FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

Amtliche Methodensammlung

Geflügelpest (Aviäre Influenza)

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Geflügelpest (Aviäre Influenza)

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Influenzaviren werden der Familie *Orthomyxoviridae* zugeordnet. Es sind behüllte RNA-Viren, die aufgrund der Antigenität ihrer Nukleo- und Matrixproteine in die Typen A, B und C und, im Falle des Typs A, nach den Hüllantigenen Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) in weitere Subtypen unterteilt werden. Influenza A Viren (IAV) zeigen eine große antigene Vielgestaltigkeit und Wandlungsfähigkeit und ein breites Virulenzspektrum. Die von Vögeln isolierten Influenzaviren (aviäre Influenzaviren, AIV) gehören ausnahmslos zum Typ A und umfassen derzeit mindestens 16 H- und 9 N-Subtypen in (theoretisch) 144 möglichen Kombinationen. Reservoir aller IAV Subtypen sind aquatisch lebende Wildvögel. Zwei weitere IAV Subtypen (H17N10, H18N11) wurden kürzlich bei Fledermäusen in Mittelamerika detektiert.

Auch Geflügel ist für AIV Infektionen empfänglich; bestimmte AIV Infektionen können Ursache schwerer Erkrankungen wie der „Klassischen Geflügelpest“ sein. „Geflügelpest“ ist ein historischer Krankheitsbegriff, der im englischen Sprachraum in den letzten Jahren generell durch ‚avian influenza‘ (aviäre Influenza, AI) ersetzt wurde. Erreger der Klassischen Geflügelpest im engeren Sinne sind hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV), die allesamt den Subtypen H5 oder H7 angehören. Es gibt jedoch auch H5- und H7-AIV von niedriger Pathogenität (engl. ‚low pathogenic avian influenza viruses‘, LPAIV). Diese haben das Potenzial, durch Zufallsmutationen eine sprunghafte Pathogenitätssteigerung zu erfahren. Daher sind auch LPAIV der Subtypen H5 und H7 als mögliche Erreger der Klassischen Geflügelpest (HPAI) anzusehen. Entscheidend für ihre Einstufung gemäß Tierseuchenrecht ist hierbei das Infektionsverhalten im Versuchshuhn (Bestimmung des intravenösen Pathogenitätsindex, IVPI): Isolate mit einem IVPI > 1.2 werden als hochpathogen (HP) bewertet, solche mit Indices < 1.2 werden als niedrigpathogen (LP) eingestuft. Als alternatives gleichrangiges Bewertungskriterium der Pathogenität von AIV der Subtypen H5 und H7 kann die Aminosäuresequenz im Bereich der endoproteolytischen Schnittstelle des Hämagglutininproteins verwendet werden. Isolate mit monobasischer Schnittstelle werden definitionsgemäß als niedrigpathogen bewertet; solche mit polybasischer Schnittstelle gelten als hochpathogen. Die molekulare Pathotypisierung kann jedoch nur bei Viren der Subtypen H5 und H7 eingesetzt werden, wogegen der IVPI Test für alle IAV Subtypen gültig ist. Alle H5- und H7-Viren werden aufgrund ihrer tierseuchenrechtlichen Bedeutung in der OIE-Klassifizierung als „notifiable avian influenza = NAI“ (anzeigepflichtig) bezeichnet.

1.2 Klinische Symptomatik

Infektionen mit aviären Influenzaviren variieren, abhängig vom viralen Sub- bzw. Pathotyp sowie wirtsspezifischen Faktoren, stark in der Schwere der Erkrankung. Neben inapparenten Formen sind perakute Verlaufsformen mit bis zu 100 % Mortalität in betroffenen Populationen bzw. Haltungen möglich. Ausschlaggebend dafür ist vor allem die Virulenz des Erregerstammes. Der Begriff ‚Geflügelpest‘ umfasst nur die schweren, anzeigepflichtigen Verlaufsformen der aviären Influenza, hervorgerufen durch hochpathogene

Virusstämme (HPAIV), die sich in der Natur bislang ausschließlich aus den Subtypen H5 und H7 rekrutiert haben.

Alle Infektionen des Hausgeflügels mit aviären Influenzaviren der Subtypen H5 und H7, also auch solche mit Stämmen niedriger Pathogenität (LPAIV), sind gemäß geltendem EU-Recht anzeige- und bekämpfungspflichtig. Bei Wildvögeln sind lediglich HPAIV Infektionen anzeigepflichtig.

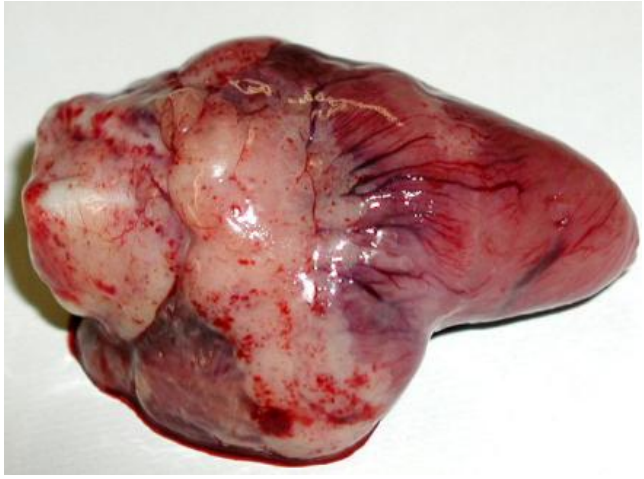


Abbildung 1: Subepikardiale petechiale Blutungen bei HPAIV Infektion (Prof. Dr. Teifke, FLI)

Vermutlich sind alle Vogelspezies empfänglich für eine AIV Infektion; bei Wildvögeln treten jedoch nur selten Erkrankungen auf. Auch die Geflügelarten erkranken nicht einheitlich. Hochempfänglich sind Hühnervögel, vor allem Puten und Hühner; bei ihnen kann die Mortalität nach Infektionen mit HPAIV bis 100 % betragen. Puten zeigen nicht selten auch bei Infektionen mit LPAIV klinische Symptome.

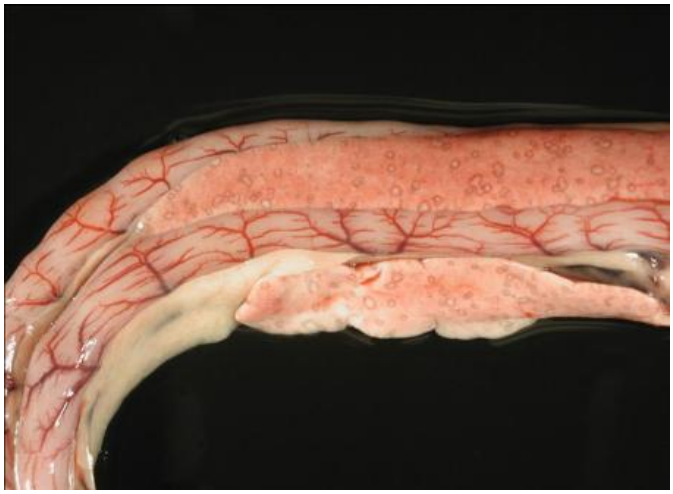


Abbildung 2: Umschriebene Pankreasnekrosen infolge HPAIV Infektion (Prof. Dr. Teifke, FLI)

Geflügelpest (Aviäre Influenza)

Die Hauptsymptome der durch HPAIV ausgelösten Geflügelpest bei Hühnervögeln sind zunächst ein drastischer Rückgang des Futterverbrauchs bei ansteigendem, später nachlassendem Wasserbedarf, dann Apathie, Atemnot, Ödeme der Kopfregion, Zyanose und Ödeme der Kopfanhänge, Durchfall, hohe Mortalität, bei Legetieren Einbruch der Eiproduktion. Nicht selten sterben die Tiere auch ohne vorherige klinische Symptome binnen 24 bis 72 Stunden nach Infektion. Häufig wird von einer ungewöhnlichen Stille („cathedral silence“) in von HPAI betroffenen Beständen berichtet. Bei der Sektion verendeter Tiere können gelegentlich Hämorrhagien auf den Serosen (Abb. 1), im Drüsenmagen u. a. Organen, Pankreasveränderungen (Abb. 2) sowie bei Legetieren hämorrhagische Eierstockentzündung und Dotterperitonitis beobachtet werden. Weder klinisches Bild noch Sektionsbefund sind pathognomonisch. Wassergeflügelarten zeigen oftmals weniger stark ausgeprägte Krankheitserscheinungen und einen protrahierten Verlauf, in dem nicht selten auch zentralnervöse Störungen zu beobachten sind (Abb. 3).

Abbildung 3: Pekingente mit zentralnervösen Störungen (Inkoordination, Lähmungen) nach Infektion mit HPAIV H5N1 (Dr. Werner, FLI)

Die klinischen Bilder von LPAIV Infektionen variieren extrem; in der Regel bleiben die Auswirkungen klinisch jedoch mild, und oftmals wird die Infektion nur bei Legetieren durch einen Rückgang der Eiproduktion deutlich. Puten können respiratorische Symptome entwickeln, in deren Folge auch erhöhte Mortalitätsraten zu verzeichnen sind.

1.3 Differentialdiagnose

Bei plötzlichem Auftreten einer schweren Allgemeinerkrankung des Geflügels mit hoher Morbidität und Mortalität ist immer auch an Geflügelpest zu denken. Differentialdiagnostisch sind u. a. Newcastle Krankheit (engl. ‚Newcastle Disease‘, ND), Geflügelcholera und akute Vergiftungen abzuklären.

1.4 Diagnostische Indikation

Kriterien, die den Verdachtsfall rechtfertigen, schildert u. a. §4 der bundesdeutschen Geflügelpestschutzverordnung. Insbesondere sind hierbei tägliche bzw. kumulative Verlustraten in betroffenen Beständen sowie Rückgänge der Lege- bzw. Mastleistung zu berücksichtigen.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

Ansprechpartner im Verdachtsfall sind staatlich autorisierte Veterinäruntersuchungsämter bzw. staatliche Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsämter der Bundesländer sowie das Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 0383517-0.

1.6 Rechtsgrundlagen

- Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest in der jeweils gültigen Fassung
- Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der jeweils gültigen Fassung
- Richtlinie 2005/94/EG vom 20. Dezember 2005
- Diagnostikhandbuch der EU für Aviäre Influenza gem. Entscheidung 2006/437/EG

2. Untersuchungsmaterial

Für die Probenahme ist die Entscheidung 2006/437/EG (Diagnostik-Handbuch) hinsichtlich der Art der Proben und des Stichprobenumfangs maßgeblich. Die folgenden Ausführungen dienen daher nur der Erläuterung bzw. Konkretisierung des Vorgehens in Deutschland:

Für den Nachweis des Erregers oder dessen Genom sind geeignet:
Kloakenabstriche oder **Fäzes *und* Abstriche** aus dem **Oropharynx (einschließlich Choanenspalte)** von lebenden Vögeln. **Hirngewebe, Lunge, Niere, Milz, Leber, Duodenum mit Pankreas** sowie **Caecaltonsille** kürzlich verendeter oder getöteter Tiere. Fäkalmaterial ist von anderen Proben getrennt zu halten. Abstriche sollten ganz in ein Stabilisierungsmedium (antibiotisch, proteinhaltig) eingetaucht werden. **Blutproben**, von denen **Heparin-Plasma** oder nach Gerinnung das **Serum** für die Untersuchung gewonnen wird.

Die Probenverpackung muss den ADR-Vorschriften entsprechen, auf jeden Fall aber flüssigkeitsdicht sein und äußerlich gut desinfiziert werden. Sie darf außerhalb des zuständigen Labors nicht mehr geöffnet werden. Frische Proben sind gekühlt, aber nicht gefroren zu versenden (Hinweis: Falls nur gefroren aufbewahrte Proben zur Verfügung stehen, können diese im Ausnahmefall eingesandt werden, da viele Nachweisverfahren mit gewissen Einschränkungen auch bei gefrorenen Proben anwendbar wären).

Geflügelpest (Aviäre Influenza)

Verdachtsproben sind nach Möglichkeit nach Vorankündigung per Kurier (Transport über Nacht) zu schicken an das Friedrich-Loeffler-Institut, Nationales Referenzlabor AI, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems. Sie sind im Falle des Verdachts auf eine anzeigepflichtige AIV Infektion telefonisch anzukündigen unter Tel. 0383517-0.

Im Anschreiben ist anzugeben:

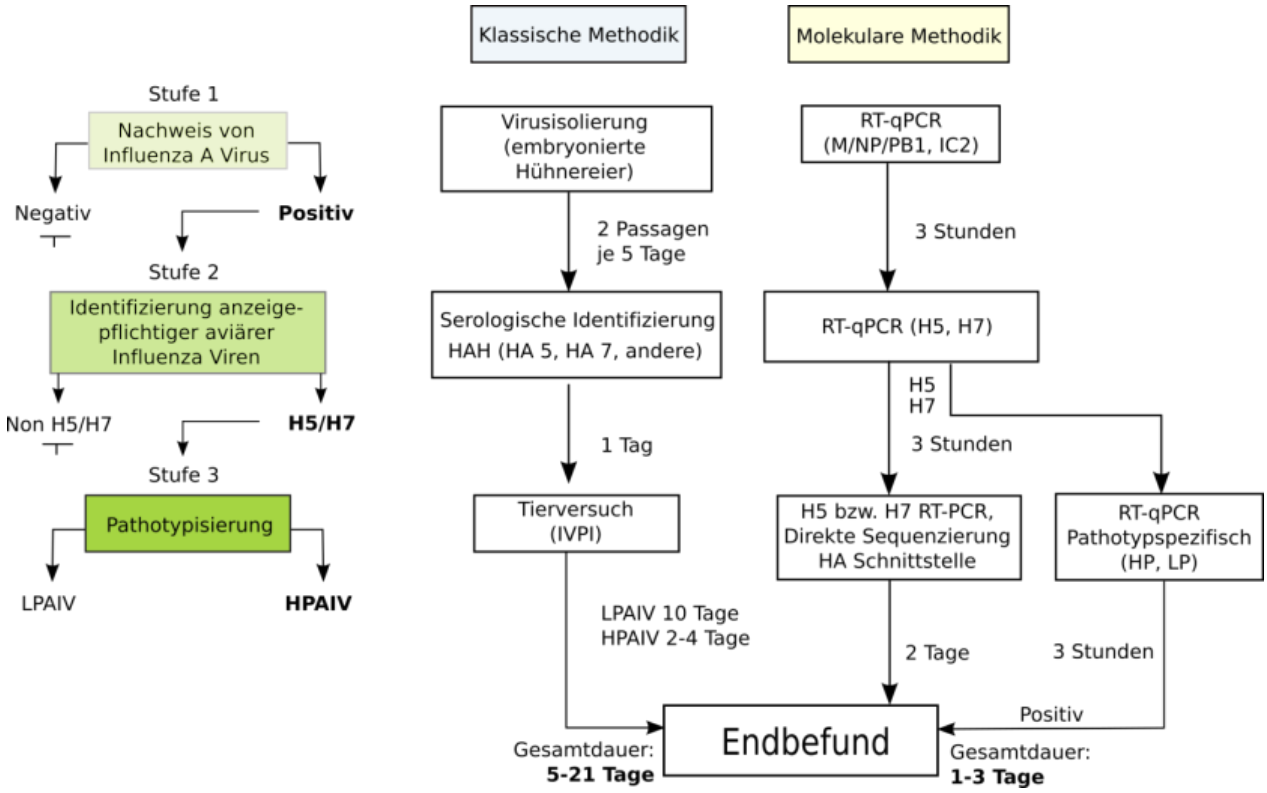
- Wer sendet ein? (Veterinäramt, Bearbeiter; inkl. dienstlicher und eventuell privater Telefon- und Faxnummer)
- Was wird eingesandt? (Art des Materials, von welchen Tieren, Anzahl etc.)
- Aus welchem Bestand stammen die Proben?
- Was wurde wann in dem Bestand festgestellt? (anamnestischer Kurzbericht)

Zusätzliche Angaben, soweit möglich:

- Wie groß ist der Bestand? Tierarten?
- Art des Bestandes (Zucht-, Mast-, Händlerbestand etc.)?
- Bemerkungen und weitere Hinweise auf eine mögliche Erregereinschleppung.

3. Untersuchungsgang

Abbildung 4: Zusammenfassung des formalen Ablaufs der Untersuchungen



3.1 Direkter Erregernachweis

3.1.1 Probenaufbereitung

Die benannten verschiedenen Organe und Gewebe können gepoolt werden, nur Fäkalmaterial ist gesondert zu behandeln. Fäzes und Organe sind in antibiotischem Medium im geschlossenen Homogenisator zu zerkleinern (Sicherheitsvorkehrungen zur Vermeidung von Aerosolen sind zu beachten), um eine etwa 10%ige Suspension herzustellen. Zur Entfaltung der antibiotischen Wirkung sind die Suspensionen für mindestens 30 Minuten bei Umgebungstemperatur (bei 4 °C entsprechend länger) stehen zu lassen und danach durch Zentrifugieren zu klären (z. B. 800 bis 1000 g für 10 Minuten).

3.1.2 Virusisolierung in embryonierten Hühnereiern

Pro Probe sind 3 bis 5 embryonierte, 8 bis 10 Tage vorbebrütete Hühnereier mit je 0,1 bis 0,2 ml des geklärten Überstandes aus 3.1.1 in die Allantoishöhle zu verimpfen. Die Eier sollten aus einer spezifiziert pathogenfreien (SPF) Herde stammen; im Notfall können auch Eier aus einem Bestand verwendet werden, der nachweislich frei von Influenza-Antikörpern und -Virus ist. Die beimpften Eier werden bei 37,0 °C bis 37,8 °C bis zu fünf Tage weiterbebrütet und täglich durchleuchtet. Eier mit toten oder absterbenden Embryonen sind auf 4 °C abzukühlen, ebenso alle verbliebenen Eier am fünften Tag nach der Beimpfung. Die Allantois- und Amnionflüssigkeiten (AAF) sind auf Hämagglutination (HA) zu untersuchen. Lässt sich keine Hämagglutination feststellen, wird die unverdünnte AAF erneut auf Eier verimpft (zweite Eipassage). Wird Hämagglutination festgestellt, so muss eine bakterielle Kontamination ausgeschlossen werden (Sterilitätsprobe). Sind Bakterien vorhanden, so wird die AAF sterilfiltriert (0,22 µm Membranfilter) und nach Zugabe weiterer Antibiotika erneut auf embryonierte Eier verimpft. Kann in zwei aufeinanderfolgenden Passagen keine hämagglutinierende Aktivität festgestellt werden, gilt die Probe als negativ für replikationskompetente IAV. Ersatzweise kann anstelle des HA-Tests auch ein molekularer Genomnachweis mittels RT-qPCR durchgeführt werden.

Zellkulturen sind wegen ihrer geringeren Sensitivität für die Isolierung von aviären Influenzaviren derzeit ungeeignet.

3.1.3 Antigen-Schnelltest

Für den Nachweis von Influenzavirusantigen binnen 20 bis 40 Minuten wird eine Reihe von konfektionierten Testbestecken kommerziell angeboten. Diese Tests zeichnen sich durch eine sehr einfache Handhabung aus und wären daher auch durch Laien und direkt im Stallbereich anwendbar. Derzeit liegen jedoch nur begrenzte Erfahrungen im Umgang mit diesen Tests im Felde vor. Aus experimentellen Untersuchungen, u. a. im Nationalen Referenzlabor AI (NRL-AI), wurde jedoch eine gegenüber der Virusisolierung und den PCR-Nachweisverfahren deutlich verminderte Sensitivität dieser Tests erkennbar. Diese Tests sind *nicht* für eine amtliche Ausschlussdiagnostik einsetzbar, da ein negatives Ergebnis das Vorhandensein anzeigepflichtiger Influenzaviren des Typs A nicht sicher ausschließt. Auch wenn formelle Zulassungen solcher Testkits durch

das FLI vorliegen (s. Tabelle 1), können diese derzeit bestenfalls für eine (nicht-amtliche!) grob orientierende Voruntersuchung auf breiter Herdenbasis eingesetzt werden und ersetzen niemals Untersuchungen nach 3.1.2 oder 3.1.4.

Tabelle 1: Vom FLI zugelassene Kits zum Nachweis von Antigen aviärer Influenzaviren (Stand 03/2019)

Antigen-Testkit für das Aviäre Influenza-Virus Kurzform: AI (ag) ELISA	BioChek	FLI-B 420
FASTest AIV Ag	MegaCor	FLI-B 411
Flu Detect Test Strip	Zoetis France	FLI-B 283

3.1.4 Nachweis viraler RNA mittels RT-PCR

Aus Kloaken- und Rachentupferproben oder aus Organ- und Fäzesmaterial kann virale RNA mittels real-time RT-PCR (RT-qPCR) nachgewiesen werden. Einem RT-qPCR Verfahren ist aufgrund seiner höheren Sensitivität und des geringeren Kontaminationsrisikos stets der Vorzug gegenüber konventioneller RT-PCR zu geben. Die RT-qPCR kann als screening-Test vor der Virusisolierung, parallel dazu oder als Bestätigungstest eingesetzt werden. Für den Ja-/Nein-Nachweis von Influenza A-Virus-RNA wird eine RT-qPCR durchgeführt, die ein Fragment des Matrix-, Nukleokapsid- oder PB1-Gens amplifiziert (Abb. 4, generische PCR). Darüber hinaus werden RT-qPCR-Tests zum subtypspezifischen Nachweis von H5-, H7- und ggf. weiteren AIV-Subtypen eingesetzt. Auch eine Pathotypisierung kann am NRL-AI durch RT-qPCR erfolgen. Die durch das Referenzlabor der EU derzeit validierten Methoden sind dem Diagnostikhandbuch der EU zu entnehmen oder können im NRL abgefragt werden. Gegenüber den Angaben des Diagnostikhandbuchs werden im NRL erweiterte RT-qPCR-Methoden eingesetzt (Abb. 4), die auch den Einsatz einer internen Kontrolle zum Ausschluss falschnegativer Befunde durch PCR-Inhibitionen umfassen. Methodik und Referenzmaterial können im NRL abgefordert werden.

Weiterhin sind kommerzielle RT-qPCR Kits für den generischen Influenzavirusnachweis ~~in Deutschland~~ zugelassen (Tabelle 2).

3.1.5 Kommerziell erhältliche Diagnostika

Tabelle 2: Vom FLI zugelassene PCR- Kits zum Nachweis von RNA aviärer Influenzaviren (Stand 03/20~~18~~2019)

VIROTYPE Influenza A Real-Time RT-PCR Testkit zum Nachweis des Influenza A-Virus Kurzform: VIROTYPE Influenza A	Indical Bioscience	FLI-B 538
Kylt Influenza A Real-Time RT-PCR Detektionskit zum Nachweis von Influenzavirus Typ A Kurzform: Kylt Influenza A	Anicon	FLI-B 672
Kylt IVA beta Real-Time RT-PCR Detektionskit zum Nachweis von Influenzavirus Typ A Kurzform: Kylt IVA beta RT-qPCR	Anicon	FLI-C 024
Influenza A – Virus – RNA Test Kit; Kurzform: InfA qPCR	BioChek	FLI-C 052

~~Tabelle 2: Zu kalkulierende Dauer des Nachweises und der Charakterisierung aviärer Influenzaviren.~~

~~Methodik~~	~~Dauer~~
~~PCR generischer Influenzanachweis~~	~~1 Tag~~
~~PCR Subtypisierung (H5, H7)~~	~~1 Tag~~
~~Pathotypisierung mittels Nukleotidsequenzierung~~	~~1 - 2 Tage~~
~~Virusanzucht und Subtypisierung~~	~~14 - 21 Tage~~
~~Bestimmung der Pathogenität mittels Tierversuch (IVPI)~~ ~~[Voraussetzung: Verfügbarkeit eines Virusisolates]~~	~~14 Tage~~

3.1.6 Molekulare Pathotypisierung

Die Bestimmung des Pathotyps von AIV der Subtypen H5 und H7 kann durch Nukleotidsequenzierung der endoproteolytischen Spaltstelle im HA-Gen vorgenommen werden; ein Virusisolat ist hierfür nicht erforderlich. Hierzu wird das fragliche Fragment des Gens durch konventionelle RT-PCR amplifiziert, extrahiert, sequenziert und die Animosäuresequenz deduziert. Eine polybasische Aminosäuresequenz der Spaltstelle signalisiert hohe Pathogenität des Virus. Die Durchführung und Bewertung dieser Untersuchungen bleibt dem Nationalen Referenzlabor für Aviäre Influenza vorbehalten. Weiterhin wurden am NRL-AI RT-qPCR Methoden zur Pathotypisierung von H5 und H7 AIV entwickelt, deren Einsatz in der amtlichen Diagnostik jedoch dem NRL-AI vorbehalten bleibt.

3.1.7 Pathotypisierung mittels Tierversuch

Die Pathogenität eines AIV **Isolates** kann auch durch einen Tierversuch ermittelt werden. Hierzu werden ca. sechs Wochen alte Hühner intravenös mit einem AIV-Isolat inokuliert und für 10 Tage beobachtet. Aus den resultierenden klinischen Symptomen, deren Bewertung in den einschlägigen Rechtsvorschriften festgelegt

ist, wird ein Index errechnet (intravenöser Pathogenitätsindex, IVPI), der zur Pathogenitätsbestimmung herangezogen wird. Isolate mit einem IVPI > 1.2 sind als hochpathogen einzustufen.

Für diese Methode ist im Gegensatz zur molekularen Pathotypisierung ein replikationskompetentes Virusisolat erforderlich. Diese Methode ist zur Pathogenitätsbestimmung aller AIV Subtypen geeignet.

3.2 Indirekter Virusnachweis

3.2.1 Antikörpernachweis im ELISA

Zur allgemeinen Voruntersuchung auf Antikörper gegen Influenza-A-Viren sind vor allem ELISA Tests geeignet, bei denen Antikörper nachgewiesen werden, die gegen die gruppenspezifischen Antigene gerichtet sind. Die Anwendung kommerzieller ELISA-Kits erfolgt nach den Empfehlungen des Herstellers. Hierbei ist auf das Vorliegen einer Zulassung für amtliche Untersuchungen der einzusetzenden Tests und der verwendeten Charge durch das FLI zu achten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Vom FLI zugelassene kommerzielle ELISA-Kits zum Nachweis von Antikörpern gegen aviäre Influenzaviren (Stand 03/~~18~~2019).

Avian Influenza Virus Antibody Test Kit Kurzform: AI ELISA	BioChek	BFAV-B 361
Avian Influenza Virus Multispezies Antikörper Testkit Kurzform: AI MSp ELISA	BioChek	FLI-B 472
Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Aviären Influenza Kurzform: FlockChek AI	IDEXX	BGVV-B 219
Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Aviären Influenza, ELISA (MultiS-Screen) Kurzform: FlockChek AI MultiS-Screen	IDEXX	FLI-B 444
ID Screen Influenza A Antibody Competition Kurzform: FLUAcA	ID Vet	FLI-B 438
~~FluDETECT BE Kurzform: ASFLU1~~	~~Synbiotics~~	~~FLI-B 488~~
FLOCKTYPE recAIV Screening, ELISA-Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das Virus der Aviären Influenza in Huhn und Pute Kurzform: FLOCKTYPE recAIV Screening	~~Qiagen~~ Indical Bioscience	FLI-B 435
IDScreen Influenza H5 antibody Competition. Kurzform: FLUACH5	ID Vet	FLI-B 506
ID Screen Influenza H7 antibody Competition. Kurzform: FLUACH7	ID Vet	FLI-C 037

3.2.2 Antikörpernachweis mittels Hämagglutinationinhibition (HI)

Im Falle positiver Reaktionen im ELISA müssen die Antikörper mittels HI subtypisiert werden; hierbei sind zumindest Antikörper gegen die Subtypen H5 und H7 auszuschließen. Gezielte Untersuchungen auf Antikörper gegen Influenzavirus vom Subtyp H5 oder H7 oder einen anderen H-Subtyp können mit dem HI unter Einsatz des H-Subtyp-spezifischen Antigens erfolgen. HI-Untersuchungen des EU-kofinanzierten Hausgeflügelmonitorings sind mit den durch das Referenzlabor der EU vorgeschriebenen Antigenen durchzuführen. Aliquots dieser Antigene können gebührenfrei beim NRL-AI des FLI abgerufen werden. HI-Untersuchungen im Rahmen anderer Programme, insbesondere gebührenpflichtige Untersuchungen, führen die Untersuchungseinrichtungen mit kommerziell bezogenen oder selbst hergestellten Antigenen ihrer Wahl durch.

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald – Insel Riems, www.fli.de