

Abschlussbericht: QS-Wissenschaftsfond

Bedeutung viraler Erreger im Antibiotikaminimierungsprogramm bei Geflügel

Laufzeit des Projektes: 01.07.2020 – 31.10.2021

Prof. Dr. Dr. Thomas W. Vahlenkamp
Dr. Antje Rückner
Tierärztin Maxi Harzer

Universität Leipzig
Veterinärmedizinische Fakultät
Institut für Virologie
An den Tierkliniken 29
04103 Leipzig

Hintergrund, Problemstellung und wissenschaftlicher Stand

Mit der 16. Novelle des Arzneimittelgesetzes ist der Leitgedanke zur Antibiotikaminimierung in der Nutztierhaltung etabliert worden. Bei der Betrachtung aktueller Kennzahlen wird jedoch deutlich, dass im Nutztiergeflügelbereich die geringste Abnahme der Antibiotikamengen zu verzeichnen ist [1, 2]. Um eine Reduktion des Medikamenteneinsatzes zu erreichen, ist es erforderlich Erkrankungsgeschehen, die den Einsatz von Antibiotika erfordern, zu minimieren. Bakterielle Infektionen werden in der Schwere und Ausprägung des Erkrankungsgeschehens von weiteren Faktoren, wie z.B. vom Handlungsmanagement, von Co-Infektionen, vom genetischen Hintergrund und vom Fütterungsregime beeinflusst. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen hat sich mit verschiedenen Aspekten zur Verbesserung der Geflügelgesundheit beschäftigt und Aktionspläne und Maßnahmen erstellt und entwickelt (z.B. EsRAM, QS-Leitfaden) [3, 4]. Bis auf wenige Untersuchungen bei Hühnern und Puten wurde die Bedeutung viraler Infektionen nicht eingehend berücksichtigt [5]. Das Zusammenspiel von Viren und Bakterien bei der Entstehung von Krankheitssymptomen ist bei vielen Tierarten beschrieben und diskutiert [6,7, 8, 9]. Eine der wichtigsten Indikationen für einen Antibiotikaeinsatz im Geflügel stellt eine generalisierte bakterielle Infektion dar (10, 11). Dies bedeutet, dass bakterielle Erreger in das unter normalen Bedingungen sterile Körperinnere gelangen konnten und sich dort vermehren. Darunter führen besonders *Escherichia coli*-Infektionen, aber auch andere bakterielle Erreger weltweit zu erheblichen wirtschaftlichen Einbußen in der Geflügelproduktion [6, 7, 10]. Es gibt verschiedene Pathomechanismen einer viralen Infektion, die den Wirt anfälliger für bakterielle Infektionen werden lassen. Beispielsweise zerstören die aviären Rotaviren, Astroviren, Adenoviren und Pneumoviren die Integrität der Schleimhaut des Respirationstraktes und/oder des Magen-Darm-Traktes und erleichtern damit den Bakterien das Überwinden dieser natürlichen Abwehrbarriere [9]. Das Anämie Virus und das Virus der Infektiösen Bursitis des Huhnes sowie der Erreger der Hämorrhagischen Enteritis der Pute haben eine immunsuppressive Wirkung auf den Organismus und begünstigen auf diesem Wege den Eintritt weiterer Keime [10]. Gegen viele dieser viralen Erreger existieren in Deutschland keine zugelassenen Vakzinen, die die Schwere von Infektionen mildern könnten. Des Weiteren ist für die Betreiber der Geflügelhaltungen oftmals die eindeutige Quelle des Erregereintrages unbekannt, was es ihnen unmöglich macht, zielgerichtete Präventionsmaßnahmen durchzuführen. Ein denkbarer Übertragungsweg ist der Eintrag von Erregern von Herde zu Herde in aufeinanderfolgenden Produktionsdurchläufen. Virale Erreger könnten bei ineffektiver Reinigung und Desinfektion im Stall verbleiben oder aus der direkten Stallumgebung eingetragen werden. Eine Desinfektionsmittelkontrolle findet in den Geflügelhaltenden Betrieben routinemäßig auf bakterielle Erreger statt. Bisher findet keine virologische Desinfektionsmittelkontrolle mit einem standardisierten Verfahren statt, sodass die Bedeutung der erwähnten Infektionskette für virale Erreger unklar ist.

Ziele des Vorhabens

Ziel des Projektes ist der Nachweis von möglichen Infektionsketten in der Haltung von Puten und Hühnern. Besondere Beachtung im Projekt findet dabei die mögliche Verschleppung viraler Erreger zwischen zeitlich aufeinanderfolgenden Produktionsdurchläufen im Rein-Raus-System. Die erhobenen Diagnostikdaten ermöglichen erstmals eine Risikoanalyse zum Vorkommen viraler Erreger im Bestand nach Reinigung und Desinfektion und deren Übertragung auf die nachfolgenden Herden. Anhand der Daten soll festgestellt werden, ob mögliche Stellschrauben vorhanden sind und gegebenenfalls Maßnahmen für die Verbesserung des Reinigungs- und Desinfektionsprozesses (R&D) erörtert und zukunftssträchtige Alternativen diskutiert werden können. Zusätzlich kann der Einfluss viraler Infektionen auf Erkrankungen der Tiere in den ersten Lebenswochen besser beurteilt werden. Der Stellenwert des Einflusses dieser Erreger auf das Antibiotikaminimierungskonzept soll erhoben werden. Die Erkenntnisse dieses Projektes können eine Grundlage für weiterführende Interventionsmaßnahmen und Forschungsansätze zur Antibiotikaminimierung in Geflügelbeständen bilden.

Voraussetzungen, Planung und Ablauf des Vorhabens

Alle teilnehmenden Betriebe fahren ihre Anlagen im Rein-Raus-Prinzip. Um die Diversität der Geflügelhaltenden Betriebe im Projekt widerzuspiegeln wurden sowohl Legehennen-, Masthähnchen- als auch Mastputenhaltende Betriebe kontaktiert. Zur Aufklärung wurde den betreuenden Tierärzten umfassendes Informationsmaterial ausgehändigt und Probenmaterial bereitgestellt (Abbildung 1).

In die Studie wurden insgesamt zwölf Stallungen aus neun Betrieben aufgenommen. Zur Anonymisierung wurde den Betrieben jeweils eine QS-Kennung zugeordnet. (Tabelle 1).

Tabelle 1: Kenngrößen der teilnehmenden Betriebe

Tierart	Tierzahl/Stall	Haltung	QS-Kennung
Legehennen	6.000	Volierenhaltung	QS1
Legehennen	2.800	Volierenhaltung	QS2
Legehennen	10.500	Bio/Freiland	QS3
Legehennen	3x 33.000	Volierenhaltung	QS4 I+II+III
Mastputen	15.000	Stallhaltung	QS5
Mastputen	2x 20.000	Stallhaltung	QS6 I + II
Masthähnchen	40.000	Stallhaltung	QS7
Masthähnchen	50.000	Stallhaltung	QS8
Masthähnchen	46.200	Stallhaltung	QS9

Für die Erkennung von Infektionsketten wurden zwei aufeinanderfolgende Durchläufe innerhalb eines Betriebes beprobt. Zusätzlich fand eine Desinfektionsmittelkontrolle auf virale Erreger statt. Im Detail ergaben sich daraus vier Beprobungszeitpunkte (ZP1-4) pro Stall:

- *Beprobung der Tiere des ersten Durchlaufes kurz vor der Ausstallung (ZP1)*
 - *R&D-Kontrolle (ZP2)*
 - *Beprobung des 2. Durchlaufes am Tag der Einstallung (ZP3)*
 - *Beprobung des 2. Durchlaufes nach 2-4 Wochen (ZP4)*

Zu jedem Zeitpunkt wurden von 15 Tieren der Herde Rachen-/Kloakentupfer entnommen. Dieser Stichprobenumfang garantiert eine 95%ige Sicherheit mindestens ein krankes Tier zu erfassen, wenn der Anteil infizierter Tiere in der Herde bei größer/gleich 20% liegt. Bei Vorliegen eines Bestandsproblems ist davon auszugehen, dass dieser Mindestwert an Durchseuchung erreicht wird. Nach R&D wurden Tupferproben in den Ställen sowie von den Gerätschaften, den Tränke- und Futtereinrichtungen und der Mitarbeiterbekleidung genommen.

Das Probenmaterial wurde anschließend auf eine Auswahl viraler Erreger mittels (RT)-PCR untersucht. (Tabelle 2).

Tabelle 2: Virale Erreger und ihr assoziiertes Krankheitsbild in Puten- und Hühnerbeständen

Erreger	Tierspezies	Tenazität	Krankheitsbild
Adenoviren	Huhn, Pute	hoch	Einschlusskörperchen-Hepatitis, HE der Pute
Aviäre Astroviren	Huhn, Pute	hoch	Nephritis, Durchfall, PEMS, RSS
Aviäre Rotaviren Gruppe A und D	Huhn, Pute	hoch	Durchfall, PEMS
Caliciviren	Huhn	hoch	Verdacht der Beteiligung RSS
Circoviren/Anelloviren	Huhn, Pute	hoch	Anämie
Herpesviren	Huhn	gering	Infektiöse Laryngotracheitis
Aviäre Coronaviren	Huhn/Pute	gering	Respiratorische Erkrankung, Nephritis– Nephrose–Syndrom, Entzündung des Legedarms, Durchfall
Pneumoviren/ Metapneumoviren	Huhn, Pute	gering	Respiratorische Erkrankung (TRT, SHS)
Orthoreoviren	Huhn, Pute	hoch	Tendovaginitis, Malabsorbtionssyndrom, PEMS

Abkürzungen: PEMS – Poult Enteritis & Mortality Syndrom, RSS – Runting-Stunting-Syndrom, TRT – Turkey Rhinotracheitis, SHS – Swollen head syndrom, HE – Hämorrhagische Enteritis

Mittels Sanger-Sequenzierung der aus den Proben generierten PCR-Produkte konnten die Sequenzhomologien und damit die Verwandtschaft der nachgewiesenen Erreger untereinander untersucht werden. Dies ermöglicht eine Aussage über das Vorliegen von Infektionsketten innerhalb eines Betriebes. Sequenzüberlagerungen können bei Vorhandensein verschiedener Stämme innerhalb einer Probe auftreten (Abbildung 1 links) und erfordern das Aufschlüsseln der einzelnen DNA-Fragmente der enthaltenen Erreger. Zur Isolation und Vervielfältigung der verschiedenen DNA-Fragmente wurde daher in diesen Fällen eine Klonierung und Vervielfältigung im Bakterium *Escherichia coli* durchgeführt (Abbildung 1 rechts). Je Klonierung wurden 10 Kolonien mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein eines erregerspezifischen DNA-Fragmentes untersucht und gegebenenfalls sequenziert. Dieses Verfahren gewährleistet die Auswertbarkeit der Sequenzierungen durch die Vereinzelung der ansonsten überlagerten PCR-Fragmente.

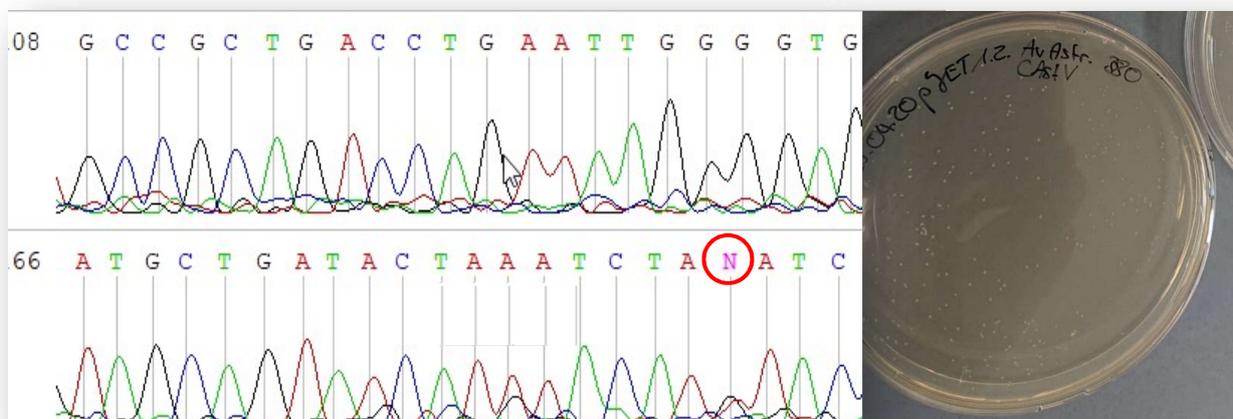


Abbildung 1: Sequenzchromatogramm und Klonierungsplatte bei mehrfach infizierten Proben. Sequenzüberlagerungen sind zu erkennen (links, roter Kreis). Über die Klonierung der RT-PCR Produkte und anschließender Sequenzierung eines Einzelklons können die Sequenzanalysen vertieft werden.

Im Projekt kamen geflockte Tupfer aus synthetischem Material zum Einsatz. Zur Verbesserung der Präanalytik wurden die Umgebungstupfer mit *Viral Transport Medium* versetzt.

Zusammenarbeit/Kooperationen (falls vorhanden)

Im Rahmen des Projektes wurde eng mit insgesamt vier Tierarztpraxen zusammengearbeitet. Sie waren für die Probenentnahme und die Übermittlung aller produktionsrelevanten Daten zuständig. Die Analyse der Proben und die wissenschaftliche Aufarbeitung oblagen hingegen allein dem Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig.

Ergebnisse

Vorkommen viraler Infektionen in den einzelnen Nutzungsrichtungen

Die Nachweishäufigkeiten der im Projekt untersuchten Viren waren divers. So konnten in 87,5% der Herden Astroviren nachgewiesen werden, während Herpes- und Circoviren in keinem der Bestände detektiert wurden. Weiterhin ergaben sich in den Beständen Prävalenzen von 50% für Adenoviren, 16.6% für Caliciviren, Rotaviren der Gruppe D, Orthoreoviren und Pneumoviren, 25% für Rotaviren der Gruppe A und 75% für Coronaviren. Spezifische Untersuchungen zur Unterscheidung von Impf- und Feldviren wurden für die Coronaviren der Hühner und die Adenoviren der Puten durchgeführt. In den Hühnerbeständen wiesen die Coronaviren in allen konventionellen Legehennen-Betrieben die höchste Homologie zu Impfviren auf. In einem Bio-Legehennen-Betrieb und in zwei der drei Masthähnchen-Betriebe konnten neben den Impfviren ein oder im Falle des Bio-Betriebes sogar mehrere verschiedene Feldviren nachgewiesen werden.

In dem Mastputenstall QS6 II konnten neben einem Adenovirus-Impfstamm drei weiteren Feldviren nachgewiesen werden. Die Vereinzelung der Adenovirus-DNA-Fragmente erfolgte eine Klonierung und Vervielfältigung im Bakterium *Escherichia coli*.

Einzelne Virusspezies wurden ausschließlich in bestimmten Nutzungsrichtungen diagnostiziert. So sind Rotaviren der Gruppe D ausschließlich in den Masthähnchen-Beständen und Pneumoviren nur in den Mastputen-Beständen nachgewiesen worden. Eine genaue Darstellung der Prävalenzdaten für die verschiedenen Viren in den einzelnen Herden eingeteilt nach der Nutzungsrichtung zeigt die Abbildung 2.

In den Tupfern von den Tieren, die am Tag der Einstellung 0 Tage alt waren, wurde in fünf von sieben Fällen Adeno-, Astro- und/oder Pneumoviren nachgewiesen. In allen Fällen erfolgte die Einstellung bereits geschlüpfter Küken. Lediglich in der Herde des QS7 schlüpften die Küken direkt im Stall. Dort und im Bestand QS9 konnten keine der untersuchten Viren nachgewiesen werden.

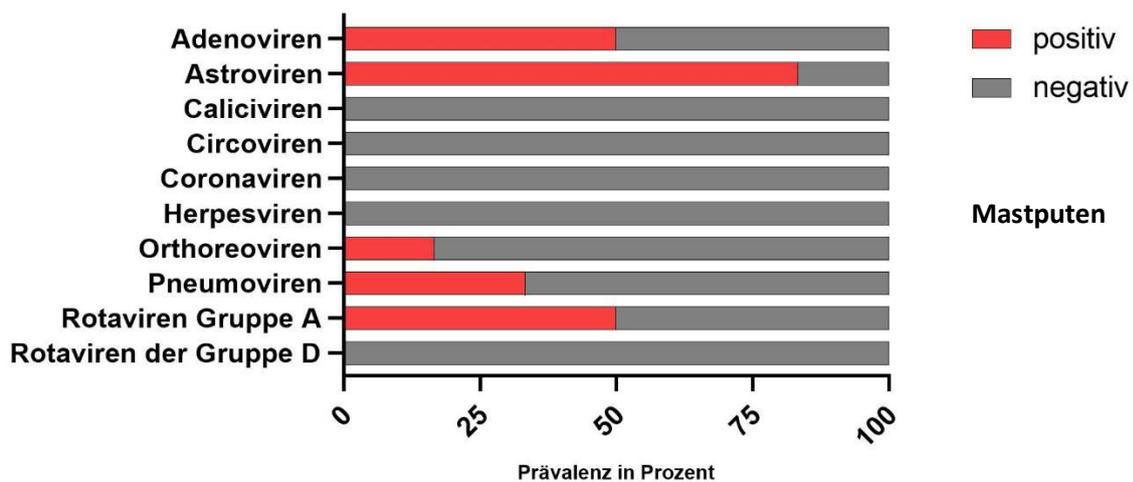
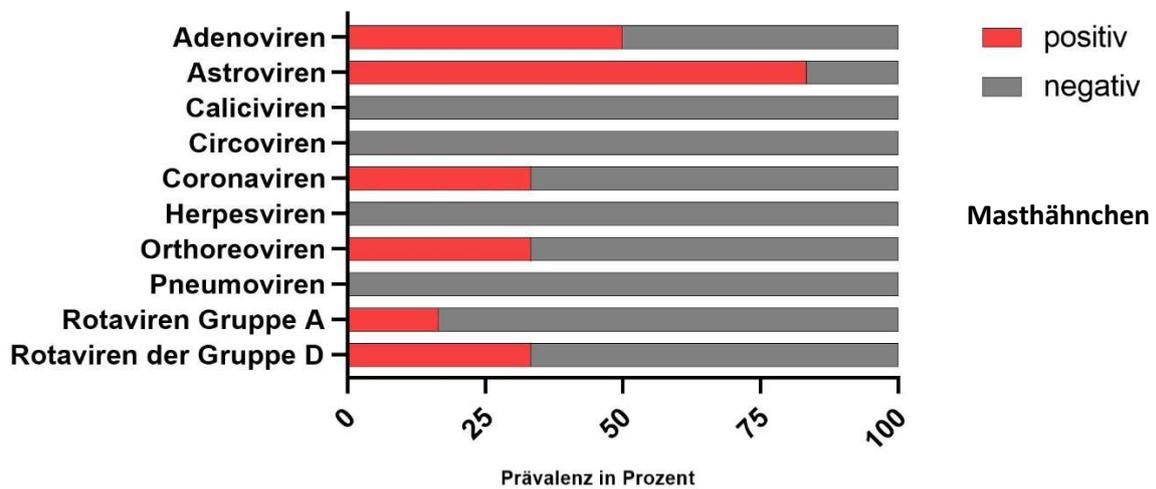
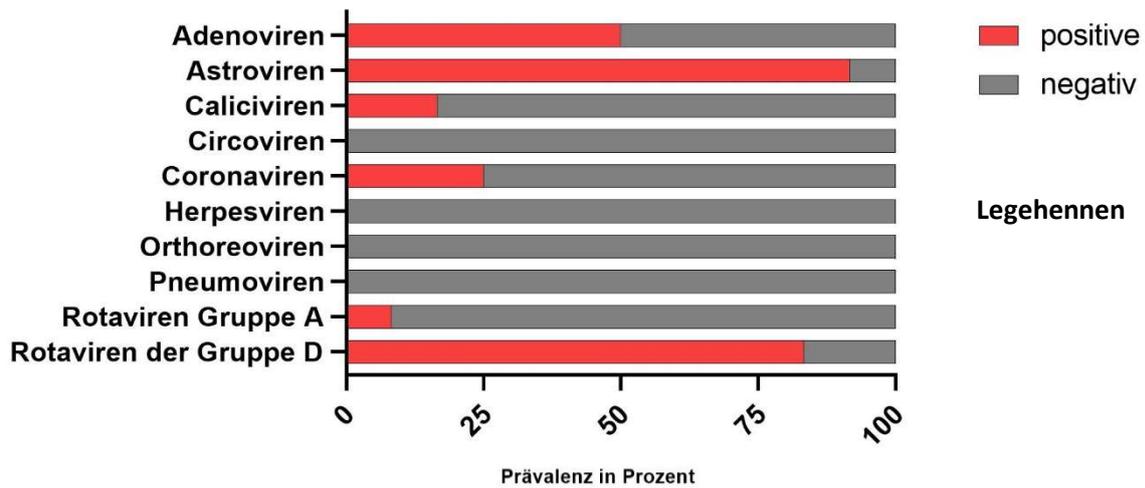


Abbildung 2: Prävalenz verschiedener Viren in den Herden unterschiedlicher Nutzungsrichtungen. Rot dargestellt ist der Anteil positiver Herden im Vergleich zu der in grau dargestellten prozentualen Anteil negativer Herden.

Nachweis von viralen Erregern nach Reinigung und Desinfektion

Eine unzureichende Desinfektion liegt vor allem bei beweglichen Gerätschaften (Tablett, Kehrschaufel) oder frei im Raum befindlichen bzw. erhöhten Stallanbauten (Wärmetauscher, Tränken, Seilwicklungen, Lüftungsanlagen etc.) vor. An der Mitarbeiterkleidung konnten in keinem Fall Erreger nachgewiesen werden. Alle teilnehmenden Betriebe verwendeten geeignete und DVG-Mittel gelistete Desinfektionsmittel. Laut Angaben erfolgte eine vorschriftsmäßige Anwendung, sodass eine ausreichend viruzide Wirkung auch bei unbehüllten Viren zu erwarten war. Verwendet wurden Desinfektionsmittel auf der Basis von Säuren, quartären Ammoniumverbindungen und Formaldehyden. Nach Reinigung und Desinfektion (R&D) wurden in acht von zwölf Stallungen verschiedene Viren mittels molekularbiologischen Nachweises detektiert. In der Tabelle 3 sind Informationen zu den nachgewiesenen Viren sowie der Lokalisation des Nachweises zusammengefasst.

Zusätzlich zu den Stallproben konnten von vier Anlieferungsanhängern sowie den Transportkisten Proben entnommen werden. Dabei entsprachen die Nachweise in zwei Anhängern den in der zugehörigen Herde verbreiteten Viren. In dem Anhänger und den Transportboxen des QS2-Betriebes wurde ein Feldvirus der Infektiösen Bronchitis und im Betrieb QS1 ein Entencircovirus festgestellt. Beide Erreger fanden sich nicht in den transportierten Herden wieder.

Tabelle 3: Orte des Virusnachweises nach den R&D-Maßnahmen

Betrieb	Virus	Lokalität
QS 2	Adenoviren	Lüfterklappe
QS4-I	Adenoviren	Fußboden, Lüfterklappe vorn
	Astroviren	Lüfterklappe links
QS5	Astroviren	Futternäpfe, Zuluftklappen auf beiden Seiten des Stalles, Lüftung Abluft
QS6 I	Astroviren	Futternäpfe
QS6 II	Astroviren	Futter- und Tränkvorrichtung, Fußboden
QS7	Astroviren	Wärmetauscher, Kehrschaufel, Tablett Futtevorrichtung
QS8	Astroviren	Abfluss Vorraum
QS9	Orthoreoviren	Fußboden, Zuluftkasten, Elektrokasten, Kabel der Heizkanone, Airmaster, Umlüfter, Wasserzufuhr
	Rotaviren der Gruppe D	Elektrokasten, Kabel der Heizkanone

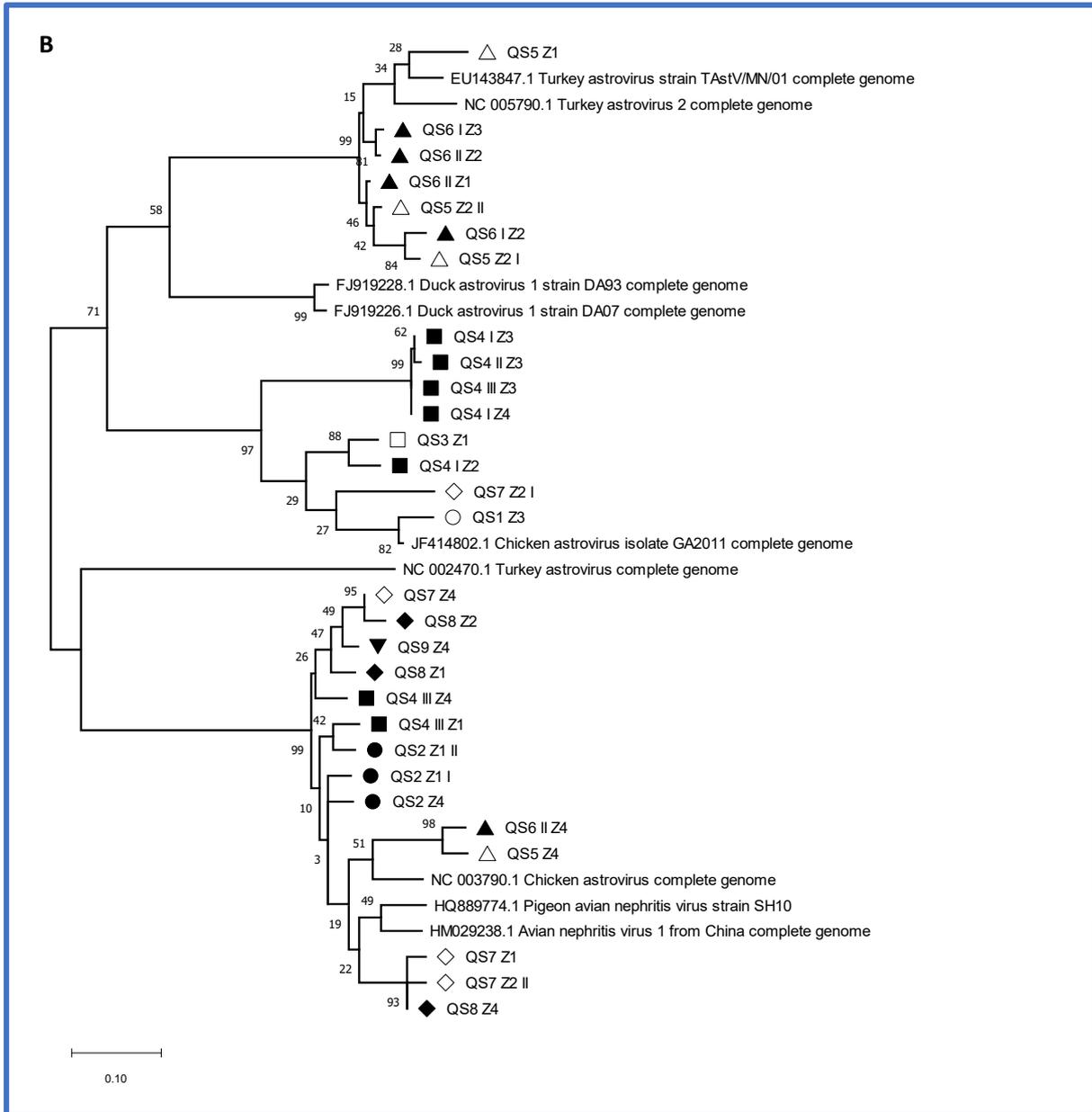


Abb. 3: Phylogenetische Beziehung der aviären Adenoviren (A) und der Avastroviren (B). Die Nukleotidsequenzen des jeweiligen Polymerasegens der im Projekt nachgewiesenen Adenoviren und Avastroviren wurden mit ClustalW2 in 202 bzw. 273 Basenpaaren (bp) miteinander verglichen („aligned“), und die Phylogenie wurde mit der "maximum likelihood"- bzw. „neighbor joining“ Methode und 1.000 Bootstrap-Wiederholungen berechnet. Die rot markierten Sequenzen in A kennzeichnet Sequenzen mit 100% Homologie innerhalb eines Bestandes. Sequenzen mit einer Länge von weniger als 200 bp wurden von der Analyse ausgeschlossen

Virale Infektionen und Antibiotikaeinsatz

Ein Antibiotikaeinsatz erfolgte ausschließlich in Mastputen- und Masthähnchen-Betrieben, jedoch nicht in den Legehennen-Herden. Zum Einsatz kamen in den Mastputen-Beständen Antibiotika der Wirkstoffklasse der Betalaktame. In den Masthähnchenbetrieben wurden zusätzlich Antibiotika aus der Gruppe der Aminoglykoside, Polymyxine und Lincosamide eingesetzt. Die Verwendung konzentrieren sich im Wesentlichen auf zwei Zeitpunkte, nämlich die 1. Lebenswoche bzw. kurz nach der Einstellung und kurz vor der Umstallung bzw. Schlachtung. Der Einsatz von beta-Laktam-Antibiotika korreliert mit dem Auftreten von katarrhalischen Enteritiden, während bei den systemischen Infektionen in den ersten Lebenswochen Antibiotika der anderen genannten Gruppen zum Einsatz kamen.

In den Beständen QS5 und QS9 wurde die zweite antibiotischen Behandlung aufgrund von katarrhalischen Enteritiden verabreicht. In diesen Fällen sind Nachweise von Rotaviren der Gruppe A und/oder D bzw. Nachweise von Orthoreoviren erbracht worden.

Bei dem Ausbruch einer hämorrhagischen Enteritis im Betrieb QS6 I und II direkt zum Zeitpunkt der Einstellung kamen ebenfalls Betalaktam-Antibiotika zum Einsatz. Trotz der antibiotischen Behandlung beider Herden fiel Stall II mit erhöhten Mortalitätsraten auf. In beiden Ställen konnten am Tag 0 Impfstämme von Adenoviren nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden in Stall II mehrere Feldstämme von Adenoviren nachgewiesen und zu einem späteren Zeitpunkt Rotaviren und der Gruppe A und Orthoreoviren. Aus der Abbildung 3 ist eine Aufstellung der gesamten Virusnachweise mit oder ohne antibiotische Behandlung zu entnehmen.

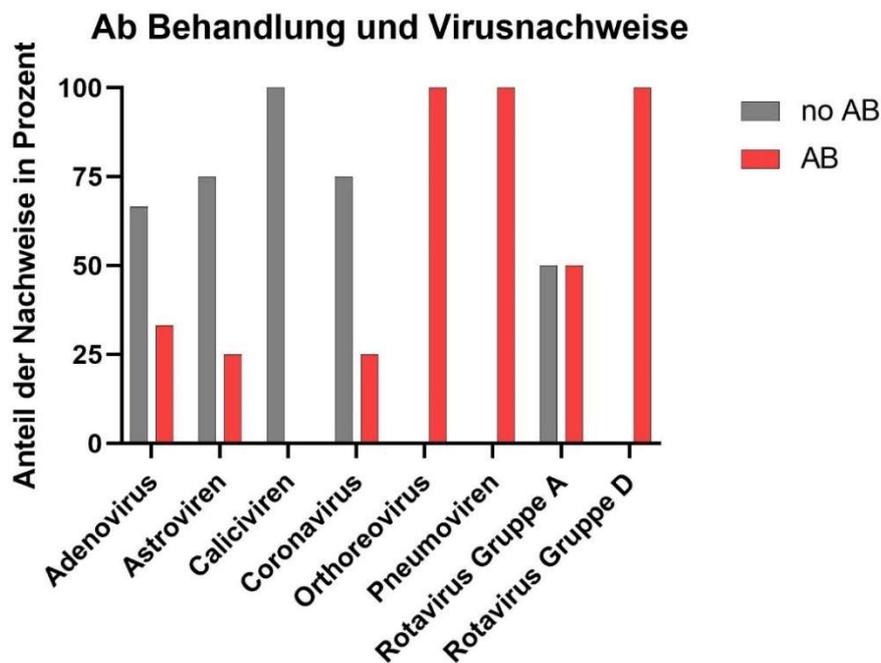


Abbildung 3: Darstellung der Virusnachweise, die während einer antibiotischen Behandlung (AB) nachgewiesen worden und währenddessen keine Behandlung stattgefunden hat (no AB) in Prozent.

Die Mortalität in den Legehennen-Betrieben unterschied sich deutlich von denen der Mastherden und lag im Beobachtungszeitraum in etwa um das zehnfache niedriger. Die Tiere der Legehennen-Betriebe waren über den Beobachtungszeitraum klinisch unauffällig und es erfolgte kein antibiotischer Medikamenteneinsatz. Die Nachweisraten von Astroviren, Adenoviren und Coronaviren ähnelten denen in den Masthähnchenherden. Im Unterschied dazu wurden Rotaviren der Gruppe D und Orthoreoviren ausschließlich in Masthähnchen- bzw. Mastputen- und Masthähnchen-Betrieben nachgewiesen.

Auswertung der Erhebungsbögen

In den Begleitscheinen zu den Proben wurden Informationen zum Stallaufbau, zur Haltungsart, zu Herdengröße und -alter, zum Personal- und Hygienemanagement und zur Futter- und Wasserversorgung erhoben.

Die Angaben wurden im Gesamtkontext ausgewertet, um Risikofaktoren für einen Verbleib/Eintrag von viralen Erregern nach R&D, für die Mortalitätsraten, für einen antibiotischen Einsatz in den Herden und für das Auftreten von bestimmten Erregern zu definieren. Zusammenhänge zwischen einer höheren Mortalitätsrate und dem Antibiotikaeinsatz zu der Mastgeflügel-Nutzungsrichtung sind herstellbar. Diese Zusammenhänge sind allerdings nicht auf die Belüftungsart des Stalles, die Einstreu, das Futter- und Wasserregime, das Personalmanagement (wie viele Mitarbeiter betreuen einen Stall und werden mehrere Altersgruppen/Geflügelspezies betreut), das Gerätemanagement, die Wasserversorgung, die Größe der Herde, die verwendeten Desinfektionsmittel, das R&D Verfahren oder die Leerstandzeit zurück zu führen.

Diskussion

Das Monitoring der im Projekt einbezogenen Herden zeigte eine niedrige Prävalenz von Rotaviren und Orthoreoviren. Der Nachweis dieser Viren scheint jedoch mit einer Klinik im Zusammenhang zu stehen und einen vermehrten Einsatz von Antibiotika zur Folge zu haben. In Betrieb QS9 ist der Nachweis der Rotaviren in der neu eingestellten Herde nach 4 Wochen auf einen direkten Übertrag der Erreger zwischen den Produktionsdurchläufen zurück zu führen. Die Zusatzinformationen zu den R&D Tupfern in diesem Betrieb lassen auf eine unzureichende Reinigung schließen, da von Schmutzresten berichtet wird. Zudem konnten Rotaviren im Stall nach R&D nachgewiesen werden. Auch im Betrieb QS5 erfolgte kurz vor der nachweislichen Durchseuchung mit Rotaviren eine zweite antibiotische Behandlung. Hier erscheint ein lokaler Eintrag von anderen Herden/Altersgruppen am wahrscheinlichsten. Betrachtet man die molekularbiologische Nachweisrate von Viren nach R&D und die Sequenzhomologien der Virusnachweise zwischen den Beständen so scheint der direkte Übertrag von zwei aufeinander folgenden Herden im Infektionsgeschehen einer Herde also nur in Einzelfällen, wie dem des QS9-Bestandes, von Bedeutung zu sein. Die im Projekt verwendeten Desinfektionsmittel sind dazu in der Lage sowohl behüllte als auch nicht behüllte infektiöse virale Erreger zu inaktivieren. Die Untersuchungen nach R&D sprechen allerdings

dafür, dass frei im Raum montierte Gegenstände, bewegliche Gegenstände und die Lüftungseinrichtungen nicht genügend vom R&D-Verfahren erfasst werden und eine Infektionsquelle darstellen können. In den Ställen QS1 und QS8 sind die Stämme der zwei aufeinanderfolgenden Herden identisch, sodass hier ein Übertrag des Erregers innerhalb des Stalles angenommen werden kann, jedoch kein kontaminierter Gegenstand nach R&D identifiziert werden konnte. Eine Sensibilisierung der Stallmanager auf die Notwendigkeit der gezielten Desinfektion von frei im Raum montierten Gegenständen, beweglichen Gegenständen und den Lüftungseinrichtungen könnte diesen Risikofaktor für die Verschleppung der Erreger zwischen den Herden reduzieren. Um statistisch signifikante Datensätze zu erheben, ist die Ausweitung der Untersuchungen auf weitere Betriebe vorgesehen. Sollten sich die Erkenntnisse dieses Projektes erhärten, so hat im Falle der Rota- und Orthoreoviren die Stallhygiene mit R&D und die Standorthygiene einen hohen Einfluss auf den Eintrag dieser Erreger und damit auch auf den Antibiotikaeinsatz.

Die hohe Prävalenz von Astro- und Adenoviren ist in dieser Studie nicht eindeutig mit einem klinischen Bild oder einem Antibiotikaeinsatz zu verbinden. Die Bedeutung im Antibiotikaminimierungskonzept beider Virusspezies lässt sich nur durch weiterführende Untersuchungen bestimmen, da mit der starken Diversität der Astro- und Adenoviren verschiedene pathogenetischen Eigenschaften einhergehen. Auch die Suszeptibilität der Tiere für eine Erkrankung durch die Infektion mit Viren ist je nach Nutzungsrichtung, Alter und Tierart verschieden (19). So zeigt das Beispiel in QS6 II, dass bestimmte Adenoviren Einfluss auf die Klinik und damit auf den Medikamenteneinsatz haben können.

In der Mehrzahl der Betriebe zeigen die Sequenzanalysen ein Vorliegen verschiedener Virusstämme in aufeinanderfolgenden Herden an. Dies spricht für weitere Eintragsquellen. So lassen die Untersuchungen der beprobten Transportfahrzeuge auf virale Kontaminationen der Fahrzeuge schließen. Ein Eintrag während des Transportes in die Herden kann nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der zentralisierten Geflügel-Elternzuchten werden die Tiere teilweise über weite Strecken transportiert, sodass ein aerogener Eintrag auf dem Transport stattfinden kann. Gleichzeitig sind auch unzureichend gereinigt und desinfizierte Transportfahrzeug und Boxen eine mögliche Erklärung für die im Projekt an den Fahrzeugen nachgewiesenen Viren. In keinem der beiden beschriebenen Fälle, hat nachweislich ein Übertrag in die Herde stattgefunden, sodass die Bedeutung dieses Infektionsweges offenbleibt.

Astroviren, Adenoviren und Metapneumoviren konnten in drei von den insgesamt fünf Betrieben in denen die Tiere am 0./1. Lebenstag eingestallt wurden, nachgewiesen werden. Aviäre Astroviren werden sowohl horizontal als auch vertikal übertragen. In der Literatur ist beschrieben, dass bestimmte Subspezies der Astroviren, die Aviären Nephritis Viren und die Chicken Astroviren vermehrt bei der vertikalen Übertragung detektiert werden (12, 13). Auch im vorliegenden Projekt wurde in den 0./1. Tag Tieren aviäre Astroviren nachgewiesen, die sich zu den Chicken Astroviren gruppieren. Auffällig war hier auch, dass die Viren bei gleicher Bezugsquelle der Tiere identische Virusstämme aufwiesen. Dieser Fakt unterstützt die These einer bereits in der Brüterei stattgefundenen Infektion. Auch Adenoviren und Metapneumoviren

können vertikal übertragen werden (14, 15), sodass der Eintrag über die Brütereien auch hier näher zu untersuchen ist.

Besonders an den Lüftungsklappen konnten neben den Herden-spezifischen Erregern auch Viren nachgewiesen werden, die weder in der ausgestalteten noch in der neu eingestellten Herde wiederzufinden waren. Dies spricht zum einen für eine ungenügende R&D und zum anderen für eine möglicherweise stattgefundenen Kontamination von außen. Nachgewiesen wurden Vertreter der aviären Adeno- und Astroviren. Die Verbreitung beider Virusspezies ist auch in wildlebenden Vögeln beschrieben (16, 17), sodass diese eine Infektionsquelle darstellen könnten. Die Lüftungsklappen sind nicht mit Filtersystemen kombiniert, sodass auch der Eintrag von aerogen übertragbaren Erregern nicht zu verhindern ist. Einige Herden wiesen neben den detektierten Impfviren der Infektiösen Bronchitis zusätzlich Feldviren auf. Die aerogene Übertragung von Herde zu Herde ist für diese Viren beschrieben (18). Das Risiko für einen Feldviruseintrag in den biologisch gehaltenen Herden erscheint besonders hoch. Ein Schutz der Tiere im Freilauf ist aktuell nicht möglich. Keine der Feldviren konnte jedoch mit einem Erkrankungsgeschehen oder einem Medikamenteneinsatz in Verbindung gebracht werden, sodass hier die prophylaktische Anwendung von regelmäßigen Impfungen als ausreichend wirksam erscheint.

Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es sind keine mit einem Fortschritt verbundenen Erkenntnisse zu dieser Thematik an anderer Stelle bekannt geworden.

Voraussichtlicher Nutzen (insbesondere wissenschaftliche und wirtschaftliche Verwertbarkeit der Forschungsergebnisse sowie Verwertungsstrategie)

Im Rahmen eines Verbundprojektes sollen die in diesem Projekt erhobenen Erkenntnisse durch einen größeren Datensatz ergänzt werden. Ziel ist es, das Verständnis der multifaktoriellen Zusammenhänge des Infektionsgeschehens in Geflügelherden durch eine methodische Erweiterung des Projektes um Sequenzieranalysen der nächsten Generation „next generation sequencing (NGS)“, Studien an primären in vitro Zellmodellen (Organoid) und die Ausdehnung der Diagnostik auf bakterielle und parasitologische Erreger zu erreichen. Die im Projekt erhobenen Daten geben bereits wichtige Hinweise über die Bedeutung einzelner Viren. Auf diesen Erkenntnissen wird aufgebaut.

Im Projekt konnte ein Zusammenhang zwischen Rotavirus- und Orthoreovirusinfektionen und dem Antibiotikaeinsatz aufgezeigt werden. Da der Datenpool jedoch begrenzt ist, soll diese These mit oben beschriebenen Projekt weiter untersucht werden. Sollte sich die Bedeutung der Rotavirus- und Orthoreovirusinfektionen im Antibiotikaeinsatz erhärten, ist ein wichtiger

Faktor für die Stagnation der Minimierung des Antibiotikaeinsatzes in der Geflügelhaltung identifiziert. Damit würde die Chance bestehen zielgerichtete Präventionsmaßnahmen zu ergreifen. Beispielsweise könnte die Entwicklung einer Rotavirusvakzine für den Wirtschaftsgeflügel die Gesundheit der Tiere fördern und wäre dann sowohl aus wirtschaftlichen und auch aus gesundheitlichen Aspekten zu forcieren.

Des Weiteren konnte im Projekt aufgezeigt werden, dass es im Stall Bauteile gibt die einer gesonderten R&D zugeführt werden müssten, um die R&D effektiv zu gestalten. Eine Sensibilisierung der Herdenmanager für diese kritischen Bauteile könnte in Zukunft in allgemeine Handlungsempfehlungen aufgenommen werden.

Es ist angestrebt die Daten vor allem praktischen Tierärzten in Form von Publikationen in weitverbreiteten Zeitschriften und mit einem Vortrag auf dem Leipziger Tierärztekongress zugänglich zu machen.

Liste aller Aktivitäten der Öffentlichkeitsarbeit (Veranstaltungen, Pressemitteilungen usw.) zum Projekt

Die gewährte Förderung durch den QS-Wissenschaftsfond wurde auf der Homepage des Instituts für Virologie und der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig dargestellt.

Eine Präsentation der Ergebnisse auf dem 11. Leipziger Tierärztekongress (LTK) im Januar 2022 ist vorgesehen. Das Manuskript wurde für einen mündlichen Vortrag im Bereich „Nutzgeflügel“ ausgewählt.

Eine Weiterführung und Erweiterung des Projektes in Kooperation mit mehreren Forschungseinrichtungen und Industriepartnern unter Förderung des BMEL wird angestrebt. Eine erste Projektskizze wurde bereits eingereicht.

Erklärung zur Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Der Mittelabruf erfolgte in zwei Etappen. Ausgaben, Ablauf und Zeitraum des Projektes liegen innerhalb des vorgegebenen Rahmens. Die Anzahl der in die Studie geplanten Ställe ist auf Wunsch des QS-Gremiums um zwei Ställe erweitert worden.

Quellen:

- 1 BMEL: Bericht des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft über die Evaluierung des Antibiotikaminimierungskonzepts der 16. AMG-Novelle. Bonn 2019
- 2 Stellungnahme zum Evaluierungsbericht zum Antibiotikaminimierungskonzept der 16. Arzneimittelgesetz-Novelle, QS
- 3 MuD-Tierschutz - Layer-HACCP Konzept
- 4 BMEL-Praxisberichte - EsRam - Antibiotikaresistente Erreger bei Mastgeflügel reduzieren
- 5 Boamah, V. E., Agyare, C., Odoi, H., Dalsgaard, A. (2016). Practices and factors influencing the use of antibiotics in selected poultry farms in Ghana.
- 6 Choi, Young Ki, Sagar M. Goyal, Han Soo Joo. "Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs." *The Canadian veterinary journal* 44.9 (2003)
- 7 Brogden, Kim A. "Polymicrobial diseases of animals and humans." Polymicrobial diseases. ASM press, 2002.
- 8 Marien, M., Decostere, A., Martel, A., Chiers, K., Froyman, R. auwynck, H., 2005. Synergy between avian pneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Avian pathology*, 34(3), pp.204-211.
- 9 Hoerr, F.J., 2010. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian diseases*, 54(1), pp.2-15.
- 10 Nolan, L. K., Barnes, H. J., Vaillancourt, J. P., Abdul-Aziz, T., & Logue, C. M. (2013). Colibacillosis. *Diseases of poultry*, 751-805.
- 11 Singer, R. S., & Hofacre, C. L. (2006). Potential impacts of antibiotic use in poultry production. *Avian diseases*, 50(2), 161-172.
- 12 Connor TJ, McNeilly F, McFerran JB, McNulty MS. A survey of avian sera from Northern Ireland for antibody to avian nephritis virus. *Avian Pathol.* 1987;16:15–20.;
- 13 Pantin-Jackwood, M., Todd, D., & Koci, M. D. (2012). Avian astroviruses. In *Astrovirus Research* (pp. 151-180). Springer, New York, NY.
- 14 Grgic, H., Philippe, C., Ojkic, D., & Nagy, É. (2006). Study of vertical transmission of fowl adenoviruses. *Canadian journal of veterinary research*, 70(3), 230.
- 15 Kaboudi, K., & Lachheb, J. (2021). Avian metapneumovirus infection in turkeys: a review on turkey rhinotracheitis. *Journal of Applied Poultry Research*, 100211.
- 16 Fitzgerald, S. D., Rautenschlein, S., Mahsoub, H. M., Pierson, F. W., Reed, W. M., & Jack, S. W. (2020). Adenovirus infections. *Diseases of poultry*, 321-363.
- 17 Donato, C., & Vijaykrishna, D. (2017). The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian astroviruses. *Viruses*, 9(5), 102.
- 18 Cavanagh, D., & Naqi, S. (2003). Infectious bronchitis. *Diseases of poultry*, 11, 101-119.
- 19 Hankel, J., Jung, K., Kuder, H., Keller, B., Keller, C., Galvez, E., ... & Visscher, C. (2019). Caecal microbiota of experimentally *Campylobacter jejuni*-infected chickens at different ages. *Frontiers in microbiology*, 10, 2303.