

# Entwicklung einer PCR zum Nachweis der EAV-Infektion

K. R. Brunner<sup>1</sup>, E. Santschi<sup>1</sup>, V. Gerber<sup>2</sup>, D. Burger<sup>2</sup> und R. G. Zanoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Veterinär-Virologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Bern, <sup>2</sup>Institut suisse de médecine équine (ISME), Universität Bern und Agroscope, Avenches

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, als Alternative zur Isolation geeignete (real-time) RT-PCR Methoden für die schnelle Diagnose von EAV und zur molekular-epidemiologischen Charakterisierung von Virusstämmen zu entwickeln. Hierfür wurden zwei konventionelle RT-PCR Methoden und eine real-time RT-PCR so adaptiert, dass ein möglichst breites Spektrum von Isolaten nachweisbar sein sollte. Verdünnungsreihen mit dem Bucyrus-Stamm zeigten eine hundertfach höhere Sensitivität der real-time- und der heminested RT-PCR im Vergleich zu der einfachen RT-PCR. Die Eignung der Methoden konnte mittels 11 Zellkulturüberständen verschiedener EAV-Isolate und 7 EAV-positiven Spermaproben gezeigt werden. Die phylogenetische Analyse der Sequenzen der eigenen Proben mit bekannten Sequenzen ergab Hinweise auf mehr EAV-Subgruppen als bisher beschrieben.

Schlüsselwörter: Equines Arteritis Virus, real-time RT-PCR, Phylogenie, Diagnostik

## Development of PCR methods for detection of EAV infection

The goal of this work was the development of suitable (real-time) RT-PCR techniques for fast and sensitive diagnosis of EAV and for molecular-epidemiological characterisation of viral strains, as an alternative to virus isolation. To this purpose two conventional RT-PCR methods and one real-time RT-PCR were adapted to detect the broadest possible spectrum of viral strains. Several dilutions with Bucyrus strain showed a 100-fold higher sensitivity of real-time RT-PCR and heminested RT-PCR compared to simple RT-PCR. Making use of 11 cell culture supernatants of different EAV isolates and 7 semen samples of positive stallions, the suitability of the techniques could be shown. Phylogenetic analysis of sequences of the newly analysed samples compared with known sequences indicated that more EAV-lineages exist than presently described.

Keywords: equine arteritis virus, real-time RT-PCR, phylogeny, diagnosis

## Einleitung

Das Equine Arteritis Virus (EAV) repräsentiert die Prototyp-Spezies des Genus *Arterivirus* in der Familie der Arteriviridae aus der Ordnung der Nidovirales (Murphy et al., 1992). Es handelt sich um ein behülltes, sphärisches, einzelsträngiges RNA Virus mit positiver Polarität. Das Genom besteht aus 12.7 Kilobasen und enthält 10 Open Reading Frames (offene Leseraster) mit einer zum 3'-Ende hin verschachtelten Organisation der Genexpression. Das natürliche Wirtsspektrum von EAV beschränkt sich auf Equidae (den Boon et al., 1991; Murphy et al., 1992). Die Übertragung von EAV erfolgt respiratorisch, transplazentar oder venerisch (Timoney et al., 1986). Eine Exposition zu EAV resultiert bei immunkompetenten Tieren meistens nur in einer milden Infektion mit Fieber, Apathie, Inappetenz, geröteten Schleimhäuten und Ödemen oder einer subklinischen Infektion. Bei trächtigen

Stuten besteht ein hohes Abortrisiko, während bei neonatalen Fohlen selten tödliche Verlaufsformen auftreten. Hengste spielen eine zentrale Rolle bei der Epidemiologie von EAV, da das Virus bei Erstinfektion von postpubertären Tieren eine auf den Reproduktionstrakt beschränkte Persistenz induzieren kann. Als Folge davon werden 30 bis mehr als 40% der betroffenen Tiere zu lebenslangen, seropositiven Dauerausscheidern im Sperma (Timoney and McCollum, 1993; Timoney and McCollum, 2000). Die klinische Diagnose von EAV ist aufgrund der vielfältigen, oft milden und unspezifischen Symptome schwierig. Für eine definitive Diagnose ist der direkte Virusnachweis oder der Nachweis einer Serokonversion unumgänglich. Die Virusisolation (VI) ist sehr aufwändig (Chirnside and Spaan, 1990; Office International des Epizooties, 2013). Geeignete Proben für den Virus-Nachweis sind Sperma, fetales Organmaterial, Abstrich/Spülungen im Nasenrachenraum, Abstrich der Bindehaut oder weis-

## 528 Originalarbeiten/Original contributions

se Blutzellen (Buffy Coat). Ein rascher und sicherer Virusnachweis ist insbesondere bei seropositiven Hengsten zur Entdeckung von Dauerausscheidern von grosser epidemiologischer Bedeutung.

Als vielversprechende Alternative zum langsamen, klassischen Virusnachweis wurden verschiedene Varianten der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zum schnellen und sensitiven Nachweis von EAV entwickelt (Chirnside and Spaan, 1990; St Laurent et al., 1994; Sekiguchi et al., 1995; Gilbert et al., 1997; Starick, 1998; Ramina et al., 1999; Stadejek et al., 1999). Ziel dieser Arbeit war es, geeignete (real-time) RT-PCR Methoden als Alternative zur klassischen Virusisolation für die schnelle und sensitive Diagnose von EAV und RT-PCR Methoden für die molekular-epidemiologische Charakterisierung von Virusstämmen zu etablieren und zu validieren. Zu diesem Zweck wurden 3 publizierte Methoden, 2 konventionelle RT-PCR Methoden und eine real-time RT-PCR (Chirnside and Spaan, 1990; St Laurent et al., 1994; Balasuriya et al., 2002), im Hinblick auf ein möglichst breites Spektrum von nachweisbaren Isolaten adaptiert.

### Material und Methoden

#### Sperma

Bei den anlässlich von Routine-Untersuchungen von serologisch positiven Zuchthengsten erhobenen Proben handelte es sich um Samenproben mit einer durchschnittlichen Konzentration von  $274 \times 10^6$  Spermien pro ml ( $131-439 \times 10^6$  Z/ml). Generell hat Sperma einen hemmenden Effekt auf die RNA-Isolation. Deshalb wurde es standardmässig unverdünnt sowie auch in einer 10-fachen Verdünnung getestet. Es standen uns 7 unverdünnte Gefriersperma-Proben zur Verfügung, die direkt mittels PCR untersucht wurden. Weitere Gefriersperma-Proben wurden uns vom Institut suisse de médecine équine (ISME, Bern/Avenches) überlassen.

#### Organmaterial

Bei Aborten unbekannter Ursache wurden fetale Organe (Lunge, Leber, Niere, Milz) einzeln oder gepoolt sowie Plazentamaterial von Stuten untersucht (St Laurent et al., 1994; Office International des Epizooties, 2013). Die Aufbewahrung der verarbeiteten Proben bis zur Verwendung für die Zellkultur- oder RNA-Isolation erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

#### Nasenrächentupfer

Als Nasenrächentupfer wurden steril verpackte 50 cm lange Kunststoffröhren, die an der Vorderseite mit einer sterilen Gazebinde (RHENA IVF Hartmann AG, Neuhausen, Schweiz) versehen sind, verwendet. Die Tupferproben wurden nach der Entnahme in ein mitgeliefertes

Röhrchen mit sterilem Isolationsmedium verbracht und dem Labor per Express zugestellt.

#### EDTA-Blut

Für den Virusnachweis einer akuten Infektion wurde venöses EDTA-Blut verwendet, welches direkt für die RNA-Isolation gebraucht werden konnte.

#### Virusstämmen und Isolate

Als Positivkontrolle für die Zellkulturen und PCR wurde der amerikanische Stamm «Bucyrus» 520/64 (am 01.10.1964 von Dr. E.R. Doll, Lexington, Kentucky, USA erhalten) verwendet. Es standen aus eigenen Beständen 6 EAV-Zellkulturisolate zur Verfügung. 5 weitere EAV-Isolate wurden uns freundlicherweise vom National Veterinary Institute in Uppsala, Schweden (SVA) überlassen.

#### Zellkultur

Die Isolation aus klinischen Proben und die Vermehrung von Isolaten aus Zellkulturüberständen erfolgte im Wesentlichen gemäss OIE Manual (Office International des Epizooties, 2013) unter Verwendung von RK-13 Zellen (ATCC, Manassas, USA), E. Derm Zellen (ATCC, Manassas, USA), sekundären equinen Nierenzellen und BHK-21 Zellen (ATCC, Manassas, USA). Nach Auftreten eines deutlichen zytopathischen Effekts nach einer Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  während 4–5 Tagen wurde die Zellkultur  $2 \times$  bei  $-20^\circ\text{C}$  gefroren und wieder aufgetaut. Die Überstände wurden bei 2'000 g zentrifugiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Titerbestimmung in Tissue Culture Infectious Dose 50% (TCID<sub>50</sub>) erfolgte gemäss Spearman-Kaerber (Spearman, 1908; Kaerber, 1931).

#### Primer und Sonden

Die Lokalisation geeigneter Primer und Sonden für die RT-PCR respektive real-time RT-PCR auf den Genomabschnitten Leader Sequenz (LS) resp. Open Reading Frame 7 (ORF7) wurde mit Hilfe bereits publizierter Arbeiten (Chirnside and Spaan, 1990; St Laurent et al., 1994; Balasuriya et al., 2002) gewählt, bezüglich variablen Positionen mit Hilfe aller auf GenBank (National Center for Biotechnology Information and National Library of Medicine, Rockville Pike, USA) erhältlichen, kompletten EAV-Genomsequenzen überprüft und bei Bedarf mit sogenannten Wobbles (mehrdeutige Positionen) versehen. Im Abschnitt LS handelte es sich um Position 1–224 gemäss der genomischen Sequenz des Stammes «Bucyrus» (DQ846750), in ORF7 um Position 12'390–12'704. Als interne Kontrolle für die real-time RT-PCR und für die klassische RT-PCR wurden Primer zur Amplifikation von Sendai-Virus (ATCC, Manassas, USA; Kaiser, 2001) verwendet. Als interne Kontrolle für zellreiche Proben

diente die Amplifikation von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, probeninhärente mRNA; Ravazzolo et al., 2006). Alle Primer und Sonden wurden von der Firma Microsynth (Microsynth GmbH, Balgach, Schweiz) bezogen. Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

### RNA-Isolation

Die RNA-Isolationen wurden mit Hilfe des Kits QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germantown, USA) gemäss Spin Protocol und Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Eluierung der RNA wurde RNA Storage Solution (Ambion, Foster City, USA) verwendet. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei –20 °C.

### Einfache RT-PCR

Für die RT-PCR wurde der One Step RT-PCR Kit (QIAGEN, Germantown, USA) verwendet. Das RT-PCR Reaktionsgemisch bestand aus 29.25 µl RNase-freiem Wasser, 10 µl OneStep RT-PCR Buffer 5×, 2 µl dNTP mix (10 mM von jedem Nukleotid), 0.75 µl Forward Primer 586F (40 µM), 0.75 µl Reverse Primer 586R (40 µM), 0.25 µl RNasin® Plus (40 U/µl; Promega, Madison, USA), 2 µl OneStep RT-PCR Enzyme Mix und

5 µl der aus den Proben resp. Kontrollen isolierten RNA. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 30 Minuten bei 50 °C, 15 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen mit einer Minute bei 94 °C, einer Minute bei 45 °C und einer Minute bei 72 °C, wobei die Elongation bei 72 °C im letzten Zyklus auf 10 Minuten verlängert wurde. Danach wurden die Proben auf 4 °C gekühlt. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese visualisiert.

### Heminested RT-PCR

Die erste Runde der hnRT-PCR mit den Primern EAV1F (Forward, 40 µM) und EAV1R (Reverse, 40 µM) resp. mit den Primern für die GAPDH- und Sendai-Kontrollen (Tab. 1) erfolgte wie bei der einfachen RT-PCR beschrieben, wobei nur 35 Zyklen verwendet wurden und die Bindung der Primer bei 55 °C stattfand. Die Reamplifikation von 1 µl des Amplifikationsprodukts der ersten Runde unter Verwendung der Primer EAV2F (40 µM) und EAV1R (40 µM) wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 15 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 35 Zyklen mit einer Minute bei 94 °C, einer Minute bei 55 °C und einer Minute bei 72 °C, wobei die Elongation bei 72 °C im letzten Zyklus auf 10 Minuten verlängert wurde. Danach wurde die Probe auf 4 °C gekühlt.

Tabelle 1: Primer und Sonden.

Method	Primer-Name	Sequenz	Lokalisation	Produkt	Referenz
RT-PCR	586-F	CRC CRT ATR CAC TGC AAG AA	35–54 <sup>a</sup> (20 bp)		Chirnside et al., 1990
RT-PCR	586-R	AGA TCG ACG ACG ATG GCA GT	203–184 (20 bp)	169 bp	
hnRT-PCR	EAV1F	ATG GCG TCA AGA CGA <u>TYA C</u>	12313–12331 (19 bp)		St Laurent et al., 1994
hnRT-PCR	EAV1R	TAT CCA CGT CTT ACG GC	12655–12639 (17 bp)	343 bp	
hnRT-PCR	EAV2F	TAC AAG CTA CAA TGA CCT ACT GCG	12375–12398 (24 bp)	281 bp	
Real-time RT-PCR	EAV7-F	GGC GAC AGC <u>STA</u> CAA GCT ACA	12365–12385 (21 bp)		Balasuriya et al., 2002
Real-time RT-PCR	EAV7-R	<u>CRG</u> CAT CTG CAG TGA GTG A	12568–12550 (19 bp)	204 bp	
Real-time RT-PCR	EAV7-P	5' FAM-TTGGTTCAGATGCGGGTYCG-CAA-BHQ1 3' (inverted)	12404–12425 (22 bp)		
Klonieren RT-PCR	EAVclon-F	CAC MGC AGT TGG YAA CAA GC	12287–12306 (20 bp)		diese Arbeit
Klonieren RT-PCR	EAVclon-R	ACT WCA ACR TGA CGC CAC AC	12682–12663 (20 bp)	396 bp	
Kontrolle <sup>1</sup>	Sendai-F	GTC ATG GAT GGG CAG GAG TC	8553–8572 <sup>b</sup> (20 bp)		Kaiser, 2001
Kontrolle <sup>1</sup>	Sendai-R	CGT TGA AGA GCC TTA CCC AGA	8768–8788 <sup>b</sup> (21 bp)	236 bp	
Kontrolle <sup>2</sup>	Sendai-P	5' FAM-CAAAATTAGGAACGGAG-GATTGTCCCCTC-Tamra 3'	8720–8748 <sup>b</sup> (29 bp)		
Kontrolle <sup>3</sup>	GAPDH-F	GGC AAG TTC CAT GGC ACA GT	58–77 <sup>c</sup> (20 bp)		Ravazzolo et al., 2006
Kontrolle <sup>3</sup>	GAPDH-R	ACG TAC TCA GCA CCA GCA TCA C	161–182 <sup>c</sup> (22 bp)	125 bp	

In Bezug auf die Referenz veränderte Basen sind unterstrichen. R = A/G, Y = C/T, S = C/G, M = A/C, W = A/T. FAM = 6-carboxyfluorescein, BHQ-1 = Black Hole Quencher-1, TAMRA = 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine

<sup>a</sup>Die Lokalisation der verschiedenen EAV-Primer bezieht sich auf die GenBank Sequenz DQ846750 des Stammes «Bucyrus»

<sup>b</sup>Die Lokalisation der Sendai-Primer bezieht sich auf die GenBank Sequenz M30202

<sup>c</sup>Die Lokalisation der GAPDH-Primer bezieht sich auf die GenBank Sequenz AJ431207

<sup>1</sup>Kontrolle real-time & klassische RT-PCR; <sup>2</sup>Kontrolle real-time RT-PCR; <sup>3</sup>Kontrolle klassische RT-PCR

F: forward; R: reverse; hn: heminested; inverted: Sonde im Vergleich zur Originalarbeit invertiert

## 530 Originalarbeiten/Original contributions

### Gelelektrophorese und Exzision von Fragmenten

Die PCR-Fragmente wurden auf 1.5 % Agarose-Gel (Agarose, Analytical Grade, Promega, Madison, USA) bei 100 V und 0.1 A elektrisch aufgetrennt. Anschliessend wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht ausgestochen. Zur Klonierung wurden die PCR-Fragmente auf 2 % Agarose Gel mit SeaKem GTG Agarose bei 100 V und 0.1 A elektrisch aufgetrennt, wobei die Gesamtmenge des noch vorhandenen PCR-Produktes geladen und anschliessend die gewünschte Bande unter UV-Licht ausgestochen wurde.

### Klonieren zur Bestimmung der analytischen Sensitivität der PCR

Zur Klonierung eines Genomfragments im Abschnitt ORF7 wurde der Stamm Bucyrus verwendet. Die Amplifikation mit den Primern EAVclon-F (40 µM) und EAVclon-R (40 µM) erfolgte wie bei der einfachen RT-PCR beschrieben, wobei die Bindung der Primer mittels eines Temperaturgradienten von 50 °C–60 °C mit einem Intervall von 2 °C durchgeführt wurde. Die nach der Gelelektrophorese ausgeschnittene Bande mit einer Länge von 396 bp wurde mittels TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen, Foster City, USA) gemäss Angaben des Herstellers kloniert.

### Real-time RT-PCR

Für die real-time RT-PCR wurde der QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAgen, Germantown, USA) verwendet. Das Reaktionsgemisch bestand aus 6.5 µl RNase-freiem Wasser, 12.5 µl QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix 2×, 0.25 µl Forward Primer EAV7-F (40 µM), 0.25 µl Reverse Primer EAV7-R (40 µM), 0.25 µl Sonde EAV7-P (20 µM), 0.25 µl QuantiTect Probe RT-Mix und 5 µl der aus den Proben resp. Kontrollen isolierten RNA. Für die parallel geführte Sendai-Kontrolle wurden die Primer Sendai-F und Sendai-R sowie die Sonde Sendai-P (je 8 µM) verwendet. Die Reaktionen (EAV- und Sendai-Gemisch) wurden wie folgt durchgeführt: 30 Minuten bei 50 °C, 15 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 45 PCR-Zyklen mit 15 Sekunden bei 94 °C und einer Minute bei 55 °C. Die Auswertung der Reaktion erfolgte mit der 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

### Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde das PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAgen, Germantown, USA) gemäss Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Sequenzierung wurde folgendes Gemisch an die Firma Microsynth gesendet: 22.5 ng DNA pro 100 bp, je 30 pmol der für die Amplifikation verwendeten Primer und eine ergänzende Menge an DEPC Treated Water (Ambion,

Foster City, USA) zu einer Gesamtmenge von 15 µl. Die Sequenzen wurden anhand der SeqMan™II v5.01 Software (DNASTAR, Madison, USA) bearbeitet und anschliessend mit dem Clone Manager 9 (Scientific & Educational Software, Cary, USA) ausgewertet.

### Phylogenetische Analyse

Die aus GenBank stammenden Sequenzen der entsprechenden Genomabschnitte (LS oder ORF7) wurden zusammen mit den eigenen Sequenzen im Fasta Format in eine Datei gespeichert. Mit Hilfe der ClustalX2.0.3 Software (Larkin et al., 2007) und der GeneDoc Software v2.5.0 (Nicholas et al., 1997) wurden anschliessend multiple Sequenz-Alignments erstellt. Die phylogenetischen Bäume wurden mit Hilfe des Phylemon2/MrBayes v3.2.0 unter Annahme des General-Time-Reversible Modells (GTR) erstellt (Sanchez et al., 2011).

## Ergebnisse

### Virusanzucht und Titerbestimmung

Die aus eigenen Beständen zur Verfügung stehenden 5 EAV-Zellkulturisolate wurden auf RK-13 Zellen oder E. Derm Zellen einmal passagiert. 5 weitere EAV-Isolate wurden auf BHK-21 Zellen vermehrt. Die Titer aller Proben lagen im Bereich von  $10^{3.625}$  bis  $10^{5.125}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Sperma-Proben konnten mit Ausnahme der Probe 001811SeCH, welche sich nur auf sekundären, equinen Nierenzellen vermehrte, auf RK-13 und E. Derm Zellen angezüchtet werden.

### Einfache RT-PCR

Um die Sensitivität der einfachen RT-PCR zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe des Bucyrus-Virus von  $10^0$  bis  $10^{-8}$  erstellt und amplifiziert. Die Amplifikation des PCR-Fragments mit einer Grösse von 169 Basenpaaren (bp) war in mit Ethidium-Bromid gefärbtem Agarose-Gel bis zu einer Verdünnung von  $10^{-4}$  sichtbar. Bezogen auf die in Zellkultur in tissue culture infectious dose 50 % (TCID<sub>50</sub>) gemessene Infektiosität, erreichte die einfache RT-PCR eine Nachweisgrenze von 0.63 TCID<sub>50</sub>.

### Heminested RT-PCR (hnRT-PCR)

Die ursprüngliche RT-PCR (St Laurent et al., 1994) wurde optimiert, indem beim Forward-Primer die letzte Base zu einem Wobble (Y für C/T) geändert und zusätzlich 2 Basen am 3'-Ende angehängt wurden. Der Grund für diese Anpassung war die schwache Reaktion mit dem Schweizer Bibuna-Stamm. Zur Erzielung einer höheren Sensitivität wurde diese RT-PCR zu einer hnRT-PCR weiterentwickelt, indem ein weiterer

Forward-Primer (EAV2F) gewählt wurde (Tab. 1). In einer Verdünnungsreihe des Bucyrus-Virus von  $10^0$  bis  $10^{-8}$  konnte das Amplifikationsprodukt mit einer Grösse von 343 bp in der ersten Runde knapp bis zu einer Verdünnung von  $10^{-5}$  nachgewiesen werden (Abb. 1A). Bezogen auf die Infektiosität erreichte die erste Runde der hnRT-PCR eine Nachweisgrenze von 0.06 TCID<sub>50</sub>. Die Reamplifikation eines Genomabschnittes mit einer Grösse von 281 bp ermöglichte eine mindestens 10-fache Steigerung der Nachweisbarkeit (0.006 TCID<sub>50</sub>; Abb. 1B).

### Real-time RT-PCR

Mit der leicht modifizierten real-time RT-PCR (Balasuriya et al., 2002) konnte das Bucyrus-Virus bis zu einer Verdünnung von  $10^{-6}$  nachgewiesen werden. Der Amplifikationsplot zeigte regelmässige Abstände der Kurven mit CT (Cycle Threshold)-Werten von 19.5 ( $10^0$ ) bis 43.51 ( $10^{-6}$ ). Bezogen auf die Infektiosität erreichte die real-time RT-PCR eine Nachweisgrenze (analytische Sensitivität) von 0.006 TCID<sub>50</sub> wie in der hnRT-PCR. Die mittels linearer Regression der CT-Werte und der Titer der Proben bestimmte Effizienz der real-time RT-PCR betrug für das Bucyrus-Virus 80 % ( $E = 10^{(-1/\text{Steigungskoeffizient})} - 1$ ).

### Analytische Sensitivität des DNA-Nachweises mittels Bucyrus-Plasmid

In einer Verdünnungsreihe von  $10^6$  bis  $10^0$  Kopien/5 µl konnten mittels hnPCR nach der ersten Runde im Ethidium-Bromid Gel  $10^1$  Plasmidkopien gerade noch knapp nachgewiesen werden. Nach der Reamplifikation konnten  $10^1$  Plasmidkopien mit deutlichem Signal nachgewiesen werden. Die mit Hilfe von Triplikaten bestimmte Detektionsgrenze der real-time PCR lag bei  $10^1$  Plasmidkopien (CT-Werte zwischen 40 und 42.5).  $10^0$  Plasmidkopien konnten noch in einem von drei Replikaten detektiert werden. Die Effizienz betrug 91 %. Die Wiederholbarkeit der real-time PCR erwies sich als hervorragend mit sehr niedrigen Variationskoeffizienten, die sich mit steigender Verdünnung deutlicher manifestierten (Tab. 2).

### Sendai-Virus als interne Kontrolle und GAPDH-Kontrolle für zelluläre Proben

Als interne Hemmungs-Kontrolle für die real-time RT-PCR und für die klassische RT-PCR wurden Primer zur Amplifikation von Sendai-Virus verwendet, das den Proben vor der RNA-Isolation beigemischt wurde. Spermaproben zeigten im Gegensatz zu Zellkulturüberständen

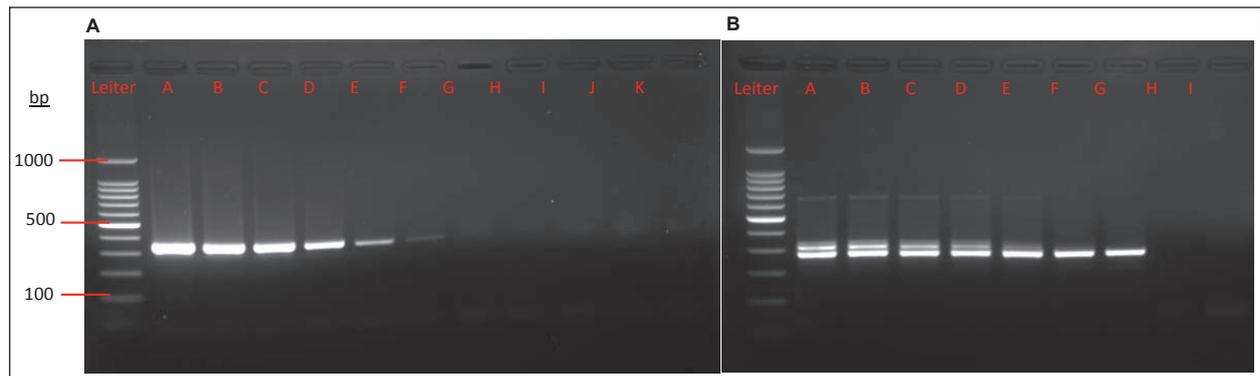


Abbildung 1: hnRT-PCR Amplifikation einer Verdünnungsreihe des Bucyrus-Virus.

(A) Eine sichtbare Amplifikation konnte nach der ersten Runde der Amplifikation bis zu einer Verdünnung von  $10^{-5}$  (Bahn F) gerade noch festgestellt werden. A = Bucyrus unverdünnt; B–I = Bucyrus  $10^{-1}$ – $10^{-8}$ ; J = negative Isolationskontrolle; K = negative PCR-Kontrolle; Leiter = Standard zur Bestimmung der Grösse des Amplifikationsprodukts. (B) Zweite Runde der Amplifikation: Bucyrus-Virus  $10^0$  bis  $10^{-8}$  (Bahnen A–I).

Tabelle 2: Verdünnungsreihe des Bucyrus-Plasmids.

Verdünnung	Anz. Kopien/5 µl	CT-Wert 1	CT-Wert 2	CT-Wert 3	MW +/- SD	CV (%)
1	$10^6$	22.56	22.5	22.46	22.51 +/- 0.05	0.22
2	$10^5$	26.49	26.48	26.52	26.5 +/- 0.02	0.08
3	$10^4$	30.06	30.1	30.08	30.08 +/- 0.02	0.07
4	$10^3$	33.39	33.54	33.63	33.52 +/- 0.12	0.36
5	$10^2$	36.92	37.2	37.43	37.18 +/- 0.26	0.69
6	$10^1$	42.45	41.67	40.21	41.44 +/- 1.14	2.74
7	$10^0$	-	41.98	-	-	-

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient

## 532 Originalarbeiten/Original contributions

oft eine deutliche Hemmung der Sendai-Kontrolle. Als interne Kontrolle zur Sicherstellung des Vorhandenseins von klinischem Material bei zellreichen Proben diente die Amplifikation von GAPDH. Die Amplifikation des PCR-Fragments mit einer Grösse von 125 bp konnte in mit Ethidium-Bromid gefärbtem Agarose-Gel bei allen EAV-positiven Zellkulturüberständen nachgewiesen werden.

### Diagnostische Breite der RT-PCR Techniken

Insgesamt wurden 11 Zellkulturüberstände von Anzuchten verschiedener EAV-Isolate und 7 EAV-positive Spermaproben mit den 3 RT-PCR Methoden getestet (Tab. 3). Mittels einfacher RT-PCR konnten 17 von 18 Proben nachgewiesen und anschliessend sequenziert werden. Nur eine Spermaprobe (Probe 16) lieferte ein negatives Resultat. In der hnRT-PCR lieferten alle 18 Proben ein positives Resultat. Hier waren alle Proben bereits nach der ersten Amplifikationsrunde als positiv zu bewerten, wobei die Spermaprobe (Probe 16) als einzige Probe nur eine schwache Bande zeigte. Mit der real-time RT-PCR konnten alle 18 Proben mit einem CT-Wert < 34 als positiv bewertet werden (Tab. 3). Spermaproben (Proben

12–18) wiesen i. d. R. signifikant höhere CT-Werte auf (22.9–33.8) als Zellkulturüberstände (Proben 1, 2, 4–11; 16.0–19.2). Drei von sieben Spermaproben (Proben 12, 14, 16) mussten jedoch wegen starker Hemmung der PCR 1:10 verdünnt werden.

### Sequenzierung der Amplifikationsprodukte und phylogenetische Analyse

Alle spezifischen Amplifikationsprodukte der EAV-Isolate und EAV-positiven Spermaproben wurden sequenziert. Für die phylogenetische Analyse der 17 Sequenzen im Bereich der Leader Sequenz von EAV (LS; Tab. 4) wurden zusätzlich die entsprechenden Abschnitte von 19 Sequenzen aus GenBank herangezogen. Die LS-Sequenzen wiesen untereinander im paarweisen Vergleich auf Nukleotidebene eine Ähnlichkeit von 86.0–98.4% auf. Die phylogenetische Analyse zeigte in Bezug auf die bekannte Aufteilung von EAV-Sequenzen in 3 Subgruppen (EAV1 = europäische Gruppe 1; EAV3 = europäische Gruppe 2; EAV2 = nordamerikanische Gruppe) eine disperse Verteilung der neu erhobenen Sequenzen. Wie in Abb. 2 ersichtlich, konnten EAV-Sequenzen von Proben

Tabelle 3: Virusisolate und Spermaproben sowie deren PCR-Resultate.

	Virusisolat	Bezeichnung	Quelle	Jahr	RT-PCR	hnRT-PCR	Real-time RT-PCR
1	Bibuna – 269/64	Bibu64SuCH	IVV	1964	+	+	17.9
2	Bucyrus – 520/64	Bucy64SuUS	IVV	1964	+	+	19.2
3	Sup – 1367/88	136788SuCH	IVV	1988	+ <sup>b</sup>	+	27.3
4	Sup – 287/95	028795SuCH	IVV	1995	+	+	16.6
5	Sup – 288/95	028895SuCH	IVV	1995	+	+	18.8
6	Sup – 217/96	ITP096SuCH	IVV	1996	+	+	18.0
7	Swe1 – VA	Swe112SuUS	SVA	2012 <sup>1</sup>	+	+	16.0
8	Swe2 – 1542	Swe212SuUS	SVA	2012 <sup>1</sup>	+	+	16.8
9	Swe3 – 436	Swe312SuPL	SVA	2012 <sup>1</sup>	+	+	17.4
10	Swe4 – 414B	Swe412SuUS	SVA	2012 <sup>1</sup>	+	+	17.4
11	Swe5 – 8118	Swe512SuUS	SVA	2012 <sup>1</sup>	+	+	16.3
12	Sem – 802/93	Stal93SeCH	IVV	1993	+ <sup>b</sup>	+	29.9
13	Sem – 1/94	000194SeCH	IVV	1994	+	+	22.9
14	Sem – 3/94	000394SeCH <sup>a</sup>	IVV	1994	+	+	27.5
15	Sem – 4/94	000494SeCH	IVV	1994	+	+	27.2
16	Sem – 1355/94	135594SeCH <sup>a</sup>	IVV	1994	-	(+)	33.8
17	Sem – 2002	Stal02SeCH	ISME	2002	+	+	28.9
18	Sem – 18/11	001811SeCH	ISME	2011	+ <sup>b</sup>	+	27.5

Die Isolate und Spermaproben sind nach Herkunft und chronologischer Reihenfolge aufgeführt. Die Bezeichnung der Proben wurde wie folgt zusammengesetzt: Name/Nummer des Isolates (4×), Isolationsjahr (2×), Zellkulturüberstand (Su) oder Spermaprobe (Se), und Herkunft (2×) anhand des 2-stelligen ISO-Ländercodes

Quelle: IVV = Institut für Veterinär-Virologie, Bern, Schweiz; SVA = National Veterinary Institute, Uppsala, Schweden; ISME = Institut suisse de médecine équine in Avenches, Schweiz

<sup>1</sup> Isolate in diesem Jahr erhalten

<sup>a</sup> Spermaproben, die aufgrund einer starken Hemmung der PCR 1:10 verdünnt werden mussten

<sup>b</sup> Spermaproben mit spezifischen und unspezifischen Amplifikationsprodukten

(+) schwach positive Reaktion

aus der Schweiz entweder den bekannten Subgruppen EAV1 und EAV2 zugeordnet werden oder lagen einzeln sowie in weiteren Untergruppen (a) und (b) dazwischen. Weitere, aus Schweden erhaltene Isolate aus den USA und Polen lagen sowohl innerhalb als auch ausserhalb bekannter Subgruppen. Die Abspaltung der Untergruppen (a) und (b) mit EAV-Sequenzen aus der Schweiz und aus

Schweden von den bekannten Subgruppen erwies sich als signifikant (probability of partitions  $p = 100\%$  resp.  $94\%$  für Subgruppe (a) resp. (b), Sanchez et al., 2011; Abb. 2). Die 18 Sequenzen im Bereich des Open Reading Frame 7 von EAV (ORF7; Tab. 4) wurden zusammen mit 49 Sequenzen aus GenBank phylogenetisch analysiert. Die ORF7-Sequenzen wiesen auf Nukleotidebene unter-

Tabelle 4: Eigene EAV-Sequenzen im Bereich der Leader Sequenz (LS) und des Open Reading Frame 7 (ORF7).

GB-Nummer	Genom- abschnitt	Name der Sequenz	Herkunft	Land	Subgruppe <sup>1</sup>	Bucyrus (DQ846750)
n. a.	LS	Bibu64SuCH	IVV	CH		55–183
n. a.	LS	Bucy64SuCH	IVV	USA	EAV2	55–183
n. a.	LS	136788SuCH	IVV	CH	EAV2	55–183
n. a.	LS	028795SuCH	IVV	CH		55–183
n. a.	LS	028895SuCH	IVV	CH		55–183
n. a.	LS	ITP096SuCH	IVV	CH		55–183
n. a.	LS	Swe112SuUS	SVA	USA	EAV2	55–183
n. a.	LS	Swe212SuUS	SVA	USA		55–183
n. a.	LS	Swe312SuPL	SVA	Polen		55–183
n. a.	LS	Swe412SuUS	SVA	USA	EAV2	55–183
n. a.	LS	Swe512SuUS	SVA	USA		55–183
n. a.	LS	Stal93SeCH	IVV	CH		55–183
n. a.	LS	000194SeCH	IVV	CH		55–183
n. a.	LS	000394SeCH	IVV	CH		55–183
n. a.	LS	000494SeCH	IVV	CH		55–183
n. a.	LS	Stal02SeCH	ISME	CH	EAV1	55–183
n. a.	LS	001811SeCH	ISME	CH	EAV1	55–183
KF484498	ORF7	Bibu64SuCH	IVV	CH		12330–12638
KF484499	ORF7	Bucy64SuUS	IVV	USA	EAV2	12330–12638
KF484503	ORF7	136788SuCH	IVV	CH	EAV2	12332–12638
KF484500	ORF7	028795SuCH	IVV	CH		12330–12638
KF484501	ORF7	028895SuCH	IVV	CH		12332–12638
KF484502	ORF7	ITP096SuCH	IVV	CH		12330–12638
KF484504	ORF7	Swe112SuUS	SVA	USA	EAV2	12330–12638
KF484505	ORF7	Swe212SuUS	SVA	USA	EAV1	12330–12638
KF484506	ORF7	Swe312SuPL	SVA	Polen		12330–12638
KF484507	ORF7	Swe412SuUS	SVA	USA	EAV2	12330–12638
KF484508	ORF7	Swe512SuUS	SVA	USA		12330–12638
KF515624	ORF7	Stal93SeCH	IVV	CH		12332–12638
KF515625	ORF7	000194SeCH	IVV	CH		12332–12638
KF515626	ORF7	000394SeCH	IVV	CH		12332–12638
KF515627	ORF7	000494SeCH	IVV	CH		12332–12638
KF515628	ORF7	135594SeCH	IVV	CH	EAV1	12332–12638
KF515629	ORF7	Stal02SeCH	ISME	CH	EAV1	12332–12638
KF515630	ORF7	001811SeCH	ISME	CH	EAV1	12332–12638

IVV: eigene Proben; SVA: aus Schweden; ISME: Institut suisse de médecine équine in Avenches, Schweiz; n.a.: nicht anwendbar

<sup>1</sup> Eindeutige phylogenetische Zuordnung zu einer der bekannten Subgruppen: EAV1 = europäische Gruppe 1; EAV3 = europäische Gruppe 2; EAV2 = nordamerikanische Gruppe

## 534 Originalarbeiten/Original contributions

einander im paarweisen Vergleich eine Ähnlichkeit von 72–99 % auf. Die Verteilung der EAV-Sequenzen aus der Schweiz entsprach weitgehend derjenigen im LS-Abschnitt. Auch weitere Isolate aus Schweden waren wie bei LS über verschiedene Subgruppen verteilt. Homogen als eigene Subgruppe traten Sequenzen aus Slowenien auf. In diesem Verwandtschaftsbaum reichte die statistische Unterstützung für die bekannten Subgruppen von 76 % (Subgruppe 3) bis 96 % (Subgruppe 1), wobei die Abtrennung der Subgruppen (a) und (b) hoch signifikant war ( $p = 100\%$ , Abb. 3).

## Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, PCR-Methoden für den Nachweis von EAV aus diagnostischen Proben zu entwickeln.

Der als Standardmethode beschriebene klassische Virusnachweis mittels Isolation in Zellkulturen gilt als empfindlich und zuverlässig (Office International des Epizooties, 2013), ist jedoch zeitaufwändig und teuer. PCR-basierte Methoden sind bekannt für ihre hohe Sensitivität und rasche Durchführbarkeit. Für den Nachweis von EAV wurden sowohl klassische RT-PCR Methoden (Chirnside and Spaan, 1990; den Boon et al., 1991; Sekiguchi et al., 1995; Gilbert et al., 1997; Stadejek et al., 1999; Westcott et al., 2003; Balasuriya et al., 2004; Hornyak et al., 2005; Morrell and Geraghty, 2006; Mittelholzer et al., 2006), wie auch real-time RT-PCR Methoden (Balasuriya et al., 2002; Mankoc et al., 2007; Lu et al., 2008; Broaddus et al., 2011) beschrieben. Zwei klassische PCR-Methoden auf 2 verschiedenen Genomabschnitten (Chirnside and Spaan, 1990; St Laurent et al., 1994) und eine real-time RT-PCR Methode (Balasuriya et al., 2002) wurden

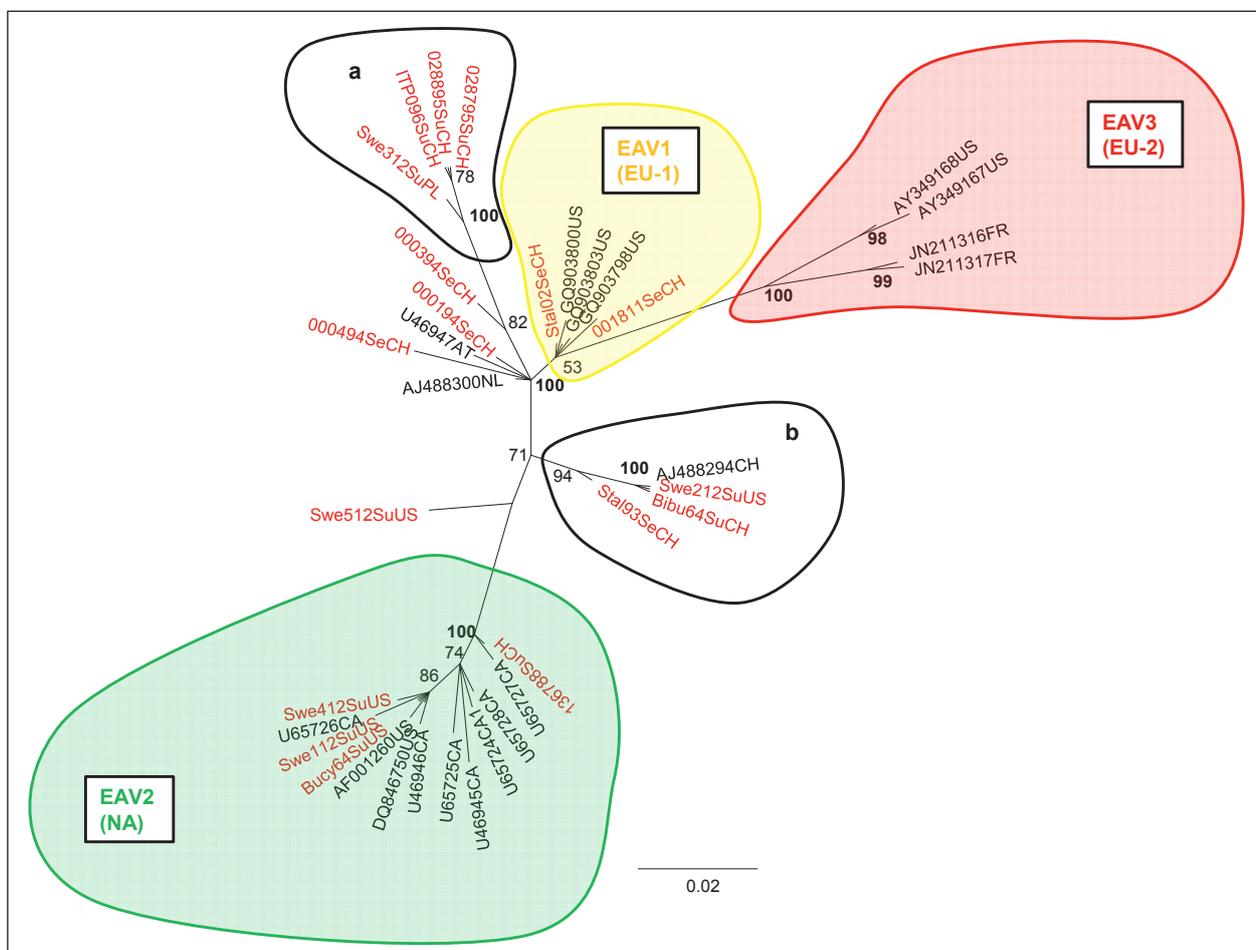


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum mit EAV-Sequenzen im LS-Abschnitt.

Der phylogenetische Baum der 129 bp grossen DNA-Fragmente der Leader Sequenz (LS) wurde mittels Phylemon2 nach MrBayes v3.2.0 (Sanchez et al., 2011) rekonstruiert. Die Länge der Äste entspricht den phylogenetischen Distanzen zwischen den verschiedenen Sequenzen (Skala in Substitutionen pro Sequenzposition). Die Zahlen entsprechen der statistischen Wahrscheinlichkeit der darunterliegenden Gruppierung (probability of partitions, Sanchez et al., 2011). Die bekannten Subgruppen EAV1 (EU-1, europäische Gruppe 1), EAV3 (EU-2, europäische Gruppe 2), EAV2 (NA, nordamerikanische Gruppe) und 2 neue Subgruppen a und b sind gekennzeichnet. Die 17 Sequenzen, welche in dieser Arbeit erhoben wurden, sind in roter Farbe dargestellt. Sequenzen von Proben, die ursprünglich aus der Schweiz stammen, sind an der Endung «CH» erkennbar.



**536 Originalarbeiten/Original contributions**

für diese Arbeit ausgewählt und optimiert. Die bessere Eignung unserer RT-PCR im Vergleich zur publizierten Methode (St Laurent et al., 1994) konnte beim schweizerischen Isolat «Bibuna» gezeigt werden. Mit Ausnahme einer schwach positiven Probe, die in der einfachen RT-PCR im LS-Abschnitt negativ reagierte, konnte mit den adaptierten PCR-Techniken das ganze zur Verfügung stehende Spektrum an Isolaten und positiven Proben diagnostisch nachgewiesen werden.

Die real-time RT-PCR gilt im Vergleich zur klassischen PCR als sensitiver mit geringerer Kontaminationsgefahr und höherer Effizienz aufgrund der Möglichkeit zur Automatisierung. In dieser Arbeit konnte die aussergewöhnlich hohe Sensitivität der real-time RT-PCR bestätigt werden. Dies ist im Hinblick auf die Untersuchung von Spermaproben, die in der PCR oft reaktionshemmend sind (Givens et al., 2003; Givens and Waldrop, 2004; Office International des Epizooties, 2013) von Vorteil. Die Eignung der PCR-Techniken für weitere klinische Proben wie fetalem Organmaterial, Nasen-(Rachen)-Tupfern oder EDTA-Blut, konnte gezeigt werden. Die phylogenetische Analyse der in dieser Arbeit neu erhobenen Sequenzen konnte im Wesentlichen die bekannte Einordnung der EAV-Isolate in die 3 Unter-

gruppen «EAV1», «EAV2» und «EAV3» bestätigen (Stadejek et al., 1999; Mankoc et al., 2007; Larska and Rola, 2008). Sowohl in den analysierten LS- wie auch in den ORF7-Abschnitten gab es Hinweise auf weitere, bisher nicht näher charakterisierte verwandtschaftliche Linien oder auf mehr EAV-Subgruppen als bisher beschrieben (Abb. 2, Abb. 3; Subgruppen a und b). Auffällig war generell die internationale Durchmischung der EAV-Sequenzen, was auf die globalisierte Pferdezucht und den regen weltweiten Tierverkehr und Pferdehandel hinweist. Die hohe Sensitivität und Effizienz der neuen Techniken sollten es erlauben, für die Schweiz Daten zur EAV-Prävalenz zu erheben, die zur Zeit fehlen.

**Dank**

Wir danken Claudia Baule und Sándor Belák vom National Veterinary Institute (SVA) in Uppsala, Schweden für das Bereitstellen von EAV-Isolaten. Ein weiterer Dank geht ebenfalls an die Mitarbeitenden des Instituts für Veterinär-Virologie, insbesondere Andrea Deubelbeiss, Susanne Aeschbacher, Martina Deubelbeiss und Laure Blatti-Cardinaux.

**Développement d'une PCR pour la mise en évidence d'infections par EAV**

Le but de ce travail était de développer, comme alternative à l'isolation, une méthode de RT-PCR (en temps réel) pour le diagnostic rapide de l'EAV et pour la caractérisation des souches virales. Pour cela, on a adapté deux méthodes de RT-PCR conventionnelles et une de RT-PCR en temps réel, de manière à ce qu'un spectre aussi large que possible d'isolats soit démontrable. Les lignées de dilution avec la souche Bucyrus ont montré une sensibilité cent fois plus élevée avec la RT-PCR en temps réel et avec la RT-PCR hémiméstrée qu'avec la RT-PCR simple. L'efficacité des méthodes a pu être démontrée avec 11 surnageants de cultures cellulaires de divers isolats d'EAV et 7 échantillons de sperme positifs à l'EAV. L'analyse phylogénétique des séquences des échantillons par rapport à des séquences connues laisse penser qu'il existe plus de sous-groupes d'EAV que décrit jusqu'à ce jour.

**Sviluppo di una PCR per il rilevamento di un'infezione EAV**

Lo scopo di questo studio era di sviluppare un'alternativa ai metodi (real-time) RT-PCR adeguati all'isolamento, per la diagnosi rapida di EAV e per la caratterizzazione epidemiologica molecolare dei ceppi virali. A questo scopo, due metodi convenzionali di RT-PCR e uno di real-time RT-PCR sono stati adattati in modo che la più ampia gamma di isolati venisse rilevata. La serie di diluizioni con il ceppo Bucyrus ha segnalato una sensibilità cento volte maggiore con metodica real-time e hémiméstrée RT-PCR rispetto alla semplice RT-PCR. L'adeguatezza del metodo è stata dimostrata da 11 cellule di coltura surnatanti di diversi isolati EAV e 7 campioni di sperma EAV positivi. L'analisi filogenetica delle sequenze dei campioni propri con sequenze note ha rivelato evidenze di più sottogruppi EAV, come precedentemente descritto.

## Literatur

- Balasuriya U. B., Leutenegger C. M., Topol J. B., McCollum W. H., Timoney P. J., MacLachlan N. J.: Detection of equine arteritis virus by real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay. *J. Virol. Methods* 2002, 101: 21–28.
- Balasuriya U. B. R., Hedges J. F., Smalley V. L., Navarrette A., McCollum W. H., Timoney P. J., Snijder E. J., MacLachlan N. J.: Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J. Gen. Virol.* 2004, 85: 379–390.
- Broadbent C. C., Balasuriya U. B. R., Timoney P. J., White J. L. R., Maldoski C., Torrisi K., Payton M., Holyoak G. R.: Infection of embryos following insemination of donor mares with equine arteritis virus infective semen. *Theriogenology* 2011, 76: 47–60.
- Chirnside E. D., Spaan W. J. M.: Reverse transcription and cDNA amplification by the polymerase chain reaction of equine arteritis virus (EAV). *J. Virol. Methods* 1990, 30: 133–140.
- den Boon J. A., Snijder E. J., Chirnside E. D., de Vries A. A., Horzinek M. C., Spaan W. J.: Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronaviruslike superfamily. *J. Virol.* 1991, 65: 2910–2920.
- Gilbert S. A., Timoney P. J., McCollum W. H., Deregt D.: Detection of equine arteritis virus in the semen of carrier stallions by using a sensitive nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35: 2181–2183.
- Givens M. D., Heath A. M., Carson R. L., Brock K. V., Edens M. S. D., Wenzel J. G. W., Stringfellow D. A.: Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in semen samples from the Southeastern United States. *Vet. Microbiol.* 2003, 96: 145–155.
- Givens M. D., Waldrop J. G.: Bovine viral diarrhoea virus in embryo and semen production systems. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2004, 20: 21–38.
- Hornyak A., Bakonyi T., Tekes G., Szeredi L., Rusvai M.: A novel subgroup among genotypes of equine arteritis virus: Genetic comparison of 40 strains. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2005, 52: 112–118.
- Kaerber G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 1931, 162: 480–487.
- Kaiser D.: Entwicklung und Evaluation eines RT-TaqMan-PCR Testverfahrens zum Nachweis des BVD-Virus. *Veterinär-Medizinische Dissertation, Universität Bern, 2001.*
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G.: Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007, 23: 2947–2948.
- Larska M., Rola J.: Molecular epizootiology of equine arteritis virus isolates from Poland. *Vet. Microbiol.* 2008, 127: 392–398.
- Lu Z. C., Branscum A. J., Shuck K. M., Zhang J. Q., Dubovi E. J., Timoney P. J., Balasuriya U. B. R.: Comparison of two real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of Equine arteritis virus nucleic acid in equine semen and tissue culture fluid. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008, 20: 147–155.
- Mankoc S., Hostnik P., Grom J., Toplak I., Klobucar I., Kosec M., Barlic-Maganja D.: Comparison of different molecular methods for assessment of equine arteritis virus (EAV) infection: A novel one-step MGB real-time RT-PCR assay, PCR-ELISA and classical RT-PCR for detection of highly diverse sequences of Slovenian EAV variants. *J. Virol. Methods* 2007, 146: 341–354.
- Mittelholzer C., Johansson I., Olsson A. K., Roneus M., Klingeborn B., Belak S.: Recovery of Swedish Equine arteritis viruses from semen by cell culture isolation and RNA transfection. *J. Virol. Methods* 2006, 133: 48–52.
- Morrell J. M., Geraghty R. M.: Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen. *Equine Vet. J.* 2006, 38: 224–229.
- Murphy T. W., McCollum W. H., Timoney P. J., Klingeborn B. W., Hyllseth B., Golnik W., Erasmus B.: Genomic variability among globally distributed isolates of equine arteritis virus. *Vet. Microbiol.* 1992, 32: 101–115.
- Nicholas K. B., Nicholas H. B. J., Deerfield D. W. II.: GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW. NEWS* 1997, 4: 14.
- Office International des Epizooties: Equine Viral Arteritis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Ed. Office International des Epizooties, Office International des Epizooties, Paris, 2013, 1–16.
- Ramina A., Dalla V. L., De Mas S., Tisato E., Zuin A., Renier M., Cuteri V., Valente C., Cancellotti F. M.: Detection of equine arteritis virus in semen by reverse transcriptase polymerase chain reaction-ELISA. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1999, 22: 187–197.
- Ravazzolo A. P., Nenci C., Vogt H. R., Waldvogel A., Obexer-Ruff G., Peterhans E., Bertoni G.: Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology* 2006, 350: 116–127.
- Sanchez R., Serra F., Tarraga J., Medina I., Carbonell J., Pulido L., de Maria A., Capella-Gutierrez S., Huerta-Cepas J., Gabaldon T., Dopazo J., Dopazo H.: Phylemon 2.0: a suite of web-tools for molecular evolution, phylogenetics, phylogenomics and hypotheses testing. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39: W470–W474.
- Sekiguchi K., Sugita S., Fukunaga Y., Kondo T., Wada R., Kamada M., Yamaguchi S.: Detection of equine arteritis virus (EAV) by polymerase chain reaction (PCR) and differentiation of EAV strains by restriction enzyme analysis of PCR products. *Arch. Virol.* 1995, 140: 1483–1491.
- Spearman C.: The method of “right or wrong cases” (constant stimuli) without Gauss’s formulae. *Brit. J. Psychol.* 1908, 2: 227–242.
- St Laurent G., Morin G., Archambault D.: Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and non-structural viral genes by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32: 658–665.
- Stadejek T., Bjorklund H., Bascunana C. R., Ciabatti I. M., Scicluna M. T., Amaddeo D., McCollum W. H., Autorino G. L., Timoney P. J., Paton D. J., Klingeborn B., Belak S.: Genetic diversity of equine arteritis virus. *J. Gen. Virol.* 1999, 80 (Pt 3): 691–699.

## 538 Originalarbeiten/Original contributions

*Starick E.*: Rapid and sensitive detection of equine arteritis virus in semen and tissue samples by reverse transcription-polymerase chain reaction, dot blot hybridisation and nested polymerase chain reaction. *Acta Virol.* 1998, 42: 333–339.

*Timoney P. J., McCollum W. H.*: Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 1993, 9: 295–309.

*Timoney P. J., McCollum W. H.*: Equine viral arteritis: further characterization of the carrier state in stallions. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 2000, 3–11.

*Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W., Murphy T. W.*: Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Res. Vet. Sci.* 1986, 41: 279–280.

*Westcott D. G., King D. P., Drew T. W., Nowotny N., Kindermann J., Hannant D., Belak S., Paton D. J.*: Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes. *Vet. Res.* 2003, 34: 165–176.

### Korrespondenz

Prof. Dr. R. Zanoni  
Institut für Virologie und Immunologie IVI  
Länggass-Strasse 122  
3012 Bern  
Schweiz  
zanoni@vetsuisse.unibe.ch

*Manuskripteingang: 17. Dezember 2013*

*Angenommen: 16. Januar 2014*