

# Aktuelle Möglichkeiten der Diagnostikdienstleistungen für die Geflügelpraxis am Beispiel des Infektiösen Bronchitis Virus des Huhnes



Martin Liman, PhD, Dipl ECPVS



## Infektiöses Bronchitis Virus

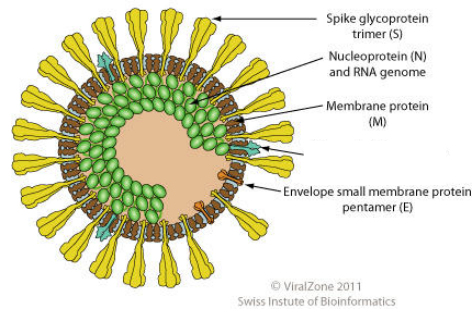
- einige allg. Kommentare zu IBV
- IBV-Diagnostik
  - Probenauswahl
  - serologische Methoden
  - real-time PCR & Sequenzierung  
(diagn. Kaskade, Interpretation der Ergebnisse)
  - NGS
  - Viruskultur



## allg. Kommentare zu IB

### IBV-Diagnostik

- geeignetes Probenmaterial?
- welche Methode passend?
- Herausforderungen:
  - Feld- vs Vakzinestämme
  - Avian Coronavirus (incl. IB, TuCV) sehr variabel
  - Neigung zu Persistenz



AniCon  
AniCon Labor GmbH

## geeignetes Probenmaterial (Ag)

### Achtung Beprobungsortlokalisation vs Virus-Persistenz

- frühes Infektionsstadium = akute repr. & resp. Klinik:  
Trachealtupfer oder Gewebeprobe von Trachea, Ovar und Oviduct
- späteres Stadium und/oder Nieren-Symptome:  
Kloakentupfer, Gewebeproben von Caecaltonsillen, Niere, Ovar und Oviduct
- kombinierte Tupfer- und Gewebeproben sinnvoll (ggf. FTA-Karte)
- cave CR88 = 793b/ 4-91 in Caecaltonsillen

AniCon  
AniCon Labor GmbH



AniCon  
AniCon Labor GmbH

## Herausforderung Prophylaxe

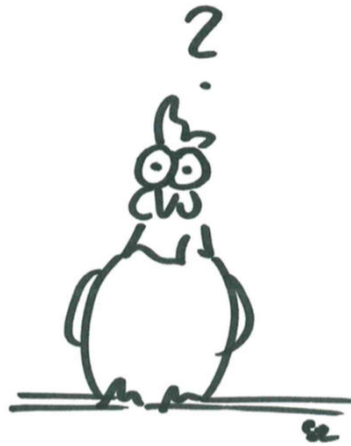
- Impfung von ET, LH, Broiler
- attenuierte (lebende) und inaktivierte Vakzine
- diverse Varianten und Stämme
- diverse Impfstoffe und -programme

AniCon  
AniCon Labor GmbH

## die Varianten


### Varianten:

- CR88 (793B bzw. 4/91)
- Mass
- D274
- D1466
- Italy02
- Ark
- QX
- Var02
- Q1
- IB80
- ...
- TuCoV



	Routine-Monitoring	Bestätigung klin. Fälle	Prävalenz / Epidemiologie	Impfkontrolle
<b>Pathogen- (Antigen-) Detektion</b>				
(real-time) RT-PCR	++	++	+	+
SNT	-	-	+	-
HA	-	-	+	-
Sequenzierung	-	+	++	+
<b>Detektion Immunantwort (Antikörper)</b>				
VNT	-	+	+	+
HAH	-	+	-	+
ELISA	++	++	++	++

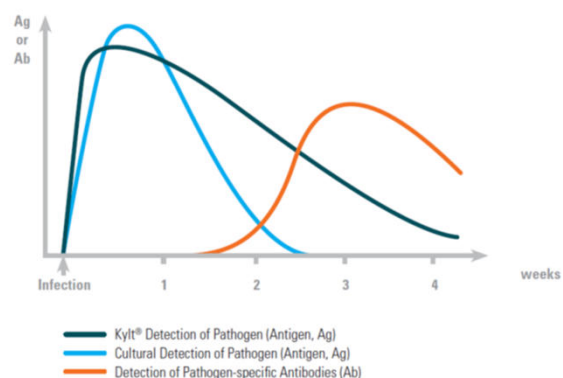
	Routine-Monitoring	Bestätigung klin. Fälle	Prävalenz / Epidemiologie	Impfkontrolle
<b>Pathogen- (Antigen-) Detektion</b>				
(real-time) RT-PCR	++	++	+	+
SNT	-	-	+	-
HA	-	-	+	-
Sequenzierung	-	+	++	+
<b>Detektion Immunantwort (Antikörper)</b>				
VNT	-	+	+	+
HAH	-	+	-	+
ELISA	++	++	++	++

 AniCon  
AniCon Labor Smart

## IB-ELISA

- Ergebnisse in wenigen Stunden
- detektiert Antikörper, v.a. Impfkontrolle
- Probenmaterial:  
Blut, Serum, Papierstreifen

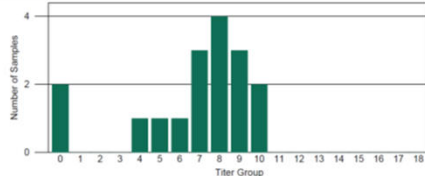
Products supplement the existing cultural and serological methods:



## Befundung IB-ELISA

Parameter: antibodies against Infectious Bronchitis Virus  
Method: indirect ELISA (BioChek) (a)  
Sample No.: A1704371

Number of Samples	positive	not detectable
17	15	2



Sample No.	Raw OD	S/P Ratio	Titer	Titer Group	Result
-	0,168				
-	0,163				
+	0,611				
+	0,608				
A1704371.001	1,531	3,075	12819	9	positive
A1704371.002	1,245	2,431	10134	8	positive
A1704371.003	1,027	1,940	8087	7	positive
A1704371.004	1,704	3,465	14445	10	positive
A1704371.005	0,933	1,729	7208	6	positive
A1704371.006	0,694	1,190	4961	4	positive
A1704371.007	0,231	0,148	617	0	not detectable
A1704371.008	1,064	2,024	8437	7	positive
A1704371.009	1,449	2,891	12052	9	positive
A1704371.010	1,644	3,330	13882	9	positive
A1704371.011	1,411	2,805	11693	8	positive
A1704371.012	0,700	1,204	5019	5	positive
A1704371.013	1,138	2,190	9129	7	positive
A1704371.014	1,422	2,830	11797	8	positive
A1704371.015	0,235	0,157	654	0	not detectable
A1704371.016	1,348	2,663	11101	8	positive
A1704371.017	1,696	3,447	14369	10	positive

Lot Number: FS6576

Note:

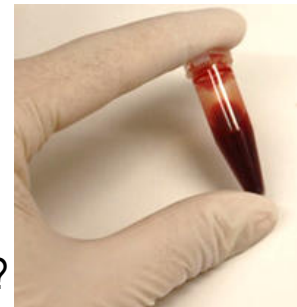
The evaluation of the ELISA results are based on the information provided by the kit manufacturer. We point out that the infection status of herds possibly can only be assessed by paired samples and / or supplementary examinations.




## Interpretation IBV ELISA

### Interpretation IBV ELISA

- bedenke IBV-Antigen auf Platte (z.B. Mass)
- Antikörper durch Impfung oder durch Feldinfektion?
  - Unterscheidung schwierig (Erfahrungswerte zu Standort, Herde, Impfprogramm)
  - praktisch alle Tiere geimpft
  - gepaarte Serumproben bzw. Verlaufskontrolle (signifikanter Anstieg?)



	Routine-Monitoring	Bestätigung klin. Fälle	Prävalenz / Epidemiologie	Impfkontrolle
<b>Pathogen- (Antigen-) Detektion</b>				
(real-time) RT-PCR	++	++	+	+
SNT	-	-	+	-
HA	-	-	+	-
Sequenzierung	-	+	++	+
<b>Detektion Immunantwort (Antikörper)</b>				
VNT	-	+	+	+
HAH	-	+	-	+
ELISA	++	++	++	++



## VNT - Virusneutralisationstest

- „Goldstandard“ für Varianten-spez IBV-AK-Nachweis
- HAH überlegen
- teuer und zeitaufwändig
- ungeeignet für Monitoring
- Probenmaterial: Serum

## Ergebnisse VNT

VN IB 4/91											
<=3	4	5	6	7	8	9	10	11	>11	MW	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	> 11,00	
VN IB China QX											
<=3	4	5	6	7	8	9	10	11	>11	MW	
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	6,00	
VN IB D-274											
<=3	4	5	6	7	8	9	10	11	>11	MW	
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	10,00	
VN IB H 120											
<=3	4	5	6	7	8	9	10	11	>11	MW	
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	6,00	



## Ergebnisse VNT

VN IB 4/91											
<=3	4	5	6	7	8	9	10	11	>11	MW	
0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	7,00	
VN IB China QX											
<=3	4	5	6	7	8	9	10	11	>11	MW	
0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	5,50	
VN IB D-274											
<=3	4	5	6	7	8	9	10	11	>11	MW	
0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	6,00	
VN IB H120											
<=3	4	5	6	7	8	9	10	11	>11	MW	
0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	6,00	





## VNT

- teuer und zeitaufwändig
- nur in wenigen spezialisierten Laboren etabliert
- nicht standardisiert → uneinheitliche Ergebnisse zw. Labore
- nicht geeignet für größere Probenmengen
- Kreuzreaktionen erschweren Interpretation, v.a. in mehrfach geimpften Herden
- neue Varianten werden mglw. nicht angemessen detektiert



	Routine-Monitoring	Bestätigung klin. Fälle	Prävalenz / Epidemiologie	Impfkontrolle
<b>Pathogen- (Antigen-) Detektion</b>				
(real-time) RT-PCR	++	++	+	+
SNT	-	-	+	-
HA	-	-	+	-
Sequenzierung	-	+	++	+
<b>Detektion Immunantwort (Antikörper)</b>				
VNT	-	+	+	+
HAH	-	+	-	+
ELISA	++	++	++	++

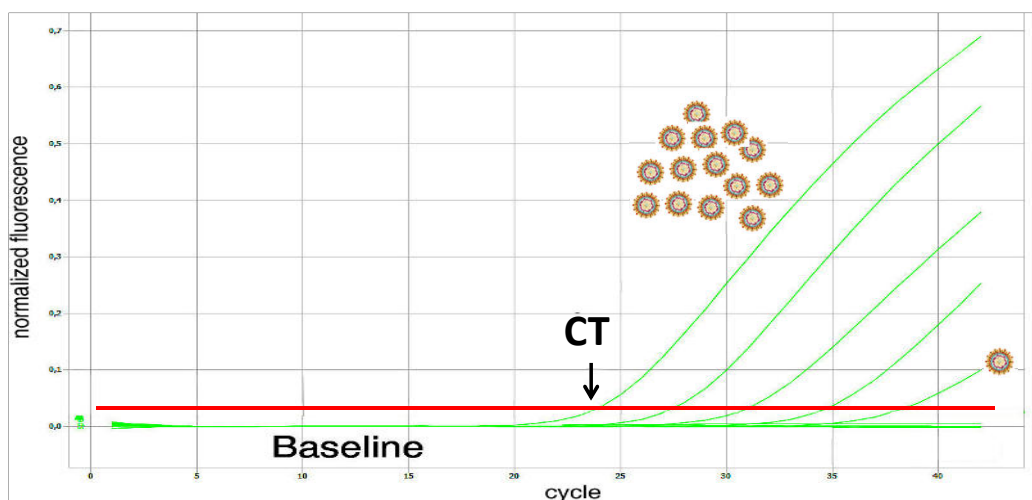


## real-time RT-PCR

- Milliarden-fache Vermehrung eines IB-spez. Zielgens
- real-time = Messung in Echtzeit, semi-quantitativ
- Ergebnisse innerhalb weniger Stunden
- detektiert Antigen bzw. Genom
  - keine Aussage zu Immunreaktion
- aber zu Überwachung von „Vaccine-take“ geeignet
- lebende Viren und tote Viren / Genomfragmente werden detektiert



## real-time RT-PCR = semi-quantitativ

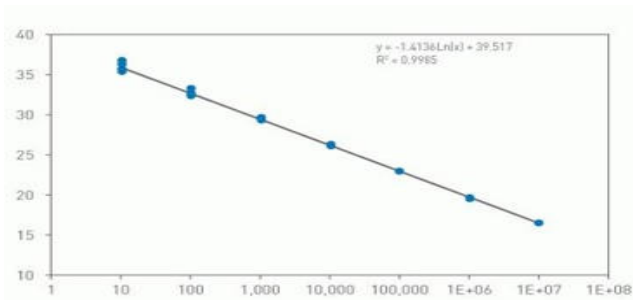


## real-time RT-PCR = semi-quantitativ

Probe	Beschreibung	aCoV CT	IB-Variante	Varianten CT	Ergebnis
1	FTA-Card, Trachea, Spot 1	18	Mass	29	positiv

10000 Kopien

&lt;10 Kopien



CT	Kopienzahl
18	10000
19	5000
21	1000
25	100
28	10



## IB – diagnostische Kaskade

Aviäres Coronavirus (aCoV) Screening



IB Varianten: CR88 (=4/91 bzw. 793b), Mass, D274, D1466, Italy02, Ark, QX, Var02, Q1, IB80



IB-Sequenzierung



# IB-aCoV-Screening

Parameter: Avian Coronavirus (aCoV incl IBV) and IB Variants

Method: Species-specific and variant-specific Real-Time RT-PCR (a)

Sample No.		A1806068.001	A1806068.002	A1806068.003
Sample Description		FTA-Card, 25 days, 4 spots pooled	FTA-Card, 25 days, 4 spots pooled	FTA-Card, 29 days, 4 spots pooled
aCoV inkl IBV <sup>1</sup>	Result	positive	positive	positive
	CT	20,8	25,1	30,2



Parameter: Avian Coronavirus (aCoV incl IBV) and IB Variants  
Method: Species-specific and variant-specific Real-Time RT-PCR (a)

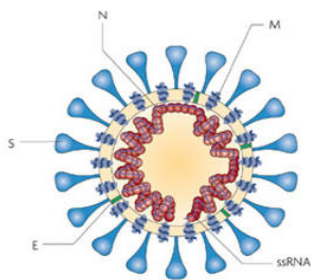
Sample No.		A1806068.001	A1806068.002	A1806068.003
Sample Description		FTA-Card, 25 days, 4 spots pooled	FTA-Card, 25 days, 4 spots pooled	FTA-Card, 29 days, 4 spots pooled
aCoV inkl IBV <sup>1</sup>	Result	positive	positive	positive
	CT	20,8	25,1	30,2

793b, 4/91, 1/96 & CR88 <sup>2</sup>	Result	positive	positive	not detectable
	CT	33,4	34,5	-
Massachusetts <sup>2</sup>	Result	positive	not detectable	not detectable
	CT	29,2	-	-
D1466 <sup>2</sup>	Result	not detectable	not detectable	not detectable
	CT	-	-	-
D274 <sup>2</sup>	Result	not detectable	not detectable	not detectable
	CT	-	-	-
Italy02 <sup>2</sup>	Result	not detectable	not detectable	not detectable
	CT	-	-	-
Arkansas <sup>2</sup>	Result	not detectable	not detectable	not detectable
	CT	-	-	-
Variant2 <sup>2</sup> (Israel02, IS 1494)	Result	positive	positive	positive
	CT	28,0	32,9	36,0
IB 80 <sup>2</sup>	Result	not detectable	not detectable	not detectable
	CT	-	-	-
Q1 <sup>2</sup>	Result	positive	positive	positive
	CT	21,4	26,6	30,9
QX <sup>2</sup>	Result	not detectable	not detectable	not detectable
	CT	-	-	-

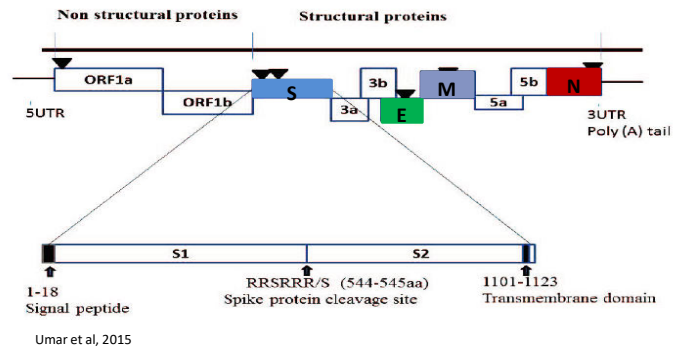
(<sup>1</sup>) species-specific Real-Time RT-PCR: detects Infectious Bronchitis Virus and Turkey Coronavirus  
(<sup>2</sup>) IBV variant- specific Real-Time RT-PCR

# Sequenzierung & phylogen. Analyse

- „Auslesen“ der Nucleotid-Sequenz des Spike-Proteins
- Umrechnung der Sequenzunterschiede in „Baum“



Nature Reviews | Microbiology

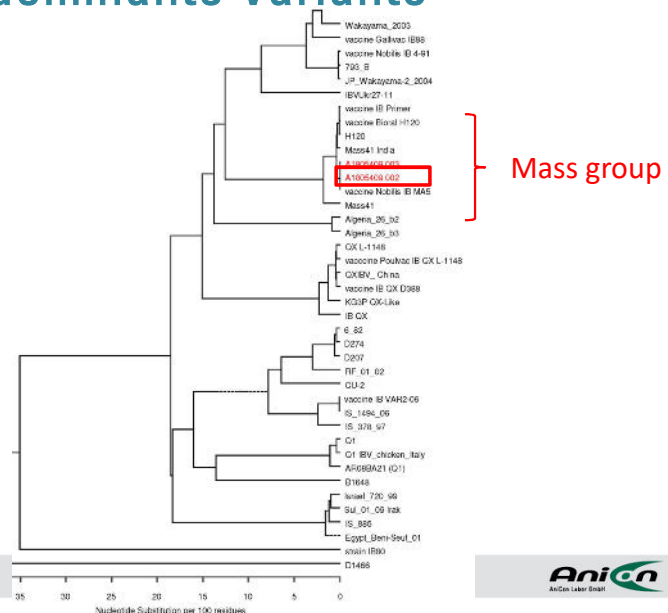


Umar et al, 2015



## Varianten detektiert: nicht-selektive Seq. = dominante Variante

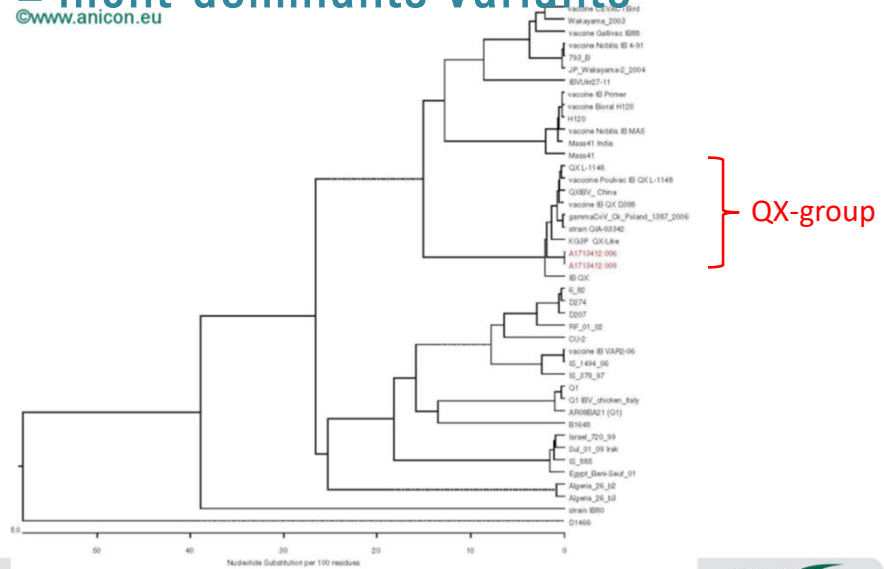
Sample No.	A1805/09.002	
Sample Description	3 swabs pooled (152932-4)	
eCoV line IBV <sup>a</sup>	Result	positive
	CT	19,5
7930, 4/91, 1/98 & CR58 <sup>a</sup>	Result	positive
	CT	24,2
Massachusetts <sup>a</sup>	Result	positive
	CT	22,1
D1480 <sup>a</sup>	Result	not detectable
	CT	-
D274 <sup>a</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Italy02 <sup>a</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Arkansas <sup>a</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Variant2 <sup>a</sup> (Israel02, IS 1484)	Result	not detectable
	CT	-
IB 80 <sup>a</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Q1 <sup>a</sup>	Result	not detectable
	CT	-
QX <sup>a</sup>	Result	not detectable
	CT	-



# Varianten detektiert: selektive Seq = nicht-dominante Variante

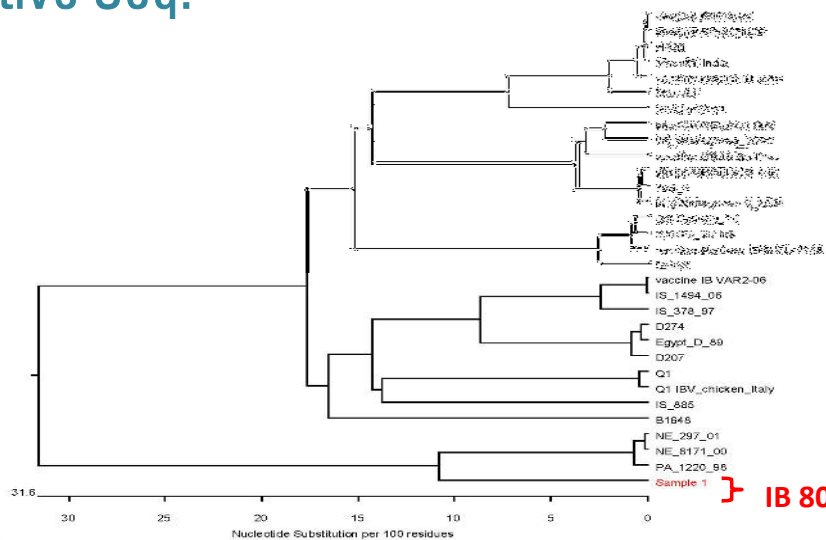
©www.anicon.eu

Sample No.		A1715412.008
Sample Description		5 trachea swabs pooled
sCoV inkl IBV <sup>1</sup>	Result	positive
	CT	14,2
793b, 4/91, 1/96 & CR88 <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Massachusetts <sup>3</sup>	Result	positive
	CT	18,7
D1466 <sup>4</sup>	Result	not detectable
	CT	-
D274 <sup>4</sup>	Result	positive
	CT	19,0
Italy02 <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Arkansas <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Variant2 <sup>2</sup> (Israel02, IS 1494)	Result	not detectable
	CT	-
IB 80 <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Q1 <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
QX <sup>2</sup>	Result	positive
	CT	24,6



# keine Varianten detektiert: nicht-selektive Seq.

Sample No.		A1805823.001
Sample Description		5 cloacal swabs pooled
sCoV inkl IBV <sup>1</sup>	Result	positive
	CT	26,1
793b, 4/91, 1/96 & CR88 <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Massachusetts <sup>3</sup>	Result	not detectable
	CT	-
D1466 <sup>4</sup>	Result	not detectable
	CT	-
D274 <sup>4</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Italy02 <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Arkansas <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Variant2 <sup>2</sup> (Israel02, IS 1494)	Result	not detectable
	CT	-
IB 80 <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
Q1 <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-
QX <sup>2</sup>	Result	not detectable
	CT	-



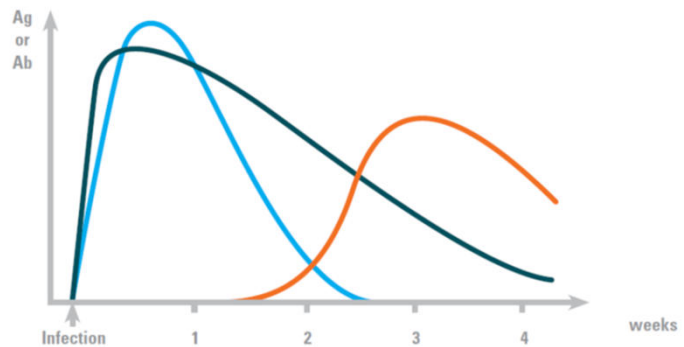
## ELISA oder PCR?

### ELISA:

- Detektion Antikörper induziert durch Impf- oder Feldinfektion
- immer retrospektiv

### PCR:

- direkte Antigen-Detektion
- aktueller Status



**Die Methoden ergänzen sich!**

- Kylt® Detection of Pathogen (Antigen, Ag)
- Cultural Detection of Pathogen (Antigen, Ag)
- Detection of Pathogen-specific Antibodies (Ab)



## Sonstige: Viruskultur & NGS

- Viruskultur im embryonierten Hühnerei
- NGS möglich, v.a. „new emerging“ aber Interpretation in Routine?



## Zusammenfassung

Serologie (VNT / ELISA)	real-time RT-PCR / Sequenzierung
retrospektiv	aktueller Status
neue Varianten werden nicht identifiziert	neue Varianten können identifiziert werden
Überwachung Immunantwort	keine Aussage zu Immunantwort
Quantifizierung Antikörper	Quantifizierung Antigen
Serum	Tupfer/Gewebe/FTA-Karte
ELISA Standard, VNT aufwändig	Schnellmethode, Sequenzierung aufwändig



[www.anicon.eu](http://www.anicon.eu)