

**Pascale Prével (1995)**

## **Differenzierung aviärer Pneumovirus-Isolate mittels monoklonaler Antikörper zum Nachweis von Puten-Rhinotracheitis-Antikörpern im ELISA**

### **6 ZUSAMMENFASSUNG**

Die Rhinotracheitis der Puten (TRT) ist ein erstmals in den siebziger Jahren in der Literatur beschriebenes Krankheitsbild, dessen Ursachen lange Zeit unerkannt blieben, zumal die Symptomatik durch virale und bakterielle Sekundärinfektionen beeinflusst wird und zur Isolierung des Virus (einem aviären Pneumovirus) einige Besonderheiten beachtet werden müssen. Die Infektion manifestiert sich klinisch anfänglich durch Tracheitis, Konjunktivitis, Nasenausfluß und Anschwellen der infraorbitalen Sinus; im weiteren Verlauf der Krankheit können dann Anorexie, Niedergeschlagenheit und damit in Zusammenhang stehender Leistungsabfall sowie Diarrhoe beobachtet werden. Zu Beginn der achtziger Jahre wurde TRT erstmals in Europa beobachtet und breitete sich rapide aus.

Das Swollen-Head-Syndrom der Hühner (SHS) wird durch ein dem TRTV verwandtes Virus hervorgerufen, verursacht allerdings ein andersartiges klinisches Bild. Dieses manifestiert sich bei Elterntieren und bei Legehennen bei durchschnittlich 3 % der betroffenen Tiere in der Herde vornehmlich in einer Abnahme der Legeleistung sowie in auffälligen Schwellungen der peri- und infraorbitalen Sinus nebst Torticollis, zerebraler Desorientierung und Leistungsdepression. Bei Broilern sind Niesen, eine Rötung der Konjunktiven, subkutane Ödeme im Kopfbereich sowie respiratorische Symptome auffällig. Beim SHS wird das Krankheitsbild ebenfalls durch virale und bakterielle Kofaktoren mitbestimmt.

Das Ziel der Untersuchung bestand darin, aviäre Pneumoviren im allgemeinen diagnostizieren zu können und speziell eine Differenzierung der zur Verfügung stehenden Referenzisolate (PL20, VC0<sub>3</sub>, T 2/91, 91/78, BUT 1#8544, STG 761/88, STG 854/88, STG III/88, STG 1439/91 und STG 1125/91) nach Hühner- und nach Putenstämmen sowie u. U. der einzelnen Isolate voneinander zu ermöglichen. Des weiteren sollte ein kompetitiver ELISA zur Detektion gegen das Pneumovirus gerichteter Antikörper aus Hühner- und Putenbeständen entnommener Seren erarbeitet werden. Hierfür wurden monoklonale Antikörper (MAbs) gegen das

Ploufragan-Isolat PL20 durch Immunisierung von BALB/C-Mäusen hergestellt und im weiteren Verlauf durch biochemische und biologische Untersuchungen charakterisiert. Die entstandenen Hybridome wurden kultiviert und kloniert, eine Selektion fand überwiegend auf der Basis der Immunfluoreszenzreaktivität der Kulturüberstände gegenüber dem PL20-Isolat statt. Eine weiterführende Charakterisierung durch Western Blot und Virusneutralisation (VN) diente der Selektion von 50 MAbs für eine Amplifikation durch Aszitesinduktion in Mäusen. Die Aszitesernten eines jeden Klonen wurden einzeln kontrolliert und anschließend vermischt, sofern sie gleiche Resultate im indirekten Fluoreszenztest (IFAT) zeigten, um sodann mit den entstandenen "pools" weiterzuarbeiten.

Im Anschluß daran wurden die MAbs im IFAT auf ein Erkennen der folgenden Pneumovirus-Isolate getestet: PL20, VC0<sub>3</sub> (Frankreich), T 2/91 (Taiwan), 91/78 (Südafrika), BUT 1#8544 (Großbritannien), STG 761/88, STG 854/88, STG III/88, STG 1439/91 und STG 1125/91 (Deutschland). Hierbei zeigte sich keine uniforme, sondern eine sehr variable Reaktivität der MAbs, die sich generell in 2 Gruppen einteilen ließen: Die erste Gruppe erkannte ein weites Virus-Spektrum, wobei alle Virusisolate mit unterschiedlicher Intensität identifiziert wurden mit Ausnahme des STG 1125/91, mit dem lediglich drei monoklonale Antikörper erkennbar reagierten. Die zweite Gruppe hingegen erkannte nur einzelne Isolate (PL20, T 2/91, 1439/91, 91/78, PL20). Einige MAbs (103 E 09; 103 F 03; 104 A 07; 110 A 03; 110 H 05) differenzierten die Hühner- von den Putenisolaten. Des weiteren wurden Western blots durchgeführt, die die in der Vorstudie erzielten Ergebnisse bestätigten. Im Virusneutralisationstest erwiesen sich die MAbs als nicht neutralisierend gegenüber den 10 Virusisolaten. Die durch die MAbs bereits in zwei große Gruppen eingeteilten Virusisolate manifestierten ein unterschiedliches Infektionsverhalten in der Zellkultur (Vero-Zellen, CEF). Es wurden zwei deutlich differenzierbare zytopathische Effekte an virusinfizierten Zellen bei verschiedenen Isolaten beobachtet, die auch in der Literatur beschrieben werden. Schließlich wurde ein bereits etablierter, kompetitiver ELISA auf der Grundlage des VC0<sub>3</sub>-Antigens durch Einführung der neu entwickelten MAbs in das System optimiert. Hierfür war eine enzymatische Markierung von ausgewählten MAbs vonnöten. Es wurden sowohl ein kompetitiver einfacher als auch ein kompetitiver Sandwich-ELISA entwickelt und eine Arbeitszone mit Hilfe der DOEHLERT'schen Funktion determiniert.

Da sowohl durch TRT als auch durch SHS bedeutende wirtschaftliche Verluste hervorgerufen werden, sind wirksame Kontrollmöglichkeiten der Krankheit von großem Interesse, zumal eine Kontrolle oder gar die Eliminierung dieser Infektion einen wichtigen Schritt für die Prevention darstellen würde. Die Bedeutung der vorliegenden Untersuchungen, die in der Etablierung eines kompetitiven Sandwich-ELISA mit dem Antigen VC03 resultierten, liegt zum einen in der sicheren und schnellen Diagnosestellung einer TRTV-Infektion auf der Basis des Antikörper-nachweises. Diese ist bei der direkten Virusdiagnostik aufgrund der zeitlich begrenzten Nachweismöglichkeit - nämlich in der frühen post-infektiösen Phase - oft bei Auftreten der zumeist durch bakterielle Sekun-därinfektionen bestimmten Symptomatik nicht mehr möglich. Zum anderen besteht die Möglichkeit, verschiedene Virusisolate differenzieren zu können, wodurch sich neue epidemiologische Erkenntnisse ergeben könnten. Aufgrund der Variabilität im Reaktionsspektrum der vorliegen-den MAbs sind mannigfaltige Möglichkeiten verschiedener diagnostischer Zielsetzungen durch unterschiedliche Kombinationen der MAbs in einem ELISA gegeben. Vor einer Verwendung dieses ELISA in der Routine-diagnostik sind jedoch zuvor Reihenuntersuchungen zur Absicherung der Diskriminierungsgrenze und des Einflusses von ELISA-Variablen notwendig.

**Differentiation of avian Pneumovirus-Isolates by monoclonal antibodies to detect Turkey-Rhinotracheitis-Antibodies in ELISA**

**5 SUMMARY**

Turkey Rhinotracheitis (TRT) and Swollen Head Syndrome (SHS) in broilers are widespread diseases which have caused considerable losses since their first appearance in Europe in the early eighties. Causal factors in both cases were not known for a long time since the symptoms are mainly produced by secondary viral and bacterial infections. Today it is regarded as the first observed avian Pneumovirus, TRTV and SHSV, respectively, causing different clinical symptoms in the two species. While turkeys show coughing, conjunctivitis, nasal discharge and distended infraorbital sinuses as the earliest signs of infection, followed by anorexia, depression and diarrhea, SHS in chickens is characterized by swelling of the peri- and infraorbital sinuses, torticollis, disorientation and depression. Effective methods of control are urgently needed because of the serious economic losses caused by TRT and SHS. Control of TRTV and SHSV would therefore be an important factor in the prevention of the disease.

Monoclonal antibodies (MAbs) were developed, based on a chicken-derived strain of TRTV (PL20) for immunization of Balb/C-mice prior to fusion of the obtained splenocytes with myelomateous cells. These MAbs have been characterized by biochemical and biological assays, resulting in MAbs recognizing a wide panel of TRTV-isolates and others differentiating these isolates in IFAT. The isolates employed for characterization were: PL20, VC03, T 2/91 (Taiwan), 91/78 (South Africa), BUT 1 # 8544, STG 761/88, STG 854/88, STG III/88, STG 1125/91 and STG 1439/91. The variable reactivity of the MAbs was obvious. Two groups could be distinguished: the first one recognizing the whole panel of virus isolates employed except for STG 1125/91, and the second group showing only reactivity with singular isolates (PL20, T 2/91, 1439/91, 91/78, PL20). A few MAbs differentiated the chicken from the turkey strains. Furthermore, the MAbs showed specificity for different viral proteins in Western blot. Virus neutralization, evaluated by endpoint titration, showed no neutralizing capacity of any of

the MAb. The two groups of isolates detected using the MAbs were confirmed by their different reactivity within the cell culture system (Vero cells, CEF), visualised by two distinct cytopathic effects. In addition, experiments were performed to optimize a competitive ELISA for antibody detection by introducing the MAbs in the system. The optimal working area was determined using a DOEHLERT's last squares estimation.

This approach, however, requires careful monitoring of the health and state of infection in populations at risk - in this case, of turkey and chicken flocks. The importance of the findings presented here, which resulted in the establishment of a competitive sandwich ELISA, based on the antigen VC03, lies on the one hand in a rapidly obtained diagnosis of an avian Pneumovirus-infection, analysing serum samples. This is related to the problem of direct virus-diagnosis, since the samples have to be obtained in the early postinfectious phase, but the clinical signs usually appear subsequent to the secondary bacterial infections. On the other hand, these results enable the differentiation of infection with various virus isolates, which can be used for epidemiological research, for example. As the reactivity of the MAbs shows a considerable variability, many combinations are possible. Before being used in routine diagnosis, the ELISA still has to be applied and evaluated on a larger scale to establish the degree of sensitivity which can be reached and the influence of ELISA-variables.