

## Amtliche Methodensammlung

# Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels (ILT, *Gallid herpesvirus 1*, ILTV)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

# Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels (ILT)

## 1. Charakterisierung der Infektion

### 1.1 Erreger

Die infektiöse Laryngotracheitis (ILT) der Hühner wird durch ein Herpesvirus (*Gallid herpesvirus 1*, *GaHV-1* oder ILTV) verursacht. Das ILTV wurde innerhalb der Ordnung *Herpesvirales* als Vertreter der Familie *Herpesviridae*, der Unterfamilie *Alphaherpesvirinae* und des Genus *Iltovirus* klassifiziert. Die 200 bis 300 nm großen ILTV Partikel enthalten ein etwa 150 kbp langes, lineares, doppelsträngiges DNA Genom in einem ikosaederförmigen Kapsid, das in eine Proteinmatrix (Tegument) eingebettet und von einer Hüllmembran umgeben ist, in die über zehn verschiedene virale (Glyko)proteine eingelagert sind. Das Virus ist weltweit verbreitet, hat aber ein sehr enges, auf einige Hühnervogelarten beschränktes Wirtsspektrum. Krankheitssymptome treten in der Regel nur beim Haushuhn und bei Fasanen auf. In Deutschland wurden innerhalb der letzten zehn Jahre (2006 2007 bis 2016 2015) insgesamt 159 179 Fälle der ILT gemeldet; allerdings dürften darüber hinaus zahlreiche mild verlaufene Ausbrüche unbemerkt geblieben sein.

### 1.2 Klinische Symptomatik, Pathologie und Bekämpfung

ILTV kann durch Kontakt mit infizierten Tieren, orale Aufnahme von kontaminiertem Auswurf und Aerosole übertragen werden. Das Virus vermehrt sich primär in den Schleimhäuten des oberen Respirationstraktes und des Auges. Abhängig von der Virulenz des Erregers und der Infektionsdosis treten klinische Symptome bei Hühnern nach einer Inkubationszeit von 3 bis 12 Tagen auf. Bei mildem Verlauf sind häufig Rhinitis, Sinusitis, Konjunktivitis und eine reduzierte Legeleistung zu beobachten, während schwere Verlaufsformen durch den Auswurf von blutigem Schleim und eine hochgradige Dyspnoe gekennzeichnet sind, die zum Tod durch Erschöpfung oder Ersticken führen kann. In solchen Fällen ist eine Mortalität von über 70 % möglich, in der Regel liegt sie jedoch unter 10 %. Die Krankheitsdauer variiert meist zwischen ein und zwei Wochen. Typische pathologische Veränderungen im oberen Respirationstrakt reichen von katarrhalischen Entzündungen mit Ödemen, Hyperämie und vermehrter Schleimproduktion bis hin zu fibrinös-hämorrhagischen Entzündungen, Epitheldegeneration, Blutungen und Nekrosen der Schleimhaut und der Bildung von diphtheroiden Membranen. Blutkoagula, Schleim und nekrotisches Gewebe können zur vollständigen Obstruktion der Trachea führen.

Wie alle Herpesviren etabliert ILTV eine lebenslange latente Infektion, während der das Virusgenom vor allem in Neuronen des Trigemininalganglions nachweisbar ist. Das latente Virus kann sporadisch, z. B. unter Stress, reaktiviert und ausgeschieden werden und dadurch zur Infektion empfänglicher Tiere führen. Zur ILT-Prophylaxe werden bei Legehennen und Zuchttieren abgeschwächte Lebendvirus-Impfstoffe und (außerhalb der EU) auch gentechnisch hergestellte Vektorimpfstoffe eingesetzt. Letztere zeigen zwar eine etwas geringere Wirksamkeit als die konventionellen Impfstoffe, verursachen dafür aber keine durch Restvirulenz und Latenz bedingten Probleme und erleichtern die diagnostische Unterscheidung geimpfter von natürlich infizierten Tieren.

### 1.3 Diagnose und Differentialdiagnose

Vor allem bei milden Verlaufsformen ist eine Unterscheidung der ILT von anderen Infektionskrankheiten des Geflügels anhand des klinischen Bildes oft nicht eindeutig möglich. Wichtige Differentialdiagnosen sind infektiöse Bronchitis, infektiöse Rhinotracheitis aber auch Pocken, Newcastle Disease, Aviäre Influenza und Mykoplasmosen. Ein starkes Indiz für eine ILTV-Infektion ist der histologische Nachweis Seifried'scher Einschlusskörper in den Zellkernen. Die Virusreisolierung aus Tupfer- oder Gewebeproben ist durch Anzucht auf der Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier sowie auf primären Nieren- und Leberzellkulturen aus dem Huhn möglich. In embryonalen Fibroblastenkulturen und den bislang untersuchten permanenten Hühner- und Wachtelzelllinien vermehrt sich ILTV deutlich weniger effizient. Zum schnellen und sensitiven Nachweis des Virusgenoms in Gewebe- oder Tupferproben können PCR und real-time PCR eingesetzt werden (z. B. Callison *et al.* 2007, *J Virol Methods* 139:31-38). Auch in Neuronen latenter infizierter Tiere konnte das ILTV-Genom mittels PCR detektiert werden (Williams *et al.* 1992, *J Gen Virol* 73:2415-2420). Außerdem stehen monoklonale Antikörper für den Nachweis viraler Proteine in Gewebeproben durch indirekte Immunfluoreszenz (IF) oder Immunhistochemie zur Verfügung (z. B. Veits *et al.* 2003, *Avian Dis* 47:330-342). IF-, Immundiffusions- und Neutralisationstests können sowohl zum spezifischen Nachweis des ILTV als auch zum Nachweis ILTV-spezifischer Serumantikörper genutzt werden. Für die Detektion ILTV-spezifischer Antikörper in Hühnerseren wurden darüber hinaus verschiedene ELISA-Testsysteme entwickelt, die zum Teil auch kommerziell vertrieben werden (Bauer *et al.* 1999, *Avian Pathol* 28:65-72). Allerdings variiert die Induktion ILTV-spezifischer Antikörper nach Infektion sehr stark, sodass negative serologische Befunde mit Vorsicht zu genießen sind. Außerdem ist zu bedenken, dass die bislang verwendeten attenuierten Lebendvirus-Vakzinen keine serologische Differenzierung geimpfter und natürlich infizierter Tiere erlauben, und dass auch die genetische Unterscheidung von Impf- und Feldviren sehr aufwändig ist.

### 1.4 Zuständige Untersuchungseinrichtungen

- Veterinäruntersuchungsämter der Bundesländer und private Untersuchungseinrichtungen
- Nationales Referenzlabor (NRL) für infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels am Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 0383517-0

### 1.5 Rechtsgrundlagen

- Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der aktuellen Fassung
- Verbindliche Anordnungen zur Probengewinnung und zur Durchführung des Virus- oder Antikörpernachweises gibt es nicht. Im Folgenden werden deshalb nur am FLI angewandte oder validierte Verfahren beschrieben, was jedoch keine Abwertung anderer Methoden einschließlich kommerziell erhältlicher Reagenzien und Testsysteme darstellen soll.

## Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels (ILT)

### 2. Untersuchungsmaterial

Das ILTV ist als Erreger der Risikogruppe II klassifiziert, weshalb möglicherweise virushaltige Proben nur unter mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken der Klasse II bearbeitet werden sollten. Die Dekontaminierung von Materialien, die mit dem Erreger in Kontakt kamen, kann durch Autoklavieren (20 min 121 °C) oder mittels viruzider Desinfektionsmittel nach Angaben der Hersteller erfolgen. Auch durch Fixierung, Protein- oder DNA-Extraktion unter Verwendung von Formalin, Parformaldehyd, Aceton, Alkoholen, Phenol/Chloroform oder SDS wird das Virus zuverlässig inaktiviert. Beim Versand von unbehandeltem Probenmaterial sind die ADR-Vorschriften für biologische Stoffe der Kategorie B (UN3373) zu beachten. Wenn infektiöses Virus reisoliert werden soll, müssen die Proben über kurze Zeiträume (1 bis 2 Tage) bei Temperaturen von +4 °C bis 0 °C und über längere Zeiträume bei Temperaturen  $\leq -70$  °C gelagert und transportiert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Zum direkten Nachweis von ILTV oder viraler DNA während der akuten Phase der Infektion sind praktisch nur Trachealtupfer- oder Gewebeproben von Larynx, Trachea und eventuell der Lunge geeignet. In entsprechenden Gewebeschnitten können unter Umständen auch virale Proteine detektiert werden. Außerdem sollten in Verdachtsfällen Serumproben für den Antikörpernachweis gewonnen werden.

Bei Einsendungen an das NRL ist anzugeben:

- Wer sendet ein? (Veterinäramt, Bearbeiter; inkl. E-Mail-Adresse sowie dienstlicher Telefon- und Fax-Nummer)
- Was wird eingesandt? (Art des Materials, Anzahl der Proben etc.)
- Aus welchem Bestand stammen die Proben? (Legehennen-, Mast-, Zuchtbestand etc.)
- Was wurde wann in dem Bestand festgestellt? (anamnestischer Kurzbericht)
- War der Bestand vollständig oder teilweise gegen ILT geimpft?
- Gegebenenfalls Hinweise auf die mögliche Erregereinschleppung (Kontakt zu infizierten Beständen etc.)

### 3. Untersuchungsgang

#### 3.1 Nukleinsäurenachweis durch klassische oder real-time PCR

Mittels verschiedener PCR-Methoden ist ein sensitiver Nachweis des ILTV-Genoms in Gewebe- und Tupferproben möglich. Bei der Beprobung lebender Tiere sollten die Tupfer möglichst tief, bis in die Trachea eingeführt werden und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) in PBS oder Zellkulturmedium mit Antibiotika (falls auch eine Virusreisolierung versucht werden soll) inkubiert werden. Die Virusfreisetzung kann durch Ultraschallbehandlung und/oder einmaliges Frieren und Tauen (-70 °C/37 °C) verbessert werden. Gewebeproben sollten mechanisch zerkleinert (z. B. mit Seesand verrieben) und wie oben beschrieben weiter aufgeschlossen werden. Zur DNA-Extraktion aus diagnostischen Proben wird am NRL meist der QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet und abschließend die DNA-Ausbeute pho-

## Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels (ILT)

tometrisch bestimmt. Für die diagnostische PCR werden von uns selbst abgeleitete Primer aus dem Glykoprotein L-Gen des ILTV eingesetzt (IgL-NF: 5'-CCTCTGTGCGTAAACACGGAAG-3' und IgL-NR: 5'-TCAACAAGTCCACGAGCCAAG-3'), deren Sequenzen in allen bislang untersuchten ILTV-Isolaten, nicht aber in den homologen Genen anderer Herpesviren konserviert sind, und mittels derer ein 149 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden kann. Für die konventionelle PCR verwenden wir in der Regel ca. 200 ng Tupfer- oder Organ-DNA sowie die Platinum Pfx DNA-Polymerase (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers, wobei den 25 µl Ansätzen 10 % des mitgelieferten „Enhancers“ zugesetzt werden. Auf DNA-Denaturierung und Enzymaktivierung (3 min 95 °C) folgen 60 Zyklen von Denaturierung (20 sec 95 °C), Primer-Hybridisierung (30 sec 55 °C) und DNA-Synthese (30 sec 70 °C) sowie ein abschließender Syntheseschritt für 10 min bei 70 °C. Für die real-time PCR wird zusätzlich eine Fluorchrom-markierte Sonde (IgL-RTPS: FAM-5'-ACGGATTCACCTTTTGCAGCGTACCCAT-3'-BHQ1) und der QuantiTect Multiplex PCR NoRox Kit (Qiagen) verwendet. Die 25 µl Reaktionsansätze enthalten ebenfalls ca. 200 ng DNA sowie je 20 pmol der Primer und 4 pmol der Sonde. Die Inkubation erfolgt für 15 min bei 95 °C, gefolgt von 55 Zyklen von 30 sec 95 °C, 30 sec 55 °C und 30 sec 68 °C. Durch Evaluierungsversuche mit zugesetzter DNA aus gereinigten ILTV-Partikeln konnte gezeigt werden, dass beide Varianten der PCR sehr sensitiv sind und weniger als 10 Kopien des Virusgenoms (< 1 fg DNA) detektieren. Unspezifische Signale wurden bislang nicht beobachtet. Zur Absicherung der Spezifität können die PCR-Produkte jedoch nötigenfalls aus Agarosegelen isoliert und mit den auch zur Amplifikation eingesetzten Primern sequenziert werden. Der Zeitaufwand für DNA-Präparation und PCR beträgt 1 bis 2 Tage und für eine anschließende Sequenzierung sind bis zum Vorliegen des Ergebnisses weitere 2 bis 3 Tage zu veranschlagen.

### 3.2 Vermehrung des ILTV in primären Hühnernierenzellen

Für die *in vitro* Vermehrung des ILTV sind primäre Nierenzellkulturen aus ca. 19 Tage alten Hühnerembryonen besonders gut geeignet (Fuchs & Mettenleiter 1996, *J Gen Virol* 77:221-229). Hierzu werden die präparierten Organe zerkleinert, mit Hanks' balanced salt solution (HBSS) gewaschen, und für 2 mal 30 min unter Rühren in Versen-Trypsin Lösung inkubiert. Nach jedem Schritt werden die Organ-Suspensionen durch Gaze filtriert, die abgelösten Zellen aus dem Durchfluss für 5 min bei 250 x g sedimentiert und in MEM mit 10 % FKS in H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 2,5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Eliminierung präparationsbedingter Kontaminationen empfiehlt sich der Zusatz bakterizider und fungizider Antibiotika. Zur Verbesserung der Zell-Anhaftung sollten die verwendeten Gewebekulturgefäße vor der Aussaat für einige Stunden mit einer 0,5 % Gelatinelösung in PBS vorbehandelt werden. Nach 1 bis 2 Tagen können die zu einem Rasen ausgewachsenen Zellen mit dem Untersuchungsmaterial oder definierten ILT-Viruspräparationen für ca. 2 h inokuliert und anschließend unter Medium mit nur 2 % FKS bis zur Ausbildung eines eindeutigen cytopathischen Effektes für 2 bis 6 Tage weiter inkubiert werden. Zur genauen Bestimmung der Virustiter, aber auch zur späteren Verwendung der Platten in IF-Tests (s. u.) sollte ein visköses Erhaltungsmedium mit 5 g/l Methylzellulose verwendet werden, welches die Ausbreitung freigesetzter Viruspartikel und die Ablösung der zu Synzytien verschmelzenden infizierten Zellen hemmt.

## Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels (ILT)

### 3.3 Nachweis von ILTV-Proteinen in Gewebeproben und Zellkulturen

Am FLI wurden ILTV-spezifische monoklonale Antikörper (MAK) isoliert, die zum Nachweis der viralen Hüllglykoproteine C und J in Kryostat- oder Paraffinschnitten infizierter Gewebe sowie in infizierten Zellkulturen geeignet sind (Veits *et al.* 2003, Avian Dis 47:330-342) und bei Bedarf an Untersuchungseinrichtungen abgegeben werden können.

Für den indirekten IF-Test sollten Kryostatschnitte in vorgekühltem Aceton und Zellkulturen auf Kunststoffplatten in Methanol/Aceton (1 : 1) für ca. 15 min bei -20 °C fixiert und anschließend für 3 mal 5 min mit PBS gespült werden. Nach Blockierung mit 3 % BSA oder 10 % FKS in PBS für mindestens 30 min erfolgt die Inkubation mit dem empfehlungsgemäß (1 : 20 bis 1 : 100) verdünnten Hybridomaüberstand des MAK für 1 bis 3 h. Nach 3-maligem Spülen mit PBS werden die Präparate für 60 min mit nach Herstellerangaben verdünntem FITC- oder AlexaFluor 488-konjugiertem Anti-Maus-IgG unter Zusatz von 0,005 % Evans-blue inkubiert und nach erneutem Spülen mit PBS/Glycerol (1 : 9) eingedeckt. Zur Konservierung können 2,5 mg/ml DABCO und zur Chromatin-Gegenfärbung 2 µg/ml Propidiumjodid zugesetzt werden. Die Immunhistologie am Paraffinschnitt erfolgt nach dem Standardprotokoll der ABC-Methode, wobei die MAK in einer Verdünnung von 1 : 20 eingesetzt werden.

### 3.4 Nachweis ILTV-spezifischer Antikörper

Zur serologischen Diagnostik der ILT wird am NRL bislang der indirekte IF-Test auf infizierten Hühnernierenzellkulturen (siehe 3.2) in 24well, 48well, oder 96well Mikrotiterplatten eingesetzt. Die Zellen werden mit einer niedrigen Virusdosis (< 100 infektiöse Einheiten/well) infiziert und für 2 Tage unter Methylzellulose-Medium inkubiert, sodass keine vollständige Lyse des Zellrasens erfolgen kann. Nach Fixierung werden die Zellen wie oben (3.3) beschrieben gewaschen und mit 10 % FKS in PBS blockiert. Die Hühnerseren werden im gleichen Puffer unterschiedlich hoch verdünnt (1 : 20, 1 : 100, 1 : 500) und für  $\geq 1$  h mit den Zellen inkubiert. Die Detektion der Antikörper-Bindung erfolgt wie oben beschrieben, wobei AlexaFluor 488-konjugiertes anti-Huhn-IgY als Sekundäntikörper dient. Da die Zellkulturplatten nach Fixierung getrocknet und über längere Zeiträume bei -20 °C gelagert werden können, ist die Testung eingehender Seren jederzeit möglich, allerdings kann die mikroskopische Auswertung gelegentlich durch unspezifische Fluoreszenzreaktionen erschwert werden und sollte deshalb erfahrenen Mitarbeitern überlassen bleiben.

Versuche mit experimentell infizierten Hühnern zeigten, dass positive Seren fast immer Antikörper gegen definierte Hüllglykoproteine des ILTV, darunter vor allem das hochabundante gJ, enthalten (z. B. Fuchs *et al.* 2005, *J Virol* 79:705-716). Deshalb könnte es in näherer Zukunft möglicherweise gelingen, durch Überexpression von Hauptantigenen des ILTV in heterologen Systemen sowohl sensitivere als auch spezifischere Tests für den Antikörpernachweis in Hühnerseren zu entwickeln.

Im Mai 2017 wurde durch die Zulassungsstelle für *in-vitro*-Diagnostika zum Nachweis von anzeigepflichtigen Tierseuchen oder meldepflichtigen Tierkrankheiten am FLI dem ILT Vollvirus-basierten Antikörper-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ID Screen ILT Indirect der Firma ID Vet die amtliche Zulassung nach § 11 Abs. 2 TierGesG erteilt. Nach Validierungsstudien am NRL wurden die Chargen P026 (verwendbar bis

## Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels (ILT)

August 2018) und C76 (verwendbar bis November 2019) gemäß § 32 TierImpfStV freigegeben. In diesen Studien zeigten die nach Herstellerangaben durchgeführten Tests eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität wie der oben beschriebene IF-Test, wobei der Arbeits- und Zeitaufwand etwas geringer und eine einfache quantitative Auswertung möglich war.