

Infektiöse Bronchitis: Typisierungsergebnisse aktueller Feldisolate aus Deutschland

Dr. Hans C. Philipp und Dr. Matthias Voss (Cuxhaven)

Einleitung

Die Infektiöse Bronchitis (IB) ist als Erkrankung von Hühnern seit den 40er Jahren bekannt. Die verursachenden Coronaviren sind vielfältig in Bezug auf ihren Genotyp, die Antigenität (Serotyp) und ihre Virulenz (Organtropismus). Die im Zusammenhang mit IB beschriebenen klinischen Erscheinungen umfassen Erkrankungen der Atemwege und des Urogenitaltraktes, die sich je nach IBV-Stamm als Tracheitis, Nephritis sowie verminderter Eiproduktion und dem Ablegen von Eiern mit deformierter und aufgehellter Schale und verflüssigtem Eiweiß äußern. Die Infektion ist hochgradig ansteckend bei geringer Sterblichkeit. Gegen IB wird weltweit intensiv mit Lebend- und Inaktivat-Vakzinen geimpft. Dennoch kommt es nach wie vor zu klinischen Ausbrüchen, was die IB insgesamt zu einer der bedeutendsten Infektionskrankheit von Hühnern macht.

Aufgrund der Mannigfaltigkeit des Erregers beschäftigen sich Forschung und Diagnostik schon lange mit der Typisierung von Feld-Isolaten. Die klassische Methode ist die Serotypisierung, ein nach wie vor wichtiges, aber aufwändiges Verfahren, da es den Einsatz von Kultursystemen sowie die Erzeugung spezifischer Antiseren erfordert. Die Analyse von Genom-Abschnitten von IBV ist heute vergleichsweise einfach und wird zunehmend zur Feincharakterisierung von Stämmen verwendet, die sich so bestimmten Serogruppen bzw. Referenz-Stämmen zuordnen lassen.

Neben zahlreichen IB-Stämmen mit eher lokaler Bedeutung gibt es Serogruppen, die sehr weit verbreitet sind. Dazu gehören in erster Linie die Massachusetts-Stämme, die auch als Impfstoffe eine international überragende Bedeutung besitzen. Wesentliche epizootologische Entwicklungen waren in Deutschland das Auftreten der holländischen Variant-Stämme D-274 und D-1466 seit den 1980er Jahren und der Nachweis von 793B (4/91) in den 1990er Jahren. Seitdem gibt es Berichte über Varianten mit ausgeprägter Nieren-Pathologie aus Italien und China (LIU et al., 2004; ZANELLA et al., 2000). Die zugelassenen Impfstoffe decken die Serogruppen Massachusetts, D-274 sowie 793B ab. Dabei sind nur Massachusetts- und D-274 auch als inaktivierte Antigene erhältlich.

Während das Vorkommen und die Verbreitung von IBV in vielen Ländern regelmäßig überwacht wird, liegen systematische Erhebungen dazu aus Deutschland schon einige Zeit zurück (TORO et al., 1987). Es stellt sich daher die Frage, ob und in welchem Umfang „neue“ IB-Serotypen in Deutschland verbreitet sind. Im Folgenden werden dazu Anmerkungen zu den für die Diagnostik verfügbaren Methoden gemacht sowie Ergebnisse aus unserem Labor vorgestellt und diskutiert.

Zu den eingesetzten Methoden

Grundsätzlich kann der Nachweis von Infektionen direkt durch die Darstellung der Anwesenheit des Erregers in einem Wirt erfolgen oder indirekt durch den Nachweis von Antikörpern, welche der Wirt in Folge der Infektion (oder Impfung) als Abwehrmaßnahme bildet. Die hier vorgestellten Verfahren und Ergebnisse beziehen sich auf di-

rekte Nachweisverfahren, von denen wir neben der klassischen Viruskultur im bebrüteten Hühnerei (Virus-Anzucht) auch den Nachweis von IB-spezifischen Nukleinsäure-Abschnitten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl: polymerase chain reaction) anwenden.

Bei der klassischen Virusanzucht wird das Probenmaterial von Bakterien befreit und in bebrütete, spezifizierte pathogenfreie Hühnereier injiziert. Im positiven Fall sterben die Embryonen ab und weisen Veränderungen auf, welche für IB typisch sind. Man erhält auf diese Weise große Mengen eines vermehrungsfähigen Virus, das für weitere Labor- und Tierversuche verwendet werden kann. Diesen Vorteilen stehen vor allem der hohe Aufwand der Untersuchung und der Zeitaufwand entgegen.

Einfacher lassen sich Erreger mit der PCR nachweisen. Dabei werden aus einer positiven Probe Genabschnitte des gesuchten Erregers mittels einer spezifischen und empfindlichen Reaktionskaskade enorm stark vermehrt. Die Spezifität der Reaktion wird durch kurze Nukleotidabschnitte (Primer) vermittelt, die sich an komplementäre Abschnitte der in der Probe enthaltenen DNS anlagern. Die Reaktionsprodukte können anschließend sichtbar gemacht und gegebenenfalls sogar sequenziert werden. Dabei wird die Abfolge bestimmter Bauteile (Nukleotide) innerhalb des vermehrten Genabschnittes ermittelt (Sequenz). Mit den ermittelten Sequenzdaten können Vergleiche mit den Sequenzen anderer IBV-Isolate vorgenommen werden, von denen bereits viele in Datenbanken über das Internet verfügbar sind.

Bei der Erstellung einer PCR-Nachweismethode ist die Auswahl der Zielsequenz von besonderer Bedeutung. Zahlreiche Infektionserreger enthalten neben genetisch stabilen Bestandteilen auch solche, die starke genetische Variabilität aufweisen. Die daraus folgende veränderliche Raumstruktur einzelner Teile des Erregers kann es so dem Immunsystem des Wirtes erschweren, den Infektionserreger schnell wirksam zu bekämpfen. Das IB-Virus verfügt über derartige hyper-variable Genabschnitte in seinem spike-Glykoprotein (S), das als äußerster Teil seiner Virushülle direkt der Einwirkung durch das Immunsystem ausgesetzt ist. Vergleichsweise konserviert ist das Gen für das im Inneren des Viruspartikels angeordnete Nucleocapsid-Protein (N). Dementsprechend determiniert der Aufbau des S-Proteins die Zugehörigkeit eines IB-Stammes zu seinem Serotyp, während das N-Protein verschiedener Serotypen sich nicht wesentlich unterscheidet.

Für den IB-Erregernachweis setzen wir in unserem Labor daher zunächst ein einfaches und robustes PCR-Protokoll ein, welches einen Teil des N-Proteins als Zielsequenz verwendet. Damit lassen sich mit hoher Empfindlichkeit alle IB-Serotypen detektieren, aber nicht weiter differenzieren.

Zur weiteren Differenzierung verschiedener IB-Serotypen verwenden wir eine zweistufige PCR („nested PCR“). Im ersten Reaktionsabschnitt wird ein größerer Abschnitt des genetisch variablen S-Protein-Gens vermehrt, wobei darauf geachtet wird, möglichst alle Serotypen abzudecken. Das Produkt dieser Reaktion wird dann in einem zweiten Schritt gleichzeitig auf das Vorhandensein typischer Gen-

abschnitte für die Serotypen Massachusetts, 793B, D-274, D-1466 und Italy O2 untersucht („Multiplex-PCR“). Die Methode liefert serotyp-spezifische Resultate, dies aber nur, wenn der in der Probe vorhandene IB-Stamm auch einem der durch den Reaktionsansatz abgedeckten Serotypen angehört. Alle anderen Serotypen bleiben unerkannt, da sie nicht mit den enthaltenen serotyp-spezifischen Primern reagieren. Solches Material kann ggf. durch Sequenzierung weiter untersucht werden.

Impfvirus oder Feldvirus?

Bei Lebend-Impfstoffen von IB handelt es sich um attenuierte Viren, das bedeutet, dass ihre krank machenden Eigenschaften abgeschwächt sind, zum Beispiel durch häufige serielle Kultur im Ei (Passagen). Für die Diagnostik hat dies zur Folge, dass solche an die Eikultur angepassten (adaptierten) Stämme sich auch besonders gut in der Eikultur vermehren und damit leichter nachgewiesen werden. Impfviren wachsen im Gegensatz zu Feldviren bereits in niedrigen Passagen und in hoher Anzahl heran und werden aus klinischem Material im Vergleich zu Feldviren bevorzugt isoliert. Dies ist unerwünscht, da die Erwartung an die Diagnostik meist darin besteht, aus Beständen mit Leistungsproblemen die verursachenden IB-Feldstämme samt Serotypen-Zuordnung zu ermitteln.

Es macht also wenig Sinn, kurz nach einer durchgeführten IB-Lebendimpfung diagnostische Proben zu entnehmen, da die Untersuchung wahrscheinlich mit dem Nachweis des Impfstoffes endet (3-5 Wochen lang muss mit dem Nachweis des Impfvirus gerechnet werden). Beim Nachweis von IB-Viren aus Herden, die bereits seit einiger Zeit ungeimpft sind, kann mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich um Feldisolate handelt.

Das biologische Verhalten der Isolate gibt ebenfalls Hinweise darauf, ob es sich eher um Feldisolate oder um Ei-adaptierte Impfstämme handelt. Letztere wachsen bereits in niedriger Passage mit ausgeprägten Embryo-Verän-

derungen (siehe Abb. 1) zu hohen Titern heran, während die Feldstämme bei kaum wahrnehmbarer Embryo-Pathologie meist erst nach einigen Passagen nachzuweisen sind (RAJ et al, 2004). Eindeutig ist die Zuordnung, wenn ein Serotyp identifiziert werden kann, der nicht als Impfstoff verfügbar ist, wie Italy O2 oder China QX.

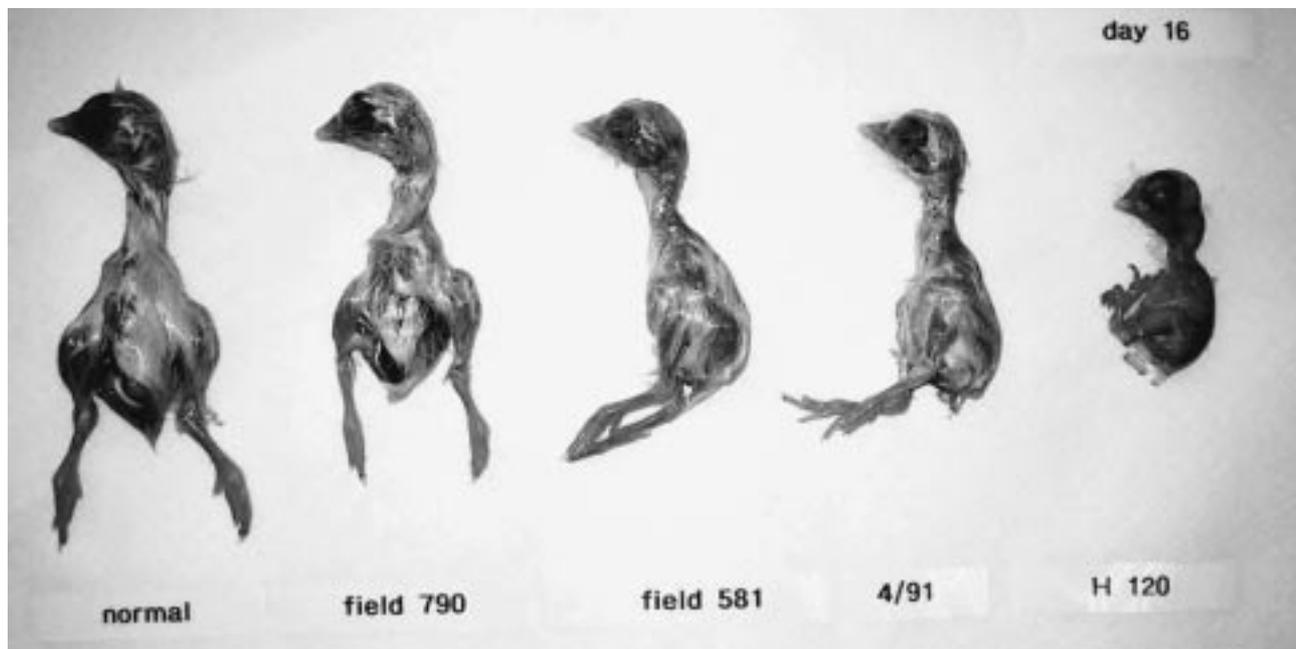
Ergebnisse

Eine Zusammenfassung der seit Ende 2004 mittels der beschriebenen Methoden gewonnenen Typisierungsergebnisse enthält Tabelle 1. Alle dort aufgeführten Fälle stammen aus Deutschland. Vorberichtlich sind Impfungen jeweils innerhalb von vier Wochen vor der Probenahme nicht erfolgt. Informationen zu klinischen Beobachtungen liegen in den meisten Fällen nicht vor. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass es Verdacht auf IB oder zumindest eine Infektion gab, die zur Einsendung des Materials durch die betroffenen Tierhalter oder deren betreuende Tierärzte führte.

Alle mit der Multiplex-PCR abgedeckten IB-Serotypen wurden nachgewiesen, darüber hinaus auch zwei Isolate, die anders einzugruppiert sind. In einem Fall gelang die Sequenzierung, bei der eine hohe Homologie zum Stamm China QX nachgewiesen wurde. Das andere Isolat konnte bisher nicht sequenziert werden und ist daher nicht zugeordnet.

In ungefähr 2/3 der Fälle wurden 793B-Stämme gefunden. Dieser Serotyp scheint in Deutschland besonders stark verbreitet zu sein, während die Nachweishäufigkeit anderer Serotypen bisher sporadischer Natur ist. Zwei Mal wurde IBV Italy O2 aus erkrankten Broilern nachgewiesen, davon ein Fall aus Süddeutschland mit Nierenveränderungen und der andere aus dem Nordwesten. Bei ungeimpftem Rassegeflügel führte eine D-1466-Infektion zu hohen Tierverlusten. Aus einer nicht mit D-274 geimpften Broilerherde mit respiratorischer Symptomatik wurde ein offensichtlich virulenter D-274-Stamm isoliert.

Abbildung 1: Hühnerembryonen nach Infektion mit unterschiedlich stark adaptierten IBV-Stämmen, Lebenstag 16



normal: nicht infizierte Kontrolle field 790 und field 581: IBV-Feldstämme 4/91: schwach adaptierter Impfstoff H 120: stark adaptierter Impfstoff

Tabelle 1: Zusammenfassung von Typisierungsergebnissen (seit 2004)

Bezeichnung	IB-Serotyp	Nutzungsrichtung	Klinik
K 1050	793B	Broiler	keine Angabe
K 1091	793B	Broiler	keine Angabe
K 1573	793B	Broiler	keine Angabe
K 169	793B	Broiler	keine Angabe
EK 464	793B	Broiler	keine Angabe
K 1353	793B	Legeeltern-tier	zahlreiche Nichtleger in der Herde
K 1608	793B	Legeeltern-tier	keine Angabe
EK 760	793B	Legeeltern-tier	unauffällig
K 1650	793B	Legehenne	keine Angabe
K 25	793B	Legehenne	keine Angabe
K 254	793B	Legehenne	keine Angabe
K 263	793B	Legehenne	keine Angabe
K 342	793B	Legehenne	hydropische Eileiterdegeneration
K 100	793B	Legehenne	keine Angabe
K 1352	793B	Legehenne	keine Angabe
K 1548	China	Legehenne	keine Angabe
K 1200	D-1466	Rassegeflügel	erhebliche Atemgeräusche und Mortalität
K 1050	D-274	Broiler	Tracheitis, Atemgeräusche
K 1477	Italy	Broiler	Nierenveränderungen
K 1270	Italy	Broiler	keine Angabe
K 101	Massachusetts	Legehenne	Leistungsrückgang, hellschalige Eier
K 570	nicht zuzuordnen	Masteltern-tier	keine Angabe

Diskussion

Durch die Anwendung neuer Methoden können IB-Isolate heute einfacher und schneller typisiert werden. Dabei konnten aus dem Feld Vertreter von allen Serotypen isoliert werden, mit deren Vorkommen aufgrund von Berichten aus benachbarten Regionen zu rechnen war. Eine hervor gehobene Bedeutung hat dabei der am häufigsten nachgewiesene Serotyp 793B. Der Nachweis potenziell „neuer“ Serotypen kommt vor, es scheint sich aber nicht um ein häufiges Ereignis zu handeln. Die Zahl der im Feld vorhandenen IB-Serotypen ist überschaubar und wird durch die zur Verfügung stehende Palette an Impfstoffen weitgehend abgedeckt. In welcher Weise sich die Italy

O2- und China QX- Stämme weiter ausbreiten und dabei auch als Krankheitserreger Bedeutung erlangen bleibt abzuwarten.

Ob es sich bei einem IB-Isolat um einen Krankheitserreger oder einen harmlosen, eher zufällig nachgewiesenen Keim handelt, kann durch Laboruntersuchungen allein allenfalls im Ansatz geklärt werden. Schließlich werden die Eigenschaften eines Erregers durch die Gesamtheit seiner Gene bestimmt, deren Struktur durch die beschriebenen Methoden nur bruchstückhaft erfasst wird. Die Unterscheidung von Stämmen aufgrund unterschiedlicher Sequenzen im S-Gen stützt sich auf wenige hundert von mehreren zehntausend Nukleotiden, aus denen das Virusgenom insgesamt besteht.

Es bedarf zusätzlich der Durchführung von Tierversuchen, deren Ergebnisse allein eine Aussage zum Grad der Virulenz eines Isolates zulassen. Nur wenn für Vertreter eines neuen Serotyps im Tierversuch gezeigt werden kann, dass es zur klinischen Krankheit kommt und dass verfügbare Impfstoffe nur eine unzureichende Wirkung haben, ist die Entwicklung eines homologen Impfstoffes angezeigt. Daher sollte bei der IB-Diagnostik darauf geachtet werden, über den PCR-Nachweis aus Tupfer- und Organproben die Gewinnung von Virusisolaten mittels klassischer Viruskultur nicht zu vernachlässigen. Diese vermehrungsfähigen Stämme können eingelagert werden und stehen dann gegebenenfalls für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Schlussfolgerungen für die Praxis

Auch in Deutschland ist neben typischen Erkrankungen des Atmungs- und Legeapparates mit dem Auftreten von Erkrankungen der Nieren bedingt durch IBV zu rechnen. Dies sollte bei der Untersuchung von Tieren berücksichtigt und besonders darauf geachtet werden.

In zahlreichen Beständen verursachen Stämme der Gruppe 793B Probleme. Gegebenenfalls sollte der Impfschutz gegen diesen Serotyp verbessert werden, etwa durch wiederholte Anwendung von Lebendimpfstoff.

Günstig wäre eine Kombination von Lebend- und Inaktivimpfung auch gegen 793B. Leider steht zur Zeit kein entsprechender Inaktivimpfstoff zur Verfügung.

Literatur

- LIU S, KONG X. (2004): A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol.*, 33(3): 321-7
- RAJ GD, KUMAR KS, NAINAM AM, K NACHIMUTHU (2004): Egg:embryo weight as an indicator of dwarfism induced by infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, 33(3): 307-309
- TORO H, SCHEMERA B, KALETA EF (1987): Serological differentiation of avian infectious bronchitis field isolates using an enzyme immunoassay: presence of Dutch strains in West Germany. *Avian Dis.*, Jan-Mar, 31(1):187-92
- ZANELLA A, COARO R, FABRIS G, MARCHI R, LAVAZZA A. (2000): Avian bronchitis virus: isolation of an apparently new variant in Italy. *Vet Rec.*, Feb 12, 191-2

Anschrift des Verfassers

Dr. Hans C. Philipp und Dr. Matthias Voss
Lohmann Tierzucht GmbH - Veterinärlabor
Abschnede 2
27472 Cuxhaven
E-Mail: philipp@ltz.de