

4 Diskussion

4.1 Entwicklung der nested RT-PCR

Am Anfang der geplanten epidemiologischen Untersuchung in Deutschland stand die Entwicklung einer RT-PCR für den Nachweis des APV. Diese hatte zusätzlich die Anforderung zu erfüllen, zwischen den beiden Subtypen A und B, die in Europa vorkommen, unterscheiden zu können. Die Subtypen C und D wurden bei der Entwicklung der RT-PCR nicht berücksichtigt, da der Subtyp C bisher nur endemisch in Nordamerika auftrat und der Subtyp D nach zweimaliger Isolierung 1985 in Frankreich nicht wieder detektiert wurde (Seal, 2000; Goyal et al., 2003; Bâyon-Auboyer et al., 2000).

Anhand der Nukleotidsequenzen des G-Proteins der beiden Subtypen des APV wurden drei Primer entwickelt, die zusammen mit einem publizierten Primer und einem modifizierten Primer nach Bâyon-Auboyer et al. (1999) in einer nested RT-PCR die beiden APV Subtypen A und B differenzieren können. Das G-Protein wurde gewählt, da sich die Nukleotidsequenz nur zu 38 % zwischen den Subtypen A und B gleicht, jedoch bei Isolaten eines Subtyps zu 96 % übereinstimmt (Juhasz und Easton, 1994).

Es wurde eine nested RT-PCR entwickelt, da diese im Vergleich zu einer einfachen RT-PCR sowohl sensitiver detektieren als auch zwischen Subtypen differenzieren kann (Bâyon-Auboyer et al., 1999, Hess et al., 2004). Dadurch besteht bei der nested RT-PCR aber auch die Gefahr, falsch positive Ergebnisse zu erhalten. Um diese auszuschließen, wurden bei allen Proben Negativkontrollen mitgeführt. Zudem wurde die Anlagerungstemperatur in der zweiten PCR mit 63 °C höher gewählt als die optimale errechnete Temperatur (48-59°C), da bei höheren Temperaturen die Möglichkeit einer unspezifischen Anlagerung der Primer reduziert ist (Cavanagh et al., 1997).

Mit der entwickelten RT-PCR wurden erfolgreich die Subtypen A und B bekannter Isolate bestimmt. In Abbildung 4 weist der Stamm VCO3 eine zweite Bande bei 450 Basenpaaren auf. Diese Bande ist ein Polymerisationsprodukt aus der ersten PCR durch die Primer G446- und G3++. Die spezifische Bande aus der zweiten PCR für den Subtyp B bei 316 Basenpaaren ist trotz der zusätzlichen Bande bei 450 Basenpaaren quantitativ ausreichend amplifiziert worden. Die Aussagekraft der RT-PCR ist daher auch bei diesem Referenzstamm nicht eingeschränkt. Bei der Prüfung anderer aviärer Viren erwies sich die RT-PCR als APV-spezifisch.

Die entwickelte nested RT-PCR kann somit zur Unterscheidung der beiden Subtypen A und B des APV verwendet werden. Ähnliche Erfahrungen machten schon Juhasz und Easton (1994), die mit einer RT-PCR anhand des G-Proteins mit anschließender Restriktionsenzymanalyse die Subtypen A und B unterscheiden konnten sowie Naylor et al. (1997a) mit einer nested RT-PCR.

Wenn weitere Subtypen des APV mit einer PCR erfasst bzw. unterschieden werden sollen, so ist das G-Protein nur bedingt als Grundlage für das Primerdesign geeignet. Das G-Protein des Subtypes C weicht in ein paar Erkennungsmerkmalen vom G-Protein des Subtypes A, B und D ab (Toquin et al., 2003). So fehlen beim Subtyp C z. B. hoch konservierte extrazelluläre Cysteinreste und eine kurze hydrophobische und konservierte Aminosäuresequenz, die in einer extrazellulären Domäne lokalisiert ist. Das G-Protein des Subtypes C hat zu 21 % ähnliche Aminosäuresequenzen zum Subtyp A (Toquin et al., 2003) und nur 4 bis 16,5 % ähnliche Aminosäuresequenzen zu den Subtypen B, D und dem hRSV (Alvarez et al., 2003). Dagegen kann eine auf dem N-Gen basierende RT-PCR die Subtypen A, B und D (Bäyon-Auboyer et al., 1999) sowie das Virus der Moschusente amplifizieren (Toquin et al., 1999a) und wahrscheinlich auch den Subtyp C (zitiert nach Cook und Cavanagh, 2002).

Da erst 1997 und 2000 die Subtypen C und D klassifiziert wurden, ist nicht auszuschliessen, dass in Zukunft weitere Subtypen auftreten, die nicht durch eine etablierte RT-PCR detektiert werden können. Daher sollten zusätzlich zum Nachweis aviärer Pneumoviren beim Geflügel weiterhin Methoden angewendet werden, die unabhängig vom Subtyp, das APV identifizieren können.

4.2 Bestimmung der Sensitivität der entwickelten nested RT-PCR

In diesem Versuch wurden die Isolate STG 761/88 (Subtyp A) und SHS/1439 (Subtyp B) sowie die zwei Impfstoffe Nobilis® TRT (Fa. Intervet, Boxmeer, Niederlande) für den Subtyp A und Terivac® (Fa. Merial, Hallbergmoos, Deutschland) für den Subtyp B zur Feststellung der Sensitivität der nested RT-PCR verwendet. Bei beiden Isolaten ließen sich bis zu 14,79 KID₅₀/ml in der Ausgangslösung der nested RT-PCR nachweisen. Die entwickelte nested RT-PCR konnte 26,77 KID₅₀/ml des Impfstoffes Subtyp A und 26,60 KID₅₀/ml des Impfstoffes Subtyp B in der Ausgangslösung nachweisen.

Damit liegt die Nachweisgrenze dieser nested RT-PCR in der Spannbreite der molekularen Nachweismethoden für das APV. Eine RT-PCR basierend auf der Gensequenz des F-Protein, die den Subtyp A detektieren kann, weist bis zu 0,4 KID₅₀ nach (Mase et al., 1996), eine single-tube PCR des M-Proteins zur Detektierung des Subtypes C kann bis zu 1,77 KID₅₀ detektieren (Pedersen et al., 2000). Eine single-tube RT-PCR, die gleichzeitig das APV, das aviäre Influenza Virus und das Newcastle Disease Virus nachweisen kann, detektiert zwischen 3,16 und 15,84 KID₅₀/ml (Malik et al., 2004). Eine RT-PCR zur Detektion des Subtypen C anhand des F-Proteins kann bis zu <0.01 KID₅₀ APV detektieren (Dar et al., 2001b), eine Taqman RT-PCR bis zu 10^{-1,69} KID₅₀ (Pedersen et al., 2001).

Auffällig ist, dass sich bei der entwickelten RT-PCR die Nachweisgrenze der verwendeten Isolate und Impfstoffe unterscheidet. Eine Ursache kann die mit unterschiedlichen Wirtssystemen ermittelte KID₅₀ des Virus in der Ausgangslösung sein. So wurden die Isolate zur Bestimmung des KID₅₀ auf CER-Zellen und die Impfstoffe auf VERO-Zellen und CEF-Zellen vermehrt. Da die verwendeten Wirtssysteme zur Vermehrung eine unterschiedliche Empfänglichkeit für das Virus aufweisen, können sich bei Titrationen die Ergebnisse unterscheiden (Rolle/Mayr, 1993). Eine weitere Ursache kann die Titration in 10er Verdünnungsschritten sein, die bei der hohen Sensitivität der RT-PCR einen Spielraum der Ergebnisse zwischen den Verdünnungen zulässt.

4.3 Versuch zur Bestimmung der Ausscheidungsdauer von Lebendimpfstoff bei Putenküken

In Deutschland wird in den Geflügelbetrieben gegen APV geimpft. Die Impfung ist eine wirksame Methode, um Puten und Hühner vor einer klinischen Infektion mit aviären Pneumoviren zu schützen. Lebendvakzine stimulieren sowohl die lokale Immunität als auch die systemische Immunität (Khehra und Jones, 1998). So können Trachealtupferproben nach einer Lebendimpfung den Impfstamm beinhalten. Da bei Mastputen kein inaktivierter Impfstoff in Deutschland verwendet wurde und ausschließlich Lebendvakzine eingesetzt wurden, ist die Unterscheidung mittels PCR zwischen dem Impfstamm und dem Feldvirus schwierig. Von Cavanagh et al. wurde 1999 eine PCR entwickelt, mit der es möglich ist, den Impfstamm Subtyp B vom Feldstamm zu unterscheiden. Für den Impfstoff vom Subtyp A existiert bislang keine solche Unterscheidungsmöglichkeit.

Die hier entwickelte **RT-PCR** erlaubt bei einem positiven Ergebnis keine Unterscheidung zwischen einem Impfstamm oder einem Feldstamm. Daher wurde anhand eines weiteren Versuches geprüft, wie lange die RNS des Impfvirus mittels der entwickelten RT-PCR aus Trachealtupfern nachgewiesen werden kann.

Die Länge des Impfversuches wurde auf fünf Wochen festgelegt, da laut Literatur der Nachweis von APV zwischen einem und 19 Tagen p.i. mittels PCR möglich war. So konnte Li et al. 1993 mit einer RT-PCR (F-Protein) bis 19 Tage nach einer experimentellen Infektion die RNS aus Trachealtupfern detektieren. Nach einer okulonasalen Beimpfung von vier Wochen alten Puten mit Virus vom Subtyp C war mittels RT-PCR (F-Protein) aus Trachealtupfern der Nachweis zwischen dem 2. und 6. Tag p.i. möglich (Jirjis et al., 2002). Eine nested RT-PCR (F-Protein) konnte vom ersten bis zum 17. Tag p.i. den Nachweis von APV bei experimentell mit Subtyp C inokulierten Tieren erbringen (Pedersen et al., 2001). Die hier entwickelte RT-PCR hat im Versuch ab der ersten Probennahme nach drei Tagen bis mindestens fünf Wochen p.vacc. den Impfstoff Subtyp A und B aus Trachealtupferproben nachgewiesen. Im Vergleich zu den Zeitspannen in der aufgeführten Literatur ist in diesem Versuch die Dauer des Nachweises relativ lang. Da das Experiment nach der 5. Woche beendet wurde, konnte die Nachweisdauer bei der kombinierten Impfung allerdings nicht ermittelt werden. Hier besteht noch Klärungsbedarf.

Der Nachweis des Impfstammes aus einer Trachealtupferprobe mit der hier entwickelten RT-PCR war nach einer einmalig erfolgten Impfung mit Nobilis® TRT (Subtyp A, Gruppe A) bis zu vier Wochen möglich. Nach der dritten Woche konnte nach einer einmaligen Impfung mit Terivac (Subtyp B, Gruppe B) keine RNS des Impfstammes mehr nachgewiesen werden. In der Gruppe B hatte von den Kontakttieren keines ein positives PCR-Ergebnis. Solche Unterschiede zwischen den beiden Subtypen wurden auch schon früher festgestellt. So repliziert sich der Subtyp B nur im oberen Atemtrakt, wogegen der Subtyp A auch den unteren Teil wie die Bronchien befällt. Zudem infiziert der Subtyp A doppelt so viele Epithelzellen im oberen Atemtrakt wie der Subtyp B und produziert damit auch eine größere Virusmenge. Damit sind Infektionen mit dem Subtyp A Virus im Gegensatz zu solchen mit dem Subtyp B Virus mit stärker ausgeprägten klinischen Symptomen, pathologischen und histologischen Veränderungen und einer höheren Ausscheidungsrate des Virus verbunden (Van de Zande et al., 1999). In diesem Versuch könnte die höhere Ausscheidungsrate von Subtyp A Virus die um eine Woche längere Nachweisdauer gegenüber Subtyp B bewirkt haben.

Ebensolche Unterschiede von Subtyp A zu Subtyp B wurden in Bezug auf den Virusgehalt festgestellt. Im Versuch bei Van de Zande et al. (2000) wiesen Puten, die mit dem Subtyp A infiziert wurden, schon nach drei Tagen den höchsten Virustiter auf, während die mit Subtyp B infizierten erst am fünften Tag den höchsten Virustiter zeigten.

Bei Hess et al. (2004) wurden im Versuch geimpfte sowie ungeimpfte Legehennen intravenös oder okulonasal mit dem Subtyp B Virus infiziert. Bis zu vier Wochen p.i. konnte das Virus vom Subtyp B bei Hühnern mit einer nested RT-PCR detektieren. Da bei dem Versuch im Gegensatz zu den hier verwendeten Impfstämmen mit einem Feldvirus infiziert wurde, kann die höhere Virulenz die längere Ausscheidungsrate des Virus - und damit auch eine längere Nachweisdauer bei den Tieren - bewirkt haben.

Die Methode der kontrollierten Weitergabe von Impfvirus in einer Herde mit nur einem kleinen Teil geimpfter Tiere (seeder birds) kann wirtschaftliche Verluste durch APV Infektionen vermeiden (Gulati et al, 2001; Patnayak et al., 2002). Tiere, die im Feld von einer Impfdosis nichts aufnehmen oder keinen Impfstoff erhalten, wurden in dem Versuch durch fünf ungeimpfte Tiere simuliert, die am ersten Tag des Versuches in die Isolatoren dazu gesetzt wurden. Auch diese Tiere wiesen, abgesehen von der Gruppe B, bei der ersten Probennahme eine Woche p.vacc. positive RT-PCR Ergebnisse auf. Entsprechende Resultate zeigten im Versuch bei Alkahalaf et al. (2002) Kontakttiere, bei denen zeitgleich zu den mit APV Subtyp C infizierten Tieren der Nachweis von RNS gelang.

Der **ELISA**-Test ist ein geeignetes Verfahren, Antikörper gegen das APV bei Puten und Hühnern nachzuweisen (Hafez und Löhren, 1990). Die im Test nachgewiesenen Antikörper erreichen am 11. Tag nach Auftreten der ersten Symptome die höchsten Werte (Baxter-Jones et al., 1989).

In diesem Versuch zeigte in der Gruppe A und B das Serum einer Pute in der zweiten Woche p. vacc. Antikörper. Einen ebensolchen Antikörpernachweis im ELISA-Test 14 Tage nach einer erfolgten Impfung erbrachten Mekkes und De Wit (1998). Etwas später, nach drei Wochen, wurde bei den Puten, die mit dem Subtyp A geimpft wurden, der erste positive ELISA-Wert gemessen. In der vierten Woche p.vacc. hatte das erste Tier aus der Gruppe B nachweislich Antikörper gebildet. Der Impfstoff vom Subtyp A hatte früher eine Antikörperbildung stimuliert als der Impfstoff Subtyp B. Weiterhin konnte nach einer einmaligen Impfung am ersten Lebenstag keine messbare Antikörperbildung durch den Impfstoff Subtyp B festgestellt werden (Le Gros et al., 1988, Hafez, 1994, Mekkes und De Wit, 1998), während nach einer einmaligen Applikation von Subtyp C Impfstoff bei 2-4 Wochen-alten Puten diese ab der zweiten Woche bis zu 10 Wochen p.vacc. (Gulati et al., 2001a) seropositiv blieben.

Panigraphy et al. (2000) setzte Puten als Kontakttiere einen Tag später zu mit Subtyp C Virus infizierten Tieren. Die Puten serokonvertierten gleichzeitig mit den infizierten Puten am 10. Tag p.i.. Hier im Versuch ließen sich erste positive ELISA Werte bei den Kontakttieren erst eine Woche nach den geimpften Tieren nachweisen. Damit bestätigt sich die Aussage von Patnayak et al., nach der die Infektion aller Tiere mit der Methode des ‚seeder bird‘ mehr Zeit benötigt als eine gleichzeitige Applikation von Impfstoff in der Herde (Patnayak et al., 2002).

Bei dem verwendeten selbst hergestellten ELISA wurde mit dem STG 761/88 Isolat (Subtyp A) beschichtet. Hafez (1991) und Eterradossi et al. (1992) fanden heraus, dass, in Bezug auf das beschichtete Antigen, heterologe Antikörper einen niedrigeren Extinktionswert erbrachten als homologe. Ähnliche Ergebnisse erzielten Toquin et al. (2000) und Cook et al. (1998b). Es kann daher sein, dass die Seren der Gruppe B im ELISA schwächer reagierten.

Betrachtet man den Mittelwert der ELISA-Ergebnisse einer Gruppe, so stieg bei der Gruppe A und B der Wert der durchschnittlichen S/P-Ratio in der vierten Woche auf 0,31 und lag damit als einziger im positiven Bereich. Bis auf eine Pute hatten die geimpften Tiere dieser Gruppe nach vier Wochen im ELISA nachweisbare Antikörper im positiven

Bereich gegen das APV gebildet. Demnach wurde in der Gruppe, die eine Kombination aus beiden Impfstoffen erhalten hatte, die stärkste Antikörperbildung gemessen.

Diese Ergebnisse stützen die Erkenntnisse, die bei der RT-PCR-Auswertung gewonnen wurden. Auch dort hat die Kombination der Impfstoffe Subtyp A und Subtyp B bei den Tieren vermehrt positive PCR Ergebnisse erbracht und der Impfstoff Subtyp B die kürzeste Nachweisdauer gezeigt.

Bei einer Übertragung der Ergebnisse auf den Feldversuch ist zu bemerken, dass im Feld Impfstoffe oft länger nachgewiesen werden können als unter experimentellen Bedingungen. So konnte auch Subtyp B Impfstoff bis zu fünf Wochen nach einer Impfung im Feld detektiert werden (Naylor et al., 2002), wobei dieser im hier diskutierten Versuch nur bis zur dritten Woche nachweisbar war. Demnach ist hier nur ein Richtwert für die Nachweisdauer von Proben aus dem Feld bestimmt worden.

4.4 Epidemiologische Untersuchung

In der vorliegenden Arbeit wurden Puten- und Masthähnchenbetriebe, deren Tiere respiratorische Symptome zeigten, auf APV untersucht. Zusätzlich wurden von Legehennenbetrieben mit Legeleistungsabfall Proben entnommen und untersucht.

In den untersuchten Putenherden lag die Infektionsrate mit dem APV bei 68 %. Bei Untersuchungen, die zwischen 1986 und 1992 durchgeführt wurden, lag die Anzahl der positiven Herden in Deutschland zwischen 43-100 % in Putenmastbetrieben (Hafez, 1994). Die hier festgestellte Anzahl der infizierten Herden bestätigt damit die Zahlen der damaligen Untersuchung in Deutschland.

Mit 73 % Nachweisrate von APV spezifischer RNS in den Putenbeständen ist der Subtyp A der am häufigsten vorkommende Subtyp in Deutschland. Dieses Ergebnis stimmt mit den APV-Isolaten, die 1988 in Deutschland untersucht wurden, überein und bestätigt die Dominanz des Subtyps A in Deutschland (Hafez et al., 2000a). Damit unterscheidet sich die derzeitige APV-Situation in Deutschland von den Subtyp-Vorkommen in anderen Ländern Europas. In der Vergangenheit wurde angenommen, dass der Subtyp A nur in England vorkommt und in den anderen Ländern Europas wie Frankreich, Spanien, Ungarn, Italien und den Niederlanden der Subtyp B (Cook et al., 1993a). Jedoch wurde in Belgien (Van de Zande et al., 1998) sowie in Deutschland über Feldinfektionen mit Subtyp A sowie Subtyp B berichtet (Hafez et al., 2000a). Erst im letzten halben Jahr der epidemiologischen Untersuchung wurde die RNS vom Subtyp A und B und Subtyp B in den Herden nachwiesen. Die RNS vom Subtyp B wurde in 17 % der Herden detektiert. In 10 % der Putenherden lag ein Nachweis von APV Subtyp A und B spezifischer RNS vor. Bisher ist ein gleichzeitiger Nachweis von zwei Subtypen in der Literatur nicht beschrieben. Einen Wechsel von Subtypen in der Population hat es jedoch schon früher in England, Belgien oder Israel gegeben (Naylor et al., 1997a; Van de Zande et al., 1998; Banet-Noach et al, 2005).

Zwischen den Subtypen A und B besteht eine Kreuzimmunität (Cook et al., 1999), sodass ein Impfstoff (Subtyp A oder B) vor einer Infektion beider Subtypen schützt. In dieser Untersuchung stellten sich Unterschiede zwischen verwendeten Impfstoffen und dem Nachweis von APV spezifischer RNS der Subtypen heraus. So wurde durch eine vorherige Impfung mit dem Impfstoff Subtyp A weniger APV Subtyp A spezifische RNS in den Herden detektiert im Vergleich zu den Herden, die keinen oder Subtyp B Impfstoff erhielten (Abb. 17). Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch bei dem Subtyp B Impfstoff.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch schon von Van de Zande et al. (2000) festgestellt. In der Untersuchung bestand zwischen den Subtypen A und B nach einer Impfung nur ein unvollständiger Schutz vor einer heterologen Infektion.

Die Betrachtung der RT-PCR-Ergebnisse im Zusammenhang mit dem **Alter** der Puten ergab eine Häufung von APV spezifischer RNS-Nachweisen zwischen der 8. und 12. Woche. In Belgien wurden dagegen schon in der 5.-7. Lebenswoche, teilweise bis in die 10. Woche hinein, bei Puten verstärkt Symptome einer APV-Infektion in sechs untersuchten Betrieben beobachtet (Van de Zande et al., 1998). In Deutschland werden die Puten zwischen der 5. und 6. Lebenswoche umgestallt. Dadurch besteht erhöhte Gefahr, das Virus durch Personal oder kontaminierte Gegenstände zu verbreiten (Stuart, 1989). Die Tiere stehen in dieser Zeit durch den Ortswechsel unter erhöhtem Stress, der eine Infektion zusätzlich begünstigt. Als Folge steigt nach der 8. Woche sowohl die absolute Anzahl der APV positiven Herden als auch der prozentuale Anteil bei den eingesendeten Proben.

Der Anteil der APV positiv getesteten Herden liegt bei den **männlichen** Tieren um 14 % höher als bei den **weiblichen**. Bei der Untersuchung von Hafez (1994) dagegen lag die Mortalität der Putenmasthennen signifikant höher als bei den Hähnen. Jirjis et al. (2002) konnten nach einer okulonasalen Infizierung von Puten mit APV Subtyp C keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren in Bezug auf die klinischen Symptome erkennen. In dieser Untersuchung wurde der APV Subtyp A mit 85 % häufiger bei männlichen als bei weiblichen Tieren (67 %) nachgewiesen. Die RNS des Subtyps B ist mit 33 % doppelt so oft bei Putenhennen detektiert worden wie bei Hähnen (15 %). Bisher liegt keine weitere Veröffentlichung vor, in der eine Abhängigkeit einer APV-Infektion vom Geschlecht der Tiere untersucht wurde.