

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung der nested RT-PCR

3.1.1. Primerbindungsstellen

Die Primer der RT-PCR wurden anhand der Nukleotidsequenz des G-Proteins des APV konstruiert. Das Computerprogramm Genmon Version 4.4 (GBF Braunschweig) wurde unterstützend dazu benutzt, Homologiestudien durchzuführen. In der GenBank und in der European Molecular Biology (EMBL)- Datenbank standen die Sequenzen der Isolate CVL 14/1 aus England und 1556 aus Frankreich für den Subtypen A sowie die Isolate 2119 aus Italien, 657/4 aus Ungarn und 872S aus Spanien für den Subtyp B für diese Homologiestudien zur Verfügung. Die Primer A+, B+mod und X- wurden anhand der bestehenden Homologien zwischen den Subtypen der oben genannten Isolate ausgewählt.

In der Abbildung 2 ist die Nukleotidsequenz des G-Proteins des APV Subtyp A vergleichend zum Subtyp B bis zum 530. bzw 533. Base dargestellt. Die Abbildung erfolgte mit Hilfe des Programms Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>; Thompson et al., 1994). Die Sterne unterhalb der Gensequenz markieren homologe Basen von Subtyp A und Subtyp B. Die grau unterlegten Basen sind die Regionen, an die sich die Primer während der cDNS Herstellung bzw. der PCR anlagern. Die Bezeichnungen der Primer stehen über der Zeile. Der Pfeil neben der Bezeichnung gibt die Polymerisations/ Ableserichtung an. Die Zahlen rechts neben den Zeilen geben die Anzahl der Basen vom Anfang des Proteins bis zum Zeilenende wieder.

G3++ →

```

A GGGACAAGTATCTCTATGGGGTCCAAACTATATATGGTTTCAGGGCACCAGTGCATATCAA 60
B GGGACAAGTATCCAGATGGGGTCAGAGCTCTACATCATAGAGGGGGTGAGCTCAT----- 55
*****          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

B+mod →

```

A ACTGCAGTGGGGTTCTGGCTGGACATCGGGAGGAGGTACA-----TATTGGCTATAGTC 114
B -CTGAAATAGTCCTCAAGCAAGTCTCAGAAGGAGCCAAAAAATACTGTTAGGACTGGTG 114
*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

A CTATCAGCTTTCGGGCTGACCTGCACAGTCACTATTGCACCTCACTGTTAGCGTCATAGTT 174
B TTATCAGCCTTAGGCTTGACGCTCACTAGCACTATTGTTATATCTATTTGTATTAGTGTA 174
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

A+ →

```

A GAACAGTCAGTGTTAGAGGAGTGCAGAAAC---TACAATGGAGGAGATAGAGATTGGTGG 231
B GAACAGGTCAAATTACGACAGTGTGTGGACACTTATTGGGCGGAAAAATGGATCCTTACAT 234
*****          ***          ***** * * * * * * * * * * * *

```

```

A TCAAC-CACCCAGGAGCAGCCAACTACTGCACCAAGTGCGACTCCAGCAGGAAATTATGG 290
B CCAGGACAGTCAACAGAAAATA-CTTCAACAAGAGATAAGACTACAACAAAAGACCCTAG 293
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

A AGGATTACAAACGGCTCGAACAAAGAAAGTCTGAAAGCTGTTTGCATGTGCAAATTTCTTA 350
B AAGATTACAGGCGACTGGAGCAGGAAAGTTTGGAGAGCTGTGGGTATGTGCAAGTTGTTGA 353
* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

← X-

```

A TGGTGATATGTATAGCCGAGTGATACGTACTGGGTGGTTTTTGTATTGTTATGGGCTTATT 410
B TGGTGATATGCATGATCGCAGTTATGCTGTACTGGGTGGTGTGTTGATTGTTTGGGCTTATT 413
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

← G446-

```

A GGTCTTTTGCAAATCAGGACCAATTTGTGAGGAGATAATCAAGTTGACCCAACAGCCCT 470
B GGCTCTTTGTGAATCAGGACCAATTTGTGAGGAGATACTTGGTCTGAAGACGGAAACTT 473
** ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

A CTGCCACTGCAGGGTAGATCTTTCAAGTGTGGACTGCTGCAAGGTGAACAAGATTAGCAC 530
B CTGCCGATGCACTTTTCTTCCCATGGGGTGAGTTGCTGCAAAAAACCCAAAAGCAAGGC 533
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

- A: Nukleotidsequenz des G-Proteins des Subtyps A, Isolat 1556, Frankreich, L34030, Juhasz und Easton 1994
- B: Nukleotidsequenz des G-Proteins des Subtyps B, Isolat 2119, Italien, L34031, Juhasz und Easton, 1994

Abbildung 2 Vergleich der Nukleotidsequenzen des G-Proteins von Subtyp A und Subtyp B

Die Nukleotidsequenz des G-Proteins weist eine 38 %ige Homologie zwischen den Subtypen A und B auf, wobei innerhalb der gleichen Subtypen eine 96 %ige Übereinstimmung besteht. Diese Eigenschaften des Proteins wurden genutzt um Primer zu entwickeln, die zwischen den Subtypen differenzieren können.

Die Primer G3++, G446- und X- liegen im konservierten Bereich der Nukleotidsequenz des G-Proteins. Sie detektieren allgemein das G-Protein des APV.

Die Primer A+ und B+mod, besonders der Bereich für die ersten 5 Basen, wurden so gewählt, dass sie im hypervariablen Bereich der Gensequenzen der Subtypen A und B liegen. So werden unterschiedlich große PCR-Fragmente amplifiziert und eine Differenzierung zwischen den Subtypen ist möglich (Abb. 3).

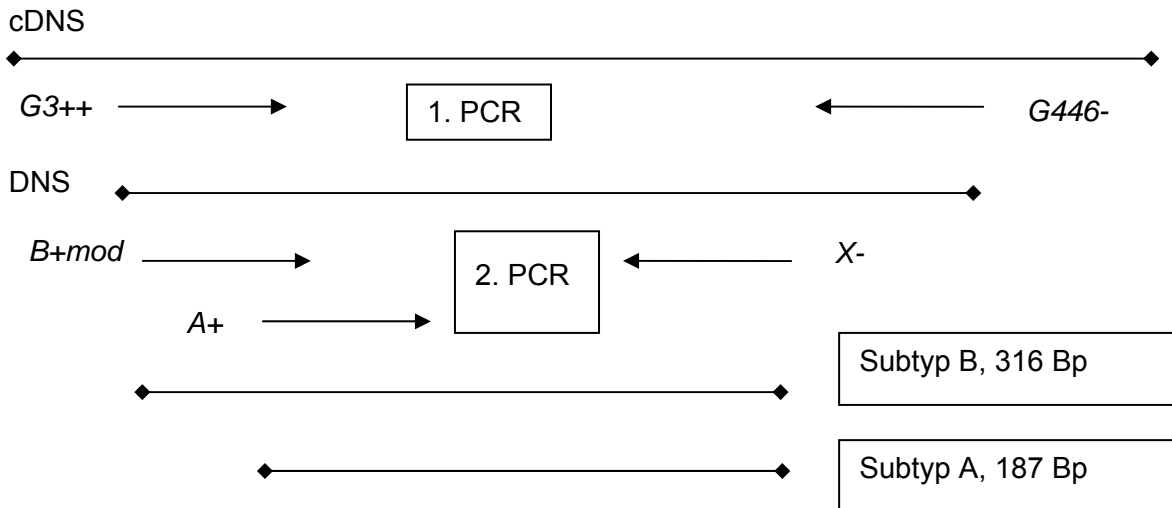
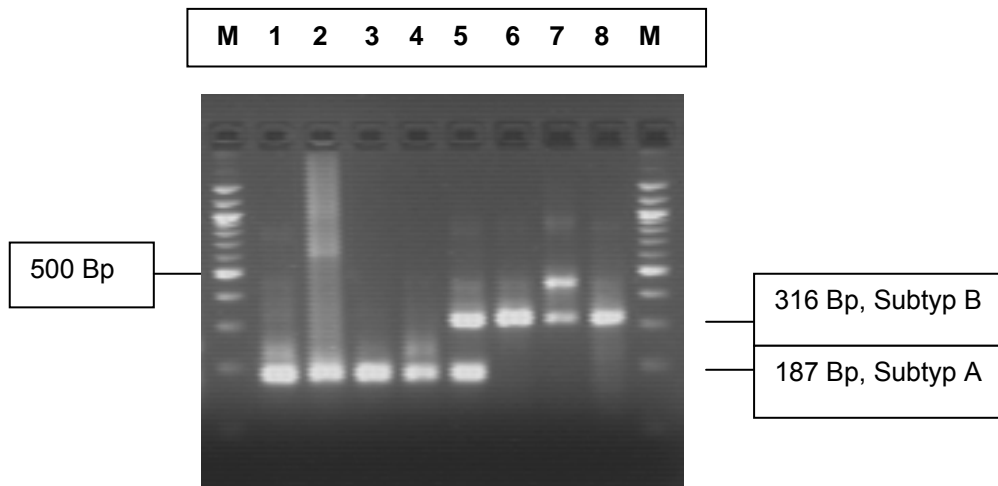


Abbildung 3 Schematische Darstellung zum Ablauf der nested PCR

3.1.2. Ergebnisse der nested RT-PCR zum Nachweis von Subtyp A und Subtyp B

Beim APV Subtyp A ist das amplifizierte PCR-Fragment 187 Bp groß und beim Subtyp B 316 Bp. Um die Ergebnisse der entwickelten nested RT-PCR überprüfen zu können, wurde zuerst anhand von bekannten Referenzstämmen die Subtypisierung durchgeführt.



1	-	BUT 1 # 8544 Isolat	Subtyp A
2	-	STG 761/88- Isolat	Subtyp A
3	-	STG 854/88- Isolat	Subtyp A
4	-	STG III/87- Isolat	Subtyp A
5	-	STG 1125 / 91- Isolat	Subtyp A und B
6	-	SHS/1439- Isolat	Subtyp B
7	-	VCO3- Isolat	Subtyp B
8	-	SHS PL20- Isolat	Subtyp B
M	-	100-Basenpaar-Marker	

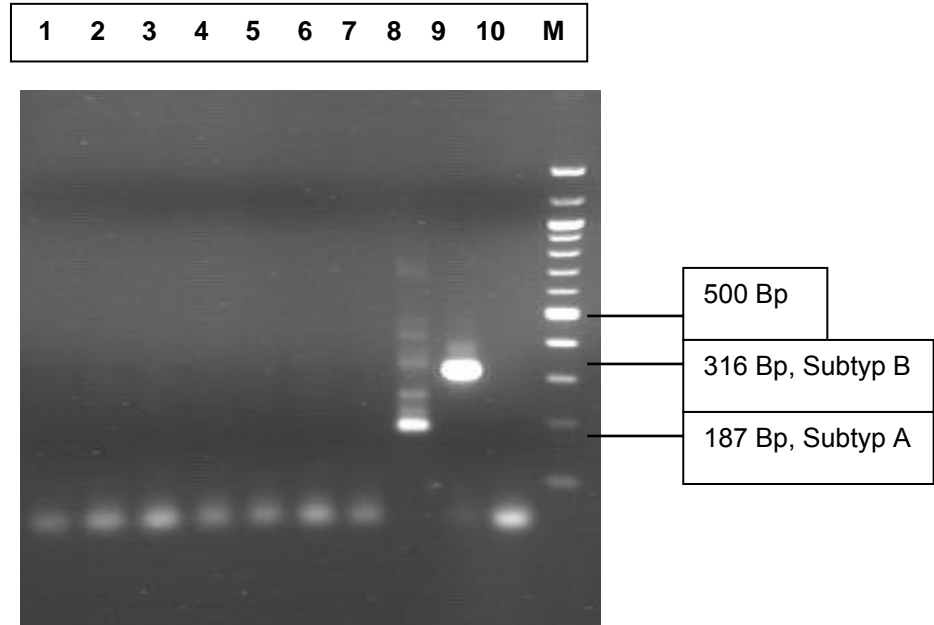
Abbildung 4 Nachweis von APV-Referenzstämmen

Die nested RT-PCR wurde an 8 APV-Referenzstämmen auf Ihre Qualität geprüft. Es standen 4 Isolate des Subtyps A, ein Isolat mit dem Subtyp A und B und drei Isolate des Subtyps B zur Verfügung. Der jeweilige Subtyp dieser bekannten Isolate konnte mittels der entwickelten nested RT-PCR bestätigt werden (Abb. 4).

Bei dem Isolat STG 1125 / 91 wurde sowohl der Subtyp B als auch der Subtyp A nachgewiesen.

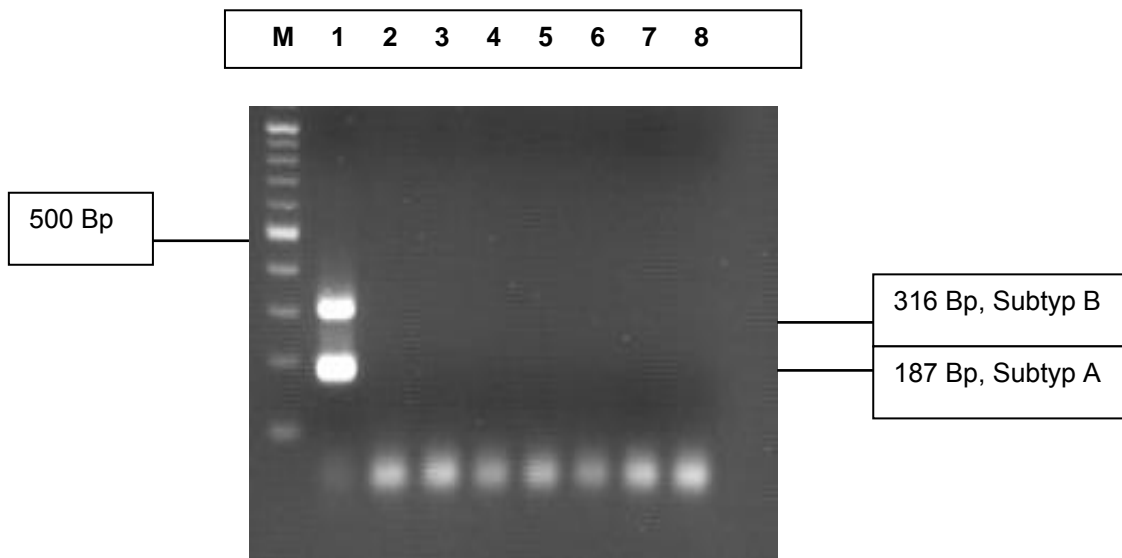
3.1.3. Bestimmung der Spezifität der nested RT-PCR

Bei der Untersuchung weiterer aviärer RNA-Viren aus dem Bestand des Instituts für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin konnten keine APV-spezifischen Banden nachgewiesen werden (Abb. 5 und Abb. 6).



1	-	La Sota Impfstoff, Impfstoffwerke Dessau,	PMV1
2	-	chicken/California/Yucaipa/56,	PMV 2
3	-	turkey/Wisconsin/68,	PMV 3
4	-	dove/Tennessee/4/75,	PMV 7
5	-	goose/Delaware/1053/76,	PMV 8
6	-	Stamm CU-1,	IBDV
7	-	U Connecticutcut 1133,	Reo
8	-	Positivkontrolle Subtyp A	
9	-	Positivkontrolle Subtyp B	
10	-	Negativkontrolle	
M	-	100-Basenpaar-Marker	

Abbildung 5: Ergebnisse der nested RT-PCR bei verschiedenen aviären RNA-Viren



- 1 - Positivkontrolle Subtyp A und Subtyp B
- 2 - PMV1
- 3 - IBV
- 4 - IBDV
- 5 - Reo
- 6 - REV
- 7 - RSV
- 8 - Negativkontrolle
- M - 100-Basenpaar-Marker

Abbildung 6 Ergebnisse der nested RT-PCR bei verschiedenen aviären RNA-Viren

3.2 Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR

3.2.1. Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR anhand von APV-Isolaten

3.2.1.1 Bestimmung des KID₅₀ der Isolate

Aus den Ergebnissen der Titration auf CER-Zellen (Tab. 9) konnte die Abschätzung des KID₅₀ erfolgen. Die KID₅₀ ist auf ein Milliliter der Lösung bezogen. Pro Verdünnung wurden drei Kulturflaschen mit je 1 ml Viruslösung beimpft.

Tabelle 9 Ergebnisse der Titration

	Proben mit CPE/ Proben gesamt					
Verdünnung	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Subtyp A						
STG 761/88	3/ 3	3/ 3	3/ 3	3/ 3	2/ 3	0/ 3
positiv/ gesamt						
Subtyp B						
STG SHS-1439/91	3/ 3	2/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3	0/ 3
positiv/ gesamt						

Berechnung nach Spearman und Kaerber:

$$\log \text{KID}_{50} / \text{Volumen} = x_0 - d/2 + d/n \times \sum x_i$$

d (Dosisverdünnungsabstand in log₁₀)= 1

n (Zahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte) = 3

X₀: positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Testobjekte positiv reagieren

∑x_i: Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Testobjekte ab und einschließlich X₀

Subtyp A: X₀ = 4

$$\sum x_i = 5$$

Die KID₅₀ für die aus Subtyp A hergestellte Virussuspension betrug 10^{5,17}/ml.

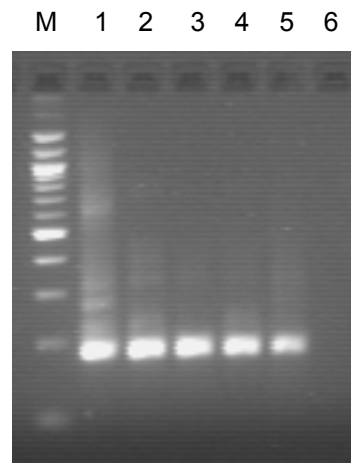
Subtyp B: X₀ = 1

$$\sum x_i = 5$$

Die KID₅₀ für die aus Subtyp B hergestellte Virussuspension betrug 10^{2,17}/ml.

Der geschätzte Virusgehalt der Suspensionen wurde für die Prüfung der Sensitivität der nested RT-PCR zugrunde gelegt.

3.2.1.2 Nested RT-PCR der Verdünnungsreihe



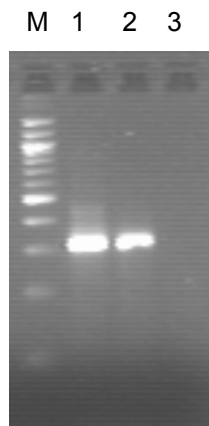
- 1: Isolat Subtyp A in Ausgangsverdünnung für die PCR
- 2: 10^{-1}
- 3: 10^{-2}
- 4: 10^{-3}
- 5: 10^{-4}
- 6: 10^{-5}
- M: 100-Basenpaar-Marker

Abbildung 7 Verdünnungsreihen des Isolates A

Bei dem Isolat A wurde bis zur 4. Verdünnungsstufe eine Bande der zu erwartenden Größe amplifiziert (Abb 7).

$$10^{5,17} \text{ KID}_{50}/\text{ml} \times 10^{-4} = 10^{1,17} \text{ KID}_{50}/\text{ml} = 14,79 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$$

Mit der entwickelten RT-PCR konnten bis zu 14,79 KID₅₀/ml APV Subtyp A aus der Lösung zur RNA-Aufbereitung nachgewiesen werden.



- 1: Isolat Subtyp B in Ausgangsverdünnung für die PCR
 2: 10^{-1}
 3: 10^{-2}
 M: 100 Basenpaar-Marker

Abbildung 8 Verdünnungsreihen des Isolates B

Beim Isolat B war bis zur 1. Verdünnungsstufe eine spezifische Bande nachzuweisen (Abb 8).

$$10^{2,17} \text{ KID}_{50}/\text{ml} \times 10^{-1} = 10^{1,17} \text{ KID}_{50}/\text{ml} = 14,79 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$$

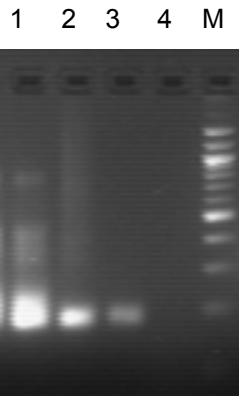
Es konnten mit der entwickelten RT-PCR bis zu $14,79 \text{ KID}_{50}/\text{ml}$ APV Subtyp B aus der Lösung zur RNA-Aufbereitung nachgewiesen werden.

3.2.2. Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR anhand von Impfstoffen

Bei einer so sensitiven Nachweismethode wie der PCR ist es wichtig, die Virusmenge zu kennen, die vorhanden sein muss, um ein positives Ergebnis zu erhalten.

In diesem Versuch wird die Nachweisgrenze der nested RT-PCR anhand zwei verschiedener Impfstoffe des Subtypes A und B untersucht. Die angegebene KID₅₀ des Impfstoffes pro Dosis wurde auf Milliliter umgerechnet.

Für den Impfstoff des Subtypes A (Nobilis® TRT)

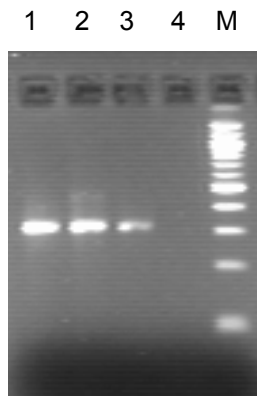


- 1: Verdünnung 10^{-1}
- 2: Verdünnung 10^{-2}
- 3: Verdünnung 10^{-3}
- 4: Verdünnung 10^{-4}
- M: 100-Basenpaar-Marker

Abbildung 9 Verdünnungsreihe Impfstoff Subtyp A, RT-PCR Ergebnisse

Bis zur 3. Verdünnungsstufe konnte die nested RT-PCR eine spezifische Bande der erwarteten Größe nachgewiesen werden (Abb 9). Unter Berücksichtigung der Verdünnung der Ausgangslösung für die erste RNA-Herstellung wurde die nachgewiesene Virusmenge ermittelt. Es waren 26,77 KID₅₀/ml des Impfstoffes Subtyp A in der Ausgangslösung für die RNA-Herstellung detektierbar.

Für den Impfstoff des Subtypes B (Terivac®)



- 1: Verdünnung 10^{-1}
- 2: Verdünnung 10^{-2}
- 3: Verdünnung 10^{-3}
- 4: Verdünnung 10^{-4}
- M: 100-Basenpaar-Marker

Abbildung 10 Verdünnungsreihe Impfstoff Subtyp B, RT-PCR Ergebnisse

Auch hier ist bis zu der 3. Verdünnungsstufe eine spezifische Bande der zu erwartenden Größe nachweisbar (Abb 10). Unter Berücksichtigung der Verdünnung der Ausgangslösung für die erste RNA-Herstellung wurde die nachgewiesene Virusmenge ermittelt. Die nested RT-PCR kann 26,60 KID₅₀/ml des Impfstoffes Subtyp B in der Ausgangslösung für die RNA-Herstellung detektieren.

3.3 Versuch zur Bestimmung der Ausscheidungsdauer von Lebendimpfstoff bei Putenküken

3.3.1. Versuchstiere

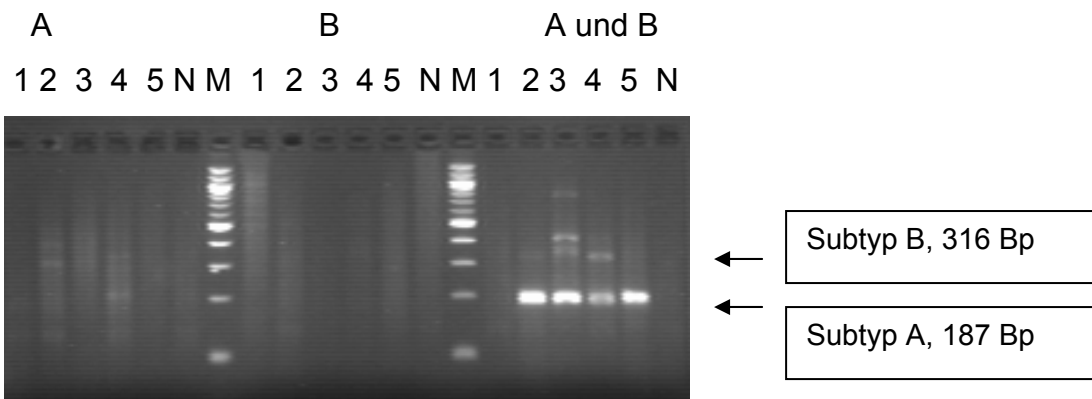
Am 1. Lebenstag besaßen die Versuchstiere keine Antikörper gegen APV und die anderen geprüften Erreger. Der festgestellte Titer im HAH gegen Newcastle Disease Viren lässt sich auf maternale Antikörper der Küken zurückführen (Tab. 10).

Tabelle 10 Kontrolle der Tiere vor Versuchsbeginn

Erreger	Anzahl der Proben	Ergebnisse der Untersuchung im ELISA	
		Positiv	Negativ
APV	14	0	14
ORT	14	0	14
MG	14	0	14
MM	14	0	14
MS	14	0	14
HAH-Test		Titerkennzahl TK log ₂	Standardabweichung
ND	14	4,4	2,5

3.3.2. RT-PCR- Ergebnisse

Die APV spezifische RNA konnte zwischen der ersten Probenentnahme am 3. Tag p.vacc. und dem Versuchende 5 Wochen p.vacc. nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind tabellarisch für die einzelnen Gruppen im Anschluss aufgeführt (Tab. 11, 12, 13) In der nicht geimpften Kontrollgruppe fielen alle RT-PCR-Ergebnisse negativ aus. Eine horizontale Übertragung zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden.



A	1-5: 5 Tiere geimpft mit Subtyp A
B	1-5: 5 Tiere geimpft mit Subtyp B
A und B	1-5: 5 Tiere geimpft mit Subtyp A und B
N	PCR Negativ Kontrolle
M	100 Bp-Marker

Abbildung 11 Nachweis APV-spezifischer Nukleinsäuren in Tupferproben drei Tage p.vacc.

In der Abbildung 11 sind die RT-PCR-Produkte drei Tage p.vacc. der geimpften Tiere der drei Gruppen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Gruppen, die nur mit einem Impfstoff immunisiert wurden, zeigten zu diesem Zeitpunkt keine positiven RT-PCR-Ergebnisse. In der Gruppe, die mit Impfstoff A und B geimpft wurde, konnten schon bei 3 von 5 Tieren Amplifikate des Subtypes A und bei einem Tier sowohl des Subtypes A als auch des Subtypes B nachgewiesen werden (Tab 13).

Im Verlauf des Impfversuches stellten sich die Ergebnisse der drei geimpften Gruppen wie folgt dar:

Tabelle 11 Ergebnisse der RT-PCR des Impfversuchs mit Subtyp A

Nummer der Puten	Ergebnisse der RT-PCR					
	3 Tage p.vacc.	1 Wo p.vacc.	2 Wo p.vacc.	3 Wo p.vacc.	4 Wo p.vacc.	5 Wo p.vacc.
1	n.d.	A	A	-	-	-
2	n.d.	A	-	-	-	-
3	-	A	-	-	-	-
4	n.d.	A	A	A	A	
5	-	A	-	-	-	-
6	n.d.	-	A	A		
7	-	-	A	-	A	
8	n.d.	A	-	-	-	
9	-	-	A	-	-	-
10	-	A	-	-	-	-
Kontakttier 1	n.d.	-	-	-	-	-
Kontakttier 2	n.d.	A	-	-	A	-
Kontakttier 3	n.d.	-				
Kontakttier 4	n.d.	-				
Kontakttier 5	n.d.	-	-			

1-10: mit Impfstoff Subtyp A geimpfte Tiere

Kontakttier 1-5: Ungeimpfte Tiere, die in den Isolator gesetzt wurden

n.d. nicht durchgeführt



Tier verendet/ aus tierschutzrelevanten Gründen (Beinschwäche) getötet

- negatives RT-PCR Ergebnis

Wo Wochen

p.vacc. post vaccinationem

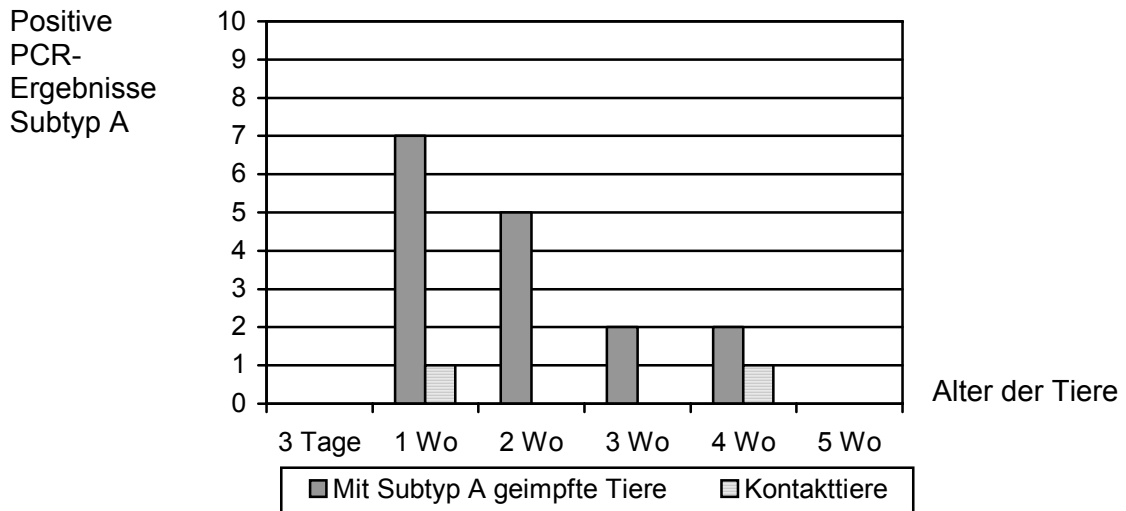



Abbildung 12 Impfversuch mit Impfstoff des Subtyps A

Bei 7 Tieren, die mit dem Impfstoff Subtyp A geimpft worden waren, konnten nach einer Woche APV Subtyp A spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen werden (Abb. 12). Nach zwei Wochen waren nur noch 5 Tiere positiv und nach 5 Wochen konnte die RNS des APV aus dem Impfstoff mittels RT-PCR nicht mehr nachgewiesen werden. Zwei Tiere, die zwischenzeitlich negativ getestet waren, zeigten wieder positive Ergebnisse.

Ein Kontakttier wies nach einer Woche und nach 4 Wochen ein positives Ergebnis auf.

Tabelle 12 Ergebnisse der RT-PCR des Impfversuchs mit Subtyp B

Nummer der Puten	Ergebnisse der RT-PCR					
	3 Tage p.vacc.	1 Wo p.vacc.	2 Wo p.vacc.	3 Wo p.vacc.	4 Wo p.vacc.	5 Wo p.vacc.
1	n.d.	B	-	-	-	
2	n.d.	-	-	-	-	
3	n.d.	-	-	-	-	-
4	n.d.	B	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	B	-	
7	n.d.	-	-	-	-	-
8	-	B	-	-	-	-
9	-	B	B	-	-	-
10	n.d.	-	B	-	-	
Kontakttier 1	n.d.	-	-	-	-	-
Kontakttier 2	n.d.	-	-	-	-	-
Kontakttier 3	n.d.	-	-	-	-	
Kontakttier 4	n.d.	-	-	-	-	
Kontakttier 5	n.d.	-	-	-	-	

- 1-10: mit Impfstoff Subtyp B geimpfte Tiere
- Kontakttier1-5: Ungeimpfte Tiere, die in den Isolator gesetzt wurden
- n.d. nicht durchgeführt
-  aus tierschutzrelevanten Gründen (Beinschwäche) getötet
- negatives RT-PCR Ergebnis
- Wo Wochen
- p.vacc. post vaccinationem

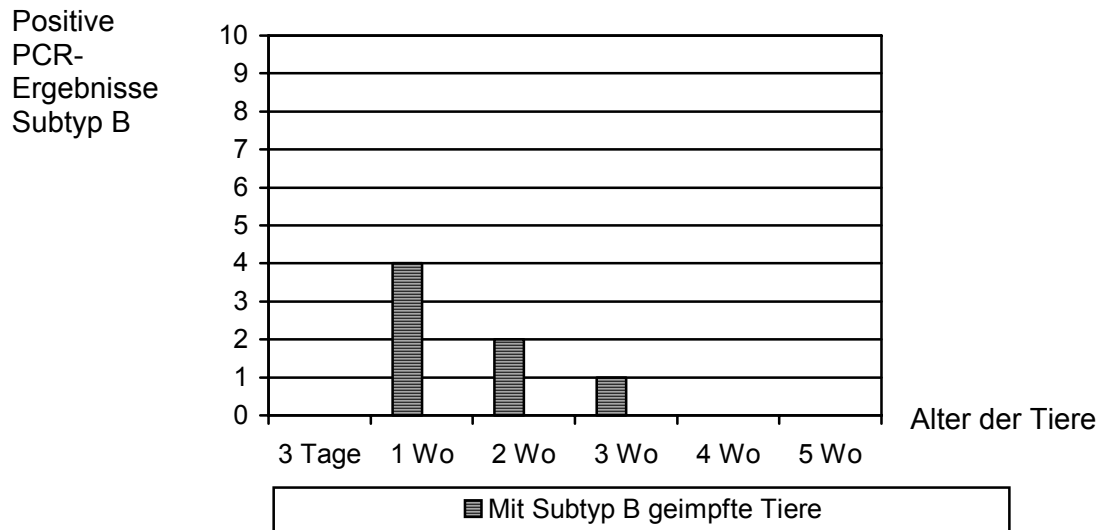


Abbildung 13 Impfversuch mit Impfstoff des Subtyps B

Die mit Subtyp B geimpften Gruppe zeigten nach einer Woche 4 Tiere positive Nachweise der Nukleinsäuren für das APV Subtyp B (Abb. 13). Schon in der 4. Woche konnte jedoch keine Virus-RNS des Impfstoffes mehr nachgewiesen werden. Die Kontakttiere waren während des gesamten Impfversuches negativ.

Tabelle 13 Ergebnisse der RT-PCR des Impfversuchs mit Subtyp A + B

Nummer der Puten	Ergebnisse der RT-PCR					
	3 Tage p.vacc.	1 Wo p.vacc.	2 Wo p.vacc.	3 Wo p.vacc.	4 Wo p.vacc.	5 Wo p.vacc.
1	-	-	-	A	-	
2	n.d.	-	-	A	-	-
3	n.d.	A	A	-	A	A
4	n.d.	AB	A	AB	-	
5	n.d.	A	AB	-	-	A
6	A	-	-	-	-	
7	A	AB	AB	AB	-	-
8	AB	A	-			
9	A	-	-			
10	n.d.	A	-	-	-	-
Kontakttier 1	n.d.	-	-	-	-	-
Kontakttier 2	n.d.	-	-	A	-	
Kontakttier 3	n.d.	-	-	-	-	A
Kontakttier 4	n.d.	-	-	A	-	
Kontakttier 5	n.d.	-	-	-	-	-

1-10: mit Impfstoff Subtyp A und B geimpfte Tiere

Kontakttier 1-5: Ungeimpfte Tiere, die in den Isolator gesetzt wurden

n.d. nicht durchgeführt



Tier verendet/ aus tierschutzrelevanten Gründen (Beinschwäche) getötet

- negatives RT-PCR Ergebnis

Wo Wochen

p.vacc. post vaccinationem

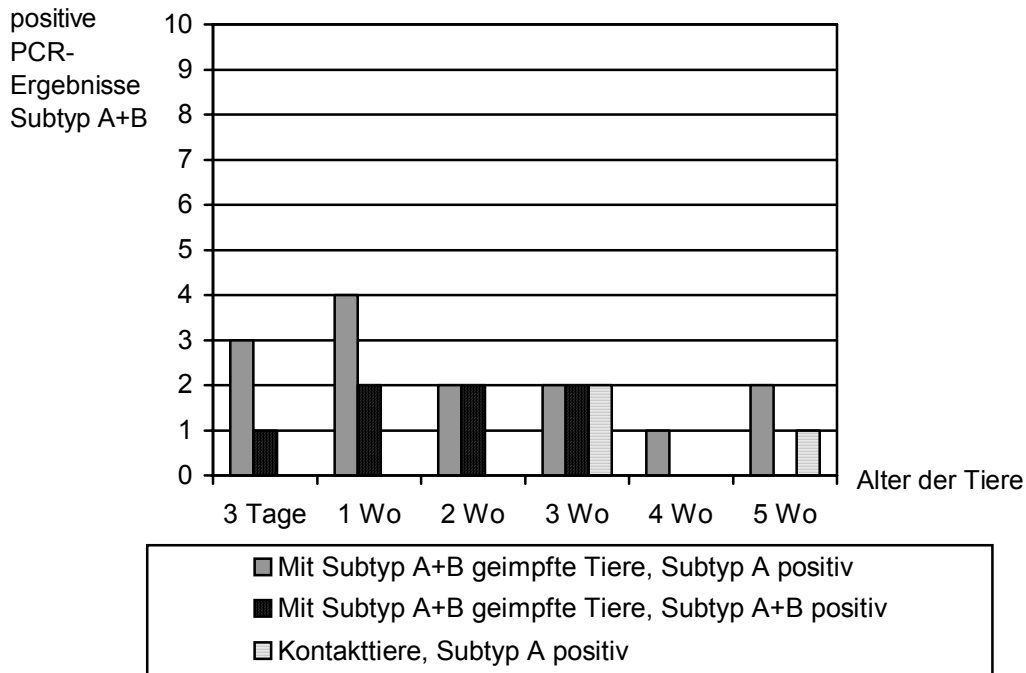


Abbildung 14 Impfversuch mit Impfstoff Subtyp A und B

Die APV-spezifische RNS vom Subtyp A konnte bei mehr Tieren nachgewiesen werden als die RNS vom Subtyp A und B. Die RNS des Subtyp B- Impfstoffes allein konnte nicht nachgewiesen werden.

Im Unterschied zu den Gruppen mit einer Impfung mit Subtyp A oder Subtyp B konnten in dieser Gruppe schon nach drei Tagen bei 3 Puten APV-spezifische RNS vom Subtyp A und bei einem Tier des Subtyps A und B nachgewiesen werden (Abb. 14). In der untersuchten Zeit war durchgehend ein positiver Nachweis der APV-RNS möglich, wobei nach der 3. Lebenswoche nur noch der Subtyp A detektiert wurde.

Zwei Kontakttiere hatten in der 3. und ein Kontakttier in der 5. Woche positive RT-PCR-Ergebnisse (Subtyp A).

3.3.3. ELISA-Ergebnisse

Der ELISA ist eine etablierte Methode, um Antikörper (AK) gegen das APV nachzuweisen und gibt in diesem Versuch Daten über den Verlauf der AK-Bildung der geimpften Tiere. Die Ergebnisse aus der 5. Woche wurden nicht aufgeführt, da die Werte der ELISA Platte durch einen Fehler bei der Aufbereitung nicht auswertbar waren.

In der folgenden Tabellen 14, 15, und 16 sind die Ergebnisse des Antikörpernachweises in den einzelnen Tiergruppen aufgeführt.

Tabelle 14 Ergebnisse des AK-Nachweises im ELISA nach Immunisierung der Tiere mit Impfstoff vom Subtyp A

Tiernummer	Ergebnisse des AK-Nachweises im indirekten ELISA							
	1. Wo p.vacc.		2. Wo p.vacc.		3. Wo p.vacc.		4. Wo p.vacc.	
	S/P-R.	Bew.	S/P-R.	Bew.	S/P-R.	Bew.	S/P-R.	Bew.
1	0,003	-	0,034	-	0,078	-	0,097	-
2	0,04	-	0,135	Gw	0,09	-	0,091	-
3	0,021	-	0,043	-	0,108	Gw	0,137	Gw
4	0,012	-	0,158	Gw	0,157	Gw	0,209	+
5	0,016	-	0,037	-	0,248	+	0,147	Gw
6	0,004	-	0,042	-	0,139	Gw	n.d.	
7	0,017	-	0,086	-	0,128	Gw	0,24	+
8	0,063	-	0,041	-	0,083	-	0,155	Gw
9	0,013	-	0,076	-	0,153	Gw	0,175	Gw
10	0,022	-	0,096	-	0,156	Gw	0,288	+
Kontakttier 1	0,002	-	0,045	-	0,141	Gw	0,19	Gw
Kontakttier 2	0,001	-	0,039	-	0,079	-	0,198	Gw
Kontakttier 3	0,006	-	n.d.		n.d.		n.d.	
Kontakttier 4	0,066	-	n.d.		n.d.		n.d.	
Kontakttier 5	0,014	-	0,03	-	n.d.		n.d.	

- S/P-Ratio < 0,1 (negativ)

Gw S/P-Ratio zwischen 0,1 und 0,2

+ S/P-Ratio > 0,2 (positiv)

n.d. nicht durchgeführt

Bew. Bewertung

Mittels ELISA konnten Antikörper nach drei Wochen bei einem Tier nachgewiesen werden. In der 4. Woche zeigten insgesamt drei Serumproben ein positives Ergebnis. Bei den Kontakttieren wurden ab der 3. Woche p.vacc. im ELISA Grenzwerte nachgewiesen, aber keine Werte im positiven Bereich.

Tabelle 15 Ergebnisse des AK-Nachweis im ELISA nach Immunisierung der Tiere mit Impfstoff vom Subtyp B

Tiernummer	Ergebnisse des AK-Nachweises im indirekten ELISA							
	1. Wo p.vacc.		2. Wo p.vacc.		3. Wo p.vacc.		4. Wo p.vacc.	
	S/P-R.	Bew.	S/P-R.	Bew.	S/P-R.	Bew.	S/P-R.	Bew.
1	0,007	-	0,014	-	0,078	-	0,155	Gw
2	0,006	-	0,104	Gw	0,053	-	0,101	Gw
3	0,006	-	0,114	Gw	0,023	-	0,027	-
4	0,013	-	0,031	-	0,048	-	0,04	-
5	0,01	-	0,059	-	0,025	-	0,141	Gw
6	0,033	-	0,052	-	0,141	Gw	0,162	Gw
7	0,027	-	0,089	-	0,115	Gw	0,11	Gw
8	0,001	-	0,038	-	0,093	-	0,017	-
9	0,01	-	0,018	-	0,061	-	0,029	-
10	0,012	-	0,028	-	0,11	Gw	0,236	+
Kontakttier 1	n.d.		0,005	-	0,045	-	0,046	-
Kontakttier 2	n.d.		-0,005	-	0,095	-	0,145	Gw
Kontakttier 3	0,004	-	0,028	-	0,063	-	0,144	Gw
Kontakttier 4	n.d.		0,036	-	0,031	-	0,073	-
Kontakttier 5	n.d.		0,027	-	0,07	-	0,075	-

- S/P-Ratio < 0,1 (negativ)

Gw S/P-Ratio zwischen 0,1 und 0,2

+ S/P-Ratio > 0,2 (positiv)

n.d. nicht durchgeführt

Bew. Bewertung

Die AK-Reaktion der Tiere nach der Immunisierung mit dem Impfstoff Subtyp B war schwächer verglichen mit der Immunisierung mit dem Impfstoff A. Nur bei einem geimpften Tier konnte in der 4. Woche eine AK-Bildung, die im positiven Bereich lag, nachgewiesen werden. Allerdings stieg die Anzahl der Seren, deren Werte im Grenzbereich lagen, von zwei Seren in der 2. Woche auf 5 Seren in der 4. Woche nach der Immunisierung. Bei den Seren von zwei Kontakttieren wurden nach 4 Wochen ELISA Ergebnisse im Grenzbereich gemessen.

Tabelle 16 Ergebnisse des AK-Nachweis im ELISA nach Immunisierung der Tiere mit Impfstoff vom Subtyp A + B

Tiernummer	Ergebnisse des AK-Nachweises im indirekten ELISA							
	1. Wo p.vacc.		2. Wo p.vacc.		3. Wo p.vacc.		4. Wo p.vacc.	
	S/P-R.	Bew.	S/P-R.	Bew.	S/P-R.	Bew.	S/P-R.	Bew.
1	0,01	-	0,126	Gw	0,051	-	0,222	+
2	0,012	-	0,092	-	0,088	-	0,233	+
3	0,014	-	0,035	-	0,101	Gw	0,744	+
4	0,001	-	0,065	-	0,195	Gw	0,332	+
5	0,024	-	0,101	Gw	0,058	-	0,206	+
6	0,004	-	0,056	-	0,145	Gw	0,153	Gw
7	0,08	-	0,098	-	0,09	-	0,381	+
8	0,012	-	0,05	-	n.d.		n.d.	
9	0,004	-	0,042	-	n.d.		n.d.	
10	0,008	-	0,213	+	0,176	Gw	0,223	+
Kontakttier 1	0,021	-	0,058	-	0,063	-	0,185	Gw
Kontakttier 2	0,041	-	0,129	Gw	0,142	Gw	0,185	Gw
Kontakttier 3	0,019	-	0,037	-	0,202	+	0,66	+
Kontakttier 4	0,027	-	0,052	-	0,198	Gw	0,3	+
Kontakttier 5	0,029	-	0,05	-	0,055	-	0,187	Gw

- S/P-Ratio < 0,1 (negativ)

Gw S/P-Ratio zwischen 0,1 und 0,2

+ S/P-Ratio > 0,2 (positiv)

n.d. nicht durchgeführt

Bew. Bewertung

In der Gruppe A und B zeigten die Seren der Tiere die stärkste Antikörperbildung. In der 2. Woche p.vacc. gelang bei einem Tier der Antikörpernachweis im positiven Bereich .

In der 4. Woche waren 7 Seren der geimpften Versuchstiere positiv und die übrigen Seren zeigten Werte im Grenzbereich.

Von den Kontakttieren wiesen drei Seren AK-Ergebnisse im positiven Bereich und die anderen beiden Seren Werte im Grenzbereich auf.

In der Tabelle 17 sind die durchschnittlichen S/P-Ratio der verschiedenen Versuchsgruppen gegeneinander aufgetragen.

Tabelle 17 Durchschnittliche S/P-Ratio der drei geimpften Gruppen

	Ergebnisse des AK-Nachweises im ELISA							
	1. Wo p.vacc.		2. Wo p.vacc.		3. Wo p.vacc.		4. Wo p.vacc.	
	D. S/P	Be.	D. S/P	Be.	D. S/P	Be.	D. S/P	Be.
Impfstoff A	0,0277	-	0,0748	-	0,134	Gw	0,172	Gw
Impfstoff B	0,0125	-	0,0547	-	0,0722	-	0,1022	Gw
Impfstoff A + B	0,0169	-	0,0878	-	0,113	Gw	0,3117	+

D. S/P Durchschnittliche S/P-Ratio

Be. Bewertung

3.4 Epidemiologische Untersuchung

Alle eingesandten Tupferproben stammen von Herden, die respiratorische Symptome wie Nasenausfluss, Niesen, Sinusschwellungen, Atemgeräusche, sinkende Legeleistung bei Legehennen und erhöhte Mortalität aufwiesen.

Das Alter der Tiere variierte zwischen 2 und 61 Lebenswochen. Der größte Teil der Tiere war jedoch zwischen 4 und 14 Wochen alt. Die Herdengröße lag zwischen 1.800 und 40.000 Tiere. Der Anteil männlicher und weiblicher Tiere war mit je 25 Geflügelherden gleich. In den restlichen Herden wurde das Geflügel nicht nach Geschlecht getrennt gehalten.

Es wurden 60 Puten- und 21 Masthähnchenherden untersucht. Zusätzlich wurden von 8 Legehennenbetrieben mit Legeleistungsabfall Proben entnommen und in die Untersuchung einbezogen.

Es wurden Bestände in den folgenden Bundesländern untersucht (Tab 18):

Tabelle 18 Untersuchte Herden nach Bundesländern

Bundesland	Anzahl der untersuchten Putenherden	Anzahl der untersuchten Masthähnchenherden	Anzahl der untersuchten Legehennenherden
Niedersachsen	10	16	-
Bayern	17	-	1
Baden-Württemberg	13	-	-
Brandenburg	2	3	7
Sachsen	11	-	-
Sachsen-Anhalt	2	1	-
Thüringen	2	1	-
Mecklenburg-Vorpommern	2	-	-
Schleswig-Holstein	1	-	-
insgesamt	60	21	8

3.4.1. Nachweis von APV-Subtypen bei Puten

Aus Bayern wurden die meisten Proben (17) eingeschendet gefolgt von Baden-Württemberg (13), Sachsen (11) und Niedersachsen (10). Aus Brandenburg, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Mecklenburg-Vorpommern und wurden zwei und aus Schleswig-Holstein eine Probe ausgewertet. Aus Hessen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz und dem Saarland lagen keine Proben vor (Tab 19). In 41 der 60 getesteten Putenbestände wurde APV-RNS nachgewiesen.

Tabelle 19 Übersicht der untersuchten Putenherden nach Bundesländern

Bundesland Puten	Anzahl der Herden	APV-Nachweis	
		positiv	negativ
Bayern	17	10	7
Baden-Württemberg	13	10	3
Sachsen	11	10	1
Niedersachsen	10	5	5
Brandenburg	2	2	-
Sachsen-Anhalt	2	1	1
Thüringen	2	1	1
Mecklenburg-Vorpommern	2	1	1
Schleswig-Holstein	1	1	-
Insgesamt	60	41	19

80 % der untersuchten Herden wurde gegen APV geimpft, hauptsächlich mit einem Subtyp B Impfstoff (47 %, 28 Herden) (Abb. 15). Die Impfungen fanden zu unterschiedlichen Zeiten statt und in manchen Betrieben folgte der ersten Impfung eine zweite oder dritte Impfung.

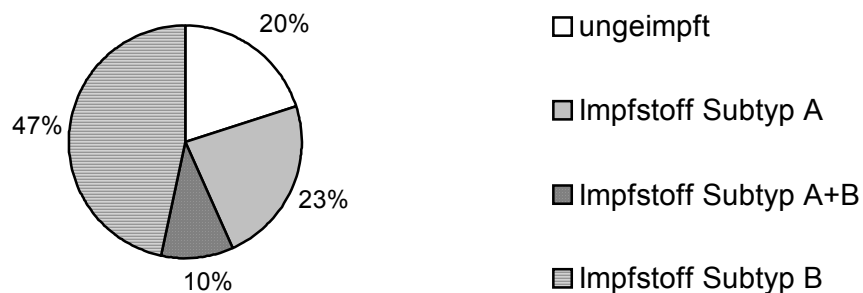


Abbildung 15 Impfungen in den Putenbeständen (%)

In den untersuchten Putenbeständen wurden 14 Herden mit einem Impfstoff Subtyp A geimpft, 28 Herden mit Subtyp B, 6 Herden mit Subtyp A und Subtyp B und 12 Herden wurden gar nicht geimpft. Unabhängig vom eingesetzten Impfstoff wurden die RNS beider APV-Subtypen in den untersuchten Herden detektiert. In 30 Herden wurde der Subtyp A detektiert. Der Subtyp B wurde in 7 Herden und der Subtyp A und B wurde in 4 Herden nachgewiesen. Von den 12 (20 %) nicht geimpften Putenbeständen wurde bei 8 Herden die RNS des Subtyps A detektiert (66,7 %) (Tab 20).

Tabelle 20 nested RT-PCR-Ergebnisse der Tupferproben der Putenbetriebe

	APV Nukleinsäure-Nachweis mittels nested RT-PCR				
	Typ A	Typ B	Typ A und B	negativ	Herden insgesamt
Subtyp A geimpft	6	4	-	4	14
Subtyp B geimpft	13	3	3	9	28
Subtyp A und B geimpft	3	-	1	2	6
ungeimpft	8	-	-	4	12
Anzahl der Herden	30	7	4	19	60

Mit 73 % Nachweisrate ist der Subtyp A der am häufigsten detektierte Subtyp in den Putenherden in Deutschland (Abb. 16). Die RNS des Subtyps B wurde in 17 % der Herden und des Subtyps A und B in 10 % der Herden detektiert.

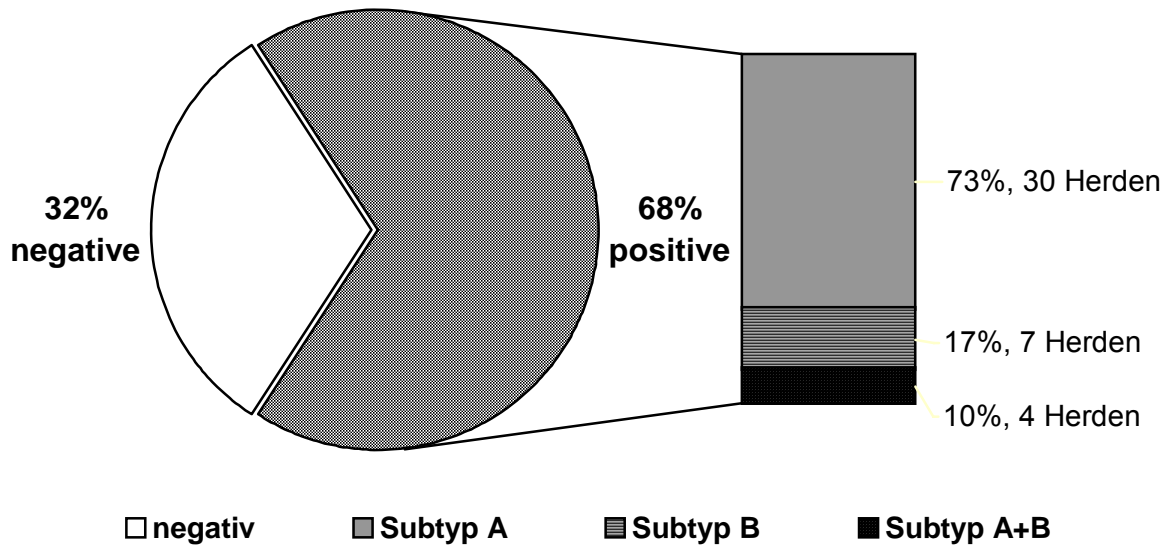


Abbildung 16 nested RT-PCR-Ergebnisse in den Putenbeständen

In der Abbildung 17 sind die PCR-Ergebnisse der untersuchten Putenbetriebe in Deutschland in Abhängigkeit von den verwendeten Impfstoffen dargestellt. Der Anteil der Subtyp A positiven Herden variierte je nach verwendetem Impfstoff. In den ungeimpften Herden waren alle positiven Herden mit dem APV Subtyp A infiziert. In den mit Subtyp A geimpften Herden konnte bei 43 %, in den mit Subtyp B geimpften Herden konnte bei 46 % und in den mit Subtyp A und B geimpften Herden konnte bei 50 % der APV-positiven Herden die RNS des Subtyps A detektiert werden. Der Anteil der Subtyp B positiven Herden variierte ebenfalls je nach verwendetem Impfstoff. In den ungeimpften Herden konnte kein APV Subtyp B nachgewiesen werden. In den mit Subtyp A geimpften Herden betrug der Anteil der Subtyp B positiven Herden 28 %. Bei Subtyp B geimpften Herden betrug der Anteil der Subtyp B positiven Herden 10 %. Bei mit Subtyp A und B geimpften Herden wurde keine RNA vom Subtyp B nachgewiesen.

PCR Ergebnisse in %

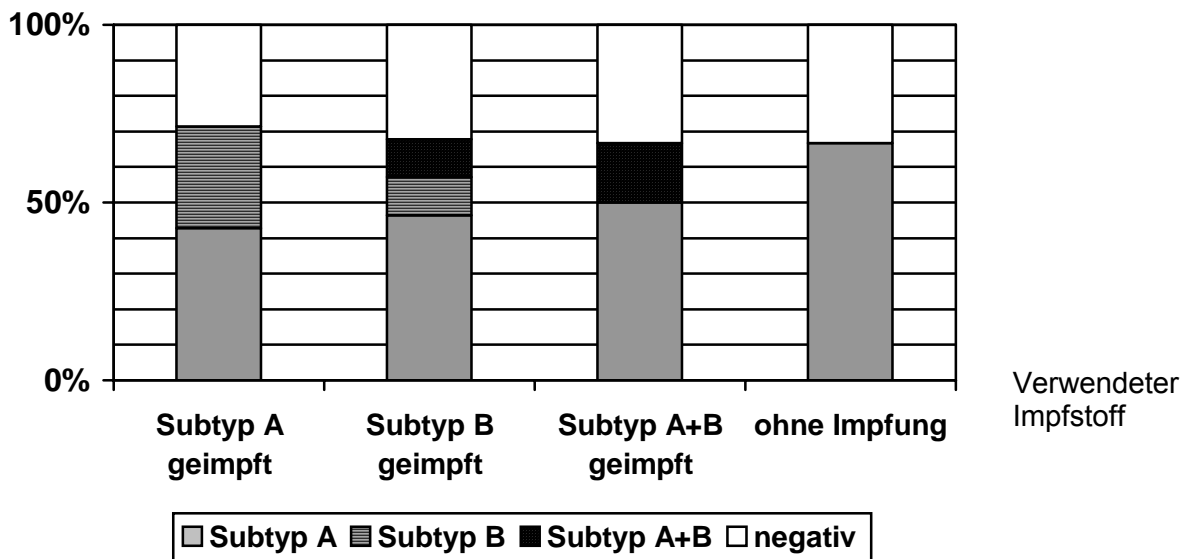


Abbildung 17 Prozentuale Verteilung der PCR-Ergebnisse in Abhängigkeit von den verwendeten Impfstoffen

3.4.1.1 Nested RT-PCR-Ergebnisse in Abhängigkeit vom Alter der Puten

Das Alter der Puten lag bei der Mehrzahl der untersuchten Proben zwischen 2 und 15 Wochen. 6 Proben stammten aus Elterntierherden, die älter als 15 Wochen waren. Die Einteilung wurde willkürlich gewählt, wobei in den einzelnen Gruppen jeweils 7-12 Herden zusammengefasst wurden (Abb. 18).

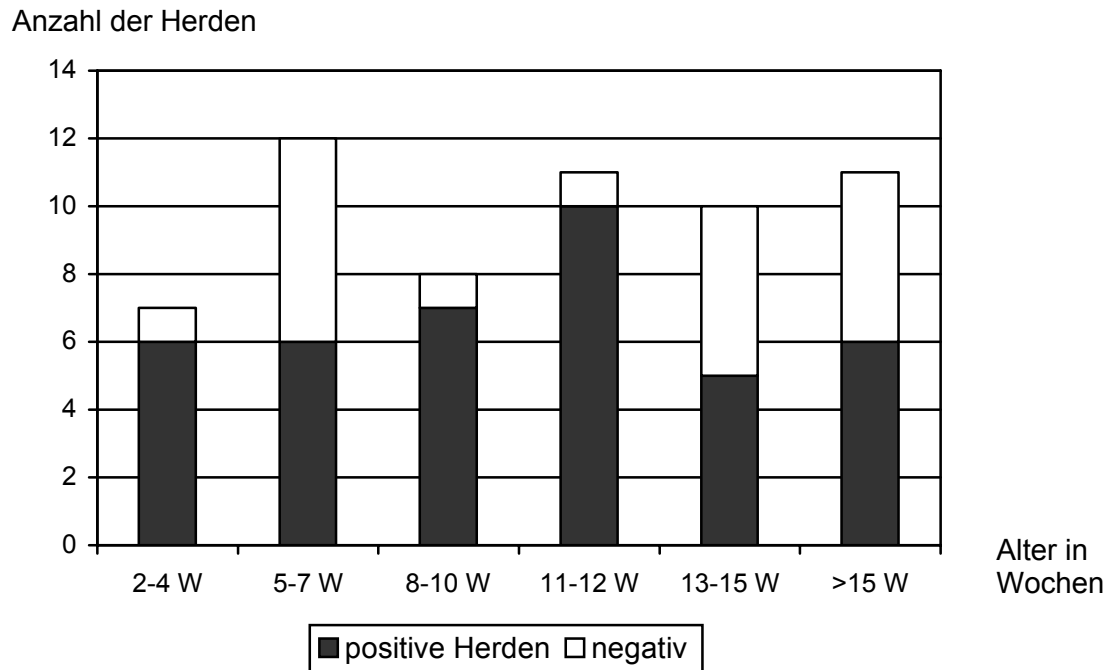


Abbildung 18 APV-positiven Herden (absolut) in Abhängigkeit von dem Alter der Puten

Der prozentuale Anteil der APV positiven Herden änderte sich mit dem Alter der Puten. In den Herden, wo die Tiere 2-4 Wochen alt waren, lag der Anteil bei 86 %. Der Anteil sank auf 50% bei Tieren, die zwischen 5-7 Wochen alt waren. Er stieg in den Herden mit Tieren im Alter von 8-10 Wochen auf 88 % bzw. bei Herden mit Tieren im Alter von 11-12 Wochen auf 91 % und sank ab der 12. Woche wieder, bis er bei den über 15 Wochen alten Tieren bei 53 % lag (Abb. 19).

PCR-Ergebnisse in %

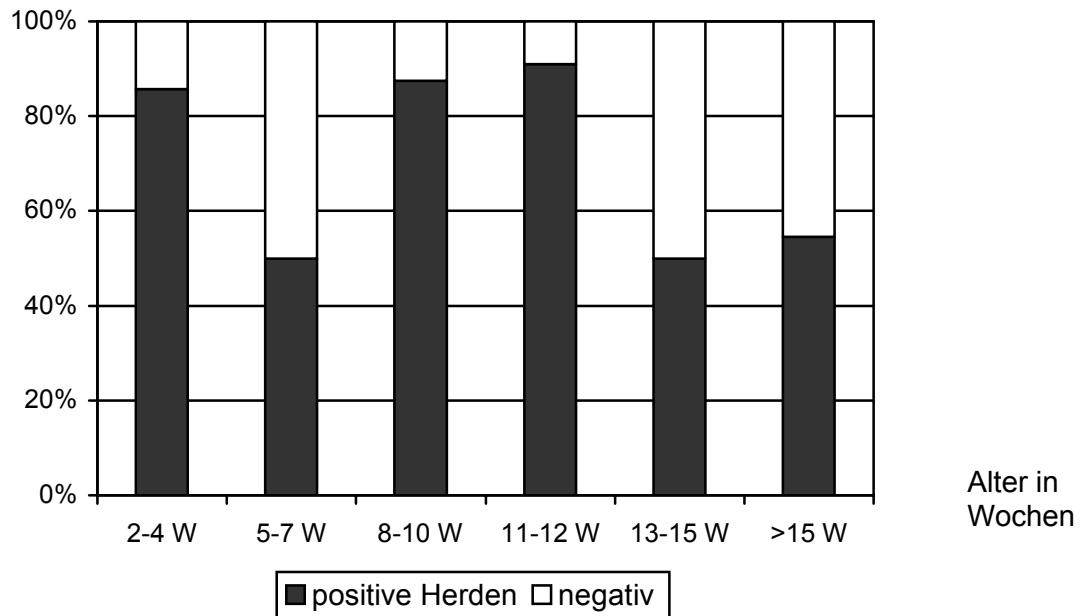


Abbildung 19 Positiven Herden (prozentual) in Abhängigkeit von dem Alter der Puten

3.4.1.2 Nested RT-PCR-Ergebnisse in Abhängigkeit vom Geschlecht der Puten

Bei 11 Betrieben ist nicht bekannt, welches Geschlecht die Herden der eingesendeten Proben hatten. 44 % (22) der eingesendeten Proben stammten aus Putenherden mit männlichen Tieren und 24 % (12) aus Herden mit weiblichen Tieren. In 32 % (15) der Proben wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere in den Herden gehalten (Tab 21).

Zwischen den beiden Geschlechtern der untersuchten Herden bestehen in Bezug auf den Nachweis von APV-spezifischen Nukleinsäuren Unterschiede.

Bei den männlichen Puten wurde häufiger (64 %) als bei den weiblichen Tieren (50 %) die RNS des APV detektiert.

Die Verteilung der Subtypen in Abhängigkeit vom Geschlecht der Tiere stellt sich wie folgt dar:

Tabelle 21 Nachweis von APV bei männlichen und weiblichen Puten

Geschlecht der Herden	Herden insgesamt	positive	negative
Weiblich	12 (24%)	6 (50%)	6 (50%)
männlich	22 (44%)	14 (64%)	8 (36%)
gemischt	15 (32%)	10 (62%)	5 (38%)
insgesamt	49	30	19

Der Nachweis von APV spezifischer RNS vom Subtyp B gelang bei 33 % der positiven Herden mit Putenhennen und bei 15 % der positiven Herden mit Hähnen. Die männlichen Tiere wiesen zu 85 % und die weiblichen zu 67 % die RNS vom APV Subtyp A auf (Tab. 22).

Tabelle 22 Verteilung der Subtypen bei männlichen und weiblichen Puten

Herden	Subtyp A	Subtyp B	Subtyp A und B
Weiblich	4 (67%)	2 (33%)	0 (0%)
männlich	12 (85%)	2 (15%)	0 (0%)
gemischt	8 (80%)	1 (10%)	1 (10%)
insgesamt	24 (80%)	5 (16%)	1 (4%)

3.4.1.3 Zusammenhang zwischen nested RT-PCR-Ergebnisse und Impfung

Wie im Kapitel 3.3 gezeigt wurde, detektierte die entwickelte nested RT-PCR bei einmaliger Impfung mit dem Subtyp B bis zu 3 Wochen, bei Subtyp A bis zu 4 Wochen und bei einer kombinierter Impfung mit den Subtypen A und B bis zu 5 Wochen lang das Virusmaterial aus dem Impfstoff mittels RT-PCR. Da mittels der entwickelten RT-PCR keine Unterscheidung zwischen dem Impfstamm und dem Feldvirus möglich war, kann die Zeit zwischen der letzten APV-Impfung und der Probenentnahme Aufschluß über den Nachweis von Impfstoff geben (Tab 23).

Innerhalb von 4 Wochen nach Impfung mit Subtyp A wurde bei 3 Herden RNS vom Subtyp A nachgewiesen. Innerhalb von 3 Wochen nach einer Impfung mit dem Subtyp B wurde bei 2 Herden RNS vom Subtyp B nachgewiesen. Innerhalb von 5 Wochen nach einer Impfung mit beiden Subtypen wurde bei einer Herde RNS vom Subtyp A nachgewiesen. Nach einer Impfung mit A und B, die länger als 5 Wochen zurücklag, konnte keine Aussage zu einem möglichen Zusammenhang gemacht werden. Dies trifft auf drei von 60 Herden zu.

Tabelle 23 Möglicher Nachweis von Lebendimpfstoff in den untersuchten Putenherden

Subtyp des Impfstoffs	Zeit zwischen letzter APV-Impfung und Probenentnahme	Nested RT-PCR-Ergebnis	Anzahl der Herden	evtl. Nachweis des Impfstoffs
A	0-4 Wo	A	3	ja
	> 4 Wo	A	3	nein
	0-4 Wo	B	1	nein
	> 4 Wo	B	2	nein
	fraglich	B	1	nein
	0-4 Wo	negativ	1	nein
	> 4 Wo	negativ	3	nein
B	0-3 Wo	A	0	nein
	> 3 Wo	A	7	nein
	fraglich	A	6	nein
	0-3 Wo	B	2	ja
	> 3 Wo	B	1	nein
	> 3 Wo	A und B	3	nein
	0-3 Wo	negativ	2	nein
	> 3 Wo	negativ	6	nein
	fraglich	negativ	1	nein
A und B	0-5 Wo	A	1	ja
	5-10 Wo	A	1	fraglich
	>10 Wo	A	1	wahrsch. nein
	>10 Wo	A und B	1	wahrsch. nein
	>10 Wo	negativ	2	nein
ungeimpft	-		12	nein
insgesamt			60	

3.4.2. Nachweis von APV-Subtypen bei Masthähnchen

Bei den ungeimpften Masthähnchen stehen die positiven RT-PCR-Ergebnisse für eine Infektion der Herde mit dem Feldvirus (Tab. 24).

Tabelle 24 Übersicht der untersuchten Masthähnchenherden nach Bundesländern

Bundesland	Anzahl der Herden	APV-Nachweis			
		Subtyp A positiv	Subtyp B positiv	Subtyp A und B positiv	negativ
Niedersachsen	16	7	-	2	7
Brandenburg	3	2	-	-	1
Sachsen-Anhalt	1	-	-	1	-
Thüringen	1	1	-	-	-
Insgesamt	21	10	0	3	8

Bei 62 % der Herden wurden APV-spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen. 77 % (10) der Herden waren mit dem APV des Subtyps A und 23 % (3) mit dem Subtyp A und B infiziert. Eine Virusinfektion mit dem Subtyp B allein wurde nicht detektiert (Abb. 20).

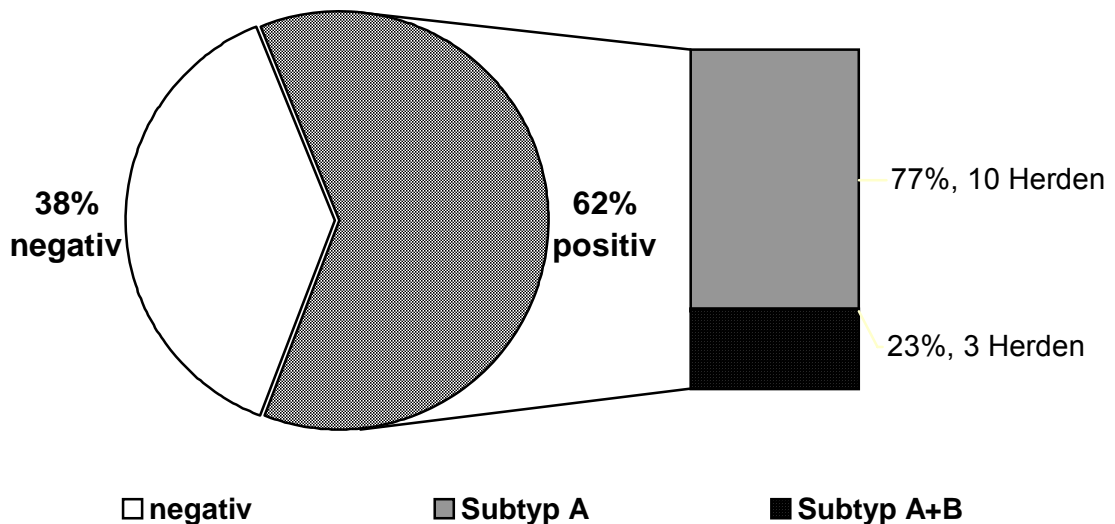


Abbildung 20 nested RT-PCR-Ergebnisse Masthähnchen (ungeimpft)

Nachweis von APV-Subtypen bei Legehennen

In den 8 untersuchten Herden mit Legehennen wurde keine Impfung gegen das APV durchgeführt. Es handelt sich daher bei den nachgewiesenen APV-Nukleinsäuren immer um eine Feldvirusinfektion (Tab. 25).

Tabelle 25 Übersicht der untersuchten Legehennenherden nach Bundesländern

Bundesland	Anzahl der Proben	APV-Nachweis			
		Subtyp A positiv	Subtyp B positiv	Subtyp A und B positiv	negativ
Bayern	1	1	-	-	-
Brandenburg	7	3	-	1	3
Insgesamt	8	4	0	1	3

Bei 62 % der Herden wurden APV-spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen. Es konnte bei 80 % (4) der positiven Herden die RNS des Subtyps A und bei einer Herde die des Subtyps A und B (20 %) nachgewiesen werden. Der Subtyp B allein wurde nicht detektiert (Abb. 21).

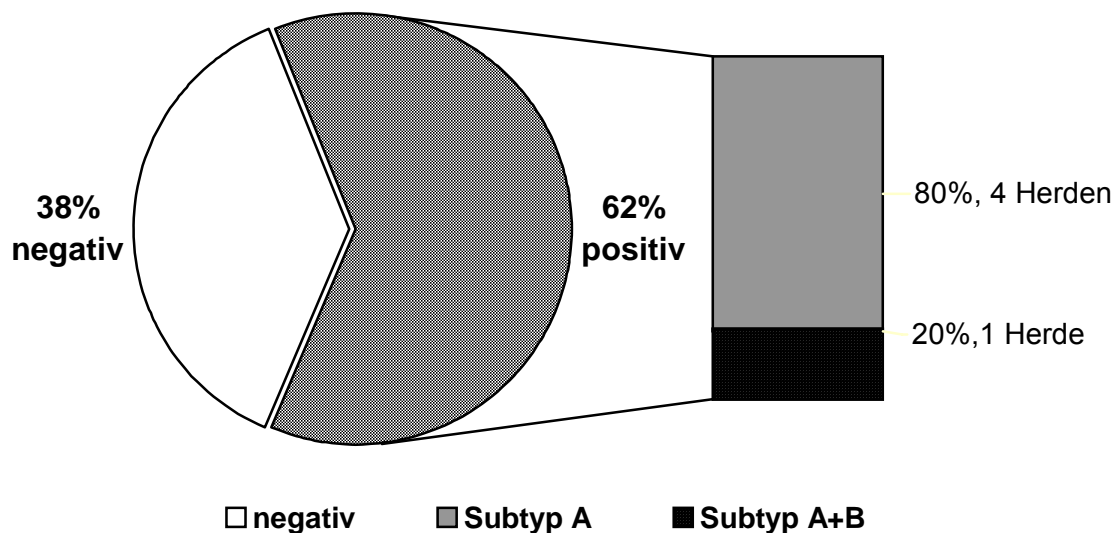


Abbildung 21 nested RT-PCR-Ergebnisse Legehennen (ungeimpft)

Durch die geringe Probenzahl können diese Ergebnisse die Situation der APV-Infektionen in Legehennenbetrieben in Deutschland nur bedingt wiedergeben.