

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Epidemiologische Untersuchung über  
das Vorkommen der Subtypen A und B des aviären Pneumovirus  
in Geflügelbeständen in Deutschland**

INAUGURAL- DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Rabea Haarländer, geb. Wenzel**  
Tierärztin aus Berlin  
Berlin, 2005

Journal-Nr. 2964

**Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. D. Ebner  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. G. Monreal

Descriptorien: turkey diseases, avian paramyxovirus, paramyxoviridae, PCR

Tag der Promotion: 28. Oktober 2005

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>10</b>
<b>1 LITERATUR</b>	<b>11</b>
1.1 Definition	11
1.2 Vorkommen und Bedeutung	11
1.3 Geschichte	14
1.4 Ätiologie	18
1.4.1. Klassifikation	18
1.4.2. Morphologie	18
1.4.3. Struktur	19
1.4.4. Virusproteine	19
1.4.5. Antigenspektrum	22
1.4.6. Pathogenese	23
1.5 Virusvermehrung in verschiedenen Kulturverfahren	24
1.5.1. Trachealringkulturen	24
1.5.2. Zellkulturen	24
1.5.3. Hühnerembryonen	24
1.6 Epizootiologie	26
1.7 Wirtsspektrum	27
1.8 Verlauf	28
1.8.1. Puten	28
1.8.2. Hühner	28
1.9 Klinische Erscheinungen	30

1.9.1.	Rhinotracheitis der Puten	30
1.9.2.	Swollen Head Syndrom (SHS)	30
1.10	Pathologisch-anatomische Veränderungen	32
1.10.1.	Rhinotracheitis der Puten	32
1.10.2.	Swollen Head Syndrom (SHS)	32
1.11	Histopathologische Veränderungen	33
1.11.1.	Rhinotracheitis der Puten	33
1.11.2.	Swollen Head Syndrom	34
1.12	Immunologie	36
1.13	Diagnose	37
1.13.1.	Direkter Nachweis	37
1.13.2.	Indirekter Nachweis	39
1.14	Differentialdiagnose	42
1.15	Bekämpfungsmaßnahmen	43
1.15.1.	Therapie	43
1.15.2.	Immunprophylaxe	43
<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>		<b>49</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>		<b>49</b>
2.1	Entwicklung der RT-PCR zur Unterscheidung der Subtypen A und B	49
2.1.1.	<b>Material</b>	<b>49</b>
2.1.1.1	Referenzvirusstämme	49
2.1.1.2	Virusisolate zur Prüfung der Spezifität der nested RT-PCR	51
2.1.1.3	Puffer, Lösungen und Kit für die RNS –Präparation	52
2.1.1.4	Puffer, Enzyme und Lösungen für die Reverse Transkription	53
2.1.1.5	PCR	53
2.1.1.6	Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese	54
2.1.2.	<b>Methoden</b>	<b>55</b>
2.1.2.1	RNS- Präparation	55
2.1.2.2	Reverse Transkription	57
2.1.2.3	Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	58
2.1.2.4	Gelelektrophorese der PCR- Produkte	62

<b>2.2</b>	<b>Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR</b>	<b>63</b>
<b>2.2.1.</b>	<b>Material</b>	<b>63</b>
2.2.1.1	Isolate	63
2.2.1.2	Puffer, Lösungen und Zellen für die Durchführung der Titration	63
2.2.1.3	Impfstoffe	65
<b>2.2.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>66</b>
2.2.2.1	Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR mit APV-Isolaten	66
2.2.2.2	Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR mit Impfstoffen	67
<b>2.3</b>	<b>Versuch zur Bestimmung der Ausscheidungsdauer von Lebendimpfstoff bei Putenküken</b>	<b>68</b>
<b>2.3.1.</b>	<b>Material</b>	<b>68</b>
2.3.1.1	Versuchstiere	68
2.3.1.2	Impfstoff	68
2.3.1.3	Indirekter ELISA	68
<b>2.3.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>70</b>
2.3.2.1	Durchführung des Impfversuches	70
2.3.2.2	Durchführung der RT-PCR	71
2.3.2.3	Durchführung des indirekten ELISA	71
<b>2.4</b>	<b>Epidemiologische Untersuchung an Feldisolaten</b>	<b>74</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>75</b>
<b>3.1</b>	<b>Entwicklung der nested RT-PCR</b>	<b>75</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Primerbindungsstellen</b>	<b>75</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Ergebnisse der nested RT-PCR zum Nachweis von Subtyp A und Subtyp B</b>	<b>78</b>
<b>3.1.3.</b>	<b>Bestimmung der Spezifität der nested RT-PCR</b>	<b>79</b>
<b>3.2</b>	<b>Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR</b>	<b>81</b>
<b>3.2.1.</b>	<b>Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR anhand von APV-Isolaten</b>	<b>81</b>
3.2.1.1	Bestimmung des KID <sub>50</sub> der Isolate	81
3.2.1.2	Nested RT-PCR der Verdünnungsreihe	82
<b>3.2.2.</b>	<b>Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR anhand von Impfstoffen</b>	<b>84</b>
<b>3.3</b>	<b>Versuch zur Bestimmung der Ausscheidungsdauer von Lebendimpfstoff bei Putenküken</b>	<b>86</b>

3.3.1.	Versuchstiere	86
3.3.2.	RT-PCR- Ergebnisse	86
3.3.3.	ELISA-Ergebnisse	93
3.4	Epidemiologische Untersuchung	98
3.4.1.	Nachweis von APV-Subtypen bei Puten	99
3.4.1.1	Nested RT-PCR-Ergebnisse in Abhängigkeit vom Alter der Puten	104
3.4.1.2	Nested RT-PCR-Ergebnisse in Abhängigkeit vom Geschlecht der Puten	106
3.4.1.3	Zusammenhang zwischen nested RT-PCR-Ergebnisse und Impfung	108
3.4.2.	Nachweis von APV-Subtypen bei Masthähnchen	110
	Nachweis von APV-Subtypen bei Legehennen	111
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>112</b>
4.1	Entwicklung der nested RT-PCR	112
4.2	Bestimmung der Sensitivität der entwickelten nested RT-PCR	114
4.3	Versuch zur Bestimmung der Ausscheidungsdauer von Lebendimpfstoff bei Putenküken	115
4.4	Epidemiologische Untersuchung	119
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>EPIDEMIOLOGICAL RESEARCH ON THE PRESENCE OF AVIAN PNEUMOVIRUS SUBTYPE A AND B IN GERMANY</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>125</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>141</b>

## Abkürzungen

A	Adenin
AMV	engl.: Avian Myeloblastosisvirus
APV	Aviäres Pneumovirus
Aqua bidest.	Lat.: Aqua bidestillata; bidestilliertes Wasser
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
CER	engl.: Chicken Embryo Rough Cells
CPE	engl.: cytopathic effect; Zytopathischer Effekt
CTP	Cytosintriphosphat
DNS	Desoxiribonukleinsäure
DNTP	Desoxinukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendinitro-Tetraessigsäure
ELISA	engl.: Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
G	Guanin
GTP	Guanintriphosphat
KID <sub>50</sub>	50% der (Zell)Kultur infizierende Dosis
i.o.	intraoculär
i.n.	intranasal
IB	infektiöse Bronchitis
MEME	engl.: minimal Essential Medium Eagle
p.i.	lat.: post infectionem; nach der Infektion
p.vacc.	lat.: post vaccinationem, nach der Impfung
PBS	engl.: phosphate buffered sodium; Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl.: Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PMV	Paramyxovirus
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	engl.: sodium dodecyl sulphate
SHS	engl.: Swollen Head Syndrome
SPF	engl.: specific pathogen free
T	Thymin
Ta	Tage

TBE	Tris-Borat-Elektrophorese-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TRT	engl.: Turkey Rhinotracheitis
TTP	Thymintriphosphat
Vol	Volumen
Wo	Wochen



## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, die aktuelle Verteilung der Subtypen A und B des aviären Pneumovirus (APV) in den Geflügelbetrieben in Deutschland zu ermitteln.

Zu Beginn wurde eine nested RT-PCR entwickelt, die diese Subtypen detektieren und unterscheiden kann. Dazu wurden für die erste PCR zwei publizierte Primer verwendet, die in der konservierten Region auf dem Genom des G-Proteins liegen. Ein Primer wurde dafür modifiziert. Für die zweite PCR wurden drei Primer konstruiert, wovon zwei in der hypervariablen Region des G-Proteins liegen und die Subtypen A oder B identifizieren können.

Alle untersuchten, bekannten Isolate reagierten positiv mit der nested RT-PCR und konnten eindeutig dem Subtyp A oder B bzw. A und B zugeordnet werden. Um die Spezifität nachzuweisen, wurden unterschiedliche aviäre Viren getestet. Diese zeigten keine positive Reaktion mit der entwickelten PCR.

Die Sensitivität der nested RT-PCR wurde mit definierten Mengen Virus in Verdünnungsreihen anhand von zwei Isolaten und zwei Impfstoffen für die beiden Subtypen ermittelt. Die Nachweisgrenze war vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen PCRs.

Da die PCR nicht zwischen Impfstamm und Feldstamm unterscheiden kann, wurde ein Versuch zur Bestimmung der Nachweisdauer von Lebendimpfstoff aus Trachealtupfern bei Puten durchgeführt. Dazu wurden einen-Tag-alte Puten mit Subtyp A (Gruppe A), Subtyp B (Gruppe B) oder Subtyp A und B (Gruppe A und B) geimpft und über fünf Wochen Blut- und Trachealtupferproben genommen.

Das Impfstoff-Virus wurde bis vier Wochen nach einer einmalig erfolgten Impfung mit Subtyp A oder bis drei Wochen nach einer einmaligen Impfung mit Subtyp B mit der entwickelten RT-PCR nachgewiesen. Bis zum Versuchende nach fünf Wochen war bei einer Impfung mit Subtyp A und B ein Nachweis des Impfstoffes Subtyp A möglich. Die Auswertung der Blutproben mit dem ELISA-Test zeigte ab der zweiten Woche bei Gruppe A und B, ab der dritten Woche bei Gruppe A und ab der vierten Woche bei Gruppe B Antikörpertiter im positiven Bereich.

In den untersuchten Betrieben, in denen Puten gehalten wurden, lag die Nachweisrate von RNS des APV bei 68 %. In 73 % der positiven Herden konnte die RNS des Subtyps A

nachgewiesen werden. Er war damit der am häufigsten vorkommende Subtyp in Deutschland. Der Nachweis von RNS des Subtyps B gelang in 17 % der Herden und die RNS der Subtypen A und B wurde in 10 % der Putenherden detektiert.

Die Betrachtung der RT-PCR-Ergebnisse im Zusammenhang mit dem Alter der Puten ergab einen Anstieg von APV Nachweisen zwischen der 8. und 12. Lebenswoche. In den Herden mit männlichen Puten wurde die RNS des APV häufiger nachgewiesen als bei den weiblichen Tieren. Zudem lag der prozentuale Anteil der Subtyp A positiven Herden bei den männlichen Puten höher als bei den weiblichen.

## **6 Epidemiological Research on the presence of avian pneumovirus subtype A and B in germany**

### Summary

The aim of this investigation was to find out the spread of subtype A and B of the avian pneumovirus (APV) in turkey and chicken flocks in Germany.

First a nested RT-PCR was developed to differentiate between subtype A and subtype B of the APV. For the first PCR two published primers which are located in the conserved region of the G-protein were used. One of them was modified. For the second PCR three primers were developed. Two of them are located in the variable region of the G-protein and do identify subtype A or B.

All of the known APV isolates that were tested reacted positive with the nested RT-PCR and the correct subtypes were identified. To confirm the specificity other avian viruses were tested. They showed no amplifications with the developed PCR.

The sensitivity of the nested RT-PCR was determined by using RNA extracted from serial 10-fold dilutions of two isolates and two vaccines for each subtype. The dilutions contained a known quantity of the virus. The result is comparable to other published detection limits of PCRs which are used to identify APV.

The PCR is not able to differentiate between attenuated virus (vaccine) and virulent virus. To find out, for how long the RT-PCR is able to detect the vaccine virus in tracheal swabs, one day old turkeys were separated into four groups and were kept under experimental conditions. The first group was vaccinated with subtype A (group A), the second with subtype B (group B) and the third with subtype A and B (group A and B). One group was kept as a control (control group). Over five weeks blood and tracheal swabs were taken.

The RT-PCR is able to detect the vaccine virus for four weeks after a single vaccination with subtype A and for three weeks after a single vaccination with subtype B. Up to the end of the experiment after five weeks the PCR was able to detect APV specific RNA of subtype A after the vaccination with subtype A and B. After two weeks the ELISA-test gives positive results in group A and B, after three weeks in group A and after four weeks in group B, supporting the results of the PCR.

The detection rate of APV specific RNA in the tested turkey flocks was 68 percent. The most common subtype at turkey farms in Germany was APV subtype A with 73 percent. Subtype B was detected in 17 percent, subtype A and B in 10 percent of the turkey flocks.

With regard to the age of the turkeys the results of the PCR show a higher detection rate of APV specific RNA at the age of 8 to 12 weeks. APV was more often detected in male flocks than in female flocks. Additionally the percentage of subtype A positives was higher in the tested male flocks than in the female flocks.

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Dr. Hafez bedanken, der mir das Thema überlassen hat und mich fortwährend bei der Durchführung der Arbeit unterstützt hat. Er stand mir mit Geduld und konstruktiver Kritik zur Seite und gab mir die Möglichkeit, durch seine weitreichenden Kontakte, Informationen zu sammeln und ein Stipendium zu nutzen.

Mein großer Dank gilt auch Frau Dr. Lüscho, die mich mit Ihrem Wissen auf dem Gebiet der Molekularbiologie begleitet hat. Sie gab mir mit durchgehendem Engagement sehr interessante Anregungen und hatte immer ein offenes Ohr für mich. Frau Dr. Prusas möchte ich für die Zeit und Gespräche danken, die Sie in diese Arbeit investiert hat, um mich auf dem Gebiet der Virologie zu unterstützen.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Grotehenn, die mir mit Ihrer freundlichen Art und Ihrem Humor immer zur Seite stand und sich auch tatkräftig eingesetzt hat.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Arndt, die mir nützliche Hinweise auf meine Fragen zur Statistik gab.

Für das wiederholte Korrekturlesen möchte ich Gerd Haarländer danken. Er war mir durch seinen reichen Erfahrungsschatz eine große Hilfe.

Meinen Eltern danke ich für die Möglichkeit zu Studieren und für die tatkräftige Unterstützung während der Promotion, damit ich die Zeit zum Schreiben hatte. Ganz besonders möchte ich mich bei Nico Haarländer bedanken, der ganz nah alle Höhen und Tiefen während der Promotion miterlebte. Er schaffte es dabei immer wieder mich zu motivieren, mit Diskussionen zum Nachdenken anzuregen und ermöglichte es mir so, die Arbeit zu beenden.

Vielen Dank an die Dr. Alhard von Burgsdorff-Stiftung, durch die ich ein Stipendium während der Promotion erhielt.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und dabei ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Rabea Haarländer

Berlin, den 18.08.2005