Aus dem Department für Kleintiere und Pferde

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinische Abteilung für Interne Medizin Pferde

(LeiterIn: Dipl.ECEIM Univ.-Prof in Dr in med.vet. Jessika-Maximiliane Cavalleri)

Equus caballus Papillomvirus Typ 2 Screening im Speichel und in Plattenepithelkarzinomen des Magens von Pferden

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Lisa Tik

Wien, im Juli 2022

Betreuerin: Dr in Sc. Dr in med. vet. Anna Sophie Ramsauer

Gutachterin: Dipl.-Ing in Dr in nat. techn. Priv.-Doz in Sabine Brandt

Inhalt

Einleitung 1

1. Papillomviren 1

1.1. Papillomviren in der Humanmedizin 2

1.2. Papillomviren bei Equiden 3

1.2.1. EcPV 3

1.2.1.1. EcPV2 5

1.2.2. BPV 7

2. Plattenepithelkarzinome bei Pferden 9

2.1. Entstehung 9

2.2. Klinische Erscheinung 9

2.3. Diagnose 11

2.4. Therapie 12

3. Magentumoren beim Pferd 13

3.1. Allgemeines 13

3.2. Co – Faktoren und Entstehung 14

4. Hypothese 15

Material und Methoden 16

1. Proben 16

2. DNS-Isolation aus paraffinfixierten Proben 16

3. Bestimmung der DNS-Konzentration 17

4. PCR auf Mikrosatellit (Eca 2A.3) und EcPV2 18

5. Gelelektrophorese 19

Ergebnisse 20

1. Speichel-Proben 20

1.1. Patienten Daten 20

1.2. Analyse Nanodrop 22

1.3. PCR Eca 2A.3 und EcPV2 23

2. Magen Proben 24

2.1. Patientendaten 25
2.2. Analyse Nanodrop Magenkarzinome 27
2.3. PCR Eca 2A.3 und EcPV2 der Magenkarzinome 27
Diskussion 28
Zusammenfassung 34
Summary 35
Abkürzungsverzeichnis 36
Literaturverzeichnis 37
Abbildungsverzeichnis 48
Tabellenverzeichnis 49

Einleitung

1. Papillomviren

Papillomviren sind kleine, unbehüllte Viren, deren Kapsel eine ikosaedrische Form hat. Ihr Genom besteht aus ringförmiger, doppelsträngiger DNS, welche in drei Regionen unterteilt werden kann. Die E-Region, wobei E hier für das englische Wort „early“, im Deutschen „früh“ steht, kodiert für frühe funktionelle Proteine (E1-E7). Die L-Region (eng.: „late“, im Deutschen „spät“), kodiert für späte Kapselproteine (L1 und L2). Die nicht kodierende Region, auch *long control region* (LCR) genannt, ist für die virale Genom-Replikation und die Transkription essenziell (Campo 2006). Eine schematische Darstellung des Papillomvirus-Genoms ist in Abb. 1A zu sehen.

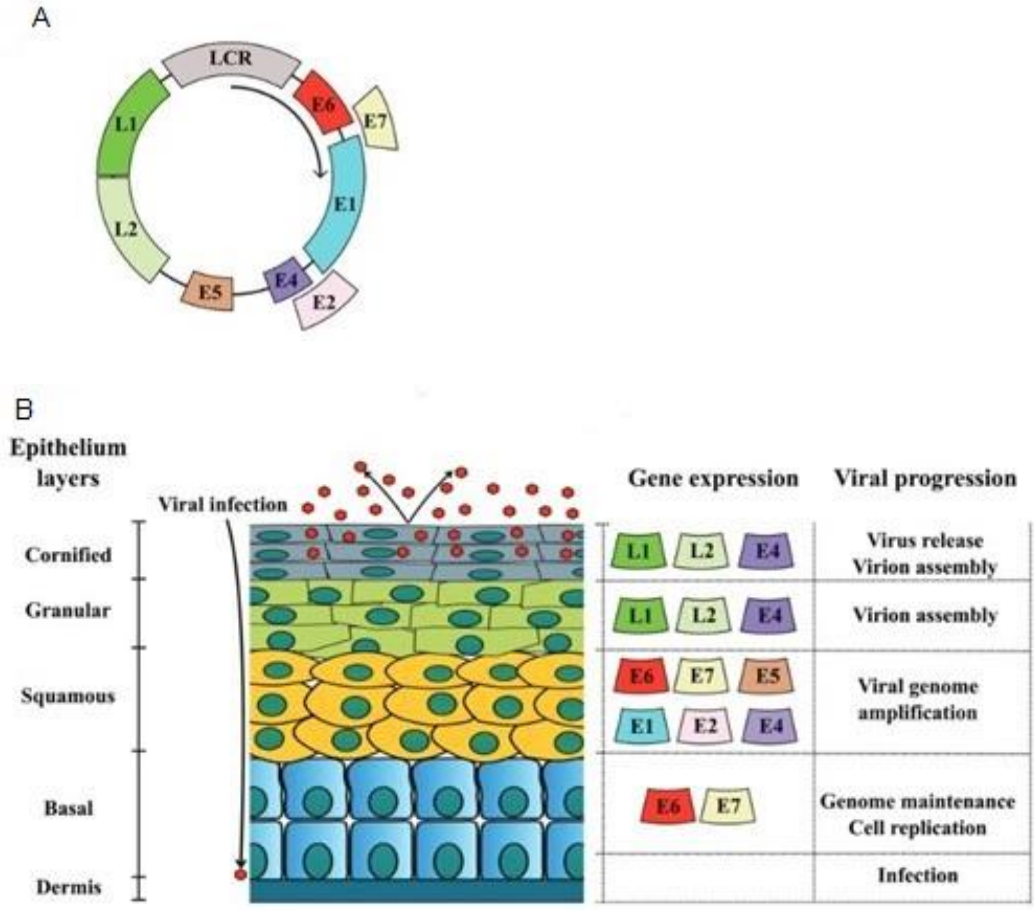

Abb. 1: Darstellung des Genoms Boviner Papillomviren (BPV) und der Genexpression in den verschiedenen Hautabschnitten (aus Araldi et al. 2017).

A: Schematische Darstellung eines Papillomvirus-Genoms am Beispiel des BPV-Genoms. Das Genom ist ringförmig aufgebaut und unterteilt in die Early (E) – Region, die Late (L) – Region und die long control region (LCR). Die E-Region codiert für die Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7, bei denen es sich um Replikationsproteine handelt. Die Proteine L1 und L2 sind Kapselproteine. B: diese Abbildung zeigt, in welchen Abschnitten der Haut die Gene exprimiert werden und in welcher Phase zwischen Infektion und der Freisetzung neuer Viren sich die Viren gerade befinden (Araldi et al. 2017)**.**

Für die Replikation der Papillomviren ist es notwendig, dass sie noch undifferenzierte Keratinozyten (in der Basalmembran des Epithels) infizieren, da ihr Lebenszyklus direkt an die Differenzierung und Entwicklung dieser Zellen gekoppelt ist (Abb. 1B). Die Erstinfektion erfolgt in der basalen Schicht des Epithels, in der Regel, wenn bereits eine (Mikro-)Läsion vorliegt, die diese Zellschicht freilegt. Es reichen bereits mikroskopisch kleine Läsionen, damit die Viren in den Organismus eindringen können (Giroglou et al. 2001). Dort und in der suprabasalen Schicht der epidermalen Hautschicht, kommt es zur Expression der frühen Proteine. Die Expression der Kapsel-Proteine, die Zusammensetzung der Virionen und die Freisetzung dieser passiert dann in den ausdifferenzierten Keratinozyten des *Stratum corneum* (Campo 2006).

Die *Papillomaviridae* sind eine eigene taxonomische Familie, von der bisher über 200 verschiedene Typen bei Menschen und viele weitere bei Säugetieren, Vögeln und Reptilien isoliert werden konnten. Sie werden je nach genetischer Übereinstimmung der Nukleotidsequenz des L1-Gens klassifiziert und weiter in *Genera* unterteilt. Bis auf wenige Ausnahmen sind sie sehr wirtsspezifisch und infizieren die Epithelien der Vertebraten. Sie können dort neoplastische Veränderungen hervorrufen oder asymptomatisch persistieren (Bernard et al. 2012).

1.1. Papillomviren in der Humanmedizin

Man geht davon aus, dass so genannte „high risk“ also Hochrisiko humane Papillomviren (HPV) bei bis zu 100 % der Fälle von Gebärmutterhalskrebs involviert sind (Carter et al. 2011), und für zirka die Hälfte der anogenitalen Tumoren und 22-26 % der Plattenepithelkarzinome (PEKs) in der Region des Kopfes und des Halses verantwortlich sind (zur Hausen 1996, Haedicke and Iftner 2013, Tumban 2019).

Schon im 19. Jahrhundert hatten Forscher den Verdacht, dass Gebärmutterhalskrebs eine infektiöse Ursache haben könnte, da vor allem Frauen betroffen waren, die bereits sexuell aktiv gewesen sind und kaum Jungfrauen oder Nonnen (Rigoni-Stern 1842). In den 1970er Jahren konnte dann aus Biopsien von genitalen Warzen und Gebärmutterhalskrebs virale DNS

nachgewiesen werden, die den Papillomviren zugeordnet werden konnte (Almeida et al. 1969, Gissmann et al. 1977). Der wichtigste Übertragungsweg ist durch direkten Kontakt. Die Infektion im Genitalbereich findet in den meisten Fällen durch sexuellen Kontakt statt (Rosenfeld et al. 1989). Bei Neoplasien im Mund und Rachenbereich könnte auch die Übertragung durch Speichel und Oralsex eine Rolle spielen (zur Hausen 1996, D'Souza et al. 2009). Handelt es sich um Tumoren in anderen Bereichen der Haut, geht man davon aus, dass der Erreger über mikroskopisch kleine Läsionen aus der direkten Umgebung in den Organismus gelangen konnte (zur Hausen 1996).

Des Weiteren war es möglich bei Patienten, die HPV-assoziierte Neoplasien im Genitalbereich oder in der Kopf-Hals Region hatten, das Virus in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes, im englischen *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) (Pao et al. 1991), im Serum (Capone et al. 2000) und im Plasma (Dong et al. 2002) nachzuweisen. Es wird davon ausgegangen, dass der Nachweis im Blut möglich war, weil die Tumoren über die Blutbahn gestreut hatten, oder von virusbelastetem Zelldebris über die Blutbahn abtransportiert wurden (Bodaghi et al. 2005).

1.2. Papillomviren bei Equiden

Bei den Equiden sind mehrere Krankheitsbilder bekannt, die mit Papillomviren in Zusammenhang gebracht wurden. Zum einen kommen Sarkoide, ausgelöst durch die bovinen Papillomviren Typ-1, Typ-2 und vereinzelt auch Typ-13 (BPV1, BPV2, BPV13) vor (Chambers et al. 2003, Lunardi et al. 2013) und zum anderen Erkrankungen, die mit equinen Papillomviren assoziiert werden konnten. Bisher konnten neun verschiedene Typen des Equus caballus Papillomvirus (EcPV) identifiziert werden, auf die im weiteren Verlauf genauer eingegangen wird (Li et al. 2019, Zakia et al. 2019).

1.2.1. EcPV

Die neun bisher identifizierten Typen der equinen Papillomviren (EcPV1-EcPV9), können sechs verschiedenen Gattungen zugeordnet werden (Li et al. 2019).

EcPV1 wurde in Proben von juvenilen Warzen gefunden (Ghim et al. 2004). Diese Papillome treten bei Pferden im Alter von 1-2 Jahren auf, vor allem wenn mehrere Jungtiere in einer Herde gehalten werden. Meistens sind sie im Bereich des Maules und der Nüstern zu finden und erreichen eine Größe zwischen 2 und 10 mm. Sie sind meist selbst limitierend, bedürfen

in den häufigsten Fällen keiner Therapie und haben selten Folgen für das betroffene Tier (Cook and Olson 1951, Zakia et al. 2019).

Für EcPV2 besteht starke Evidenz, dass es an der Entstehung von PEKs im Genitalbereich beteiligt ist (Scase et al. 2010, Bogaert et al. 2012, Lange et al. 2012, Sykora et al. 2012, Knight et al. 2013). EcPV2 konnte außerdem in genitalen Plaques, Papillomen und *in situ* Karzinomen nachgewiesen werden, bei welchen es sich um Vorstufen des PEKs handelt (Sykora and Brandt 2017). Auch EcPV7 konnte in genitalen Massen nachgewiesen werden (Lange et al. 2013). Des Weiteren konnte EcPV2 in PEKs im Bereich des Larynx und des Magens nachgewiesen werden (Hibi et al. 2019, Alloway et al. 2020, Porcellato et al. 2020). In Fallberichten werden Tumoren im periorbitalen Bereich, bei der Parotis, im retropharyngealen Bereich und in der Drosselrinne beschrieben, in denen EcPV2 ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Kainzbauer et al. 2012, Hibi et al. 2019). PEKs und EcPV2 im Speziellen werden in den nächsten Kapiteln eingehend besprochen.

In auralen Plaques konnten EcPV3, EcPV4, EcPV5 und EcPV6 nachgewiesen werden (Zakia et al. 2016). Bei diesen Veränderungen handelt es sich um weiße, hyperkeratotische Erhabenheiten an der Innenseite der Ohrmuschel. Sie sind gut abgrenzbar, werden mit der Zeit tendenziell größer und in den meisten Fällen sind beide Ohren betroffen (Scott and Miller 2011). Die Läsionen können durchaus problematisch sein, da es zum Kopfscheuen durch erhöhte Sensitivität im Bereich der betroffenen Stellen kommen kann (Torres et al. 2010). Der Wert der Pferde wird dadurch gemindert und in manchen Regionen dürfen Pferde mit diesen Veränderungen nicht an Turnieren teilnehmen (Sousa et al. 2008). Es wurden bereits mehrere Therapieversuche beschrieben, unter anderem Abschaben der Läsionen (Torres et al. 2010), Imiquimod, als Form der Immuntherapie (Zakia et al. 2016), Ivermectin (Aslan and Orucß 2010), Cisplatin mit Elektrochemotherapie (Tamzali et al. 2012) und *Sanguinaria canadensis* Extrakt in Zink-Chlorid (Scott and Miller 2011). Bisher konnte sich keine Therapiemöglichkeit eindeutig durchsetzen, da bei keiner Therapie dauerhaft zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden konnten.

Linder et al. konnten 2018 EcPV8 bei drei Pferden, die eine generalisierte Form der Papillomatose zeigten, isolieren. Die Papillome waren zwischen 0,5 und 1,5 cm groß, hyperkeratotisch und teilweise konfluierend. Vor allem waren die Axel, der Inguinalbereich, die proximalen Gliedmaßen und Bereiche am ventralen und lateralen Hals, Thorax und Abdomen betroffen. Im Gesicht, den Ohren, den distalen Gliedmaßen und den Genitalien waren weniger

Veränderungen zu finden. Sowohl mit als auch ohne Behandlung (intraläsionales humanes INF-α) persistierten die Papillome für anderthalb bis zwei Jahre (Linder et al. 2018, Peters-Kennedy et al. 2019).

Das neueste Papillomvirus, EcPV9, konnte 2019 aus dem Samen eines Hengstes mit Läsionen im Genitalbereich nachgewiesen werden. Es ist am nächsten mit EcPV2, EcPV4 und EcPV5 verwandt. Um eine Assoziation zu bestimmten Krankheitsbildern sicher festlegen zu können, bedarf es hier aber noch weiterer Studien (Li et al. 2019).

1.2.1.1. EcPV2

EcPV2 konnte erstmals 2010 in equinen genitalen *in situ* Karzinomen und penilen PEKs nachgewiesen werden und wurde damals, im Zuge der Entdeckung, auch erstmals vollständig sequenziert (Scase et al. 2010). Die Prävalenz von EcPV2 in den getesteten Plaques, Papillomen und PEKs im Genitalbereich liegt bei bis zu 100%, im gesunden Gewebe bei nur 0-18% (Scase et al. 2010, Lange et al. 2012, Sykora et al. 2012, Sykora and Brandt 2017). Es konnte des Weiteren auch mRNS in den positiven PEK-Proben nachgewiesen werden, was ebenfalls auf eine aktive Rolle des Virus bei der Entstehung der Tumoren hindeutet (Sykora et al., 2012). Die beiden Onkogene von EcPV2 sind E6 und E7, diese konnten in allen Phasen der Progression von Plaque zu PEK als aktiv nachgewiesen werden, was weiter die These der Beteiligung von EcPV2 an der Transformation von benignen Läsionen zu malignen Tumoren unterstreicht (Sykora and Brandt, 2017; Sykora et al., 2017; Ramsauer et al., 2019 b).

Wie auch bei anderen fast allen onkogenen HPV, konnte bei EcPV2 gezeigt werden, dass sich das virale Genom in die Wirtszelle integrieren kann (McBride 2017, Sykora et al. 2017). Dadurch kann es zur vermehrten Expression von den Onkogenen E6 und E7 und in Folge zu einem vermehrten Wachstum betroffener Zellen und vermehrter genetischer Instabilität kommen. Die aktivierten Mechanismen können so den onkogenen Verlauf der Veränderungen fördern (Ramsauer 2019). Es konnte außerdem festgestellt werden, dass in weiter fortgeschrittenen Läsionen die später im Lebenszyklus des Virus exprimierten Gene L1 und L2 nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden können (Sykora et al., 2012; Ramsauer et al., 2019 b). Das könnte zum Beispiel für eine abortive Infektion sprechen, bei der der Produktionszyklus des Virus nicht vollständig abgeschlossen werden kann. Im Gegensatz dazu steht eine produktive Infektion, bei der vollständige neue Viren zusammengesetzt und ausgeschieden werden können. Diese wird vor allem in den intraepithelialen Anfangsstadien beobachtet (Doorbar 2005, Ramsauer 2019).

Durch serologische Untersuchungen konnten EcPV2-spezifische Antikörper sowohl in bis zu 100 % der betroffenen als auch in 15-28 % der gesunden Tieren nachgewiesen werden, was dafürspricht, dass die Infektion von manchen Tieren auch wieder neutralisiert werden kann (Fischer et al. 2014, Schellenbacher et al. 2015). Dadurch sind allerdings serologische Tests zur Diagnosefindung ungeeignet. Auch dass EcPV-2 teilweise in der genitalen Schleimhaut von gesunden Tieren nachgewiesen werden konnte, könnte für eine latente Infektion sprechen (Bogaert et al. 2012). Dies wäre ähnlich dem Humanbereich, wo der Großteil der Population von subklinischen Infektionen betroffen ist, die meist selbstlimitierend sind und von denen sich der Körper wieder befreien kann, ohne dass es zur Tumorentstehung kommt (Koutsky 1997).

Um zu einer genauen Diagnose und infolgedessen auch zur optimalen Therapie zu kommen, kann die histologische Klassifizierung der Veränderungen hilfreich sein. Diese und die Therapie werden zusammen mit den PEKs im nächsten Kapitel genauer beschrieben.

Damit eine Infektion mit EcPV2 und infolgedessen auch die Bildung der Neoplasien unterbunden werden kann, wäre es wichtig zu verstehen, wie die Viren übertragen werden. Leider ist dazu noch sehr wenig bekannt, aber es gibt mehrere Theorien, die für die Übertragung von EcPV2 und dessen Verbreitung im Körper infrage kommen würden. Die meisten davon wurden bereits bei anderen Papillomviren beobachtet und es wurde dann versucht, Evidenz dafür zu finden, dass dieser Weg auch bei EcPV2 infrage kommen würde.

Eine Möglichkeit wäre über direkten Haut-zu-Haut Kontakt zwischen den Tieren, was auch bei HPV bereits beobachtet werden konnte (Hernandez et al. 2008). Dieser Weg konnte beim Pferd bis jetzt nur innerhalb von einem Individuum beschrieben werden. Das Pferd hat eine Neoplasie am Penis über einen längeren Zeitraum immer wieder beknabbert und dann eine Läsion am Maul entwickelt (Bogaert et al. 2012).
Sowohl belebte als auch unbelebte Vektoren, wie Putzzeug oder andere Gebrauchsgegenstände, könnten die Viren ebenfalls an betroffenen Stellen der Haut aufnehmen und an weitere Tiere übertragen, wie es auch beim equinen Sarkoid vermutet wird (Kemp-Symonds 2000, Bogaert et al. 2005, Finlay et al. 2009). In einem Fallbericht wurde ein Pony vorgestellt, das sowohl ein PEK im Magen als auch an der Vulva aufwies und beide konnten positiv auf EcPV2 getestet werden (Porcellato et al. 2020). Für das Vorhandensein genetisch identer Viren in den beiden Läsionen gibt es zwei Theorien: zum einen könnten sie unabhängig voneinander ausgelöst worden sein, zum Beispiel durch eine sehr hohe Virenlast in der Umgebung. Teilt sich das betroffene Pferd den Stall oder Futterplatz mit einem Tier mit

einer aktiven Infektion, könnte dort oder durch Insekten eine Übertragung stattfinden. Die andere Möglichkeit wäre, dass die Neoplasie im Magen eigentlich eine Metastase der Veränderung an der Vulva ist, wobei letzteres eher unwahrscheinlich ist, da der Tumor an der Vulva keine aggressiven Infiltrate aufgewiesen hat und PEKs normalerweise lokal invasiv wachsen und dann gegebenenfalls in regionale Lymphknoten und in die Lunge metastasieren (Porcellato et al. 2020).
Eine weitere Transmissions-Route wäre über das Blut. Bisher konnte in einem Fallbericht EcPV2 in PBMCs von einer betroffenen Stute nachgewiesen werden (Kainzbauer et al. 2012), wie es auch schon bei BPV sowohl bei betroffenen Rindern als auch bei Pferden möglich war. Das könnte den Viren ermöglichen sich im Körper auszubreiten, aber auch von Vektoren, wie stechenden Insekten, aufgenommen und auf andere Tiere übertragen zu werden (Brandt et al. 2008, Hartl et al. 2016).

1.2.2. BPV

Bei den BPV, die zu der Gattung der Delta-Papillomvirus-Arten gehören, handelt es sich um eine der wenigen Papillomvirus-Arten, die mehrere Spezies infizieren können. Im Fall von BPV1, BPV2 und BPV13 können sowohl Rinder als natürlicher Wirt, als auch Pferde infiziert werden (Nasir and Campo 2008). Auch hier konnte bisher nicht mit Sicherheit geklärt werden, wie die Viren sich innerhalb des Organismus ausbreiten und von Wirt zu Wirt übertragen werden. Möglichkeiten wären zum Beispiel durch direkten Kontakt zwischen den Tieren oder indirekt durch kontaminierte Gegenstände in der Umgebung (Chambers et al. 2003, Bogaert et al. 2005). Nachdem es möglich war, virale DNS in Fliegen nachzuweisen, die mit Sarkoiden Kontakt hatten, ist auch eine Übertragung durch Insekten denkbar (Kemp-Symonds 2000). Ein weiteres Reservoir könnte Blut darstellen. BPV1 und BPV2 konnte bereits im Blut von symptomatischen Rindern nachgewiesen werden, was eine vertikale Übertragung über die Blutbahn ermöglichen könnte (Brandt et al., 2008).

Beim Pferd konnte BPV mit der Entstehung von Sarkoiden in Zusammenhang gebracht werden (Chambers et al. 2003). Sarkoide sind häufig vorkommende Hauttumoren bei Pferden, es handelt sich um benigne Veränderungen, die sehr selten metastasieren, aber eine sehr hohe Rezidivrate aufweisen (Goodrich et al. 1998). Sie können nach ihrer Erscheinung in sechs Formen unterschieden werden (Knottenbelt 2005). Das okkulte Sarkoid ist die mildeste und oberflächlichste Form. Verruköse oder warzenartige Sarkoide haben eine raue, hyperkeratotische, abschilfernde Oberfläche und sind eher klein. Sie können auch miteinander konfluieren, was ihnen dann ihr warzenartiges Aussehen verleiht. Außerdem können sie

breitbasig oder gestielt vorkommen. Die noduläre Form kann einzeln oder in größerer Zahl vorkommen, sie können sich ebenfalls miteinander verbinden und ulzerieren, was vermutlich für eine maligne Transformation spricht. Das fibroblastische Sarkoid hat ein typisch „fleischiges“ Aussehen, es ulzeriert oft und meist kommt es zur Ausscheidung von Exsudat und zu sekundären Infektionen. Malveolente Sarkoide sind sehr aggressiv und wachsen invasiv, außerdem können sie die Lymphbahnen infiltrieren. Bei der sechsten Form handelt es sich um gemischte Sarkoide, also eine Kombination aus okkulten, verrukösen, nodulären und fibroblastischen Sarkoiden. Zu dieser Ausprägung kommt es, wenn die Läsionen schon lang bestehen. Sie werden mit fortschreitender Zeit immer aggressiver und es treten mehr und mehr fibroblastische Transformationen auf (Knottenbelt 2005).

Mögliche Therapieansätze sind die Entfernung durch eine Ligatur, eine chirurgische Entfernung oder die Kryotherapie, (Goodrich et al. 1998, Knottenbelt 2019). Behandlung durch Hitze wurde ebenfalls beschrieben, ist aber nicht weit verbreitet (Hoffman et al. 1983). Außerdem kommen bei der Entfernung der Sarkoide der Elektrokauter und die Laserchirurgie zur Anwendung (Goodrich et al. 1998, Compston et al. 2016). Zusätzlich kann eine topische oder intraläsionale Therapie mit zytotoxischen oder antimitotischen Medikamenten erfolgen und auch die Anwendung von Elektrochemotherapie, photodynamischer Therapie, Phytotherapie, immunologischen Methoden und Brachytherapie ist möglich (Knottenbelt et al. 2015).

Grundsätzlich ist bei der Therapie von durch Papillomviren verursachten Neoplasien zu beachten, dass es zwar diverse Methoden gibt, jedoch keine eine optimale Wirkung zeigt. In den meisten Fällen kommt es zu Rezidiven, da die ursächlichen Papillomvirus-Arten nicht durch die Therapie angegriffen werden. Trotzdem sollte die Therapie so schnell wie möglich erfolgen. Welche Form der Therapie gewählt werden sollte, hängt davon ab, wo sich der Tumor befindet, wie groß er ist und ob bereits andere Maßnahmen gesetzt wurden. Entscheidend ist aber auch was logistisch möglich ist, welcher Kostenrahmen vorliegt und die Compliance von Besitzer und Patient (Knottenbelt et al. 2015).

2. Plattenepithelkarzinome bei Pferden

2.1. Entstehung

PEKs sind die häufigsten malignen, epithelialen Tumoren bei Equiden (Scott and Miller 2011). Sie können theoretisch an jeder Stelle entstehen, an der Epithelzellen zu Keratinozyten differenzieren. Am häufigsten sind sie jedoch an mukokutanen Übergängen, zum Beispiel im Genitalbereich oder in der Augenumgebung (Sundberg et al. 1977); (Strafuss 1976, Cotchin 1977, Brinsko 1998). Weitere Stellen, an denen sie entstehen können, sind am Kopf. Betroffen sind dort die Lippen, die Maulschleimhaut, die Gingiva und der nasale, pharyngeale und paranasale Bereich. Des Weiteren kann das Epithel des Gastro-Intestinal-Traktes (GIT) und des Respirationstraktes betroffen sein (Cotchin 1977). Das mittlere Alter der betroffenen Tiere liegt bei zirka 12-21 Jahren, es können aber auch jüngere Tiere betroffen sein (Strafuss 1976, Mair et al. 2000, Valentine 2006, van den Top 2008). Eine Häufung bei einem Geschlecht konnte nicht in allen Studien bestätigt werden. In einigen Studien wurde aber berichtet, dass Wallache am häufigsten betroffen sind, vor allem bei Neoplasien im Genitalbereich (Sundberg et al. 1977, Pascoe and Summers 1981, Mosunic et al. 2004). Ein weiterer Faktor bei der Entstehung ist UV-Strahlung. Dadurch sind unpigmentierte Hautstellen besonders gefährdet und Rassen die viel unpigmentierte Haut haben, tendenziell mehr betroffen als andere, unter anderem Appaloosas, Pintos und das American Paint Horse (Plummer et al. 2007). Rassen, die im Bereich der Augen unpigmentierte Stellen haben (unpigmentierte interpalpebrale Konjunktiva), wie Brabanter, Shire Horses und Clydesdales sind ebenfalls vor allem an diesen Stellen vermehrt betroffen (Schwink 1987).

2.2. Klinische Erscheinung

Grundsätzlich handelt es sich meistens um lokal invasive und langsam metastasierende Tumoren, wobei eine Metastasierung in die regionalen Lymphknoten nicht ungewöhnlich ist (Taylor and Haldorson 2013). Kommt es durch ein zu hohes Maß an UV-Strahlen zu PEKs, gehen ihnen meistens aktinische Keratose und ein *Carcinoma in situ* voraus, wobei vor allem die Keratose von Besitzern oft übersehen wird (Scott and Miller 2011). Die Läsionen sind im Anfangsstadium meistens solitär, schlecht umschrieben und beginnen als nicht heilende, größer werdende granulierende Ulzerationen oder warzenartige Veränderungen, die sich dann zu blumenkohlartige Massen entwickeln. Sie können schmerzhaft sein, häufig kommen auch Nekrosen und ein fauliger Geruch vor. Die ulzerative Form kann vor allem in den Anfängen

leicht mit einer nicht heilenden Wunde verwechselt werden, sie entwickeln aber mit der Zeit ein kraterähnliches Aussehen mit verhärteten Rändern (Scott and Miller 2011).

Bei PEKs am Penis oder Präputium, die durch EcPV2 ausgelöst werden können, kann es sowohl durch die primäre Läsion als auch durch eine sekundäre Entzündungsreaktion zu Symptomen kommen. Meistens sind in den Anfangsstadien depigmentierte Plaques, Unebenheiten der Hautoberfläche und nicht heilende Erosionen, möglicherweise begleitet von Granulationsgewebe zu erkennen. Die weiter fortgeschrittenen Formen zeigen sich als solide Masse, die ein blumenkohlartiges Aussehen haben kann. Klinisch können sich außerdem ausgeprägte Nekrosen, sanguinöser oder purulenter Ausfluss, ein stechender Geruch durch eine mögliche Infektion zeigen. Große Neoplasien können beim Deckakt störend sein, oder dazu führen, dass der Penis nicht mehr eingeschachtet werden kann. Auf Grund der schmerzhaften Prozesse kann es außerdem dazu kommen, dass der Penis nicht mehr ausgeschachtet werden kann. Dies kann auch dazu beitragen, dass die fortschreitenden Läsionen vom Besitzer übersehen werden. Außerdem kann man Störungen im Gangbild oder einen weiten Stand der Hintergliedmaßen beobachten (Howarth et al. 1991, Archer and Edwards 2004, van den Top 2008, Scase et al. 2010).

Plaques, Papillome und *in situ* Karzinome werden als nicht invasive Vorstufen gesehen, da sie die Basalmembran nicht penetrieren und somit, im Gegensatz zum PEK, nicht metastasieren (Howarth et al. 1991, Brinsko 1998, van den Top et al. 2011). Histologisch stellen sich Plaques als Verdickung des Epithels dar, mit noch normaler Zellreifung und Bildung breiter Reteleisten. Ein Papillom ist durch fingerartige Fortsätze des leicht hyperplastischen und hyperkeratotischen Plattenepithels, mit einem dünnen bindegewebigen Zentrum zu erkennen, wobei die Differenzierung der Zellen noch normal ist. Histologisch spricht man von einem *Carcinoma in situ*, wenn die Reifung des Epithels und der transepithelialen Schichten verändert ist, die Keratinozyten-Variabilität erhöht ist und in der suprabasalen Region vermehrte Mitose-Anzeichen zu sehen sind. Als PEK werden infiltrativ wachsende Veränderungen bezeichnet, die vom Epithel ausgehend inselartig durch Trabekel aus keratinisiertem oder unkertatinisiertem Plattenepithel in das umliegende dermale Gewebe einwachsen. Zwischen den Vorstufen und einem PEK kann nur histologisch und nicht klinisch unterschieden werden, da sich ein *Carcinoma in situ* sowohl wie ein depigmentiertes Plaque aber auch warzenartig darstellen kann und PEKs auch noch warzenartiges Aussehen haben können (Ramsauer et al., 2019 a). Die Wahrscheinlichkeit, dass Metastasen gebildet werden, liegt in diversen Studien zwischen 12 % und 17 % (Howarth et al. 1991, Mair et al. 2000, van

den Top 2008). Auch bei Stuten wurden PEKs im Genitalbereich beschrieben, vor allem an den Schamlippen und der Klitoris, allerdings wesentlich seltener als bei männlichen Tieren (Cotchin 1977).

Im Bereich der Augen können die Nickhaut, vor allem der mediale Kanthus, die Konjunktiva, der nasale und temporale Teil des Limbus, die Kornea, die Orbita und der Bulbus betroffen sein (Dugan et al. 1991, King et al. 1991). Die Symptomatik beginnt meist unspezifisch in Form von mukopurulentem Augenausfluss, geröteten Schleimhäuten und Blepherospasmus. Es treten nach und nach präkanzeröse Stadien, wie Plaques oder papillomartige Veränderungen auf, die sich therapieresistent darstellen und weiter ausbreiten, bis es sich um blassrosa bis gräulich-weiße granulomähnliche Massen handelt, die die gesamte Hornhaut überwuchern können (Theilen and Madewell 1979).

Auch in der Nase und den *Sini paranasales* sind PEKs die häufigsten Neoplasien (Cotchin 1977). Die klinischen Zeichen beginnen auch hier unspezifisch in Form von Nasenausfluss, Schwellungen im Gesichtsbereich, Augenausfluss und Obstruktion der oberen Atemwege. Auch Exophtalmus, Head-shaking und Epistaxis können teilweise beobachtet werden (Hill et al. 1989, Tremaine and Dixon 2001).

2.3. Diagnose

Ein erster Verdacht ergibt sich durch die klinische Präsentation des Geschehens. Um eine eindeutige Diagnose stellen zu können ist die sicherste Variante eine komplette Exzision und anschließende histologische Untersuchung der Masse. Dies erlaubt nicht nur eine Diagnose, sondern auch die Feststellung in welchem Stadium der Differenzierung sich der Tumor befindet. Auch eine Untersuchung von einem Hautgeschabsel kann aussagekräftig sein, im Bereich der Augen kann auch ein Abklatsch-Präparat gemacht werden. Bei Läsionen in der Genital-Region wird außerdem eine PCR auf EcPV2 empfohlen (Knottenbelt, Patterson-Kane and Snalune, 2015). Histologisch sind Keratin-Formationen, Horn-Perlen, interzelluläre Brücken, Mitosen und Zellatypien zu beobachten. PEKs sind positiv auf Zytokeratin zu testen, was sehr wichtig ist, um die Zellart verifizieren zu können (Scott and Miller 2011). Außerdem sollte eine klinische Untersuchung der Lymphknoten vorgenommen werden und von diesen, wenn sie verändert sind, mittels Feinnadelaspiration oder Biopsie eine Probe entnommen und histologisch untersucht werden, um eine eventuelle Metastasierung feststellen zu können (Taylor and Haldorson 2013).

2.4. Therapie

Es ist je nach Lokalisation, Größe, Vorhandensein von Metastasen und Zugänglichkeit zu entscheiden, ob eine chirurgische oder konservative/topische Therapiemethode gewählt wird, oder eine Kombination. Zur Euthanasie muss geraten werden, wenn es sich um maligne Tumoren handelt, die bereits metastasiert haben. Ebenfalls, wenn sie sich an inoperablen Stellen befinden oder bei starker Einschränkung der Lebensqualität des Pferdes (Tremaine and Dixon 2001, van den Top et al. 2011).

Zu den chirurgischen Methoden gehört unter anderem die lokale Exzision. Es sollte beachtet werden, dass die Exzision der Neoplasie mit mindestens 1 cm Abstand im gesunden Gewebe durchgeführt wird, wobei das nicht bei jeder Lokation möglich ist. Diese Variante wird vor allem angewendet, wenn sich die Neoplasie noch in einem kleinen, lokalen, nicht invasiven Stadium befindet und bei Tumoren im Bereich der Augen (van den Top et al. 2010).

Ist die Kornea auch betroffen, kann nach Möglichkeit eine Keratektomie durchgeführt werden, bei der versucht werden sollte, alle neoplastischen Zellen zu entfernen. Ist auch die Nickhaut involviert kann diese reseziert werden (Auer and Stick 2012).

Im Bereich des Penis und des Präputiums kann je nach Lage des Tumors entweder mit einer partiellen Phallektomie oder En-block Resektion des Penis mit oder ohne peniler Retroversion gearbeitet werden. Bei der partiellen Phallektomie kommt es vermehrt zu Rezidiven, wenn proximal der Stelle an der abgesetzt wird, bereits Vorstufen vorhanden sind (Doles et al. 2001, van den Top et al. 2010). Die En-Block Resektion ist eine sehr invasive Methode, die zwar geringere Rezidiv-Raten aufweist, allerdings ein wesentlich höheres Komplikationsrisiko hat (Archer and Edwards 2004, van den Top et al. 2011).

Zu den konservativen Therapie-Methoden gehört zum Beispiel die Kryotherapie, bei der das Gewebe mittels flüssigen Stickstoffs auf -196 °C gekühlt wird, vor allem geeignet für präkanzeröse Stadien im Genitalbereich (Bosch and Klein 2005, Taylor and Haldorson 2013). Die Therapie durch Erhitzen wird vor allem nach chirurgischer Entfernung der Masse verwendet, um die Rezidivrate zu senken (Grier et al. 1980, King et al. 1991, Taylor and Haldorson 2013). Bei der Radiotherapie sind die Brachytherapie und die Teletherapie zu unterscheiden, beide für eher kleine oberflächliche Läsionen oder nach chirurgischer Exzision geeignet. Zur Chemotherapie wurden bisher Cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU), Mitomycin-C und Bleomycin angewendet, entweder in Form einer intraläsionalen Injektion oder mittels

abbaubarer Perlen (Taylor and Haldorson 2013). Imiquimod führte in einer Studie mit acht Pferden mit auralen Plaques (14 Ohren waren betroffen) bei 95 % der Patienten zum Rückgang der Veränderungen (Zakia et al. 2016). Ursprünglich wurde Imiquimod in der Humanmedizin zur Behandlung von genitalen und analen Warzen zugelassen (Pressanti and Cadiergues 2013). Es handelt sich dabei um ein Imidazochinolin-Amin, welches indirekt INF-α Produktion stimuliert. Dadurch kommt es zur vermehrten Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine und anderer Mediatoren. Infolgedessen werden antigen-präsentierende Zellen aktiviert, wodurch sich eine indirekte antivirale Wirkung ergibt (Roberto et al. 2013).

3. Magentumoren beim Pferd

3.1. Allgemeines

Generell gehören Magentumoren beim Pferd zu den selteneren Krankheitsbildern, sie machen nur in etwa 1,5 % der tumorösen Veränderungen beim Pferd aus (Sundberg et al. 1977). Bei den meisten Neoplasien des Magens handelt es sich um PEKs, am zweithäufigsten ist die intestinale Form des Lymphoms (Taylor et al. 2009). Außerdem kommen Adenokarzinome, Leiomyosarkome, gastrointestinale Stromatumoren, Papillome, und benigne Polypen vor (Taylor et al. 2009).

Die Symptome der erkrankten Tiere sind meistens unspezifisch, weshalb eine Diagnose oft erst *post mortem* gestellt werden kann (Taylor et al. 2009). Zu den am meisten beobachteten klinischen Symptomen gehören intermittierende Anorexie beziehungsweise ein verminderter Appetit und Gewichtsverlust (Tennant et al. 1982). Außerdem können milde, wiederkehrende Koliken, Hypersalivation, Fieber, eine erhöhte Atemfrequenz und selten auch Halitosis vorkommen (Taylor et al. 2009).

Die Diagnosefindung kann sich schwierig gestalten. Zu den heranzuziehenden Methoden gehören eine Hämatologie inklusive eines Differentialblutbildes, eine klinisch-chemische Untersuchung des Blutes, eine Untersuchung des Bauchhöhlenpunktates, eine rektale Untersuchung, eine Gastroskopie, eine transabdominale Ultraschalluntersuchung des Magens und eine ultraschallgestützte Feinnadelaspiration oder Biopsie-Entnahme von verändertem Gewebe, falls solches gefunden werden konnte (Taylor et al. 2009).

Auch die therapeutischen Möglichkeiten sind beschränkt, da der Magen des Pferdes für chirurgische Eingriffe nur sehr schlecht zugänglich ist und das Geschehen zum Zeitpunkt der Diagnose, wenn eine gestellt werden kann, oft schon sehr weit fortgeschritten ist. Die meisten Pferde müssen daher euthanasiert werden. Wenn sich die Diagnostik in Zukunft so verbessert, dass der Primärtumor entdeckt wird bevor es zu Metastasen kommt, könnte auch eine chirurgische Therapie erfolgreich sein. Problematisch ist allerdings trotzdem der sehr hohe Kostenfaktor (Taylor et al. 2009).

3.2. Co – Faktoren und Entstehung

PEKs sind die am häufigsten vorkommenden tumorösen Veränderungen des Magens des Pferdes, auch wenn sie nur zirka 3-4 % der insgesamt auftretenden PEKs ausmachen (Cotchin 1977, Sundberg et al. 1977). Die meisten der Tumore betreffen den *Fundus ventriculi,* da der Magen in diesem Teil mit kutaner Schleimhaut ausgekleidet ist, von der die Tumoren ausgehen (Tennant et al. 1982, Taylor et al. 2009). Es handelt sich um den *Pars nonglandularis* der Magenschleimhaut (Tennant et al. 1982). Außerdem kann der ösophageale Teil des Magens oder der distale Ösophagus betroffen sein. Primär ösophageale Tumoren sind allerdings selten beschrieben, meistens handelt es sich um die Ausdehnung eines Karzinoms des Magens (Duncanson et al. 2008).

Beim Alter zur Zeit der Vorstellung unterscheiden sich die Ergebnisse verschiedener Studien, teilweise ist von einem durchschnittlichen Alter von 18 Jahren die Rede, in anderer Literatur sind es zwölf Jahre (Cotchin 1977, Wester et al. 1980, Ferrer et al. 2021). Eine geschlechtliche Prädisposition bei männlichen Tieren wurde vermutet, konnte aber nicht eindeutig bestätigt werden (Tennant et al. 1982, Taylor et al. 2009).

Ferrer et al., 2021 erwähnen die Möglichkeit, dass Umweltfaktoren, sowie geographische und ernährungsbedingte Risikofaktoren eine Rolle spielen könnten, es gibt dazu aber leider noch keine eindeutigen Studien (Ferrer et al. 2021).

Welche Rolle EcPV2 bei der Entstehung von PEKs im Magen spielt, konnte noch nicht endgültig geklärt werden. Allerdings war es Alloway et al. 2020 möglich in sieben von elf Proben von PEKs aus dem Magen mittels PCR EcPV2 nachzuweisen (Alloway et al. 2020). EcPV2 konnte in keiner der Negativ-Kontrollen detektiert werden, was die Theorie einer kausativen Rolle von EcPV2 bei der Entstehung von PEKs im Magen unterstützt. In einem Fallbericht wurde ein Pony vorgestellt, welches sowohl ein Karzinom an der Vulva hatte als

auch ein PEK im Magen. In beiden Läsionen konnten genetisch idente EcPV2 RNS nachgewiesen werden, wobei die Veränderungen an der Vulva positiv für E6 und L1 waren und die im Magen nur für E6. Die unterschiedliche Expression der beiden Gene könnte für einen unterschiedlichen Fortschritt der viralen Infektion sprechen oder für die Entwicklung einer abortiven Infektion in der Läsion im Magen sein (Porcellato et al. 2020).

4. Hypothese

Nachdem noch sehr wenig zur Transmission von EcPV2 bekannt ist, ist die erste Fragestellung, der diese Arbeit nachgehen soll, ob der Speichel von gesunden Pferden als Reservoir für EcPV2 dienen kann. Um dem nachzugehen, wurden Speichelproben von nicht betroffenen Pferden mittels PCR auf das Vorhandensein von EcPV2 untersucht.

Die zweite Hypothese ist, dass EcPV2 an der Entstehung von PEKs im Magen von Pferden beteiligt ist. Um diese Frage zu untersuchen, wurden paraffinierte Proben aus diesen Veränderungen mittels PCR auf EcPV2 analysiert.

Material und Methoden

1. Proben

Bei den 42 verwendeten Proben handelt es sich um isolierte DNS aus gingivalem Sulcusfluid von Pferden und Ponys, die im Rahmen der Dissertation „Possible involvement of Herpesvirus and Treponema in Peridontal Disease of the anterior dentiton in Horses“ von K. Pieber 2012 gesammelt und bereits isoliert wurden (Pieber 2012). Nach der Verwendung für eben genannte Arbeit, wurden die Proben tiefgekühlt auf -20°C aufbewahrt.
Außerdem wurde das Institut für Pathologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien damit beauftragt, Fälle von PEKs im Magen von Pferden herauszusuchen, von denen im Zeitraum von 2001 bis 2020 paraffinierte Proben archiviert wurden. Es konnten drei Fälle gefunden werden, von denen die Magentumoren in Paraffinblöcken aufbewahrt wurden. Auf unser Ansuchen wurden Schnitte angefertigt, die dann zur weiteren Untersuchung zur Verfügung standen.

2. DNS-Isolation aus paraffinfixierten Proben

Dieser Schritt wurde durchgeführt, um die DNS aus den paraffinfixierten Schnitten der PEKs des Magens der Pferde zu extrahieren und danach mit dieser weiterzuarbeiten.

Um die Schnitte zu entparaffinieren wurden die drei Proben mit jeweils 1 ml Xylol überschichtet, einige Sekunden gevortext und dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, und immer wieder kurz gevortext. Anschließend wurden sie 5 min bei 20 000 g zentrifugiert und danach der Überstand abpipettiert. Diese ersten Schritte wurden einmal wiederholt.
Das nun entstandene Pellet wurde mit 1 ml Ethanol überschichtet und einige Sekunden gevortext und anschließend 5 min bei 20 000 g zentrifugiert und erneut der Überstand abpipettiert. Die Überschichtung mit Ethanol und die folgenden Schritte wurden wiederholt und anschließend der gesamte Ethanol-Rest abpipettiert.
Das entstandene Pellet wurde bei 37 °C mit offenem Deckel getrocknet.

Die Isolation der DNS aus den entparaffinierten Proben erfolgte mittels des „QIAamp DNS Micro Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Folgende Schritte wurden dafür durchgeführt: Zuerst wurden die entparaffinierten Proben in 1,5 ml Röhrchen gefüllt, sofort 180 µl „Buffer ATL“ und 20 µl „Proteinase K“ hinzugefügt und für 15 s gevortext, um die Zellen zu lysieren

und die Proteine zu verdauen. Die Mischung wurde bei 56 °C über Nacht inkubiert um die Probe komplett zu lysieren.

Am folgenden Tag wurden die Röhrchen durch eine fünfminütige Inkubation auf Raumtemperatur gekühlt und anschließend 200 µl „Buffer AL“ hinzugefügt, um später eine optimale Bindung der DNS an die Membran zu ermöglichen. Es wurde erneut mehrmals gevortext und anschließend kurz zentrifugiert, um die Tropfen aus dem Deckel zu entfernen. Das gesamte Lysat wurde in das mitgelieferte „MinElute“ Gefäß transferiert, ohne den Rand zu befeuchten, dieses dann in einem 2 ml Tube platziert, verschlossen und bei 20 000 g für 1 min zentrifugiert. Dadurch wurde das Lysat durch die Membran im Gefäß gezogen und die DNS daran adsorbiert. Das „MinElute“ Gefäß, in dem sich die Membran befand, an der die DNS gebunden war, wurde in ein neues 2 ml Röhrchen transferiert und die abzentrifugierte Flüssigkeit verworfen. Anschließend wurde der Deckel des „MinElute“ Gefäßes geöffnet, 500 µl „Buffer AW1“ hinzupipettiert, der Deckel wieder verschlossen und erneut bei 20 000 g für eine Minute zentrifugiert. Das „MinElute“ Gefäß wurde daraufhin wieder in ein neues 2 ml Röhrchen transferiert und der Waschschritt wiederholt.

Danach wurde das Gefäß bei 20 000 g 3 min zentrifugiert, um die Membran komplett zu trocknen und Ethanolreste zu entfernen. Das „MinElute“ Gefäß wurde erneut transferiert und das Gefäß mit dem Durchfluss verworfen.

In Folge wurde das „MinElute“ Gefäß vorsichtig geöffnet und 50 µl „Buffer AE“ in die Mitte der Membran pipettiert um die Probe zu eluieren. Der Deckel wurde verschlossen, das Gefäß für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 20 000 g für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss mit der isolierten DNS wurde in 1,5 ml Eppendorf-Tubes transferiert und bei -20 °C aufbewahrt.

3. Bestimmung der DNS-Konzentration

Da, die in der Arbeit verwendeten Speichel-DNS-Proben schon mehrere Jahre tiefgekühlt aufbewahrt wurden, wurde, um einen Überblick über die noch erhaltene DNS-Menge in den Proben zu erlangen, der DNS-Gehalt in den Proben mit Hilfe des NanoDrop™ ONE (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) bestimmt. Auch die aus den Paraffinschnitten der Magentumoren isolierte DNS wurde mit dem NanoDrop™ analysiert.

Vor der Analyse wurde die Stelle, auf welche die zu untersuchende Probe getropft wurde, mit Reinstwasser gereinigt und es erfolgte die Einstellung des Blindwerts. Die Proben wurden vor

der Bestimmung gevortext und es wurde jeweils 1 µl der Probe analysiert. Die Durchführung der Überprüfung erfolgte nach den Anweisungen des Gerätes, indem 1 µl der Probe auf die dafür vorgesehene Stelle getropft wurde, anschließend der Arm des Gerätes herabgelassen und die Untersuchung über das Touchpad gestartet wurde.

4. PCR auf Mikrosatellit (Eca 2A.3) und EcPV2

Um erfolgreiche DNS-Isolation aus den Proben zu bestätigen, wurde mit allen Proben eine PCR mit Eca 2A.3 Primern durchgeführt (Sequenz siehe Tab. 1) (Wallner 2001). Es handelt sich hierbei um einen Microsatellit, der in der DNS jeder Zelle des Organismus exprimiert wird. Sie sind somit dafür geeignet festzustellen, ob die Isolation der DNS funktioniert hat und genug DNS in den Proben vorhanden ist, um eine PCR durchführen zu können.

Zum Nachweis von EcPV2 wurde eine PCR auf das E6 Gen des Virus mit den in Tab. 1 beschriebenen Primern durchgeführt (Scase et al. 2010). Der für die PCR verwendete Mix setzte sich zusammen aus 12 µl REDTaq® ReadyMix™ PCR-Reaktionsmischung (Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich), 4 µl Wasser, jeweils 2 µl des vorwärts und des rückwärts gerichteten Primers in einer Konzentration von 10 µmol und 5 µl der Probe.

Tab. 1: Verwendete Primersequenzen

Gen	Sequenz
Eca 2A.3 (Wallner 2001)	5´-TCCAGTAGCCCAATACCACA-3´ 5´- CCCAGGTCCAACTTAGAGGA -3´
EcPV2 E6 (Scase et al. 2010)	41f: 5′-GCTCTCTTCTGGTTACTTTGG-3′ 435r: 5′-CTTGCAGTGTACACGTTTCTG-3′

Das verwendete PCR Protokoll lautete wie folgt: 3 min bei 94 °C, um die DNS zu denaturieren, anschließend 45 Zyklen von 30 sec bei 94 °C, in welcher Phase es ebenfalls zur Denaturierung kommt, 30 sec bei 58 °C wobei hier die Bindung der Primer stattfindet und 30 sec bei 72 °C, um die Elongation zu ermöglichen. Darauf folgte die Abkühlung auf 10 °C bis zur Entnahme.

In jedem Durchgang wurden die zu untersuchenden Proben, eine Negativkontrolle (steriles Wasser) und eine Positivkontrolle (bekannt positives PEK-Gewebe) untersucht.

5. Gelelektrophorese

Die amplifizierten PCR Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Dafür wurde ein ein-prozentiges Agarose Gel hergestellt, indem 1,25 g Agarose mit 125 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) gemischt und in der Mikrowelle erhitzt wurde, bis die Flüssigkeit klar wurde. Das Gefäß musste, während des Erhitzens immer wieder geschwenkt werden, um ein Überkochen zu verhindern.

Danach wurde das Gefäß kurz unter kaltem Wasser geschwenkt, um es auf zirka 50 °C abzukühlen und 4 µl Atlas ClearSight DNS Stain (Bioatlas, Tartu, Estland) hinzugefügt. Das Gel wurde dann in eine Gießkammer gefüllt mit zwei Kämmen, mit denen jeweils zwölf Taschen im Gel entstehen und darin belassen, bis das Gel ausgehärtet war.

Das fest gewordene Gel wurde in die Kammer eingesetzt und diese mit TAE-Puffer aufgefüllt bis zur Markierung auf der Kammer. Anschließend wurden die PCR Produkte in die Geltaschen pipettiert, in eine Geltasche wurden 6 µl des GeneRuler 100 bp Plus DNS Ladders (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) gefüllt. Dieser wurde vorher vorbereitet und bestand aus Farbstoff, Marker und sterilem Wasser im Verhältnis 1:2:3.

Nach dem Befüllen der Taschen wurde mit Hilfe des PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) für 1 h eine Spannung von 100 V an die Laufkammer angelegt.

Waren die PCR-Amplifikate nach 45-60 min weit genug Richtung Kathode gelaufen, wurde das Gel mittels UV-Licht in dem Geldokumentationssystem ChemiDoc XRD, Modell: Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) analysiert und fotografiert.

Ergebnisse

1. Speichel-Proben

1.1. Patienten Daten

Die Speichel-Proben wurden von insgesamt 42 Pferden entnommen. Die bekannten Daten zu den in der Arbeit inkludierten Tieren sind in Tab. 2 dargestellt. Von den 42 Pferden waren 21 Wallache (50 %) und sieben Stuten (17 %), bei 14 Pferden (33 %) war das Geschlecht nicht bekannt.

Das durchschnittliche Alter der beprobten Tiere betrug 19,82 Jahre, die Standardabweichung lag bei fünf Jahren. Das jüngste Tier war zum Zeitpunkt der Untersuchung zwei Jahre alt, das Älteste 34.

Die Population bestand aus den folgenden Rassen: Warmblut (alle Rassen zusammengefasst) (69,05 %), Islandpferd (4,76 %), Shetlandpony (4,76 %), Haflinger (4,76 %), norwegisches Fjordpferd (2,38 %), deutsches Reitpony (2,38 %), Pony unbekannter Rasse (2,38 %), Kaltblutpferd unbekannter Rasse (2,38 %), Fox Trotter (2,38 %) und Shagya Araber (2,38 %).

Tab. 2: Probendaten

Probennummer	Geschlecht	Alter	Rasse
1	Wallach	17	Warmblut
2	Wallach	24	Warmblut
3	Wallach	22	Islandpferd
4	Wallach	24	Warmblut
5	Wallach	23	Warmblut
6	Wallach	15	Warmblut
7	Wallach	17	Norwegisches Fjordpferd
8	Wallach	22	Warmblut
9	Wallach	19	Warmblut
10	Wallach	17	Warmblut
11	unbekannt	19	Warmblut
12	unbekannt	25	Warmblut
13	unbekannt	18	Warmblut

14	Wallach	29	Islandpferd
15	Wallach	19	Shetlandpony
16	Wallach	21	Warmblut
17	Wallach	20	Warmblut
18	Wallach	12	Warmblut
19	Stute	24	Warmblut
20	Wallach	27	Warmblut
21	Stute	18	Deutsches Reitpony
22	Stute	30	Shetlandpony
23	Wallach	19	Warmblut
24	Stute	16	Warmblut
25	Stute	15	Warmblut
26	Wallach	20	Warmblut
27	Stute	17	Warmblut
28	Wallach	19	Pony
29	Wallach	18	Warmblut
30	Wallach	19	Warmblut
31	Stute	18	Kaltblutpferd
32	unbekannt	17	Warmblut
33	unbekannt	6	Warmblut
34	unbekannt	26	Haflinger
35	unbekannt	2	Fox Trotter
36	unbekannt	13	Warmblut
37	unbekannt	10	Shagya Araber
38	unbekannt	17	Warmblut
39	unbekannt	23	Warmblut
40	unbekannt	34	Warmblut
41	unbekannt	12	Warmblut
42	unbekannt	18	Haflinger

1.2. Analyse Nanodrop

Mit dem Nanodrop wurde der DNS-Gehalt der Proben in ng/µl gemessen, die Werte sind in Tab. 3 dargestellt. Die mittlere DNS-Konzentration betrug 10,92 ng/µl, die Standardabweichung 9,15 ng/µl. Die geringste Konzentration lag bei 3,61 ng/µl, die höchste bei 56,38 ng/µl. Das erste Quartil betrug 6,16 ng/µl, das zweite 8,11 ng/µl und das dritte 12,14 ng/µl.

Tab. 3: DNS-Gehalt der Speichel-Proben und PCR Ergebnisse

Probennummer	DNS/ Probe (ng/µl)	PCR Mikrosatellit	PCR EcPV2
1	56,38	+	-
2	5,98	+	-
3	12,16	+	-
4	33,76	+	-
5	19,07	+	-
6	19,90	+	-
7	12,10	+	-
8	6,71	-	-
9	8,52	+	-
10	18,97	+	-
11	14,78	-	-
12	5,00	-	-
13	12,16	+	-
14	7,72	+	-
15	8,19	+	-
16	16,23	+	-
17	4,45	+	-
18	3,61	-	-
19	7,29	+	-
20	12,54	+	-
21	5,43	+	-
22	9,79	+	-
23	7,03	+	-

24	6,68	+	-
25	4,88	+	-
26	9,83	+	-
27	8,03	-	-
28	6,31	+	-
29	5,44	-	-
30	8,63	+	-
31	6,82	+	-
32	10,12	+	-
33	5,93	+	-
34	17,58	+	-
35	5,60	+	-
36	7,12	+	-
37	8,74	+	-
38	10,30	+	-
39	6,11	+	-
40	7,36	-	-
41	4,91	-	-
42	10,34	-	-

1.3. PCR Eca 2A.3 und EcPV2

Von den 42 Proben konnten 33 (79 %) positiv auf Eca 2A.3 getestet werden und somit das Vorhandensein zellulärer Pferde DNS und daher erfolgreiche DNS-Isolation bestätigt werden. Der Rest (9 Proben, 2 %) musste aus der Arbeit ausgeschlossen werden, da, wenn keine Amplifikate dieses Gens nachzuweisen sind, nicht davon ausgegangen werden kann, dass ausreichend DNS in der Probe vorhanden ist, bzw. die Isolation der DNS nicht funktioniert hat. In Tab. 3 ist ein Vergleich zwischen den festgestellten DNS Mengen und dem Testergebnis auf den Mikrosatellit dargestellt. Die Mittlere DNS-Konzentration in den auf Eca 2A.3 positiv getesteten Proben beträgt 11,89 ng/µl. In den Proben, in denen der Mikrosatellit nicht nachzuweisen ist, liegt die mittlere DNS-Konzentration bei 7,35 ng/µl. Die PCR wurde mittels Gelelektrophorese ausgewertet, von welcher in Abb.2 eine repräsentative Auswahl gezeigt wird.

Die PCR Analyse auf das Equine-Papilloma-Virus-Typ-2 war in allen Proben negativ, dargestellt in Tab. 3.

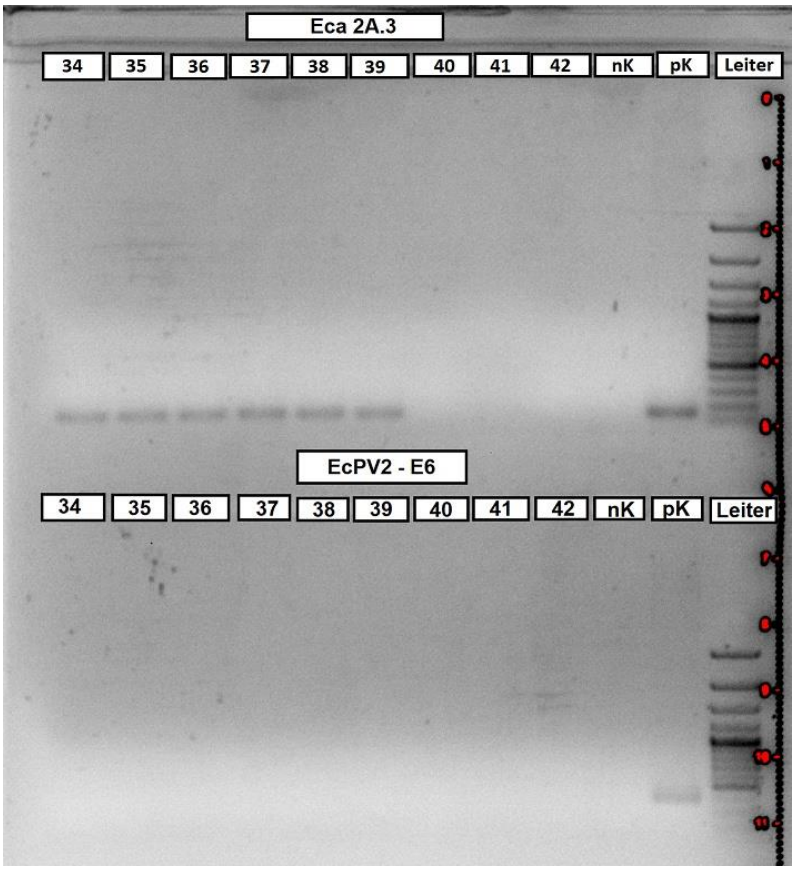

Abb. 2: Gelelektrophorese der PCR auf Eca 2A.3 und dem E6 Gen des EcPV2 aus den Proben 34-42. Die Banden der Leiter liegen in Abständen von jeweils 100 bp, die beiden stärkeren Banden liegen bei 500 und 1000 bp. Es ist zu sehen, dass in den Proben34-39 Eca 2A.3 nachgewiesen werden konnte, da hier Banden im Bereich von 150 bp zu sehen sind. In den restlichen Proben und der PCR auf EcPV2 sind keine Banden zu sehen, hier konnte also die gesuchte DNS in den Proben nicht nachgewiesen werden. Die Negativ-kontrolle ist bei beiden PCR Durchläufen negativ und bei der Positivkontrolle ist jeweils eine Bande zu sehen. Man kann also davon ausgehen, dass die PCR funktioniert hat.

2. Magen Proben

Es konnten von der Pathologie Paraffinschnitte von archivierten Blöcken von drei Fällen zur Verfügung gestellt werden. Im Folgenden wird kurz auf die Krankengeschichte der Patienten und die pathologischen Untersuchungsergebnisse eingegangen.

2.1. Patientendaten

Beim ersten Patienten handelt es sich um einen 29-jährigen, englischen Vollbluthengst. Er wurde erstmals in der Klinik vorstellig wegen intermittierendem Fieber, Inappetenz und geringgradigen Kolik-Erscheinungen.
Durch die bei der Untersuchung erhobenen Befunde kam man zu den folgenden Diagnosen: eine Masse im Magen, Verdachtsdiagnosen waren hier Magenkarzinom, Spindelzelltumor oder Granulationsgewebe, außerdem eine Hepatopathie und eine hochgradige Verwurmung.
Nachdem der Patient nicht auf die Therapie ansprach, sich der Allgemeinzustand weiter verschlechterte und auf Grund der schlechten Prognose, entschied man sich zu einer Euthanasie mit anschließender patho-histologischen Untersuchung.
Bei der pathologischen Untersuchung konnten fokale Verwachsungen von Magen, Leber, großem Netz und Zwerchfell, ungefähr auf Höhe des *Margo plicatus*, vor allem die kleine Kurvatur und die kaudale Seite des Magens betreffend, festgestellt werden. Außerdem wurde an der Magenwand eine halbkreisförmige schlecht abgegrenzte derbe Verdickung registriert und an der kleinen Kurvatur eine zirka handtellergroße Unebenheit der kutanen Schleimhaut. An der unteren Zwerchfellflexur lag ein zirka 10 x 20 cm großer, dem Tumor anliegender Bereich mit deutlicher Serositis. Die Milz war hochgradig, die Lungen geringgradig gestaut
In der histologischen Untersuchung kam es zu folgendem Befund: Die Umfangsvermehrung besteht histologisch aus Inseln und Straßen von ungeordnet mehrschichtigem Epithel, das stellenweise Differenzierung zu nicht verhornendem Plattenepithel zeigt: die Tumorzellen haben einen ovalen blasigen Kern mit ein bis zwei deutlichen Nukleoli, zeigen mäßige Pleomorphie und eine moderate Mitoserate, und sind von großen Mengen skirrhösen Stromas umgeben; das Stroma zeigt mäßige gemischtzellige Entzündung, die Tumorinseln sind häufig eitrig infiltriert, der Tumor wächst hochgradig infiltrativ von der kutanen Schleimhaut ausgehend submukös und in der Muskularis der Magenwand. Zusätzlich finden sich zahlreiche Metastasen in den Magen- und Leberlymphknoten sowie in der Leber. Das umgebende Lebergewebe ist atrophisch, fibrosiert, subakut gestaut, zeigt hepatozelluläre Degeneration, Cholestase und eine mäßige gemischtzellige Entzündung.
Die endgültige Diagnose war hier ein metastasierendes skirrhöses nicht-verhornendes PEK des Magens.

Der zweite Patient war ein 19-jähriger Friesenhengst der auf Grund extremer Abmagerung, Fieber und vom Haustierarzt festgestellten erhöhten Entzündungsparametern vorgestellt wurde.

Durch die Untersuchungen ergab sich der starke Verdacht auf ein tumoröses Geschehen, das sich bereits weit in der Bauchhöhle verteilt hat und man entschied sich zu einer Euthanasie und in Folge zu einer patho-histologischen Untersuchung.
Die Diagnose der Pathologischen Untersuchung lautete „Plattenepithelkarzinom, möglicherweise von der Magenschleimhaut ausgehend“. Es wurde bei der Obduktion eine zirka 40 x 20 x 20 cm große weiße derbe bis harte Umfangsvermehrung im ventralen Bereich der intrathorakalen Bauchhöhle zwischen Magen und Leber (stielartig mit der Magenwand im Bereich der kleinen Kurvatur verwachsen) festgestellt. Außerdem fand man während der Untersuchung an der Serosa des Magens multiple bis zu kinderfaustgroße derbe, harte weiße Umfangsvermehrungen: an einer Lokalisation Infiltration der Magenwand assoziiert mit einer ca. handflächengroßen Ulzeration der Schleimhaut (*Pars glandularis*) und diffus an den serösen Häuten der ventralen Bauchwand sowie am Colon multiple bis zu kinderfaustgroße derbe, harte weiße blumenkohlartige Zubildungen. Es zeigte sich weiter eine diffuse mittelgradige chronische Peritonitis bzw. Serositis insbesondere des *Caecums* und Zwerchfells.
Histologisch konnten die Zubildungen als PEK identifiziert werden.

Die dritte Probe kam von einem 14-jährigen Norikerwallach, der an die Universitätsklinik kam, um das seit vier Wochen anhaltende Fieber und die damit einhergehende Inappetenz abzuklären.
Es wurde eine Peritonitis diagnostiziert, die mit Antibiotika und entzündungshemmenden Medikamenten antherapiert wurde. Auf die Therapie zeigte sich keine Besserung, woraufhin eine Probe-Laparotomie durchgeführt wurde, da man bisher keinen Hinweis auf die Ursache der Peritonitis finden konnte. Durch die Operation konnten derbe, höckerige Massen in der Bauchhöhle verteilt, unter anderem an Zwerchfell Leber, Milz und Omentum gefunden werden. Es wurden Biopsien der Massen genommen und in der histologischen Analyse festgestellt, dass es sich entweder um ein PEK oder ein Mesotheliom handelt. Auf Grund der schlechten Prognose und bereits erfolgten Streuung wurde das Pferd euthanasiert und zur patho-histologischen Untersuchung geschickt.
Bei dieser konnte ein metastasierendes nicht verhornendes PEK, ausgehend von der kutanen Schleimhaut des Magens gefunden werden. In der Bauchhöhle waren folgende Veränderungen zu finden: Geringgradiger Ascites, mäßige filamentöse Serositis am Zwerchfell und Peritoneum. Außen am Magen war eine großflächige derbe knotige Zubildung zu sehen, die über eine Ulzeration mit der kutanen Schleimhaut in Verbindung stand. Die Zubildung

bestand aus nicht verhornenden Plattenepithelzellen mit zum Teil ausgedehnten Nekrosen, eitrigen Einschmelzungsherden und begleitender lymphozytärer Infiltration. Die Zubildung erstreckte sich vom Magen zum linken kranialen Nierenpol. Weitere Zubildungen fanden sich im Zwerchfell, zwischen Zwerchfell und Leber (bis doppelt faustgroß), in der Leber (kugelig 13x13x10 cm), rund um die Gekrösewurzel, im großen Netz, in der Pankreas, im Mesenterium und im retroperitonealen Fettgewebe der Nieren.

Alle drei Fälle wurden mit Fieber und Inappetenz vorgestellt, es handelte sich bei allen bereits um ein chronisches Geschehen. Auf Grund der unzureichenden Therapiemöglichkeiten und der schlechten Prognose mussten alle drei Pferde euthanasiert werden. Durch die pathologische Untersuchung wurde bei allen Pferden ein metastasierendes PEK des Magens festgestellt.

2.2. Analyse Nanodrop Magenkarzinome

Die Proben aus den PEKs der Mägen wurden ebenfalls mit dem Nanodrop analysiert, die DNS-Gehalte sind in Tab.4 dargestellt. Der höchste Wert beträgt 173, 15 ng/µl, der geringste 37,23 ng/µl und der Durchschnitt liegt bei 102,67 ng/µl.

Tab. 4: DNS-Gehalt der PEK-Proben aus dem Magen und PCR Ergebnisse

Probennummer	DNS/Probe (ng/µl)	PCR Mikrosatellit	PCR EcPV2
43	173,15	+	-
44	37,23	+	-
45	100,63	+	-

2.3. PCR Eca 2A.3 und EcPV2 der Magenkarzinome

Die PCR auf das Eca2A.3 war bei allen Proben positiv, auch zu sehen in Tab. 3.

DNS des Equinen-Papilloma-Virus-Typ-2 konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden, dargestellt in Tab. 3.

Diskussion

In dieser Studie wurden 42 Speichel-Proben mittels PCR auf das Vorhandensein von EcPV-2 getestet, wobei das Virus in keiner der Proben nachgewiesen werden konnte. Bei der Patientengruppe handelte es sich um eher ältere Pferde, mit einem mittleren Alter von fast 20 Jahren, was zirka mit dem mittleren Alter der Pferde übereinstimmt, bei denen sich die meisten genitalen PEKs entwickeln (Valentine 2006). Zur Gruppenzusammenstellung ist zu sagen, dass 50 % Wallache waren, 17 % Stuten und beim Rest (33 %) das Geschlecht nicht bekannt war. Da nicht davon auszugehen ist, dass alle Pferde mit unbekanntem Geschlecht Stuten waren, waren die männlichen Tiere wahrscheinlich überrepräsentiert. Das stellt allerdings einen nicht uninteressanten Aspekt dar, da manche Studien zeigen, dass genitale PEKs bei männlichen Tieren häufiger vorkommen als bei weiblichen (Sundberg et al., 1977; Pascoe and Summers, 1981; Mosunic et al., 2004). Allerdings wurden die Speichelproben von gesunden Pferden entnommen. Es wäre in Folgestudien interessant, den Speichel von erkrankten Tieren auf EcPV-2 zu untersuchen. Die Population bestand aus verschiedenen Rassen, vor allem Warmblütern, es konnte aber bisher bei PEKs im Genitalbereich keine Häufung bei einer der in dieser Studie vorhandenen Rassen festgestellt werden (Valentine 2006). Ein weiterer Punkt, der in späteren Studien Beachtung finden sollte, ist die Haltung der Tiere, wobei dieser Datenlage darauf keine Rücksicht genommen werden konnte, da keine Informationen dazu zur Verfügung standen. Die Haltung kann Einfluss auf den direkten Tier-zu-Tier-Kontakt haben und man könnte somit beleuchten, ob es Unterschiede in der Prävalenz bei engerem Kontakt gibt.

Bei den verwendeten Proben handelte es sich um isolierte DNS von Speichel-Proben, die im Zuge einer anderen Arbeit gesammelt wurden (Pieber 2012). Es war auffällig, dass der DNS-Gehalt der Proben stark variierte und generell eher niedrig war, was von mehreren Faktoren abhängen kann. Zum einen davon, wie die Proben gesammelt wurden und wie viel Speichel dabei entnommen wurde. Die Speichel-Proben wurden im Zuge der anderen Studie mittels einer sterilen Pipette aus dem *Sulcus cervicularis* entnommen und dann in 1,5 ml Röhrchen gespült (Pieber 2012). Wieviel Material dabei gesammelt wurde und wie hoch der DNS-Gehalt vor der Lagerung war ist nicht bekannt. Zum anderen könnte die Lagerungsart und -dauer Einfluss auf die noch vorhandene DNS-Menge haben. Ob die Proben in ihrer Lagerungszeit von zirka 10 Jahren fachgerecht gelagert, also permanent gefroren waren, konnte hier leider nicht mehr festgestellt werden. War dies nicht der Fall, könnte es durch die Temperaturwechsel

und die lange Lagerungsdauer an sich zu einem Abbau der DNS gekommen sein. (Tumban 2019).

Trotz des schwankenden DNS-Gehalts war der verwendete Mikrosatellit, der als zelluläre Isolationskontrolle getestet wurde, in 79 % der Proben nachweisbar. Somit war im Großteil der Speichel-Proben zelluläre DNS nachweisbar, aber es konnte keine EcPV-2 DNS detektiert werden. Es konnte daher in dieser Pilotstudie kein Hinweis dafür gefunden werden, dass Speichel bei gesunden Tieren eine Rolle als Reservoir für EcPV-2 spielt. Da in dieser Studie die Fallzahl aber leider nur sehr gering war, kann hier keine endgütige Aussage getroffen werden. Dafür wäre eine größer angelegte Untersuchung notwendig.

Bisher wurden zur Fragestellung, ob Speichel als Übertragungsweg für EcPV-2 eine Rolle spielen könnte noch keine Studien durchgeführt. Die Transmission von EcPV-2 ist im Allgemeinen noch weitgehend unbekannt. Es wäre daher von großem Interesse, weitere Arbeiten zu diesem Thema durchzuführen.

Es gibt diverse Theorien zur Transmission von EcPV2. Ein möglicher Übertragungsweg wäre durch direkten Kontakt sowohl von Tier zu Tier als auch bei einem Individuum von einer Körper-Stelle an die andere. Bogaert et al. berichten von einem Pferd, dass ein EcPV-2 positives PEK am Penis hatte und nach dem es an diesem über Wochen geleckt und geknabbert hatte, eine Läsion am Maul entwickelte, in der ebenfalls EcPV-2 nachgewiesen werden konnte (Bogaert et al. 2012). Dies zeigt auch die Möglichkeit, dass EcPV-2 dazu in der Lage ist, Schleimhaut an diversen Stellen zu infizieren, was auch schon bei kaninen oralen Papillomviren gezeigt werden konnte. Diese verursachen beim Hund bekanntermaßen Papillome in der Maulhöhle, konnten nun aber auch aus warzenartigen Veränderungen der Konjunktiva isoliert werden (Brandes et al. 2009). In der Humanmedizin konnte eine Studie HPV im Speichel von Patientinnen feststellen, die mit HPV assoziierte zervikale Läsionen hatten, allerdings gibt es noch keine Studien dazu, wie die Viren vom Genitalbereich in den Speichel gelangen könnten (Visalli et al. 2016). Beim Pferd konnte EcPV-2 bereits im Smegma von betroffenen Tieren nachgewiesen werden, was dafürsprechen könnte, dass Smegma als Reservoir dient, an dem sich ebenfalls weitere Tiere infizieren könnten. (Sykora et al. 2017)

Eine weitere Möglichkeit, wie sich EcPV2 in einem Tier ausbreiten könnte, wäre über das Blut, wie es auch schon für BPV gezeigt werden konnte. In einer Studie wurden Fohlen intradermal mit BPV1 Virionen infiziert. 2-4 Wochen vor der Sarkoid-Entwicklung konnte in den PBMCs virale DNS nachgewiesen werden, was frühestens sieben Tage nach Infektion war. Eine

dadurch entstandene Theorie ist, dass es zu einer virämischen Phase kommt, bevor die Tumorentwicklung beginnt, was auch erklären könnte, wie sich in einem Pferd Sarkoide an mehreren Stellen entwickeln können, vor allem wenn man bedenkt, dass die weißen Blutzellen an entzündete Hautstellen wandern (Hartl et al. 2016).

Auch in natürlicherweise betroffenen Tieren konnte BPV in PBMCs nachgewiesen werden (Brandt et al. 2008). Bei einer Stute mit multiplen Massen am Kopf und in der Region der Drosselrinne, die positiv auf EcPV-2 getestet werden konnten, wurde EcPV-2 ebenfalls in den PBMCs nachgewiesen (Kainzbauer et al. 2012), dieser Transportweg könnte also auch bei EcPV-2 eine Rolle spielen.

In Bezug auf die Übertragung von einem Individuum zum anderen konnte beim Menschen bereits nachgewiesen werden, dass HPV durch Haut-zu-Haut Kontakt zwischen Menschen übertragen werden kann. Eine Studie konnte zeigen, dass die Viren vom Anus einer Partnerin auf das Skrotum des anderen Partners übertragen wurden, ohne dass die Geschlechtsteile positiv getestet werden konnten (Hernandez et al. 2008).

Bei BPV wird auch ein Übertragungsweg über unbelebte Vektoren in Betracht gezogen, zum Beispiel durch kontaminiertes Putzzeug wie Bürsten oder andere Gebrauchsgegenstände. Durch diese können die Viren an Mikroläsionen in der Haut gebracht werden, in die sie dann eindringen können und die basalen Hautschichten infizieren. (Chambers et al. 2003, Bogaert et al. 2005). Wenn diese Gegenstände mit EcPV2-positivem Gewebe oder Smegma in Berührung kommen, könnte man diesen Weg der Transmission auch für EcPV2 in Betracht ziehen.

Auch die Übertragung durch Insekten könnte für EcPV-2 von Bedeutung sein, wie es auch bei BPV assoziierten Sarkoiden beim Pferd vermutet wird. Nachdem ein Nachweis von viraler BPV-DNS in Fliegen möglich war, die mit Sarkoiden Kontakt hatten, ist eine Übertragung durch Insekten durchaus denkbar (Kemp-Symonds 2000, Finlay et al. 2009). Da EcPV-2 auch im Smegma von betroffenen Tieren nachgewiesen werden kann, und nicht nur in Biopsie-Proben der Veränderungen, könnten daran vermutlich auch Fliegen die Viren aufnehmen und von einem Pferd auf das nächste übertragen (Sykora et al. 2017).

Bei caninen und felinen Papillomviren ist bis jetzt auch nur sehr wenig zur Transmission bekannt, aber auch hier wird eine Übertragung durch beißende Fliegen oder bei Kämpfen zwischen Katzen in Betracht gezogen (Munday et al. 2017).

In der Humanmedizin wurde für HPV von einer hauptsächlich sexuellen Transmission ausgegangen, aber mit der steigenden Zahl an Personen, die HPV-assoziierte Neoplasien haben, aber nicht sexuell aktiv sind, werden nun auch andere Wege in Betracht gezogen. In Frage kommen zum Beispiel die direkte oder indirekte Übertragung durch eine Schmier-Infektion, eine vertikale Übertragung oder eine nosokomiale Infektion (Ryndock and Meyers 2014). Auch beim Pferd könnte die sexuelle Übertragung eine Rolle spielen. Da allerdings auch Pferde betroffen sind, die nie zur Zucht verwendet wurden und der Natursprung generell mittlerweile nur mehr eine untergeordnete Rolle spielt, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch andere Transmissions-Wege von Bedeutung sind, wie zum Beispiel die oben bereits erwähnte Übertragung durch direkten Kontakt. Eine vertikale Übertragung vor, während oder direkt nach der Geburt könnte beim Pferd ebenfalls von Bedeutung sein, wie auch bei humanen Papillomviren bereits gezeigt werden konnte (Rombaldi et al. 2008). Eine vertikale Übertragung konnte auch bei BPV in Rindern demonstriert werden. In einer Studie konnte BPV in den PBMCs von Rindern nachgewiesen werden, die eine BPV-positive Bluttransfusion erhalten haben. Auch aus deren Nachzucht konnten BPV isoliert werden, was für eine *in utero* Übertragung sprechen könnte. (Stocco Dos Santos et al. 1998). Das Reservoir Blut könnte auch eine vertikale Übertragung über die Blutbahn ermöglichen (Brandt et al. 2008). Durch eine sensitivere PCR, konnte auch in den mononukleären Blutzellen von betroffenen Equiden das BPV1/-2 E5 Gen nachgewiesen werden (Brandt et al. 2008), und auch bei EcPV2 war bereits ein Nachweis in PBMCs möglich (Kainzbauer et al. 2012).

Im Zuge dieser Arbeit wurden Proben von drei Magentumoren mittels PCR auf das Vorhandensein von EcPV-2 untersucht, das Ergebnis aller Proben war negativ. Leider stand nur diese sehr kleine Fallzahl zur Verfügung, eine größer angelegte Untersuchung wäre hier mit Sicherheit interessant.

Das durchschnittliche Alter, mit dem Pferde mit Magentumoren vorstellig werden, liegt laut Literatur zwischen zwölf und 18 Jahren. In dieser Studie lag das mittlere Alter bei 21 Jahren also etwas über dem beschriebenen Durchschnitt, allerdings lassen sich bei einer Fallzahl von drei Patienten hier kaum Rückschlüsse ziehen. Bei allen drei Fällen handelt es sich bereits um ein chronisches Geschehen, was zu dem in der Literatur angegebenen Krankheitsbild passt, da beschrieben wird, dass die meisten Patienten erst vorstellig werden, wenn die Veränderungen bereits weit fortgeschritten sind. Daher ergibt sich auch die meist infauste Prognose. Auch die unspezifischen Symptome, welche die Patienten zeigten, wie Anorexie,

Lethargie, Abmagerung, intermittierendes Fieber stimmen mit der Literatur überein (Cotchin 1977, Tennant et al. 1982, Ferrer et al. 2021).

In einer Studie konnte in sieben von elf PEKs in Mägen von Pferden mittels PCR EcPV-2 DNS nachgewiesen werden. Dass vier der elf untersuchten Proben in der PCR Untersuchung negativ waren, könnte dafürsprechen, dass es mehrere Faktoren gibt, die die Entstehung von PEKs beeinflussen, so wie es auch bei PEKs im Genitalbereich angenommen wird (Zhu et al. 2015, Alloway et al. 2020). Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Viren nur in gewissen Phasen der Tumorentstehung vorhanden sind, wie es auch bei PEKs in der Kopf- und Nackenregion beim Menschen vermutet wird (Gheit 2019). Dort sind zirka 30 % - 60 % der Neoplasien mit HPV assoziiert, was auch mit der Nachweisquote von EcPV-2 im Magen von Pferden zusammen passen würde (Kobayashi et al. 2018, Alloway et al. 2020). Bei Magentumoren beim Menschen konnte noch kein kausaler Zusammenhang mit HPV hergestellt werden, was daran liegen könnte, dass der Magen des Menschen vollständig von glandulärer Schleimhaut ausgekleidet ist, wohingegen beim Pferd auch Teile mit kutaner Schleimhaut bedeckt sind, von welcher die PEKs ausgehen (Taylor et al. 2009, Akce et al. 2019). Die Umgebung entspricht also eher dem oropharyngealen Bereich des Menschen, in welchem PEKs je nach Region zu 20 %-90 % mit HPV in Verbindung gebracht werden konnten (Marur et al. 2010). Beim Pferd konnte EcPV-2 in 15 %-27 % der Tumoren im oropharyngealen Bereich nachgewiesen werden (Knight et al. 2013, Sykora et al. 2017). Es gibt bereits mehrere Case-Reports, in denen Pferde mit EcPV-2 positiven Tumoren im oberen Atmungstrakt und im GIT beschrieben werden, zum Beispiel ein 19-jähriger Hengst mit mehreren Massen in der Region des Larynx und Pharynx (Hibi et al. 2019), eine 20-jährige Stute, die eine Läsion an der Vulva und eine im Magen hatte, die beide positiv für EcPV-2 waren (Porcellato et al. 2020) und eine 14-jährige Stute mit multiplen Massen am Kopf und im Bereich der Drosselrinne (Kainzbauer et al. 2012).

In unserer Arbeit waren in allen Fällen Metastasen vorhanden, die allerdings nicht zur Untersuchung zur Verfügung standen. Alloway et al. untersuchten die Proben ebenfalls mittels *in situ* Hybridisierung, wobei mit dieser Methode in zwei der Fälle, die laut PCR positiv auf EcPV-2 waren, EcPV-2 nicht nachgewiesen werden konnte. In drei von diesen fünf Fällen waren Metastasen vorhanden, in denen mittels *in situ* Hybridisierung ebenfalls EcPV-2 nachgewiesen werden konnte. Die Diskrepanz zwischen der Untersuchung mittels PCR und *in situ* Hybridisierung könnte auf Unterschiede in der Sensitivität hinweisen. Die histologischen Veränderungen, die dort festgestellt wurden, sind sehr ähnlich zu denen, die bei den Pferden

dieser Studie zu sehen waren. Bei den Läsionen im Magen handelt es sich sowohl in unseren Fällen als auch in der erwähnten Arbeit um Primärtumoren. Es wurden weder pathohistologische noch pathoanatomische Unterschiede zwischen den EcPV-2 positiven und negativen Tumoren beschrieben (Alloway et al. 2020).

Alle hier zur Verfügung gestellten Proben waren über mehrere Jahre in Paraffin fixiert gelagert. In einigen Studien konnte auch aus Paraffin fixierten Proben EcPV-2 nachgewiesen werden (Scase et al. 2010, Knight et al. 2013, Alloway et al. 2020), es wurde aber auch berichtet, dass sich die Sensitivität der PCR bei dieser Art der Fixierung verringern kann (de Oliveira da Silva et al. 2022). Sollte in den hier verwendeten Proben also ursprünglich bereits eine geringe Viruslast gewesen sein, könnten sie durch den Sensitivitätsverlust nun falsch negativ sein. In jedem Fall wäre es von großem Interesse weitere Untersuchungen in größerem Umfang zu dieser Fragestellung einzuleiten. Es wäre sehr spannend frische Proben zu untersuchen, wobei es hier auch schwierig werden könnte eine ausreichende Fallzahl zu erreichen, da Magentumoren beim Pferd sehr selten auftreten.

Durch die hier gesammelten Daten war es nicht möglich einen Hinweis, darauf zu finden, dass der Speichel gesunder Pferde als Reservoir für EcPV2 dienen könnte. Auch die Frage, wie das Virus in den Magen gelangen könnte, ob das Virus an PEKs im Magen von Pferden beteiligt ist, oder nur sekundär in die Veränderungen gelangt, bleibt weiterhin offen und stellt ein spannendes Gebiet für weitere Nachforschungen dar.

Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome (PEKs) sind die häufigsten malignen epithelialen Tumoren beim Pferd. Besonders häufig sind sie an mukokutanen Übergängen, zum Beispiel im Genitalbereich oder am Kopf. Außerdem können sie im Gastro-Intestinal-Trakt vorkommen und stellen ebenfalls im Magen die am häufigsten vorkommende Tumorart dar. An den unterschiedlichen Lokalisationen kommen unterschiedliche auslösende Faktoren in Frage. Vor allem im Genitalbereich konnte das Equine Papillomvirus Typ-2 (EcPV2) als ursächlicher Faktor nachgewiesen werden. Bei den Tumoren im Magen ist noch nicht geklärt, wodurch die Entstehung ausgelöst wird, aber es konnte in der Vergangenheit in einigen PEKs in Mägen von Pferden ebenfalls EcPV2 nachgewiesen werden. Wie das Virus übertragen wird, ist ebenfalls noch nicht endgültig geklärt.

Diese Arbeit behandelt zum einen die Frage, ob Speichel bei gesunden Pferden als Reservoir für EcPV2 dienen kann. Um dieser Theorie nachzugehen, wurden Speichel-Proben von 42 Pferden mittels PCR auf das Vorhandensein von EcPV2 untersucht. In keiner der untersuchten Proben konnte EcPV2 nachgewiesen werden, es konnte also kein Hinweis darauf gefunden werden, dass Speichel eine Rolle als Reservoir dient.

Die zweite Frage, der diese Arbeit nachgeht, ist, ob EcPV2 in PEKs in Mägen von Pferden nachgewiesen werden kann. Da Magentumoren beim Pferd im Allgemeinen sehr selten sind, standen nur drei Proben zur Verfügung, die mittels PCR ebenfalls auf die Anwesenheit von EcPV2 untersucht wurden. Auch hier konnte das Virus nicht nachgewiesen werden, allerdings ist die Aussagekraft dieses Ergebnisses auf Grund der geringen Fallzahl nicht sehr groß.

Summary

Squamous cell carcinomas (SCCs) are the most common malignant epithelial tumors in horses. They are particularly common at mucocutaneous transitions, for example in the genital area or on the head. They can also occur in the gastro-intestinal tract and are also the most common type of tumor in the stomach. Different triggering factors need to be considered at the various locations. The Equine Papillomavirus Type 2 (EcPV2) was proven to be the causative factor in the genital area. In the case of tumors in the stomach, it is not yet clear what triggers their development, but EcPV2 has also been detected in some SCCs in horse stomachs in the past. How the virus is transmitted has not yet been finally clarified.

On the one hand, this work addresses the question of whether saliva can serve as a reservoir for EcPV2 in healthy horses. To investigate this theory, saliva samples from 42 horses were tested for the presence of EcPV2 using PCR. EcPV2 could not be detected in any of the samples examined, so no evidence could be found that saliva plays a role as a reservoir. The second question addressed in this work is whether EcPV2 can be detected in SCCs in horse stomachs. Since gastric tumors are generally very rare in horses, only three samples were available, which were also tested for the presence of EcPV2 by means of PCR. The virus could not be detected here either, but the significance of this result is limited due to the small number of cases.

Abkürzungsverzeichnis

Bovines Papillomvirus Typ-1/2/13/14	BPV1/2/13/14
Equus caballus Papillomvirus Typ-1-9	EcPV1-9
Gastro-Intestinal-Trakt	GIT
Humane Papillomviren	HPV
Long control region	LCR
peripheral blood mononuclear cells	PBMCs
Plattenepithelkarzinom	PEK
Tris-Acetat-EDTA-Puffer	TAE-Puffer
5-Fluorouracil	5-FU

Literaturverzeichnis

Akce M, Jiang R, Alese OB, Shaib WL, Wu C, Behera M, El-Rayes BF. 2019. Gastric squamous cell carcinoma and gastric adenosquamous carcinoma, clinical features and outcomes of rare clinical entities: A National Cancer Database (NCDB) analysis. Journal of Gastrointestinal Oncology, 10(1):85–94.

Alloway E, Linder K, May S, Rose T, Delay J, Bender S, Tucker A, Luff J. 2020. A Subset of Equine Gastric Squamous Cell Carcinomas Is Associated With Equus Caballus Papilloamvirus – 2 Infection. Veterinary Pathology, 57(3):427–431.

Almeida JD, Oriel JD, Stannard LM. 1969. Characterization of the virus found in human genital warts. Microbios, 3:225–232.

Araldi RP, Muro S, Assaf R, Carvalho RF de, Caldas MA, Carvalho R de, Souza JM de, Magnelli RF, Grando D, Roperto FP, et al. 2017. Papillomaviruses : a systematic review. Genetics and Molecular Biology, 40(1):1–21.

Archer DC, Edwards GB. 2004. En bloc resection of the penis in five geldings. Equine Veterinary Education, 16(1):12–19.

Aslan O, Orucß E. 2010. Is it possible to treat equine papillomatosis with ivermectin given orally? Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 16(6):1065–1068.

Auer JA, Stick JA. 2012. Equine Surgery. St. Louis: Saunders Elsevir.

Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, Koenraad D van, Al E. 2012. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. Virology, 401(1):70–79.

Bodaghi S, Wood L v, Roby G, Ryder C, Steinberg SM. 2005. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood ? Journal of Clinical Microbiology, 43(11):5428–5434.

Bogaert L, Martens A, de Baere C, Gasthuys F. 2005. Detection of bovine papillomavirus DNA on the normal skin and in the habitual surroundings of horses with and without equine sarcoids. Research in Veterinary Science, 79(3):253–258.

Bogaert L, Willemsen A, Vanderstraeten E, Bracho MA, Baere C de, Bravo IG, Martens A. 2012. EcPV2 DNA in equine genital squamous cell carcinomas and normal genital mucosa. Veterinary Microbiology, 158(1–2):33–41.

Bosch G, Klein WR. 2005. Superficial keratectomy and cryosurgery as therapy for limbal neoplasms in 13 horses. Veterinary Ophthalmology, 8(4):241–246.

Brandes K, Fritsche J, Mueller N, Dierig B, Strebelow G, Teifke JP. 2009. Detection of Canine Oral Papillomavirus DNA in Conjunctival Epithelial Hyperplastic Lesions of Three Dogs. Vet. Pathol., 46:34–28.

Brandt S, Haralambus R, Schoster A, Kirnbauer R, Stanek C. 2008. Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. Journal of General Virology, 89:1390–1395.

Brinsko SP. 1998. Neoplasia of the male reproductive tract. The Veterinary clinics of North America. Equine practice, 14(3):517–533.

Campo MS. 2006. Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond. first 1. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, Daniel R, Shah K v., Sidransky D. 2000. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. Clin. Cancer Res., 6:4171–4175.

Carter JR, Ding Z, Rose BR. 2011. HPV infection and cervical disease: A review. Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology, 51(2):103–108.

Chambers G, Ellsmore VA, Brien PMO, Reid SWJ, Love S, Campo MS, Nasir L. 2003. The association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. Journal of General Virology, 84:1055–1062.

Compston PC, Turner T, Wylie CE, Payne RJ. 2016. Laser surgery as a treatment for histologically confirmed sarcoids in the horse. Equine veterinary journal, 48(4):451–456.

Cook RH, Olson C. 1951. Experimental transmission of cutaneous papilloma of the horse. The American journal of pathology, 27(6):1087–1097.

Cotchin E. 1977. A General Survey of Tumours in the Horse. Equine Veterinary Journal, 9(1):16–21.

Doles J, Williams JW, Yarbrough TB. 2001. Penile amputation and sheath ablation in the horse. Veterinary Surgery, 30(4):327–331.

Dong SM, Pai SI, Rha SH, Hildesheim A, Kurman RJ, Schwartz PE, Mortel R, McGowan L, Greenberg MD, Barnes WA, et al. 2002. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma. Cancer Epidemiol. Bi- omarkers Prev., 11:3–6.

Doorbar J. 2005. The papillomavirus life cycle. Journal of Clinical Virology, 32(SUPPL.):7.

D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. 2009. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. Journal of Infectious Diseases, 199(9):1263–1269.

Dugan S, Roberts S, Curtis C, Severin G. 1991. Prognostic factors and survival of horses with ocular/adnexal squamous cell carcinoma: 147 cases (1978-1988). J Am Vet Med Assoc., 198(2):298–303.

Duncanson GR, Tomlinson CJ, Kent AF. 2008. Recurrent oesophageal obstruction caused by gastro- oesophageal squamous carcinoma : A diagnostic challenge for the clinician ? Equine Veterinary Education, 633–634.

Ferrer GR, Lyon D, Etoile M, Etoile M. 2021. Case Report Gastric squamous cell carcinoma in the horse : Seven cases (2009 – 2019). Equine vet. Educ., 33(10):357–364.

Finlay M, Yuan ZQ, Burden F, Trawford A, Morgan IM, Saveria Campo M, Nasir L. 2009. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. Virus Research, 144(1–2):315–317.

Fischer NM, Favrot C, Birkmann K, Jackson M, Schwarzwald CC, Müller M, Tobler K, Geisseler M, Lange CE. 2014. Serum antibodies and DNA indicate a high prevalence of equine papillomavirus 2 (EcPV2) among horses in Switzerland. Veterinary Dermatology, 25(3).

Gheit T. 2019. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. Front Oncol., 9:355.

Ghim SJ, Rector A, Delius H, Sundberg JP, Jenson AB, van Ranst M. 2004. Equine papillomavirus type 1: Complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV-1 L1 major capsid protein. Biochemical and Biophysical Research Communications, 324(3):1108–1115.

Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M. 2001. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. Journal of Virology, 75(3):1565–1570.

Gissmann L, zur Hausen H, Pfister H. 1977. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. Virology, 76:569–580.

Goodrich L, Gerber H, Marti E, Antczak DF. 1998. Equine sarcoids. The Veterinary clinics of North America. Equine practice, 14(3):607–623.

Grier RL, Brewer WGJ, Paul SR, Theilen GH. 1980. Treatment of bovine and equine ocular squamous cell carcinoma by radiofrequency hyperthermia. Journal of the American Veterinary Medical Association, 177(1):55–61.

Haedicke J, Iftner T. 2013. Human papillomaviruses and cancer. Radiotherapy and Oncology, 108(3):397–402.

Hartl B, Hainisch EK, Shafti-keramat S, Kirnbauer R. 2016. Inoculation of young horses with bovine papillomavirus type 1 virions leads to early infection of PBMCs prior to pseudo-sarcoid formation. J Gen Virol., 92(10):2437–2445.

zur Hausen H. 1996. Papillomavirus infections - a major cause o f human cancers. Biochimica et Biophysica Acta, 1288:55–78.

Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, Mcduffi K, Shvetsov YB, Kamemoto LE, Killeen J, Ning L, Goodman MT. 2008. Transmission of Human Papillomavirus in Heterosexual Couples CME ACTIVITY.

Hibi H, Hatama S, Obata A, Shibahara T. 2019. Laryngeal squamous cell carcinoma and papilloma associated with Equus caballus papillomavirus 2 in a horse. J. Vet. Med. Sci., 81(7):1029–1033.

Hill FW, Moulton JE, Schiff PH. 1989. Exophthalmos in a horse resulting from an adenocarcinoma of the frontal sinus. Journal of the South African Veterinary Association, 60(2):104–105.

Hoffman KD, Kainer RA, Shideler RK. 1983. Radiofrequency current-induced hyperthermia for the treatment of equine sarcoid. Equine-Practice, 5:24–28.

Howarth S, Lucke VM, Pearson H. 1991. Squamous cell carcinoma of the equine external genitalia: a review and assessment of penile amputation and urethrostomy as a surgical treatment. Equine Veterinary Journal, 23(1):53–58.

Kainzbauer C, Rushton J, Tober R, Scase T, Nell B, Sykora S, Brandt S. 2012. Bovine papillomavirus type 1 and Equus caballus papillomavirus 2 in equine squamous cell carcinoma of the head and neck in a Connemara mare. Equine Veterinary Journal, 44(1):112–115.

Kemp-Symonds JG. 2000. The detection and sequencing of bovine papillomavirus type 1 and 2 DNA from Musca autumnalis (Diptera: Muscidae) face flies infesting sarcoid-affected horses. Virus Research, 144(1):315–317.

King TC, Priehs DR, Gum GG, Miller TR. 1991. Therapeutic management of ocular squamous cell carcinoma in the horse: 43 cases (1979–1989). Equine Veterinary Journal, 23(6):449–452.

Knight CG, Dunowska M, Munday JS, Peters-Kennedy J, Rosa B v. 2013. Comparison of the levels of Equus caballus papillomavirus type 2 (EcPV-2) DNA in equine squamous cell carcinomas and non-cancerous tissues using quantitative PCR. Veterinary Microbiology, 166(1–2):257–262.

Knottenbelt DC. 2005. A suggested clinical classification for the equine sarcoid. Clinical Techniques in Equine Practice, 4(4):278–295.

Knottenbelt DC. 2019. The Equine Sarcoid: Why Are There so Many Treatment Options? Veterinary Clinics of North America - Equine Practice, 35(2):243–262.

Knottenbelt DC, Patterson-Kane JC, Snalune KL. 2015. Equine Clinical Oncology. Elsevier Ltd.

Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. 2018. A review of HPV-related head and neck cancer. Journal of Clinical Medicine, 7(9):1–11.

Koutsky PL. 1997. Epidemiology of Genital Human Papillomavirus Infection. The American Journal of Medicine, 102(5):3–8.

Lange CE, Tobler K, Lehner A, Grest P, Welle MM. 2012. EcPV2 DNA in Equine Papillomas and In Situ and Invasive Squamous Cell Carcinomas Supports Papillomavirus Etiology. Veterinary Pathology, 50(4):686–692.

Lange CE, Vetsch E, Ackermann M, Favrot C, Tobler K. 2013. Four novel papillomavirus sequences support a broad diversity among equine papillomaviruses. Journal of General Virology, 94(6):1365–1372.

Li CX, Chang WS, Mitsakos K, Rodger J, Holmes EC, Hudson BJ. 2019. Identification of a novel equine papillomavirus in semen from a thoroughbred stallion with a penile lesion. Viruses, 11(8):1–7.

Linder KE, Bizikova P, Luff J, Zhou D, Yuan H, Breuhaus B, Nelson E, Mackay R. 2018. Generalized papillomatosis in three horses associated with a novel equine papillomavirus (EcPV8). Veterinary Dermatology, 29(1):30–72.

Lunardi M, de Alcântara BK, Otonel RAA, Rodrigues WB, Alfieri AF, Alfieri AA. 2013. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. Journal of Clinical Microbiology, 51(7):2167–2171.

Mair TS, Walmsley JP, Phillips TJ. 2000. Surgical treatment of 45 horses affected by squamous cell carcinoma of the penis and prepuce. Equine Veterinary Journal, 32(5):406–410.

Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. 2010. HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. The Lancet Oncology, 11(8):781–789.

McBride AA. 2017. Oncogenic human papillomaviruses. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 372(1732).

Mosunic CB, Moore PA, Carmicheal KP, Chandler MJ, Vidyashankar A, Zhao Y, Roberts RE, Dietrich UM. 2004. Effects of treatment with and without adjuvant radiation therapy on

recurrence of ocular and adnexal squamous cell carcinoma in horses: 157 cases (1985–2002). Journal of the American Veterinary Medical Association, 225(11):1733–1738.

Munday JS, Thomson NA, Luff JA. 2017. Papillomaviruses in dogs and cats. Veterinary Journal, 225:23–31.

Nasir L, Campo MS. 2008. Bovine papillomaviruses: Their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. Veterinary Dermatology, 19(5):243–254.

de Oliveira da Silva TR, Campos Gonçalves PN, Berté Marcus V, Isabela C, Igor M, Glaucia S, David K. 2022. Detection of Equus caballus papillomavirus - 2 in equine penile / preputial papillomas and squamous cell carcinomas in southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology.

Pao CC, Lin SS, Lin CY, Maa JS, Lai CH, Hsieh TT. 1991. Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. Am. J. Clin. Pathol., 95:540–546.

Pascoe RR, Summers PM. 1981. Clinical survey of tumours and tumour-like lesions in horses in south east Queensland. Equine Veterinary Journal, 13(4):235–239.

Peters-Kennedy J, Lange CE, Rine SL, Hackett RP. 2019. Equus caballus papillomavirus 8 (EcPV8) associated with multiple viral plaques, viral papillomas, and squamous cell carcinoma in a horse. Equine Veterinary Journal, 51(4):470–474.

Pieber MK. 2012. Possible involvement of Herpesvirus and Treponema in Peridontal Disease of the anterior dentiton in Horses.

Plummer CE, Smith S, Andrew SE, Lassaline ME, Gelatt KN, Brooks DE, Kallberg ME, Ollivier FJ. 2007. Combined keratectomy, strontium-90 irradiation and permanent bulbar conjunctival grafts for corneolimbal squamous cell carcinomas in horses (1990-2002): 38 Horses. Veterinary Ophthalmology, 10(1):37–42.

Porcellato I, Modesto P, Cappelli K, Varello K, Peletto S, Brachelente C, Martini I, Mechelli L, Ferrari A, Ghelardi A, et al. 2020. Equus caballus papillomavirus type 2 (EcPV2) in co-occurring vulvar and gastric lesions of a pony. Research in Veterinary Science, 132(May):167–171.

Pressanti C, Cadiergues MC. 2013. Imiquimod: Mode of action and implication in treatment of cutaneous viral infections in humans and animals. Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie, 48(4):105–112.

Ramsauer AS. 2019. Transcriptional and histological analysis of Equine Papillomavirus Type 2 associated lesions in vivo and in vitro. Zurich: Vetsuisse Faculty University of Zurich.

Ramsauer AS, Kubacki J, Favrot C, Ackermann M, Fraefel C, Tobler K. 2019a. RNA-seq analysis in equine papillomavirus type 2-positive carcinomas identifies affected pathways and potential cancer markers as well as viral gene expression and splicing events. Journal of General Virology, 100(6):985–998.

Ramsauer AS, Wachoski-dark GL, Fraefel C, Tobler K, Brandt S, Knight CG, Favrot C, Grest P. 2019b. Paving the way for more precise diagnosis of EcPV2-associated equine penile lesions. BMC Veterinary Research, 15.

Rigoni-Stern D. 1842. Fatti statistici relative alle mallatie cancrosi che servirono de base alla poche cose dette dal dott. Giornale s(2):507–517.

Roberto H, Brandt C, Fernandes JD, Celli R, Patriota R, Criado PR, Junior WB. 2013. Treatment of human papillomavirus in childhood with imiquimod 5% cream Tratamento do papiloma vírus humano na infância com creme de imiquimode a 5%. Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie, 48:105–112.

Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. 2008. Transplacental transmission of human papillomavirus. Virology Journal, 5.

Rosenfeld WD, Vermund SH, Wentz SJ. 1989. High Prevalence Rate of Human Papillomavirus Infection and Association With Abnormal Papanicolaou Smears in Sexually Active Adolescents. Am J Dis Child., 143:1443–1447.

Ryndock EJ, Meyers C. 2014. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? Expert Review of Anti-Infective Therapy, 12(10):1165–1170.

Scase T, Brandt S, Kainzbauer C, Sykora S, Bijmholt S, Hughes K, Sharpe S, Foote A. 2010. Equus caballus papillomavirus-2 (EcPV-2): An infectious cause for equine genital cancer ? Equine Veterinary Journal, 42(8):738–745.

Schellenbacher C, Shafti-Keramat S, Huber B, Fink D, Brandt S, Kirnbauer R. 2015. Establishment of an in vitro equine papillomavirus type 2 (EcPV2) neutralization assay and a VLP-based vaccine for protection of equids against EcPV2-associated genital tumors. Virology, 486:284–290.

Schwink K. 1987. Factors influencing morbidity and outcome of equine ocular squamous cell carcinoma. Equine Veterinary Journal, 19(3):198–200.

Scott DW, Miller WH. 2011. Equine Dermatology. second 2. Maryland Heights, Missouri: Elsevier.

Sousa NR, Adorno VB, Marcondes JS, Oliveira Filho JP, Conceição LG, Amorim RL, Borges AS. 2008. Características clínicas e histopatológicas da placa aural em eqüinos das raças Mangalarga e Quarto de Milha. Pesquisa Veterinária Brasileira, 28(6):279–284.

Stocco Dos Santos RC, Lindsey CJ, Ferraz OP, Pinto JR, Mirandola RS, Benesi FJ, Birgel EH, Bragança Pereira CA, Beçak W. 1998. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: An experimental model. Journal of General Virology, 79(9):2127–2135.

Strafuss AC. 1976. Squamous cell carcinoma in horses. J AM Vet Med Assoc, 168(62):2.

Sundberg JP, Burnstein T, Page EH, Kirkham WW, Robinson FR. 1977. Neoplasms of Equidae. Journal of the American Veterinary Medical Association, 170(2):150—152.

Sykora S, Brandt S. 2017. Papillomavirus infection and squamous cell carcinoma in horses. Revue europeenne de psychologie appliquee, 223:48–54.

Sykora S, Samek L, Schönthaler K, Palm F, Borzacchiello G, Aurich C, Brandt S. 2012. EcPV-2 is transcriptionally active in equine SCC but only rarely detectable in swabs and semen from healthy horses. Veterinary Microbiology, 158(1–2):194–198.

Sykora S, Jindra C, Hofer M, Steinborn R, Brandt S. 2017. Equine papillomavirus type 2 : An equine equivalent to human papillomavirus 16 ? The Veterinary Journal, 225:3–8.

Tamzali Y, Borde L, Rols MP, Golzio M, Lyazrhi F, Teissie J. 2012. Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: A retrospective study of 48 cases. Equine Veterinary Journal, 44(2):214–220.

Taylor S, Haldorson G. 2013. A review of equine mucocutaneous squamous cell carcinoma. Equine Veterinary Education, 25(7):374–378.

Taylor SD, Haldorson GJ, Vaughan B, Pusterla N. 2009. Gastric Neoplasia in Horses. J Vet Intern Med, 23:1097–1102.

Tennant B, Keirn DR, White KK, King JM. 1982. Six cases of squamous cell carcinoma of the stomach of the horse. Equine vet. J., 14(3):238–243.

Theilen GH, Madewell BR. 1979. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. Veterinary cancer medicine. 123–191, Philadelphia: Lea & Febiger;

van den Top JGB. 2008. Penile and preputial squamous cell carcinoma in the horse: A retrospective study of treatment of 77 affected horses. Equine Veterinary Journal, 40(6):533–537.

van den Top JGB, Ensink JM, Gröne A, Klein WR, Barneveld A, van Weeren PR. 2010. Penile and preputial tumours in the horse: Literature review and proposal of a standardised approach. Equine Veterinary Journal, 42(8):746–757.

van den Top JGB, Ensink JM, Barneveld A, van Weeren PR. 2011. Penile and preputial squamous cell carcinoma in the horse and proposal of a classification system. Equine Veterinary Education, 23(12):636–648.

Torres SMF, Malone ED, White SD, Koch SN, Watson JL. 2010. The efficacy of imiquimod 5% cream (Aldara®) in the treatment of aural plaque in horses: A pilot open-label clinical trial. Veterinary Dermatology, 21(5):503–509.

Tremaine WH, Dixon PM. 2001. A long-term study of 277 cases of equine sinonasal disease. Part 2: Treatments and results of treatments. Equine Veterinary Journal, 33(3):283–289.

Tumban E. 2019. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. Viruses, 11(10).

Valentine BA. 2006. Survey of equine cutaneous neoplasia in the Pacific Northwest erinary Diagnostic Laboratory at Oregon State Uni-. Journal of Veterinary Diagnostics Investigation, 18:123–126.

Visalli G, Currò M, Facciolà A, Riso R, Mondello P, Laganà P, di Pietro A, Picerno I, Spataro P. 2016. Prevalence of human papillomavirus in saliva of women with HPV genital lesions. Infectious Agents and Cancer, 11(1):1–6.

Wallner DB. 2001. Selektive Klonierung Von Y-Chromosomalen DNA-Sequenzen Beim Pferd Mittels „ Representational Difference Analysis“.

Wester PW, Franken P, Häni HJ. 1980. Squamous cell carcinoma of the equine stomach. A report of seven cases. Tijdschrift voor diergeneeskunde, 105(8).

Zakia LS, Olivo G, Basso RM, Mira J, Herman M, Araujo JP, Borges AS, Oliveira-Filho JP. 2016. Imiquimod treatment for Equus caballus papillomavirus infection in equine aural plaques. Veterinary Dermatology, 27(3):175-e44.

Zakia LS, Herman M, Basso RM, Hernadez JM, Araujo JP, Borges AS, Oliveira-Filho JP. 2019. Equine papillomavirus detection in aural plaques by qPCR. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, 12(1):1–4.

Zhu KW, Affolter VK, Gaynor AM, dela Cruz FN, Pesavento PA. 2015. Equine Genital Squamous Cell Carcinoma: In Situ Hybridization Identifies a Distinct Subset Containing Equus caballus Papillomavirus 2. Veterinary Pathology, 52(6):1067–1072.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des Genoms Boviner Papillomviren (BPV) und der Genexpression in den verschiedenen Hautabschnitten (aus Araldi et al. 2017). A: Schematische Darstellung eines Papillomavirus-Genoms am Beispiel des BPV-Genoms. Das Genom ist ringförmig aufgebaut und unterteilt in die Early (E) – Region, die Late (L) – Region und die long control region (LCR). Die E-Region codiert für die Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7, bei denen es sich um Replikationsproteine handelt. Die Proteine L1 und L2 sind Kapselproteine. B: diese Abbildung zeigt, in welchen Abschnitten der Haut die Gene exprimiert werden und in welcher Phase zwischen Infektion und der Freisetzung neuer Viren sich die Viren gerade befinden (Araldi et al. 2017)..... 1

Abb. 2: Gelelektrophorese der PCR auf Eca 2A.3 und dem E6 Gen des EcPV2 aus den Proben 34-42. Die Banden der Leiter liegen in Abständen von jeweils 100 bp, die beiden stärkeren Banden liegen bei 500 und 1000 bp. Es ist zu sehen, dass in den Proben34-39 Eca 2A.3 nachgewiesen werden konnte, da hier Banden im Bereich von 150 bp zu sehen sind. In den restlichen Proben und der PCR auf EcPV2 sind keine Banden zu sehen, hier konnte also die gesuchte DNS in den Proben nicht nachgewiesen werden. Die Negativ-kontrolle ist bei beiden PCR Durchläufen negativ und bei der Positivkontrolle ist jeweils eine Bande zu sehen. Man kann also davon ausgehen, dass die PCR funktioniert hat. 24

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Primersequenzen 18
Tab. 2: Probendaten 20
Tab. 3: DNS-Gehalt der Speichel-Proben und PCR Ergebnisse 22
Tab. 4: DNS-Gehalt der PEK-Proben aus dem Magen und PCR Ergebnisse 27