

EHV-1 Ausbruch im Pferdestall

Projektleitung:
Dr. med. vet.
Julia Lechmann

Transkriptomanalyse von equinen und viralen Genen im Blut von akut und latent mit EHV-1 infizierten Pferden

Die vorliegende Studie untersucht einen natürlichen EHV-1 Ausbruch in einem Pferdestall, nachdem eines der Pferde mit neurologischen Symptomen in der Klinik für Pferdemedizin am Tierspital in Zürich vorgestellt und positiv auf EHV-1 getestet worden ist. Dieser Indexfall und die 34 Kontaktpferde wurden anschliessend unter Besitzereverständnis über sechs Monate in Nasentupfer und allenfalls Blut beprobt.

Ziel der Studie

Ziel der Studie ist, einen natürlichen EHV-1 Ausbruch über eine längere Periode zu verfolgen. Um das Infektionsgeschehen und die Virusbiologie besser zu verstehen, soll der Verlauf einer natürlichen EHV-1 Infektion mittels verschiedener Labormethoden genauer beleuchtet werden.

Klinische Relevanz

Obwohl EHV-1 Ausbrüche regelmässig beschrieben werden, ist noch nicht klar, welche viralen und Wirtsfaktoren zu den unterschiedlichen Verläufen beitragen. In Anlehnung an ein vorheriges Projekt (PR 2020-09), wurde das Analysespektrum der vorliegenden Studie um die RNA-Sequenzierung zur Analyse des Transkriptoms in equinen mononukleären Blutzellen erweitert.

Bisherige Ergebnisse

Ausser dem Indexfall entwickelte keines der Pferde klinische Symptome. Von 21 EHV-1 positiv getesteten Pferde waren im Untersuchungszeitraum 13 sowohl im Nasentupfer (Ausscheidung) als auch im Blut (Virämie) positiv, die übrigen acht waren nur im Nasentupfer positiv. Mit Ausnahme von Pferd 14 endete die Virusausscheidung innerhalb von 2-3 Wochen. Eine – teilweise intermittierende – Virämie konnte bis Tag 21 Nach Beprobungsbeginn festgestellt werden, aber höchstens an zwei aufeinanderfolgenden Testdaten pro Pferd (Abb. 1).

Bei allen EHV-1 positiven Pferden wurde die NNP-Variante (A2254) nachgewiesen, was frühere Beobachtungen bestätigt, dass diese Punktmutation allein kein zuverlässiger Indikator für den klinischen Verlauf ist.

Die meisten Pferde entwickelten eine Antikörperantwort gegen EHV-1, wobei der Anstieg beim Indexfall (Pferd 6) am deutlichsten, das Antikörperlevel an Tag 203 aber wieder auf tiefem Niveau war. Einzelne Pferde mit vorbestehendem, erhöhtem Level zeigten über die Zeit eine Abnahme in der Antikörperantwort (Pferd 16 und 22) (Abb. 2).

ID	T -1	T 0	T 2	T 7	T 14	T 21	T 42	T 83	T 132	T 203
4	NT	32	26	37	36	38	-	-	-	-
	Blut	-	31,70	-	-	38,40	-	-	-	-
5	NT	-	-	-	32	-	-	-	-	-
	Blut	-	kein Buffy	kein Buffy	kein Buffy	-	-	-	-	-
6	NT	18	18	31	31	39	39	-	-	-
	Blut	36,00	29,70	-	-	-	-	-	-	-
7	NT	31	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blut	-	39,00	-	-	37,30	-	-	-	-
8	NT	-	-	37	-	-	-	-	-	-
	Blut	-	-	37,60	-	37,90	-	-	-	-
9	NT	29	33	-	-	-	-	-	-	-
	Blut	-	35,90	-	-	-	-	-	-	-
11	NT	36	38	33	-	-	-	-	-	-
	Blut	-	-	37,00	kein Buffy	kein Buffy	kein Buffy	-	-	-
14	NT	29	-	33	39	-	37	-	-	-
	Blut	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	NT	23	31	-	-	-	-	-	-	-
	Blut	39,90	-	38,20	-	-	-	-	-	-
17	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	39
	Blut	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	NT	17	-	39	-	-	-	-	-	-
	Blut	35,50	37,20	-	-	-	-	-	-	-
21	NT	-	-	-	-	35	-	-	-	-
	Blut	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	NT	35	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blut	39,30	-	-	-	-	-	-	-	-
23	NT	35	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blut	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	NT	35	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blut	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	NT	-	-	-	-	36	-	-	-	-
	Blut	-	-	-	-	36,10	-	-	-	-
28	NT	36	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blut	-	-	kein Buffy	kein Buffy	kein Buffy	-	-	-	-
29	NT	22	25	26	-	-	-	-	-	-
	Blut	34,70	39,10	-	-	-	-	-	-	-
31	NT	35	-	-	29	28	-	-	-	-
	Blut	-	-	38,10	-	-	-	-	-	-
32	NT	36	-	-	-	-	-	-	-	-
	Blut	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	NT	-	-	27	31	-	-	-	-	-
	Blut	-	-	31,40	-	-	-	-	-	-

Abb. 1

Abbildung 1: rtPCR-Ergebnisse aus Nasentupfer (= NT, blau) und EDTA-Blut (grün), dunkelblau = starke Ausscheidung im Nasentupfer (Ct < 30), blau = milde Ausscheidung (Ct ≥ 30), hellblau = keine Ausscheidung; dunkelgrün = starke Virämie (Ct < 30), blau = milde Virämie (Ct ≥ 30), hellblau = keine Virämie

Abbildung 2: Verlauf der EHV-1 Antikörper, getestet mit dem SVANOVIR EHV1/EHV4-Ab Kit (Svanova, Uppsala, Schweden). Negativ: OD < 0.1, positiv: OD > 0.2, fraglich: OD 0.1 – 0.2 (hellroter Balken)

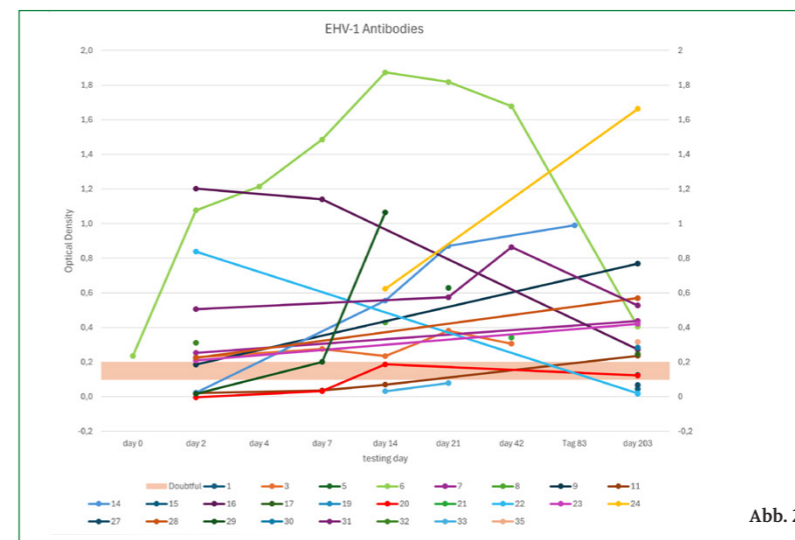


Abb. 2

Material	Methode	Zweck/Ziel
eNAT-Nasentupfer	EHV-1/4 multiplex rtPCR EHV-1 NNP/NP PCR NGS	Viral DNA (Ausscheidung) Unterscheidung NNP und NP EHV-1 Genomsequenz
	gB/ LAT RT-rtPCR	Virale mRNA (lytisch replizierend vs. latent)
EDTA-Blut	EHV-1/4 multiplex rtPCR	Virale DNA (Virämie)
UTM-Nasentupfer	Virusisolation auf Zellkultur	Infektiosität
Vollblut/Serum	EHV-1/4 Antikörper ELISA	Serumantikörper
Tempus-Blut	RNA bulk sequencing	mRNA (Genexpression Virus & Wirt)

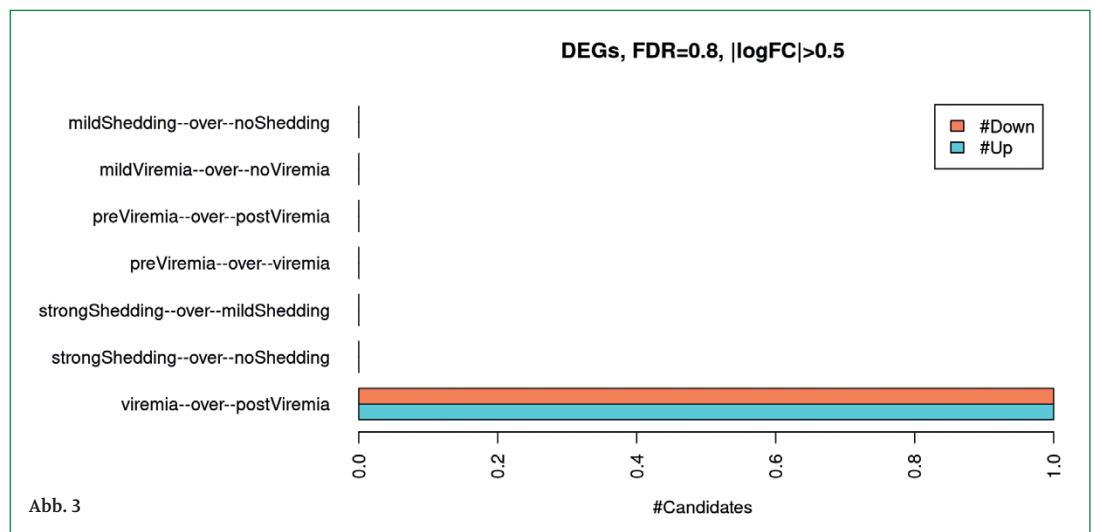
Tab. 1

Tabelle 1:
Material, Ziel, Methode

Sechzehn Tempus-Blutproben von sechs Pferden wurden mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Anhand der rtPCR-Ergebnisse aus Nasentupfern und Blut wurden Gruppen gebildet und das Transkriptom verglichen (Abb. 3, Y-Achse), um Unterschiede in der Genexpression zu finden. Lediglich im Vergleich ‘Virämie vs. Post-Virämie’ wurden signifikante Unterschiede in der Genexpression gefunden. Das MMP9-Gen war während der Virämie runterreguliert, das PLVAP-Gen hochreguliert.

Ausblick

Die Virusisolierung mit Nasentupfern EHV-1 positiver Pferde ist abgeschlossen. Die infizierten Zellen und der Zellkulturüberstand werden demnächst mittels EHV-1/4 multiplex rtPCR untersucht, um das Vorhandensein infektiöser EHV-1 Partikel zu bestätigen. EHV-1 Isolate oder EHV-1 positive Proben-DNA werden anschliessend mittels NGS analysiert, um die Genomsequenz der EHV-1 Viren bei den einzelnen Pferden zu bestimmen und untereinander zu vergleichen. Ebenfalls wird in den kommenden Wochen die RT-rtPCR zur Unterscheidung von latenter und aktiver Infektion in EHV-1 positiven Proben durchgeführt.



Differentially expressed genes (DEG)	Eigenschaften
MMP9 (reduziert in Virämie)	Involviert in Kollagen-Abbauprozessen, Organisation der extrazellulären Matrix, Proteolyse
PLVAP (vermehrt in Virämie)	Involviert in positiver Regulation der zellulären Extravasation, Gefässpermeabilität

Tab. 2