

Erfahrungsbericht zur Eignung verschiedener ELISA Kits zum Nachweis von Antikörpern gegen Aviäre Influenza für das Routinelabor

Dr. Hans-C. Philipp
Lohmann Tierzucht GmbH
Veterinär-Labor
Abschnede 64
27472 Cuxhaven
philipp@ltz.de

Lohmann Tierzucht GmbH

- Teil der EW Group
- Geflügelzucht als Kernaktivität
- LTZ
 - ◆ weiße Legehennen
 - ◆ braune Legehennen
 - ◆ spf-Hühnereier für diagnostische und
 - ◆ pharmazeutische Zwecke

LTZ Veterinär-Labor

- mikrobiologisches Labor für Geflügel, besonders Hühner
- Proben aus dem Feld (kommerzielles Auftragslabor)
- Qualitätssicherung eigener Zucht- und Vermehrungsbestände
- Qualitätssicherung von spf-Hühnerherden nach Pharm. Europ.
- projektbezogene F&E (z.B. FUGATO)

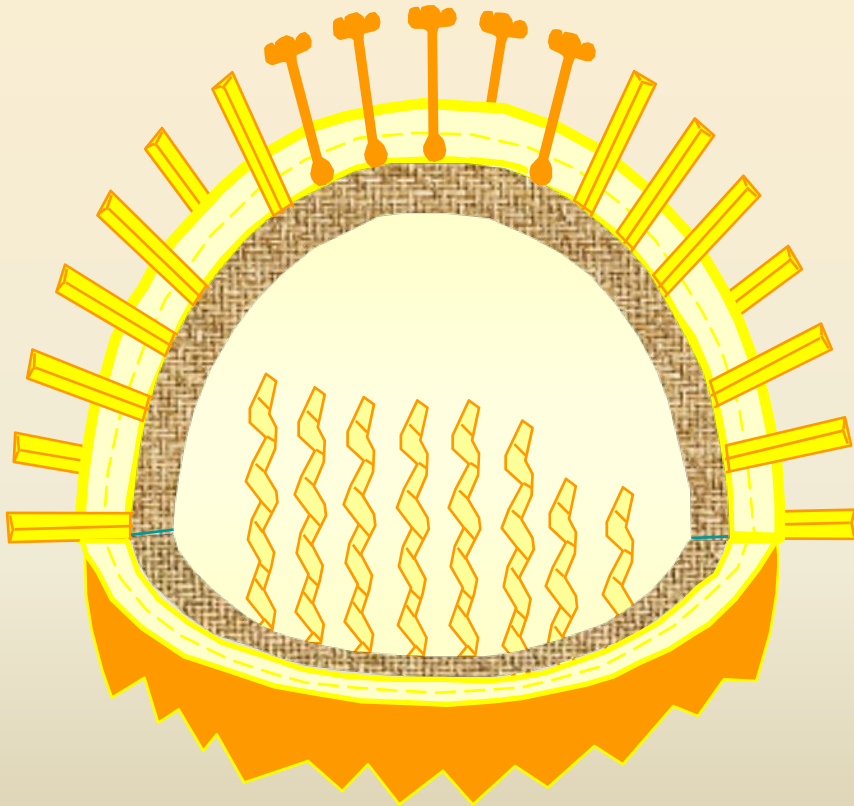
Akkreditierte Laborbereiche

- Pathologie
- Virologie
- PCR
- Bakteriologie/Parasitologie
- **Serologie**

etablierte serologische Untersuchungsmethoden

- Virus-Neutralisationstest
- Immunfluoreszenz
- Hämagglutinationstest
- Schnellagglutination
- Agargel-Präzipitationstest
- **ELISA (fast ausschließlich kommerzielle Kits)**

Aviäre Influenza (Influenza A)



- Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (N), 16x9 Reassortanten
- bei Vögeln kommen alle 16 HA Subtypen vor
- tierseuchenrechtlich relevant sind H5 und H7
- von aktueller Bedeutung bei Geflügel sind H5, H6, H7 und H9

Diagnose der AI bei Hühnern und Puten

- klinischer Verdacht: Apathie, Verzehrdepression, Legeleistungsrückgang
- pathologisch-antomisch: kann unspezifisch sein!
- Entscheidend ist die unmittelbare Abklärung von Verdachtsfällen durch den schnellen Erregernachweis
- Monitoring und Epizootiologie: durch den Antikörpernachweis (Hühnervögel)

Nachweis von Antikörpern gegen AI

- AGP, ELISA: gruppenspezifischer Nachweis auf Basis von Ak gegen konservierte Antigene (z.B. Matrixprotein)
- HAH: subtyp-spezifischer Nachweis von Ak gegen HA-Subtypen
- IFT: subtyp-spezifischer Nachweis von AK gegen NA-Subtypen (von Bedeutung bei Impfungen nach dem „DIVA“-Prinzip)
- beginnend: kommerziell erhältliche subtyp-spezifische ELISAs (verfügbar für H5, N1)

Indikationen für den AI-Antikörpernachweis

- amtlich veranlaßte Untersuchungen
 - ◆ Monitoring, z.B. Freilandhaltungen
 - ◆ untersuchungspflichtige Verdachtsfälle
- klinische Verdachtsfälle
- betrieblich veranlaßtes Monitoring
- Export

ELISA AI

- Anforderungen aus Sicht des Anwenders
 - ◆ maximale Spezifität (anzeigepflichtige Tierseuche)
 - ◆ maximale Sensitivität
- einfach, robust, preiswert usw...

- Aber: nicht alle Anwender haben die gleichen Interessen (Sonderfall spf)

Problem Spezifität

- bis April 2007 haben wir 2.839 Serumproben von gesichert negativen Beständen untersucht, davon waren 277 positiv im ELISA
- keines dieser Sera war positiv im AGPT
- über 9% falsch positive Ergebnisse unter unseren Bedingungen
- Der Wechsel von einem Kit zu einem anderen brachte keinen wesentlichen Vorteil
- Die Testung von 96 spf-Seren im LDL-AI-ELISA ergab 96 x negativ

orientierende Untersuchung zu Sensitivität verschiedener AI-AK-ELISAs

- verglichen wurden vier verschiedene Kits
- drei Antikörper-bindende ELISAs, einer davon mit rekombinantem Antigen
- ein kompetitiver ELISA (Vorteil: spezies-unabhängig einsetzbar!)
- als positive Seren dienten Kontrollseren für den HHT gegen H1, H5, H6, H9
- Doppelbestimmung seriell verdünnter Proben

Versuchsergebnis

	LDL	A	B	C
H1	1:10	<1:10	1:10	<1:10
H5	1:320	1:160	1:160	1:160
H6	1:20	<1:10	1:20	1:10
H9	1:80	1:80	1:40	1:80

AI H6-Feldinfektion, Mai 2007

- milde Klinik
- der Einsender hatte mit einem ELISA positive Serum-Befunde erzielt und die Proben zur Bestätigung weiter gereicht
- Die Verwendung von zwei weiteren ELISAs erbrachte bei uns übereinstimmende Beurteilungen für 24 Seren
- die Proben waren ebenfalls positiv im AGPT und im H6-HHT

unsere Einschätzung der Methoden und Produkte

- ELISA ist am besten geeignet zur Untersuchung größeren Probenzahlen
- die verfügbaren Kits unterscheiden sich wenig in der Sensitivität
- entscheidend ist demnach die Rate falsch positiver Ergebnisse
- es besteht die Notwendigkeit, positive Resultate zu verifizieren- im Gegensatz zu anderen Herstellern bietet LDL dazu eine Lösung an (verification ELISA)
- cave: schlechte Serum-Qualität!!

Ausblick

- Ein Monitoring auf Basis von Antikörpern gegen Influenza A ist sinnvoll und wünschenswert
- die verfügbaren ELISAs eignen sich dafür, Schwierigkeiten machen die falsch positiven Resultate
- wenn sich H6 „festsetzen“ sollte, muß die Strategie geändert werden. Dann müssen Serotyp-spezifische ELISAs oder HHTs durchgeführt werden
- erfahrungsgemäß verschwindet H6 aber rasch wieder