

Aus dem Department für biologische Wissenschaften und Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Infektiologie und Virologie

Leiter: Univ.Prof. Dr.med.vet. Hans Tillmann Rümenapf

**Coronaviren bei Pferden: Können equine und bovine Coronaviren im Kot gesunder
Pferde aus Österreich nachgewiesen werden?**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Michaela Kurz

Wien, im April 2025

Betreuerin:

Dr.ⁱⁿ med.vet. Angelika Auer

Infektiologie und Virologie

Biologische Wissenschaften und Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachterin:

PD Dr.ⁱⁿ med.vet. Jutta Pikalo

Parasitologie

Biologische Wissenschaften und Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle sinngemäß und wörtlich übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, im April 2025

Michaela Kurz

Abstract

Die zu den Betacoronaviren (β -CoV) gehörenden equinen Coronaviren (ECoV) können bei Pferden vor allem Fieber, Lethargie, Anorexie und gastrointestinale Störungen wie Durchfall und Koliken hervorrufen. Häufig zeigen erkrankte Tiere eine Leukopenie, seltener neurologische Symptome wie Ataxie. Da sich bisher durchgeführte Studien auf Ausbruchsgeschehen und Ermittlung der Seroprävalenz konzentrierten, war es Ziel dieser Arbeit, Pferdekotproben gesunder Tiere molekularbiologisch auf equine und ebenfalls auf bovine Coronaviren zu untersuchen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Duplex RT-qPCR etabliert, bei der β -CoV1-spezifische Nukleinsäuren und das, als interne Kontrolle zugefügte EGFP-Gen (Enhanced Green Fluorescent Protein), gleichzeitig nachgewiesen werden können. Durch absolute Quantifizierung über eine, im Triplikat angesetzte Standardverdünnungsreihe, konnte festgestellt werden, dass dieser Duplex-Assay 10 Kopien des Virusgenoms pro PCR-Reaktion sicher nachweisen kann. Im Anschluss wurden 588 aus Österreich stammenden Pferdekotproben getestet, welche zuvor im Rahmen einer parasitologischen Studie gesammelt worden waren. Nach der Herstellung von Kotsuspensionen wurden diese in Pools zu je drei Proben extrahiert und danach die validierte β -CoV-1-EGFP-Duplex RT-qPCR durchgeführt. Da in keiner der untersuchten Kotproben β -CoV1-spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass von klinisch gesunden Pferden kaum Gefahr der Verbreitung im Bezug auf equine und bovine Coronaviren ausgeht. Aufgrund der Mutationsfreudigkeit von Coronaviren und einem damit verbundenen Zoonosepotential ist es dennoch sinnvoll, Betacoronaviren weiterhin zu beobachten.

Equine coronaviruses (ECoV), which belong to the betacoronaviruses (β -CoV), can cause fever, lethargy, anorexia and gastrointestinal disorders such as diarrhea and colic in horses. Diseased animals often show leukopenia and less frequently neurological symptoms, such as ataxia. As previous studies have focused on outbreaks and determination of seroprevalence, the aim of this thesis was to examine equine faecal samples from healthy animals for equine and bovine coronaviruses using molecular biology. As part of the present work, a duplex RT-qPCR was established in which β -CoV-1-specific nucleic acids and the EGFP gene (enhanced green fluorescent protein), added as an internal control, can be detected simultaneously. Absolute quantification using a standard dilution series prepared in triplicates showed, that this duplex assay can reliably detect 10 copies of the virus genome per PCR reaction. Subsequently, 588 horse faeces samples from Austria were tested, which had previously been

collected as part of a parasitological study. After the preparation of faecal supernatants, these were extracted in pools of three samples each and then the validated β -CoV1-EGFP duplex RT-qPCR was performed. As no β -CoV1-specific nucleic acids were detected in any of the faecal samples examined, it can be assumed that clinically healthy horses pose little risk of spreading the virus with regard to equine and bovine coronaviruses. However, due to the tendency of coronaviruses to mutate and the associated zoonotic potential, it is crucial to continue monitoring betacoronaviruses closely.

Inhalt

1.	Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1	Einleitung und Ziel dieser Arbeit	1
1.2	Die Familie der Coronaviridae	1
1.3	Mutationen und Seroprävalenz.....	2
1.4	Epidemiologie.....	3
1.4.1	ECoV in Asien.....	3
1.4.2	ECoV in Amerika.....	4
1.4.3	ECoV in Europa	5
2.	Material und Methode	6
2.1	Verwendetes Probenmaterial.....	6
2.2	Methoden	9
2.2.1	Herstellung und Berechnung des ECoV-Standards zur absoluten Quantifizierung ..	9
2.2.2	Herstellung einer Verdünnungsreihe des ECoV- Standards	9
2.2.3	Herstellung der Mastermixe für die Monoplex-RT-qPCR.....	10
2.2.4	Herstellung der Mastermixe für die Duplex-RT-qPCR	11
2.2.5	RT-qPCR der Verdünnungsreihe.....	12
2.2.6	Probenaufbereitung	12
2.2.7	Nukleinsäureextraktion.....	13
2.2.8	PCR der Proben.....	13
3.	Ergebnisse.....	14
3.1	Sensitivitätsbestimmung.....	14
3.2	Auswirkungen von EGFP auf die Nachweisbarkeit von β -CoV	17
3.3	Untersuchung der Pferdekotproben.....	18
4.	Diskussion	19
5.	Literaturverzeichnis.....	22
6.	Abbildungs- & Tabellenverzeichnis.....	25
6.1	Abbildungsverzeichnis	25
6.2	Tabellenverzeichnis	25

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung und Ziel dieser Arbeit

Das Equine Coronavirus (ECoV) ist als Auslöser von Störungen des Gastrointestinaltrakts, Fieber und vermindertem Allgemeinverhalten bei Pferden bekannt (1). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass ECoV sowohl im Zusammenhang mit ausbruchsartigen Krankheitswellen, als auch in Form einer Einzeltiererkrankung auftreten kann. Die auftretenden Symptome können unspezifisch, mild und selbstlimitierend sein aber auch mit lebensbedrohlichen Koliken und Enteritiden einhergehen (2–5).

Neben equinen wurden auch bovine Coronaviren (BCoV) bei Pferden nachgewiesen. Beide Viren sind taxonomisch der Gattung *Betacoronavirus* (β -CoV) zuzuordnen. Da ihnen eine gewisse Mutationsfreudigkeit zugeschrieben wird, ist es nicht nur wichtig, diese bei der Diagnosestellung in Betracht zu ziehen, sondern auch mit einem weiteren Speziesübertritt zu rechnen (1).

Auch die Frage über die Verbreitung klinisch gesunder Virusträger bleibt bisher weitgehend unbeantwortet. Die Seroprävalenz von ECoV gibt Hinweise darauf, dass das Virus durchaus weit verbreitet ist (6). Im Rahmen des HOVID-Projekts war es möglich, 588 Pferdekotproben mittels Reverser-Transkriptase quantitativer PCR (RT-qPCR) auf Betacoronaviren (β -CoV) zu screenen (siehe Kapitel 2.1). Das Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob ECoV- oder BCoV-spezifische Nukleinsäuren in Kotproben klinisch gesunder Pferde aus Österreich nachgewiesen werden können.

1.2 Die Familie der Coronaviridae

Viren der Familie der *Coronaviridae* besitzen eine einzelsträngige RNA mit positiver Polarität und einer Größe von 22 bis 36 kb (Kilobasen) (7). Sie sind behüllt, rund bis pleomorph und besitzen einen Durchmesser von 80 bis 160 nm. Ihren Namen erhielt die Virusfamilie durch die auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbaren Spikeproteine, die sich ähnlich wie ein Kranz um das Virus darstellen. Weitere membranassoziierte Proteine, neben dem Spikeprotein (S) der Virionen, sind das Hüllprotein (envelope protein (E)), das Membran-Glykoprotein (membrane (M) glycoprotein) und das, nur bei Viren des Genus β -CoV vorkommende, Hämagglutinin-Esteraseprotein (haemagglutinin-esterase (HE) glycoprotein) (23). Die Replikation von Coronaviren findet im Zytoplasma statt (7).

Da Fledermäuse wahrscheinlich den Genpool für Alpha- und Betacoronaviren und Vögel den für Gamma- und Deltacoronaviren darstellen, gehen Forscher davon aus, dass Vorgänger der

Coronaviren diese Tierarten als erstes infizierten. Von dort aus ging das Virus auf die jeweils andere Spezies und später auf andere Tierarten über und entwickelte sich in verschiedene Richtungen weiter (8,9).

Coronaviren sind aufgrund ihrer großen Mutations- und Anpassungsfähigkeit wichtige Zoonoseerreger. Die Subfamilie *Orthocoronavirinae* wird in folgende vier Genera unterteilt: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* und *Deltacoronavirus* (9). Für unsere Haussäugetiere bedeutende Vertreter der Alphacoronaviren sind das feline Coronavirus (FCoV Erreger der feline infektiösen Peritonitis), das canine enterale Coronavirus (CECoV), das transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) bzw. das, aus diesem hervorgegangene, porcine respiratorische Coronavirus (PRCoV) des Schweines. Wichtige Betacoronaviren (β -CoV) sind das canine respiratorische Coronavirus (CRCoV), das equine Coronavirus (ECoV) und das bovine Coronavirus (BCoV). Alle drei der genannten Viren, wie auch die humanen Coronaviren OC43 und HKU1, bei denen es sich um Erreger von Erkältungskrankheiten des Menschen handelt, gehören dem Subgenus *Embecovirus* an (10). Ebenfalls zu den β -CoV aber zu anderen Untergattungen zählen die Zoonoseerreger severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) und Middle Eastern respiratory syndrome-related coronavirus (MERS-CoV). Zu den Gammacoronaviren zählt das für Vögel gefährliche infektiöse Bronchitis Virus (IBV) (8).

Das erste vollständig sequenzierte ECoV-Genom wies, ohne den PolyA-Schwanz, eine Länge von 30 992 Nukleotiden auf (11).

1.3 Mutationen und Seroprävalenz

Bovine Coronaviren haben schon zuvor bewiesen, dass sie auf andere Spezies übergehen können. Die Russische Grippe-Pandemie im späten 19. Jahrhundert, soll laut einiger Forschungserkenntnisse nicht wie zuvor angenommen durch Influenzaviren, sondern durch das humane Coronavirus OC43 (HCoV-OC43) ausgelöst worden sein, welches sich durch Mutation aus BCoV entwickelt hat. Die Infektion äußerte sich durch respiratorische und zentralnervöse Symptome, Unwohlsein und Fieber und forderte in den Jahren 1889 und 1890 etwa eine Million Todesopfer (12,13). Ein weiterer Erreger, der sich aus BCoV entwickelte, ist das canine respiratorische Coronavirus (CRCoV) (14,15). Außerdem wurden BCoV-spezifische Nukleinsäuren bereits in Wildwiederkäuern, Kameliden und Tapiren nachgewiesen (16–18).

Um die Seroprävalenz von ECoV einschätzen zu können, wurden zwischen 2019 und 2023 in den USA 385 Seren von gesunden Pferden untersucht, die aus verschiedenen europäischen Ländern importiert wurden. Insgesamt wurden neun Proben aus den Ländern Deutschland, Irland, Belgien, Italien und der Niederlande positiv befundet, was eine Seroprävalenz von 2,3 % aufzeigt (19). Die Seroprävalenz für SARS-CoV-2 lag bei derselben Testgruppe bei 1 % (6). Pferde weisen, im Vergleich zu Menschen, zwar nur eine niedrige, Rinder sogar eine mittlere Empfänglichkeit zu SARS-CoV-2 auf, dennoch bergen der enge Kontakt zu Menschen und die hohen Besatzdichten ein gewisses Risiko für Virusübertragungen, Mutationen und Rekombinationen mit anderen Coronaviren (20).

Aufgrund des möglichen zoonotischen Potenzials mancher Betacoronaviren sollte im Rahmen dieser Diplomarbeit die Zirkulation und Ausscheidung equiner und boviner Coronaviren in 588 Kotproben von klinisch unauffälligen Pferden untersucht werden. Dieses ist mit einer RT-qPCR zum Nachweis von Viren der Spezies *Betacoronavirus 1* (β -CoV-1) möglich. (21,22). Zusätzlich soll die β -CoV-1-RT-qPCR als Duplex-PCR mit interner EGFP-Kontrolle (enhanced green fluorescent protein) validiert werden.

1.4 Epidemiologie

Equine Coronaviren wurden erstmals im Jahr 2000 beschrieben, nachdem ein zwei Wochen altes Araberfohlen mit profusem, wässrigem Durchfall und Fieber an der Universität für Veterinärmedizin in North Carolina vorgestellt wurde. Aus dem Kot des Fohlens konnte der NC99-Stamm isoliert werden. Das isolierte Virus wies unter dem Elektronenmikroskop eine für Coronaviren typische Form auf. Durch die Größe, Morphologie und Herkunft der Virionen wurde das Virus als ECoV identifiziert (23) und von Zhang et al. vollständig sequenziert und charakterisiert (11).

1.4.1 ECoV in Asien

Im Jahr 2009 wurde ECoV erstmals auch in adulten Pferden nachgewiesen. Im Zeitraum von Mitte Juni bis Ende August 2009 kam es in Tokachi (Japan) zu einem ausbruchsartigen Auftreten der Erkrankung bei zwei- bis vierjährigen Pferden. Zu Beginn äußerte sich die Erkrankung durch eine erhöhte innere Körpertemperatur und gastrointestinale Störungen wie Durchfall. Zwei bis vier Tage nach dem Auftreten der ersten Symptome erholten sich die meisten Pferde. Von insgesamt 600 Pferden des Bestands erkrankten rund 132 Tiere (22 %). Für den Erregernachweis wurde der Nasenausfluss und Kotproben von klinisch kranken Pferden mit Durchfall untersucht. In keinem der beprobten Nasensekrete konnte das gesuchte

Pathogen gefunden werden, aus jeder der Kotproben konnte jedoch ECoV isoliert werden. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass dieser Erreger große Ähnlichkeit zum im Jahr 2000 in den USA beschriebenen Stamm aufwies. Im Jahr 2004 kam es im selben Stall bereits zu einem Krankheitsausbruch, bei dem kein Pathogen festgestellt werden konnte (24). Um die Verbreitung des Virus in gesunden Pferdebeständen einschätzen zu können, wurden im Jahr 2012 in Japan 120 Kotproben von klinisch gesunden Fohlen auf das Vorhandensein ECoV-spezifischer Nukleinsäuren untersucht. Das Pathogen konnte in drei der 120 Proben (2,5 %) nachgewiesen werden (4).

In einem anderen Stall in Japan, in der Stadt Obihiro, kam es zu insgesamt drei Ausbrüchen durch ECoV. Der erste Ausbruch, bei dem 191 Pferde erkrankten, erstreckte sich über die Monate Dezember 2004 bis März 2005. Der zweite Ausbruch, mit 132 betroffenen Tieren, von Juni bis August im Jahr 2009. Im Zeitraum von Februar bis April 2012 erkrankten 204 von 650 Pferden. Diese Ausbruchsreihe zeigt, dass das Virus saisonal unabhängig auftreten kann und hier eine Morbidität von 20–30 % aufweist. Zu den Symptomen der im Jahr 2012 erkrankten Tiere, im Alter von zwei bis elf Jahren, zählten Anorexie, eine erhöhte innere Körpertemperatur mit bis zu 41,5 °C, Leukopenie, Stomatitis, Durchfall und Kolik. Pferde mit milden Symptomen, die mit einer Flüssigkeitstherapie gegen Dehydrierung und einer Behandlung mit Antibiotika zur Prävention von Sekundärinfektionen behandelt wurden, erholten sich bereits innerhalb weniger Tage. Jene mit starken Symptomen, wie wässrigem Durchfall, konnten sich erst nach fünf bis zehn Tagen erholen. Für zwei Pferde verlief die Infektion tödlich (25).

1.4.2 ECoV in Amerika

In Amerika kam es zwischen November 2011 und April 2012 zu ECoV-assoziierten Ausbrüchen in den Bundesstaaten Kalifornien, Texas, Massachusetts und Wisconsin. Die Pferde zeigten Anorexie, Lethargie, Durchfall, Kolik und Fieber. Vier von insgesamt 161 Pferden wurden euthanasiert oder starben am raschen Krankheitsverlauf. Zusätzlich wurden zwei Pferde nach dem akuten Auftreten von neurologischen Symptomen mit vermindertem Allgemeinverhalten und Ataxie euthanasiert, wobei keine genaue Ursache festgestellt werden konnte, aber eine Hyperammonämie als Grund vermutet wurde. ECoV konnte sowohl bei 86 % der klinisch kranken Tiere als auch bei 7 % der gesunden Pferde nachgewiesen werden (26).

Bei einem Ausbruch im amerikanischen Bundesstaat Kalifornien im Jahr 2013 wurden acht von 19 Pferden positiv auf das Virus getestet, zwei der Tiere verstarben. Nach dem Tod wurde im Dünndarm beider Pferde ECoV gefunden. Eines der Tiere zeigte eine schwere diffus-nekrotisierende Enteritis, das andere eine Hyperammonämie und eine Alzheimer-Typ-II-

Astrozytose in der Großhirnrinde. Zur gleichen Zeit wurden im Bundesstaat Idaho sieben von acht Tieren positiv auf das Virus getestet. Für zwei der vier kranken Equiden verlief die Infektion tödlich. Ein Esel verendete nach dem raschen Auftreten neurologischer Symptome und ein Miniaturpferd wurde aufgrund von einem akuten Rückgang der Erythrozyten sowie Ulzerationen an der Maulschleimhaut und der Zunge euthanasiert. Die verendeten Tiere dieser beiden Ausbrüche wiesen eine höhere Viruslast auf als die Überlebenden. Unter den insgesamt 15 positiv getesteten Tieren dieser beiden Ausbrüche befanden sich fünf asymptomatische Tiere, die das Virus ausschieden und verbreiteten (3).

1.4.3 ECoV in Europa

In Europa wurde ECoV erstmals in den Wintermonaten 2011/2012 entdeckt. 395 Kotproben und 200 Atemwegsproben von Pferden mit milden gastrointestinalen oder respiratorischen Erkrankungen wurden aus verschiedenen Regionen in Frankreich gesammelt und untersucht. Elf der 395 Kotproben wurden positiv auf das Virus getestet. Erstmals konnte auch in einer Probe aus dem Atmungstrakt das Virus nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um eine Probe eines an einer Atemwegserkrankung leidenden neun Monate alten Fohlens (27).

In Österreich wurde das Virus erstmals im Jahr 2013 nachgewiesen. Zu acht ECoV-assoziierten Ausbrüchen kam es im Zeitraum von 2018 bis 2020 im Burgenland und in Niederösterreich. In den betroffenen Ställen zeigten 54 von 298 Pferden (18 %) Krankheitssymptome wie Fieber Durchfall und Kolik. Bei neun Tieren war für die Behandlung ein Klinikaufenthalt notwendig, zwei Tiere verstarben aufgrund einer Kolik. Insgesamt wurden 219 Kotproben auf ECoV-spezifische Nukleinsäuren untersucht. Das Virus konnte bei 41 % der Kotproben, also auch bei klinisch gesund gebliebenen Tieren, nachgewiesen werden. Die Kotproben der Kontrollgruppe aus anderen, klinisch nicht betroffenen Ställen wurden alle negativ getestet (28).

In einer Studie von Stummer et al. wurden 141 Kotproben von Pferden aus Österreich auf Viren der Spezies *Betacoronavirus 1* (β -CoV-1) untersucht. Von diesen Proben stammen 105 von Tieren mit akuter Koliksymptomatik und 36 der Proben von Tieren, die keine ECoV-assoziierten Symptome zeigten. In sechs Kotproben der klinisch kranken Pferde (5,7 %) wurde das gesuchte Pathogen nachgewiesen. Auch in einer Kotprobe der Kontrollgruppe (2,8 %) wurde β -CoV-1-RNA gefunden, was das Vorhandensein asymptomatischer Ausscheidertiere erneut beweist. In drei der sechs positiven Proben wurde nicht ECoV, sondern BCoV nachgewiesen, was dafür spricht Pferde nicht ausschließlich auf ECoV zu testen, sondern PCRs für β -CoV-1-spezifische Nukleinsäuren einzusetzen (1).

2. Material und Methode

2.1 Verwendetes Probenmaterial

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pferdekotproben wurden zum Zweck parasitologischer Untersuchungen für das HOVID-Projekt von verschiedenen Tierärzten in Österreich zwischen Mai 2023 und August 2024 gesammelt und wurden im Zuge dessen auch für die Untersuchung auf Coronaviren verwendet. Die Pferdekotproben stammen aus allen Bundesländern Österreichs mit der Ausnahme des Bundeslands Wien. Aus *Abbildung 1* geht hervor, dass der größte Teil, mehr als 40 %, der Proben aus Niederösterreich stammt. Rund 21 % der untersuchten Kotproben kommen aus Kärnten und knappe 10 % aus Oberösterreich. Weniger als 10 % entfallen jeweils auf die Bundesländer Burgenland, Steiermark und Tirol. Knappe 4 % der Proben stammen aus Salzburg und der kleinste Teil, knappe 2 %, hat seinen Ursprung in Vorarlberg.

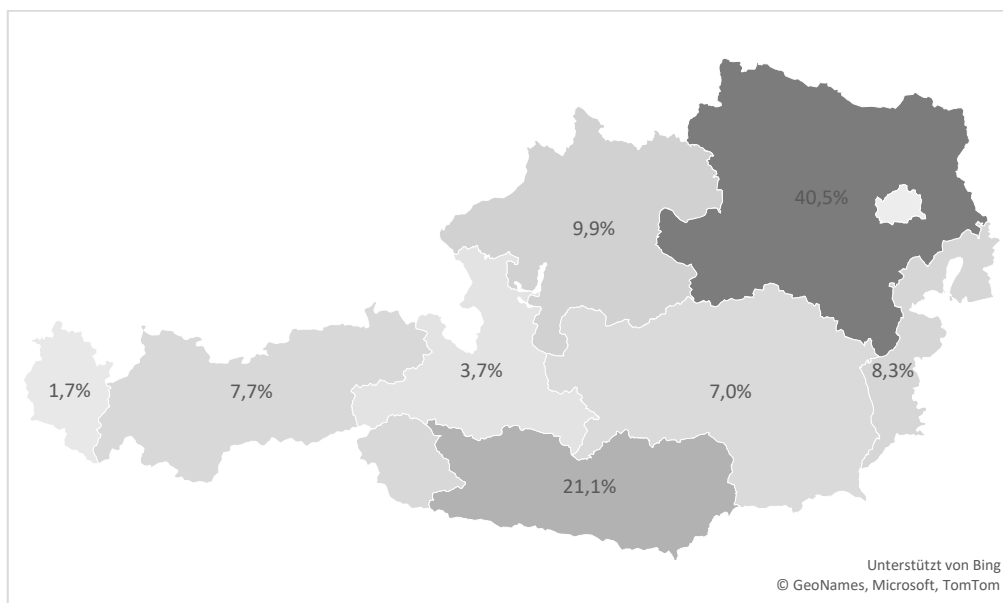


Abbildung 1: prozentueller Anteil der Pferdekotproben aus den Bundesländern Österreichs

Für eine aufschlussreiche statistische Auswertung aller Ergebnisse wurden im Rahmen des HOVID-Projekts vorab umfangreiche Fragebögen von Mitarbeitern der Parasitologie erstellt und an die Besitzer ausgegeben. Im Zuge dieser Befragung wurden Daten über den genauen Aufenthaltsort, das Geburtsdatum, die Herkunft sowie Rasse und Geschlecht des Pferdes gesammelt. Zusätzlich wurde erhoben ob bzw. wie oft das Tier im In- oder Ausland transportiert wird, ob und wohin ausgeritten wird und für welchen Zweck es genutzt wird. Weiters wurden die Haltungs- und Auslauform, die Fütterungsart, die Anzahl der Koppelpartner, der Impf- und Entwurmungsstatus sowie vorangegangene Erkrankungen und Verletzungen festgehalten. Das Datum der Probenentnahme sowie das Eingangsdatum der Kotproben auf der Universität wurde dokumentiert. Zusätzlich zum Fragebogen wurde bei jedem Pferd eine allgemeine klinische Untersuchung durch einen Tierarzt durchgeführt. Beurteilt wurden die Körperhaltung und das Allgemeinverhalten, der Ernährungszustand, das Haarkleid und die Hautoberfläche. Die Vitalparameter Puls, Atemfrequenz und innere Körpertemperatur wurden gemessen und die Qualität der Atmung beurteilt. Weiters wurden die Farbe der Lid-, Nasen- und Maulschleimhaut festgehalten und auf das Vorhandensein von Nasenausfluss geachtet. Ebenfalls überprüft wurden die Jugularvenen, die Mandibularlymphknoten und ob Husten vorhanden ist. Die Lunge, das Herz und die Peristaltik wurden im Rahmen der klinischen Untersuchung auskultiert. Außerdem wurden, falls vorhanden, Auffälligkeiten im Gangbild festgehalten.

Wie aus *Abbildung 2* hervorgeht, handelt es sich bei den untersuchten Kotproben bei 42 % um Proben von Stuten, bei 46 % um Proben von Wallachen und knappe 7 % stammen von Hengsten. Bei rund 5 % der Proben wurde kein Geschlecht angegeben.

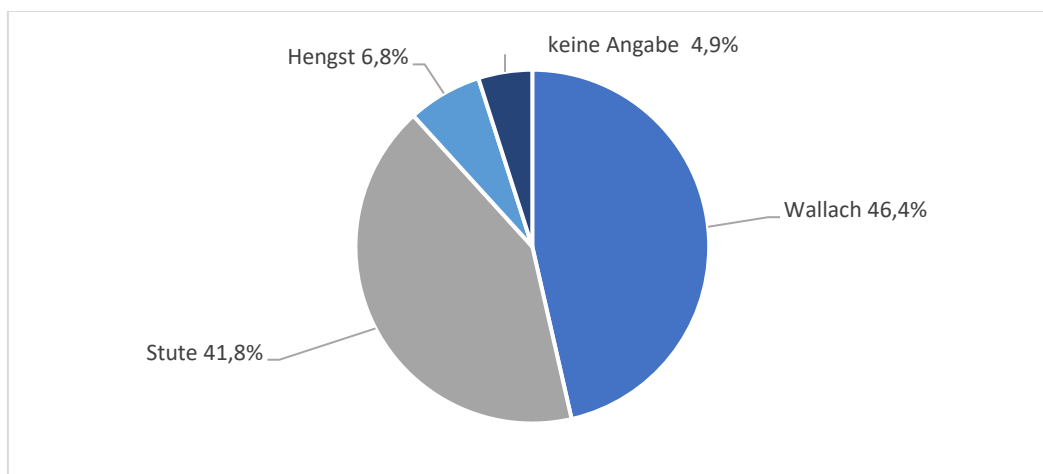


Abbildung 2: Verteilung der Geschlechter innerhalb der beprobten Pferdepopulation

Eine Übersicht der Altersklassen innerhalb der beprobten Gruppe ist in *Abbildung 3* ersichtlich. Rund 18 % der getesteten Kotproben stammen von Jungtieren bis fünf Jahre, 15 % der Proben stammen von Tieren mit einem Alter von mindestens 21 Jahren und rund 58 % der Proben von Pferden zwischen sechs und 20 Jahren.

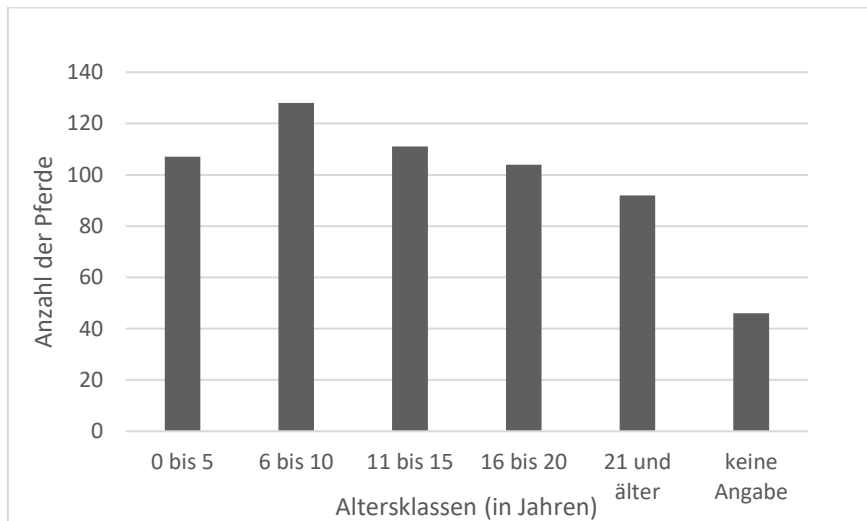


Abbildung 3: Einteilung der beprobten Pferde in Altersklassen

2.2 Methoden

Bisher wurden an der Virologie der Vetmeduni Wien equine und bovine Coronaviren mittels einer RT-qPCR nachgewiesen, welche einen Genabschnitt von Viren der Spezies *Betacoronavirus 1* detektiert (21). Um inhibitorische Substanzen ausschließen zu können, die in Kotproben auftreten und Ursache falsch-negativer Ergebnisse sein können, wurde zusätzlich eine Pan-Bakterien-RT-qPCR durchgeführt (16s-rRNA) (29). Die Kombination dieser beiden Assays zu einer Duplex-RT-qPCR ist leider in früheren Versuchen nicht gelungen, weshalb im Rahmen dieser Diplomarbeit eine neue Methode etabliert und validiert werden sollte, um den spezifischen mit einem internen Kontroll-Nachweis in einer Reaktion zu kombinieren. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Verdünnungsreihe, ausgehend von einem bekannten ECoV-Standard, hergestellt und diese vergleichend in einer Monoplex RT-qPCR und einer Duplex RT-qPCR getestet. In der Duplex RT-qPCR ist zusätzlich die DNA des sogenannten enhanced green fluorescent proteins (EGFP) enthalten. Diese, ursprünglich aus einer Qualle stammende DNA, welche für ein grünes, fluoreszierendes Protein kodiert, interferiert nicht mit den Primer- und Probe-Sequenzen der verwendeten Assays und wird bei den folgenden RT-qPCRs in derselben Reaktion mitamplifiziert.

2.2.1 Herstellung und Berechnung des ECoV-Standards zur absoluten Quantifizierung

In Zusammenhang mit dieser Arbeit wurde von einer Mitarbeiterin der Virologie ein neuer ECoV-Standard kloniert. Dabei handelt es sich um ein 455 bp langes, die Bindungsstellen der RT-qPCR-Primer beinhaltendes PCR-Produkt, dass in einen T-Vektor kloniert wurde. Da es mit Hilfe dieses Plasmides mehrfach nicht gelang, eine Verdünnungsreihe mit homogenen Kurvenabständen in der qPCR zu erzeugen, wurde das 455 pb lange Vektor-Insert mittels PCR amplifiziert und mit dieser aufgereinigten doppelsträngigen DNA als Standard weitergearbeitet. Zur Berechnung der Menge der Genomäquivalente des ECoV-Standards wurde der copy number calculator for realtime PCR (30) herangezogen. Aus der Menge von 84 ng DNA pro μl und einer Länge von 455 Basenpaaren ergibt sich eine Anzahl von $1,7 \times 10^{11}$ GE/ μl .

2.2.2 Herstellung einer Verdünnungsreihe des ECoV- Standards

Um die Funktionalität und Sensitivität der PCR sicherzustellen wurde vorab eine Verdünnungsreihe aus dem ECoV-Standard hergestellt und getestet. Zur Herstellung von 20 μl einer Lösung die 1×10^{11} GE/ μl enthält, wurden 11,76 μl des neuen ECoV-Standards und 8,24 μl Nuklease-freies Wasser vermischt. Durch weitere Verdünnungsschritte wurde eine

10-fach-Verdünnungsreihe erstellt, die 10^{10} bis 10^{-1} Kopien/ μl enthält. Um die Löslichkeit der DNA in Wasser zu verbessern, wurde zur Verdünnung eine 0,01%ige carrier-RNA-Lösung verwendet.

2.2.3 Herstellung der Mastermixe für die Monoplex-RT-qPCR

Für die Herstellung der Mastermixe für die Monoplex-RT-qPCR, die zum Nachweis von β -CoV-1 spezifischer Nukleinsäuren dient, wurden die Primer Real- β -CoV-F und Real- β -CoV-R sowie die Sonde Real- β -CoV-S verwendet (21). In Tabelle 1 sind die Bezeichnungen der Primer und Sonde sowie deren Sequenzen und Richtung aufgelistet. Für die Herstellung der Mastermixe wurde das Luna® Probe One-Step RT-qPCR Kit (NEB) verwendet. Je nach gewünschter Anzahl an Mastermixen wurden die Mengenangaben der Bestandteile (Tabelle 2) multipliziert und die benötigten Komponenten nach dem Mischen in ein Gefäß pipettiert. Danach wurden jeweils 17,5 μl des fertigen Mastermix in kleinere, für die qPCR geeignete Gefäße aliquotiert und anschließend im Tiefkühlschrank bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Bezeichnung, Sequenz und Richtung der verwendeten Primer und Sonde für die Mastermixe der Monoplex-RT-qPCR.

Primer/Sonde	Sequenz (5'-3')	Richtung
Real- β -CoV-F	ACGTGGTGTTCCTGTTGTTATAGG	Forward
Real- β -CoV-R	AACATCTTTAATAAGGCGACGTAACAT	Reverse
Real- β -CoV-Sonde	FAM-CCACTAAGTTTTATGGCGGCTGGGATG-BHQ1	

Tabelle 2: Protokoll für die Herstellung eines Mastermix für den Nachweis von β -CoV-1 in der Monoplex-RT-qPCR (Luna® Probe One-Step RT-qPCR Kit (NEB))

Luna RT-Reaction Mix (2x)	10 μl
Luna RT-Enzyme Mix (20x)	1 μl
Nuklease-freies Wasser	5,9 μl
Primer-Mix (F und R je 20 μM)	0,4 μl
Sonde (20 μM)	0,2 μl
Gesamtvolumen	17,5 μl

2.2.4 Herstellung der Mastermixe für die Duplex-RT-qPCR

Für den gleichzeitigen Nachweis von β -CoV-1-spezifischen Nukleinsäuren und EGFP wurde eine Duplex-RTqPCR entwickelt, die alle Primer und Sonden, die in Tabelle 3 aufgeführt sind, enthält. Neben den Bezeichnungen der Primer und Sonden sind in Tabelle 3 auch die dazugehörigen Sequenzen und Richtungen aufgelistet. Das Protokoll für die Herstellung eines Duplex-Mastermix ist in Tabelle 4 dargestellt (21,31). Für die Herstellung der Mastermixe wurde das Luna® Probe One-Step RT-qPCR Kit (NEB) verwendet. Der EGFP-Mix wurde vorab aus jeweils 10 μ l der Primer EGFP1-F (100 μ M) und EGFP2-R (100 μ M) sowie 5 μ l der Sonde EGFP-Probe1-HEX (100 μ M) und 75 μ l Nuklease-freiem Wasser vorbereitet. Der Primer-Mix wurde aus gleich großen Anteilen der Primer Real- β -CoV-F und Real- β -CoV-R hergestellt.

Tabelle 3: Bezeichnung, Sequenz und Richtung der Primer und Sonden für den Nachweis von β -CoV und EGFP

Primer/Sonde	Sequenz (5'-3')	Richtung
Real- β -CoV-F	ACGTGGTGTTTCCTGTTGTTATAGG	Forward
Real- β -CoV-R	AACATCTTTAATAAGGGACGTAACAT	Reverse
Real- β -CoV-Sonde	FAM-CCACTAAGTTTTATGGCGGCTGGGATG-BHQ1	
EGFP1-F	GACCACTACCAGCAGAACAC	Forward
EGFP2-R	GAAGTCCAGCAGGACCATG	Reverse
EGFP-Probe1-HEX	HEX-AGCACCCAGTCCCCCTGAGCA-BHQ1	

Tabelle 4: PCR Protokoll für die Herstellung der Mastermixe für die Duplex-RT-qPCR

Luna RT-Reaction Mix (2x)	10 μ l
Luna RT-Enzyme Mix (20x)	1 μ l
Nuklease-freies Wasser	4,9 μ l
EGFP-Mix ¹	1 μ l
Primer-Mix (F und R je 20 μ M)	0,4 μ l
Sonde (20 μ M)	0,2 μ l
Gesamtvolumen	17,5 μ l

¹ EGFP-Mix bestehend aus: 10 μ l EGFP1-F (100 μ M), 10 μ l EGFP2-R (100 μ M), 5 μ l EGFP-Probe1-HEX (100 μ M) und 75 μ l Nuklease-freiem Wasser.

2.2.5 RT-qPCR der Verdünnungsreihe

Die RT-qPCR der Verdünnungsreihe mit dem bekannten ECoV-Standard erfolgte im Rotor-Gene Q (QIAGEN, Niederlande) und die Analyse der Ergebnisse mit der dazugehörigen Software (Version 2.3.4.3). In der Monoplex RT-qPCR wurden die Verdünnungen, die 10^7 bis 10^{-1} Kopien pro μl enthalten, doppelt angesetzt und im FAM-Kanal (Grün) gemessen.

Um die Sensitivitäten von Mono- und Duplex-Assay vergleichen zu können, wurde dieser ebenfalls mit den ECoV-Standards (10^6 bis 10^{-1} Kopien pro μl) getestet. Um mögliche Auswirkungen der Zugabe des EGFP zu erkennen, wurden verschiedene Kombinationen verglichen: Die Testung des ersten Ansatzes erfolgte ohne Zugabe von EGFP. Den Verdünnungen des zweiten Ansatzes wurde je 1 μl EGFP 10^{-5} und den Verdünnungen des dritten Ansatzes je 1 μl EGFP 10^{-7} zugegeben. Der ECoV-Standard wurde im FAM-Kanal (Grün), das EGFP im HEX-Kanal (Gelb) gemessen.

Zusätzlich wurde in jeder PCR mindestens eine Negativkontrolle (no template control, ntc) und eine Positivkontrolle (bekannt positive Feldprobe) mitgetestet. In Tabelle 5 ist das bei allen durchgeführten PCR-Runs verwendete Temperaturschema aufgelistet.

Tabelle 5: Temperaturschema für die RT-qPCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
55 °C	10 min	1
95 °C	1 min	1
95 °C	1 sec	45
60 °C	30 sec	

2.2.6 Probenaufbereitung

Die Vorbereitung der Pferdekotproben für die Testungen erfolgte gemeinsam mit einem anderen Diplomstudierenden. Für die Aufbereitung der Pferdekotproben wurden 15 ml Schraubröhrchen und 2 ml Schraubröhrchen mit dem TubeWriter 360 (TubeWriter LLC, USA) beschriftet. Anschließend wurden in jedes 15 ml Schraubröhrchen 10 ml sterile, phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) vorgelegt. Die bei -80 °C gelagerten Kotproben wurden aufgetaut und aus jeder Probe wurde 1 g Kot eingewogen und in das 15 ml Schraubröhrchen überführt. Die Kotsuspensionen wurden daraufhin zehn Sekunden gevortext, anschließend 5 min bei 4000 g abzentrifugiert (Laborfuge 400 R, Heraeus,

Deutschland) und danach auf Eis gestellt. Vom Überstand der Kotsuspension wurden 1500 µl in ein 2 ml Schraubröhrchen abpipettiert.

Für die Herstellung von Dreier-Pools wurden aus jedem, vorher gevortexten, Röhrchen 500 µl Probe entnommen und in das vorgesehene 2 ml Schraubröhrchen für den jeweiligen Pool pipettiert. Der Rest der Kotproben, die Kotsuspensionen sowie die Einzelproben und Poolproben wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.7 Nukleinsäureextraktion

Um das Vorhandensein von PCR-hemmenden Substanzen in der Probe und dadurch falsch-negative Ergebnisse ausschließen zu können, wurde den Proben bzw. Probenpools vor der Nukleinsäureextraktion ein Plasmid zugesetzt, welches die DNA des EGFP enthält.

Da vorangegangene PCR-Probelaufe gezeigt haben, dass in den Kotproben vorhandene Hemmstoffe das EGFP-Signal unterdrücken können und somit auch den Betacoronavirus-Nachweis stark beeinflussen können, wurden die Proben vor der Extraktion mit sterilem PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt. Danach wurden sie mit 1 µl einer EGFP-Plasmidverdünnung versetzt, welche eine, in der qPCR sicher nachweisbare Menge an EGFP-DNA enthält. Die Extraktion der Proben erfolgte je nach Probenumfang im QIAcube HT (QIAGEN, Niederlande) bzw. im TANBead Maelstrom™ 4800 (Taiwan Advanced Nanotech, Taiwan).

2.2.8 PCR der Proben

Für die Testungen der Pferdekotproben wurden Mastermixe für die Duplex-RT-qPCR hergestellt (Kapitel 2.2.4). Die Untersuchungen der Poolproben sowie sämtliche Nachtestungen einzelner Pferdekotproben erfolgten in Form der vorher getesteten Duplex-RT-qPCR (Kapitel 2.2.5) mit dem dazugehörigen Temperaturschema (Tab. 5). Die Testungen wurden mit dem qTower³/G (Analytik Jena, Deutschland) und der dazugehörigen Software qPCRsoft (Version: 2.3.4.3) durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte der Beta-CoV-1-PCR wurden im FAM-Kanal (Grün) detektiert, während die Produkte der EGFP-PCR im HEX-Kanal (Gelb) gemessen wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Sensitivitätsbestimmung

Untersucht wurden die Verdünnungen des bekannten ECoV-Standards mit 10^7 bis 10^{-1} Kopien pro Mikroliter in der Monoplex-RT-qPCR im Doppelansatz. In der Duplex-RT-qPCR, die zusätzlich unterschiedliche Mengen EGFP enthält, wurden die Verdünnungen des bekannten ECoV-Standards mit 10^6 bis 10^{-1} Kopien pro Mikroliter dreifach angesetzt und untersucht. Für alle PCRs der Verdünnungsreihe wurde ein Threshold von 0,0109 festgelegt. Sowohl im Monoplex- als auch im Duplex-Ansatz konnte der Standard mit 10^6 Kopien des ECoV pro μl bei einem Ct-Wert von ungefähr 17 nachgewiesen werden (Abb. 4 und Abb. 5). Jene Verdünnungen die 10 GE/ μl oder mehr enthielten, lieferten immer positive Ergebnisse. Daraus lässt sich schließen, dass die Sensitivität dieser RT-qPCR in jedem Fall bei 10 Kopien viraler RNA pro Reaktion liegt. Dies entspricht je nach verwendeter Methode der Nukleinsäureextraktion, einem Detektionslimit von ca. 5×10^4 GE pro Gramm Kotprobe. Bei der Monoplex-RT-qPCR konnte die Verdünnung die 1 GE/ μl enthält, zwei von zwei Mal nachgewiesen werden, die Verdünnung mit 10^{-1} GE/ μl ein von zwei Mal (Tab. 6). Bei der Duplex-RT-qPCR konnte jene Verdünnung die 1 GE/ μl enthält, in einem der drei Ansätze nachgewiesen werden (Tab. 7).

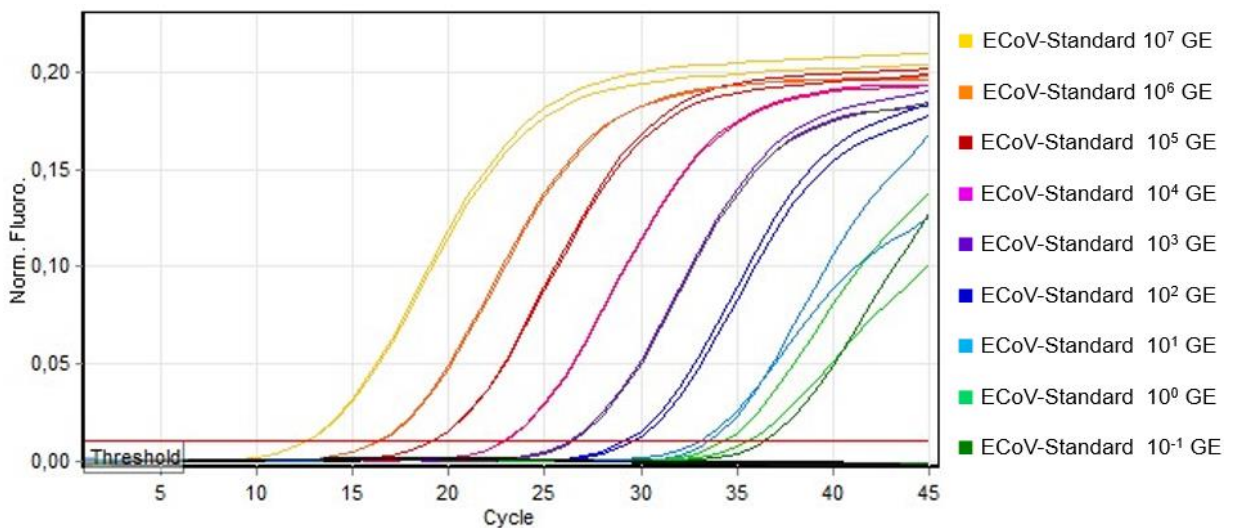


Abbildung 4: lineare Darstellung der Ergebnisse der Monoplex-RT-qPCR der Verdünnungen im FAM-Kanal (Grün)

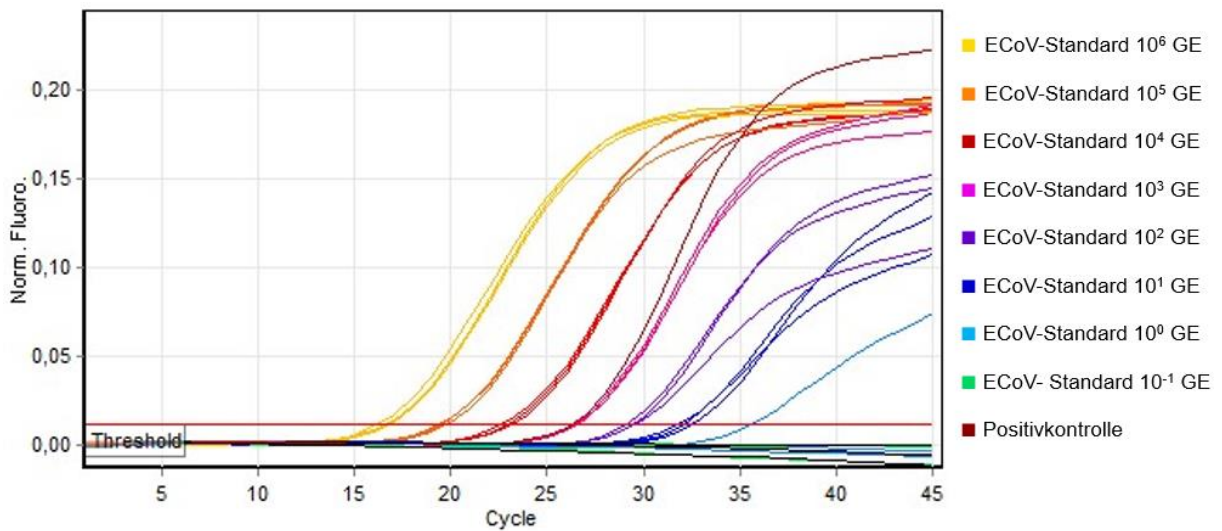


Abbildung 5: lineare Darstellung der Ergebnisse der Duplex-RT-qPCR der Verdünnungen im FAM-Kanal (Grün)

Tabelle 6: Verdünnungsreihe des ECoV-Standards in der Monoplex-RT-qPCR mit den dazugehörigen Ct-Werten, bei einem Threshold von 0,0109. Gemessen im FAM-Kanal.

Standard / Probe		Ct-Werte 1. Ansatz	Ct-Werte 2. Ansatz
	ECoV-Standard 10^7 GE/ μ l	12,75	12,71
	ECoV-Standard 10^6 GE/ μ l	16,48	16,54
	ECoV-Standard 10^5 GE/ μ l	19,30	19,32
	ECoV-Standard 10^4 GE/ μ l	22,99	22,99
	ECoV-Standard 10^3 GE/ μ l	26,36	26,35
	ECoV-Standard 10^2 GE/ μ l	29,71	29,33
	ECoV-Standard 10^1 GE/ μ l	33,65	33,21
	ECoV-Standard 10^0 GE/ μ l	34,45	35,71
	ECoV-Standard 10^{-1} GE/ μ l	/	36,52
	Carrier RNA 1 μ g/ μ l	/	
	ntc	/	
	Positivkontrolle 33/22 1:10	26,55	

Tabelle 7: Verdünnungsreihe des ECoV-Standards in der Duplex-RT-qPCR im Dreifachansatz mit EGFP und den dazugehörigen Ct-Werten, bei einem Threshold von 0,0109. Gemessen im FAM-Kanal.

Standard / Probe		Ct-Wert
	ECoV-Standard 10^6 GE/ μ l	16,21
	ECoV-Standard 10^5 GE/ μ l	19,5
	ECoV-Standard 10^4 GE/ μ l	22,68
	ECoV-Standard 10^3 GE/ μ l	26,42
	ECoV-Standard 10^2 GE/ μ l	29,54
	ECoV-Standard 10^1 GE/ μ l	31,85
	ECoV-Standard 10^0 GE/ μ l	/
	ECoV-Standard 10^{-1} GE/ μ l	/
	ECoV-Standard 10^6 GE/ μ l + EGFP 10^{-5}	16,58
	ECoV-Standard 10^5 GE/ μ l + EGFP 10^{-5}	19,41
	ECoV-Standard 10^4 GE/ μ l + EGFP 10^{-5}	22,97
	ECoV-Standard 10^3 GE/ μ l + EGFP 10^{-5}	26,49
	ECoV-Standard 10^2 GE/ μ l + EGFP 10^{-5}	29,06
	ECoV-Standard 10^1 GE/ μ l + EGFP 10^{-5}	32,51
	ECoV-Standard 10^0 GE/ μ l + EGFP 10^{-5}	35,63
	ECoV-Standard 10^{-1} GE/ μ l + EGFP 10^{-5}	/
	ECoV-Standard 10^6 GE/ μ l + EGFP 10^{-7}	16,77
	ECoV-Standard 10^5 GE/ μ l + EGFP 10^{-7}	19,78
	ECoV-Standard 10^4 GE/ μ l + EGFP 10^{-7}	23,15
	ECoV-Standard 10^3 GE/ μ l + EGFP 10^{-7}	26,29
	ECoV-Standard 10^2 GE/ μ l + EGFP 10^{-7}	29,41
	ECoV-Standard 10^1 GE/ μ l + EGFP 10^{-7}	32,06
	ECoV-Standard 10^0 GE/ μ l + EGFP 10^{-7}	/
	ECoV-Standard 10^{-1} GE/ μ l + EGFP 10^{-7}	/
	ntc	/
	Positivkontrolle 33/22 1:10	26,23

3.2 Auswirkungen von EGFP auf die Nachweisbarkeit von β -CoV

Um die Auswirkungen der Zugabe von unterschiedlichen Mengen von EGFP auf die Nachweisbarkeit von β -CoV1 zu untersuchen, wurde eine RT-qPCR durchgeführt, bei der die Verdünnungsreihe ECoV-Standards mit 10^6 GE/ μ l bis 10^{-1} GE/ μ l dreifach angesetzt wurde. In den ersten der drei Ansätze wurde kein EGFP gegeben, in den zweiten Ansatz wurde je 1 μ l der EGFP Verdünnungsstufe 10^{-5} und in den dritten wurde jeweils 1 μ l des EGFP von der Verdünnungsstufe 10^{-7} hinzugegeben. Der Vergleich der Ergebnisse der Monoplex und Duplex RT-qPCR zeigt, dass die Zugabe von EGFP keinen signifikanten Einfluss auf die Nachweisbarkeit von β -CoV aufweist (Tab. 8).

Tabelle 8: Vergleich der Ct-Werte der Monoplex- und Duplex-RT-qPCR um den Einfluss von unterschiedlichen Mengen von EGFP auf die Nachweisbarkeit von β -CoV zu untersuchen. Die Ct-Werte beziehen sich auf den FAM-Kanal.

GE/ μ l ECoV-Standard	Ct Monoplex	Ct Duplex ohne EGFP	Ct Duplex EGFP 10^{-5}	Ct Duplex EGFP 10^{-7}
10^6	16,48 16,54	16,21	16,58	16,77
10^5	19,30 19,32	19,5	19,41	19,78
10^4	22,99 22,99	22,68	22,97	23,15
10^3	26,36 26,35	26,42	26,49	26,29
10^2	29,71 29,33	29,54	29,06	29,41
10^1	33,65 33,21	31,85	32,51	32,06
10^0	34,45 35,71	/	35,63	/
10^{-1}	/ 36,52	/	/	/

3.3 Untersuchung der Pferdekotproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 588 Kotproben von Pferden aus Österreich auf das Vorhandensein β -CoV-1-spezifischer Nukleinsäuren getestet. Für die Untersuchung wurde die Duplex-RT-qPCR mit EGFP, als interne Kontrolle, herangezogen. Zuerst wurden die gepoolten Kotproben untersucht, Pools mit fraglichen Ergebnissen wurden geöffnet und die Einzelproben nachuntersucht. In der ersten durchgeführten RT-qPCR konnten bei vier Pools Kurven mit sehr hohen Ct-Werten nachgewiesen werden. Nachdem die Pools und die Einzelproben jener erneut untersucht wurden, konnte nur bei der Einzelprobe mit der Nummer 1818/24 ein Ct-Wert von 31,42 ermittelt werden. Ein wiederholter Test des Pools 125 und der dazugehörigen Einzelprobe mit der Nummer 1818/24 im Doppelansatz hat negative Ergebnisse ergeben. Bei jeder der durchgeführten RT-qPCR wurde sowohl mindestens eine Negativ- als auch eine Positivkontrolle mitgetestet. EGFP war in allen extrahierten Probenpools und Proben nachweisbar.

Somit wurden alle, im Rahmen dieser Diplomarbeit untersuchten Pferdekotproben β -CoV-1 negativ befundet.

4. Diskussion

Die zu den Betacoronaviren gehörenden equinen Coronaviren sind Krankheitserreger, die bei Pferden vor allem gastrointestinale Störungen wie Durchfall und Kolik hervorrufen können. Ausbrüche betreffen meist mehrere Tiere einer Herde mit unterschiedlich schweren Krankheitsverläufen (32).

Um β -CoV-spezifische Nukleinsäuren sicher und effizient nachweisen zu können, wurde eine Duplex-RT-qPCR etabliert. Hierbei werden in einem Ansatz sowohl Betacoronavirus 1-spezifische Nukleinsäuren, als auch EGFP als interne Kontrolle nachgewiesen. Dadurch können zeitgleich mit dem spezifischen Nachweis auch PCR-hemmende Substanzen im Extrakt überprüft werden. Mithilfe eines zuvor generierten ECoV-Standards wurde untersucht, wie stark sich die Ergebnisse von einer etablierten Monoplex-RT-qPCR von der neuen Duplex-RT-qPCR mit EGFP-Zugabe unterscheiden. Wie aus Tabelle 8 hervorgeht, wirkt sich die zeitgleiche Testung auf EGFP-DNA nicht auf die Nachweisbarkeit der RNA von β -CoV-1 aus. Die geringen Unterschiede der Ct-Werte sind wahrscheinlich auf eine Ungenauigkeit beim Pipettieren zurückzuführen. Die Testung der Verdünnungsreihe des ECoV-Standards hat gezeigt, dass die Verdünnung mit 10 GE/ μ l sicher in der Duplex-RT-qPCR nachgewiesen werden kann.

In der Monoplex-PCR und in einem der drei Ansätzen der Duplex-PCR konnte auch bei der Verdünnung mit 10^0 GE/ μ l, also der Verdünnung, die eine Kopie der DNA enthält, β -CoV-1-spezifische Nukleinsäure nachgewiesen werden. In der Verdünnung die 10^{-1} GE/ μ l enthält, also rechnerisch 0,1 Kopien pro μ l, konnte in einem der insgesamt fünf Ansätze DNA nachgewiesen werden. Da in der Realität nicht 0,1 Kopien der DNA enthalten sein können, sondern statistisch gesehen in jeder zehnten Verdünnung eine Kopie enthalten ist, ist das positive Ergebnis auf die Wahrscheinlichkeit genau diese Verdünnung zu testen, zurückzuführen. Auch können geringfügige Messfehler bei der Bestimmung der DNA-Konzentration in der Standard-Präparation Ursache hierfür sein.

Jedenfalls kann aufgrund dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass dieses Testsystem auch als Duplex-RT-qPCR höchst sensitiv für eine valide Untersuchung der Kotproben ist. Selbst ein Vorverdünnen der Kotsuspensionen vor der Extraktion, wie sie im Rahmen dieser Studie zwecks Reduktion von Hemmstoffen durchgeführt wurde, oder ein Poolen von Suspensionen würde eine Menge von 5×10^4 Kopien der Virus-RNA pro Gramm Einzelkotprobe noch zuverlässig erkennen lassen.

Eine Studie von Stummer et al. (1), in der österreichische Pferde untersucht wurden, zeigte, dass ECoV nicht nur bei klinisch an Kolik erkrankten Tieren nachgewiesen werden konnte,

sondern auch bei einem klinisch gesund erscheinenden Tier, das der Kontrollgruppe angehörte. Außerdem wurden in dieser Studie nicht nur equine, sondern auch bovine Coronaviren gefunden (1). Auch in einer Studie von Auer et al. konnte das Pathogen sowohl bei erkrankten Pferden als auch bei klinisch gesunden Tieren im Rahmen von Ausbrüchen in Österreich nachgewiesen werden (28). Ob und wie häufig bovine oder equine Coronaviren bei klinisch gesunden Pferden, die nicht in Zusammenhang mit einem akuten ECoV-Ausbruch stehen, nachgewiesen werden können, wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter erforscht.

Da die hohe Sensitivität der Nachweismethode es zulässt und um die Analysekosten zu reduzieren, wurden vor der Nukleinsäureextraktion die 588 hergestellten Kotsuspensionen von jeweils drei Tieren gepoolt. Die vier Pools, die zunächst fragliche oder schwach positive Ergebnisse zeigten, wurden geöffnet und die zugehörigen Proben einzeln und im Doppelansatz nachuntersucht. Dabei konnten die Resultate nicht bestätigt werden, weshalb es sich dabei vermutlich um Kontaminationen handelte. In Hinblick darauf stellt der Umgang mit hoch positiver Standard-DNA im PCR-Labor immer ein gewisses Risiko dar, welches sich durch sorgfältiges Arbeiten und bei Verwendung von Negativkontrollen minimieren aber niemals zu 100% ausschließen lässt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in keiner der 588 untersuchten Pferdekotproben, die im Rahmen dieser Arbeit in 3er-Pools getestet wurden, bovine oder equine Coronaviren nachgewiesen werden konnten. Vergleichbare Daten liegen für Europa nur in limitiertem Maße vor. Auer et al. (28) konnten bei 31 klinisch gesunden und nicht Ausbruchs-assoziierten österreichischen Kontrollpferden ebenfalls keine Betacoronaviren (β -CoV-1) nachweisen. In der Kontrollgruppe von Stummer et al (1) war eines von 36 Kontrollpferden positiv. Eine aktuelle Studie aus den USA fand eine Seroprävalenz von ECoV-Antikörpern bei aus Europa stammenden Pferden von 2,3 % (6). Dem gegenüber stehen von Zhao et al. 2019 (19) publizierte serologische Daten von Niederländischen und Isländischen Pferden, die zum Teil im hohen zweistelligen Bereich lagen (26 – 83 %). Der Nachweis von Antikörpern weist auf eine überstandene Coronavirusinfektion hin und lässt kaum Schlüsse auf die Ausscheidungsprävalenzen gesunder Pferde zu.

Eine mögliche Limitation dieser Studie könnte die beschriebene Saisonalität von ECoV-Nachweisen sein (33). Zwar können Pferdebestände auch in Sommermonaten von ECoV betroffen sein (25), aufgrund der größeren Stabilität der Viren bei Kälte wäre eine Viruszirkulation im Winter vermutlich eher auch über asymptomatische Tiere erfassbar. Die hier untersuchten Proben wurden primär zum Zweck einer parasitologischen Studie und somit

Großteiles in der warmen Jahreszeit gesammelt. Nur 47 Kotproben fallen auf die Monate Jänner und Februar, im November und Dezember wurde nicht beprobt.

Dennoch kann aufgrund der hier vorgelegten Ergebnisse der Schluss gezogen werden, dass von klinisch gesunden Pferden keine oder kaum Gefahr der Ansteckung und Weiterverbreitung in Hinblick auf equine und bovine Coronaviren auszugehen scheint.

Die große Mutationsfreudigkeit von Coronaviren und das damit verbundene Risiko für einen Übertritt auf andere Tierarten bzw. den Menschen (8,34) bleibt weiterhin ein Grund, die Zirkulation von Betacoronaviren bei unseren Haus- und Nutztieren in Hinblick auf ihr Zoonosepotenzial zu überwachen.

5. Literaturverzeichnis

1. Stummer M, Frisch V, Glitz F, Hinney B, Spargser J, Krücken J, et al. Presence of Equine and Bovine Coronaviruses, Endoparasites, and Bacteria in Fecal Samples of Horses with Colic. *Pathogens*. 2023 Aug 1;12(8). doi: 10.3390/pathogens12081043.
2. Mattei DN, Kopper JJ, Sanz MG. Equine Coronavirus-Associated Colitis in Horses: A Retrospective Study. *J Equine Vet Sci*. 2020 Apr 1;87. doi: 10.1016/j.jevs.2019.102906.
3. Fielding CL, Higgins JK, Higgins JC, McIntosh S, Scott E, Giannitti F, et al. Disease Associated with Equine Coronavirus Infection and High Case Fatality Rate. *J Vet Intern Med*. 2015 Jan 1;29(1):307–10. doi: 10.1111/jvim.12480.
4. Nemoto M, Oue Y, Higuchi T, Kinoshita Y, Bannai H, Tsujimura K, et al. Low prevalence of equine coronavirus in foals in the largest thoroughbred horse breeding region of Japan, 2012-2014. *Acta Vet Scand*. 2015 Sep 22;57(1). doi: 10.1186/s13028-015-0149-4.
5. Pusterla N, Vin R, Leutenegger C, Mittel LD, Divers TJ. Equine coronavirus: An emerging enteric virus of adult horses. *Equine Vet Educ*.(4). 2016 Apr; p. 216–23. doi: 10.1111/eve.12453.
6. Pusterla N, Lawton K, Barnum S. Investigation of the seroprevalence to equine coronavirus and SARS-CoV-2 in healthy adult horses recently imported to the United States. *Veterinary Q*. 2024 Mär; 44(1):1–6. doi: 10.1080/01652176.2023.2288876.
7. Woo PCY, De Groot RJ, Haagmans B, Lau SKP, Neuman BW, Perlman S, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. *J Gen Virol*. 2023; 104(4). doi: 10.1099/jgv.0.001843.
8. Woo PCY, Lau SKP, Huang Y, Yuen KY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. Vol. 234, *Exp Biol Med*. 2009 Okt, S. 1117–27. doi: 10.3181/0903-MR-94
9. Haake C, Cook S, Pusterla N, Murphy B. Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. *Viruses*. 2020 Sep 1;12(9). doi: 10.3390/v12091023.
10. Zehr JD, Kosakovsky Pond SL, Shank SD, McQueary H, Grenier JK, Whittaker GR, et al. Positive selection, genetic recombination, and intra-host evolution in novel equine coronavirus genomes and other members of the *Embecovirus* subgenus. *Microbiol Spectr*. 2024 Okt; 12(11). doi: 10.1128/spectrum.00867-24.
11. Zhang J, Guy JS, Snijder EJ, Denniston DA, Timoney PJ, Balasuriya UBR. Genomic characterization of equine coronavirus. *Virology*. 2007 Dez 5;369(1):92–104. doi: 10.1016/j.virol.2007.06.035.
12. Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Thoelen I, Wollants E, Lemey P, et al. Complete Genomic Sequence of Human Coronavirus OC43: Molecular Clock Analysis Suggests a Relatively Recent Zoonotic Coronavirus Transmission Event. *J Virol*. 2005 Feb; 79(3):1595–604. doi: 10.1128/JVI.79.3.1595-1604.2005.

13. Berche P. The enigma of the 1889 Russian flu pandemic: A coronavirus? *Presse Med.*; 2022 Sep (51); doi: 10.1016/j.lpm.2022.104111.
14. Erles K, Shiu KB, Brownlie J. Isolation and sequence analysis of canine respiratory coronavirus. *Virus Res.* 2007 Mär;124(1–2):78–87. doi: 10.1016/j.virusres.2006.10.004.
15. Kaneshima T, Hohdatsu T, Hagino R, Hosoya S, Nojiri Y, Murata M, et al. The Infectivity and Pathogenicity of a Group 2 Bovine Coronavirus in Pups. *J. Vet Med Sci.* 2007; 69 (3):301-3. doi: 10.1292/jvms.69.301.
16. Amer HM. Bovine-like coronaviruses in domestic and wild ruminants. *Anim Health Res Rev.* 2018 Dez 1;19(2):113–24. doi: 10.1017/S1466252318000117.
17. Leopardi S, Desiato R, Mazzucato M, Orusa R, Obber F, Averaimo D, et al. One health surveillance strategy for coronaviruses in Italian wildlife. *Epidemiol Infect.* 2023 Jun 1;151. doi: 10.1017/S095026882300081X.
18. Savard C, Provost C, Ariel O, Morin S, Fredrickson R, Gagnon CA, et al. First report and genomic characterization of a bovine-like coronavirus causing enteric infection in an odd-toed non-ruminant species (Indonesian tapir, *Acrocodia indica*) during an outbreak of winter dysentery in a zoo. *Transbound Emerg Dis.* 2022 Sep 1;69(5):3056–65. doi: 10.1111/tbed.14300.
19. Zhao S, Smits C, Schuurman N, Barnum S, Pusterla N, Van Kuppeveld F, et al. Development and validation of a S1 protein-based ELISA for the specific detection of antibodies against equine coronavirus. *Viruses.* 2019 Nov 30;11(12). doi: 10.3390/v11121109.
20. Hüttl J, Reitt K, Meli ML, Meili T, Bönzli E, Pineroli B, et al. Serological and Molecular Investigation of SARS-CoV-2 in Horses and Cattle in Switzerland from 2020 to 2022. *Viruses.* 2024 Feb 1;16(2). doi: 10.3390/v16020224.
21. Spiss S, Benetka V, Künzel F, Sommerfeld-stur I, Walk K, Latif M, et al. Enteric and respiratory coronavirus infections in Austrian dogs: serological and virological investigations of prevalence and clinical importance in respiratory and enteric disease. *Wien Tierarztl Monatsschr.* 2012 Jan; 99(3):67-81.
22. Steffel Victoria. Vergleich zweier RT-qPCRs zum Nachweis und zur Quantifizierung ECoV-spezifischer Nukleinsäuren aus Kotproben von Pferden. 2022 Jun.
23. Guy JS, Breslin JJ, Breuhaus B, Vivrette S, Smith LG. Characterization of a Coronavirus Isolated from a Diarrheic Foal. *J Clin Microbiol.* 2000 Dez; 38(12):4523-6; doi: 10.1128/JCM.38.12.4523-4526.2000.
24. Oue Y, Ishihara R, Edamatsu H, Morita Y, Yoshida M, Yoshima M, et al. Isolation of an equine coronavirus from adult horses with pyrogenic and enteric disease and its antigenic and genomic characterization in comparison with the NC99 strain. *Vet Microbiol.* 2011 Mai 12;150(1–2):41–8. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.01.004.

25. Oue Y, Morita Y, Kondo T, Nemoto M. Epidemic of equine coronavirus at obihiro racecourse, Hokkaido, Japan in 2012. *J Vet Med Sci.* 2013 Mai. 75(9) S. 1261–5. doi: 10.1292/jvms.13-0056.
26. Pusterla N, Mapes S, Wademan C, White A, Ball R, Sapp K, et al. Emerging outbreaks associated with equine coronavirus in adult horses. *Vet Microbiol.* 2013 Feb 22;162(1):228–31. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.014.
27. Miszczak F, Tesson V, Kin N, Dina J, Balasuriya UBR, Pronost S, et al. First detection of equine coronavirus (ECoV) in Europe. *Vet Microbiol.* 2014 Jun;171(1–2):206–9. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.031
28. Auer A, Junge HK, Glitz F, Dimmel K, Leidinger J, Cavalleri JM, et al. Equine coronavirus is an underestimated pathogen in Austria. *Wien Tierarztl Monatsschr.* 2020.
29. Mapes S, Rhodes DM, Wilson WD, Leutenegger CM, Pusterla N. Comparison of five real-time PCR assays for detecting virulence genes in isolates of *Escherichia coli* from septicemic neonatal foals. *Vet Rec.* 2007 Nov; 24;161(21):716–8. doi: 10.1136/vr.161.21.716.
30. Staroscik A. Science Primer. [Internet]. 2011 [zitiert 07. August 2024]. verfügbar unter: <https://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>.
31. Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods.* 2006 Sep;136(1–2):200–9. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.05.020.
32. Pusterla N, Vin R, Leutenegger CM, Mittel LD, Divers TJ. Enteric coronavirus infection in adult horses. *Vet J.* 2018 Jan 1;231:13–8. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.11.004.
33. Pusterla N. Equine Coronaviruses. Vol. 39, *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2023 Apr; 39(1) S. 55–71. doi: 10.1016/j.cveq.2022.11.008.
34. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Re Microbiol.* 2019 März; 17(3), S.181–92. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.

6. Abbildungs- & Tabellenverzeichnis

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: prozentueller Anteil der Pferdekotproben aus den Bundesländern Österreichs .	6
Abbildung 2: Verteilung der Geschlechter innerhalb der beprobten Pferdepopulation	7
Abbildung 3: Einteilung der beprobten Pferde in Altersklassen	8
Abbildung 4: lineare Darstellung der Ergebnisse der Monoplex-RT-qPCR der Verdünnungen FAM-Kanal (Grün).....	14
Abbildung 5: lineare Darstellung der Ergebnisse der Duplex-RT-qPCR der Verdünnungen im FAM-Kanal (Grün).....	15

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnung, Sequenz und Richtung der verwendeten Primer und Sonde für die Mastermixe der Monoplex-RT-qPCR.....	10
Tabelle 2: Protokoll für die Herstellung eines Mastermix für den Nachweis von β -CoV-1 in der Monoplex-RT-qPCR (Luna® Probe One-Step RT-qPCR Kit (NEB)).....	10
Tabelle 3: Bezeichnung, Sequenz und Richtung der Primer und Sonden für den Nachweis von β -CoV und EGFP	11
Tabelle 4: PCR Protokoll für die Herstellung der Mastermixe für die Duplex-RT-qPCR	11
Tabelle 5: Temperaturschema für die RT-qPCR	12
Tabelle 6: Verdünnungsreihe des ECoV-Standards in der Monoplex-RT-qPCR mit den dazugehörigen Ct-Werten, bei einem Threshold von 0,0109. Gemessen im FAM-Kanal.....	15
Tabelle 7: Verdünnungsreihe des ECoV-Standards in der Duplex-RT-qPCR im Dreifachansatz mit EGFP und den dazugehörigen Ct-Werten, bei einem Threshold von 0,0109. Gemessen im FAM-Kanal.	16
Tabelle 8: Vergleich der Ct-Werte der Monoplex- und Duplex-RT-qPCR um den Einfluss von unterschiedlichen Mengen von EGFP auf die Nachweisbarkeit von β -CoV zu untersuchen. Die Ct-Werte beziehen sich auf den FAM-Kanal.	17