis von ECoV gelang, immer eine Koinfektion (vor allem mit *Cryptosporidium spp.*) vorlag. Besonders zu erwähnen ist, dass bei gesunden und kranken

Fohlen gleich häufig ECoV im Kot detektiert werden konnte, was eine geringe Pathogenität von ECoV bei Fohlen vermuten lässt (Slovic et al. 2014).

1.12. Experimentelle Infektionen

Um den klinischen Verlauf und die Ausscheidung von ECoV genauer zu untersuchen, wurde eine experimentelle Infektion von drei neun bis zehn Monate alten Kaltblutpferden durchgeführt. Das Inokulum stammte von einem vierjährigen Pferd, das schon fünf Tage vor Probennahme an wässrigem Durchfall litt. Zusätzlich zu ECoV konnte *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden. Die Probe wurde 10%ig verdünnt und anschließend den sedierten Pferden über einen transnasalen Katheter (jeweils 1000 Milliliter) in den Ösophagus verabreicht. Der Virustiter des Inokulums war nicht bekannt, jedem Tier wurden $4,2 \times 10^9$ Kopien des N-Gens von ECoV verabreicht (Nemoto et al. 2014).

Folgend wurden die Tiere täglich einmal klinisch untersucht, die innere Körpertemperatur wurde zweimal pro Tag bestimmt. Des Weiteren wurden Kotproben, Nasentupfer und EDTA-Blutproben gewonnen (Tage 0-8, 10, 12, 14) und mittels RT-qPCR auf ECoV untersucht. Für einen Virusneutralisationstest an den Tagen 0 und 14 nach der Beimpfung wurden paarige Serumproben verwendet (Nemoto et al. 2014).

Eines der drei Pferde zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung des klinischen Erscheinungsbildes, während die anderen beiden an Fieber und Anorexie litten, außerdem schieden sie pastösen Kot aus. Als Ursache hierfür konnten *Clostridium difficile* und *perfringens* sowie *Salmonella spp.* ausgeschlossen werden (Nemoto et al. 2014).

Die Analyse des Blutes zeigte eine Leuko- und Lymphopenie eines symptomatischen Pferdes, die SAA-Konzentration war bei den zwei Pferden, die Symptome zeigten, erhöht (Nemoto et al. 2014).

Die Ausscheidung von ECoV im Kot begann, unabhängig davon ob die Tiere Symptome oder Veränderungen in der Blutuntersuchung zeigten, an den Tagen drei oder vier und dauerte bis zu den Tagen zwölf beziehungsweise 14 nach der Beimpfung an. Das Maximum an viraler RNA wurde an den Tagen sieben oder acht ausgeschieden, es konnten $2,7 \times 10^9$ bis $5,5 \times 10^{10}$ Kopien/g Kot gemessen werden. Es konnte ebenso bei allen drei Tieren, je nach Pferd von Tag fünf bis 14, ECoV in Nasentupfern nachgewiesen werden. Ein Peak der Ausscheidung

wurden an den Tagen sechs beziehungsweise sieben beobachtet, hier lagen die Werte je nach Pferd bei $2,2 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$ beziehungsweise $1,4 \times 10^5$ Kopien/ml. Die Untersuchung des EDTA-Blutes ergab einen positiven Nachweis für ECoV-spezifischen Nukleinsäuren bei den beiden Tieren, die Veränderungen in ihrem klinischen Erscheinungsbild gezeigt hatten. Am Tag zwei erreichte die Menge ihr Maximum bei $1,3 \times 10^6$ beziehungsweise $1,2 \times 10^5$ Kopien/ml (Nemoto et al. 2014).

Alle beimpften Tieren zeigten eine Serokonversion zu den Stämmen NC99 und Obihiro12-2 (Nemoto et al. 2014).

Aufgrund des unveränderten klinischen Erscheinungsbildes eines Pferdes, trotz positivem Nachweis von ECoV-RNA in Kotproben und Nasentupfern, kann davon ausgegangen werden, dass eine subklinische Infektion möglich ist (Nemoto et al. 2014).

Die Menge an Virus, die ausgeschieden wird, ist im Kot am höchsten, weshalb die wahrscheinlichste Route einer Übertragung fäkal-oral ist (Nemoto et al. 2014).

Eine weitere experimentelle Infektion wurde einige Jahre später mit acht Pferden durchgeführt. Die Pferde waren klinisch gesund, gehörten den unterschiedlichsten Rassen an (zum Beispiel Warmblüter und Quarter Horses) und waren sechs bis 15 Jahre alt. Der Kot der Pferde wurde auf ECoV und andere typische gastrointestinale Pathogene (darunter *Salmonella spp.* und *Clostridium perfringens*) untersucht. Um eine Serokonversion gegen ECoV-spezifische Antigene auszuschließen wurde ein ELISA durchgeführt (Schaefer et al. 2018).

Das Inokulum stammte von einem amerikanischen Minaturpferd, das an einem endotoxämischen Schock infolge einer ECoV-Infektion starb und enthielt $2,5 \times 10^9$ GE/g Darminhalt. Dieses wurde auf einen Gehalt von 1×10^9 GE von ECoV verdünnt und vier sedierten Pferden über eine Nasenschlundsonde verabreicht (Gruppe 1). Sobald im Kot mittels qPCR ECoV-Genom nachgewiesen werden konnte, wurde davon zweimal täglich eine Menge neben oder auf das Heu der übrigen vier Pferde verbracht, um eine natürliche Exposition zu simulieren (Gruppe 2). In den folgenden Tagen wurden alle Pferde zweimal täglich klinisch beurteilt, sowie die Kotkonsistenz untersucht. Einmal täglich wurden Kot- und Nasentupfer- und Vollblutproben gewonnen (Schaefer et al. 2018).

Alle vier der experimentell infizierten Pferde entwickelten im Verlauf der Untersuchungen eine veränderte Kotkonsistenz, während nur zwei der natürlich expositionierten Pferde ähnliches zeigten. Ein Pferd der Gruppe 1 entwickelte Fieber, das drei Tage andauerte, ansonsten zeigten die Pferde guten Appetit und normales Allgemeinverhalten (Schaefer et al. 2018).

Die PCR zur Detektion eines spezifischen 142 bp langen Abschnitts des N-Gens von ECoV fiel bei allen acht Tieren positiv aus. Die experimentell infizierten Pferde schieden das Virus durchschnittlich sechs Tage lang aus, die natürlich-expositionierten Tiere 2,75 Tage. Der Beginn der Ausscheidung nach der Beimpfung oder der Exposition lag bei 5,5 bzw. sieben Tagen. Einige Tiere zeigten eine intermittierende Ausscheidung, was eine wiederholte Testung der Pferde erforderlich macht, bevor sie wieder mit anderen Tieren in Kontakt kommen. Des Weiteren ist eine Ausscheidung von ECoV auch bei asymptomatischen Tieren möglich. In der PCR der Nasentupferproben konnte bei jeweils zwei Pferden der beiden Gruppen zwei Tage lang ECoV detektiert werden. Einige der positiven Tupferproben wurden am Tag nach dem Peak der fäkalen Ausscheidung genommen (Schaefer et al. 2018).

Eine serologische Untersuchung mittels eines ELISA zeigte bei zwei Pferden jeder Gruppe eine Serokonversion auf (Schaefer et al. 2018).

Die Ergebnisse der experimentellen Infektion unterstützen die Annahme einer fäkal-oralen Übertragung (Schaefer et al. 2018).

1.13. Diagnostik

Um eine Infektion mit equinem Coronavirus nachweisen zu können, gibt es einige Möglichkeiten. Häufig wird eine RT-(q)PCR durchgeführt, der Nachweis von ECoV ist vor allem in Kotproben (Auer et al. 2020, Fielding et al. 2015, Oue et al. 2011, Oue et al. 2013, Pusterla et al. 2013), seltener auch in Nasentupfern (Miszczak et al. 2014, Nemoto et al. 2014, Schaefer et al. 2018) oder Blutproben (Nemoto et al. 2014, Schaefer et al. 2018) möglich. Coronavirusähnliche Strukturen konnten durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung in mazeriertem Dünndarmgewebe (Giannitti et al. 2015) und in Kot (Guy et al. 2000) festgestellt werden.

1.13.1. PCR

Das Ziel einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit anschließender Sichtbarmachung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese (konventionelle PCR) oder Detektion mittels Fluoreszenz-Messung (qPCR). Die PCR besteht aus 20 bis 45 Zyklen, die jeweils aus drei Schritten bestehen. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA auf etwa 95 °C erhitzt und durch die Trennung der Wasserstoffbrücken, die die DNA-Stränge verbinden, in Einzelstränge getrennt. Anschließend erfolgt das Primer Annealing, hier lagern sich die Primer infolge einer Temperaturabsenkung an die Einzelstränge an. Im dritten Schritt, der Elongation, wird ein neuer, komplementärer DNA-Strang durch die DNA-Polymerase synthetisiert. Die Verlängerung der DNA in 5-' zu 3'-Richtung beginnt an den zuvor angelagerten Primern, die danach auch einen Teil des neuen Einzelstrangs darstellen. Der optimale Temperaturbereich für diesen Vorgang liegt, abhängig von der DNA-Polymerase, meist zwischen 68 °C und 72 °C. Die fünf- bis zehnminütige Elongationsphase schließt die PCR ab, hier sollen noch nicht gänzlich synthetisierte Stränge vervollständigt werden. Eine Abkühlung auf 4 °C bis 8 °C beendet die Reaktion. Am Ende der PCR liegen die DNA-Abschnitte in millionenfachen Kopien vor (Thiemann et al. 2015).

Liegt die genetische Information als RNA vor, muss die RNA in cDNA umgewandelt werden. Hierfür werden reverse Transkriptasen verwendet, das sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen. Diese Enzyme synthetisieren aus RNA-Einzelsträngen komplementäre DNA-Einzelstränge (cDNA). Die Prozesse reverse Transkription und die darauf folgende PCR werden als RT-PCR bezeichnet (Thiemann et al. 2015).

Um die Kopien des genetischen Materials nachweisen zu können, werden grundsätzlich zwei Verfahren genutzt.

Zum einen kann eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt werden, zum anderen kann man die PCR-Produkte mit einer real time-PCR (qPCR) in Echtzeit nachweisen. Für die Elektrophorese stehen, neben den Agarosegelen, automatisierte Elektrophoresegeräte zur Verfügung.

Die Gelelektrophorese trennt die DNA-Abschnitte anhand ihrer Ladung und Größe auf und diese Abschnitte können anschließend mit Längenstandards verglichen und so zugeordnet werden (Thiemann et al. 2015).

Die real time-PCR (qPCR) beziehungsweise die real time-RT-PCR (RT-qPCR) ermöglicht die Erfassung von PCR-Produkten während ihrer Bildung. Oft werden dazu spezielle, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte, Sonden verwendet, die nur an eine bestimmte Sequenz binden. Die Sonde bindet während dem Annealing der Primer. Das Fluoreszenzsignal wird durch einen Quencher, der an die Sonde gebunden ist, unterdrückt. Die Sonde muss durch die Polymerase vom Quencher gespalten werden, erst dann kommt es zur Fluoreszenzemission, die Stärke der Emission ist direkt proportional zur Menge der synthetisierten Nukleinsäurestränge (und somit auch zur RNA beziehungsweise DNA-Menge in der Probe), wodurch eine Quantifizierung erfolgen kann. Die Fluoreszenz wird in jedem Zyklus gemessen (Jansohn und Rothhämel 2012).

Zusammengefasst werden für eine PCR Template, also DNA beziehungsweise durch reverse Transkriptase zu cDNA umgewandelte RNA, Primer und das Enzym DNA-Polymerase benötigt. Ein Primer bildet den Startpunkt für die DNA-Polymerase, diese ist in der Lage, einen komplementären DNA-Einzelstrang in 5'- zu 3'-Richtung zu synthetisieren (Thiemann et al. 2015). Für einige (RT)-qPCRs wird außerdem noch eine Sonde benötigt (Jahson 2012).

1.13.2. bekannte PCRs zum Nachweis von ECoV

Bei einer Untersuchung des Fäzes eines zwei Wochen alten, an Durchfall leidenden, Fohlens mittels Elektronenmikroskopie, konnten coronavirusähnliche Strukturen gefunden werden. Danach wurden humane Adenokarzinomzellen mit einer gefilterten Suspension des Kots beimpft. Von diesen Zellen konnte anschließend ECoV-NC99 isoliert werden. Für eine spätere Klonierung wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden ein Forward- und ein Reverse-

Primer zum Nachweis des N-Gens von BCoV-Mebus, sowie ein Primer, der einen mittleren Abschnitt des N-Gens abdecken sollte, verwendet (Guy et al. 2000).

Primer	Sequenz 5'->3'
Forward-Primer ECVf	TGAATTCTCTGGCATGGACACCGCATT
Reverse-Primer ECVr	TGAATTCACAGGTGCCGACATAAGGTT
ECVmid	TGAATTCGTGATGAGGCTATTCCGACTA

Tab. 2: verwendete Primer (Guy et al. 2000).

Eine modifizierte Version der oben angeführten Primer fand in einer RT-PCR bei Oue et al. 2011 Anwendung. Für die Extraktion der viralen RNA aus Kotproben wurde zuvor eine 10%ige Lösung hergestellt.

Das PCR-Produkt der RT-PCR hatte die erwartete Größe von 869bp (Oue et al. 2011).

Primer	Sequenz 5'->3'	Position
Forward-Primer ECoV-midf	GTGATGAGGCTATTCCGACTA	29862-29882
Reverse-Primer ECoV-Nr	CCAGGTGCCGACATAAGGTTTCAT	30708-30730

Tab. 3: verwendete Primer (Oue et al. 2011).

Der Nachweis eines 142 bp Abschnitts des N-Gens von ECoV in Kotproben gelang Pusterla et al. 2013 mittels qPCR. Dazu wurden 200 µg Kot mit 2 Millilitern PBS durch Vortexen vermengt und danach zentrifugiert. Anschließend wurden Nucleinsäuren aus 200 µl der Lösung durch eine automatisierte Nucleinsäureextraktion extrahiert und die RNA zu cDNA konvertiert. Darauf folgte eine qPCR, die verwendeten Primer und die Sonde sind in Tab. 4 zu finden.

Primer/Sonde	Sequenz 5'->3'
Forward-Primer ECoV-380f	TGGGAACAGGCCCGC
Reverse-Primer ECoV-522r	CCTAGTCGGAATAGCCTCATCAC
Sonde ECoV-436p	FAM-TGGGTGCTAACAAG-TAMRA

Tab. 4: verwendete Primer und Sonde (Pusterla et al. 2013).

Das verwendete Temperaturprotokoll lautete:

<p>2 min 50 °C; 10 min 95 °C 40x: 15 sek 95 °C; 60 sek 60 °C</p>
--

Um die analytische Sensitivität für die qPCR angeben zu können, wurde mittels eines ECoV-Plasmids eine Standardkurve generiert. Die Berechnung ergab eine Sensitivität von 98,3 %, die Spezifität ergab nach Sequenzierung von vier PCR-Produkten einen Wert von 100 % (Pusterla et al. 2013).

Das Detektionslimit dieser qPCR wurde mit einer zehnfachen Verdünnung eines ECoV-Plasmids ermittelt und ergab fünf (bei Verdünnung des Plasmids mit PBS) beziehungsweise 20 (bei Verdünnung des Plasmids mit ECoV-freiem Kot) Genomäquivalente (Pusterla et al. 2013).

Zur Diagnostik von ECoV in Kot- und Nasentupferproben wurden neben Genomsequenzen des N-Gens auch die des M-Gens verwendet. Die für die RT-qPCR genutzten Primer und Sonden sind in Tab. 5 angeführt (Miszczak et al. 2014).

Abschnitt	Primer	Sequenz 5'→3'
M-Gen	Forward Primer ECoV-M-f	GGTGGAGTTTCAACCCAGAA
	Reverse Primer ECoV-M-r	AGGTGCGACACCTTAGCAAC
	Sonde ECoV-M-p	(FAM)- CCACAATAATACGTGGCCACCTTTA- (BHQ1)
N-Gen	Forward Primer ECoV-N-f	GCCAATTCCGGCACTAGAAC
	Reverse Primer ECoV-N-r	ACCCCTTTTTCCAAAGCACT
	Sonde ECoV-N-p	(FAM)-GACTGCCAAAGAAGTCAGGC)- (BHQ1)

Tab. 5: Verwendete Primer und Sonden für M- bzw. N-Gen RT-qPCR (Miszczak et al. 2014).

Von den insgesamt zwölf positiven Proben wurden von der „M-RT-qPCR“ alle zwölf detektiert, während es mit der „N-RT-qPCR“ acht waren.

Das Detektionslimit wurde durch eine Verdünnungsreihe von NC99 und eines generierten Transkripts ermittelt und lag bei der M-RT-qPCR bei 3×10^5 Kopien pro Milliliter Transkript, das der N-RT-qPCR bei 3×10^7 Kopien pro Milliliter Transkript. Somit war die Sensitivität der M-RT-qPCR höher als die der N-RT-qPCR (Miszczak et al. 2014).

Eine RT-qPCR mit den Primern, die in Tab. 4 aufgelistet sind, wurde mit einem abgeänderten Temperaturschema durchgeführt. Zuvor wurden Kotproben zu einer 1:10 Verdünnung verdünnt, aus 100 µl dieser Verdünnung wurden mit einem Kit Nukleinsäuren extrahiert. Für die darauf folgende RT-qPCR wurden wiederum 4 µl des Extrakts verwendet (Nemoto et al. 2014).

5 min 50°C; 20 sek 95°C
40x: 3 sek 95°C; 30 sek 60°C

Temperaturschema

Außerdem wurde eine Standardkurve generiert. Die insgesamt zehn Verdünnungsstufen der viralen RNA enthielten 2×10^8 bis 2×10^0 Kopien pro 4µl. Mit der RT-qPCR konnten zuverlässig wenigstens 200 Kopien pro Reaktion detektiert werden, das entsprach $5,0 \times 10^5$ Kopien pro Gramm Kot und $5,0 \times 10^4$ Kopien pro Milliliter in Blut und Nasentupfern (Nemoto et al. 2014).

Ein ebenfalls abgeändertes Temperaturprotokoll verwendete Nemoto et al. 2019 unter Verwendung der in Tab. 4 angeführten Primer. Auch hier wurden Kotproben 1:10 verdünnt beziehungsweise Rektaltupfer in PBS gelöst. Nach der Extraktion der viralen RNA wurde eine RT-qPCR vorgenommen. Das verwendete Temperaturschema lautete:

10 min 48°C; 10 min 95°C
40x: 15 sek 95°C; 45 sek 60°C

Auer et al. 2020 extrahierte Nukleinsäuren aus 140 µl einer 1%igen Kotsuspension.

Für den Nachweis von ECoV wurde eine RT-qPCR durchgeführt, die das Polymerasegen von *Betacoronaviren* nachweisen konnte. Diese RT-qPCR wurde ursprünglich zur Detektion von CRCoV genutzt. Aus diesem Grund wurde sie durch verschiedene Verdünnungen von bekannt ECoV-positiven Proben für den Einsatz zum Nachweis von ECoV validiert (Auer et al. 2020, Spiss et al. 2012).

Primer/Sonde	Sequenz 5'→3'
CRCoV forward primer	ACGTGGTGTTCTGTTGTTATAGG
CRCoV reverse primer	AACATCTTTAATAAGGCGACGTAACAT
CRCoV probe	FAM- CCACTAAATTTTATGGCGGCTGGGATG- TAMRA

Tab. 6: Verwendete Primer und Sonde nach Spiss et al. 2012.

2. Ziel der Arbeit

Am Institut für Virologie wurde bisher zur Diagnostik einer ECoV-Infektion eine RT-qPCR (BetaCoV1-RT-qPCR) zum Nachweis für Erreger der Spezies *Betacoronavirus 1* (CRCoV, BCoV, ECoV) verwendet. Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, eine neue RT-qPCR nach Pusterla et al. 2013 (ECoV_N-Gen-RT-qPCR), die einen Abschnitt des N-Gens von ECoV detektieren kann, zu etablieren und mit der bisher verwendeten Methode zum ECoV-Nukleinsäurenachweis zu vergleichen.

Zu diesem Zweck wurde ein Plasmid von einem Abschnitt des N-Gens durch T-Vektor-Klonierung hergestellt, die Sensitivität der beiden PCRs durch Verdünnungsreihen getestet und abschließend 25 Feldproben analysiert.

3. Material und Methode

3.1. BetaCoV1-RT-qPCR

Am Institut für Virologie der Vetmeduni Vienna wurde bisher zum Nachweis von ECoV, BCoV und CRCoV eine RT-qPCR nach Spiss et al. 2012 zum Nachweis für Viren der Spezies *Betacoronavirus 1* genutzt. Die verwendeten Primer- und Sondensequenzen liegen im Bereich des Polymerase-Gens und sind in Tab. 7 angeführt.

Primer/Sonde	Sequenz 5' → 3'	Position*
qBetaCoV1-F	ACGTGGTGTTCCTGTTGTTATAGG	15187-15210
qBetaCoV1-R	AACATCTTTAATAAGGCGACGTAACAT	15242-15268
qBetaCoV1-S	FAM-CCACTAAGTTTTATGGCGGCTGGGATG-BHQ1	15213-15239

Tab. 7: Verwendete Primer- und Sondensequenzen für die BetaCoV1-RT-qPCR.

*) bezogen auf das Gesamtgenom von ECoV NC99 (GenBank accession no. EF446615.1).

Zur Quantifizierung wurde das RNA-Transkript BetaCoV_TR (Rümenapf, nicht publiziert), das aus einem Abschnitt des Polymerase-Gens eines Vertreters der Spezies *Betacoronavirus 1* besteht, verwendet. Von diesem Transkript, welches unverdünnt 1×10^{12} GE/ μ l enthält, wurde eine Verdünnungsreihe, bestehend aus den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-13} , hergestellt. Dazu wurden 13 1,5 ml Eppendorftubes (Eppendorf, Österreich) mit 10^{-1} bis 10^{-13} beschriftet und jeweils 90 μ l H₂O vorgelegt. Von dem unverdünnten Transkript wurden 10 μ l in das 10^{-1} -Tube pipettiert, gevortext und kurz zentrifugiert. Von dieser Verdünnung wurden danach 10 μ l abgenommen und in das 10^{-2} -Tube überführt, anschließend gevortext und kurz zentrifugiert. Diese Schritte wurden bis zur 10^{-13} -Verdünnung wiederholt.

Für die BetaCoV1-RT-qPCR wurden unter Verwendung des Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR Kits (New England Biolabs, Inc., USA) Mastermixe, wie in Tab. 8 angeführt, hergestellt.

	1x (μl)
Luna RT-reaction Mix (2x)	10
Luna RT-enzyme Mix (20x)	1
RNAse freies H ₂ O	7,4
Primer-F(40 μ M)+R(40 μ M)	0,4
Probe P (20 μ M)	0,2
Gesamtvolumen Mastermix	19
Zugabe Template	1

Tab. 8: Mastermixprotokoll für die BetaCoV1-RT-qPCR mit dem Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit.

Das verwendete Temperaturschema lautete:

<p>50°C, 15 min; 95°C, 2 min; 45x: 95°C, 10 sec; 60°C, 30 sec</p>

Die Amplifikatlänge der BetaCoV1-RT-qPCR beträgt 82 bp.

Die Verdünnungen BetaCoV_TR 10^{-4} bis 10^{-13} wurden als Doppelansatz in der RT-qPCR eingesetzt. Als Positivkontrolle diente die Feldprobe 3006/13 und das RNA-Transkript BetaCoV_TR. Der Gehalt an RNA-Kopien/ μ l war für das unverdünnte Transkript bereits bekannt. Als Negativkontrolle wurde ntc (no template control) verwendet, diese bestand aus dem mit dem Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit hergestellten Mastermix. Die RT-qPCR wurde mit einem Rotor-Gene Q-Gerät (Qiagen®, USA) durchgeführt.

3.2. ECoV_N-Gen-RT-qPCR

Die ECoV_N-Gen-RT-qPCR wurde nach Pusterla et al. 2013 durchgeführt. Die verwendeten Primer- und Sondensequenzen liegen im Bereich des Nucleocapsid-Gens und sind in Tab. 9 angeführt.

Name	Sequenz 5' → 3'	Position*
qECoV-N380F	TGGGAACAGGCCCGC	29742-29756
qECoV-N522R	CCTAGTCGGAATAGCCTCATCAC	29862-29884
qECoV-N436Sonde	FAM-GGGTCGCTAACAAG -BHQ1	29798-29812

Tab. 9: Verwendete Primer- und Sondensequenzen für die ECoV_N-Gen-RT-qPCR

*) bezogen auf das Gesamtgenom von ECoV NC99 (GenBank accession no. EF446615.1).

Die ECoV_N-Gen-RT-qPCR wurde mit dem neuen, bei der Firma Eurofins bestellten, Primer- und Sonden-Set zunächst an drei bekannt ECoV-positiven Proben getestet (3006/13, 241/19, 393/18). Die Feldproben lagen bereits als RNA-Extrakte vor und waren zur Diagnostik von ECoV mit der am Institut verwendeten BetaCoV1-RT-qPCR analysiert worden. Die Extrakte wurden unverdünnt und in der Verdünnung 1:10 eingesetzt. Für die Herstellung der 1:10 Verdünnung wurden 45 µl RNase freies H₂O und 5 µl des Extraktes in ein 1,5 ml Eppendorftube pipettiert und anschließend gevortext.

Folgend wurde jeweils, nach vorherigem kurzem Vortexen, 1 µl Template in die PCR-Tubes mit dem zuvor hergestellten Mastermix unter Verwendung des Luna® Universal Probe One-Step RT-qPCR Kits pipettiert (siehe Tab. 8). Als Negativkontrollen wurden zwei ntc's eingesetzt. Für die RT-qPCR wurde ein Rotor-Gene Q-Gerät (Qiagen®, USA) verwendet.

Das Temperaturschema, das genutzt wurde, lautete:

55°C, 10 min
95°C, 1min
45x: 95°C, 15 sec; 60°C, 30sec

Die Amplifikatlänge der ECoV-N_Gen-RT-qPCR beträgt 143bp.

3.3. Herstellung eines RNA-Standards

Zur Herstellung eines RNA-Standards für die ECoV-N_Gen-RT-qPCR wurde ein, auf das N-Gen des ECoV passendes, Primerpaar (Auer et al. 2020) verwendet (Tab. 10).

Name	Sequenz 5' → 3'	Position*
konv.ECoV_N_1.Teil_F	CAGGCATGGACACCGCATTG	29316-29335
konv.ECoV_N_1.Teil_R	CTTGATCCTGCACTAGAGGCTC	29979-30000

Tab. 10: Verwendete Primersequenzen für die Herstellung eines RNA-Standards für die ECoV-N-Gen-RT-qPCR.

*) bezogen auf das Gesamtgenom von ECoV NC99 (GenBank accession no. EF446615.1).

3.3.1. Durchführung einer konventionellen RT-PCR

Für die Herstellung eines RNA-Standards wurde im ersten Schritt eine konventionelle RT-PCR zum Nachweis des 1. Teils des N-Gens von ECoV durchgeführt (Primer siehe Tab. 10). Die verwendeten Proben waren drei, bereits bekannt ECoV positive Feldproben, die zur Diagnostik von ECoV am Institut für Virologie eingelangt sind (3006/13, 393/18, 241/19). Die Proben lagen bereits als RNA-Extrakte vor, die bis zur Verwendung auf -80°C gelagert wurden. Ein Mastermix wurde mit dem Qiagen® OneStep RT-PCR Kit (Qiagen®, USA), wie in Tab. 11 angeführt, hergestellt.

	1x (µl)
RNAse freies H ₂ O	14,5
5x RT-PCR Puffer	5
Enzyme mix	1
dNTP mix	1
Primergemisch F(40µM)+R(40µM)	1
Gesamtvolumen Mastermix	22,5
Zugabe Template	2,5

Tab. 11: Protokoll zur Herstellung eines Mastermixes für die konventionelle RT-PCR zum Nachweis von ECoV-N 1. Teil.

Das verwendete Temperaturschema lautete:

50°C, 30 min; 95°C, 15 min 45x: 94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 1 min 72°C, 10 min
--

Die Amplifikatlänge dieser PCR beträgt 685bp.

Nach Abschluss der konventionellen RT-PCR wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt.

3.3.2. Aufreinigung des PCR-Produkts aus dem Gel

Anschließend wurde das PCR-Produkt aus dem Agarosegel extrahiert. Hierfür wurden die Banden mit einem Skalpell möglichst exakt ausgeschnitten, für die Gelaufreinigung wurde das PCR-Produkt von 3006/13 verwendet, die PCR-Reaktionen von 393/18 und 241/19 wurden zur Lagerung in den Kühlschrank verbracht.

Die Extraktion wurde mit dem Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs, Inc., USA) folgendermaßen durchgeführt:

Die Zentrifugationen wurden bei 13.000 rpm (revolutions per minute) für eine Minute durchgeführt. Es wurden die Tubes und Säulen vom Hersteller des Kits verwendet.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde mit der vierfachen Menge Gel Dissolving Buffer in ein 1,5 ml Tube überführt, anschließend bei 37 °C im Thermomixer inkubiert und immer wieder gevortext, bis sich die Agarose komplett aufgelöst hat. Die Flüssigkeit wurde anschließend auf die Säule, die sich in einem Collectiontube befand, pipettiert, für eine Minute zentrifugiert und das Collectiontube geleert. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Waschpuffer auf die Säule pipettiert, zentrifugiert und das Tube erneut geleert; dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Im Anschluss wurde die Säule erneut trocken zentrifugiert. Danach wurde sie in ein steriles 1,5 ml Eppendorftube überführt. Im letzten Schritt wurde mit 15 µl DNA Elution Buffer eluiert, je eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert.

Abschließend wurde die DNA-Menge im aufgereinigten PCR-Produkt mit einem Spektralphotometer (NanoVue Plus, GE Healthcare, UK) gemessen.

3.3.3. T-Vektor Klonierung

Ligation:

Für die T-Vektor Klonierung wurden 4,5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt, 0,5 µl pGEM®-T easy Vektor (Promega, USA) und 5 µl 2 x Blunt/TA Ligase Mastermix (New England Biolabs, Inc., USA) in ein 1,5 ml Eppendorftube pipettiert. Um die Reagenzien zu durchmischen, wurde sieben Mal auf- und abpipettiert und das Tube anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf Eis gekühlt.

Transformation:

Für die Transformation in kompetente *E. coli* (Stamm: HB101) wurden die Bakterien circa 30 Minuten auf Eis aufgetaut. Im nächsten Schritt wurden 50 µl der aufgetauten Bakterien der Ligation zugegeben und für 20-30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock durchgeführt, bei dem der Transformationsansatz für eine Minute und 30 Sekunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert wurden, danach wurde das Tube wieder für zwei bis drei Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 450 µl LB-Medium ohne Ampicillin hinzu pipettiert und bei 37 °C und 700 rpm für 20-30 Minuten im Heizblock geschüttelt.

Im letzten Schritt wurden 200 µl des Ansatzes auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze vorsichtig im Zentrum angetippt und in eine Epruvette abgeworfen, in der 2,5 ml LB-Medium (mit Ampicillin) vorgelegt war. Es wurde jeweils eine Epruvette für die Kolonien #1, #2, #3 und #4, eine für die Minikolonie und eine für die Negativkontrolle verwendet, diese wurden anschließend für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei ausreichender Trübung der Bakterienkolonien wurde die Plasmidpräparation vorgenommen.

3.3.4. Plasmidpräparation (Minis)

Alle Zentrifugationen wurden bei 13000 rpm ausgeführt.

Im ersten Schritt wurde die Bakterienkultur gevortext, danach 2 ml der Kultur in ein 2 ml Eppendorftube gekippt und für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt.

In das Eppendorftube wurden danach 200 µl Resuspendierungspuffer P1 (50 mM Tris + 0,1 mg/ml RNase A, pH = 8.0) pipettiert und solange gevortext bis das, durch die Zentrifugation gebildete, Pellet resuspendiert war. Danach wurden 200µl Lyse-Puffer P2 (0,2 M NaOH + 1 % SDS [Natriumdodecylsulfat]) hinzu pipettiert, fünfmal vorsichtig invertiert und das Eppendorftube für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Folgend wurden 200 µl Neutralisationspuffer (2,55 M KaAc, pH = 5.5) zugegeben, geschwenkt und für fünf Minuten zentrifugiert.

Nach Ablauf der Zentrifugation wurde der gesamte Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in die, zuvor in ein 1,5 ml Eppendorftube vorgelegten, 500 µl Isopropanol pipettiert und sorgfältig geschwenkt. Anschließend wurde für eine Minute zentrifugiert. Nachdem der Überstand mit einer Vakuumpumpe abgesaugt wurde, wurden 100 µl 70 % Ethanol auf das Pellet pipettiert, für eine Minute zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Das Eppendorftube wurde anschließend für drei bis fünf Minuten mit offenem Deckel bei 37 °C im Thermomixer inkubiert, bis das Ethanol verdampft war. Im letzten Schritt wurden 25 µl H₂O auf das Pellet pipettiert und für zehn Minuten bei 37 °C und 700 rpm im Thermomixer belassen und anschließend gevortext.

3.3.5. Testverdau der Plasmid-DNA

Mit dem Testverdau wird die Korrektheit der isolierten Plasmid-DNA überprüft.

Der Mastermix setzte sich je Probe folgendermaßen zusammen: 6,8 µl H₂O, 1 µl 10 x Puffer NEB 3.1 (New England Biolabs, Inc., USA) und 0,2 µl EcoRI (Restriktionsenzym, New England Biolabs, Inc. USA) Der Mastermix wurde in ein Well einer 96 Well-Testplatte vorgelegt, anschließend wurden 2 µl Plasmid-DNA als Template dazu pipettiert und vorsichtig durchmischt. Die befüllten Wells wurden mit einem Klebestreifen abgedeckt und für 45 Minuten bei 37 °C in der Wärmekammer inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein 0,8%iges Agarosegel für die folgende Gelelektrophorese hergestellt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden in jedes zuvor befüllte Well 2 µl Ladepuffer (Gel Loading Dye Purple (6X), New England Biolabs, Inc., USA) pipettiert. Das gesamte Volumen wurde benutzt, um die Geltaschen zu befüllen. Außerdem wurden 3 µl einer 1 kbp DNA-Leiter (Carl Roth, Karlsruhe) als Größenstandard aufgetragen. Das Agarosegel wurde für 25 Minuten bei 100 Volt laufen gelassen.

3.3.6. Sequenzierung

Wenn sich nach dem Testverdau das erwartete Bandenmuster im Agarosegel zeigte, wurde das Plasmid für eine Sequenzierung bei der Firma Eurofins vorbereitet. Hierfür wurden 11 µl H₂O, 4 µl Plasmid-DNA und 2 µl des in 3.3 verwendeten Forward-Primers (CAGGCATGGACACCGCATTG) (10µM) in ein Sequenzierrohrchen pipettiert.

3.3.7. Plasmidpräparation (Midis)

Um die Midis anzupflanzen wurden 50 ml LB-Medium (mit Ampicillin) und 1 µl des Klons in Epporvetten überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Präparation der Midis wurde mit dem FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwan) durchgeführt.

Nach der Inkubation über Nacht wurden 15 ml der Kultur für zehn Minuten bei 4.000 rpm zentrifugiert und so die Bakterien pelletiert. Für die alkalische Lyse wurde das Pellet in 400 µl FADP1 Puffer (+ RNase A) durch vortexen resuspendiert und der Inhalt in ein 2 ml Eppendorftube überführt. In das Tube wurden 400 µl FADP2 Puffer pipettiert und fünf bis zehn Mal invertiert. Das Tube wurde für fünf Minuten inkubiert, anschließend wurden 600 µl FADP3 Puffer hinzugegeben und fünf- bis zehnmal invertiert. Den Abschluss der alkalischen Lyse bildete eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für fünf Minuten. Im nächsten Schritt wurde die DNA an eine Silicasäule gebunden. Dazu wurde eine Säule mit 700 µl Lysat beladen, bei 13.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss abgekippt, anschließend wurde die Säule erneut mit dem Rest des Lysats beladen und erneut bei 13.000 rpm für 30 sec zentrifugiert. Die Entfernung zellulärer Bestandteile und anderer Komponenten erfolgte durch zweimaliges Waschen. Dazu wurden 400 µl W1 Puffer auf die Säule pipettiert, bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss abgekippt. Danach wurden 700 µl Wash Buffer (+EtOH) auf die Säule pipettiert und erneut bei 13.000 für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss wurde abgekippt. Die Säule wurde anschließend bei 13.000 rpm für drei Minuten trocken zentrifugiert und in ein 1,5 ml Tube überführt. Im letzten Schritt erfolgte die Elution der DNA, hierfür wurden 100 µl dH₂O direkt auf die Matrix gegeben und für eine Minute inkubiert, abschließend wurde bei 13.0000 rpm für 1 min zentrifugiert.

Anschließend erfolgte erneut ein Testverdau der Plasmid-DNA, dieser wurde wie unter 3.3.5. beschrieben durchgeführt.

3.3.8. Linearisierung

Für eine effiziente RNA-Transkription wurde die Plasmid-DNA zuerst mittels PCR linearisiert.

Dafür wurden 12,5 µl des 2x Phanta Max Master Mix (Vazyme Biotech, China), jeweils 1 µl der von der Firma Eurofins synthetisierten Primer A5 (Forward-Primer, Sequenz: ACGTTGTAAAACGACGGCCAG) und A7 (Reverse-Primer, Sequenz: CACAGGAAACAGCTATGACCATG) (10 µM), 10 µl H₂O und 0,5 µl Template in ein PCR-Röhrchen pipettiert. Das Temperaturschema der PCR lautete:

95°C, 1 min
40x: 95°C, 15 sec; 64°C, 15 sec; 72°C, 30 sec
72°C, 5 min

Im nächsten Schritt wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1 µl Ladebuffer (Gel Loading Dye Purple (6X), New England Biolabs, Inc., USA) und jeweils 2 µl des PCR-Produkts in die Taschen des Agarosegels geladen und bei 100 Volt 30 Minuten laufen gelassen. Es wurde eine Leiter für 1 kbp (Carl Roth, Karlsruhe) verwendet.

3.3.9. Transkription

Für die Verwendung des linearisierten PCR-Produkts als Standard in der RT-qPCR musste die DNA in RNA umgeschrieben werden. Hierbei wurde besonders auf die Arbeit mit RNase-freien, sterilen Reagenzien geachtet.

Der Transkriptionsansatz wurde folgendermaßen hergestellt: 5 µl nucelasefreies H₂O (Carl Roth, Karlsruhe), 1 µl 10x Transkriptionspuffer (New England Biolabs, Inc., USA), 1 µl (10mM) rNTPs (New England Biolabs, Inc., USA), 1 µl 100mM DTT (New England Biolabs, Inc., USA), 0,5 µl T7-RNA-Polymerase (New England Biolabs, Inc., USA) und 0,5 µl RNase-Inhibitor (New England Biolabs, Inc., USA) wurden in ein 1,5 ml Eppendorftube pipettiert. Außerdem wurden 3 µl linearisiertes PCR-Produkt als Template hinzu pipettiert. Vor der anschließenden Inkubation für 45 Minuten im Thermomixer bei 37 °C wurde das Tube gevortext und sehr kurz zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde ein Agarosegel vorbereitet, hier war es wichtig, einen neuen, unbenutzten Puffer zu verwenden. In die Geltaschen wurden 0,5 µl des Loading Dye

(derselbe wie oben von NEB) mit 1 µl der transkribierten RNA aufgetragen und bei 135 Volt für vier Minuten laufen gelassen. Als Größenstandard wurde die 1 kbp Leiter der Fa. Roth verwendet.

3.3.10. Aufreinigung der RNA

Die Aufreinigung der RNA wurde mit dem Monarch® RNA Cleanup Kit (New England Biolabs, Inc., USA) durchgeführt.

Zur transkribierten RNA wurden 120 µl RNA Cleanup Binding Buffer und 150 µl 95%iges Ethanol pipettiert, durch mehrmaliges Pipettieren vermischt und danach auf eine Säule, welche sich in einem Collectiontube befand, überführt. Anschließend wurde bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert (gilt für alle folgenden Zentrifugationen) und das Collectiontube geleert. Danach wurden 500 µl Washbuffer auf die Säule pipettiert, zentrifugiert und das Collectiontube geleert, dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurde die Säule in ein RNase-freies 1,5 ml Tube überführt, 25 µl nucleasefreies Wasser auf die Säule pipettiert und zentrifugiert.

Die Menge der in einem Transkript enthaltenen RNA- oder DNA-Kopien pro Mikroliter kann mit der unten angeführten Formel berechnet werden. Zuerst musste die RNA-Menge des aufgereinigten Transkripts gemessen werden, das erfolgte mit dem QuantiFluor® RNA System (Promega, USA) nach Herstellerangaben.

$$\frac{\text{RNA -/DNA - Menge in ng pro } \mu\text{l} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Länge des RNA -/DNA - Abschnitts} \times 1 \times 10^9 \times \text{Gewicht (Da)}} \\ = \text{RNA -/DNA - Kopien pro } \mu\text{l}$$

Die Avogadro-Konstante gibt an, wie viele Moleküle in einem Mol enthalten sind. Weiters wird angenommen, dass ein RNA-Nukleotid eine Masse von 340 Dalton (Da) hat, die eines DNA-Nukleotids beträgt 330 Da und die eines Basenpaares einer doppelsträngigen DNA 660 Da. Die Länge des RNA-/DNA-Abschnitts (in Basen oder Basenpaaren) wird mit 1×10^9 multipliziert, um in ng/µl umzurechnen. So kann die Menge an RNA- oder DNA-Kopien pro Mikroliter Transkript bestimmt werden (<http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr> - About the Calculation Zugriff 15.04.2022).

3.4. Herstellung einer Verdünnungsreihe des Transkripts ECoV_N

Von dem RNA-Transkript wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-13} hergestellt. Dazu wurden 13 1,5 ml Eppendorftubes mit 10^{-1} bis 10^{-13} beschriftet und jeweils 90 μ l H₂O vorgelegt. Anschließend wurden 10 μ l des unverdünnten Transkripts in das 10^{-1} -Tube pipettiert, gevortext und kurz zentrifugiert. Von der 10^{-1} Verdünnung wurden danach 10 μ l in das 10^{-2} -Tube überführt, gevortext und kurz zentrifugiert. Diese Schritte wurden bis zu 10^{-13} Verdünnung wiederholt.

Die Verdünnungen ECoV_N 10^{-4} bis 10^{-13} wurden als Doppelansatz in der darauffolgenden ECoV_N-Gen-RT-qPCR eingesetzt. Es wurde 1 μ l der jeweiligen Verdünnungsstufe in die PCR-Tubes mit dem zuvor hergestellten Mastermix (Anfertigung wie in Tab. 8) pipettiert. Als Negativkontrollen wurden ntc und das Transkript BetaCoV_TR und als Positivkontrolle die Feldprobe 3006/13 verwendet.

3.5. Durchführung der BetaCoV1-RT-qPCR und ECoV_N-Gen-RT-qPCR zum Vergleich ECoV positiver Feldproben

Um die bisher am Institut für Virologie zur Diagnostik von ECoV verwendete BetaCoV1-RT-qPCR mit der ECoV_N-Gen-RT-qPCR vergleichen zu können, wurden 25, zuvor zu diagnostischen Zwecken analysierte Proben, nochmals getestet. Die Feldproben stammten aus österreichischen Ställen und wurden in den Jahren 2018 und 2019 eingeschickt.

Probennummer			
393/18	232/19	278/19	658/19
241/18	238/19	279/19	659/19
216/19	239/19	285/19	679/19
217/19	669/19	286/19	671/19
223/19	613/19	287/19	
228/19	615/19	282/19	
232/19	259/19	284/19	

Tab. 12: Die 25 für die RT-qPCRs verwendeten Kotproben von Pferden.

3.5.1. BetaCoV1-RT-qPCR (Feldproben)

Es wurde für insgesamt 31 Proben ein Mastermix hergestellt, wie in Tab. 8 angeführt. Zusätzlich zu den in Tab. 12 gelisteten Feldproben wurden die Verdünnungen des RNA-Transkripts BetaCoV_TR 10^{-6} , BetaCoV_TR 10^{-7} , BetaCoV_TR 10^{-8} und BetaCoV_TR 10^{-9} als Standards, die Feldprobe 3006/13 als Positivkontrolle und ntc als Negativkontrolle eingesetzt. Das verwendete Temperaturprotokoll ist unter 3.1. zu finden.

3.5.2. ECoV-N_Gen-RT-qPCR (Feldproben)

Die Herstellung des Mastermixes ist in Tab. 8 zu finden. Auch hier wurde mit den 25 Feldproben und zusätzlich den Verdünnungen des RNA-Transkripts ECoV_N 10^{-6} , ECoV_N 10^{-7} , ECoV_N 10^{-8} und ECoV_N 10^{-9} als Standards eine RT-qPCR durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die Feldprobe 3006/13 und als Negativkontrolle ntc. Es wurde das in 3.2. erwähnte Temperaturschema verwendet.

3.5.3. Quantifizierung der Feldproben (GE/g Probe)

Die von der Software (Qiagen) errechneten GE/ μ l der 25 Feldproben der BetaCoV1-RT-qPCR und der ECoV-N_Gen-RT-qPCR wurden mit dem Faktor 4285 multipliziert um die in einem Gramm Feldprobe enthaltenen Genomäquivalente zu berechnen. Der Faktor ergab sich aus der nicht im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Probenbearbeitung und Extraktion.

4. Ergebnisse

4.1. RT-qPCR der Verdünnungsreihen der Transkripte BetaCoV_TR und ECoV_N

4.1.1. RT-qPCR einer Verdünnungsreihe des Transkripts BetaCoV_TR im Doppelansatz

Das Transkript BetaCoV_TR enthält unverdünnt $1,0 \times 10^{12}$ GE/ μ l, daraus ergab sich der unten angeführte Gehalt an Genomäquivalenten pro Mikroliter der jeweiligen Verdünnungsstufe.

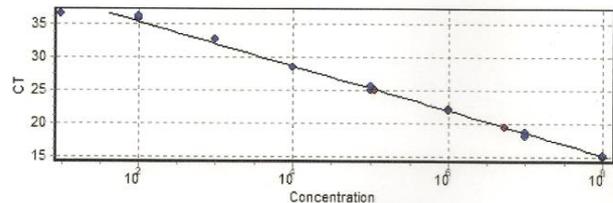
Verdünnung	GE/ μ l
10^{-4}	$1,0 \times 10^8$
10^{-5}	$1,0 \times 10^7$
10^{-6}	$1,0 \times 10^6$
10^{-7}	$1,0 \times 10^5$
10^{-8}	$1,0 \times 10^4$
10^{-9}	$1,0 \times 10^3$
10^{-10}	$1,0 \times 10^2$
10^{-11}	$1,0 \times 10^1$
10^{-12}	1
10^{-13}	$1,0 \times 10^{-1}$

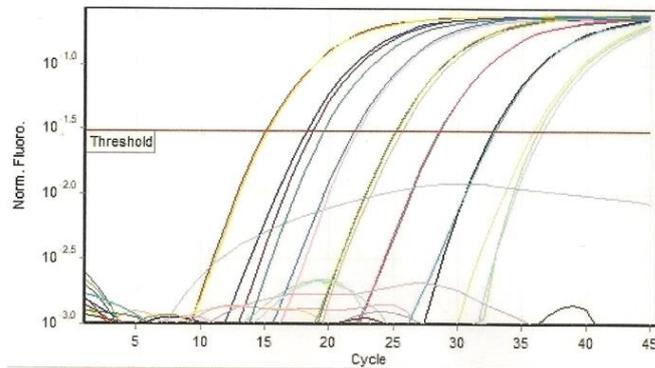
Tab. 13: Errechneter Gehalt an GE/ μ l der Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-13} des Transkripts BetaCoV_TR.

Quantitation Information

Threshold	0,03037
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= $10^{(-0,299 \cdot CT + 12,564)}$
Standard Curve (2)	CT = $-3,348 \cdot \log(\text{conc}) + 42,061$
Reaction efficiency (*)	($* = 10^{(-1/m)} - 1$) 0,98934
M	-3,34773
B	42,0615
R Value	0,99563
R^2 Value	0,99127
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





No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1		BCoV 10 ⁻⁴ 1	Standard	15,06		1,00E+08	1,16E+08
2		BCoV 10 ⁻⁴ 2	Standard	15,18		1,00E+08	1,07E+08
3		BCoV 10 ⁻⁵ 1	Standard	18,18		1,00E+07	1,36E+07
4		BCoV 10 ⁻⁵ 2	Standard	18,66		1,00E+07	9,80E+06
5		BCoV 10 ⁻⁶ 1	Standard	22,18		1,00E+06	8,70E+05
6		BCoV 10 ⁻⁶ 2	Standard	21,93		1,00E+06	1,03E+06
7		BCoV 10 ⁻⁷ 1	Standard	25,11		1,00E+05	1,16E+05
8		BCoV 10 ⁻⁷ 2	Standard	25,58		1,00E+05	8,37E+04
9		BCoV 10 ⁻⁸ 1	Standard	28,61		1,00E+04	1,04E+04
10		BCoV 10 ⁻⁸ 2	Standard	28,54		1,00E+04	1,09E+04
11		BCoV 10 ⁻⁹ 1	Standard	32,68		1,00E+03	6,35E+02
12		BCoV 10 ⁻⁹ 2	Standard	32,82		1,00E+03	5,78E+02
13		BCoV 10 ⁻¹⁰ 1	Standard	35,86		1,00E+02	7,10E+01
14		BCoV 10 ⁻¹⁰ 2	Standard	36,24		1,00E+02	5,48E+01
15		BCoV 10 ⁻¹¹ 1	Standard	36,60		1,00E+01	4,29E+01
16		BCoV 10 ⁻¹¹ 2	Standard			1,00E+01	
17		BCoV 10 ⁻¹² 1	Standard			1,00E+00	
18		BCoV 10 ⁻¹² 2	Standard			1,00E+00	
19		BCoV 10 ⁻¹³ 1	Standard			1,00E-01	
20		BCoV 10 ⁻¹³ 2	Standard			1,00E-01	
21		ntc	NTC				
22		pos. KO 3006/13 1	Positive Control	25,15			1,13E+05
23		pos. KO BCoV 1	Positive Control	19,55			5,30E+06

Tab. 14: Ergebnisse der RT-qPCR der Verdünnungsreihe des Transkripts BetaCoV_TR.

In der RT-qPCR konnte bei den Verdünnungen BetaCoV_TR 10^{-11} 2, BetaCoV_TR 10^{-12} 1 und 2 und BetaCoV_TR 10^{-13} 1 und 2 keine Fluoreszenz detektiert werden, somit war mit dieser PCR ein Minimalgehalt von 10 GE/ μ l in der Reaktion detektierbar. Dies entspricht einem GE-Gehalt von $4,29 \times 10^4$ GE/g Probe.

4.1.2. RT-qPCR einer Verdünnungsreihe des Transkripts ECoV_N im Doppelansatz

Die in dem Transkript enthaltene RNA-Menge wurde mit dem QuantiFluor® RNA System (Promega, USA) gemessen und ergab 287,6 ng/ μ l. Daraus lässt sich unter der Berücksichtigung der Nukleotidsequenz ein Wert von $7,62 \times 10^{11}$ GE/ μ l errechnen. Der Gehalt an GE/ μ l der Verdünnungsstufen ist in Tab. 14 angeführt.

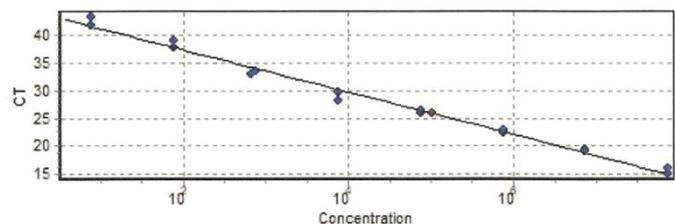
Verdünnung	GE/ μ l
10^{-4}	$7,6 \times 10^7$
10^{-5}	$7,6 \times 10^6$
10^{-6}	$7,6 \times 10^5$
10^{-7}	$7,6 \times 10^4$
10^{-8}	$7,6 \times 10^3$
10^{-9}	$7,6 \times 10^2$
10^{-10}	$7,6 \times 10^1$
10^{-11}	7,6
10^{-12}	$7,6 \times 10^{-1}$
10^{-13}	$7,6 \times 10^{-2}$

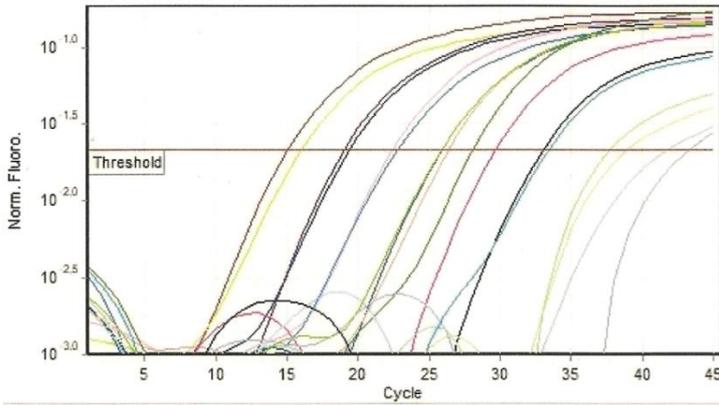
Tab. 15: Errechneter Gehalt an GE/ μ l der Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-13} des Transkripts ECoV_N.

Quantitation Information

Threshold	0,02129
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= $10^{(-0,264*CT + 11,836)}$
Standard Curve (2)	CT = $-3,793*\log(\text{conc}) + 44,896$
Reaction efficiency (*)	(* = $10^{(-1/m) - 1}$) 0,83496
M	-3,79325
B	44,89626
R Value	0,99496
R^2 Value	0,98994
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 7
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light

Standard Curve





No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)
1	Red	ECoV N 10 ⁻⁴ 1	Standard	15,07		7,60E+07	7,29E+07
2	Yellow	ECoV N 10 ⁻⁴ 2	Standard	16,01		7,60E+07	4,11E+07
3	Blue	ECoV N 10 ⁻⁵ 1	Standard	19,36		7,60E+06	5,40E+06
4	Purple	ECoV N 10 ⁻⁵ 2	Standard	18,99		7,60E+06	6,75E+06
5	Pink	ECoV N 10 ⁻⁶ 1	Standard	22,39		7,60E+05	8,56E+05
6	Light Blue	ECoV N 10 ⁻⁶ 2	Standard	22,80		7,60E+05	6,70E+05
7	Dark Green	ECoV N 10 ⁻⁷ 1	Standard	25,88		7,60E+04	1,03E+05
8	Orange	ECoV N 10 ⁻⁷ 2	Standard	26,36		7,60E+04	7,71E+04
9	Green	ECoV N 10 ⁻⁸ 1	Standard	28,09		7,60E+03	2,70E+04
10	Light Pink	ECoV N 10 ⁻⁸ 2	Standard	29,68		7,60E+03	1,02E+04
11	Black	ECoV N 10 ⁻⁹ 1	Standard	33,02		6,70E+02	1,35E+03
12	Light Blue	ECoV N 10 ⁻⁹ 2	Standard	33,39		7,60E+02	1,08E+03
13	Yellow	ECoV N 10 ⁻¹⁰ 1	Standard	38,89		7,60E+01	3,83E+01
14	Light Green	ECoV N 10 ⁻¹⁰ 2	Standard	37,70		7,60E+01	7,89E+01
15	Light Blue	ECoV N 10 ⁻¹¹ 1	Standard	41,75		7,60E+00	6,75E+00
16	Light Blue	ECoV N 10 ⁻¹¹ 2	Standard	43,28		7,60E+00	2,66E+00
17	Blue	ECoV N 10 ⁻¹² 1	Standard		NEG (NTC)	7,60E-01	
18	Pink	ECoV N 10 ⁻¹² 2	Standard		NEG (NTC)	7,60E-01	
19	Light Pink	ECoV N 10 ⁻¹³ 1	Standard		NEG (NTC)	7,60E-02	
20	Red	ECoV N 10 ⁻¹³ 2	Standard		NEG (NTC)	7,60E-02	
21	Orange	ntc	NTC		NEG (NTC)		
22	Light Green	pos. KO 3006/13 1	Positive Control	25,85			1,05E+05
23	Dark Green	pos. KO betaCoV 1	Positive Control		NEG (NTC)		

Tab. 16: Ergebnisse der RT-qPCR der Verdünnungsreihe des Transkripts ECoV_N.

Bei den Verdünnungen ECoV_N 10^{-12} 1 und 2 sowie ECoV_N 10^{-13} 1 und 2 konnte in dieser PCR keine Fluoreszenz gemessen werden. Somit kann die Sensitivität der N-Gen-spezifischen RT-qPCR mit rund 10 GE/ μ l in der Reaktion und somit $4,29 \times 10^4$ GE/g Probe angenommen werden.

4.2. Vergleich der BetaCoV1-RT-qPCR und der ECoV_N-Gen-RT-qPCR anhand von 25 Feldproben

Für einen Vergleich der BetaCoV1-RT-qPCR und der ECoV_N-Gen-RT-qPCR mit Feldproben wurden 25 Extrakte von Pferdekotproben, die zuvor zu diagnostischen Zwecken an das Institut für Virologie eingesendet worden waren, erneut analysiert. Die Proben stammten aus fünf Ställen in Niederösterreich und dem Burgenland, in denen 2018 oder 2019 ein Ausbruch von ECoV aufgetreten war. In den Betrieben waren jeweils zehn bis 87 Pferde untergebracht. Es wurden für die Diplomarbeit Kotproben verwendet, deren Ergebnis in der diagnostischen BetaCoV1-RT-qPCR positiv (20 Proben), als auch negativ (fünf Proben) war.

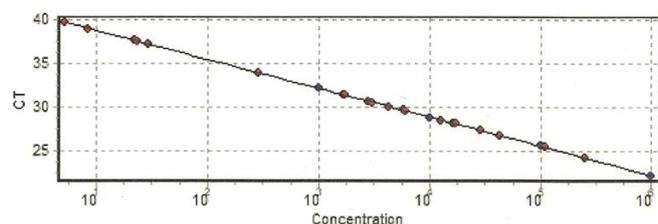
4.2.1. Analyse von 25 Feldproben unter Verwendung der BetaCoV1-RT-qPCR

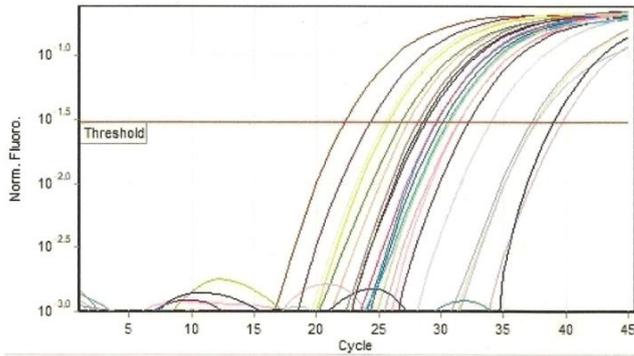
Diese RT-qPCR wurde ursprünglich am Institut zur Diagnostik einer ECoV-Infektion genutzt.

Quantitation Information

Threshold	0,030
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= $10^{(-0,305 \cdot CT + 12,796)}$
Standard Curve (2)	CT = $-3,280 \cdot \log(\text{conc}) + 41,968$
Reaction efficiency (*)	(* = $10^{(-1/m) - 1}$) 1,01795
M	-3,27966
B	41,96755
R Value	0,99966
R^2 Value	0,99932
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





No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1	Red	betaCoV 10 ⁻⁶	Standard	22,23		1,00E+06	1,05E+06
2	Yellow	betaCoV 10 ⁻⁷	Standard	25,72		1,00E+05	9,02E+04
3	Blue	betaCoV 10 ⁻⁸	Standard	28,75		1,00E+04	1,07E+04
4	Purple	betaCoV 10 ⁻⁹	Standard	32,15		1,00E+03	9,87E+02
5	Pink	223/19	Unknown	31,42			1,65E+03
6	Light Blue	228/19	Unknown	29,62			5,81E+03
7	Dark Green	232/19	Unknown	30,07			4,25E+03
8	Orange	233/19	Unknown	27,33			2,91E+04
9	Green	238/19	Unknown	26,79			4,25E+04
10	Red	239/19	Unknown	29,58			6,00E+03
11	Black	669/19	Unknown				
12	Teal	671/19	Unknown	30,53			3,08E+03
13	Yellow	613/19	Unknown	37,50			2,31E+01
14	Light Green	615/19	Unknown	30,67			2,79E+03
15	Light Blue	259/19	Unknown	33,91			2,86E+02
16	Blue	278/19	Unknown	37,56			2,20E+01
17	Light Blue	279/19	Unknown	37,18			2,88E+01
18	Pink	285/19	Unknown	39,64			5,13E+00
19	Red	286/19	Unknown	31,37			1,71E+03
20	Red	287/19	Unknown	28,51			1,27E+04
21	Orange	282/19	Unknown				
22	Light Green	284/19	Unknown				
23	Teal	658/19	Unknown				
24	Blue	659/19	Unknown				
25	Blue	679/19	Unknown	38,94			8,41E+00
26	Purple	ntc	NTC				
27	Red	3006/13	Positive Control	24,24			2,55E+05
28	Light Blue	393/18	Unknown	25,43			1,10E+05
29	Light Blue	241/18	Unknown	28,08			1,71E+04
30	Light Blue	216/19	Unknown				
31	Light Blue	217/19	Unknown	28,14			1,64E+04

Tab. 17: Ergebnisse der BetaCoV1-RT-qPCR.

Im Vergleich mit der zuvor zur Diagnostik einer ECoV-Infektion durchgeführten RT-qPCR konnte mit dieser RT-qPCR im Rahmen der Diplomarbeit bei den Proben 216/19 und 669/19 keine Fluoreszenz detektiert werden, während bei Probe 679/19 eine Fluoreszenz messbar war. Ein Vergleich der CT-Werte und der enthaltenen GE/g Probe findet sich in Tab. 19.

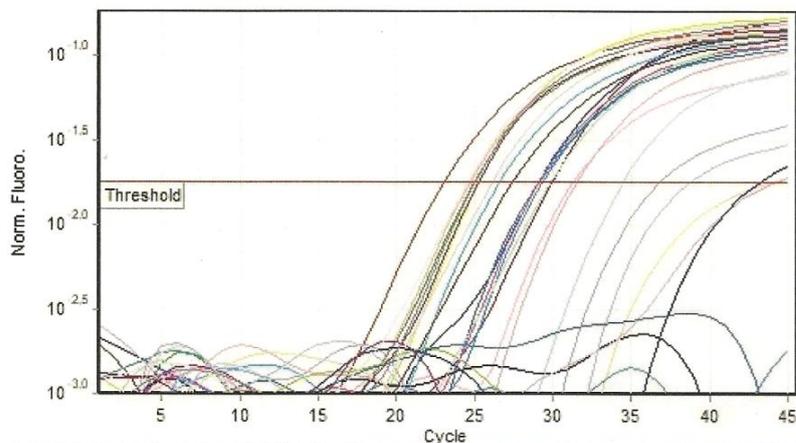
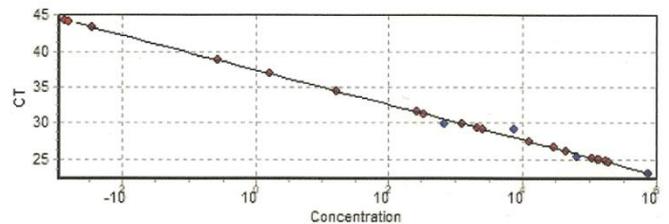
4.2.2. Analyse von 25 Feldproben unter Verwendung der ECoV-N_Gen-RT-qPCR

Diese RT-qPCR, die einen Abschnitt des N-Gens von ECoV nachweist, soll zukünftig für die Diagnostik einer Infektion mit dem equinen Coronavirus genutzt werden. Um die Sensitivität mit der bisher eingesetzten BetaCoV1_RT-qPCR auch mit Feldproben vergleichen zu können, wurden dieselben Proben auch mit der ECoV_N-Gen-RT-qPCR analysiert.

Quantitation Information

Threshold	0,01809
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= $10^{(-0,414*CT + 15,465)}$
Standard Curve (2)	CT = $-2,418*\log(\text{conc}) + 37,396$
Reaction efficiency (*)	($* = 10^{(-1/m)} - 1$) 1,59145
M	-2,41813
B	37,39641
R Value	0,97028
R^2 Value	0,94145
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



No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1		ECoV N 10 ⁻⁶	Standard	23,07		7,60E+05	8,41E+05
2		ECoV N 10 ⁻⁷	Standard	25,29		6,70E+04	1,02E+05
3		ECoV N 10 ⁻⁸	Standard	29,15		7,60E+03	2,57E+03
4		ECoV N 10 ⁻⁹	Standard	29,97		6,70E+02	1,18E+03
5		223/19	Unknown	31,27			3,41E+02
6		228/19	Unknown	29,37			2,09E+03
7		232/19	Unknown	29,15			2,57E+03
8		233/19	Unknown	24,72			1,75E+05
9		238/19	Unknown	24,96			1,39E+05
10		239/19	Unknown	29,16			2,55E+03
11		669/19	Unknown				
12		671/19	Unknown	26,61			2,89E+04
13		613/19	Unknown	44,16			1,59E-03
14		615/19	Unknown	29,90			1,27E+03
15		259/19	Unknown	34,48			1,61E+01
16		278/19	Unknown	38,77			2,70E-01
17		279/19	Unknown	36,88			1,64E+00
18		285/19	Unknown	44,31			1,38E-03
19		286/19	Unknown	31,55			2,63E+02
20		287/19	Unknown	27,46			1,28E+04
21		282/19	Unknown				
22		284/19	Unknown				
23		658/19	Unknown				
24		659/19	Unknown				
25		679/19	Unknown	43,33			3,53E-03
26		ntc	NTC				
27		3006/13	Positive Control	25,21			1,10E+05
28		393/18	Unknown	24,60			1,95E+05
29		241/18	Unknown	26,12			4,59E+04
30		216/19	Unknown				
31		217/19	Unknown	25,02			1,31E+05

Tab. 18: Ergebnisse der ECoV_N-Gen-RT-qPCR.

Ein Vergleich der CT-Werte und der enthaltenen GE/g Kotprobe ist in Tab. 19 zu finden.

Probennummer	CT-Wert Diagnostik	BetaCoV1_RT-qPCR		ECoV_N-Gen-RT-qPCR	
	BetaCoV1_RT-qPCR	CT-Wert	GE/g	CT-Wert	GE/g
393/18		25,4	4,71 x 10 ⁸	24,6	8,36 x 10 ⁸
241/18	26,4	28,1	7,33 x 10 ⁷	26,1	1,97 x 10 ⁸
216/19	39,5	-	-	-	-
217/19	29,2	28,1	7,03 x 10 ⁷	25,0	5,61 x 10 ⁸
223/19	33,7	31,4	7,07 x 10 ⁶	31,3	1,46 x 10 ⁶
228/19	31,1	29,6	2,49 x 10 ⁷	29,4	8,96 x 10 ⁶
232/19	30,8	30,1	1,82 x 10 ⁷	29,2	1,10 x 10 ⁷
233/19	28,0	27,3	1,25 x 10 ⁸	24,7	7,50 x 10 ⁸
238/19	28,1	26,8	1,82 x 10 ⁸	25,0	5,96 x 10 ⁸
239/19	30,7	29,6	2,57 x 10 ⁷	29,2	1,09 x 10 ⁷
669/19	38,8	-	-	-	-
671/19	32,4	30,5	1,32 x 10 ⁷	26,6	1,24 x 10 ⁸
613/19	38,3	37,5	9,90 x 10 ⁴	44,2	6,81*
615/19	30,9	30,7	1,20 x 10 ⁷	29,9	5,44 x 10 ⁶
259/19	31,8	33,9	1,23 x 10 ⁶	34,5	6,70 x 10 ⁴
278/19	32,7	37,6	9,43 x 10 ⁴	38,8	1156,95*
279/19	31,8	37,2	1,23 x 10 ⁵	36,9	7,03 x 10 ³
285/19	33,5	39,6	2,20 x 10 ⁴	44,3	5,91*
286/19	26,5	31,4	7,33 x 10 ⁶	31,6	1,13 x 10 ⁶
287/19	24,3	28,5	5,44 x 10 ⁷	27,5	5,49 x 10 ⁷
282/19	-	-	-	-	-
284/19	-	-	-	-	-
658/19	-	-	-	-	-
659/19	-	-	-	-	-
679/19	-	38,9	3,60 x 10 ⁴	43,3	15,13*

Tab. 19: Vergleich der CT-Werte und der GE/g Kotprobe der drei RT-qPCRs.

*) Werte unter dem Quantifikationslevel der ECoV_N-Gen-RT-qPCR.

Die Ergebnisse dieser RT-qPCR decken sich qualitativ (positiv/negativ) mit denen der BetaCoV1_RT-qPCR. In den Proben 393/18, 241/18, 217/19, 233/19, 238/19, 671/19 und 287/19 konnte mit der ECoV_N-Gen_RT-qPCR im Vergleich mit der BetaCoV1-RT-qPCR ein höherer Gehalt an Genomäquivalenten pro Gramm Probe detektiert werden, in den Proben 223/19, 228/19, 232/19, 239/19, 613/19, 615/19, 259/19, 278/19, 279/19, 285/19, 286/19 und

679/19 war mit der BetaCoV1-RT-qPCR ein höherer Gehalt an GE/g Probe nachweisbar. Die Berechnung der GE/g in der Probe 232/19 ergab einen ähnlichen Gehalt.

Die laut den Berechnungen in den Proben 613/19, 278/19, 285/19 und 279/19 enthalten Genomäquivalente pro Gramm Kotprobe (Tab. 19) lagen unter dem, zuvor mit der Verdünnungsreihe des Transkripts ECoV_N bestimmten, Quantifikationslevel der PCR ($4,29 \times 10^4$ GE/g Probe).

Das Ergebnis der Kotproben 216/19, 669/19, 282/19, 284/19, 658/19 und 659/19 fiel in der BetaCoV1-RT-qPCR und in der ECoV_N-Gen-RT-qPCR negativ aus.

Das Resultat der Proben 216/19 und 669/19 war zuvor in der diagnostischen BetaCoV1-RT-qPCR positiv, während das der Probe 679/19 negativ ausfiel.

5. Diskussion

Am Institut für Virologie der Vetmeduni Vienna wurde bisher zur Diagnostik einer Infektion mit dem equinen Coronavirus eine RT-qPCR (BetaCoV1-RT-qPCR) nach Spiss et al. 2012 zum Nachweis von Viren der Spezies *Betacoronavirus 1* (CRCoV, BCoV, ECoV) verwendet. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde eine RT-qPCR (ECoV_N-Gen-RT-qPCR) nach Pusterla et al. 2013, die einen Abschnitt des N-Gens von ECoV detektieren kann, etabliert und mit der bisher verwendeten BetaCoV1-RT-qPCR anhand von 25 Feldproben verglichen. Um das in Kotproben enthaltene Virusmaterial zu quantifizieren, wurde erfolgreich ein Plasmid (ein Abschnitt des N-Gens von ECoV) durch Klonierung generiert (Transkript ECoV_N) und die enthaltenen GE/ μ l gemessen. Mit diesem Transkript und dem bereits vorhandenen Transkript BetaCoV_TR wurden Verdünnungsreihen hergestellt.

Die RT-qPCRs der Verdünnungsreihen der Transkripte BetaCoV_TR und ECoV_N ergaben einen minimalsten detektierbaren Gehalt von jeweils 10 GE/ μ l in der Reaktion und somit $4,29 \times 10^4$ GE/g Probe. In anderen PCRs zum Nachweis des N-Gens von ECoV waren fünf GE (Pusterla et al. 2013) beziehungsweise 200 Kopien/Reaktion (entspricht $5,0 \times 10^5$ Kopien/g Kot) (Nemoto et al. 2014) nachweisbar. Damit können beide, in dieser Diplomarbeit evaluierte Real-time PCRs als vergleichbar gut sensitiv bewertet werden.

Die bisher zur Diagnostik einer ECoV-Infektion durchgeführte BetaCoV1-RT-qPCR der 25 ausgewählten Feldproben ergab ursprünglich ein positives Ergebnis bei 20 Proben, bei fünf Proben fiel das Ergebnis negativ aus (Tab. 19). Die Ergebnisse der beiden RT-qPCRs, die hier im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführt wurden, stimmten qualitativ (positiv/negativ) in allen Fällen miteinander überein. Der Tabelle 19 ist zu entnehmen, dass in den Proben 216/19 und 669/19 in der diagnostischen BetaCoV1-RT-qPCR Abschnitte des Polymerasegens von ECoV detektiert werden konnten, während das bei beiden, im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführten, RT-qPCRs nicht der Fall war. Die Ursache hierfür kann die Lagerung der RNA-Extrakte auf -80 °C über Monate und das für die PCR erforderliche Auftauen sein. Weiters lag der CT-Wert beider Proben in der diagnostischen PCR bei über 38, die Viruslast war somit schon initial sehr gering. Umgekehrt verhält sich das Ergebnis der Probe 679/19, diese war in der diagnostischen RT-qPCR negativ, während es bei den PCRs im Rahmen der Diplomarbeit positiv ausfiel. In den beiden RT-qPCRs lagen die CT-Werte mit 38,9 (BetaCoV1-

RT-qPCR) und 43,3 (ECoV_N-Gen-RT-qPCR) an der Nachweisbarkeitsgrenze und können somit nicht zwingend als reproduzierbar angesehen werden.

Der errechnete Gehalt an GE/g Probe lag mit der BetaCoV1-RT-qPCR bei zwölf von 19 positiven Kotproben über dem der ECoV_N-Gen-RT-qPCR. In der Probe 232/19 ergab die Berechnung einen sehr ähnlichen Gehalt an Genomäquivalenten pro Gramm Kotprobe. Unter dem zuvor bestimmten Quantifikationslevel ($4,29 \times 10^4$ GE/g Probe) lagen die errechneten GE/g Probe von 613/19, 278/19, 285/19 und 279/19 in der ECoV_N-Gen_RT-qPCR. Diese wurden aufgrund des CT-Werts und des Verlaufs der Amplifikationskurve der qPCR dennoch als positiv gewertet.

Die Quantifizierungsdaten der ECoV_N-Gen-RT-qPCR der Feldproben sind aufgrund von Eingabefehlern bei den errechneten GE/ μ l der Standards ECoV_N 10^{-7} ($6,7 \times 10^4$ statt $7,6 \times 10^4$) sowie ECoV_N 10^{-9} ($6,7 \times 10^2$ statt $7,6 \times 10^2$) (Tab. 18) kritisch zu beurteilen. Da daraus keine Beeinträchtigung der qualitativen Aussage, die die Kernaussage dieser Diplomarbeit darstellt, zu erwarten ist, wurde die RT-qPCR nicht wiederholt. Auch bei der RT-qPCR der Verdünnungsreihe des Transkripts ECoV_N kam es bei dem Standard ECoV_N 10^{-9} 1 ($6,7 \times 10^2$ statt $7,6 \times 10^2$) (Tab. 16) zu einem Eingabefehler. Auch hier sind keine Änderungen an der qualitativen Aussage der RT-qPCR zu erwarten, weshalb auch diese PCR nicht wiederholt wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Sensitivität beider PCRs hoch ist und sie sich somit für die Diagnostik einer ECoV-Infektion eignen. Auch die weniger spezifische RT-qPCR zum Nachweis von *Betacoronaviren 1* (CRCoV, BCoV, ECoV) kann weiterhin genutzt werden, da ECoV das bisher einzige bekannte und klinisch relevante Coronavirus bei Pferden ist. In Zukunft kann am Institut routinemäßig die ECoV_N-Gen-RT-qPCR zur Diagnostik genutzt werden, da hier ein für ECoV spezifischer Abschnitt des N-Gens detektiert werden kann und durch die Generierung des Plasmids und der Verdünnungsreihe auch eine Quantifizierung möglich ist. Die BetaCoV1-RT-qPCR eignet sich dennoch als Ergänzung bei fraglich positiven/negativen Ergebnissen.

Die bisherigen Berichte über das Auftreten von ECoV in Ausbrüchen zeigen, dass eine sensitive und rasche Diagnostik einer ECoV-Infektion essentiell ist. Je nach Aufbau des Betriebs und Detektionszeitpunkt der ECoV-Infektion kann eine unterschiedliche Anzahl von Tieren betroffen sein. In Ausbrüchen konnte beispielsweise bei 132 von 600 Pferden das Virus nachgewiesen werden (Oue et al. 2011), Oue et al. 2013 testete 204 von 650 Tiere positiv,

sieben von acht Pferden infizierten sich bei Fielding et al. 2015 mit ECoV, Kambayashi et al. 2021 wies bei 41 von 41 Tieren eine Serokonversion auf ECoV nach. Auch in Österreich sind immer wieder Ausbrüche von ECoV (Auer et al. 2020) festgestellt worden. Die Prävalenz betrug je nach Betrieb sechs bis 100 %. Das equine Coronavirus kommt allerdings in Österreich zum jetzigen Zeitpunkt nicht ubiquitär vor (Auer et al. 2020).

In nicht-Ausbruchssituationen wird das equine Coronavirus deutlich seltener detektiert. Nemoto et al. 2019 fand unter 424 Proben fünf ECoV-positive Tiere, Bryan et al. 2019 konnte bei vier von 381 Equiden das Virus nachweisen, Berryhill et al. 2019 detektierte unter 498 Proben 33 positive Pferde.

Die Symptomatik einer ECoV-Erkrankung kann auch innerhalb eines Bestands stark variieren. Zu den am häufigsten auftretenden Symptomen zählen Anorexie, Fieber und Lethargie (Berryhill et al. 2019, Bryan et al. 2019, Kambayashi et al. 2021, Mattei et al. 2020, Nemoto et al. 2019, Pusterla et al. 2013, Pusterla et al. 2018), Koliksymptome (Auer et al. 2020, Berryhill et al. 2019, Bryan et al. 2019, Manship et al. 2019, Pusterla et al. 2018) und Diarrhoe beziehungsweise eine Veränderung der Kotkonsistenz (Auer et al. 2020, Manship et al. 2019, Mattei et al. 2020, Oue et al. 2013, Pusterla et al. 2013, Pusterla et al. 2018, Schaefer et al. 2018).

Die Methode der Wahl zur Diagnose einer Infektion mit dem equinen Coronavirus ist die RT-(q)PCR. Durch die experimentelle Infektion von Pferden und der darauffolgenden Simulation einer natürlichen Exposition von weiteren Tieren konnte gezeigt werden, dass ECoV fäkal-oral übertragen wird (Schaefer et al. 2018). Kot ist daher als Probenmaterial sehr gut geeignet. ECoV konnte sehr selten auch in Nasentupferproben mittels PCR detektiert werden, aufgrund der höheren Ausscheidung von Virusmaterial mit dem Kot wird eine Testung des Kots bevorzugt (Pusterla et al. 2019).

Die Dauer der Ausscheidung von ECoV mit dem Kot beträgt im Normalfall etwa dreieinhalb Tage bis zwei Wochen (Berryhill et al. 2019, Fielding et al. 2015, Pusterla et al. 2013). Kambayashi et al. 2021 konnte allerdings eine Ausscheidungsdauer von bis zu 98 Tagen feststellen. Wichtig zu erwähnen ist außerdem, dass die Ausscheidung von ECoV intermittierend erfolgen kann (Schaefer et al. 2018). Auch bei symptomfreien Pferden konnte das Virus nachgewiesen werden (Kambayashi et al. 2021, Schaefer et al. 2018).

Bisher ist nicht bekannt, wie hoch die ausgeschiedene Virusmenge von nachgewiesenen positiven Pferden sein muss, um andere Pferde zu infizieren. In experimentellen

Infektionsstudien wurden Pferden $4,2 \times 10^9$ Viruskopien (Nemoto et al. 2014) beziehungsweise 1×10^9 Genomäquivalente von ECoV (Schaefer et al. 2018) verabreicht. Alle infizierten Tiere schieden nach drei (Nemoto et al. 2014) beziehungsweise 5,5 (Schaefer et al. 2018) Tagen ECoV-spezifische Nukleinsäuren mit dem Kot aus. Eine Mindestmenge ist hiervon natürlich nicht abzuleiten, zudem spielt hier sowohl der Übertragungsweg als auch das Immunsystem der Tiere eine Rolle. Eine Quantifizierung über CT-Werte oder aber auch über eine absolute Bestimmung der Viruslast bietet dennoch gewisse Vorteile.

Ähnlich der Virusausscheidung nach einer humanen SARS-CoV-2-Infektion, kann anhand der ECoV-Viruslasten bei wiederholten Untersuchungen eines Tieres in Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf eine Einschätzung über den Stand des Infektionsgeschehens getroffen werden. Typischerweise fallen die Viruslasten bei beiden Infektionen in den Tagen bis Wochen nach überstandener Erkrankung deutlich ab (Auer, unpublizierte Daten, Jang et al. 2021). Für SARS-CoV-2 wird angenommen, dass bei Rekonvaleszenten ab einem CT-Wert von 30 eine Ansteckung ausgeschlossen werden kann (Robert Koch Institut. https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html;jsessionid=C5EC90FB7A00616E11029079E839EAF4.internet052?nn=2386228#doc13490982bodyText36 Zugriff 24.04.2022). Dies kann ohne belastbare Zellkulturstudien für ECoV nicht ohne weiteres angenommen werden, wenn auch die Information, ab welchen Viruslasten Pferde wieder gefahrlos in die Herde integriert werden können oder an Turnieren teilnehmen dürfen, von großer praktischer Bedeutung wäre.

Sowohl bei einem ECoV-Ausbruch, als auch bei einer experimentellen Infektionsstudie, konnte eine positive Korrelation von der Schwere der Erkrankung mit der ausgeschiedenen Virusmenge beobachtet werden (Fielding et al. 2015, Schaefer et al. 2018). Fielding et al. 2015 konnte bei verendeten Pferden eine durchschnittliche Viruslast von $2,9 \times 10^7$ GE/g Kot feststellen, die der überlebenden Tiere lag im Durchschnitt bei $9,5 \times 10^4$ GE/g Kot.

Pusterla et al. 2013 stellte fest, dass die ausgeschiedene Virusmenge von symptomfreien Tieren bei maximal $3,9 \times 10^6$ Genomäquivalenten/g Kot lag, während die symptomatischen Pferde eine Höchstmenge von $7,7 \times 10^7$ Genomäquivalenten/g Kot ausschieden. Die Übereinstimmung des klinischen Erscheinungsbildes mit der Detektion von ECoV betrug 91 %.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird klar, dass, wie in der derzeit ablaufenden Pandemie durch SARS-CoV-2 (*Betacoronavirus*), neben einer raschen und sensitiven Diagnostik, schnelle und effiziente Maßnahmen nach der Feststellung einer ECoV-Infektion eines Pferdes in einem Stall

oder in einer Klinik von großer Bedeutung sind. Auch symptomfreie Tiere sind mögliche Überträger (Schaefer et al. 2018). Betroffene Pferde sollten, wenn möglich, isoliert werden. Es ist sinnvoll, alle Pferde des Bestands auf ECoV zu testen (oder zumindest die, die einer möglichen Exposition ausgesetzt waren) und den Gesundheitszustand genau zu beobachten (Messung der inneren Körpertemperatur, Fressverhalten, Kotkonsistenz, Allgemeinbefinden). Eine ECoV-Erkrankung ist nicht ursächlich behandelbar, eine symptomatische Therapie ist allerdings in den meisten Fällen sinnvoll.

TierärztInnen sollten die BesitzerInnen und Einstellbetriebe im Fall eines ECoV-Ausbruches in einer Herde, neben der Therapie der betroffenen Pferde, auch in Hygieneaspekten und der eventuellen Einrichtung einer Isolationsstation beratend zur Seite stehen. Nur wiederholte, quantitative PCR-Testungen des gesamten Bestandes erlauben eine Einschätzung über den Fortschritt des Infektionsgeschehens bzw. das Ausmaß der Durchseuchung und somit über die Sinnhaftigkeit von Isolationsmaßnahmen innerhalb des Betriebes.

Bevor infizierte Tiere wieder mit anderen, nicht betroffenen, Pferden in Kontakt kommen, sollte sichergestellt werden, dass kein Infektionsrisiko mehr besteht. Ein, aufgrund möglicher intermittierender Ausscheidung (Schaefer et al., 2018), besser zwei negative PCR-Ergebnisse aus Kotproben des rekonvaleszenten Tieres wären sinnvoll. Auch eine, in Analogie zu SARS-CoV-2, geringe Viruslast nach Beendigung der klinischen Symptome könnte möglicherweise einen Schluss auf die Minimierung des Übertragungsrisikos zulassen. Um hier sicher zu gehen, wären weitere Untersuchungen notwendig.

6. Zusammenfassung

Das equine Coronavirus (ECoV, Spezies *Betacoronavirus 1*) konnte im Jahr 1999 erstmals aus dem Kot eines an Diarrhoe leidenden Fohlens isoliert werden (ECoV-NC99). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde in Europa, Asien und Amerika immer wieder vom sporadischen Auftreten oder von ECoV-Ausbrüchen berichtet. Die Virusübertragung erfolgt fäkal-oral, einhergehend mit einer ECoV-Infektion treten häufig Anorexie, Lethargie, Diarrhoe und Kolik auf, aber auch asymptomatische Infektionen sind möglich.

ECoV gehört den behüllten Positivstrang-RNA-Viren an, das Genom umfasst etwa 27 bis 32 kb, an der Oberfläche sind für Coronaviren charakteristische Peplomere entdeckt worden.

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde ein Plasmid (ECoV_N) durch T-Vektor-Klonierung generiert und eine RT-qPCR zum Nachweis des N-Gens von ECoV etabliert (ECoV_N-Gen-RT-qPCR). Diese PCR wurde mit der bisher am Institut für Virologie der Vetmeduni Vienna verwendeten RT-qPCR (BetaCoV1-RT-qPCR) zum Nachweis für *Betacoronaviren 1* (BCoV, CRCoV, ECoV) durch die Herstellung von Verdünnungsreihen zweier Plasmide zur Quantifizierung und anschließender Analyse von 25 Feldproben verglichen.

Die beiden RT-qPCRs erwiesen sich als sensitive Methoden zur Diagnose einer ECoV-Infektion. Mit den PCRs konnten 10 GE/ μ l in der Reaktion und somit $4,29 \times 10^4$ GE/g Probe detektiert werden. Die Ergebnisse der Testung der 25 Feldkotproben deckten sich qualitativ. Verglichen mit der ECoV_N-Gen-RT-qPCR stellte die BetaCoV1-RT-qPCR bei elf von 19 positiven Proben einen höheren Gehalt an GE/g Kotprobe fest.

Zukünftig können am Institut Kotproben mit der neu etablierten RT-qPCR zum Nachweis des N-Gens von ECoV analysiert und quantifiziert werden.

7. Abstract

In 1999 the equine coronavirus (ECoV, species *betacoronavirus 1*) was isolated for the first time from feces of a foal suffering from diarrhea (ECoV-NC99). During the last two decades, sporadic occurrence or ECoV-outbreaks have been reported in Europe, Asia and America. Virus transmission occurs fecal-oral, an ECoV-infection is frequently accompanied with anorexia, lethargy, diarrhea and colic, but asymptomatic infections are also possible.

ECoV belongs to the enveloped positive-strand-RNA-viruses, the genome comprises about 27 to 32 kb and peplomers, characteristic for coronaviruses, have been discovered on the surface.

In this thesis, a plasmid (ECoV_N) was generated by T-vector-cloning and a RT-qPCR was established for the detection of the N-Gene of ECoV (ECoV_N-Gen-RT-qPCR). This PCR was compared with the, currently at the institute of virology of Vetmeduni Vienna used, BetaCoV1_RT-qPCR for detection of *betacoronavirus 1* (BCoV, CRCoV, ECoV) by serial dilutions of two plasmides for quantification and subsequent analysis of 25 field samples.

Both RT-qPCRs were found to be sensitive methods for diagnosing an ECoV infection. The detectionlimit for both PCRs was 10 GE/ μ l/reaction and thus $4,29 \times 10^4$ GE/g sample. The results of the analysis of 25 field samples coincided qualitatively. Compared to the ECoV_N-Gen-RT-qPCR, the BetaCoV1-RT-qPCR detected an higher amount iF GE/g sample in eleven of 19 positive samples.

In the future, it is possible to analyse and quantificate fecal samples with the new established RT-qPCR for the detection of the N-Gen of ECoV.

8. Literaturverzeichnis

- Auer A, Junge HK, Glitz F, Dimmel K, Leidinger J, Cavalleri, J., M., Rümenapf T. 2020. Equine coronavirus is an underestimated pathogen in Austria. Wiener tierärztliche Monatsschrift.
- Berryhill EH, Magdesian KG, Aleman M, Pusterla N. 2019. Clinical presentation, diagnostic findings, and outcome of adult horses with equine coronavirus infection at a veterinary teaching hospital: 33 cases (2012-2018). *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 248: 95–100. DOI 10.1016/j.tvjl.2019.05.001.
- Bryan J, Marr CM, Mackenzie CJ, Mair TS, Fletcher A, Cash R, Phillips M, Pusterla N, Mapes S, Foote AK. 2019. Detection of equine coronavirus in horses in the United Kingdom. *The Veterinary record*, 184 (4): 123. DOI 10.1136/vr.105098.
- Fielding CL, Higgins JK, Higgins JC, McIntosh S, Scott E, Giannitti F, Mete A, Pusterla N. 2015. Disease associated with equine coronavirus infection and high case fatality rate. *Journal of veterinary internal medicine*, 29 (1): 307–310. DOI 10.1111/jvim.12480.
- Giannitti F, Diab S, Mete A, Stanton JB, Fielding L, Crossley B, Sverlow K, Fish S, Mapes S, Scott L, Pusterla N. 2015. Necrotizing Enteritis and Hyperammonemic Encephalopathy Associated With Equine Coronavirus Infection in Equids. *Veterinary pathology*, 52 (6): 1148–1156. DOI 10.1177/0300985814568683.
- Guy JS, Breslin JJ, Breuhaus B, Vivrette S, Smith LG. 2000. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. *Journal of clinical microbiology*, 38 (12): 4523–4526.
- Jang S, Rhee J-Y, Wi YM, Jung BK. 2021. Viral kinetics of SARS-CoV-2 over the preclinical, clinical, and postclinical period. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 102: 561–565. DOI 10.1016/j.ijid.2020.10.099.
- Jansohn M, Hrsg. 2012. *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Fünfte. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl., 660.*
- Kambayashi Y, Bannai H, Tsujimura K, Hiramata A, Ohta M, Nemoto M. 2021. Outbreak of equine coronavirus infection among riding horses in Tokyo, Japan. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 77: 101668. DOI 10.1016/j.cimid.2021.101668.

- Manship AJ, Blikslager AT, Elfenbein JR. 2019. Disease features of equine coronavirus and enteric salmonellosis are similar in horses. *Journal of veterinary internal medicine*, 33 (2): 912–917. DOI 10.1111/jvim.15386.
- Mattei DN, Kopper JJ, Sanz MG. 2020. Equine Coronavirus-Associated Colitis in Horses: A Retrospective Study. *Journal of equine veterinary science*, 87: 102906. DOI 10.1016/j.jevs.2019.102906.
- Miszczak F, Tesson V, Kin N, Dina J, Balasuriya UBR, Pronost S, Vabret A. 2014. First detection of equine coronavirus (ECoV) in Europe. *Veterinary microbiology*, 171 (1-2): 206–209. DOI 10.1016/j.vetmic.2014.03.031.
- NCBI Taxonomy Browser. [Online]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=2501931&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> [Zugriff 09.02.2022].
- NCBI Taxonomy Browser. [Online]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=2501931&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock> [Zugriff 22.02.2022].
- Nemoto M, Oue Y, Morita Y, Kanno T, Kinoshita Y, Niwa H, Ueno T, Katayama Y, Bannai H, Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T. 2014. Experimental inoculation of equine coronavirus into Japanese draft horses. *Archives of virology*, 159 (12): 3329–3334. DOI 10.1007/s00705-014-2205-1.
- Nemoto M, Oue Y, Murakami S, Kanno T, Bannai H, Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T. 2015. Complete genome analysis of equine coronavirus isolated in Japan. *Archives of virology*, 160 (11): 2903–2906. DOI 10.1007/s00705-015-2565-1.
- Nemoto M, Schofield W, Cullinane A. 2019. The First Detection of Equine Coronavirus in Adult Horses and Foals in Ireland. *Viruses*, 11 (10). DOI 10.3390/v11100946.
- Oue Y, Ishihara R, Edamatsu H, Morita Y, Yoshida M, Yoshima M, Hatama S, Murakami K, Kanno T. 2011. Isolation of an equine coronavirus from adult horses with pyrogenic and enteric disease and its antigenic and genomic characterization in comparison with the NC99 strain. *Veterinary microbiology*, 150 (1-2): 41–48. DOI 10.1016/j.vetmic.2011.01.004.
- Oue Y, Morita Y, Kondo T, Nemoto M. 2013. Epidemic of equine coronavirus at Obihiro Racecourse, Hokkaido, Japan in 2012. *The Journal of veterinary medical science*, 75 (9): 1261–1265. DOI 10.1292/jvms.13-0056;

Pusterla N, James K, Mapes S, Bain F. 2019. Frequency of molecular detection of equine coronavirus in faeces and nasal secretions in 277 horses with acute onset of fever. *The Veterinary record*, 184 (12): 385. DOI 10.1136/vr.104919.

Pusterla N, Mapes S, Wademan C, White A, Ball R, Sapp K, Burns P, Ormond C, Butterworth K, Bartol J, Magdesian KG. 2013. Emerging outbreaks associated with equine coronavirus in adult horses. *Veterinary microbiology*, 162 (1): 228–231. DOI 10.1016/j.vetmic.2012.10.014.

Pusterla N, Vin R, Leutenegger CM, Mittel LD, Divers TJ. 2018. Enteric coronavirus infection in adult horses. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 231: 13–18. DOI 10.1016/j.tvjl.2017.11.004.

Robert Koch Institut. [Online]

https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html;jsessionid=C5EC90FB7A00616E11029079E839EAF4.internet052?nn=2386228#doc13490982bodyText36 [Zugriff 24.04.2022].

Sanz MG, Kwon S, Pusterla N, Gold JR, Bain F, Evermann J. 2019. Evaluation of equine coronavirus fecal shedding among hospitalized horses. *Journal of veterinary internal medicine*, 33 (2): 918–922. DOI 10.1111/jvim.15449.

Schaefer E, Harms C, Viner M, Barnum S, Pusterla N. 2018. Investigation of an experimental infection model of equine coronavirus in adult horses. *Journal of veterinary internal medicine*, 32 (6): 2099–2104. DOI 10.1111/jvim.15318.

Schwartz G, Tirosh-Levy S, Barnum S, David D, Sol A, Pusterla N, Steinman A. 2021. Seroprevalence and Risk Factors for Exposure to Equine Coronavirus in Apparently Healthy Horses in Israel. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11 (3). DOI 10.3390/ani11030894.

SciencePrimer. [Online]

<http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr> - About the Calculation [Zugriff 15.04.2022]

Slovis NM, Elam J, Estrada M, Leutenegger CM. 2014. Infectious agents associated with diarrhoea in neonatal foals in central Kentucky: a comprehensive molecular study. *Equine veterinary journal*, 46 (3): 311–316. DOI 10.1111/evj.12119.

Spiss, S., Benetka, V., Künzel, F., Sommerfeld-Stur, I., Walk, K., Latif, M., Möstl, K. 2012. Enteric and respiratory coronavirus infection in Austrian dogs serological and virological

investigations of prevalence and clinical importance in respiratory and enteric diseases. Wiener tierärztliche Monatsschrift: 67–81.

Thiemann F, Cullen PM, Klein H-G, Hrsg. 2015. Molekulare Diagnostik. Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik. Zweite. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH, 353.

Woo PCY, Lau SKP, Huang Y, Yuen K-Y. 2009. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), 234 (10): 1117–1127. DOI 10.3181/0903-MR-94.

Zhang J, Guy JS, Snijder EJ, Denniston DA, Timoney PJ, Balasuriya UBR. 2007. Genomic characterization of equine coronavirus. Virology, 369 (1): 92–104. DOI 10.1016/j.virol.2007.06.035.

Zhao S, Smits C, Schuurman N, Barnum S, Pusterla N, van Kuppeveld F, Bosch B-J, van Maanen K, Egberink H. 2019. Development and Validation of a S1 Protein-Based ELISA for the Specific Detection of Antibodies against Equine Coronavirus. Viruses, 11 (12). DOI 10.3390/v11121109.