

KLASSIFIZIERUNG: Familie: Herpesviridae

Genus: Herpesvirus equi, Typen 1-4

1. ALLGEMEINES

Die vier bisher bekannten Herpesviren des Pferdes (EHV) sind in Aufbau und Genom-Struktur verwandt mit dem Varizella-Zoster Virus (VZV) des Menschen und dem Pseudorabiesvirus des Schweines (PRV). Anders als bei PRV ist bisher nur in seltenen Fällen EHV bei einer anderen Spezies als dem Pferd nachgewiesen worden. Man kann daher davon ausgehen, daß die Übertragung stets zwischen Pferden, die somit auch das einzige Reservoir stellen, stattfindet. Herpesviren sind außerhalb des Wirtes nicht lange lebensfähig, die Ansteckung erfolgt bei direktem Kontakt. Die Infektion geht in eine latente Phase über. Einmal infizierte Tiere sind daher lebenslang potentielle Infektionsherde. Es existieren vier EHV-Typen, wovon EHV-1 und -4 als Erreger des Virus-Abortes und der Rhinopneumonitis von herausragender Bedeutung sind. Die unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens dieser beiden Typen hat zur Bezeichnung Rhinopneumonitis für EHV-4 und Equines Abort Virus für EHV-1 geführt. Die für die Benennung zugrundeliegenden Daten spiegeln jedoch nicht den aktuellen Stand in Deutschland wider, hier wird bei beiden klinischen Formen nahezu immer EHV-1 nachgewiesen. Beide Typen sind jedoch serologisch nicht eindeutig differenzierbar, es besteht eine hohe Kreuzneutralität nach Infektion mit einem der beiden Viren. Eindeutig kann nur mittels monoklonaler Antikörper oder Genomanalyse differenziert werden. Da am häufigsten die Diagnose nach einem Abort durchgeführt wird, genügt jedoch meistens der Virusnachweis ohne Typpufferenzierung. Der direkte Virusnachweis erfolgt über die Virusanzüchtung in geeigneten Zellkulturen mit anschließender serologischer Überprüfung und mittels Immunfluoreszenz (IF) an Organproben. Der indirekte Virusnachweis mit Serumpaaren wird im Neutralisationstest (NT) durchgeführt.

2. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

2.1 Direkter Virus/Antigennachweis

Zur Anzüchtung: Tupferproben, Organe (Lunge, Leber, Milz)

IF: Organe (Lunge, Leber, Milz)

2.2 Indirekter Virus/Antigennachweis

- Serum

3. UNTERSUCHUNGSGANG

3.1 Antigennachweis mittels direkter Immunfluoreszenz

- Gefrierschnitte (0,2-0,4 µm) von Organen abortierter Feten (Milz, Leber, Lunge) anlegen,
- Schnitte lufttrocknen und 5 Minuten bei -20 °C in Aceton fixieren, Schnitte lufttrocknen, in PBS spülen, Schnitte mit EHV-1 - Konjugat überschichten,
- Inkubation 30 Minuten bei 37 °C (feuchte Kammer),
- Schnitte dreimal in PBS waschen, mit PBS/Glycerin ein decken.

3.2 Virusnachweis mittels Anzuchtung Zellkulturen

3.2.1 Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

Tupferproben: - Tupfer mit 1-2 ml EMEM (siehe ANHANG) mit 5-facher Antibiotikamenge kräftig schütteln,

- Tupfer an der Röhrenwand ausdrücken,
- Zentrifugation 20 Minuten bei 1000 g ;

Organe:

- 1:10-Verreibung mit PBS anlegen,
- Zentrifugation 20 Minuten bei 1000 g

3.2.2 Zellkulturen und deren Beimpfung

Für die Virusanzüchtung aus Untersuchungsmaterial eignet sich besonders Kaninchennieren-Zelllinie RK13 (siehe ANHANG):

- Beimpfung von dichten Kulturen mit Überstand der Zentrifugate (0,2 ml pro Röhren),
Bebrütung bei 37 °C,
Mikroskopische Beobachtung bis zu 7 Tagen,
- bei Ausbleiben eines zpE Anlegen von 1-2 Subpassagen nach Gefriertauen des Zellmaterials,
- bei Auftreten eines zpE Virusidentifizierung mittels IF

N.B.: Für EHV-4 sind Zelllinien mit zufriedenstellenden Anzüchtungsergebnissen noch nicht bekannt.

3.2.3 Virusidentifizierung mittels Immunfluoreszenz

- Zellen in Kulturröhrchen mittels Gummischaber von der Glaswand ablösen und auf einen Objektträger überführen (Pasteurpipette),
- Präparat lufttrocknen; weitere Behandlung siehe Nr. 3.1.

3.2.4 Virusidentifizierung mittels Restriktions-Analyse

Bei fraglichen Ergebnissen bei der Virusidentifizierung mittels IF kann zur Differenzierung von EHV-1 und EHV-4 mit in der Zellkultur angereicherten Virusmaterial eine Restriktionsanalyse durchgeführt werden:

- 0,4 ml einer Zellkultur mit deutlichem cpE mit 50 µl TEN, 50 µl Proteinase K und 22,5 µl 20% SDS (siehe ANHANG) mischen,
- 5 Minuten kräftig schütteln,
- 30 Minuten bei 56-60 °C lysieren,
- Lysat zweimal mit gleichem Volumen Phenol versetzten, gut mischen, zentrifugieren und in ein Eppendorfgefäß überführen,
- restliches Phenol durch Ausschütteln mit IAC entfernen,
- Fällung der gereinigten DNS nach Zugabe von 1/10 des Volumens von 3m Natriumazetat mit Äthanol (doppeltes Volumen vorsichtig kippend untermischen) während 2-3 Stunden bei -70 °C,
- DNS durch Zentrifugation bei ca. 12.000 g pelletieren,
- zweimal mit 70% Äthanol waschen,
- je nach Größe des Pellets (zwischen einem »grauen Schleier« und einer deutlichen »weißen Flocke« am Gefäßboden) 10 bis 20 µl TE zugeben, mindestens 30 Minuten weichen lassen;
- 3 bis 5 ml davon werden für einen Restriktionsverdau eingesetzt:
- in einem Eppendorfgefäß für ein Endvolumen von 15 bis 20 µl H₂O bidest. als Vorlage einfüllen, 1/10 des Endvolumens 10xRP und die DNA zugeben,
- Zugabe von 5 bis 10 units (0,5 bis 1 ml) des Enzyms Bam HI,
- 1 bis 3 Stunden bei 37 °C inkubieren,
- Reaktion durch Zugabe von BSE Puffer stoppen.

Die spätere Auftrennung der Fragmente wird durch kurzes Erhitzen auf 68 °C (3 Minuten) und sofortiges Abkühlen auf Eis verbessert.

- Der Ansatz wird in einem 0,7% Agarosegel bei konstant 3-6V/cm Gellänge elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel 10 Min. in Ethidiumbromid gefärbt, 30 Min. in H₂O entfärbt und auf einem UV-Lichtkasten ausgewertet. Es empfiehlt sich, das Gel im UV mit einer Polaroidkamera mit vorgesetztem Orangefilter zur Dokumentation zu fotografieren, da die Färbung im UV sehr schnell ausbleicht.

3.3 Indirekter Virus/antigennachweis mittels Neutralisationstest

Der Test wird im Mikroverfahren nach der Simultanmethode durchgeführt:

Virus: EHV-1, z.B. Stamm Rac H.

- Anlegen von Serumverdünnungsreihen in 2er-Potenzen (1: 2 bis ca. 1:126) In Mikroplatten,
- Zugabe der gleichen Menge Virusgebrauchsverdünnung (100 KID" eines EHV-1 - Laborstammes (z.B. Rac H),
- Inkubation 1 Stunde bei 37 °C,
- Zugabe von RK13 - Zellen (ca. 5x10⁶ Zellen pro ml),
- Inkubation bei 37 °C.
- Mikroskopische Ablesung der Ergebnisse am 7. Tag nach Versuchsansatz.

ANHANG

Medien und Lösungen

Erhaltungsmedium f. RK13- Zellen: Medium 199 + 5% FKS

TEN 100:	mM Tris-HCl (pH 7,4), 10 mM EDTA, 1 mM NaCl
Proteinase K:	1 mg/ml in autoklaviertem H ₂ O
20% SDS:	Natriumdodecylsulfat 20 g/100 ml, steril filtriert
Phenol:	neutralisiertes Phenol, flüssig, pH 7,4
IAC:	1 Teil Isoamylalkohol mit 24 Teilen Chloroform gemischt
TE:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0, autoklaviert
BSE Stop-Puffer:	10x BSE: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (w/v) SDS, 50 % (w/v) Sucrose, 50 mM EDTA, pH 8,0
0,7% Agarose:	0,7g Agarose/100 ml EP aufkochen, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind, abkühlen auf 55 °C und in mit eingesetztem Kamm (25 l/slot) Gelkammer gießen, Kamm nach Erstarren entfernen
Ethidiumbromid:	Stammlösung 10 mg/ml in H ₂ O dest., dunkel aufbewahrt Färbelösung 1:500 in EP (Als Zusatz bereits während der Elektrophorese: 1:10.000 in EP)
EP:	Elektrophoresepuffer für Agarosegele: 40 mM Tris, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7.9 am besten als 50-fach konzentrierte Stammlösung ansetzen.
10xRP:	10-fach konzentrierter Enzympuffer, wird im allgemeinen vom Hersteller jedem Restriktionsenzym beige packt
<i>Bam-HI:</i>	Restriktionsenzym, besonders gut geeignet zur Charak- terisierung und Differenzierung von EHV-1 und EHV-4.

LITERATUR

HÜBERT, P. (1989): Herpesinfektionen des Pferdes.

Prakt. Tierarzt **4**, 12-14.

HOBERT P.H. and H. MEYER (1987): Characteristic changes in restriction enzyme pattern of a fetal equine herpesvirus type 1 (EHV-1) isolate during development to the vaccine strain Rac H.

Zbl. Bakt. Hyg. A **267**, 124-.

MEYER, H. and P.H. HÜBERT (1988): Isolation and characterization of monoclonal antibodies against an attenuated vaccine strain of equine herpesvirus type 1 (EHV-1). Vet. Microbiol. **18**, 95-101.

MEYER H., P.H. HOBERT and W. EICHHORN (1987): Changes in restriction enzyme pattern of the equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) strain Rac-H DNA during attenuation.

Journal of Veterinary Medicine Series B **34**, 310-313.

MEYER, H., P.H. HÜBERT, C. SCHWEND and W. EICHHORN (1992): Rapid identification and differentiation of the vaccine strain Rac H from EHV-1 field isolates using a non-radioactive probe.

Veterinary Microbiology **30**, 13-20.

MEYER, H., P. THEIN and P. HÜBERT (1987): Characterization of two equine herpesvirus (EHV) isolates associated with neurological disorders

in horses.

J. Vet. Med. B **34**, 545-548.

SACHBEARBEIT

Dr. P. Hübert, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin,
Tierärztliche Fakultät,
Ludwig-Maximilians-Universität München
Veterinärstr. 13,
80539 München