Entwicklung einer real-time RT-PCR zum Nachweis von equinem Influenzavirus

S. Aeschbacher[1], E. Santschi[1], V. Gerber[2], H. P. Stalder[1], R. G. Zanoni[1]

[1] Institut für Virologie und Immunologie, Bern, [2] Institut suisse de médecine équine (ISME), Universität Bern und Agroscope, Bern

DOI 10.17236/sat00015

Eingereicht: 10.07.2014
Angenommen: 22.08.2014

Zusammenfassung

Equine Influenza ist eine durch Influenza A-Viren verursachte, kontagiöse Respirationserkrankung beim Pferd. In dieser Arbeit wurde eine real-time RT-PCR in einem konservierten Abschnitt des Matrix-Segments des viralen Genoms für die schnelle und sensitive Diagnose von equinen Influenzaviren (EIV) und je eine RT-PCR Methode im Matrix- und im HA-Segment für die molekular-epidemiologische Charakterisierung der Viren entwickelt. Die Primer der real-time RT-PCR sind zu 99.4% der bekannten EIV-Sequenzen und zu 97.7% aller Influenza A-Sequenzen homolog. Die Homologie der Minor Groove Binder (MGB)-Sonde lag bei 99.3% und 99.6%. Diese hohen Werte ermöglichen die Anwendung des Assays für Influenzaviren bei anderen Spezies. Die diagnostische Eignung der Methode wurde mit Hilfe von 20 equinen, 11 porcinen sowie 2 aviären Proben verifiziert. Eine hohe Spezifität für Influenzaviren wurde experimentell und mittels Software-Simulation gezeigt. Die analytische Sensitivität des Tests lag bei 10^2–10^3 RNA-Kopien und 10^0–10^1 DNA-Kopien, was den Virusnachweis auch bei geringer Virusausscheidung ermöglicht. Alle amplifizierten EIV-Sequenzen konnten phylogenetisch den bekannten Linien zugeordnet werden.

Schlüsselwörter: equines Influenzavirus, real-time RT-PCR, MGB-Sonde, molekulare Epidemiologie, Diagnostik

Development of a real-time RT-PCR for detection of equine influenza virus

Equine influenza is a highly contagious respiratory disease in horses caused by influenza A viruses. In this work a real-time RT-PCR for fast and sensitive diagnosis of equine influenza viruses (EIV) targeting a highly conserved region of the matrix gene was developed. In addition two RT-PCR methods for the amplification of large parts of the matrix- and HA gene were adapted for molecular-epidemiological characterization of viruses. The primers of the real-time RT-PCR had homologies of 99.4% to EIV- and 97.7% to all influenza A viral sequences, whereas the minor groove binder (MGB) probe showed homologies of 99.3% and 99.6%, respectively. These high values allow application of the assay for influenza viruses in other species. Using 20 equine, 11 porcine and 2 avian samples, diagnostic suitability of the assay was confirmed. High specificity for influenza viruses was shown both experimentally and by software simulation. The assay analytical sensitivity was at 10^2–10^3 copies of RNA and 10^0–10^1 copies of DNA, respectively. This allows virus detection also in circumstances of minor viral shedding. All amplified EIV sequences were classified phylogenetically within the known lineages.

Keywords: equine influenza virus, real-time RT-PCR, MGB probe, molecular epidemiology, diagnosis

Einleitung

Das equine Influenzavirus (EIV) ist ein Influenza A-Virus aus der Familie der Orthomyxoviridae. Das behüllte, negativ-strängige Virus enthält acht einzelsträngige RNA-Segmente, die mit dem Nukleoprotein (NP) und den drei Polymeraseproteinen (PA, PB1 und PB2) assoziiert sind. In die Hülle eingebettet sind die variablen Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) sowie der M2-Ionenkanal, währenddem das Matrix (M1)-Protein die Innenseite der Hülle auskleidet (Horimoto and Kawaoka, 2005). Die Influenza A-Viren werden aufgrund der zwei Oberflächenproteine (Hämagglutinin und Neuraminidase) in Subtypen unterteilt.

Influenza A-Viren können eine Vielzahl von Säugetier- und Vogelspezies infizieren. Wildlebende Wasservögel, die in der Regel nicht erkranken, bilden das natürliche Reservoir der Influenzaviren (Webster et al., 1992). In Equiden wurden bisher nur zwei Influenza A-Subtypen regelmässig gefunden, die sogenannten equinen Influ-

source: https://doi.org/10.7892/boris.72560 | downloaded: 12.10.2024

191_201_Aeschbacher.indd 191 26.03.15 16:38

enzaviren H7N7 und H3N8. Nur in Einzelfällen wurden andere Subtypen aus Equiden isoliert, wie H5N1 aus Eseln mit respiratorischen Symptomen (Abdel-Moneim et al., 2010) oder H9N2 aus einem Pferd in Guangxi (Neumann et al., 2014). Seit 1979 wurde der Subtyp H7N7 nicht mehr nachgewiesen (Webster, 1993). Die H3N8-Subtypen divergierten in den späten 1980er Jahren in zwei Abstammungslinien, nämlich die Europäische und die Amerikanische Hauptlinie (Daly et al., 1996), die wiederum in die Kentucky-, die South American- und die Florida-Linie unterteilt werden kann. Die Florida-Linie evolvierte seither in die zwei heute vorherrschenden Linien, die Florida Clades 1 und 2 (Bryant et al., 2009).

Aufgrund der Einfuhr subklinisch infizierter, geimpfter Pferde und inadäquater Quarantänemassnahmen kam es wiederholt zu grossen Ausbrüchen in empfänglichen Populationen (Cullinane and Newton, 2013). Ausserdem wurde wider Erwarten im Jahr 2004 auch bei Greyhounds ein schwerer, EIV-bedingter Influenza-Ausbruch beobachtet (Crawford et al., 2005).

Angesichts der hohen Kontagiosität von EIV und den schweren Folgen kommt der raschen Diagnose eine besondere Bedeutung zu. Die klassische Diagnose beruht auf der 1–2 Wochen dauernden Virusanzucht in embryonierten Hühnereiern oder in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Zell-Linien. Auch eine serologische Diagnose ist möglich (OIE, 2012) oder der Antigennachweis mittels humaner Influenza-Schnelltests (Yamanaka et al., 2008). Eine vielversprechende Alternative zum klassischen Virusnachweis stellen die in den letzten Jahren entwickelten RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion)-Methoden zum Nachweis von EIV aus Nasenrachentupfern dar (Oxburgh and Hagstrom, 1999; Fouchier et al., 2000; Quinlivan et al., 2005; Heine et al., 2007; Lu et al., 2009; Foord et al., 2009; Nagy et al., 2010). Ziel dieser Arbeit war es, eine optimierte real-time RT-PCR zum raschen Nachweis möglichst aller equinen Influenzaviren und RT-PCR Methoden für deren molekular-epidemiologische Charakterisierung zu entwickeln.

Tiere, Material und Methoden

Nasenrachentupfer

Als Nasenrachentupfer wurden steril verpackte, 50 cm lange Kunststoffröhren verwendet, die an der Vorderseite mit einer sterilen Gazebinde (RHENA IVF Hartmann AG, Neuhausen, Schweiz) versehen sind. Anschliessend wurden die Tupferproben in ein Röhrchen mit 5 ml Virusisolationsmedium verbracht und auf Eis gelagert.

Virusisolation

Die Isolation aus Nasenrachentupfern und die Vermehrung von Isolaten erfolgte in 11 Tage alten, embryonierten Hühnereiern (OIE, 2012).

Zellkultur zur Titerbestimmung

Die Viren wurden für die Titerbestimmung auf MDCK-Zellen angezüchtet (Madin Darby Canine Kidney Zell-Linie; Anonymous, 2011). Die Titerbestimmung in TCID50 gemäss Spearman-Kaerber (Spearman, 1908; Kaerber, 1931) erfolgte mikroskopisch anhand des zytopathischen Effekts und mittels indirekter Immunfluoreszenz (Monofluo™ Kit Influenza; Bio-Rad Laboratories AG, Cressier, Schweiz).

Viren

Aus den Beständen des Instituts standen 15 equine Influenza-Virusstämme zur Verfügung, die in embryonierten Hühnereiern angezüchtet worden waren. RNA-Proben von 9 porcinen Influenza A-Virusstämmen wurden uns vom Virologischen Institut der Vetsuisse-Fakultät Zürich überlassen und 9 weitere equine, aviäre und porcine Influenza A-Viren wurden uns vom Institut für Virologie und Immunologie (IVI), Standort Mittelhäusern zur Verfügung gestellt (Tab. 1).

Primer und Sonden

Die optimalen Positionen für die Primer und die MGB (Minor Groove Binding)-Sonde wurden anhand multipler Alignements (Clone Manager 9-Software, Scientific & Educational Software, Cary, USA; MAFT-Software, Katoh et al., 2009) aller verfügbaren EIV-Matrix- resp. aller Matrix-Sequenzen aus der Influenza Research Database (www.fludb.org, April 2013) lokalisiert. Aufgrund ihrer Häufigkeit und unter spezieller Berücksichtigung der equinen Influenza A-Viren wurden je 5 individuelle Sequenzen für den „Forward"- respektive „Reverse"-Primer-Mix (InfAMf1a-e, InfAMr2a-e; Tab. 2) ausgewählt. Die einzelnen synthetisierten Oligonukleotide wurden für die PCR äquimolar gemischt. Für die MGB-Sonde (InfAMp3; Tab. 2) wurde aufgrund des hohen Konservierungsgrades des Abschnitts eine einzelne Sequenz ausgewählt. Für die konventionelle RT-PCR wurden der „Forward"- und der „Reverse"-Primer-Mix (InfAMf1a-e, InfAMr2a-e; Tab. 2) der real-time RT-PCR verwendet. Zur Amplifikation des gesamten Matrix-Segments wurden die Primer von Hoffmann et al. (Hoffmann et al., 2001) adaptiert (Tab. 2). Geeignete Primer zur Amplifikation eines grossen Abschnitts des Hämagglutinins (HA1) wurden mit Hilfe bereits publizierter Arbeiten (Hoffmann et al., 2001; Bryant et al., 2009) ausgewählt und optimiert. (Tab. 2). Für die real-time RT-PCR und die konventionellen RT-PCRs wurden als interne Kontrollen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und als externe Kontrolle Sendai-Virus (ATCC, Manassas, USA; Kaiser, 2001) verwendet. Alle Primer

und die GAPDH-Sonde wurden bei Microsynth (Microsynth GmbH, Balgach, Switzerland) bezogen. Die MGB-Sonde zum Nachweis des Matrix-Segments wurde von der Firma Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, USA) hergestellt.

RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAgen, Germantown, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA der Isolate aus dem IVI, Standort Mittelhäusern wurden mittels TRIZOL® LS Reagent (Ambion, Foster City, USA) nach Angaben des Herstellers isoliert (MAN0001271, Rev. Datum 13. Dez. 2012). Zu den Proben wurden zusätzlich 10 µg Carrier RNA aus dem Mini Kit (QIAgen, Germantown, USA) gegeben.

Konventionelle RT-PCR

Die Amplifikation eines Matrix-Abschnitts mit einer Länge von 231 Basenpaaren (bp), des ganzen Matrix-

Tabelle 1: Virusisolate.

	Virusisolat/RNA Isolation	Subtyp	Spezies	Material	Quelle	isoliert[a]/erhalten[b]	CT-Werte
1	A/equine/Prag/1956	H7N7	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1966[b]	15.4
2	A/equine/Lex/1963	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1989[b]	13.6
3	A/equine/Fontainbleu/1979	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1990[b]	15.4
4	A/equine/Suffolk/1989	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1995[b]	14.8
5	A/equine/Bern/P137/1973	H7N7	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1973[a]	16.5
6	A/equine/Alfort	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1995[b]	12.4
7	A/equine/CH/P462/1995, Rachentupfer	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1995[a]	15.8
8	A/equine/P503/1995, Nasenrachentupfer	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1995[a]	15.9
9	A/equine/P504/1995, Nasenrachentupfer	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1995[a]	17.5
10	A/equine/P1180/1989	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1989[a]	19.3
11	A/equine/P1273/1995, Nasenrachentupfer	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1995[a]	16.6
12	A/equine/P1274/1995, Nasenrachentupfer	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	1995[a]	16.6
13	A/equine/P204/2000, Nasenrachentupfer	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	2000[a]	19.6
14	A/equine/P207/2000, Nasenrachentupfer	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	2000[a]	15.8
15	A/equine/P112/2007, Nasenrachentupfer	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, BE	2007[a]	16.7
16	10.13	H1N1	Schwein	Nasentupfer	VIZH	2013[a]	27.2
17	23.13	H1N1 pdm[1]	Schwein	Nasentupfer	VIZH	2013[a]	26.2
18	24.13	H1N1	Schwein	Nasentupfer	VIZH	2013[a]	24.2
19	25.13	H1N1	Schwein	Nasentupfer	VIZH	2013[a]	30.4
20	42.13	H1N1	Schwein	Nasentupfer	VIZH	2013[a]	43.73
21	43.13	H1N1	Schwein	Nasentupfer	VIZH	2013[a]	21.9
22	45.13	H1N1	Schwein	Nasentupfer	VIZH	2013[a]	33.2
23	56.13	H1N1	Schwein	Nasentupfer	VIZH	2013[a]	23.8
24	75.13	H1N1 pdm[1]	Schwein	Nasentupfer	VIZH	2013[a]	33.4
25	A/equine/New Market/1/1993	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, MH	2014[b]	13.5
26	A/equine/New Market/2/1993	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, MH	2014[b]	15.1
27	A/equine/South Africa/4/2003	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, MH	2014[b]	16.8
28	A/equine/Miami/1963[2]	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, MH	2014[b]	15.0
29	A/equine/Fontainbleu	H3N8	Pferd	Allantoisflüssigkeit	IVI, MH	2014[b]	16.4
30	Swine Port Chalmers 6T17R	H3N2	Schwein	keine Angaben	IVI, MH	2014[b]	24.2
31	Swine New Jersey 6H32R	H1N1	Schwein	keine Angaben	IVI, MH	2014[b]	24.7
32	Inakt. Impfstoff: Gallimune Flu	H5N9	Vögel	keine Angaben	IVI, MH	2014[b]	27.6
33	Inakt. Impfstoff: Nobilis Influenza (A/Duck/Potsdam/1402/86)	H5N2	Vögel	keine Angaben	IVI, MH	2014[b]	28.6

[1] pdm = pandemisch
[2] Sequenzierung nur aus real-time RT-PCR-Produkt möglich, daher nicht für phylogenetische Analyse verwendet
[3] Gemäss PD Dr. Monika Engels (Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Uni Zürich) bestätigte, schwach positive Probe
Quelle: IVI, BE = Institut für Virologie und Immunologie, Standort Bern, Schweiz; VIZH = Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Zürich, Schweiz; IVI, MH = Institut für Virologie und Immunologie, Standort Mittelhäusern, Schweiz

Tabelle 2: Sequenzen von Primern und Sonden.

Methode	Name	Sequenz (5′-3′)	Länge	Position	Produkt	TM in °C[4]	Referenz
Real-time	InfAMf[1]1a*	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA	23	32–54[a]	231bp	58.5	Diese Arbeit
	InfAMf1b	CTTCTGACCGAGGTCGAAACGTA	23	32–54[a]		61.4	
	InfAMf1c	CTTCTAACAGAGGTCGAAACGTA	23	32–54[a]		54.4	
	InfAMf1d	CTTCTAACCGAAGTCGAAACGTA	23	32–54[a]		56.5	
	InfAMf1e	CTTCTTACCGAGGTCGAAACGTA	23	32–54[a]		58.5	
	InfAMr[2]2a*	AAAGCGTCTACGCTGCAGTCC	21	262–242[a]		60.5	
	InfAMr2b	AAAACGTCTACGCTGCAGTCC	21	262–242[a]		58.1	
	InfAMr2c	AAATCGTCTACGCTGCAGTCC	21	262–242[a]		58.1	
	InfAMr2d	AAAGCGTCTACGTTGCAGTCC	21	262–242[a]		58.1	
	InfAMr2e	AAACCGTCTACGCTGCAGTCC	21	262–242[a]		60.3	
	InfAMp[3]3	5′-6 FAM-CCCCCTCAAAGCCGA-MGBNFQ-3′	15	79–93[a]		70	
RT-PCR	Bm-InfAMf4a	CTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	22	1–15[a]	1027+18bp	59.2	(Hoffmann et al., 2001)
	Bm-InfAMr5a	CGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	32	1027–1007[a]		60.1	
	Bm-InfAHAf6a	AGGGAGCAAAAGCAGGGG	18	1–14[b]	1087+4bp	58.8	(Hoffmann et al., 2001)
	HA Reverse 1	GCTATTGCTCCAAAGATTCCT	21	1087–1067[b]		54.1	(Bryant et al., 2009)
	HA Reverse 2	GCTATTGCCCCAAAGATTCCT	21	1087–1067[b]		58.2	(Bryant et al., 2009)
Kontrollen	Sendai-f	GTCATGGATGGGCAGGAGTC	20	8553–8572[c]	236bp	58.9	(Kaiser, 2001)
	Sendai-r	CGTTGAAGAGCCTTACCCAGA	21	8788–8768[c]		58.1	
	Sendai-p	5′-FAM-CAAAATTAGGAACGGAGGATTGTCCCC-TC-Tamra-3′	29	8720–8748[c]		68.4	
	equGAPDH-208f	GGCAAGTTCCATGGCACAGT	20	208–227[d]	110bp	59.6	Diese Arbeit
	equGAPDH-317r	GCATCGCCCCATTTGATG	18	317–300[d]		59.4	
	equGAPDH-272p	5′-YY-CCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCG–BHQ-1-3′	24	272–295[d]		69.5	

[1] f = Primer mit „forward“ Orientierung
[2] r = Primer mit „reverse“ Orientierung
[3] p = Sonde
[4] Bestimmung mittels Primer Express© Software for Real-Time PCR Version 3.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA)
* „Forward“- und „Reverse“-Primer-Mix (a–e) wird auch für die konventionelle RT-PCR verwendet
[a] GenBank KF559337 (A/equine/Richmond/1/2007, Segment 7)
[b] GenBank FJ195395 (A/equine/Richmond/1/2007, Segment 4)
[c] GenBank M30202
[d] GenBank NM_001163856
TM = Schmelztemperatur, FAM = 6-carboxyfluorescein reporter dye, MGBNFQ = minor groove binding non-fluorescent quencher, BHQ-1 = Black Hole Quencher-1, YY = Yakima Yellow, Tamra = 6-carboxy–tetramethyl-rhodamin

Segments und des HA1-Abschnitts wurde mit dem OneStep RT-PCR Kit (QIAgen, Germantown, USA) in einem Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die RNA einer Probe wurde zum Reaktionsgemisch bestehend aus Nuklease-freiem Wasser (Ambion, Foster City, USA), 5 × QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer, dNTP Mix (zu einer Endkonzentration von 400 µM von jedem Nukleotid), QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix, RNasin® Plus (40 U/µl; Promega, Madison, USA), „Forward“-Primer (Tab. 2; 0.6 µM Endkonzentration) und „Reverse“-Primer (Tab. 2; 0.6 µM Endkonzentration) pipettiert. Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen: 30 Minuten Reverse Transkription bei 50 °C, 15 Minuten Polymerase-Aktivierung bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen mit 1 Min. 94 °C, 1 Min. 55 °C (HA1-Abschnitt 50 °C) und 3 Min. 72 °C (respektive 1 Min. für den 231 bp Matrix-Abschnitt). Der letzte Elongationsschritt bei 72 °C wurde um 10 Min. verlängert.

Onestep real-time RT-PCR

Für die onestep real-time RT-PCR wurde der QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAgen, Germantown, USA) verwendet. Zum Reaktionsgemisch von 16 µl bestehend aus Nuklease-freiem Wasser (Ambion, Foster City, USA), 2 × QuantiTect RT-PCR Master Mix, „Forward“-Primer

(InfAMf1a–1e; 0.4 µM Endkonzentration), „Reverse"-Primer (InfAMr2a–2e; 0.4 µM Endkonzentration) und QuantiTect RT Mix wurden 4 µl RNA einer Probe zugegeben. Die Reaktion wurde in einem Gerät vom Typ 7500 Fast Real-Time PCR System v1.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 30 Min. Reverse Transkription bei 50 °C, 15 Min. Inaktivierung der Reversen Transkriptase und Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95 °C, gefolgt von 45 Amplifikationszyklen mit je 15 Sek. 94 °C und 1 Min. 60 °C. Die Auswertung der Reaktion erfolgte mit der 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Klonierung

Zur Klonierung wurde das gesamte Matrix-Segment des Stamms A/equine/CH/P462/95 mittels konventioneller RT-PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen, Foster City, USA) in den pCR®-II-TOPO® Vektor kloniert. Mit diesem Vektor transformierte, chemisch kompetente one Shot® TOP10 E. coli (Invitrogen, Foster City, USA) wurden auf LB (Luria-Bertani)-Agar-Platten ausgesät und anschliessend in LB-Medium vermehrt. Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des QuickLyse Miniprep Kit (QIAgen, Germantown, USA) nach Angaben des Herstellers.

In vitro transkribierte RNA zur Bestimmung der analytischen Sensitivität

Das mit dem Matrix-Segment des Influenza Virus rekombinierte Plasmid (pCR®-II-TOPO®_EIV-Matrix) wurde nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des Restriktionsenzyms HindIII (Promega, Madison, USA) bei 37 °C während 1.5 h inkubiert. Das linearisierte Plasmid wurde dann mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAgen, Germantown, USA) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die RNA-Transkripte wurden anschliessend mit dem Ambion MEGAshortscript™T7, High Yield Transcription Kit (Invitrogen, Foster City, USA) mit Hilfe der promotorspezifischen T7-Polymerase nach Angaben des Herstellers generiert, gereinigt und bei 260 nm gemessen.

Sequenzierung

Die PCR-Produkte des Matrix-Segments und des HA1-Abschnitts wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit gemäss Angaben des Herstellers gereinigt und der Firma Microsynth AG, Balgach, Schweiz zur Sanger-Sequenzierung übermittelt. Die Endbearbeitung der ermittelten Sequenzen erfolgte mit Hilfe der SeqMan™II v5.01 Software (DNASTAR, Madison, WI, USA).

Phylogenetische Analyse

Anhand der Nukleotidsequenzen des ganzen Matrix-Segments und des HA1-Abschnitts der eigenen Virusstämme und weiterer Sequenzen aus GenBank wurden mit Hilfe der MUSCLE-Software (Edgar, 2004) und der MEGA 5.1 Software (Tamura et al., 2011) multiple Alignements erstellt. Das für die vorliegenden Sequenzdaten am besten geeignete Evolutionsmodell wurde mit Hilfe des in der MEGA 5.1 Software implementierten Verfahrens „Models" ermittelt. Die phylogenetischen Bäume wurden mit der Maximum Likelihood Methode in MEGA 5.1 unter Verwendung von 100 Bootstrap-Replikaten erstellt.

Ergebnisse

Primer und MGB-Sonde

Die Position für den „Forward"-Primer-Mix wurde so gewählt, dass zu jeder der 150 verfügbaren EIV-Sequenzen einer der 5 Primer eine homologe Bindung aufwies (100%). Die fünf „Reverse"-Primer sichern zusammen mit Ausnahme des Stamms A/equine/Prague/1956 (H7N7, GeneBank-Nr. CY130135) eine homologe Bindung zu den 160 in diesem Bereich verfügbaren Matrix-Sequenzen (99.4%). Die MGB-Sonde stellt in 151 von 152 Fällen eine fehlerfreie Bindung an die verfügbaren Sequenzen sicher (99.3%). Die Homologie der „Forward"-Primer zu allen verfügbaren Matrix-Sequenzen lag bei 97.7% von 22'851 Sequenzen, woran der Primer InfAMf1a mit 90.9% den grössten Anteil hatte. Die „Reverse"-Primer waren komplementär zu 98.1% von 23'744 verfügbaren Sequenzen, woran der „Reverse"-Primer InfAMr2a mit 87.2% den grössten Beitrag leistete. Für die MGB-Sonde wurde in 99.6% von 23'720 Sequenzen eine fehlerfreie Bindung beobachtet.

Einfache RT-PCR

Um die Sensitivität der einfachen RT-PCR des 231 bp Matrixsegments zu bestimmen, wurde nach der RNA-Isolation in Nuklease-freiem Wasser eine Verdünnungsreihe des Stamms A/equine/Fontainbleu/79 in 10-er Schritten erstellt und amplifiziert (10^0–10^{-7}). Die Amplifikation des PCR-Fragments war in mit Ethidium-Bromid gefärbtem Agarose-Gel bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} sichtbar (Abb. 1).

Real-time RT-PCR Amplifikation der Verdünnungsreihe des Stamms A/equine/Fontainbleu/79

Die isolierte RNA des Stamms A/equine/Fontainbleu/79 konnte bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} nachgewiesen werden. Bezogen auf die in Zellkultur gemessene Infektiosität (in Tissue Culture Infectious Dose 50%, $TCID_{50}$) erreichte die real-time RT-PCR für den Stamm A/equine/Fontainbleu/79 eine Nachweisgrenze von 6.0×10^{-4} (1/1'666) TCID50. Dies entspricht 3.0×10^{-6} (1/333'333) hämagglutinierenden Einheiten (HAE; Tab. 3). Die PCR erwies sich in diesem Experi-

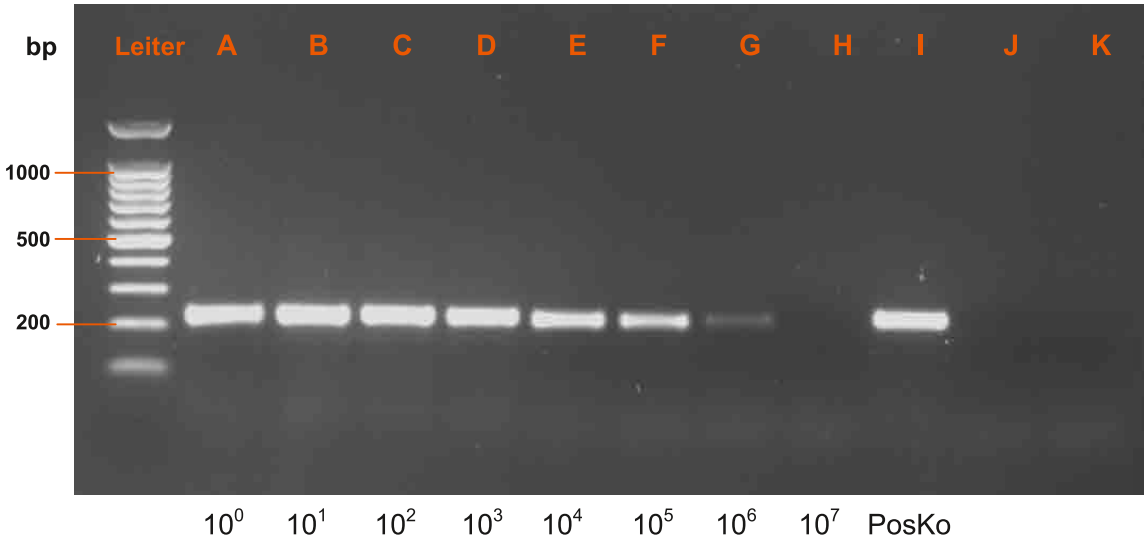

Abbildung 1: Eine sichtbare Bande des Produkts der einfachen RT-PCR konnte nach Gelelektrophorese bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} festgestellt werden.
A-H = A/equine/Fontainbleu/79: 10^0–10^{-7}; I = positive Isolationskontrolle; J = negative Isolationskontrolle; K = negative PCR Kontrolle; Leiter = Standard zur Grössenbestimmung in Basenpaaren (bp)

ment als gut 1500-fach empfindlicher als die Messung der Infektiosität, die ihrerseits 200-fach empfindlicher war als die Hämagglutination. Das Amplifikationsprodukt der real-time RT-PCR mit einer Grösse von 231 bp war im Agarosegel bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} sichtbar.

Analytische Sensitivität der real-time RT-PCR

Die analytische Sensitivität der real-time RT-PCR wurde mittels Amplifikation von *in vitro* transkribierter RNA des Matrix-Segments des Stamms A/equine/CH/P462/95 bestimmt. In einer im Triplikat getesteten Verdünnungsreihe (10^6–10^0 RNA-Kopien/4 µl) konnte eine Nachweisgrenze von mindestens 10^3 RNA-Kopien ermittelt werden (3 von 3 Replikaten positiv). 10^2 Kopien waren in zwei von drei Replikaten detektierbar. Die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten (CV: 0.2%–9.3%) der CT-Werte waren mit Ausnahme der höchsten detektierbaren Verdünnung sehr tief (Tab. 4). Die direkte DNA-Amplifikation des EIV-Matrix-Plasmids ergab ein Minimum der Detektion von 10^1 DNA-Kopien in 4 µl, was einer 100-fach höheren Schätzung der Empfindlichkeit gegenüber der *in vitro* transkribierten RNA entspricht. Die Variationskoeffizienten der CT-Werte lagen zwischen 0% und 7.2%.

Tabelle 3: CT-Werte, Infektiosität und Hämagglutinierende Einheiten.

Verdünnung	CT-Wert/4 µl	$TCID_{50}$/4 µl	HAE/4 µl
10^0	15.4	6.0×10^3	3.0×10^1
10^{-1}	17.9	6.0×10^2	3.0×10^0
10^{-2}	21.3	6.0×10^1	3.0×10^{-1}
10^{-3}	24.9	6.0×10^0	3.0×10^{-2}
10^{-4}	28.4	6.0×10^{-1}	3.0×10^{-3}
10^{-5}	32.3	6.0×10^{-2}	3.0×10^{-4}
10^{-6}	36.6	6.0×10^{-3}	3.0×10^{-5}
10^{-7}	43.5	6.0×10^{-4}	3.0×10^{-6}

Der Sensitivitätsvergleich wurde anhand einer Verdünnungsreihe der Allantoisflüssigkeit von A/equine/Fontainbleu/79 durchgeführt.
CT: Cycle Threshold; $TCID_{50}$: Tissue Culture Infectious Dose 50%;
HAE: Hämagglutinierende Einheiten

Spezifität der real-time RT-PCR

Mit keiner RNA- oder DNA-Extraktion der überprüften Viren, nämlich EAV, EHV-1-4, ERV A/B, EIAV, BVD-1a/2 und BTV-1/8, wurde ein positives Fluoreszenzsignal beobachtet. Die Spezifität der „Forward"-und „Reverse"-Primer der real-time RT-PCR wurde zusätzlich mit der Primer-Blast Software anhand von 50'000 Sequenzen überprüft. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Primerkombinationen potentiell nur an eine sehr geringe Anzahl von Nicht-Zielsequenzen mit weniger als 7 Fehlpaarungen pro Primer binden könnten (0 bis maximal 6 Sequenzen).

Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit und Effizienz der real-time RT-PCR

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit der real-time RT-PCR wurde nach RNA-Isolation eine Verdünnungsreihe (10^0–10^{-5}) von EIV (A/equine/CH/P462/95) hergestellt und in einem Testansatz 8-fach angesetzt. Die Replikate zeigten in jeder Verdünnung nur eine geringe Varianz mit einem Variationskoeffizienten von 0.2%–1.6%. Die mittels linearer Regression bestimmte mittlere Effizienz der Amplifikation betrug 97% bei einem Steigungskoeffizienten von 3.4 (E = $^{10\text{-}1/\text{Steigungskoeffizient}}$

Tabelle 4: Verdünnungsreihe *in vitro* transkribierter RNA1 in der real-time RT-PCR.

Anzahl Kopien / 4 µl	CT 1	CT 2	CT 3	Mw +/– SD	CV (%)
10^6	23.5	23.3	23.4	23.4 +/– 0.1	0.4
10^5	26.8	26.8	26.7	26.8 +/– 0.1	0.2
10^4	30.5	30.5	29.9	30.3 +/– 0.4	1.1
10^3	39.8	33.7	34.4	36.0 +/– 3.3	9.3
10^2	–	37.4	40.3	–	–

[1] Stamm: A/equine/CH/P462/95
CT: Cylcle Threshold; Mw = Mittelwert; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient

–1). Die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurde mit Hilfe der EIV-Verdünnungsreihe (10^0–10^{-5}) von vier verschiedenen Personen in sieben unabhängigen Amplifikationen bestimmt. Die anhand der CT-Werte festgestellte Varianz der Testansätze erwies sich mit Ausnahme der höchsten Verdünnung als sehr gering mit Variationskoeffizienten von 0.5%–7.8%.

Real-time RT-PCR mit frisch entnommenen, equinen Nasenrachentupfern

In keiner der 10 frisch entnommenen, equinen Tupferproben des Institut suisse de médecine equine (ISME) und des nationalen Pferdezentrums (NPZ), die in der neu entwickelten real-time RT-PCR Influenza-negativ waren, wurde im Vergleich zur Sendai- oder GAPDH-Kontrolle ein Störeffekt oder eine Hemmung der Reaktion festgestellt.

Real-time RT-PCR mit eigener Sammlung von EIV und weiteren Influenza A-Viren

Alle 15 EIV-Isolate des Subtyps H7N7 und H3N8 aus eigenen Beständen (Tab. 1) waren mittels real-time RT-PCR nachweisbar. Die CT-Werte dieser Proben lagen im Bereich von 12.4-19.6. Die in hämagglutinierenden Einheiten messbaren Titer lagen zwischen 3.5×10^0–1.2×10^2. In 9 von 9 bestätigt positiven und schwach positiven RNA-Proben (persönliche Mitteilung von PD Dr. Monika Engels, Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Uni Zürich) des Subtyps H1N1 aus porcinen Nasentupfern konnte mit der real-time RT-PCR mit CT-Werten von 21.9–43.7 Influenza-RNA nachgewiesen werden. Alle 9 aus dem IVI, Standort Mittelhäusern stammenden Influenza A-Viren der Subtypen H3N8, H3N2, H1N1, H5N9 und H5N2 reagierten positiv mit CT-Werten von 13.5–28.6 (nicht gezeigt).

Sequenzierung der Amplifikationsprodukte und phylogenetische Analyse

Alle 19 Amplifikationsprodukte mit einer Länge von 880 bp des Matrix-Segments von EIV-Isolaten wurden sequenziert und zusammen mit 16 Sequenzen aus GenBank phylogenetisch analysiert (Tab. 5). Als optimales Modell für die phylogenetische Rekonstruktion mittels Maximum Likelihood (ML) wurde das Tamura 3-Parameter Modell mit Gamma-Distanzen gewählt (Tamura, 1992). Die EIV aus dem IVI, Standort Bern und Mittelhäusern konnten den bekannten Subgruppen der Prädivergenzstämme, der Eurasischen und der Amerikanischen Stämme, dem Florida Clade 1 oder dem Subtyp H7N7 zugeordnet werden (Abb. 2). Die Amplifikations-

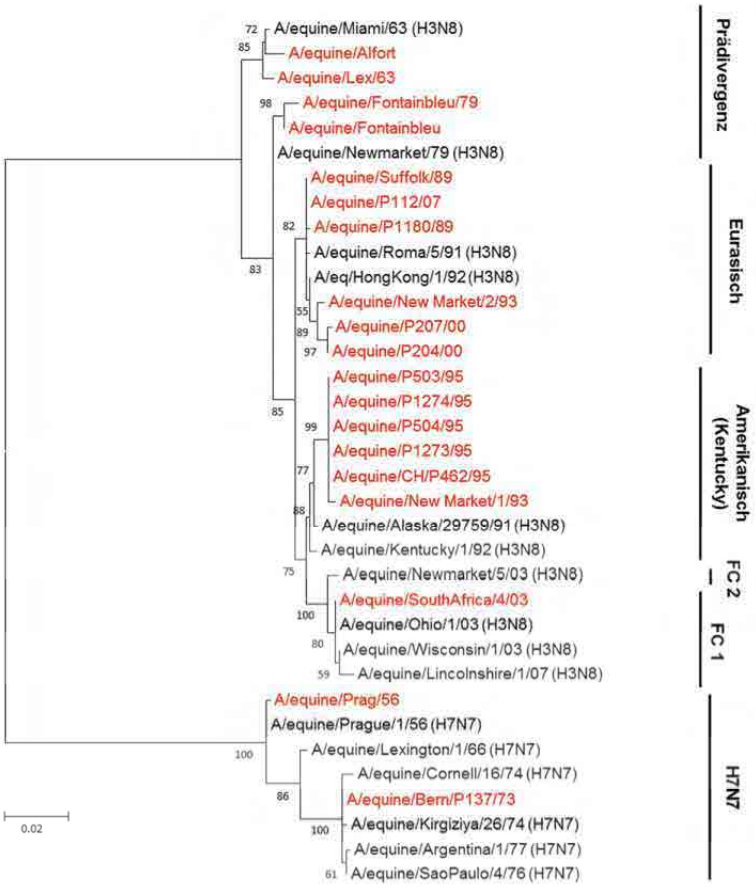

Abbildung 2: Phylogenetischer Baum der Matrix-Nukleotidsequenzen von EIV
Die phylogenetische Rekonstruktion für die 35 Nukleotidsequenzen mit einer Länge von 880 bp erfolgte mittels Maximum Likelihood (ML) unter Verwendung des Tamura 3-Parameter Modells mit Gamma-Distanzen (MEGA 5.1). Die Länge der horizontalen Äste entspricht den phylogenetischen Distanzen zwischen den verschiedenen Sequenzen (Skala in Substitutionen pro Sequenzposition). Die Zahlen an den Knotenpunkten entsprechen der „Bootstrap"-Konfidenz der darunterliegenden Gruppierung. Die phylogenetischen Gruppen sowie der Subtyp H7N7 sind mit entsprechenden Bezeichnungen auf der rechten Seite des Baums gekennzeichnet (FC 1 = Florida Clade 1; FC 2 = Florida Clade 2). Die 19 Sequenzen, welche in dieser Arbeit neu erhoben wurden, sind in roter Farbe dargestellt.

Tabelle 5: EIV–Sequenzen im Bereich des Matrix-Segments.

GB-Nr.	Name der Sequenz	Land	Untergruppe	Herkunft	Subtyp
AF001674	A/eq/Miami/1963	USA	Pd	GenBank	H3N8
AF001675	A/eq/Newmarket/1979	UK	Pd	GenBank	H3N8
CY030158	A/equine/Alaska/29759/1991	USA	Am	GenBank	H3N8
AF001681	A/eq/Roma/5/1991	Italien	Eu	GenBank	H3N8
AF001682	A/eq/Hong Kong/1/1992	Hongkong	Eu	GenBank	H3N8
CY030150	A/equine/Kentucky/1/1992	USA	Am	GenBank	H3N8
FJ375236	A/equine/Newmarket/5/2003	UK	FC 2	GenBank	H3N8
DQ222916	A/equine/Wisconsin/1/2003	USA	FC 1	GenBank	H3N8
DQ124188	A/equine/Ohio/1/2003	USA	FC 1	GenBank	H3N8
KF559343	A/equine/Lincolnshire/1/2007	UK	FC 1	GenBank	H3N8
CY005801	A/equine/Prague/1/1956	Tschechei		GenBank	H7N7
CY039392	A/equine/Lexington/1/1966	USA		GenBank	H7N7
EU521582	A/equine/Cornell/16/1974	USA		GenBank	H7N7
JX983549	A/equine/Kirgiziya/26/1974	k. Angabe		GenBank	H7N7
CY036880	A/equine/Sao Paulo/4/1976	Brasilien		GenBank	H7N7
CY036896	A/equine/Argentina/1/1977	Argentinien		GenBank	H7N7
	A/equine/Alfort		Pd	IVI, BE[1]	H3N8
	A/equine/Lex/1963		Pd	IVI, BE	H3N8
	A/equine/Fontainbleu/1979		Pd	IVI, BE	H3N8
	A/equine/Fontainbleu		Pd	IVI, MH[2]	H3N8
	A/equine/Suffolk/1989		Eu	IVI, BE	H3N8
	A/equine/P1180/1989		Eu	IVI, BE	H3N8
	A/equine/New Market/1/1993		Am	IVI, MH	H3N8
	A/equine/New Market/2/1993		Eu	IVI, MH	H3N8
	A/equine/CH/P462/1995		Am	IVI, BE	H3N8
	A/equine/P503/1995		Am	IVI, BE	H3N8
	A/equine/P504/1995		Am	IVI, BE	H3N8
	A/equine/P1273/1995		Am	IVI, BE	H3N8
	A/equine/P1274/1995		Am	IVI, BE	H3N8
	A/equine/P204/2000		Eu	IVI, BE	H3N8
	A/equine/P207/2000		Eu	IVI, BE	H3N8
	A/equine/South Africa/4/2003		FC1	IVI, MH	H3N8
	A/equine/P112/2007		Eu	IVI, BE	H3N8
	A/equine/Prag/1956			IVI, BE	H7N7
	A/equine/Bern/P137/1973			IVI, BE	H7N7

Pd: Prädivergenz, Am: Amerikanisch, Eu: Eurasisch, FC 1: Florida Clade 1, FC 2: Florida Clade 2
[1] BE = Bern
[2] MH = Mittelhäusern

produkte aus dem HA-Segment zeigten eine sehr ähnliche Zuordnung zu den bekannten Untergruppen (nicht gezeigt). Auf Nukleotidebene wiesen alle berücksichtigten Matrix-Sequenzen vom Subtyp H3N8 im paarweisen Vergleich eine Ähnlichkeit von 95.9%–100% auf (0–36 Substitutionen auf 880 bp) und diejenigen vom Subtyp H7N7 eine solche von 97.4%–99.9% (1–23 Substitutionen auf 880 bp).

Diskussion

Equine Influenzaviren (EIV) sind ausserordentlich kontagiös. Einer schnellen und zuverlässigen Diagnose mittels real-time RT-PCR kommt deshalb anlässlich eines Ausbruchs eine besondere Bedeutung zu. Die Resultate liegen im Vergleich zu konventionellen Methoden wie der Isolation im Hühnerei oder der Anzucht in der Zellkultur innert Tagen statt innert Wochen vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine real-time RT-PCR entwi-

ckelt mit Primern und einer Minor Groove Binder (MGB)-Sonde, welche auf einen hoch konservierten RNA-Abschnitt im Matrix-Segment zielen. Der Vorteil der MGB-Sonde besteht darin, dass diese ausserordentlich stabile Hybride mit der Ziel-DNA bildet (Kumar et al., 1998), was die Verwendung kürzerer Oligonukleotide mit höherer durchgängiger Homologie erlaubt. MGB-Sonden haben eine höhere Schmelztemperatur und eine verbesserte Spezifität (Yao et al., 2006). Aufgrund der hohen Konserviertheit des gewählten Sequenzabschnitts kann die Sonde zu 99.3% der publizierten Sequenzen von equinen Influenzaviren respektive zu 99.6% der Sequenzen aller Influenza A-Viren fehlerfrei binden. Die zu erwartende, grosse Nachweisbreite der neu entwickelten real-time RT-PCR, die auch durch die Wahl der Primer-Zusammensetzung unterstützt wird, ist trotz der epidemiologischen Sonderstellung des Pferdes ein grosser Vorteil dieser Methode. Neben den üblichen Subtypen H7N7 und H3N8 wurden nämlich auch beim Pferd gelegentlich Erkrankungen durch andere Subtypen ausgelöst (Webster and Guo, 1991).

Die real-time RT-PCR gilt als sensitiver, weniger kontaminationsgefährdet und effizienter als die klassische RT-PCR (Spackman et al., 2002). Letztere ist 10-fach weniger sensitiv als die in dieser Arbeit entwickelte real-time RT-PCR. Wenige *in vitro* transkribierte RNA-Kopien (10^2–10^3) oder DNA-Kopien (10^0–10^1), respektive $10^{-3.2}$ $TCID_{50}$ konnten noch sicher nachgewiesen werden. Die Sensitivität der real-time RT-PCR ist für die diagnostische Anwendung von Bedeutung im Hinblick auf die Untersuchung von Nasenrachentupferproben, wo je nach Zeitpunkt während der Infektion oder auch bei geimpften Tieren unter Umständen nur geringe Virusmengen vorhanden sind (Paillot et al., 2013).

Die Spezifität der neu entwickelten real-time RT-PCR konnte *in vitro* und mittels Software-Simulation bestätigt werden. Anhand einer geeigneten internen und externen Kontrolle wurde ausserdem sichergestellt, dass bei Untersuchungen von klinischem Material allfällige Störeffekte bemerkt werden. Zudem kann eine mögliche Kontamination rasch entdeckt werden, indem das Amplifikationsprodukt der real-time RT-PCR (231 bp) direkt sequenziert wird.

Die diagnostische Breite der Methode konnte mittels einer Reihe von Isolaten bestätigt werden. Neben EIV-Isolaten konnten auch Influenza A-Viren aus Schweinen und Vögeln mit hoher Treffsicherheit nachgewiesen werden. Die Sequenzabschnitte mit einer Grösse von ungefähr 1 kB aus dem Matrix-Segment und dem HA-Segment wurden phylogenetisch erwartungsgemäss den bekannten Linien zugeordnet.

Die neu entwickelte real-time RT-PCR ist eine geeignete Methode zum raschen, sensitiven und reproduzierbaren Nachweis von EIV und anderen Influenza A-Viren und deren Charakterisierung im diagnostischen Labor.

Dank

PD Dr. Monika Engels und Martina Penker, Virologisches Institut der Universität Zürich danken wir für das Aushändigen von Proben und die Durchführung von Versuchsreihen wie auch dem Institut für Virologie und Immunologie, Standort Mittelhäusern, insbesondere Dr. Lukas Bruckner und Raffael Fricker, für das Bereitstellen und Überlassen von Proben. Für das Überlassen von Nasenrachentupfern bedanken wir uns bei Nathalie Fouché, Institut suisse de médecine equine und bei Tanja Mathys, nationales Pferdezentrum.

Développement d'une PCR en temps réel pour la mise en évidence du virus de l'Influenza équine

L'Influenza équine est une maladie respiratoire contagieuse des chevaux, causée par des virus Influenza de type A. Dans la présente recherche, on a développé une PCR en temps réel dans un segment conservé de la matrice du génome viral du virus de l'influenza équine (EIV) pour obtenir un diagnostic rapide et sensible, ainsi que des méthodes de RT-PCR dans le segment de la matrice et dans le segment HA pour permettre une caractérisation moléculaire et épidémiologique des virus. Les primers des RT-PCR ont identiques à 99.4% avec les séquences connues des EIV et homologues à 97.7% avec toutes les séquences d'Influenza A. L'homo-

Sviluppo di una real-time RT-PCR per l'individuazione del virus dell'influenza equina

L'influenza equina è causata dal virus dell'influenza A, una malattia respiratoria contagiosa nei cavalli. In questo studio, una real-time RT-PCR è stata sviluppata in una porzione conservata del segmento matrice del genoma virale per la diagnosi rapida e sensibile del virus dell'influenza equina e un metodo RT-PCR ciascuno nella matrice e nel segmento HA per la caratterizzazione epidemiologia molecolare dei virus. I primer della real-time RT-PCR sono omologhe al 99.4% delle sequenze del virus dell'influenza equina conosciute e al 97,7% di tutte le sequenze di influenza A omologhe. L'omologia della sonda Minor Groove Binder (MGB) si situava

logie de la sonde Minor Groove Binder (MGB) était de 99.3% et 99.6%. Ces valeurs élevées permettent l'emploi du test pour les virus Influenza chez d'autres espèces. L'aptitude diagnostique de la méthode a été vérifiée au moyen de 20 échantillons équins, 11 porcins ainsi que de 2 aviaires. On a pu démontrer une haute spécificité pour les virus Influenza par l'expérience ainsi qu'au moyen d'une simulation informatique. La sensivité analytique du test se situait à 10^2–10^3 copies RNA et 10^0–10^1 copies DNA, ce qui permet la mise en évidence du virus également lors d'excrétion très faible. Toutes les séquences d'EIV amplifiées ont pu être attribuées à des lignées connues phylogénétiquement.

tra il 99.3% e il 99.6%. Questi elevati livelli consentono l'utilizzo del test per i virus influenzali di altre specie. L'idoneità diagnostica del metodo è stata verificata con l'aiuto di 20 campioni equini, 11 porcini e 2 aviari. Un'alta specificità per il virus influenzale è stata dimostrata sperimentalmente e via delle simulazioni software. La sensitività analitica dei test si situa tra 10^2–10^3 copie di RNA e tra 10^0–10^1 copie di DNA cosa che rende possibile il rilevamento del virus anche quando lo spargimento virale è basso. Tutte le sequenze del virus dell'influenza equina amplificate sono state associate filogeneticamente con le linee conosciute.

Literatur

Anonymous: WHO global influenza surveillance network: manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHOGeneva, 2011

Abdel-Moneim A. S., Abdel-Ghany A. E., Shany S. A.: Isolation and characterization of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 from donkeys. J.Biomed.Sci. 2010, 17: 25.

Bryant N. A., Rash A. S., Russell C. A., Ross J., Cooke A., Bowman S., MacRae S., Lewis N. S., Paillot R., Zanoni R., Meier H., Griffiths L. A., Daly J. M., Tiwari A., Chambers T. M., Newton J. R., Elton D. M.: Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. Vet.Microbiol. 2009, 138: 41–52.

Crawford P. C., Dubovi E. J., Castleman W. L., Stephenson I., Gibbs E. P. J., Chen L., Smith C., Hill R. C., Ferro P., Pompey J., Bright R. A., Medina M. J., Johnson C. M., Olsen C. W., Cox N. J., Klimov A. I., Katz J. M., Donis R. O.: Transmission of equine influenza virus to dogs. Science 2005, 310: 482–485.

Cullinane A., Newton J. R.: Equine influenza – a global perspective. Vet.Microbiol. 2013, 167: 205–214.

Daly J. M., Lai A. C., Binns M. M., Chambers T. M., Barrandeguy M., Mumford J. A.: Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses. J.Gen.Virol. 1996, 77 (Pt 4): 661–671.

Edgar R. C.: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004, 32: 1792–1797.

Foord A. J., Selleck P., Colling A., Klippel J., Middleton D., Heine H. G.: Real-time RT-PCR for detection of equine influenza and evaluation using samples from horses infected with A/equine/Sydney/2007 (H3N8). Vet.Microbiol. 2009, 137: 1–9.

Fouchier R. A., Bestebroer T. M., Herfst S., Van Der Kemp L., Rimmelzwaan G. F., Osterhaus A. D.: Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. J.Clin.Microbiol. 2000, 38: 4096–4101.

Heine H. G., Trinidad L., Selleck P., Lowther S.: Rapid detection of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus by TaqMan reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Avian Dis. 2007, 51: 370–372.

Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R. G., Perez D. R.: Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Arch.Virol. 2001, 146: 2275–2289.

Horimoto T., Kawaoka Y.: Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. Nat.Rev.Microbiol. 2005, 3: 591–600.

Kaerber G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch.exp.Pathol.Pharmakol. 1931, 162: 480–487.

Kaiser D.: Entwicklung und Evaluation eines RT-Taq-Man-PCR Testverfahrens zum Nachweis des BVD-Virus. Bern, 2001

Katoh K., Asimenos G., Toh H.: Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. Methods Mol.Biol. 2009, 537: 39–64.

Kumar S., Reed M. W., Gamper H. B., Jr., Gorn V. V., Lukhtanov E. A., Foti M., West J., Meyer R. B., Jr., Schweitzer B. I.: Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. Nucleic Acids Res. 1998, 26: 831–838.

Lu Z. C., Chambers T. M., Boliar S., Branscum A. J., Sturgill T. L., Timoney P. J., Reedy S. E., Tudor L. R., Dubovi E. J., Vickers M. L., Sells S., Balasuriya U. B. R.: Development and Evaluation of One-Step TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR Assays Targeting Nucleoprotein, Matrix, and Hemagglutinin Genes of Equine Influenza Virus. J.Clin. Microbiol. 2009, 47: 3907–3913.

Nagy A., Vostinakova V., Pirchanova Z., Cernikova L., Dirbakova Z., Mojzis M., Jirincova H., Havlickova M., Dan A., Ursu K., Vilcek S., Hornickova J.: Development and evaluation of a one-step real-time RT-PCR assay for universal detection of influenza A viruses from avian and mammal species. Arch.Virol. 2010, 155: 665–673.

Neumann G., Macken C. A., Kawaoka Y.: Identification of Amino Acid Changes That May Have Been Critical for the Genesis of A(H7N9) Influenza Viruses. J.Virol. 2014, 88: 4877–4896.

OIE: Equine Influenza. Manual of Diagnonstic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Office International des Epizooties, Paris, France, 2012, 1–14

Oxburgh L., Hagstrom A.: A PCR based method for the identification of equine influenza virus from clinical samples. Vet.Microbiol. 1999, 67: 161–174.

Paillot R., Prowse L., Montesso F., Stewart B., Jordon L., Newton J. R., Gilkerson J. R.: Duration of equine influenza

virus shedding and infectivity in immunised horses after experimental infection with EIV A/eq2/Richmond/1/07. Vet.Microbiol. 2013, 166: 22–34.

Quinlivan M., Dempsey E., Ryan F., Arkins S., Cullinane A.: Real-time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus. J.Clin.Microbiol. 2005, 43: 5055–5057.

Spackman E., Senne D. A., Myers T. J., Bulaga L. L., Garber L. P., Perdue M. L., Lohman K., Daum L. T., Suarez D. L.: Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J.Clin.Microbiol. 2002, 40: 3256–3260.

Spearman C.: The method of «right or wrong cases» (constant stimuli) without Gauss›s formulae. Brit.J.Psychol. 1908, 2: 227–242.

Tamura K.: Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. Mol.Biol.Evol. 1992, 9: 678–687.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol.Biol.Evol. 2011, 28: 2731–2739.

Webster R. G.: Are equine 1 influenza viruses still present in horses? Equine Vet.J. 1993, 25: 537–538.

Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y.: Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol.Rev. 1992, 56: 152–179.

Webster R. G., Guo Y. J.: New influenza virus in horses. Nature 1991, 351: 527.

Yamanaka T., Tsujimura K., Kondo T., Matsumurao T.: Evaluation of antigen detection kits for diagnosis of equine influenza. J.Vet.Med.Sci. 2008, 70: 189–192.

Yao Y., Nellaker C., Karlsson H.: Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. Mol.Cell.Probes 2006, 20: 311–316.

Korrespondenz

Prof. Dr. R. Zanoni
Institut für Virologie und Immunologie IVI
Länggass-Strasse 122
CH-3012 Bern
Tel. 031 631 23 78
Fax 031 631 25 34
E-Mail: zanoni@vetsuisse.unibe.ch