

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zu ausgewählten Aviadenovirusisolaten von Broilern und  
Puten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Anne Kleine  
Tierärztin  
aus Mönchengladbach

Berlin 2021  
Journal-Nr.: 4286

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
**Erster Gutachter:** Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez  
**Zweiter Gutachter:** Prof. Dr. Benedikt Kaufer  
**Dritter Gutachter:** Prof. Dr. Timm Harder

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):* fowl aviadenovirus a, broilers, turkeys,  
immunofluorescence, polymerase chain reaction, restriction endonuclease analysis

Tag der Promotion: 04.05.2021

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1. Morphologie, Genom und Klassifikation	3
2.2. Besonderheiten zu ausgewählten Aviadenoviren	7
2.2.1. Fowl aviadenovirus A Serotyp 1 (FAdV-1) als ätiologische Ursache der Muskelmagenerosionen	7
2.2.2. Putenaviadenoviren	9
2.3. Epidemiologie und Übertragung	9
2.4. Klinik und Pathologie	11
2.5. Labordiagnostik	16
2.5.1. Virusisolierung in Zellkulturen	16
2.5.2. Virusisolierung im embryonierten Hühnerei	17
2.5.3. Detektion und Typisierung	17
2.5.4. Serologische Untersuchungen	17
2.5.5. Molekularer Nachweis	18
2.6. Bekämpfung	20
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1. Material	21
3.1.1. Virusisolate	21
3.1.2. Verwendete Referenzstämme	26
3.1.3. Antiserum	26
3.1.4. Referenzdaten für die Sequenzanalyse	26
3.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien	30
3.1.6. Reagenzien und Kits	31
3.1.7. Lösungen und Medien	32
3.1.7.1. Lösungen und Medien für die virologischen Untersuchungen	32
3.1.7.2. Lösungen und Medien für die molekularbiologischen Untersuchungen	33
3.1.8. Programme und Software	34
3.2. Methoden	34
3.2.1. Isolierung und virologische Methoden	34
3.2.1.1. Virusisolierung und Virusvermehrung	34
3.2.1.2. Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	36
3.2.1.3. Virustitration	37
3.2.2. Molekularbiologische Untersuchungen	38

## Inhaltsverzeichnis

3.2.2.1. DNA-Extraktion .....	38
3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.2.2.3. Gelelektrophorese.....	43
3.2.2.4. Restriktionsenzymanalyse (REA).....	43
3.2.2.5. Gelextraktion und Sequenzierung.....	44
3.2.2.6. Sequenzanalyse und phylogenetische Untersuchungen.....	45
3.2.3. Embryoletalitäts-Assay.....	46
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
4.1. Auswertung der Ergebnisse der Virusisolierung und des indirekten Immunfluoreszenztests.....	48
4.2. Charakterisierung der Broilerisolate.....	51
4.2.1. Molekularbiologische Untersuchungen.....	51
4.2.1.1. Untersuchungen einer partiellen Hexongenregion.....	51
4.2.1.1.1. Amplifikation und Sequenzierung der partiellen Hexongenregion.....	51
4.2.1.2. Phylogenetische Untersuchungen einer partiellen Hexongenregion.....	53
4.2.1.3. Untersuchungen der partiellen Long- und Short-Fibergene.....	57
4.2.1.3.1. Amplifikation der Fibergene.....	57
4.2.1.3.2. Restriktionsenzymanalyse der Fiber-Amplifikate.....	57
4.2.1.3.3. Sequenzanalyse der Fibergene.....	58
4.2.1.4. Embryoletalitäts-Assay (ELA).....	66
4.3. Charakterisierung der Putenisolate.....	77
4.3.1. Untersuchung einer partiellen Hexongenregion.....	77
4.3.2. Untersuchung des partiellen DNA-Polymerasegens.....	81
4.3.2.1. Amplifikation des partiellen DNA-Polymerasegens.....	81
4.3.2.2. Sequenz- und phylogenetische Analyse des partiellen DNA-Polymerasegens..	82
4.3.3. Zusammenfassende Analyse der Vorberichte.....	85
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>87</b>
5.1. Broilerisolate.....	87
5.2. Putenisolate.....	93
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>101</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>124</b>
<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>125</b>

Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung.....</b>	<b>127</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>128</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung der FAdV im Vergleich zwischen Europa, den USA und nach dem International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). .....	5
Tabelle 2: Einteilung der Virusstämme im Vergleich zwischen Genotyp und Serotyp.....	6
Tabelle 3: Übersicht der symptomatischen und pathologischen Veränderungen aus Feldausbrüchen mit Muskelmagenerosionen.....	13
Tabelle 4: Überblick der beschriebenen molekularen Diagnostikmöglichkeiten zum Nachweis von Hühneraviadenoviren. ....	19
Tabelle 5: Feldisolate von Broilern und Puten aus den Jahren 2011 und 2012.....	22
Tabelle 6: Vergleichssequenzen für die Sequenzanalyse der untersuchten Gen-Loci.....	27
Tabelle 7: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	30
Tabelle 8: Medien, Reagenzien und Kits .....	31
Tabelle 9: verwendete Software.....	34
Tabelle 10: verwendete Zellsuspensionsvolumina in verschiedenen Zellkulturgefäßen.....	35
Tabelle 11: Inokulationsvolumen der jeweiligen Zellkulturgefäße .....	36
Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Primer.....	40
Tabelle 13: Temperaturprofile der eingesetzten PCR-Verfahren .....	42
Tabelle 14: Verwendete Restriktionsendonukleasen und ihre Spaltstellen.....	43
Tabelle 15: Übersicht der Versuchsgruppen .....	46
Tabelle 16: Ergebnis der positiven Virusisolierung aus Broilerproben.....	48
Tabelle 18: Ergebnisse der Typisierung der aus Broilerproben gewonnenen Aviadenovirusisolate mittels BLAST-Analyse.....	52
Tabelle 19: Ähnlichkeit der FAdV-A- Nukleotid- und Aminosäuresequenzen.....	56
Tabelle 20: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des partiellen Long-Fibergens der FAdV-A Broilerisolate mit den Referenzstämmen CELO und Ote sowie GenBank Vergleichssequenzen. ....	62
Tabelle 21: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des partiellen Short-Fibergens der FAdV-A Broilersolate. ....	65
Tabelle 24: verarbeitete Fälle für die Kaplan-Meier-Analyse der Untersuchung der Überlebenszeit in Abhängigkeit des inokulierten Virus.....	71
Tabelle 25: Verarbeitete Fälle für die Kaplan-Meier-Analyse der Untersuchung der Überlebenszeit in Abhängigkeit der Pathogenität des inokulierten Virus.....	73
Tabelle 26: Verarbeitete Fälle für die Kaplan-Meier-Analyse der Untersuchung der Überlebenszeit in Abhängigkeit der Inokulationsdosis.....	75
Tabelle 27: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der TAdV-B Isolate.....	79
Tabelle 28: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des TAdV-C-Clusters.....	79

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 29: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der FAdV-B und FAdV-E Isolate. ....	80
Tabelle 30: Ergebnis der DNA-Polymerase-PCR.....	81
Tabelle 31: Vergleich der DNA-Polymerase Aminosäure-Sequenzen.....	84

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung der äußeren Gestalt der Adenoviren... 3

Abbildung 2: Genuseinteilung der Adenoviridae..... 4

Abbildung 3: Adenoviren der Puten sind dem Genus Siadenovirus und Aviadenovirus zugeordnet..... 7

Abbildung 4: Beispiel eines Muskelmagens mit GE..... 12

Abbildung 6: Gruppenspezifischer indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Aviadenoviren..... 51

Abbildung 7: Maximum Likelihood Analyse der partiellen Hexongen-Aminosäuren-Sequenz (175 AS) der FAdV-A Broilerisolate ..... 55

Abbildung 8: Amplifikation des Long- und Short-Fibergens ..... 57

Abbildung 9: REA der Long-Fiber-Amplifikate..... 58

Abbildung 10: REA der Short Fiber-Amplifikate ..... 58

Abbildung 11: Schematische Darstellung der amplifizierten Teilfragmente (Long-Fiber1, -2 und -3) sowie der jeweils verwendeten Primer zur Sequenzierung des Long-Fibergens..... 59

Abbildung 12: Amplifikation des Long-Fibergens mittels der PCR Verfahren Long-Fiber1, Long-Fiber2 und Long-Fiber3 am Beispiel von CELO und Ote..... 59

Abbildung 13: Alignment der partiellen Aminosäuresequenzen der Long-Fiber..... 64

Abbildung 14: Alignment der partiellen Short-Fiber-Aminosäuresequenzen..... 66

Abbildung 15: Infizierte und abgestorbene Embryonen am 4. Tag p.i..... 69

Abbildung 16: Beobachtete Todeszeitpunkte in den einzelnen Versuchsgruppen A1 bis D3 als Boxplot-Diagramme dargestellt..... 70

Abbildung 17: Verteilung der beobachteten Todeszeitpunkte der Embryonen..... 71

Abbildung 18: Kaplan-Meier Kurven für die Überlebenszeit in Stunden der eingesetzten Broilerisolate/Referenzstämmen. .... 72

Abbildung 19: Verteilung der beobachteten Todeszeitpunkte in hpi. Vergleich zwischen Broilerisolaten (A1-B3) und Referenzstämmen (C1-D3)..... 73

Abbildung 20: Kaplan-Meier Kurven für die Überlebenszeit in Stunden der mit den Broilerisolaten (A1-B3) und Referenzstämmen (C1-D3) infizierten Embryonen..... 74

Abbildung 21: Verteilung der beobachteten Todeszeitpunkte. Vergleich zwischen drei Infektionsdosen (ID1, ID2, ID3)..... 75

Abbildung 22: Kaplan-Meier Kurven für die Überlebenszeit in Stunden in Abhängigkeit von der Infektionsdosis..... 76

Abbildung 23: Maximum Likelihood Analyse der partiellen Hexongen-Aminosäure-Sequenz (196 AS) der Putenaviadenovirusisolate..... 78

Abbildung 24: Ergebnis der DNA-Polymerase-PCR..... 82

Abbildung 25: Ergebnis der DNA-Polymerase-PCR..... 82

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 26: Maximum Likelihood Analyse der partiellen Aminosäure-Sequenz der DNA-Polymerase (289 AS) der Putenaviadenovirusisolate.....	83
Abbildung 27: Ergebnis der Typisierung der Putenisolate und beobachtete Symptome. ....	85
Abbildung 28: Ergebnis der Typisierung der Putenisolate und Alter der betroffenen Tiere...	86

**Verwendete Abkürzungen**

AGE	Adenoviral Gizzard Erosions
AI	Aviäre Influenza
AS	Aminosäure
B	Broilerisolat
bp	Basenpaare
CPA	cross-priming Amplifikation
CAV	chicken anaemia virus
CELO	Chicken Embryo Lethal Orphan
CPE	zytopathogener Effekt
DAdV	Duck aviadenovirus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid
ELA	Embryoletalitäts-Assay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FaAdV	Falcon aviadenovirus
FAdV	Fowl aviadenovirus
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
GE	Gizzard Erosions
GoAdV	Goose aviadenovirus
h	Stunde
HE	Hämorrhagische Enteritis
HEF	Hühnerembryofibroblasten
HEL	Hühnerembryoleberzellen
HHS	Hydropericard-Hepatitis-Syndrom
HNZ	Hühnernierenzellen

## Abkürzungsverzeichnis

hpi	hours post infection
HRM	High Resolution Melt
IBD	infectious bursal disease
IBDV	infectious bursal disease virus
IBH	Inclusion Body Hepatitis
IB	Infektiöse Bronchitis
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
ID	Infektionsdosis
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
ITR	inverted terminal repeats
K. A.	keine Angabe
kbp	Kilobasenpaare
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification
LMH	Leghorn Male Hepatoma
LT	Lebenstag
LW	Lebenswoche
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NC	Negativkontrolle
ND	Newcastle Disease
NT	Nukleotid
obB	ohne besonderen Befund
ORF	open reading frame
P	Putenisolat

## Abkürzungsverzeichnis

pmol	Pikomol
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PiAdV	Pigeon aviadenovirus
PsAdV	Psittacine Aviadenovirus
qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
REA	Restriktionsenzymanalyse
RPA	Rekombinase-Polymerase-Amplifikation
rpm	rounds per minute
sek	Sekunde
SPF	spezifiziert-pathogenfrei
TAdV	Turkey aviadenovirus
TBE	Tris-Borat-Elektrophoresepuffer
TCID	Tissue Culture Infective Dose
TR	terminal repeat

## 1. Einleitung

Aviäre Adenovirusinfektionen sind weltweit in der Geflügelproduktion verbreitet. Führen Stämme der Si- und Atadenoviren zu den spezifischen Krankheitsbildern der Hämorrhagischen Enteritis der Pute und dem Egg-Drop Syndrom der Hühner, so ist die Infektion mit Aviadenoviren differenzierter zu betrachten. Seit ihrer eher zufälligen Entdeckung in den frühen 50er Jahren des vorangegangenen Jahrhunderts wandelte sich die Bedeutung von Kommensalen zu Auslösern multifaktorieller Erkrankungen, bis hin zu primär pathogenen Erregern. So führen Hühneraviadenoviren der Spezies *Fowl aviadenovirus C, D* und *E* regelmäßig weltweit zu Ausbrüchen des Hydroperikard-Hepatitis-Syndroms und der Einschlusskörperchen-Hepatitis bei Hühnern. Vergleichsweise neu beschrieben hingegen ist das Auftreten der sogenannten Muskelmagenerosionen, ausgelöst durch Stämme der Spezies *Fowl aviadenovirus A* (FAdV-A). Seit Anfang der 2000er Jahre wurde in verschiedenen Teilen der Welt über Ausbrüche dieser Erkrankung berichtet, so kam es auch im Jahr 2011 zu einem gehäuften Auftreten in Deutschland. Im Rahmen der Routinediagnostik des Institutes für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin konnten in dem Jahr vermehrt Aviadenovirus-Isolate aus Organproben aus Broilerbeständen isoliert werden. Während das Krankheitsbild der adenoviralen Muskelmagenerosionen klinisch von unspezifischer Symptomatik gekennzeichnet ist, sind post mortem klare umschriebene Läsionen im Muskelmagen sichtbar. Neben pathogenen FAdV-A Isolaten werden auch apathogene FAdV-A Stämme isoliert. Labordiagnostisch ist eine Unterscheidung hinsichtlich der Pathogenität bisher jedoch nicht möglich. So lieferte ein Ansatz, sie anhand ihrer Fibergene zu unterscheiden, widersprüchliche Ergebnisse. Für verschiedene aviäre Erreger wurde über den Einsatz des Embryoletalitäts-Assays zur Untersuchung pathogener und apathogener Stämme berichtet. Dieser wurde sowohl als Methode zur Bestimmung der Pathogenität, als auch zur Charakterisierung verschiedener Virulenzfaktoren eingesetzt. Daraus ergeben sich für den ersten Teil dieser Arbeit folgende Vorhaben:

- Molekulare Charakterisierung der im Jahr 2011 isolierten Broilerisolate anhand ihrer Hexongen- und Fibergensequenzen
- Evaluation des Embryoletalitäts-Assays als alternatives *in-vivo* Modell zur Differenzierung apathogener und pathogener FAdV-A Stämme und als Möglichkeit für den Einsatz als alternative Ersatzmethode für einen Tierversuch

Im Jahr 2012 hingegen konnten ebenfalls im Rahmen der Routinediagnostik vermehrt Aviadenoviren aus Mastputenputenbeständen isoliert werden. Die Verbreitung von Aviadenoviren in Putenbeständen und deren Bedeutung als Pathogene ist bislang unklar, da nur vergleichsweise wenige Veröffentlichungen zu dieser Thematik vorliegen. Bisher gelang

## Einleitung

es, vereinzelt Hühneraviadenoviren als auch Putenaviadenoviren aus erkrankten sowie symptomfreien Tieren zu isolieren, wobei eine Differenzierung der Isolate auf Speziesebene nicht in jedem Fall durchgeführt wurde. Kann eine Speziestypisierung der Aviadenoviren auf Basis der Hexongensequenz erfolgen, so ist für die Beschreibung einer neuen Spezies innerhalb des Genus Aviadenovirus neben einem weiteren Kriterium die Untersuchung der DNA-Polymerase wesentlich.

Als Vorhaben des zweiten Teils dieser Arbeit ergibt sich somit:

- Molekulare Untersuchung der im Jahr 2012 gewonnenen Putenisolate anhand ihrer Hexon- und DNA-Polymerasegenesequenz

Ergebnisse des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit wurden bereits unter dem Titel „Investigations on aviadenoviruses isolated from turkey flocks in Germany“ in Avian Pathology veröffentlicht (Kleine et al. 2017).

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Morphologie, Genom und Klassifikation

Adenoviren gehören zu den unbehüllten doppelsträngigen DNA Viren. Ihre Größe variiert innerhalb der Virusfamilie zwischen 70 bis 90 nm. Die äußere Form ist die eines Icosaeders. Das Kapsid wird aus insgesamt 252 Kapsomeren gebildet, bestehend aus 240 Hexonproteinen, die die Seitenflächen formen, und zwölf Pentonproteinen, die die Eckpunkte bilden. Das Penton besteht dabei aus der Pentonbasis und ein oder zwei Fiberproteinen, die sich wiederum in Faserschaft und Fiberkopf untergliedern lassen (Harrach et al. 2011). Vereinfacht ist dies in Abbildung 1 dargestellt.

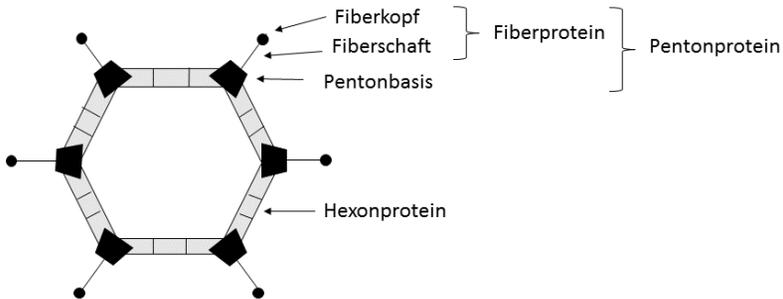


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung der äußeren Gestalt der Adenoviren. Das ikosaedrische Kapsid wird dabei größtenteils aus den Hexonproteinen gebildet. Die Ecken werden von Pentonproteinen, bestehend aus Pentonbasis und Fiberprotein gebildet.

Die Größe des Genoms variiert innerhalb der Virusfamilie zwischen 26 Kilobasenpaaren (kbp) (Davison et al. 2000) und 48 kbp (Dospoly et al. 2019) mit einem Guanin-Cytosin-Gehalt von 33,6 % (Vrati et al. 1996) bis 66,9 % (Kajan et al. 2010). Der zentrale Part des Genoms ist über die Genera hinweg sehr konserviert und kodiert vor allem die Gene für die Strukturproteine. An den Enden des Genoms hingegen unterscheiden sich die Genera hinsichtlich ihrer Sequenzlänge und der Proteine, für die es kodiert (Harrach et al. 2011). Zusätzlich finden sich hier unterschiedlich lange sogenannte repetitive Sequenzen (inverted terminal repeats, ITR) von 39 Basenpaare (bp) (Kajan et al. 2012) bis 95 bp Länge (Kajan et al. 2010). An den beiden 5'-Enden des Genoms ist je ein terminales Protein gebunden (Harrach et al. 2011).

## Literaturübersicht

Adenoviren besitzen eine hohe Tenazität gegenüber ihrer Umwelt. Sie weisen eine hohe Hitzestabilität und Resistenz gegenüber pH-Werten von pH 3 bis pH 9 auf. Sie sind unempfindlich gegenüber lipidlöslichen Desinfektionsmitteln, durch Formalin können sie hingegen inaktiviert werden (Mcferran und Smyth 2000).

Die Adenoviren wurden in ihrer Geschichte häufig umklassifiziert. Von ursprünglich zwei großen Gruppen, gegliedert nach ihrer Herkunft in Säugetier- und Vogeladenoviren, besteht die Familie der *Adenoviridae* nach aktueller offizieller Nomenklatur derzeit aus fünf Genera: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* und *Ichtadenovirus* (Virus Taxonomy: 2019 Release; <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Während die Mitglieder der Genera *Mast-* und *Aviadenovirus* nur Säugetiere und Vögel infizieren, umfassen die *At-* und *Siadenoviren* ein größeres Wirtsspektrum. Das einzige piszine Adenovirus (*Sturgeon Adenovirus A*) bildet eine eigene Gattung, das Genus *Ichtadenovirus* (Harrach et al. 2011). Zusätzlich wurde zuletzt eine sechste Gattung, das Genus *Testadenovirus*, vorgeschlagen, welches sechs weitere Adenoviren umfasst, die aus einer Reihe von Sumpf- und Landschildkröten isoliert worden waren (Harrach et al. 2019). Aviäre Adenoviren finden sich in den Genera *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* und *Atadenovirus* (Abbildung 2). Vertreter des Genus *Aviadenovirus* wurden in der Vergangenheit auch als Gruppe I aviäre Adenoviren bzw. konventionelle aviäre Adenoviren bezeichnet (Mcferran und Smyth 2000).

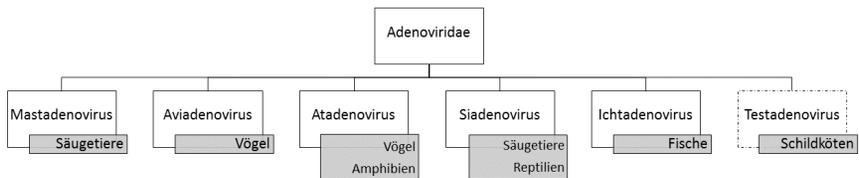


Abbildung 2: Genuseinteilung der Adenoviridae. Die Virusfamilie umfasst derzeit fünf offizielle Genera. Das Genus *Testadenovirus* ist bisher noch nicht offiziell als eigene Gattung bestätigt (Virus Taxonomy: 2019 Release; <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

Aviadenoviren sind serologisch und durch ihre Genomorganisation von den anderen Genera zu unterscheiden. Eine weitere Besonderheit stellt das Vorhandensein von zwei Fiberproteinen je Pentonbasis dar (Gelderblom und Maichle-Lauppe 1982; Harrach et al.

## Literaturübersicht

2011). Diese können entweder von einem oder zwei Genen kodiert werden und eine unterschiedliche oder gleiche Länge aufweisen (Hess 2020).

Die Genera wiederum lassen sich in Spezies unterteilen, die ein oder mehrere Virustypen enthalten können. Die Spezies werden dabei jeweils mit fortlaufenden Buchstaben bezeichnet, die Virustypen mit fortlaufenden Zahlen (Harrach et al. 2011). So sind im Genus *Aviadenovirus* bisher 15 Spezies beschrieben: *Duck aviadenovirus B* (DAdV-B), *Falcon aviadenovirus A* (FaAdV-A), *Fowl aviadenovirus A bis E* (FAdV-A bis E), *Goose aviadenovirus A* (GoAdV-A), *Pigeon aviadenovirus A* (PiAdV-A), *Pigeon aviadenovirus B* (PiAdV-B), *Psittacine aviadenovirus B* (PsAdV-B), *Psittacine aviadenovirus C* (PsAdV-C), *Turkey aviadenovirus B bis D* (TAdV-B bis D) (Virus Taxonomy: 2019 Release; <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

Für die Speziesbeschreibung innerhalb des Genus *Aviadenovirus* werden mindestens zwei der folgenden Kriterien herangezogen: phylogenetische Distanz von > 5 % bis 15 % basierend vor allem auf der Aminosäuresequenz der DNA-Polymerase, Genomorganisation, Ergebnis der Restriktionsenzymanalyse (REA), Wirtsspektrum, Pathogenität, Kreuzneutralisation sowie Fähigkeit zur Rekombination. Fünf dieser 15 Spezies werden als Hühneraviadenoviren (*Fowl aviadenovirus*, FAdV-A bis FAdV-E) bezeichnet und lassen sich weiter anhand ihrer serologischen Charakteristika in Serotypen unterteilen. Jedoch ist die Benennung der Serotypen nicht immer einheitlich, da verschiedene Serotypen zu unterschiedlichen Zeiten in unterschiedlichen Regionen der Welt isoliert und beschrieben wurden.

In Tabelle 1 sind beispielhaft Virusstämme mit ihrer Zuteilung zu Serotypen und Spezies aufgeführt. In der vorliegenden Arbeit wird die Einteilung des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) verwendet (Harrach et al. 2011).

Tabelle 1: Klassifizierung der FAdV im Vergleich zwischen Europa, den USA und nach dem International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Modifiziert nach McFerran 1997; Harrach et al. 2011 und Hess 2020

Literaturübersicht

Spezies	Serotyp			Virusstämme
	Europa	USA	ICTV	
FAdV-A	FAdV-1	FAdV-1	FAdV-1	CELO*, Phelps, OTE, QBV, 112, H1, Fontes, PLA2
FAdV-B	FAdV-5	FAdV-8	FAdV-5	340*, M2, Tipton, TR22
FAdV-C	FAdV-4	FAdV-4	FAdV-4	ON1*, KR5, 341, 506, Da60, H2, J2, K31, K1013
	FAdV-11	FAdV-10	FAdV-10	CFA20*, C-2B, M11, SA2
FAdV-D	FAdV-2	FAdV-2	FAdV-2	P7*, GAL-1, SR 48, 685, H3, IDAI
	FAdV-3	FAdV-3	FAdV-3	75*, SR49, H5
	FAdV-10	FAdV-9	FAdV-9	A2*, 93
	FAdV-12	FAdV-12	FAdV-11	380*, 161, UF71
FAdV-E	FAdV-6	FAdV-5	FAdV-6	CR119*, 168, WDA6
	FAdV-7	FAdV-11	FAdV-7	YR36*, X11, 122
	FAdV-8	FAdV-6	FAdV-8a	CFA40*, TR59, T8, 58, H6
	FAdV-9	FAdV-7	FAdV-8b	764*, B3, CFA3

\* ICTV-Referenzstamm

Größenteils werden neu nachgewiesene Aviadenoviren mit molekularbiologischen Methoden untersucht und dann zu den existierenden Serotypen zugeordnet, allerdings ohne diese serologisch zu bestätigen (Kajan et al. 2013). Abweichend davon, werden ausschließlich molekularbiologisch typisierte Isolate auch als Virustypen bezeichnet (Marek et al. 2014). Auch die Typisierung anhand von Genotypen auf Basis des Hexongens wurde vorgeschlagen. So ließen sich die fünf FAdV-Spezies in zwölf FAdV-Genotypen mit 22 Subgruppen einteilen. Allerdings erfolgte auch hier kein Vergleich zu den existierenden Serotypen. So beinhaltet, wie in Tabelle 2 dargestellt, die Spezies FAdV-B zwei Genotypen, aber nur einen Serotyp und Spezies FAdV-C nur einen Genotyp, aber zwei Serotypen (Marek et al. 2010a).

Tabelle 2: Einteilung der Virusstämme im Vergleich zwischen Genotyp und Serotyp nach Marek et al. 2010a

Genotyp	Spezies	Serotyp
A1	FAdV-A	FAdV-1
B1 und B2	FAdV-B	FAdV-5
C1	FAdV-C	FAdV-4 FAdV-10
D1 bis D4	FAdV-D	FAdV-2 FAdV-3 FAdV-9 FAdV-11
E1 bis E4	FAdV-E	FAdV-6 FAdV-7 FAdV-8a FAdV-8b

Putenaviadenoviren werden zurzeit in drei Spezies klassifiziert: *Turkey aviadenovirus B* (TAdV-B) mit Typ 1 (TAdV-1), *Turkey aviadenovirus C* (TAdV-C) mit Typ 4 (TAdV-4) und *Turkey aviadenovirus D* (TAdV-D) mit Typ 5 (TAdV-5) (Virus Taxonomy: 2019 Release; <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Neben den drei genannten Spezies ist ein weiterer Serotyp, TAdV-2, ohne Spezieszuordnung beschrieben (Harrach et al. 2011). Deutlich davon zu unterscheiden ist die Spezies *Turkey siadenovirus A* (TAdV-A) mit dem Serotyp 3 (TAdV-3), welche dem Genus *Siadenovirus* angehört (Harrach et al. 2011). Zur Übersichtlichkeit ist dies in Abbildung 3 dargestellt.

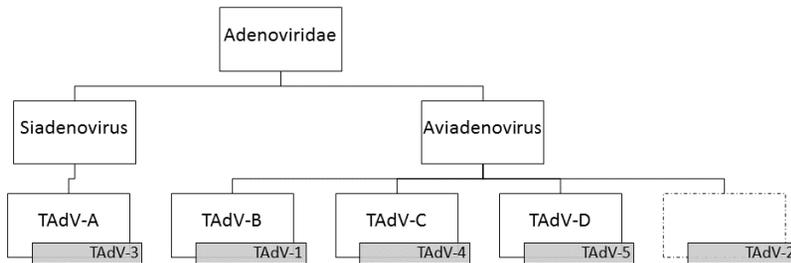


Abbildung 3: Adenoviren der Puten sind dem Genus *Siadenovirus* und *Aviadenovirus* zugeordnet. Neben den Virustypen, die den Spezies TAdV-A, TAdV-B, TAdV-C und TAdV-D zugeordnet werden können, existiert ein weiterer Serotyp, TAdV-2, der bisher keiner Spezies zugeordnet werden konnte (Virus Taxonomy: 2019 Release; <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

## 2.2. Besonderheiten zu ausgewählten Aviadenoviren

### 2.2.1. *Fowl aviadenovirus A* Serotyp 1 (FAdV-1) als ätiologische Ursache der Muskelmagerosionen

Muskelmagerosionen (Gizzard Erosions, GE) wurden erstmalig in den 1930er Jahren im Zusammenhang mit Futtermittelstudien bei Hühnern beschrieben (Mcfarlane et al. 1931; Holst und Halbrook 1933). Seitdem wurden immer wieder Untersuchungen zur Ergündung der Ursache durchgeführt. Zur Diskussion stehen kongenitale Faktoren (Gjevre et al. 2013), Stress und Futterentzug (Grabarevic et al. 1993) sowie Zusammensetzung, Qualität und Beschaffenheit des Futters (Mcfarlane et al. 1931; Holst und Halbrook 1933; Almquist und Stokstad 1936; Johnson und Pinedo 1971; Ross 1979; Tisljar et al. 2002; Gjevre et al. 2013). Neben der Beteiligung der oben genannten nicht infektiösen Faktoren, können aber auch Pathogene wie *Clostridium perfringens* in der Pathogenese der Muskelmagerosionen von Bedeutung sein (Fossum et al. 1988; Novoa-Garrido et al. 2006; Dinev 2010; Gjevre et al. 2013).

## Literaturübersicht

In den letzten Jahren haben die durch Aviadenoviren ausgelösten Muskelmagenerosionen (Adenoviral Gizzard Erosions, AGE) zunehmend an Bedeutung erlangt.

Bereits im Jahr 1977 wurden GE nach einer experimentellen FAdV-8a Infektion als Nebenbefund beschrieben (Grimes und King 1977). Weitere Nachweise von FAdV-8a und FAdV-8b im Zusammenhang mit GE folgten (Tanimura et al. 1993; Okuda et al. 2004; Mase und Nakamura 2014; Grafl et al. 2018; Niczyporuk und Czekaj 2018), wobei die Erkrankung im Tierversuch nicht reproduziert werden konnte (Grafl et al. 2018; Niczyporuk und Czekaj 2018).

Im Jahr 2001 wurde das erste Mal über GE in Zusammenhang mit FAdV-1 berichtet (Okuda et al. 2001b). Weitere Fallbeschreibungen folgten (Manarolla et al. 2009; Marek et al. 2010b; Domanska-Blicharz et al. 2011; Grafl et al. 2012; Lim et al. 2012; De Herdt et al. 2013; Schade et al. 2013; Grafl et al. 2018; Garmyn et al. 2018). Infektionsversuche konnten das Krankheitsbild reproduzieren, so dass nach derzeitigem Wissensstand FAdV-1 als Auslöser der AGE zu verstehen ist (Okuda et al. 2001a; Nakamura et al. 2002; Ono et al. 2003; Muroga et al. 2006; Ono et al. 2007; Domanska-Blicharz et al. 2011; Grafl et al. 2013; Grafl et al. 2018; Niczyporuk und Czekaj 2018; Grafl et al. 2019).

FAdV-1 kann sowohl aus klinisch gesunden als auch aus mit AGE betroffenen Beständen isoliert werden (Okuda et al. 2006). Darüber hinaus führen Infektionen mit dem europäischen Referenzstamm CELO und dem japanischen Referenzstamm Ote nicht zu einer klinischen Erkrankung (Nakamura et al. 2002; Grafl et al. 2014). Dementsprechend wird zwischen pathogenen und apathogenen FAdV-1 Stämmen unterschieden. Welche Faktoren für die Pathogenitätsunterschiede ursächlich sind, ist bisher nicht bekannt. Als Virulenzfaktoren werden bei Hühneraviadenoviren unter anderem die Fiberproteine diskutiert (Pallister et al. 1996; Zhang et al. 2018). FAdV-1 besitzt im Gegensatz zu den meisten anderen Aviadenoviren zwei Fiberproteine, die als Long- bzw. Short-Fiberproteine bezeichnet werden (Harrach et al. 2011). Diese spielen eine wichtige Rolle im Replikationszyklus des Virus. Ein defektes Long-Fiberprotein verringert *in-vivo* die Replikation stark, während sie bei einem defekten Short-Fiberprotein *in-vitro* verhindert wird (Tan et al. 2001).

Molekularbiologische Untersuchungen der Long-Fibergene mittels REA zeigten Unterschiede zwischen apathogenen und pathogenen Feldstämmen sowie dem japanischen Referenzstamm Ote. Es wurden drei verschiedene Restriktionsmuster erfasst, wobei alle pathogenen Feldisolate einem Muster zugeordnet werden konnten. Ote zeigte ein abweichendes Restriktionsmuster. Die apathogenen Feldisolate glichen sowohl dem Restriktionsmuster der pathogenen Isolate als auch dem Muster von Ote. Darüber hinaus wurde bei den apathogenen Isolaten noch ein drittes Restriktionsmuster beobachtet (Okuda et al. 2006). Bei der Untersuchung pathogener europäischer Feldisolate ließen sich diese

Ergebnisse weder mittels REA noch in einer zusätzlich durchgeführten Sequenzanalyse reproduzieren (Marek et al. 2010b).

### 2.2.2. Putenaviadenoviren

Der Kenntnisstand über die Bedeutung von Putenaviadenoviren ist im Gegensatz zu den Hühneraviadenoviren gering. Zwar konnten bereits in den 1970er-Jahren zwei eigenständige Serotypen der Puten, zu damaliger Zeit zugehörig zu der Gruppe I Adenoviren, beschrieben werden (Scott und McFerran 1972; McFerran und Adair 1977; Adair et al. 1980), aber erst über 40 Jahre später gelang die Isolierung weiterer Putenaviadenoviren (Kajan et al. 2010; Marek et al. 2014).

Neben der Gesamtgenomsequenzierung eines neuen Putenisolates (D90/2) wurden auch die beiden 1979 isolierten Serotypen in ihrer partiellen Hexongensequenz untersucht. Dabei stellte sich zunächst heraus, dass es sich bei einem der beiden Serotypen um FAdV-8a handelt. Der zweite Serotyp, TAdV-2, wurde nicht näher charakterisiert und wurde bis heute keiner Spezies zugeordnet. Das Isolat D90/2 wurde hingegen aufgrund seiner Genomorganisation als eigene Spezies, TAdV-B mit dem Typen TAdV-1, innerhalb des Genus *Aviadenovirus* klassifiziert (Kajan et al. 2010). Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es schließlich, den ursprünglichen ersten Serotyp als eigenständiges Putenaviadenovirus zu charakterisieren und als TAdV-4 der Spezies TAdV-C zuzuordnen. Zusätzlich wurde ein weiteres neues Putenaviadenovirus isoliert, das TAdV-5, Spezies TAdV-D (Marek et al. 2014).

TAdV-B scheint am nächsten mit FAdV-A und FAdV-C verwandt zu sein. TAdV-B und TAdV-D besitzen darüber hinaus jeweils zwei Fibergene, die vergleichbar mit den Fibergenen von FAdV-A sind (Kajan et al. 2010; Marek et al. 2014). TAdV-C weist dagegen nur ein Fibergen auf. Während die Genomorganisation von TAdV-C ähnlich zu der von FAdV-B ist, ist die Genomorganisation von TAdV-D nahezu identisch zur Genomorganisation von FAdV-A. Insgesamt scheint ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung von TAdV-B, TAdV-D und FAdV-A wahrscheinlich (Kajan et al. 2010; Marek et al. 2014).

## 2.3. Epidemiologie und Übertragung

Aviadenoviren sind weltweit verbreitet. Aufgrund ihrer Bedeutung beim Geflügel sind die Hühneraviadenoviren vergleichsweise gut untersucht. Hühneraviadenoviren können dabei nicht nur aus Hühnern, sondern auch aus anderen Vogelarten isoliert werden. Wirtschaftlich bedeutende Erkrankungen, die durch Aviadenoviren hervorgerufen werden, sind neben der

## Literaturübersicht

AGE insbesondere die Einschlusskörperchen-Hepatitis (Inclusion Body Hepatitis, IBH) und das Hydroperikard-Hepatitis-Syndrom (HHS) (Hess 2020).

AGE wurden erstmals 1993 unabhängig voneinander in Japan und den USA beschrieben (Goodwin 1993; Tanimura et al. 1993). Weitere Nachweise folgten in Italien (Manarolla et al. 2009), Deutschland (Marek et al. 2010b; Schade et al. 2013), Großbritannien (Marek et al. 2010b), Polen (Marek et al. 2010b; Domanska-Blicharz et al. 2011), Korea (Lim et al. 2012), Belgien (De Herdt et al. 2013) und im Iran (Mirzazadeh et al. 2019).

Während gezeigt werden konnte, dass der genetische Hintergrund der Tiere bei der IBH an der Entstehung von Krankheitssymptomen beteiligt ist (Matos et al. 2016), scheint er bei der Entwicklung der AGE keine maßgebliche Rolle zu spielen. Zwar wurden die AGE hauptsächlich bei Broilern beschrieben (Goodwin 1993; Lenz et al. 1998; Abe et al. 2001; Ono et al. 2001; Okuda et al. 2006; Manarolla et al. 2009; Marek et al. 2010a; Domanska-Blicharz et al. 2011; Grafl et al. 2012; De Herdt et al. 2013; Schade et al. 2013; Garmyn et al. 2018), aber auch Legehennen sind regelmäßig betroffen (Lim et al. 2012; Matczuk et al. 2017; Grafl et al. 2018). Daneben scheint das Alter bei AGE keinen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung des Krankheitsbildes zu haben, so konnte diese Erkrankung sowohl bei neun Tage alten Broilern (Grafl et al. 2012) als auch 35 Wochen alten Legehennen diagnostiziert werden (Grafl et al. 2018).

Die Verbreitung von Putenaviadenoviren in Putenbeständen ist weitgehend unbekannt. So wurden Nachweise nur aus Irland (Scott und McFerran 1972; McFerran und Adair 1977), USA (Guy et al. 1988), Ungarn (Kajan et al. 2010; Marek et al. 2014) und Großbritannien (Marek et al. 2014) berichtet. Neben einer insgesamt geringen Datenlage kommt erschwerend hinzu, dass in vielen Untersuchungen keine eindeutige Klassifizierung erfolgte (Simmons et al. 1976; Dillman und Simmons 1977; Sutjipto et al. 1977; Crespo et al. 1998; Barnes et al. 2000; Woolcock und Shivaprasad 2008; Moura-Alvarez et al. 2013).

Aviadenoviren können sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden (McFerran und Smyth 2000). Die direkte horizontale Übertragung erfolgt hauptsächlich über die fäkal-orale Route (McFerran und Adair 1977). Daneben ist eine indirekte Übertragung durch Personal oder Gegenstände (Hess 2020) sowie über kontaminierte Impfstoffe möglich (Li et al. 2017; Su et al. 2018). Sowohl die direkte als auch die indirekte horizontale Übertragung via Aerosole konnte für AGE experimentell nachvollzogen werden (Ono et al. 2007).

Der vertikalen Übertragung kommt eine besondere Bedeutung zu. Bereits in den 50er-Jahren des vorherigen Jahrhunderts erfolgte der Nachweis eines endogenen Virus aus embryonierten Hühnereiern bei Isolierungsversuchen anderer Agenzien (Yates und Fry 1957). Im Folgenden berichteten auch andere Autoren über endogene Viren aus nicht inokulierten Hühnereiern (Du

Bose und Grumbles 1959; Cook 1968). Auch in Hühnerzellkulturen konnten diese Partikel nachgewiesen und später als Adenoviren klassifiziert werden (Burmester et al. 1960; Burke et al. 1968). Diese Erkenntnis führte zur Etablierung von spezifiziert-pathogenfreien (SPF) Beständen (Mcferran und Adair 1977). Wie bedeutend die vertikale Übertragung sein kann, zeigt eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2012. So konnte ein Ausbruch von AGE in 22 deutschen Broilerherden auf eine einzige infizierte Elterntierherde zurückgeführt werden. Hierbei ließen sich genetisch identische FAdV-1 Isolate aus der betroffenen Elterntierherde sowie aus Embryonen und Mastbetrieben isolieren (Grafl et al. 2012). Auch TAdV-2 konnte erfolgreich aus Eintagsküken isoliert werden, was für eine vertikale Übertragung spricht (Guy et al. 1988).

### 2.4. Klinik und Pathologie

Die Aviadenoviren waren lange als fakultative Erreger bekannt. In den letzten Jahren rückten sie als primäre Pathogene in den Vordergrund (Schachner et al. 2020). Dabei können Aviadenoviren sowohl von gesunden als auch von erkrankten Tieren isoliert werden (Mcferran und Adair 1977; Kajan et al. 2013; Niczyporuk 2016). Eine Immunsuppression, ausgelöst durch eine Infektion mit dem Hühner-Anämie-Virus (chicken anaemia virus, CAV) oder dem Infektiösen Bursitis-Virus (infectious bursal disease virus, IBDV), oder auch eine Belastung mit Aflatoxinen kann die Virulenz der Hühneraviadenoviren erhöhen (Rosenberger et al. 1975; Fadly et al. 1976; V. Bülow et al. 1986; Hess 2020). Ebenso können Hühneraviadenoviren zusammen mit anderen Krankheitserregern wie dem Infektiösen Bronchitis Virus (IBV) oder *Mycoplasma* spp. auftreten und zu einer multifaktoriellen Erkrankung führen (Kajan et al. 2013).

Darüber hinaus agieren einige Hühneraviadenoviren auch als primär pathogene Erreger. Infektionen mit bestimmten Stämmen von FAdV-2 und -11 (Spezies FAdV-D) sowie von FAdV-8a und -8b (Spezies FAdV-E) lösen die IBH aus, wohingegen es nach Infektion mit bestimmten FAdV-4 Stämmen (Spezies FAdV-C) zum HHS kommen kann (Hess 2020).

Das Bild der AGE variiert klinisch zwischen einem subklinischen Verlauf (Ono et al. 2001), einer unspezifischen Symptomatik einhergehend mit Apathie, Rückgang der Futter- und Wasseraufnahme, geringeren Tageszunahmen, ungleichmäßiger Entwicklung der Herde bis hin zu erhöhter Mortalität (Abe et al. 2001; Domanska-Blicharz et al. 2011; Grafl et al. 2012; Lim et al. 2012; Schade et al. 2013; Garmyn et al. 2018). Während bei Legehennen zum Teil ein Legeleistungsrückgang verzeichnet werden konnte (Grafl et al. 2018), wurde bei Broilerelterntieren lediglich eine geringere Schlupfrate registriert (Grafl et al. 2012).

## Literaturübersicht

In der Pathologie fallen vor allem die Veränderungen am Muskelmagen auf. Teilweise sind diese vergrößert und mit hämorrhagischem Inhalt gefüllt. Erosionen der Koilinschicht unterschiedlicher Größe können festgestellt werden. Diese stellen sich als dunkelrot-braun bis schwarz verfärbte Areale dar (Abbildung 4). Zum Teil kommt es zu Ulzerationen und Perforationen (Abe et al. 2001; Ono et al. 2001; Grafl et al. 2012; Grafl et al. 2013; Schade et al. 2013; Grafl et al. 2014; Mirzazadeh et al. 2019). Zusätzlich können Ko-Infektionen mit Kokzidien stattfinden oder auch Veränderungen an Drüsenmagen, Darm und Pankreas auftreten (Tanimura et al. 1993; Domanska-Blicharz et al. 2011; Lim et al. 2012; Garmyn et al. 2018). In Tabelle 3 sind die wichtigsten Charakteristika der bisher publizierten Feldausbrüche zusammengefasst.



Abbildung 4: Beispiel eines Muskelmagens mit GE. Auffällig ist hier das großflächige dunkelbraune Areal in der Koilinschicht mit erosiven Veränderungen in der darunterliegenden Mukosa (© Prof. H.M. Hafez).

## Literaturübersicht

Tabelle 3: Übersicht der klinischen Symptomatik und pathologischen Veränderungen aus Feldausbrüchen mit Muskelagenrosionen

Nutzungsrichtung	Serotyp	Klinische Symptomatik	Ko-Infektionen	Pathologie	Literatur
Legehennen	FAdV-8b	Mortalität 0,5 %	CAV <sup>1</sup>	Anämie; Ekchymosen; Atrophie des Thymus, der Bursa fabricii und der Milz; Gelbverfärbung des Knochenmarks; Hämorrhagien in Drüsen- und Muskelmagen; GE <sup>2</sup> mit blutigem Inhalt; petechiale Blutungen im Pankreas; weiße punktuelle Veränderungen in der Leber	Tanimura et al. 1993
Broiler, Legehennen	K. A. <sup>3</sup>	K. A.	Pocken, Arsenvergiftung, bakterielle Infektion	Atrophie der Bursa; GE	Goodwin 1993
Broiler	K. A.	Mortalität 1,8 %	Bakteriologisch negativ	Dilatation des Muskelmagens; GE mit blutigem Inhalt	Abe et al. 2001
Broiler	FAdV-1	Keine Feststellung im Schlachthof	K. A.	K. A.	Ono et al. 2001
Broiler, Legehennen, Hobbyhühner	FAdV-1	Keine, außer bei Hobbyhühnern: Auseinanderwachsen, Mortalität > 20 %	K. A.	GE	Manarolla et al. 2009
Broiler	FAdV-1	K. A.	<i>Escherichia coli</i> , Reovirus	GE mit blutigem Inhalt	Marek et al. 2010b
Broiler	FAdV-1	Auseinanderwachsen	Bakteriologisch und parasitologisch negativ	Blass; GE mit blutigem Inhalt; Atrophie des Thymus, der Bursa fabricii und der Milz; Vergrößerung von Leber und Nieren; weiße punktuelle Veränderungen in der Leber	Domanska-Blicharz et al. 2011
Broiler, Broiler-Eieltertiere	FAdV-1	Auseinanderwachsen, erhöhte Embryomortalität	Bakteriologisch negativ, Reovirus + IBDV <sup>4</sup> + CAV negativ	Dilatierter Muskelmagen; GE mit blutigem Inhalt	Graff et al. 2012
Legehennen	FAdV-1	Mortalität 0,2 % pro Woche, Apathie, Anorexie, Kachexie 1-2 %	K. A.	Dilatierter Drüsen- und Muskelmagen mit blutigem Inhalt; GE; Perforation	Lim et al. 2012

Literaturübersicht

Nutzungsrichtung	Serotyp	Klinische Symptomatik	Ko-Infektionen	Pathologie	Literatur
Broiler	FAdV-1	Auseinanderwachsen, bis zu 8 % Mortalität	Bakteriologisch negativ, AIV <sup>5</sup> + NDV <sup>6</sup> negativ	GE mit blutigem Inhalt; geschwollene Nieren	Schade et al. 2013
Broiler	FAdV-1 FAdV-8a FAdV-8b	Keine, Feststellung im Schlachthof	K. A.	K. A.	Mase und Nakamura 2014
Legehennen	FAdV-1	Mortalität 2,3 %, Legeleistungsrückgang, Reduzierung des Eigewichtes	K. A.	GE mit blutigem Inhalt; Perforation; vergrößerte gelblich verfärbte Lebern; Salpingitis; Peritonitis; Enteritis	Matczuk et al. 2017
Junghennen, Legehennen	FAdV-1	Mortalität bis 1,07 % kumulativ über 2 Wochen, Legeleistungsrückgang	FAdV-8a, FAdV-4	Blass; Dilatation des Drüsen- und Muskelmagens; Perforation; GE mit blutigem Inhalt	Grafi et al. 2018
Broiler	FAdV-1	Keine, Feststellung im Schlachthof	FAdV-8a, FAdV-11	GE; Perforation	Mirzazadeh et al. 2019

<sup>1</sup> CAV = chicken anaemia virus, <sup>2</sup> GE = Gizzard Erosions, <sup>3</sup> K. A. = keine Angabe, <sup>4</sup> IBDV= infectious bursal disease virus, <sup>5</sup> AIV = Aviäres Influenzavirus, <sup>6</sup> NDV = Newcastle Disease Virus

## Literaturübersicht

Histopathologisch fällt eine multifokale erosive Ventrikulitis auf, die mit einer Infiltration der Lamina propria, der Submukosa sowie der Lamina muscularis mit Makrophagen, Heterophilen Granulozyten und Lymphozyten einhergehen kann. Die glandulären und epithelialen Zellen des Muskelmagens weisen basophile intranukleäre Einschlusskörperchen auf (Abe et al. 2001; Grafl et al. 2012; Grafl et al. 2013; Schade et al. 2013; Grafl et al. 2014; Grafl et al. 2019). Selten kann zusätzlich eine Pankreatitis oder Hepatitis diagnostiziert werden (Lim et al. 2012; Garmyn et al. 2018).

Nach experimenteller Infektion konnten AGE bei SPF-Legehennen (Okuda et al. 2001b; Nakamura et al. 2002; Ono et al. 2004; Muroga et al. 2006; Domanska-Blicharz et al. 2011; Lim et al. 2012; Grafl et al. 2018; Niczyporuk und Czekaj 2018; Grafl et al. 2019) sowie bei SPF-Broilern (Grafl et al. 2013; Grafl et al. 2014; Grafl et al. 2015) und kommerziellen Broilern (Okuda et al. 2001a; Grafl et al. 2013) reproduziert werden. Generell wurden dabei meist keine (Okuda et al. 2001a; Nakamura et al. 2002; Okuda et al. 2006; Lim et al. 2012) oder nur milde Symptome verbunden mit verringerten Gewichtszunahmen (Okuda et al. 2001a; Grafl et al. 2013; Grafl et al. 2014; Grafl et al. 2015; Niczyporuk und Czekaj 2018) oder Apathie (Ono et al. 2004; Ono et al. 2007; Niczyporuk und Czekaj 2018) festgestellt. Teilweise konnte eine Mortalität von 10 % (Niczyporuk und Czekaj 2018) bzw. 100 % (Domanska-Blicharz et al. 2011) registriert werden. Zusätzlich schien eine Infektion mit einem pathogenen FAdV-1-Stamm einen negativen Einfluss auf die Entwicklung des Legeapparates zu haben (Grafl et al. 2019). Unabhängig von der klinischen Symptomatik wurden in allen Studien post mortem GE festgestellt (Okuda et al. 2001a; Ono et al. 2001; Ono et al. 2003; Ono et al. 2004; Muroga et al. 2006; Okuda et al. 2006; Ono et al. 2007; Domanska-Blicharz et al. 2011; Grafl et al. 2012; Lim et al. 2012; Grafl et al. 2013; Grafl et al. 2015; Grafl et al. 2018; Niczyporuk und Czekaj 2018; Grafl et al. 2019).

Die klinische Relevanz von Aviadenovirusinfektionen bei Puten ist bisher wenig untersucht. Im Gegensatz zu TAdV-A (TAdV-3) als Erreger der hämorrhagischen Enteritis (HE) der Pute, ist bei den Aviadenoviren noch kein einheitliches Krankheitsbild beschrieben (Hess 2020).

Putenaviadenoviren oder nicht näher charakterisierte Adenoviren der Gruppe I wurden von Puten mit sehr unterschiedlicher Symptomatik isoliert. Im Vordergrund stand allerdings in verschiedenen Fällen eine respiratorische Symptomatik. So wurde TAdV-4 aus einem Putenbestand isoliert, in dem Konjunktivitiden, Aerosacculitiden und darüber hinaus Nephritiden festgestellt wurden (Scott und Mcferran 1972). Infektionsversuche konnten diese Symptomatik allerdings nicht reproduzieren (Mcferran und Adair 1977). TAdV-1 wurde ebenfalls aus einer Herde mit Atemwegssymptomatik isoliert (Kajan et al. 2010). Vereinzelt wurde von Infektionen mit FAdV-1 bei Puten berichtet, die mit respiratorischer Symptomatik einhergingen (Blalock et al. 1975; Cho 1976). Ein nachfolgender Tierversuch ging zusätzlich

mit Hepatitis, Atrophie der Bursa fabricii und Wachstumsdepression einher (Cho 1976). Auch bei TAdV-2 spielte die Infektion des Respirationstraktes eine Rolle (Mcferran und Adair 1977). Ein späterer Fallbericht beschrieb darüber hinaus das Auftreten von IBH und einer geringeren Schlupfrate (Guy et al. 1988; Guy und Barnes 1997). Über das Auftreten der IBH bei Puten wurde ein weiteres Mal berichtet, allerdings erfolgte hier lediglich eine Typisierung als Aviadenovirus (Shivaprasad et al. 2001).

Weiterhin wurden Adenoviren auch im Zusammenhang mit dem Poult Enteritis Komplex beschrieben. Allerdings scheinen sie hier eher eine geringe Bedeutung zu haben (Barnes et al. 2000; Woolcock und Shivaprasad 2008; Moura-Alvarez et al. 2013).

Zusätzlich scheinen Adenoviren auch an multifaktoriellen Erkrankungen der Pute beteiligt zu sein. So wurden nicht näher klassifizierte Adenoviren zusammen mit anderen Pathogenen wie Reoviren, *Pasteurella multocida*, *Bordetella avium*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* (*E. coli*) isoliert (Dillman und Simmons 1977; Simmons und Gray 1978; Crespo et al. 1998).

Über eine klinische Symptomatik von TAdV-5 liegen keine Angaben vor (Marek et al. 2014).

## **2.5. Labordiagnostik**

### **2.5.1. Virusisolierung in Zellkulturen**

Als geeignete Proben zur Virusisolierung zählen Fäzes, Dickdarm mit Ingesta sowie Organproben von Pharynx, Nieren und veränderten Organen (Mcferran 1998).

Die Isolierung von Aviadenoviren gelingt am besten in homologen Zellkultursystemen (Mcferran und Smyth 2000). Für Hühneraviadenoviren scheinen dabei Hühnernierenzellen (HNZ) oder Hühnerembryoleberzellen (HEL) am besten geeignet. Hühnerembryofibroblasten (HEF) sind vergleichsweise weniger sensitiv (Miller und Yates 1972; Kraft und Tischer 1978; Hess 2000). Auch die permanente Zelllinie LMH (chicken hepatocellular carcinoma cell line, Leghorn Male Hepatoma cell line) findet Verwendung (Hess 2020). Putennierenzellen und Putenembryoleberzellen eignen sich für die Isolierung von TAdV-4 und TAdV-2, während die Anzucht auf HNZ und HEF hingegen nicht erfolgreich war (Scott und Mcferran 1972; Guy et al. 1988). Durch die vermutlich weite Verbreitung der Aviadenoviren besteht die Gefahr der Kontamination, daher sind Zellkulturen von SPF-Ursprung klar zu favorisieren. Allerdings sind diese von anderen Vogelarten selten vorhanden (Mcferran und Smyth 2000). Stehen somit keine homologen Zellkulturen zur Verfügung, so sind HEL-Zellen zu bevorzugen (Hess 2000). Typischerweise kommt es bei einer Infektion der Zellen zu einem sichtbaren zytopathogenen

Effekt (CPE) in Form von abgerundeten Zellen, die sich aus dem Zellverband lösen (Mcferran und Smyth 2000).

### **2.5.2. Virusisolierung im embryonierten Hühnerei**

Auch die Isolierung von FAdV im embryonierten Hühnerei ist möglich. Allerdings ist diese Methodik weniger sensibel als passende Zellkultursysteme (Mcferran 1998). Ein kritischer Punkt dabei ist die Wahl der Inokulationsroute. So ist zwar die Beimpfung der Chorioallantoismembran der Beimpfung der Allantoishöhle überlegen – hier können nur FAdV-1 und FAdV-5 isoliert werden - allerdings scheint die Inokulation über den Dottersack am günstigsten zu sein (Kawamura et al. 1964; Cowen 1988; Mcferran und Smyth 2000; Alemnesh et al. 2012). Es ist jedoch fraglich, inwieweit sich die Hühnereibeimpfung zur Erstisolierung eignet, da sich die Versuche zur Kultivierung im Ei auf Laborisolate beziehen (Cowen 1988; Hess 2000). Infizierte Embryonen zeigen eine erhöhte Mortalität und können in ihrer Entwicklung verzögert sein. Teilweise sind sie verkrümmt und hyperämisch. Die Lebern können grün verfärbt und nekrotisch sein. Zudem kommt es zu einer Splenomegalie sowie teilweise zu Hämorrhagien und Uraten in den Mesonephronen (Cowen 1988).

### **2.5.3. Detektion und Typisierung**

Adenoviren haben ein charakteristisches Aussehen, welches sich mittels Elektronenmikroskopie gut darstellen lässt. Diese Untersuchungsmethode erlaubt jedoch keinen Rückschluss auf Genus, Spezies oder Serotyp (Hess 2000). Zur Bestimmung des Genus Aviadenovirus eignet sich die Überprüfung durch den indirekten gruppenspezifischen Immunfluoreszenztest (Adair et al. 1980). Allerdings muss hierfür vorher eine Isolierung des Agens erfolgen. Nach erfolgter Isolierung kann die Typisierung von FAdV-Isolaten durch den Neutralisationstest erfolgen. Diese Testmethodik ist jedoch sowohl zeit- als auch materialaufwendig und wurde vor allem durch molekularbiologische Methoden in der Routinediagnostik abgelöst (Hess 2000; Kajan et al. 2013).

### **2.5.4. Serologische Untersuchungen**

Für den Antikörper-Nachweis sind gruppen- und serotypspezifische Diagnostikverfahren beschrieben. Sowohl die Hexonproteine, als auch die Fiberproteine sind an der Neutralisationsreaktion beteiligt. Die Hexonepitope können dabei genus-, spezies- oder serotypspezifisch reagieren (Harrach et al. 2011). Für den gruppenspezifischen Nachweis ist

die Durchführung des Immunfluoreszenztests und des Agar-Gel-Präzipitationstests möglich (Adair et al. 1980; Feichtner et al. 2017). Für die Serotypisierung gilt der Kreuzneutralisationstest als Goldstandard (Hess 2000; Feichtner et al. 2017). Da dieser allerdings zeit- und materialaufwendig ist, wurden verschiedene Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Systeme zum Antikörpernachweis entwickelt. Frühe ELISA-Methoden beruhten auf der Verwendung von vollständigen Virus-Lysaten. Diese zeigten eine hohe Sensitivität, bargen aber die Gefahr von Kreuzreaktionen (Dawson et al. 1980; Calnek et al. 1982; Mockett und Cook 1983). Jüngere ELISA-Verfahren basieren auf der Nutzung rekombinanter Proteine. So können Hexonprotein-basierte ELISA Systeme zur Detektion von Antikörpern gegen FAdV-2 und FAdV-4 verwendet werden (Junnu et al. 2014; Rajasekhar und Roy 2014), während ein Fiberprotein-basierter ELISA zur Untersuchung auf FAdV-1 und FAdV-4 (Feichtner et al. 2017) bzw. FAdV-7, FAdV-8a und -8b (Lu et al. 2020) eingesetzt werden kann. Zur serologischen Diagnostik der wichtigsten Vertreter virulent eingestufte Hühneraviadenoviren (FAdV-1, FAdV-2, FAdV-4, FAdV-8a, FAdV-8b, FAdV-11), wurde ein Fluoreszenzimmunassay entwickelt, der nicht nur eine Detektion, sondern auch eine Differenzierung ermöglicht (Feichtner et al. 2018). Zur Unterscheidung zwischen Impfantikörpern und Antikörpern nach Feldinfektion kann ein auf den Nicht-Struktur-Proteinen 33K und 100K basierender ELISA eingesetzt werden (Xie et al. 2013).

### **2.5.5. Molekularer Nachweis**

Zum molekularen Nachweis von Aviadenoviren mittels Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurden verschiedene Verfahren basierend auf der Hexongenregion entwickelt. Als nachgeschaltete Differenzierungsmethoden zur Typisierung der Hühneraviadenoviren eignen sich die REA (Raue und Hess 1998; Meulemans et al. 2001), die Sequenzierung (Meulemans et al. 2004; Raue et al. 2005; Mase et al. 2009; Niczyporuk 2016) oder die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (High Resolution Melt, HRM) (Steer et al. 2009; Marek et al. 2010a). Bei diesen Methoden stimmt die Typisierung der Hühneraviadenoviren weitestgehend mit der Serotypisierung überein (Schachner et al. 2019). Die von Pizzuto et al. (2010) entwickelte Methode der Pyrosequenzierung erlaubt eine Typisierung auf Speziesebene. Teilweise ermöglichen die Methoden auch den Nachweis und Typisierung anderer Aviadenoviren wie TAdV-1 und TAdV-2 (Meulemans et al. 2001; Kajan et al. 2010) oder PsAdV (Raue et al. 2005).

Die molekulare Diagnostik von Hühneraviadenoviren lässt sich auch auf Grundlage des 52K Gens unter Verwendung einer SYBR Green-basierten real-time PCR durchführen (Gunes et al. 2012). Durch die anschließende Sequenzierung der Fragmente wird die Differenzierung

## Literaturübersicht

der Spezies ermöglicht (Gunes et al. 2013). Ebenfalls möglich ist der Einsatz einer real-time PCR basierend auf dem ORF20A zur Detektion und Quantifizierung von Hühneraviadenoviren (Romanova et al. 2009).

Weitere Methoden beruhen auf isothermalen Reaktionen. So wurden verschiedene Schleifen-vermittelte-isothermale Amplifikationsverfahren (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP), basierend auf dem Hexongen entwickelt (Xie et al. 2011; Niczyporuk et al. 2020). Die bei Xie et al. (2011) beschriebene LAMP Technik detektiert alle zwölf Hühneraviadenoviren, während die Methoden nach Niczyporuk et al. (2020) nur FAdV-2, FAdV-3 und FAdV-11 bzw. die nach Yuan et al. (2019) nur FAdV-4 erfassen. Darüber hinaus wurde ein Rekombinase-Polymerase-Amplifikationsverfahren (RPA) (Zhang et al. 2020) sowie ein cross-priming Amplifikationsverfahren (CPA) (Niczyporuk et al. 2015) zur Detektion aller zwölf Hühneraviadenoviren entwickelt.

Einen Überblick über die diagnostisch genutzten molekularbiologischen Methoden bietet Tabelle 4.

Tabelle 4: Überblick der beschriebenen molekularen Diagnostikmöglichkeiten zum Nachweis von Aviadenoviren

Methodik	Gen	Verwendung	Literatur
PCR <sup>1</sup> + REA <sup>2</sup>	Hexon	Detektion und Typisierung aller zwölf FAdV-Serotypen	Raue und Hess 1998; Meulemans et al. 2001
PCR + Sequenzierung	Hexon	Detektion und Typisierung aller zwölf FAdV-Serotypen, zusätzlich TAdV möglich	Meulemans et al. 2004
PCR + Sequenzierung	Hexon	Detektion und Typisierung aller zwölf FAdV-Serotypen und PsAdV möglich	Raue et al. 2005
PCR + Sequenzierung	Hexon	Detektion und Typisierung aller zwölf FAdV-Serotypen	Niczyporuk 2016
PCR + Sequenzierung	Hexon	Detektion und Typisierung von Avi-, At- und Siadenoviren	Mase et al. 2009
PCR + Pyrosequenzierung	Hexon	Detektion und Speziesdifferenzierung der Hühneraviadenoviren	Pizzuto et al. 2010
qPCR <sup>3</sup>	ORF20A	Detektion und Quantifizierung von Hühneraviadenoviren	Romanova et al. 2009
qPCR + Sequenzierung	52K	Detektion, Quantifizierung und Speziesdifferenzierung der Hühneraviadenoviren	Gunes et al. 2012; Gunes et al. 2013
HRM <sup>4</sup>	Hexon	Detektion und Unterscheidung zwölf FAdV-Serotypen	Steer et al. 2009; Marek et al. 2010a
LAMP <sup>5</sup>	Hexon	Detektion aller zwölf FAdV-Serotypen	Xie et al. 2011
LAMP	Hexon	Detektion von FAdV-2, FAdV-3, FAdV-11	Niczyporuk et al. 2020
LAMP	Hexon	Detektion von FAdV-4	Yuan et al. 2019

## Literaturübersicht

Methodik	Gen	Verwendung	Literatur
CPA <sup>6</sup>	Hexon	Detektion aller zwölf FAdV-Serotypen	Niczyporuk et al. 2015
RPA <sup>7</sup>	Keine Angabe	Detektion aller zwölf FAdV-Serotypen	Zhang et al. 2020

<sup>1</sup> PCR = Polymerasekettenreaktion, <sup>2</sup> REA = Restriktionsenzymanalyse, <sup>3</sup> qPCR = real-time quantitative PCR, <sup>4</sup> HRM = High Resolution Melt, <sup>5</sup> LAMP = Loop-Mediated Isothermal Amplification, <sup>6</sup> CPA = Cross-Priming Amplification, <sup>7</sup> RPA = Rekombinase-Polymerase-Amplifikation

### 2.6. Bekämpfung

Neben Management- und Hygienemaßnahmen zur Verhinderung der horizontalen Übertragung ist die Impfung gegen die als primär pathogen geltenden Aviadenoviren ein wichtiger Faktor bei der Prophylaxe.

Bei der Immunprophylaxe des HHS und der IBH kommen inaktivierte, lebend-attenuierte sowie Subunit-Vakzinen in Betracht, jedoch mit teils unterschiedlichem Erfolg (Schachner et al. 2017). Ein besonders kritischer Punkt ist hierbei die Interferenz zwischen Feldinfektion und Serokonversion durch die Impfung bei Elterntieren. Trotz Antikörperspiegel bei den Elterntieren kann es zu einer vertikalen Virusübertragung kommen, die eventuell zu einer Viruslatenz führen kann. Weiterhin ist eine Kreuzimmunität gegen heterologe Stämme nur gering ausgebildet. Dies muss insbesondere bei der Prophylaxe der IBH beachtet werden. Hier sollte eine Vakzine gewählt werden, die verschiedene Serotypen beinhaltet (Schachner et al. 2017). Entgegen der Strategie, Elterntiere gegen die IBH und HHS zu vakzinieren, um durch maternale Antikörper einen Schutz der Broilerherde zu erreichen (Schachner et al. 2017), ist dieses Vorgehen bei der Prophylaxe der AGE nicht zu empfehlen. Maternale Antikörper führen bei der AGE zu keinem Schutz vor der Infektion und der Entwicklung klinischer Symptomatik (Okuda et al. 2001a; Grafl et al. 2013), im Gegenteil, sie scheinen die Symptome sogar zu verstärken (Ono et al. 2003). Allerdings konnte experimentell gezeigt werden, dass der Einsatz einer Lebendvakzine bei naiven Broilern und Legehennen einen vollständigen Schutz vor einer horizontalen Infektion bietet (Grafl et al. 2014; Grafl et al. 2019). Dabei handelte es sich aber nicht um eine sterile Immunität, da das Challengevirus im Muskelmagen und in Kloakentupfern mittels PCR detektiert werden konnte (Grafl et al. 2019). In Deutschland ist kein zugelassener Impfstoff zur Immunprophylaxe gegen Hühneraviadenoviren verfügbar. So bleibt zur speziellen Prophylaxe gegen eine Infektion mit Aviadenoviren derzeit nur die Nutzung einer bestandsspezifischen Vakzine.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Virusisolate**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Organproben bzw. Virusisolate aus verschiedenen Geflügelbeständen aus den Jahren 2011 und 2012 untersucht (Tabelle 5).

Im Jahr 2011 gelangten 33 Einsendungen aus Broilerbeständen zur Virusisolierung ins Institut für Geflügelkrankheiten. Bei 20 dieser diagnostischen Einsendungen gelang eine Isolierung von Aviadenoviren vor allem in Kontext von Muskelmagenerosionen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollen diese bereits vorliegenden Isolate einer weiteren Charakterisierung unterzogen werden.

Im Jahr 2012 wurden hingegen vermehrt Aviadenoviren aus Putenbeständen isoliert. Insgesamt wurden 69 Einsendungen aus Puteneltern- und Mastputenbeständen verzeichnet. Daraus konnten 21 Virusisolate aus Mastputenbeständen gewonnen werden. Diese bereits vorliegenden als auch selbst aus Organproben gewonnenen Isolate sind Gegenstand des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit.

Eine Übersicht über die Isolate findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Feldisolat von Broilern und Puten aus den Jahren 2011 und 2012

Labor-Nr.	Tierart	Identifizierung		Probematerial	Vorbereicht	Alter	Geschlecht
		a	b				
GB 139/11	Broiler	B1	a	Leber	K. A. <sup>3</sup>	K. A.	N. e. <sup>4</sup>
			b	Zäkaltonsillen			
GB 675/11	Broiler	B2	a	Leber	K. A.	K. A.	N. e.
GB 1024/11	Broiler	B3	a	Leber	Muskelmagenerosionen	K. A.	N. e.
			b	Muskelmagen			
GB 1128/11	Broiler	B4	a	Organpool	Muskelmagenerosionen	K. A.	N. e.
GB 1131/11	Broiler	B5	a	Organpool: Leber, Magen	Muskelmagenerosionen	22. LT <sup>5</sup>	N. e.
GB 1156/11	Broiler	B6	a	Organpool: Leber, Magen	Auseinanderwachsen, Verwurfrate 2,47 %, Aszites, HHJs <sup>6</sup>	K. A.	N. e.
GB 1157/11	Broiler	B7	a	Zäkaltonsillen	Auseinanderwachsen, Verwurfrate 1,88 %, Aszites, Zellulitis, Verdacht auf IBH <sup>7</sup>	33. LT	N. e.
GB 1191/11	Broiler	B8	a	Organpool: Leber, Magen	Muskelmagenerosionen	K. A.	N. e.
			b	Darm			
GB 1236/11	Broiler	B9	a	Drüsenmagen	Muskelmagenerosionen	K. A.	N. e.
			b	Magen			
GB 1338/11	Broiler	B10	a	Magen	Muskelmagenerosionen	K. A.	N. e.
GB 1340/11	Broiler	B11	a	Magen	Muskelmagenerosionen, Verwurfrate 4,88 %, Aszites, Zellulitis, HHJs	34. LT	N. e.
			b	Magen			
GB 1723/11	Broiler	B12	a	Organpool: Milz, Magen	Muskelmagenerosionen	K. A.	N. e.
GB 1724/11	Broiler	B13	a	Organpool: Milz, Magen	Muskelmagenerosionen	K. A.	N. e.
GB 1760/11	Broiler	B14	a	Magen	Muskelmagenerosionen	K. A.	N. e.
GB 1777/11	Broiler	B15	a	Organpool: Milz, Magen	Muskelmagenerosionen	K. A.	N. e.
			b	Magen			
GB 1878/11	Broiler	B16	a	Zäkaltonsillen	Zunehmend Hinker, Abhocker, Gangunsicherheiten, Verlustanstieg	K. A.	N. e.

Material und Methoden

Labor-Nr.	Tierart	Identifizierung	Probematerial		Vorbbericht	Alter	Geschlecht
			Probe	material			
GB 1924/11	Broiler	a	Sehnen	Organpool: Leber, Milz, Darm, Zäkaltonsillen, Magen	K. A.	K. A.	N. e.
		b					
GB 1994/11	Broiler	a	Organpool: Leber, Milz	Zäkaltonsillen	K. A.	K.A.	N. e.
		b					
GB 2488/11	Broiler	a	Zäkaltonsillen		K. A.	44 Tage	N. e.
GB 2614/11	Broiler	a	Mägen		Drüsenmagen verdickt und Blutungen, Muskelmagen obB <sup>8</sup> , Verdacht auf Hühneraviadenoviren und IBV <sup>9</sup>	36 Tage	N. e.
GB 1005/12	Puten	a	Organpool: Leber, Milz, Niere, Zäkaltonsillen		Auseinanderwachsen, Klagegeräusche, hochgradige Enteritis, Einstreufressen, reduzierte Futteraufnahme	10. LW <sup>10</sup>	Männlich
GB 1006/12	Puten	a	Organpool: Leber, Milz, Niere, Zäkaltonsillen		Hepatitis, Splenitis, Enteritis, vereinzelt Polyserositis, Nachweis von <i>E. coli</i>	9. LW	Männlich
GB 1136/12	Puten	a	Zäkaltonsillen		Auseinanderwachsen, Klagegeräusche, hochgradige Enteritis, Einstreufressen, reduzierte Futteraufnahme	8. LW	K. A.
		b	Leber				
GB 1592/20	Puten	a	Darm		K. A.	K. A.	K. A.
GB 1643/12	Puten	a	Organpool: Leber, Milz		Auseinanderwachsen, Klagegeräusche, hochgradige Enteritis, Einstreufressen, reduzierte Futteraufnahme, Hepatitis, Splenitis, vereinzelt Polyserositis, Nachweis von <i>E. coli</i>	10. LW	Weiblich
		b	Darm				
GB 1792/12	Puten	a	Zäkaltonsillen		Hepatitis, Splenitis, Enteritis, vereinzelt Polyserositis, Nachweis von <i>E. coli</i>	4. LW	K. A.
GB 1882/12	Puten	a	Darm		K. A.	K. A.	K. A.
		b	Sehnen				

Material und Methoden

Labor- Nr.	Tierart	Identifizierung	Probematerial	Vorbericht	Alter	Geschlecht
GB 2051/12	Puten	c	Organpool: Leber, Milz, Niere, Bursa fabricii	K. A.	K. A.	K. A.
		a	Darm			
GB 2071/12	Puten	b	Organpool: Leber, Milz, Niere	K. A.	K. A.	K. A.
		a	Organpool: Leber, Milz, Niere, Herz			
GB 2082/12	Puten	b	Darm	K. A.	K. A.	K. A.
		a	Organpool: Leber, Milz			
GB 2084/12	Puten	a	Organpool: Leber, Milz	Hepatitis, Splenitis, Enteritis, vereinzelt Polyserositis, Nachweis von <i>E. coli</i>	7.-12. LW	K. A.
		b	Darm			
GB 2085/12	Puten	a	Organpool: Leber, Milz	Auseinanderwachsen, Klagegeräusche, Futteraufnahme	6. LW	K. A.
		b	Darm			
GB 2100/12	Puten	a	Zäkaltonsillen	Auseinanderwachsen, Klagegeräusche, hochgradige Enteritis	2.-4. LW	K. A.
		b	Zäkaltonsillen			
GB 2150/12	Puten	a	Organpool: Leber, Milz	Hepatitis, Splenitis, Enteritis, vereinzelt Polyserositis, Nachweis von <i>E. coli</i>	7.-12. LW	K. A.
		b	Zäkaltonsillen			
GB 2203/12	Puten	a	Organpool: Leber, Milz	Auseinanderwachsen, Klagegeräusche, hochgradige Enteritis	2.-4. LW	K. A.
		b	Zäkaltonsillen			
GB 2331/12	Puten	a	Zäkaltonsillen	K. A.	K. A.	K. A.
		b	Organpool: Leber, Milz, Niere, Herz			
		c	Organpool: Trachea, Lunge			
		d	Sehnen			

Material und Methoden

Labor-Nr.	Tierart	Identifizierung	Probematerial	Vorbericht	Alter	Geschlecht
GB 2853/12	Puten	P17	Blinddarm	Hepatitis, Splenitis, Enteritis, vereinzelt Polyserositis, Nachweis von E. coli	7. LW	K. A.
GB 3158/12	Puten	a	Darm	Erhöhte Mortalität, Hepatitis, Hydroperikard	12. LW	weiblich
		b	Organpool: Leber, Milz, Herz, Lunge			
GB 3293/12	Puten	P19	Leber	Hepatitis	12./13. LW	männlich

<sup>1</sup>B = Broilerisolat, <sup>2</sup>P = Putenisolat, <sup>3</sup>K. A. = keine Angaben, <sup>4</sup>N. e. = Nicht erhoben, <sup>5</sup>LT = Lebenstag, <sup>6</sup>HHS = Hydropericard-Hepatitis-Syndrom, <sup>7</sup>IBH = Inclusion Body Hepatitis, <sup>8</sup>obB = ohne besonderen Befund, <sup>9</sup>IBV = Infektiöses Bronchitis Virus, <sup>10</sup>LW = Lebenswoche

### **3.1.2. Verwendete Referenzstämme**

Als Referenzmaterial dienten die FAdV-A Referenzstämme CELO (Chicken Embryo Lethal Orphan) und Ote. CELO wird als europäischer, Ote als japanischer Referenzstamm geführt. Beide entstammen der Institutssammlung und wurden ursprünglich von Dr. JB McFerran aus Stormont Belfast, Irland zur Verfügung gestellt.

### **3.1.3. Antiserum**

Für den indirekten Immunfluoreszenztest wurde ein FAdV-1 Antiserum (Stamm A2) des Instituts für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin eingesetzt.

### **3.1.4. Referenzdaten für die Sequenzanalyse**

Die Referenzdaten für die Sequenzanalyse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Material und Methoden

Tabelle 6: Aus der NCBI-GenBank entnommene Vergleichssequenzen für die Sequenzanalyse der untersuchten Gen-Loci

Virus Spezies	Virus (Sero) Typ	Bezeichnung	Herkunft	Referenzstamm/ Feldisolat	Bezeichnung (GenBank-Zugangsnummer)	Gen-Lokus
FAdV-A	FAdV-1	CELO	USA	Referenzstamm	U46933/1 NC_001720	Hexon, Long- und Short-Fiber
		W15	Polen	Feldisolat	KX247011	
		61/11z	Polen	Feldisolat	KX247012	
		JM1/1	Japan	Feldisolat	MF168407	
		K181/10	Südkorea	Feldisolat	JN181575	
		PLJ060/08	Polen	Feldisolat	GU952110	
		09-1567-9	Deutschland	Feldisolat	FN557181	
FAdV-B	FAdV-5	Ote	Japan	Referenzstamm	MK572847	Hexon
		08-3909	Polen	Feldisolat	FN557183	Long-Fiber
		08-3622	Großbritannien	Feldisolat	FN557186	Short-Fiber
		340	Irland	Referenzstamm	FN557182	Long-Fiber
		ON1	Kanada	Feldisolat	FN557184	Short-Fiber
FAdV-C	FAdV-10	C2B	USA	Referenzstamm	KC493646	Hexon, DNA-Polymerase
		314/2011 Debrecen	Ungarn	Feldisolat	GU188428	Hexon, DNA-Polymerase
		SR48, 17479/3b/239/2010 Debrecen	Japan, Ungarn	Referenzstamm, Feldisolat	EU979377	Hexon
FAdV-D	FAdV-3	SR49	Japan	Referenzstamm	KC750800	Hexon
		23548/II/263/2010 Debrecen	Ungarn	Feldisolat	EU979368, KC750793	Hexon
		A-2A	USA	Referenzstamm	EU979369	Hexon
	FAdV -9			Referenzstamm	KC750797	Hexon
				Referenzstamm	NC_000899/AC_000013	Hexon

Material und Methoden

Virus Spezies	Virus (Sero) Typ	Bezeichnung	Herkunft	Referenzstamm/ Feldisolat	Bezeichnung (GenBank-Zugangsnummer)	Gen-Lokus
		UF71	K. A. <sup>2</sup>	K. A.	EU979378	Hexon
	FAdV-11	15843/2010 Debreceen	Ungarn	Feldisolat	KC750789	Hexon
	FAdV-6	CR119	Japan	Referenzstamm	EU979372, AF508954	Hexon
	FAdV-7	YR36	Japan	Referenzstamm	EU979373	Hexon
		17479/2b/259/2010 Debreceen	Ungarn	Feldisolat	KC750792	Hexon
		TR59	Japan	Referenzstamm	EU979374	Hexon
FAdV-E	FAdV-8a	4350/2011 Debreceen	Ungarn	Feldisolat	KC750801	Hexon
		764	Nordirland	Referenzstamm	EU979375	Hexon
	FAdV-8b	14406/2011 Debreceen	Ungarn	Feldisolat	KC750803	Hexon
		HG	Kanada	Feldisolat	GU734104	DNA-Polymerase
TAdV-B	TAdV-1	D90/2	Ungarn	Feldisolat	GU936707	Hexon, DNA-Polymerase
TAdV-C	TAdV-4	TN1	Nordirland	Feldisolat	KF477312	Hexon, DNA-Polymerase
TAdV-D	TAdV-5	D1648	Ungarn	Feldisolat	KF477314	Hexon, DNA-Polymerase
-	TAdV-2	TAV-2	Nordirland	Referenzstamm	GU936708	Hexon
PsAdV-B	PsAdV-1	GB 818-3	Spanien	Feldisolat	EF442329	Hexon, DNA-Polymerase
PiAdV-A	PiAdV-1	IDA4	Niederlande	Feldisolat	FN824512	Hexon
FaAdV-A	FaAdV-1	K. A.	USA	Feldisolat	AY683541	Hexon
Gull AdV-A	Gull AdV-1	LA010815.1	Niederlande	Feldisolat	KC309439	Hexon
DAdV-B	DAdV-2	GR	Frankreich	Feldisolat	KJ469653	Hexon

Material und Methoden

Virus Spezies	Virus (Sero) Typ	Bezeichnung	Herkunft	Referenzstamm/ Feldisolat	Bezeichnung (GenBank-Zugangsnummer)	Gen-Lokus
GoAdV-A	GoAdV-4	P29	Ungarn	Feldisolat	JF510462	Hexon, DNA-Polymerase
DAdV-A	DAdV-1	127	Nordirland	Feldisolat	NP_044710 NC_001813	Hexon DNA-Polymerase
Great tit AdV-A	Great tit AdV-1	5957/SZ	Ungarn	Feldisolat	ACW84430, ACW84422	Hexon
TAdV-A	TAdV-3	K. A.	Israel	Feldisolat	AF074946, NP_047393 AAC64523	Hexon DNA-Polymerase
Raptor AdV-A	Raptor AdV-1	K. A.	Großbritannien	Feldisolat	NC_015455 YP_004414808	Hexon DNA-Polymerase
Skua AdV-A	Skua AdV-1	T03	Antarktis	Feldisolat	NC_016437 ADP30814	Hexon DNA-Polymerase

<sup>1/</sup> = unter beiden Nummern geführt, <sup>2/</sup>K. A. = keine Angabe

### 3.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät, Verbrauchsmaterial	Hersteller
Kolbenhubpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Isolierung und virologische Untersuchung</b>	
Bruteier von Hühnern der Rasse „White Leghorn“	VALO Biomedica GmbH, Osterholz-Scharmbeck, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Brutschrank Hera Cell 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Columbia Agar mit Schafblut	Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
Filtereinheit, 0,45 µl/0,2µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Lamina Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Magnetrührer, Ikamag Reo	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroskop Leitz Diavert	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Leitz Aristoplan	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ultra Turrax	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Zellkulturgefäß: Flaschen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturgefäß: Schälchen	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturgefäß: 96-Well System	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, 50ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien für die molekularbiologische Untersuchung</b>	
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Elektrophoresesystem: Gelkammern und Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Lamina Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrowelle	Severin, Sundern, Deutschland
QIACube	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
T3000 Thermocycler	Biometra, Analytik Jena, Jena, Deutschland
Thermoblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UV Transluminator Typ UVT2053, 302 nm, mittelwellig	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## Material und Methoden

Gerät, Verbrauchsmaterial	Hersteller
Geräte und Verbrauchsmaterialien für den Embryoletalitätstest	
Bruteier von Hühnern der Linie „White Leghorn“	VALO Biomedica GmbH, Osterholz-Scharmbeck, Deutschland
Einmalkanülen 20Gx1 1/2	Covetrus DE GmbH, Hamburg, Deutschland (ehemals Henry Schein VET GmbH, Hamburg, Deutschland)
Einmalspritzen 1 ml	Covetrus DE GmbH, Hamburg, Deutschland (ehemals Henry Schein VET GmbH, Hamburg, Deutschland)
Infektionsbrutschrank	J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co KG, Verl-Kaunitz, Deutschland
Vorbrutschrank Hemel	J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co KG, Verl-Kaunitz, Deutschland

### 3.1.6. Reagenzien und Kits

Tabelle 8: Medien, Reagenzien und Kits

Medium/Reagenz/Kit	Hersteller
Medien und Reagenzien für die Virusisolierung und Virusvermehrung, Virustitration und den Embryoletalitäts-Assay	
Fetales Kälberserum	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Ehemals Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Medium 199	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Ehemals Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Konjugat, FITC-markiertes anti-Rabbit IgG von der Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Ehemals Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Tryptosephosphatbouillon	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Ehemals Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Medien, Reagenzien und Kits für die molekularbiologische Untersuchung	
1 kbp-DNA Größenmarker	Lifetechnologies TMGibco Brl, Galthersburg, USA
100 bp-DNA Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Ethidiumbromid, 1 %	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads:</b> PCR-Gefäße mit Puffer-, Nukleotid- und Polymerasemix in lyophilisierter Form. PuReTaq-DNA-Polymerase Tris-HCL (pH 9,0) KCL MgCl <sub>2</sub> Bovines Serumalbumin (BSA)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland

## Material und Methoden

Medium/Reagenz/Kit	Hersteller
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat; dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	
<b>MinElute Gel Extractions Kit</b> Puffer QG Puffer PE Puffer Puffer EB Säulen und Auffangbehälter	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Primer	Biomers, Ulm, Deutschland
<b>QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)</b> Multiplex PCR Master Mix HOT StarTaq DNA Polymerase Multiplex PCR Puffer mit 6 mM MgCL2 dNTP-Mix Q-Solution	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<b>QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit:</b> QIAamp MinElute Columns Collection Tubes (2 ml) AL Puffer AW1 Puffer (Konzentrat) AW2 Puffer (Konzentrat) Protease Resuspensionspuffer Carrier RNA QIAGEN® Protease	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Restriktionsendonuklease <i>Hin</i> fl (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Restriktionsendonuklease <i>Hae</i> III (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Nicht besonders aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Carl-Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland und Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland bezogen.

### 3.1.7. Lösungen und Medien

#### 3.1.7.1. Lösungen und Medien für die virologischen Untersuchungen

##### Anzuchtmedium

Medium 199

10% Tryptosephosphatboullion

10% Fetales Kälberserum

ErhaltungsmEDIUM

Wie Anzuchtmedium, aber nur 2% Fetales Kälberserum

##### Glycerin-PBS

Glycerin und PBS im Verhältnis 1:9

## Material und Methoden

### PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, phosphate buffered saline), pH 7,4

8g NaCl  
0,2g KCl  
1,15g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat  
0,2g Kaliumdihydrogenphosphat  
ad 1000ml Aqua dest.

### Trypsin-Gebrauchslösung (PBS-T)

1ml Trypsin-Stammlösung  
100ml PBS

### Trypsin-Stammlösung

4g NaCl  
0,2g KCl  
25g Trypsin, 1:250  
ad 475ml Aqua dest.

## **3.1.7.2. Lösungen und Medien für die molekularbiologischen Untersuchungen**

### DEPC H<sub>2</sub>O, 0,1%

10µl Diethyl Pyrocarbonate  
ad 100 ml Aqua dest.  
12h bei Raumtemperatur inkubieren, autoklavieren

### Elektrophorese-Laufpuffer (TBE, 1x)

100 ml TBE, 10x  
ad 1000 ml Aqua dest.

### Ethidiumbromid-Lösung

5µl Ethidiumbromid, 1%  
ad 100 ml DEPC H<sub>2</sub>O

### Größenstandard 1 kbp

30 µl 1 kbp-DNA Ladder  
50 µl Probenladepuffer  
200 µl Aqua bidest.

### Größenstandard 100 bp

## Material und Methoden

30 µl 100 bp-DNA Ladder

30 µl Probenladepuffer

185 µl Aqua bidest.

### Probenladepuffer in TBE-Puffer (10x)

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol

30,0 % Glycerin

In TBE Puffer (4x)

### TBE (Tris-Borat-Elektrophoresepuffer), 10x, pH 7,5-7,8

108g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

55g Borsäure

9,3g Titriplex III

ad 1000 ml Millipore H<sub>2</sub>O

## 3.1.8. Programme und Software

Tabelle 9: Verwendete Software

Software	Hersteller/Referenz
Bio Edit, Version 7.2	Hall 1999
Chromas Lite, Version 2.6.6	Technelysium Pty Ltd
Geldokumentation und Software ImageLab V.5.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
MEGA6	Tamura et al. 2013
MEGA X	Kumar et al. 2018
Primer-BLAST	Ye et al. 2012
SPSS 25	IBM Statistics
PhyML 3.0	Guindon et al. 2010

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Isolierung und virologische Methoden

#### 3.2.1.1. Virusisolierung und Virusvermehrung

##### Probenaufbereitung

Eingesandte Organproben wurden entweder einzeln oder als Poolprobe bearbeitet. Zur Herstellung einer 20%igen Organsuspension wurden die Organproben mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mittels Ultra Turrex homogenisiert. Die

## Material und Methoden

Suspension wurde für 30 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend abwechselnd bei -20 °C und Raumtemperatur drei Frier-Tau-Schritten unterzogen. Die Organsuspension wurde bei 3000 rpm für 15 min zentrifugiert und die erhaltenen Überstände zuerst mit einem Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm und anschließend mit einem Filter mit 0,2 µm Porengröße filtriert. Das Filtrat wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

### Herstellung primärer Hühnerembryoleberzellkulturen

Zur Herstellung von Hühnerembryoleberzellen wurden elf Tage SPF - Hühnerembryonen verwendet. Die Embryonen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und dekapitiert. Die Lebern wurden extrahiert, anschließend grob homogenisiert und mit PBS gewaschen, bis der Überstand klar blieb. Anschließend wurden die Leberhomogenate mit trypsinhaltigen PBS (PBS-T) auf einem Magnetrührer für 30 min bei Raumtemperatur trypsinisiert. Der zellhaltige Überstand wurde entnommen und der Trypsinierungsvorgang so lange wiederholt, bis der Zellverbund vollständig gelöst war. Die Überstände wurden bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in Erhaltungsmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde zur Abtrennung grober Bestandteile durch sterile Baumwollgaze filtriert und erneut bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in ein definiertes Volumen Anzuchtmedium resuspendiert und in das entsprechende Kulturgefäß eingesät (Tabelle 10).

Tabelle 10: Verwendete Zellsuspensionsvolumina in verschiedenen Zellkulturgefäßen

Zellkulturgefäß	Wachstumsfläche (cm <sup>2</sup> )	Zugegebenes Volumen Zellsuspension (ml)	Verwendungszweck
Flasche	25	8	Isolierung und Passagierung
Schälchen mit zwei Deckgläschen	22,1	4,5	Indirekter Immunfluoreszenztest
96 well Platte	0,322	0,2	Virustitration

Nach 24 h bei 37 °C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre hatte sich ein einschichtiger Zellrasen gebildet.

### Beimpfung der Zellkulturen

Sobald sich ein konfluenter Monolayer im Kulturgefäß gebildet hat, wurde das Erhaltungsmedium entfernt und eine definierte Menge Probenmaterial vorsichtig unter Schonung des Zellrasens in das jeweilige Zellkulturgefäß eingebracht (Tabelle 11).

## Material und Methoden

Es folgte eine Inkubation der Proben über 1 h bei 37 °C und einer 5%-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Anschließend wurde vorsichtig Erhaltungsmedium hinzugefügt und weiter unter den genannten Bedingungen inkubiert.

Tabelle 11: Inokulationsvolumen der jeweiligen Zellkulturgefäße

Zellkulturgefäß	Inokulationsvolumen (ml)	Menge des Erhaltungsmediums
Flasche (25 cm <sup>2</sup> )	1	8
Schälchen mit zwei Deckgläschen (22,1 cm <sup>2</sup> )	0,1 je Deckgläschen	5
96-well Platte (0,322 cm <sup>2</sup> )	0,01	0,3

### Virusisolierung und Virusvermehrung

Nach der Infektion mit den Organfiltraten wurden die Zellkulturen täglich mikroskopisch (125-fache Vergrößerung) auf das Vorhandensein eines zytopathogenen Effektes (CPE) hin untersucht. Die Beurteilung erfolgte stets im Vergleich zu einer nicht-infizierten Zellkontrolle. Bei Vorhandensein eines CPEs bzw. spätestens nach fünf Tagen wurden die infizierten Zellen durch dreimaliges Friertauen (-20 °C/ Raumtemperatur) lysiert, um enthaltenes Virus freizusetzen. Das Zelllysat wurde bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C aufbewahrt. Wenn innerhalb der fünf Tage Beobachtungszeit kein CPE auftrat, wurden bis zu drei weitere Passagen durchgeführt. Hierfür wurde 1 ml des Zelllysates auf frische HEL-Kulturen aufgebracht und wie zuvor beschrieben weiterbehandelt. Trat nach vier Passagen kein CPE auf, so wurde die Virusisolierung als negativ beurteilt.

#### **3.2.1.2. Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)**

Zum Nachweis von Aviadenovirus-Antigenen wurde ein gruppenspezifischer IIFT nach den Angaben von Adair et al (1980) durchgeführt.

Hierzu wurden zwei Deckgläschen in eine Zellkulturschale gelegt und mit HEL-Kulturen beimpft. Nach 24 h bei 37 °C in einer 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre hatte sich ein konfluenter einschichtiger Zellrasen gebildet.

Das Medium wurde entfernt und die Deckgläschen mit je 0,1 ml Virusmaterial beimpft. Nach 1 h unter den o.g. Inkubationsbedingungen wurde vorsichtig 5 ml Erhaltungsmedium hinzu pipettiert und weiter bebrütet.

Nach Ausbildung eines schwachen CPE (nach ca. 12 bis 24 h) wurden die Deckgläschen aus der Zellkulturschale entnommen, mit PBS gewaschen und trocken gelassen. Anschließend wurden sie 8 min in Aceton fixiert und es erfolgte ein weiterer Trocknungsschritt. Danach

## Material und Methoden

wurden die Deckgläschen mit PBS befeuchtet und auf jedes wurde 0,1 ml von einem 1:30 verdünnten Antiserum gegen FAdV-1 aufgetragen. Nach 30-minütiger Inkubation abgedunkelt bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen zweimal 10 min in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde jeweils 0,1 ml eines 1:100 verdünnten mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-markierten anti-rabbit IgG auf die Deckgläschen gegeben. Der Inkubations- und Waschschrift erfolgte analog des ersten.

Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite auf ein mit Glycerin-PBS angefeuchteten Objektträger gelegt und im Fluoreszenzmikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung begutachtet.

### 3.2.1.3. Virustitration

Das Virusmaterial wurde in  $\log_{10}$ -Schritten von  $10^0$  bis  $10^{-9}$  in PBS verdünnt.

Es wurden HEL-Kulturen in 96-Well Zellkulturplatten verwendet. Nach Bildung eines konfluenten Monolayers wurde das Anzuchtmedium vorsichtig entfernt. Anschließend wurde die Verdünnungsreihe im fünffachen Ansatz mit je 0,01 ml je Kavität aufgetragen und bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  für 1 h inkubiert. Für die Zellkontrolle (NK) wurde PBS verwendet.

Nach abgeschlossener Inkubation wurde vorsichtig 0,3 ml Erhaltungsmedium hinzu pipettiert und unter o.g. Bedingungen weiter inkubiert. Die erste Begutachtung des Zellrasens erfolgte am dritten Bebrütungstag, die abschließende Beurteilung ereignete sich am Fünften. Es wurden die Wells dokumentiert, die einen eindeutigen CPE aufwiesen. Die Berechnung der Virustiter erfolgte mit Hilfe der Tissue Culture Infection Dose (TCID)<sub>50</sub>/ml nach Spearman und Kaerber unter Verwendung der folgenden Formel (Villegas 1998):

$$TCID_{50} = x + \frac{1}{2} d - \frac{d \sum r_1}{n}$$

x = höchste getestete Verdünnung

d = Verdünnungsfaktor

$\sum r_1$  = Summe der nicht-infizierten Wells

N = Summe der getesteten Wiederholungen

Bei einer  $\log_{10}$ -Verdünnung verkürzt sich die Formel auf:

$$TCID_{50} = x + 0,5 - \frac{\sum r_1}{n}$$

Die höchste Verdünnungsstufe war stets  $10^{-9}$  und es erfolgte immer ein fünffach-Ansatz:

$$TCID_{50} = 9,5 - \frac{\sum r_1}{5}$$

### 3.2.2. Molekularbiologische Untersuchungen

#### 3.2.2.1. DNA-Extraktion

Die DNA wurde direkt aus Zellkulturmaterial, welches einen eindeutigen CPE aufwies, extrahiert. Die Extraktion erfolgte vollautomatisch (QIAgen Cube) unter Verwendung des Blood and body fluid spin – Protokolls. Es wurde jeweils 200  $\mu$ l Zelllysat eingesetzt. Die Bestückung des Geräts wurde entsprechend der Herstelleranweisungen vorgenommen. Die benötigten Puffer (AVL-Puffer, Ethanol absolut reinst, Waschpuffer AW1 und AW2 und Elutionspuffer AE) wurden an ihre zugewiesenen Stellen gestellt und der Vorgang gestartet. Nach einer von der Probenanzahl abhängigen Extraktions-Dauer erfolgte die Elution der DNA in 100 $\mu$ l Elutionspuffer AE.

Es wurde immer eine Extraktionskontrolle (PBS) durchgeführt.

#### 3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur molekularbiologischen Charakterisierung der Virusisolate wurden verschiedene konventionelle PCR-Verfahren angewandt. Aufgrund gleicher Methodik werden diese PCR-Verfahren nachfolgend gemeinsam beschrieben. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 12 dargestellt.

Die Untersuchung auf Aviadenovirus-spezifische DNA erfolgte unter Verwendung der zuvor beschriebenen Primer HexA und HexB (HexAB-PCR), die in einem konservierten Genabschnitt des Hexogens der Aviadenoviren lokalisiert sind (Meulemans et al. 2001).

Für die Amplifikation des Long- und Short-Fibergens der FAdV-A Isolate wurden verschiedene Protokolle verwendet. Die Long-Fiber-PCR und die Short-Fiber-PCR beruht auf der Veröffentlichung von (Marek et al. 2010b). Aufgrund der Länge des Amplifikates der Long-Fiber-PCR wurden zur Sequenzierung zusätzliche Fragmente amplifiziert (Long-Fiber1-PCR, Long-Fiber2-PCR, Long-Fiber3-PCR) Das Primerdesign erfolgte unter Verwendung des Programmes Primer-BLAST (Ye et al. 2012).

Für ausgewählte Isolate der Spezies TAdV-C und TAdV-D wurde ein Fragment der DNA-Polymerase analysiert. Hierzu wurde eine Consensus-Sequenz aus TAdV-4 (KF477312) und

## Material und Methoden

TAdV-5 (KF477313) gebildet und Primer mit Hilfe von Primer-BLAST abgeleitet (Ye et al. 2012).

Die verwendeten Primer wurden bei biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Polarität	Nukleotid- position	Amplifikat- größe	Primer- konzentration	Referenz
HexAB-PCR, Zielgen: Hexon der Aviadenoviren (Genuspezifisch)						
Hex A	CAARITTCAGRCAGACGGT	V <sup>1</sup>	144-161 <sup>3</sup>	897 bp	Je 10 pmol/µl	Meulemans et al. 2001
Hex B	TAGTGATGMC GSGACATCAT	R <sup>2</sup>	1041-1021 <sup>3</sup>			
Long-Fiber-PCR, Zielgen: Long-Fiber von FAdV-A						
Flong	TCATGAACGAGGAGGTTCCC	V	28112-28131 <sup>4</sup>	2382 bp	Je 7,5 pmol/µl	Marek et al. 2010
Rlong	GTTCAATTGATAGTACCCAG	R	30478-30497 <sup>4</sup>			
Long-Fiber1-PCR, Zielgen: Long-Fiber von FAdV-A						
Flong1	ACCATTGCACCTACTACGGA	V	28990-29009 <sup>4</sup>	829 bp	Je 7,5 pmol/µl	Primerdesign auf Basis der veröffentlichten Sequenz von CELO (U46933)
Rlong1	GCACCATTGGTAATGGTAAA	R	29800-29819 <sup>4</sup>			
Long-Fiber2-PCR, Zielgen: Long-Fiber von FAdV-A						
Flong2	CCTTACTCTACACTCCCGCC	V	29630-29649 <sup>4</sup>	867 bp	Je 7,5 pmol/µl	Primerdesign auf Basis der veröffentlichten Sequenz von CELO (U46933)
Rlong	GTTCAATTGATAGTACCCAG	R	30478-30497 <sup>4,2</sup>			
Long-Fiber3-PCR, Zielgen: Long-Fiber von FAdV-A						
Flong	TCATGAACGAGGAGGTTCCC	V	28112-28131 <sup>4</sup>	1100 bp	Je 7,5 pmol/µl	Primerdesign auf Basis der veröffentlichten Sequenz von CELO (U46933). Rlong4 wurde ausschließlich zur Sequenzierung eingesetzt.
Rlong3	GGAGCTGCCAGAGCTGACT	R	29193-29212 <sup>4</sup>			
Rlong4 <sup>5</sup>	GTCCAGGTTGAGGCAGAGAC	R	28694-28713 <sup>4</sup>	-	-	
Short-Fiber-PCR, Zielgen: Short-Fiber von FAdV-A						
Fshort	GCATGGCTGACCAGAAAAGGA	V	30524-30544 <sup>4</sup>	1240 bp	Je 7,5 pmol/µl	Marek et al. 2010
Rshort	TTGTTCAGACCGTAACGGGGG	R	31752-31772 <sup>4</sup>			
DNA-Polymerase-PCR, Zielgen: DNA-Polymerase von TAdV-C und TAdV-D						
DNA-pol-f	CCTCGTGACGCTGCCAA	V	7478-7494 <sup>5</sup>	1207 bp	Je 7,5 pmol/µl	Primerdesign auf Basis einer Konsensus-Sequenz von TAdV-4

Material und Methoden

Primer	Sequenz (5'-3')	Polarität	Nukleotid- position	Amplifikat- größe	Primer- konzentration	Referenz
DNA- pol-r	AACGAAGCGCTATACGACGA	R	8662-8681 <sup>5</sup>			(KF477312) und TAdV-5 (KF477313)

<sup>1</sup>V: vorwärts gerichteter Primer, <sup>2</sup>R: rückwärts gerichteter Primer

Die Nukleotidpositionen beziehen sich auf folgende Sequenzen:

<sup>3</sup> Konsensus-Sequenz von FAdV-A und zwei FAdV-E-Sequenzen (Meulemans et al. 2001)

<sup>4</sup> veröffentlichte Sequenz von CELO (U46933)

<sup>5</sup> veröffentlichte Sequenz von TAdV-4 (KF477312)

## Material und Methoden

Für die PCR-Amplifikation mit Ausnahme der Long- und Short-Fiber-PCR wurden die PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads mit einem Gesamtvolumen von 25 µl benutzt. Eingesetzt wurden die jeweiligen Primerpaare in einem Volumen von 1 µl. Für die HexAB-PCR wurde jeweils 10 µl DNA-Eluat verwandt. Für die Amplifikation des Long- und Short-Fibergens sowie des DNA-Polymerasegens wurden jeweils 5 µl DNA-Eluat eingesetzt. Die Differenz des PCR-Ansatzes wurde mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Es wurde je eine Negativ-, eine Positiv- und eine Extraktionskontrolle mitgeführt.

Die Durchführung der Long- und Short-Fiber-PCR erfolgte unter Verwendung des Taq PCR Master Mix Kits mit einem Endvolumen von 25 µl hergestellt. In die PCR Gefäße wurden jeweils 12,5 µl Taq PCR Mastermix sowie 1 µl des jeweiligen Primermixes pipettiert. Es wurden 5 µl DNA-Eluat und 6,5 µl nukleasefreies Wasser eingesetzt.

Die verschiedenen Arbeitsschritte (Herstellung des Primer- bzw. Mastermixes, Zugabe der DNA und Amplifikation) erfolgten in getrennten Räumen. Die einzelnen Komponenten (Primer- bzw. Mastermix, DNA sowie Positivkontrollen) wurden zwischenzeitlich auf Eis gelagert. Die Amplifikation wurde im Thermocycler T3000 unter den in der Tabelle 13 genannten Temperaturprofilen durchgeführt.

Tabelle 13: Temperaturprofile der eingesetzten PCR-Verfahren

PCR-Schritt		Dauer (min:sek)	Temperatur (°C)
<b>HexAB-PCR</b>			
Initiale Denaturierung		2:00	94
40 Zyklen aus	Denaturierung	1:00	94
	Annealing	1:00	62
	Elongation	1:30	72
Finale Elongation		2:00	72
<b>Long-Fiber-PCR, Short-Fiber-PCR</b>			
Initiale Denaturierung		2:00	94
30 Zyklen aus	Denaturierung	0:15	94
	Annealing	0:30	45
	Elongation	2:30	72
Finale Elongation		7:00	72
<b>Long-Fiber1-PCR, Long-Fiber2-PCR, Long-Fiber3-PCR</b>			
Initiale Denaturierung		2:00	94
30 Zyklen aus	Denaturierung	0:15	94
	Annealing	0:30	55
	Elongation	1:30	72
Finale Elongation		7:00	72

## Material und Methoden

PCR-Schritt		Dauer (min:sek)	Temperatur (°C)
DNA-Polymerase-PCR			
Initiale Denaturierung		2:00	94
30 Zyklen aus	Denaturierung	0:15	94
	Annealing	0:30	50
	Elongation	2:30	72
Finale Elongation		7:00	72

Vor und nach der Amplifikation wurden die Proben jeweils kurz anzentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei 7 °C gelagert.

### 3.2.2.3. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarose-Gel gegossen. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 100 ml 1 x TBE-Puffer gelöst und für ca. 4 min in der Mikrowelle aufgekocht. Die Gele wurden je mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt und nach dem Abkühlen auf horizontale Gelträger gegossen. Für die Detektion der Amplifikation wurden je 5 µl PCR-Produkt mit 0,5 µl Probeladepuffer gemischt und nach Polymerisation des Gels in die Vertiefungen pipettiert. Zusätzlich wurde 8 µl eines Markers (100 bpl bzw. 1 kbpl) aufgebracht. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer genutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 Volt über 90 min. Die Auswertung des Gels erfolgte unter UV-Licht und die Bilddokumentation mittels ImageLab.

### 3.2.2.4. Restriktionsenzymanalyse (REA)

Die Produkte der Fiber-PCR Verfahren wurden einer Restriktionsenzymanalyse (REA) unterzogen. Für das Produkt der Long-Fiber-PCR wurde die Endonuklease *HinfI* entsprechend der Veröffentlichungen von Okuda et al. (2006) und Marek et al. (2010) gewählt. Für das Short-Fiber-PCR-Produkt wurde *Hae* III anhand der bekannten CEL0 (U46933) und Ote (FN557186) Sequenzen gewählt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Verwendete Restriktionsendonukleasen und ihre Spaltstellen

Enzym (U/µl)	Spaltstelle (/)	PCR-Produkt
<i>HinfI</i> (10 U/µl)	5'-G/ANTC-3' 3'-CTNA/G-5'	Long-Fiber
<i>Hae</i> III (10 U/µl)	5'-GG/CC-3' 3'-CC/GG-5'	Short-Fiber

## Material und Methoden

Im Ansatz wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl des entsprechenden Enzyms und 2 µl des vom Hersteller empfohlenen enzymabhängigen Reaktionspuffer versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für ein Gesamtvolumen von 20 µl entsprechend mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei 37 °C für 90 min auf einem Thermoblock inkubiert. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese auf einem 3%igen Agarosegel mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt aufgetrennt. Dazu wurde der Probenansatz mit 2 µl Probeladepuffer versetzt. Zusätzlich wurde als Größenstandard der 100 bpl aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die Gelelektrophorese fand über einen Zeitraum von 2 h bei 60 Volt statt. Auswertung und Dokumentation erfolgten analog der PCR-Produktanalyse (3.2.2.3.).

### 3.2.2.5. Gelextraktion und Sequenzierung

Alle erhaltenen PCR-Produkte wurden zur weiteren Analyse sequenziert.

Hierzu erfolgte im ersten Schritt eine Gelextraktion. Die kompletten PCR-Produkte wurden mit 2,5 µl Probeladepuffer auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte analog der in 3.2.2.3. beschriebenen Schritte. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die PCR-Produkte auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht, die gewünschte Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein 2 ml Zentrifugengefäß übertragen und gewogen. Die anschließende Aufreinigung erfolgte nach Herstelleranweisungen mittels MinElute Gel Extraction Kit. Drei Volumeneinheiten Gel-Lösungspuffer (Puffer QG) wurden zu einem Volumen Gel hinzu pipettiert und das Gemisch anschließend für 10 min bei 50 °C auf einem Thermoblock inkubiert. Alle 2 bis 3 min wurde das Röhrchen sorgfältig gemischt, um das Gel besser zu lösen. Als nächstes wurde eine Volumeneinheit Isopropanol in das Röhrchen pipettiert und von Hand vorsichtig geschwenkt. Pro Probe wurde eine Min-Elute Säule in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen platziert und das gesamte Probenvolumen auf die Säule überführt. Anschließend wurden die Säulen für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen und die Säule im gleichen 2 ml Röhrchen belassen. 500 µl Puffer QG wurden auf die Säule pipettiert, ein erneuter Zentrifugationsschritt bei gleichen Bedingungen durchgeführt und der Durchfluss erneut verworfen. Nun wurden 700 µl Puffer PE auf die Säule pipettiert und für 2 bis 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgten wieder zwei Zentrifugationsschritte analog des ersten mit Verwurf des Durchflusses. Nun wurde die Säule in ein 1,5 ml Zentrifugengefäß überführt, mit 11 µl Elutionspuffer EB versetzt und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch eine abschließende Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm wurde die DNA eluiert.

Zur Kontrolle wurde 1 µl des Eluats mit 0,1 µl Probeladepuffer vermischt und mit nukleasefreiem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 5 µl aufgefüllt und eine Elektrophorese mit

anschließender Auswertung und Bilddokumentation wie unter 3.2.2.3. beschrieben durchgeführt.

10 µl des aufgereinigten PCR-Produktes wurde mit 4 µl des vorwärts bzw. des rückwärts gerichteten Primers (je 5 pmol/µl) versetzt und zur Sanger-Sequenzierung in ein externes Labor (LGC Genomics GmbH, Berlin, Germany) versendet.

Abweichend von den o.g. Schritten wurde die Sequenzierung in einzelnen Fällen in einem Mikrotiterplatten Verfahren durchgeführt. Hierzu wurden je 5 µl nicht-aufgereinigtes PCR Produkt und 5 µl H<sub>2</sub>O in die Vertiefungen einer 96-Well Platte aufgetragen. Die Wells einer zweiten Platte wurde mit je 15 µl Primer (5 pmol/µl) bestückt. Die Aufreinigung und Sanger-Sequenzierung erfolgte durch LGC Genomics GmbH (Berlin, Germany).

Alle Proben wurden sowohl in 5' → 3' als auch in 3' → 5' Richtung sequenziert.

### **3.2.2.6. Sequenzanalyse und phylogenetische Untersuchungen**

Die bei der Sequenzierung erhaltenen Chromatogramme wurden mit der Software Chromas Lite (Version 2.6.6) überprüft, und bei gut befundener Qualität wurde ein Datenbankabgleich der Sequenzen in der GenBank durch eine BLAST Analyse durchgeführt (Altschul et al. 1990).

Aufgrund ihrer Länge wurden die Nukleotidsequenzen der Long-Fiber-PCR (2382 bp) in vier überlappenden Teilfragmenten sequenziert und zu einer vollständigen Sequenz zusammengefügt. Sequenzen der HexAB-PCR, der Long- und Short-Fiber-PCR sowie der DNA-Polymerase-PCR wurden in jeweils einem Datensatz zusammengefügt und die Primerbindungsstellen entfernt. Für die phylogenetischen Untersuchungen wurden die erhaltenen Sequenzen mit Sequenzen aus der GenBank ergänzt. Alle im Datensatz befindlichen Nukleotidsequenzen wurden auf eine gleiche Länge gekürzt. Die Bearbeitung der Sequenzen sowie die Erstellung der Datensätze erfolgte mittels BioEdit. Die erhaltenen Sequenzen wurden in der GenBank veröffentlicht.

Aus den Nukleotidsequenzen wurden Aminosäuresequenzen durch BioEdit generiert. Die Datensätze wurden mit dem ClustalW – Modell unter Verwendung der Standardeinstellungen aliniert (Thompson et al. 1994).

Die Konstruktion der phylogenetischen Bäume erfolgte im Programm MEGAX bzw. online mittels PhyML unter Verwendung der erstellten Alignments (Guindon et al. 2010; Kumar et al. 2018). Für die phylogenetischen Analysen wurde das Maximum Likelihood Verfahren eingesetzt. Die Schätzung der genetischen Distanz erfolgte durch unkorrigierte p-Distanzen (Lemey 2009). Die Robustheit der konstruierten phylogenetischen Bäume wurde mittels Bootstrap-Verfahren mit 1000 Wiederholungen überprüft (Felsenstein 1985). Die Darstellung

und Annotation der phylogenetischen Bäume erfolgte unter Verwendung der Programme MEGA6 bzw. MEGAX.

### 3.2.3. Embryoletalitäts-Assay

Für den Embryoletalitäts-Assay (ELA) wurden zwei zufällig ausgewählte FAdV-A Broilerisolate sowie die Referenzstämme CELO und Ote in je drei verschiedenen Infektionsdosen ( $10^2$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml,  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml,  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml) getestet. Zusätzlich wurde eine mit PBS inokulierte Kontrollgruppe (NC) mitgeführt. Pro Versuchsgruppe wurden 17 embryonierete spezifisch-pathogenfreie (SPF) Hühnereier verwendet (Tabelle 15).

Tabelle 15: Übersicht der Versuchsgruppen

Feldisolat/ Referenzstamm	Verwendete Passage	Infektionsdosis (TCID* <sub>50</sub> /0,1 ml)	Versuchsgruppe
B5	4. HEL	$10^2$	A1
		$10^3$	A2
		$10^4$	A3
B14	4. HEL	$10^2$	B1
		$10^3$	B2
		$10^4$	B3
CELO	2. HEL	$10^2$	C1
		$10^3$	C2
		$10^4$	C3
Ote	4. HEL	$10^2$	D1
		$10^3$	D2
		$10^4$	D3
NC	-	-	NC

\*TCID = Tissue Culture Infective Dose

Die Eier wurden für 7 Tage bei 37,8 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % bebrütet und regelmäßig gewendet. Am siebten Bebrütungstag wurden sie geschickt und abgestorbene Embryonen aussortiert. Eier mit lebenden Embryonen wurden zur Dottersack-Beimpfung vorbereitet. Hierzu wurde mit einem Bleistift der Luftkammerrand angezeichnet und am stumpfen Pol der Mittelpunkt zur Inokulation markiert. Zudem erfolgte eine Kennzeichnung der Eier (Versuchsgruppe, fortlaufende Nummer 1 – 17). Die Eischale wurde am Inokulationspunkt mit Jod desinfiziert. An den Markierungen wurde mit Hilfe eines Metallornes ein Loch gebohrt. Der Dorn wurde zuvor in Ethanol getaucht und abgeflammt. 0,1 ml des Virusmaterial wurden 3 cm tief in der senkrechten Längsachse des Eis inokuliert. Das Loch wurde anschließend mit Paraffin verschlossen.

## Material und Methoden

Die inokulierten Bruteier wurden bei 37,8 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % ohne Wendung für 7 Tage weiter bebrütet. Die Anzahl der abgestorbenen Embryonen wurde im Abstand von 12 Stunden nach Infektion (hours post infection, hpi) durch Schieren erhoben. Embryonen, die nach 168 hpi noch lebten, wurden durch Hypothermie getötet. Zur Überprüfung der eingesetzten Dosis wurde am Tag der Eiimpfung eine Titration des eingesetzten Virus wie unter 3.2.1.3 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Sterilitätskontrolle der Inokula auf Columbiaagar mit Schafblut, der aerob bei 37 °C für 24 h bebrütet wurde.

### Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 25 (IBM Statistics). Zuerst wurde ein Test auf Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk-Tests durchgeführt. Dieser ermöglicht eine Überprüfung bei kleineren Stichproben. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

Die Überlebensanalyse wurde mittels Kaplan-Meier-Schätzer durchgeführt (Kaplan und Meier 1958). Die Zielvariable war der Todeszeitpunkt der Embryonen. Daten der Embryonen, die den Beobachtungszeitraum von 168 hpi überlebten, wurden zensiert. Für den Vergleich der Überlebenszeitkurven nach Kaplan-Meier wurde nachfolgend der Log-Rank-Test bzw. der generalisierte Wilcoxon-Test durchgeführt. Der Log-Rank-Test gilt als Standardmethode beim Vergleich von Überlebenszeiten. Er kann allerdings nur angewendet werden, wenn die Proportionalität der Daten gegeben ist. Waren die Daten nicht-normalverteilt, so wurde der generalisierte Wilcoxon-Test durchgeführt. Dieser hat bei nicht-proportionalen Daten die größere Power (Ziegler et al. 2007).

Das Signifikanzniveau wurde beim Gesamtvergleich mit  $p < 0,05$  festgelegt. Zur Verhinderung der Alpha-Fehler Kumulierung durch multiples Testen wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Auswertung der Ergebnisse der Virusisolierung und des indirekten Immunfluoreszenztests

Im Jahr 2011 wurden 33 Einsendungen aus Broilerbeständen zur Virusisolierung an das Institut für Geflügelkrankheiten gesandt. Diese Einsendungen enthielten zum Teil verschiedene Organe. Je nach Fragestellung wurden die Proben gepoolt oder einzeln virologisch untersucht. Aus dem Probenmaterial von 20 Einsendungen gelang eine Virusanzucht in Hühnerembryoleberzellen. In allen Fällen zeigte sich nach ein bis drei Passagen ein zytopathogener Effekt (CPE) in Form eines Zusammenziehens und Abrundens der Leberzellen mit nachfolgender Loslösung aus dem Zellverband. Die abgerundeten Zellen waren nahezu einheitlich groß und deutlich konturiert (Abbildung 5).

Bei fünf der 20 Einsendungen wurden die eingesandten Organe getrennt untersucht. Die Virusisolierung gelang bei diesen fünf Einsendungen aus allen Probenmatrices mit Ausnahme des Probenmaterials B18. Hier war die Virusisolierung aus Zäkaltonsillen nach zwei Passagen erfolgreich, während in dem untersuchten Organpool aus Leber und Milz nach vier Passagen keine sichtbare Virusvermehrung festgestellt wurde (Tabelle 16).

Tabelle 16: Übersicht über die positive Virusisolierung aus Broilerproben

Identifizierung		Probenmaterial	Anzahl der Passage mit Auftreten eines typischen CPEs
B1	a	Leber	2
	b	Zäkaltonsillen	2
B2	a	Leber	1
B3	a	Leber	2
	b	Muskelmagen	2
B4	a	Organpool	2
B5	a	Organpool: Leber, Magen	3
B6	a	Organpool: Leber, Milz	2
B7	a	Zäkaltonsillen	2
B8	a	Organpool: Leber, Magen	2
B9	a	Darm	2
	b	Drüsenmagen	2
B10	a	Mägen	2
B11	a	Mägen	2
B12	a	Organpool: Milz, Mägen	2
B13	a	Organpool: Milz, Mägen	2
B14	a	Magen	2

## Ergebnisse

Identifizierung		Probenmaterial	Anzahl der Passage mit Auftreten eines typischen CPEs
B15	a	Organpool: Milz, Mägen	2
B16	a	Zäkaltonsillen	2
B17	a	Sehnen	2
	b	Organpool: Leber, Milz, Darm, Zäkaltonsillen, Magen	2
B18	a	Organpool: Leber, Milz	negativ
	b	Zäkaltonsillen	2
B19	a	Zäkaltonsillen	2
B20	b	Mägen	2

\*CPE= zytopathogener Effekt

Im Jahr 2012 gelangten 69 Einsendungen aus Putenbeständen mit verschiedenen Organen zur Virusisolierung ins Institut für Geflügelkrankheiten. Auch hier erfolgte die Untersuchung der Organproben je nach Fragestellung und Probenmaterial zum Teil getrennt. Bei 19 Einsendungen war die Virusanzucht erfolgreich.

Bei zwölf der 19 Einsendungen erfolgte eine getrennte Untersuchung der Organe. Bei fünf von zwölf Einsendungen gelang eine Virusisolierung aus den verschiedenen Organproben. Bei sieben Einsendungen gelang die Virusisolierung nur bei einer Probenart. In der Regel wurde hier nach Darm bzw. Zäkaltonsillen und anderen, meist parenchymatösen Organen, getrennt untersucht. In sechs von sieben Einsendungen gelang die Virusisolierung aus dem Darm bzw. aus den Zäkaltonsillen, während die Isolierung aus anderen Organen nach Durchführung von vier Passagen negativ verlief. Eine Ausnahme war das Probenmaterial P16, hier verlief die Virusanzucht aus Zäkaltonsillen und Organpool negativ, während diese aus Sehnen nach vier Passagen gelang (Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht über die positive Virusisolierung aus Putenproben

Identifizierung		Probenmaterial	Anzahl der Passage mit Auftreten eines typischen CPEs
P1	a	Organpool: Leber, Milz, Niere, Zäkaltonsillen	3
P2	a	Organpool: Leber, Milz, Niere, Zäkaltonsillen	3
P3	a	Zäkaltonsillen	2
	b	Leber	2
P4	a	Darm	3
P5	a	Organpool: Leber, Milz	3
	b	Darm	3
P6	a	Zäkaltonsillen	3
P7	a	Darm	2

## Ergebnisse

Identifizierung		Probenmaterial	Anzahl der Passage mit Auftreten eines typischen CPEs
	b	Sehnen	2
	c	Organpool: Leber, Milz, Niere, Bursa fabricii	2
P8	a	Darm	2
	b	Organpool: Leber, Milz, Niere	2
P9	a	Organpool: Leber, Milz, Niere, Herz	2
	b	Darm	2
P10	a	Organpool: Leber, Milz	negativ
	b	Darm	3
P11	a	Organpool: Leber, Milz	negativ
	b	Darm	2
P12	a	Zäkaltionsillen	4
P13	a	Organpool: Leber, Milz	negativ
	b	Zäkaltionsillen	1
P14	a	Organpool: Leber, Milz	negativ
	b	Zäkaltionsillen	3
P15	a	Zäkaltionsillen	1
P16	a	Zäkaltionsillen	negativ
	b	Organpool: Leber, Milz, Niere, Herz	negativ
	c	Organpool: Trachea, Lunge	negativ
	d	Sehen	4
P17	a	Blinddarm	1
P18	a	Organpool: Leber, Milz	negativ
	b	Zäkaltionsillen	2
P19	a	Darm	4
	b	Organpool: Leber, Milz, Herz, Lunge	negativ
P20	a	Leber	1

\*CPE = zytopathogener Effekt

Nach ein bis vier Passagen war ein Aviadenovirus-typischer CPE festzustellen. Morphologische Unterschiede der CPE zwischen Puten- und Hühnerisolaten konnten nicht festgestellt werden (Abbildung 5).

## Ergebnisse

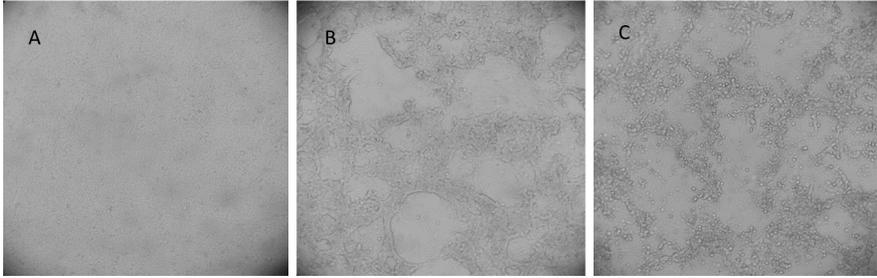


Abbildung 5: Anzucht in Hühnerembryoleberzellen. A: Zellkontrolle und infizierte HEL-Kulturen B: Broilerisolat B5 und C: Putenisolat P1 am 3. Tag post infectionem. In allen infizierten Zellkulturen wurde eine Abrundung und Loslösung der infizierten Zellen aus dem Zellverband festgestellt.

Im Anschluss wurden die HEL-Kulturen, die einen typischen CPE aufwiesen, im IIFT untersucht. Dieser basiert auf dem Nachweis eines gruppenspezifischen Antigens für das Genus *Aviadenovirus* (Adair et al. 1980). Alle Broiler- und Putenisolate zeigten eine deutliche Fluoreszenz in den Zellkernen (Abbildung 6) und konnten somit als Aviadenoviren identifiziert werden.

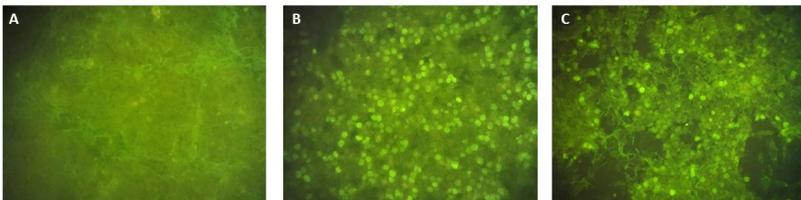


Abbildung 6: Gruppenspezifischer indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Aviadenoviren. A: Zellkontrolle und B: Beispiel einer positiven Fluoreszenz im Zellkern bei einer mit einem Broilerisolat (B4) und einer mit einem Putenisolat (P3) infizierten HEL-Zellkultur.

## 4.2. Charakterisierung der Broilerisolate

### 4.2.1. Molekularbiologische Untersuchungen

#### 4.2.1.1. Untersuchungen einer partiellen Hexongenregion

##### 4.2.1.1.1. Amplifikation und Sequenzierung der partiellen Hexongenregion

## Ergebnisse

Für den Nachweis von Aviadenoviren mittels PCR wurden Primer verwendet, die in einer konservierten Hexongenregion lokalisiert sind und eine Amplifikation der variablen L1 Loop Region ermöglichen (HexAB-PCR) (Meulemans et al. 2001). Die nachfolgende Sequenzierung der Amplifikate ermöglichte eine weiterführende Typisierung.

Alle Feldisolate aus den Broilerproben wurden mittels HexAB-PCR untersucht. Bei allen konnte ein Amplifikat mit der erwarteten Länge von ca. 897 bp nachgewiesen werden. Die erhaltenen Amplifikate wurden in einem weiteren Schritt sequenziert. Mittels der sich anschließenden BLAST-Analyse wurden die Broilerisolate eindeutig als Aviadenoviren identifiziert.

Bei den Einsendungen B1, B9 und B17, bei denen eine getrennte Untersuchung der Organproben durchgeführt wurde, stimmten die Virusisolate innerhalb einer Einsendung nach Sequenzierung überein und wurden fortan jeweils als ein Isolat geführt. Bei B3 wurde nur eins der beiden gewonnenen Isolate exemplarisch sequenziert. Zehn Isolate wurden als FAdV-A, zwei Isolate als FAdV-B, fünf Isolate als FAdV-D und zwei Isolate als FAdV-E typisiert. Eine Typisierung von B7 war nicht möglich, da die Qualität der Sequenzierung nicht ausreichend war (Tabelle 18).

Tabelle 18: Ergebnisse der Typisierung der aus Broilerproben gewonnenen Aviadenovirusisolate mittels BLAST-Analyse

Isolat	Vorbericht	BLAST-Analyse	
		Höchste GenBank - Übereinstimmung	Homologie auf Nukleotidebene
B1	K. A.	FAdV-B (MG953201)	835/836 bp (99%)
B2	K. A.	FAdV-D (MK995483)	798/799 bp (99%)
B3	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	805/805 bp (100%)
B4	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	805/805 bp (100%)
B5	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	807/807 bp (100%)
B6	Auseinanderwachsen, Verwurfrate 2,47 %, Aszites, HHS <sup>1</sup>	FAdV-D (MK572870)	808/808 bp (100%)
B7	Auseinanderwachsen, Verwurfrate 1,88 %, Aszites, Zellulitis, Verdacht auf IBH <sup>2</sup>	Keine Identifizierung möglich	
B8	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	805/805 bp (100%)
B9	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	805/805 bp (100%)
B10	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	805/805 bp (100%)

## Ergebnisse

Isolat	Vorbericht	BLAST-Analyse	
		Höchste GenBank - Übereinstimmung	Homologie auf Nukleotidebene
B11	Muskelmagenerosionen, Verwurfrate 4,88 %, Aszites, Zellulitis, HHS	FAdV-D (MK572870)	852/854 bp (99%)
B12	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	805/805 bp (100%)
B13	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	838/839 bp (99%)
B14	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	805/805 bp (100%)
B15	Muskelmagenerosionen	FAdV-A (MN165288)	805/805 bp (100%)
B16	Zunehmend Hinker, Abhocker, Gangunsicherheiten, Verlustanstieg	FAdV-D (MK572870)	780/780 bp (100%)
B17	K. A.	FAdV-E (MK572861)	798/798 bp (100%)
B18	K. A.	FAdV-B (MG953201)	771/772 bp (99%)
B19	K. A.	FAdV-E (MK572861)	817/817 bp (100%)
B20	Drüsenmagen verdickt und Blutungen, Muskelmagen obB <sup>3</sup> ; Verdacht auf Hühneraviadenoviren und IBV <sup>4</sup>	FAdV-D (MK995483)	798/799 bp (99%)

K. A. = keine Angabe, <sup>1</sup>HHS = Hydroperikard-Hepatitis-Syndrom, <sup>2</sup>IBH = Inclusion Body Hepatitis, <sup>3</sup>obB = ohne besonderen Befund, <sup>4</sup>IBV = Infektiöse Bronchitis

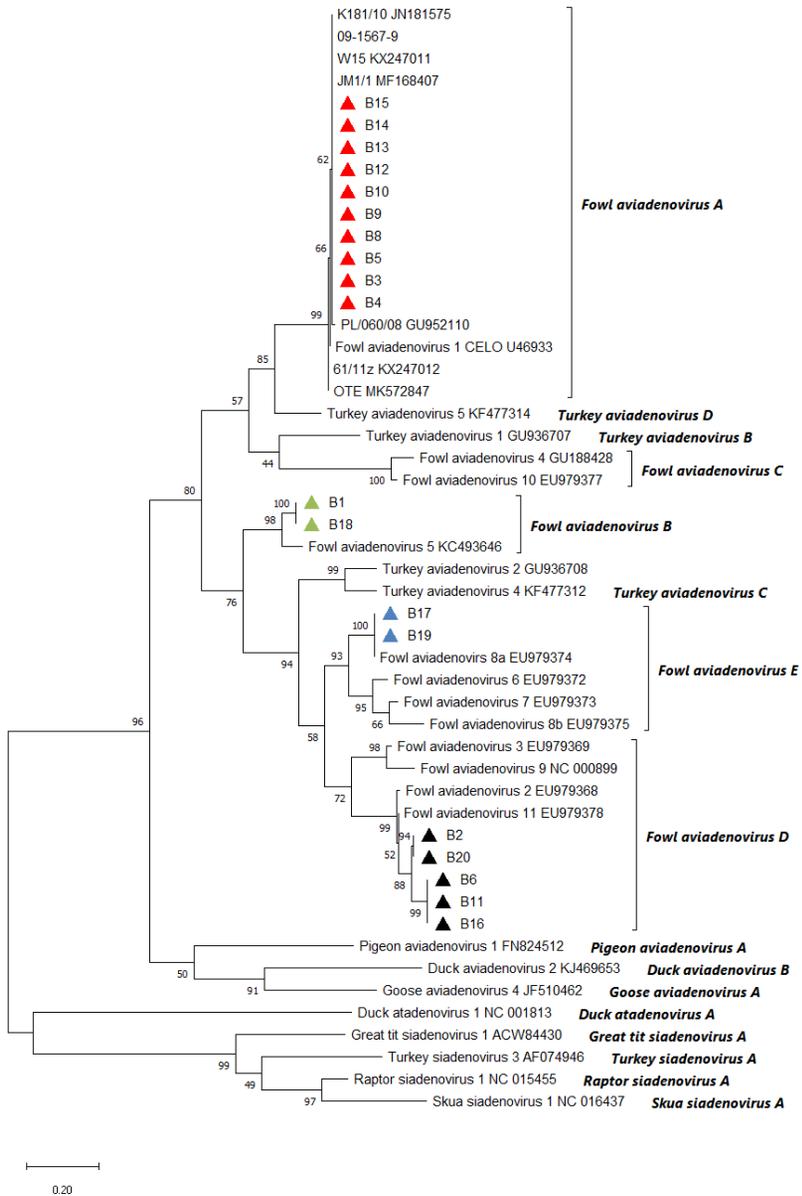
### 4.2.1.2. Phylogenetische Untersuchungen einer partiellen Hexongenregion

Für die phylogenetische Untersuchung wurden alle Sequenzen der Broilerisolate verwendet. Zum Vergleich wurden 25 aviäre Adenovirus-Referenzsequenzen und sechs FAdV-A-Sequenzen, die im Zusammenhang mit Muskelmagenerosionen bei Broilern und Legehennen standen, aus der GenBank mit einbezogen. Zur Alinierung wurden alle Sequenzen auf eine einheitliche Länge von 528 bp gekürzt. Da es sich bei dem untersuchten Genabschnitt um eine Protein-kodierende Region handelt, wurden die Nukleotidsequenzen (NT-Sequenzen) in Aminosäuresequenzen (AS-Sequenzen) übersetzt. Es wurden AS-Sequenzen von 176 AS Länge generiert.

In der phylogenetischen Analyse gruppieren sich die Broilerisolate zu drei FAdV-Spezies. Zehn der Isolate gruppieren sich zu FAdV-A. Fünf Isolate clusterten mit FAdV-D, zwei Isolate mit FAdV-E und zwei weitere Isolate mit FAdV-B. Die B7 Probe wurde nicht untersucht, da

## Ergebnisse

keine Identifizierung möglich war. Die Gruppierung zu den FAdV-Spezies wurde durch hohe Bootstrap-Werte unterstützt (Abbildung 7).



## Ergebnisse

Abbildung 7: Maximum Likelihood Analyse der partiellen Hexongen-Aminosäuren-Sequenz (175 AS) mit 1000 Bootstrapwiederholungen basierend auf dem JTT Distanz Matrix Modell. Zum Vergleich wurden die GenBank-Sequenzen von Referenzstämmen und ausgewählte FAdV-A Isolate einbezogen. GenBank-Sequenzen sind anhand ihrer Zugangsnummern gekennzeichnet.

Bei allen FAdV-A Isolaten wurde anamnestisch von Muskelmagenerosionen berichtet. Bei Isolat B11, welches mit FAdV-D clusterte, galt dies ebenso, allerdings umfassten die pathologischen Veränderungen zusätzlich HHS sowie Aszites und Zellulitis. Bei Isolat B6, welches gleichfalls mit FAdV-D clusterte, lag vorberichtlich ebenfalls HHS und Aszites vor. Zudem wurde ein Auseinanderwachsen der Herde beobachtet. Bei einem weiteren FAdV-D Isolat (B20) wurde zwar von Veränderungen im Drüsenmagen berichtet, allerdings war der Muskelmagen ohne auffälligen Befund. Für die Isolate B1, B2, B17, B18 und B19 lagen leider keine Vorberichte vor.

Im Weiteren liegt der Fokus besonders auf den Isolaten, die im Vorbericht mit Muskelmagenerosionen assoziiert waren und der Spezies FAdV-A angehörten. Für den Vergleich wurden Feldstämme aus Japan (JM1/1, MF168407), Korea (K181/10, JN181575), Polen (PL/060/08, GU952110; W-15, KX247011; 61/11z, KX247012) und Deutschland (09-1567-9, FN557181) gewählt. Vorwiegend handelt es sich hierbei um FAdV-A-Sequenzen von Broilern, mit Ausnahme von K181/10 und W-15. Diese stammten aus Legehennenbeständen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen der Broilerisolate waren auf Nukleotid-Ebene (NT-Ebene) untereinander zu 100 % identisch. Im Vergleich zu den Referenzstämmen CELO und Ote zeigten sie eine Ähnlichkeit von 99,05 % bis 99,81 % und auf Aminosäuren-Ebene (AS-Ebene) von 98,86 % bis 99,43 %. Zu den aus der GenBank entnommenen FAdV-A Sequenzen bestand eine Ähnlichkeit von 98,3 % bis 100 % auf NT-Ebene. Zwischen den AS-Sequenzen betrug die Ähnlichkeit 97,71 % bis 100 % (Tabelle 19). Interessanterweise waren die Sequenzen der Broilerisolate auf AS-Ebene zu 100 % identisch mit denen aus Deutschland, Japan und Korea sowie der polnischen Legehennen-Sequenz (W-15), zu den anderen beiden polnischen Sequenzen zeigten sie eine Ähnlichkeit von 98,86 %. Die partielle AS-Hexongen-Sequenz von 61/11z war zu 100 % identisch mit Ote.

## Ergebnisse

Tabelle 19: Ähnlichkeit der FAdV-A- Nukleotid- und Aminosäuresequenzen. Isolat B3 steht stellvertretend für die in dieser Arbeit isolierten FAdV-A, die in der untersuchten Region zu 100 % identisch waren. Neben der Referenzstämme CELO und Ote wurden ausgewählte FAdV-A-Sequenzen in die Analyse einbezogen. Die Ähnlichkeiten wurden anhand der p-Distanzen berechnet.

		Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen in %									
Ähnlichkeit der Nukleotidsequenzen in %	B3	CELO, U46933	Ote, MK572847	JM1/1, MF-168407	K181/10, JN181575	PL/060/08, GU952110	W-15, KX247011	61/11z, KX247012	09-1567-9, FN557181		
	B3	-	99,43	98,86	100	100	98,86	100	98,86	100	
CELO, U46933	99,81	-	99,43	99,43	99,43	98,29	99,43	99,43	99,43		
Ote, MK572847	99,05	99,24	-	98,86	98,86	97,71	98,86	100	98,86		
JM1/1, MF168407	100	99,81	99,05	-	100	98,86	100	98,86	100		
K181/10, JN181575	99,81	99,62	98,86	99,81	-	98,86	100	98,86	100		
PL/060/08, GU952110	99,62	99,43	98,67	99,62	99,43	-	98,86	97,71	98,86		
W-15, KX247011	100	99,81	99,05	100	99,81	99,62	-	98,86	100		
61/11z, KX247012	98,67	98,86	99,62	98,67	98,49	98,3	98,67	-	98,86		
09-1567-9, FN557181	100	99,81	99,05	100	99,81	99,62	100	98,67	-		

### 4.2.1.3. Untersuchungen der partiellen Long- und Short-Fibergene

#### 4.2.1.3.1. Amplifikation der Fibergene

Die Fibergene von FAdV-A werden als mögliche Virulenzfaktoren diskutiert. Die zehn FAdV-A-Broilerisolate wurden daher dahingehend weiter untersucht. Für die Analyse der Long- und Short-Fibergene dienten die von Marek et al. (2010) veröffentlichten PCR-Verfahren. Diese konnten bei allen zehn als FAdV-A klassifizierten Broilerisolaten und bei den Referenzstämmen CELO und Ote Amplifikate der erwarteten Größen von 2382 und 1240 bp generieren (Abbildung 8).

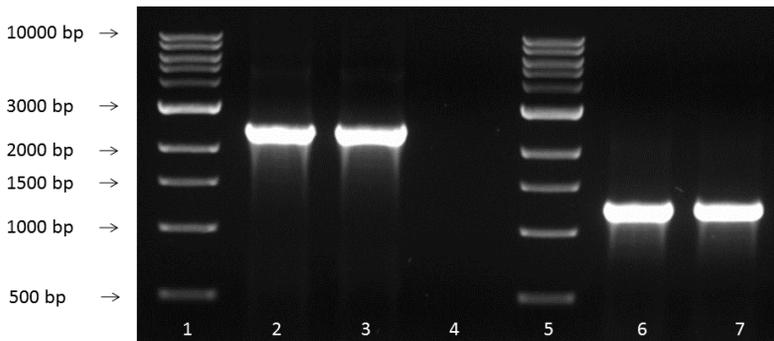


Abbildung 8: Amplifikation des Long- und Short-Fibergens mittels der Primerpaare Flong/Rlong und Fshort/Rshort am Beispiel von CELO und Ote. Spur 1 bis 4: Long-Fibergen; Spur 1: 1 kbp Marker; Spur 2: CELO; Spur 3: Ote; Spur 4: Negativkontrolle; Spur 5 bis 7: Short-Fibergen; Spur 5: 1 kbp Marker; Spur 6: CELO; Spur 7: Ote

#### 4.2.1.3.2. Restriktionsenzymanalyse der Fiber-Amplifikate

Literaturangaben zufolge kann eine REA des Long-Fiber-Amplifikates mittels der Restriktionsendonuklease *HinfI* zur Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen FAdV-A Isolaten durchgeführt werden (Okuda et al. 2006). Die zehn FAdV-A Isolate wurden daher im Vergleich zu den Referenzstämmen CELO und Ote getestet. Die getesteten Amplifikate zeigten in der REA keine Unterschiede hinsichtlich ihres Restriktionsmusters (Abbildung 9).

## Ergebnisse

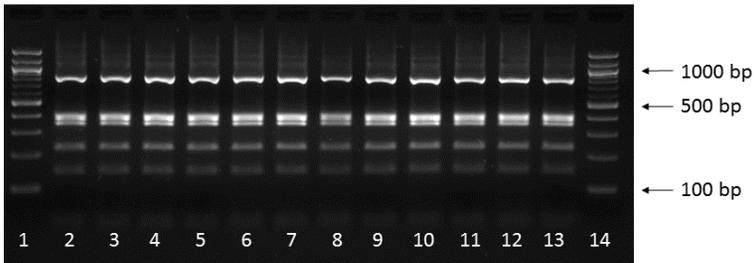


Abbildung 9: REA der Long-Fiber-Amplifikate mit HinfI: Spur 1: 100 bp Marker; Spur 2: CELO; Spur 3: Ote; Spur 4: B3; Spur 5: B 4; Spur 6: B 5; Spur 7: B8; Spur 8: B9; Spur 9: B10; Spur 10: B12; Spur 12: B13; Spur 12: B14; Spur 13: B15; Spur 14: 100 bp Marker

Auf Basis der GenBank-Sequenzen des Short-Fibergens von CELO (U46933) und Ote (FN557186) wurde für die REA der Amplifikate des Short-Fibergens die Restriktionendonuklease *HaeIII* gewählt. Wie erwartet wichen CELO und Ote hinsichtlich ihres Restriktionsmusters voneinander ab. Das Restriktionsmuster der Amplifikate der zehn FAdV-A Isolate entsprach dem von Ote (Abbildung 10).

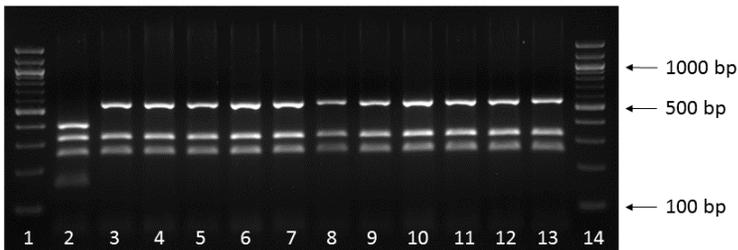


Abbildung 10: REA der Short Fiber-Amplifikat mit HaeIII: Spur 1: 100 bpMarker; Spur 2: CELO; Spur 3: Ote; Spur 4: B3; Spur 5: B 4; Spur 6: B 5; Spur 7: B8; Spur 8: B9; Spur 9: B10; Spur 10: B12; Spur 12: B13; Spur 12: B14; Spur 13: B15; Spur 14: 100 bp Marker

### 4.2.1.3.3. Sequenzanalyse der Fibergene

In einem weiteren Schritt wurden die Long- und Short-Fibergene einer Sequenzanalyse unterzogen. Aufgrund der Größe des Long-Fiber Amplifikates von 2382 bp unter Verwendung

## Ergebnisse

der publizierten Primer Flong und Rlong war die nachfolgende Sequenzierung nur unvollständig möglich. Aus diesem Grund wurden auf Basis der Genbank-Sequenz des Referenzstammes CELO (U46933) weitere Primer (Flong1+2, Rlong1+3) zur Amplifizierung und Sequenzierung von drei überlappenden Teilfragmenten des Long-Fiber-Gens abgeleitet (Abbildung 11). Der Primer Rlong4 wurde ausschließlich zur Sequenzierung des Long-Fiber3 Amplifikates eingesetzt.

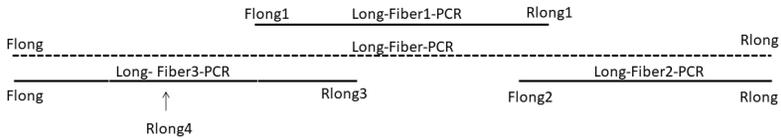


Abbildung 11: Schematische Darstellung der amplifizierten Teilfragmente (Long-Fiber1, -2 und -3) sowie der jeweils verwendeten Primer zur Sequenzierung des Long-Fibergens. Der Primer Rlong4 wurde nur zur Sequenzierung eingesetzt.

Für alle zehn Broilerisolate und die beiden Referenzstämme CELO und Ote konnten unter Verwendung der jeweiligen Primerkombination die Teilfragmente Long-Fiber1, Long-Fiber2 und Long-Fiber3 mit den erwarteten Größen von jeweils 829 bp, 867 bp und 1100 bp amplifiziert werden (beispielhaft dargestellt in Abbildung 12).

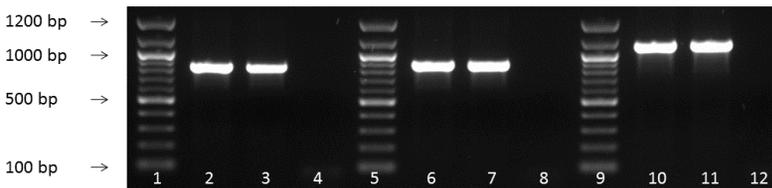


Abbildung 12: Amplifikation des Long-Fibergens mittels der PCR Verfahren Long-Fiber1, Long-Fiber2 und Long-Fiber3 am Beispiel von CELO und Ote. Spur 1 bis 4: Long-Fiber1: Spur1: 100 bp Marker; Spur 2: CELO; Spur 3: Ote; Spur 4: Negativkontrolle; Spur 5 bis 8: Long-Fiber2: Spur 5: 100 bp Marker; Spur 6: CELO; Spur 7: Ote; Spur 8: Negativkontrolle; Spur 9 bis 12 Long-Fiber3: Spur 9: 100 bp Marker; Spur 10: CELO; Spur 11: Ote; Spur 12: Negativkontrolle

## Ergebnisse

Nach Durchführung der Sequenzierung wurden die erhaltenen Sequenzabschnitte zu einer Gesamtsequenz von 2079 bp zusammengefügt. Die überlappenden Sequenzbereiche waren jeweils identisch.

Für die weiterführenden Untersuchungen wurde ein Multiples Alignment mit zusätzlichen GenBank-Sequenzen durchgeführt. Hierzu wurden die Referenzstämme CELO (U46933) und Ote (FN557183, FN557186) sowie Feldstämme aus Japan (JM1/1, MF168407), Polen (PL/060/08, GU952110; W-15, KX247011; 61/11z, KX247012) und Großbritannien (08-3909, FN557182, FN557184) gewählt. Die Sequenzen des Isolats 09-1567-9 (Vergleichssequenz in der Analyse der Hexongensequenzen) und 08-3909 stammen aus einer Veröffentlichung und galten als identisch (Marek et al. 2010). Von dem koreanischen Isolat K181/10 waren leider keine Fibergensequenzen verfügbar. Zusätzlich wurden die Referenzstämme CELO und Ote aus der Stammsammlung des Instituts für Geflügelkrankheiten sequenziert und ebenfalls in den Vergleich mit einbezogen.

Zur Alinierung wurden alle Sequenzen auf eine einheitliche Länge von 2079 bp (Long-Fiber) bzw. 734 bp (Short-Fiber) gekürzt. Da es sich bei den untersuchten Genabschnitten um Protein-kodierende Regionen handelt, wurden aus den erhaltenen NT-Sequenzen AS-Sequenzen abgeleitet. Es wurden AS-Sequenzen von 693 bzw. 244 AS Länge generiert.

Die Sequenzen der zehn Broilerisolate waren in beiden Regionen zu 100 % identisch. Daher wird nachfolgend exemplarisch die Sequenz des Isolats B3 als Vergleichssequenz herangezogen.

Ein Vergleich der Long-Fibersequenz der in der GenBank hinterlegten CELO-Sequenz (U46933) und der selbst ermittelten Sequenz des Institutsstammes CELO (CELO\*) ergab lediglich eine 99,86%ige Ähnlichkeit auf NT- und AS-Ebene (Tabelle 20).

Dies resultierte in einem Aminosäureaustausch von Q (CELO U46933) → P (CELO\*) in der Schaft-Region des Long-Fibergens. Nachfolgende Vergleiche beziehen sich auf CELO\*. Die GenBank-Sequenz von Ote stimmt mit der Sequenz des Institutsstammes überein. Die Sequenz des Isolats B3 zeigte eine Ähnlichkeit von 99,23 % (NT) bzw. 99,71 % (AS) zu CELO\* und eine 99,76 % (NT) bzw. 99,42%ige Ähnlichkeit zu Ote. Diese Unterschiede resultierten in zwei Aminosäureaustauschen bei B3 im Vergleich zu CELO\* (A → T; Q → P). Diese Austausche konnten jedoch auch in der Ote-Sequenz festgestellt werden. Beide befanden sich in der Schaft-Region. Drei weitere AS-Austausche konnten bei Ote in der Schaft-Region und ein weiterer in der Knob-Region im Vergleich zu CELO\* festgestellt werden. Ein Vergleich der Sequenzen der zehn Broilerisolate in der untersuchten Region ergab 99,9 % bis 100 % (NT) bzw. 100 % (AS) Übereinstimmung im Vergleich zu den GenBank-Sequenzen aus Polen und Großbritannien. Das japanische Isolat zeigte eine 99,66%ige (NT) bzw. 99,57%ige (AS)

## Ergebnisse

Ähnlichkeit. Dies resultierte in zwei AS-Austausche in der Schaft-Region und einem AS-Austausch in der Knob-Region im Vergleich zu B3 (Tabelle 20, Abbildung 13).

Ergebnisse

Tabelle 20: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des partiellen Long-Fibergens der FAdV-A Broilerisolate mit den Referenzstämmen CELO und Ote sowie GenBank-Vergleichssequenzen. Die Ähnlichkeiten wurden anhand der p-Distanzen berechnet.

		Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen in %										
Ähnlichkeit der Nukleotidsequenzen in %	B3	CELO*	CELO, U46933	Ote*	Ote, FN557183	JM1/1, MF168407	PL/060/08, GU952109	W-15, KX247011	61/11z, KX247012	08-3909, FN557182		
		99,71	99,87	99,42	99,42	99,57	100	99,71	100	100		
B3	-	99,71	99,87	99,42	99,42	99,57	100	99,71	100	100		
CELO*	99,23	-	99,86	99,13	99,13	99,42	99,71	99,71	99,71	99,71		
CELO, U46933	99,23	99,86	-	99,28	99,28	99,42	99,86	99,86	99,86	99,86		
Ote*	99,76	98,99	99,86	-	100	98,99	99,42	99,42	99,42	99,42		
Ote, FN557183	99,76	98,99	98,99	100	-	98,99	99,42	99,42	99,42	99,42		
JM1/1, MF168407	99,66	98,94	98,89	99,42	99,42	-	99,57	99,57	99,57	99,57		
PL/060/08, GU952109	100	99,28	99,23	99,71	99,71	99,62	-	100	100	100		
W-15, KX247011	100	99,23	99,23	99,76	99,76	99,66	99,95	-	100	100		
61/11z, KX247012	99,9	99,33	99,33	99,66	99,66	99,57	99,86	99,90	-	100		
08-3909, FN557182	100	99,23	99,23	99,76	99,76	99,66	99,95	100	99,90	-		

\* Institutsstamm

# Ergebnisse

CELO\* MT S P L T L S Q R A L A L K T D S T L T L N T Q G Q L G V S L T P G D G L V L N T N G L S I N A D P Q T L A F N N S G  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* ..... N .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 .....

CELO\* A L E V N L D P D G P W S K T A T G I D L R L D P T T L E V D N W E L G V K L D P D E A I D S G P D G L C L N L D E T L  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 ..... T .....

CELO\* L L A T N S T S G K T E L G V H L N T S G P I T A D D Q G I D L D V D P N T M Q V N T G P S G G M L A V K L K S G G G L  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 .....

CELO\* T A D P D G I S V T A T V A P P S I S A T A P L T Y T S G T I A L T T D T P T M Q V N S N Q L A V K L K T G G G L T A D  
 CELO U46933 ..... Q .....  
 Ote\* ..... A ..... Q .....  
 B3 ..... A ..... Q .....  
 JM1/1 MF168407 ..... A ..... R .....

CELO\* A D G I S V S V A P T P T I S A S P P L T Y T N G Q I G L S I G D Q S L Q V S S G Q L Q V K L K S Q G G I Q Q S T G L  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* ..... D .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 .....

CELO\* G V A V D Q T L K I V S N T L E V N T D P S G P L T S G N N G L S L A A V T P L A V S S A G V T L N Y Q S P L T V T S N  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 .....

CELO\* S L G L S I A A P L Q A G A Q G L T V N T M E P L S A S A Q G I Q L H Y G G G F Q V V A G T L Q L L T N P P I V V S S R R  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 .....

CELO\* G F T L L Y T P A F T V S N N M L G L N V D G T D C V A I S A G L Q I R K E A P L Y V T S G S T P A L A L K Y S S D T  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 .....

CELO\* T I T N G A L A N S G G G G S S T E V A T Y H C G D N L L E S Y D I F A S L P N T N A A K V A A Y C R L A A A G G  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* ..... T .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 .....

CELO\* V V S G T I Q V T S Y A G R W P K V G N S V T D G I K F A I V V S P P M D K D P R S N L S Q W L G A T V F P A G A T T A  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* ..... S .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 .....

CELO\* L F S P N P Y G S L N T I T T L P S I A S D W V P E S N L V T Y T K I H F K P T G S Q Q L Q L A S G E L V V A A A K S  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 ..... T .....

CELO\* P V Q T T K Y E L I Y L G F T L K Q N S S G T N F F D P N A S S D  
 CELO U46933 .....  
 Ote\* .....  
 B3 .....  
 JM1/1 MF168407 .....

## Ergebnisse

Abbildung 13: Alignment der partiellen Aminosäuresequenzen der Long-Fiber. Aufgeführt ist der Vergleich der GenBank-Sequenzen von CELO (U46933), CELO Institutsstamm (CELO\*), Ote Institutsstamm (Ote\*), B3 (exemplarisch für alle zehn FAdV-A Broilerisolate) und JM1/1 (japanisches FAdV-A Feldisolat). Die Schaft-Region ist hellgrau hinterlegt, die Knob-Region dunkelgrau.

Bei der Untersuchung der Short-Fibersequenzen zeigte sich eine 100%ige Übereinstimmung zwischen den selbst ermittelten Sequenzen der Instituts-Referenzstämmen und den in der GenBank hinterlegten Sequenzen der Referenzstämm CELO und Ote. Die Sequenz des Isolats B3 zeigte eine 98,5%ige (NT) bzw. eine 97,95%ige (AS) Ähnlichkeit zu CELO\*. Dies resultierte in fünf AS-Austausche in der Knob-Region der Short-Fibersequenz (N → K, I → T, R → Q, F → L, S → A, Abbildung 14). B3 stimmte zu 98,73 % (NT) bzw. zu 100 % (AS) mit Ote überein. In der Short-Fibersequenz waren die zehn Feldisolate zu 100 % identisch mit den polnischen als auch den britischen und japanischen Isolaten (Tabelle 21)

Ergebnisse

Tabelle 21: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des partiellen Short-Fibergens der FAdV-A Broilerisolate. Die Ähnlichkeiten wurden anhand der p-Distanzen berechnet.

		Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen in %										
Ähnlichkeit der Nukleotid-sequenzen in %		B3	CELO*	CELO, U46933	Ote*	Ote, FN557186	JM1/1, MF168407	PL/060/08, GU952108	W-15, KX247011	61/11z, KX247012	08-3922, FN557184	
B3	-		97,95	97,95	100	100	100	100	100	100	100	
CELO*	98,50		-	100	97,95	97,95	97,95	97,95	97,95	97,95	97,95	
CELO, U46933	98,50		100	-	97,95	97,95	97,95	97,95	97,95	97,95	97,95	
Ote*	98,73		98,77	98,77	-	100	100	100	100	100	100	
Ote, FN557186	98,73		98,77	98,77	100	-	100	100	100	100	100	
JM1/1, MF168407	99,59		98,64	98,64	99,86	99,86	-	100	100	100	100	
PL/060/08, GU952108	100		98,77	98,77	99,73	99,73	99,59	-	100	100	100	
W-15, KX247011	100		98,50	98,50	99,73	99,73	99,59	100	-	100	100	
61/11z, KX247012	99,86		98,64	98,64	99,86	99,86	99,73	99,86	99,86	-	100	
08-3622, FN557184	98,73		98,77	98,77	99,73	99,73	99,59	99,73	99,73	99,86	-	

\* Institutsstamm

## Ergebnisse

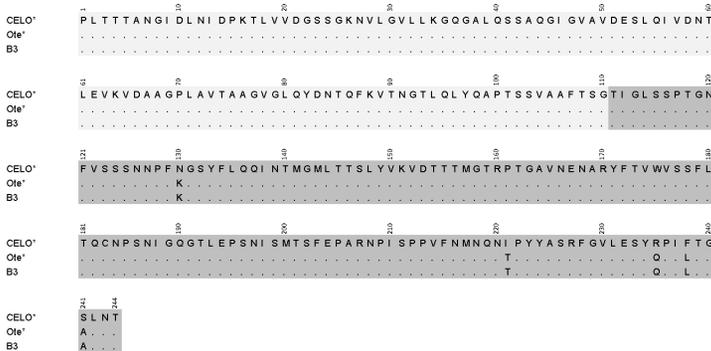


Abbildung 14: Alignment der partiellen Short-Fiber-Aminosäuresequenzen. Aufgeführt ist der Vergleich der Sequenzen der Institutsstämme CELO\* und Ote\* und des Feldisolates B3 exemplarisch für alle zehn FAdV-A Broilerisolate. Die Schaf-Region ist hellgrau hinterlegt, die Knob-Region dunkelgrau.

### 4.2.1.4. Embryoletalitäts-Assay (ELA)

Im ELA sollten pathogene FAdV-A mit apathogenen FAdV-A Referenzstämmen verglichen werden, um zu untersuchen, ob der ELA eine Differenzierungsmöglichkeit *in-vivo* darstellt. Hierzu wurden exemplarisch die per Zufall ausgewählten FAdV-A Broilerisolate B5 und B14 mit den institutseigenen Referenzstämmen CELO und Ote im Vergleich in jeweils drei Infektionsdosen (ID) ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml) im ELA untersucht.

Die Bestimmung der jeweiligen ID erfolgte durch eine Virustitration der beiden Broilerisolate und der Referenzstämmen. Zuvor wurde von den Isolaten jeweils mindestens eine weitere Passage auf HEL-Kulturen durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse der Virustitration sind in der Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Ergebnisse der Virustitration. Die Berechnung der infektiösen Einheiten erfolgte nach Spearman und Kaerber

Identifizierung	Anzahl der Passage	Infektiöse Einheit in TCID* <sub>50</sub> /ml
B5	4. HEL	$10^{8,3}$
B14	5. HEL	$10^{8,3}$
CELO	2. HEL	$10^{5,4}$
Ote	4. HEL	$10^{7,8}$

## Ergebnisse

\*TCID = Tissue Culture Infective Dose

Pro Versuchsgruppe wurden 17 Embryonen in den Dottersack beimpft. Im Anschluss erfolgte eine Re-Titration und eine bakterielle Kontrolle der eingesetzten Inokula. Dabei konnte in allen Fällen ein dem Ausgangstiter entsprechender Titer nachgewiesen werden. Eine bakterielle Kontamination war bei keinem der Inokula nachweisbar

Das Versuchsschema und die daraus folgenden Ergebnisse sind in der Tabelle 23 zusammenfassend dargestellt:

## Ergebnisse

Tabelle 23: Embryoletalität der eingesetzten Broilerisolate und Referenzstämme in drei Infektionsdosen.

Broilerisolat/ Referenzstamm	Versuchs- gruppe	ID <sup>1</sup>	TCID <sub>50</sub> <sup>2</sup> ml	Anzahl abgestorbener Embryonen In Stunden nach Infektion (hours post infection, hpi)											Mortalität <sup>3</sup>	Ab- sterbe- rate (%)	Mittlerer Todes- zeitpunkt (hpi) <sup>4</sup>		
				20 <sup>5</sup>	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144				156	168
B5	A1	ID1	10 <sup>2</sup>	2	- <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	1	8	6	-	-	15/15	100	124.0
	A2	ID2	10 <sup>3</sup>	1	-	-	-	1	-	-	3	12	-	-	-	-	16/16	100	115.5
	A3	ID3	10 <sup>4</sup>	-	1	-	-	-	1	1	11	3	-	-	-	-	17/17	100	108.0
B14	B1	ID1	10 <sup>2</sup>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	4	-	16/16	100	135.0
	B2	ID2	10 <sup>3</sup>	1	-	-	-	-	-	-	2	13	1	-	-	-	16/16	100	119.25
	B3	ID3	10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	1	11	5	-	-	-	17/17	100	110.82
CELO	C1	ID1	10 <sup>2</sup>	3	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	3	2	9/14	64.3	150.67
	C2	ID2	10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	5	4	2	14/17	82.4	133.71
	C3	ID3	10 <sup>4</sup>	-	-	-	1	-	-	-	3	4	6	1	1	-	16/17	94.1	122.25
Ote	D1	ID1	10 <sup>2</sup>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	6	8	16/16	100	150.75
	D2	ID2	10 <sup>3</sup>	-	-	1	-	-	-	2	-	2	7	-	4	1	17/17	100	129.18
	D3	ID3	10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	12	3	1	-	-	16/17	94.1	123.75
NC	NC	0	PBS	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/16	0	> 168.0	

<sup>1</sup>ID = Infektionsdosis, <sup>2</sup>TCID = Tissue Culture Infective Dose, <sup>3</sup>abgestorbene Embryonen/beimpfte Eier, <sup>4</sup>Summe der Stunden an denen Embryonen abgestorben waren/ Summe der toten Embryonen, <sup>5</sup>abgestorbene Embryonen, die aus der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden, <sup>6</sup>- = kein embryonaler Tod beobachtet

## Ergebnisse

Ein Embryo der Kontrollgruppe (NC) war nach 20 Stunden Bebrütungsdauer post infectionem (hours post infection, hpi) abgestorben, somit wurden alle Embryonen der Versuchsgruppen, die in diesem Zeitraum abgestorben waren, nicht in die weiterführenden Analysen einbezogen. Die verbleibenden Embryonen der Kontrollgruppe überlebten bis zum Versuchsende.

Insgesamt waren in allen Versuchsgruppen mit Ausnahme der Kontrollgruppe hohe Embryomortalitäten in kurzer Zeit zu beobachten. Verstorbene Embryonen wiesen deutliche Hämorrhagien, z.T. Verzweigungen und Verkrümmungen auf (Abbildung 15).

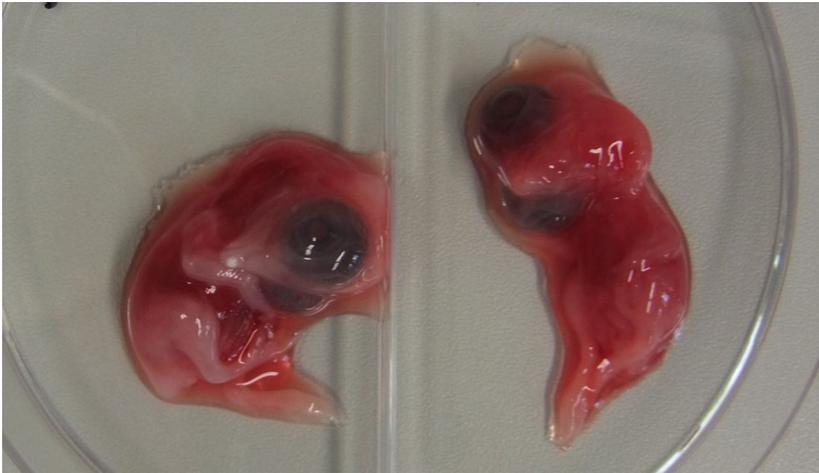


Abbildung 15: mit Versuchsgruppe C2 infizierte und abgestorbene Embryonen am 4. Tag p.i. Die Embryonen waren hämorrhagisch, zeigten eine Verzweigung und z. T. eine Verkrümmung.

Bei allen Embryonen, die mit den Broilerisolaten B5 und B14 (Versuchsgruppe A und B) infiziert worden waren, war unabhängig von der ID eine Absterberate von 100 % zu verzeichnen. Bei den mit den Referenzstämmen infizierten Embryonen lagen die Absterberaten in Abhängigkeit von der ID bei CELO zwischen 64,3 % und 94,1% und bei Ote zwischen 94,1 % und 100 %. Die Zeiträume, in denen ein Absterben der Embryonen beobachtet wurde, variierten zwischen den Broilerisolaten und den Referenzstämmen. Bei den Referenzstämmen konnten frühe Tode (48 hpi, Versuchsgruppe D2 und 60 hpi, Versuchsgruppe C3) verzeichnet werden, allerdings streckten sich die Beobachtungen über den gesamten Beobachtungszeitraum hinaus. Die Mortalität in den Versuchsgruppen A1 bis B3 begann frühestens 84 hpi über einen Zeitraum von 12 bis 36 Stunden, mit Ausnahme von Versuchsgruppe A3, bei der bereits nach 36 hpi ein Embryo abgestorben war. Der nächste abgestorbene Embryo war dort allerdings erst wieder 84 hpi zu verzeichnen (Abbildung 16).

## Ergebnisse

Die mittleren Todeszeitpunkte waren in Abhängigkeit von der jeweiligen ID der Versuchsgruppen C und D in einer vergleichbaren Größenordnung. Dies gilt auch für die ID2 und ID3 der Versuchsgruppen A und B. In der ID1 war allerdings ein Unterschied von elf Stunden zwischen den Versuchsgruppen A und B zu verzeichnen. Insgesamt führte eine höhere ID zu einem schnelleren Absterben der Embryonen, so lagen zwischen dem mittleren Todeszeitpunkt bei ID1 und ID3 16 Stunden (Versuchsgruppe A) bis 28,42 Stunden (Versuchsgruppe C) Zeitunterschied (Tabelle 23). In Abbildung 16 sind die Zeitspannen der Todeszeitpunkte der Embryonen der Versuchsgruppe A1 bis D3 als Boxplot-Diagramm wiedergegeben.

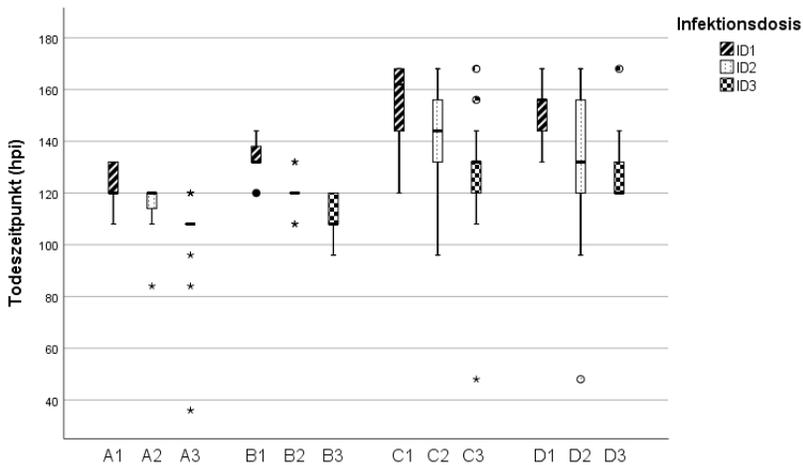


Abbildung 16: Beobachtete Todeszeitpunkte in den einzelnen Versuchsgruppen A1 bis D3 als Boxplot-Diagramme dargestellt.

Bei der statistischen Auswertung sollte zu einem untersucht werden, ob die Art des Inokulums – Broilerisolat oder Referenzstamm- für die Mortalität bzw. den Todeszeitpunkt Bedeutung hat und zum anderen, ob die ID hierauf Einfluss nimmt. Hierzu wurden Überlebenszeitanalysen mit Hilfe des Kaplan-Meier-Schätzers durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die Versuchsgruppen A bis D unabhängig ihrer ID untersucht. Mit dem Shapiro-Wilk Test wurde die Verteilung der Todeszeitpunkte innerhalb der Gruppen verglichen. In Abbildung 17 ist diese grafisch dargestellt. Das Auftreten der Todeszeitpunkte war in den Gruppen nicht normalverteilt (A, C, D jeweils  $p < 0,001$ , B  $p = 0,001$ ).

## Ergebnisse

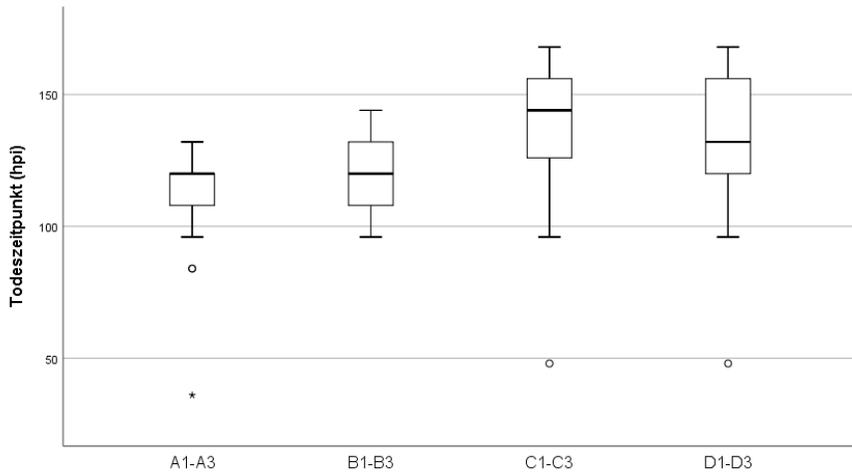


Abbildung 17: Verteilung der beobachteten Todeszeitpunkte der Embryonen. Vergleich den eingesetzten Broilerisolaten B5 und B14 (A und B) und Referenzstämmen CELO und Ote zwischen (C und D).

Die Überlebenszeitanalyse umfasste 195 Hühnerembryonen (Ausschluss der unspezifisch abgestorbenen Embryonen 20 hpi und der Kontrollgruppe). Die Absterberate in Versuchsgruppe A (B5) betrug 100 % (48/48), in B (B14) 100 % (49/49), in C (CELO) 81,25 % (39/48) und in D (Ote) 98 % (49/50).

In Tabelle 24 sind die verarbeiteten Fälle für die Kaplan-Meier-Analyse zusammengefasst. Insgesamt gingen zehn Ereignisse als zensierte Ereignisse, allesamt Embryonen der Referenzstämmen, in die Untersuchung ein. In Abbildung 18 sind die Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Die Kurven der Versuchsgruppen B, C und D kreuzen sich. Dies unterstreicht die Nicht-Normalverteilung der beobachteten Ereignisse.

Tabelle 24: verarbeitete Fälle für die Kaplan-Meier-Analyse der Untersuchung der Überlebenszeit in Abhängigkeit des inokulierten Virus

Broilerisolat/ Referenzstamm	Gesamtzahl	Anzahl der abgestorbenen Embryonen	zensiert	
			Anzahl der überlebenden Embryonen	Anteil in % der überlebenden Embryonen
A (B5)	48	48	0	0
B (B14)	49	49	0	0
C (CELO)	48	39	9	18,8
D (Ote)	50	49	1	2
Gesamt	195	185	10	5,1

## Ergebnisse

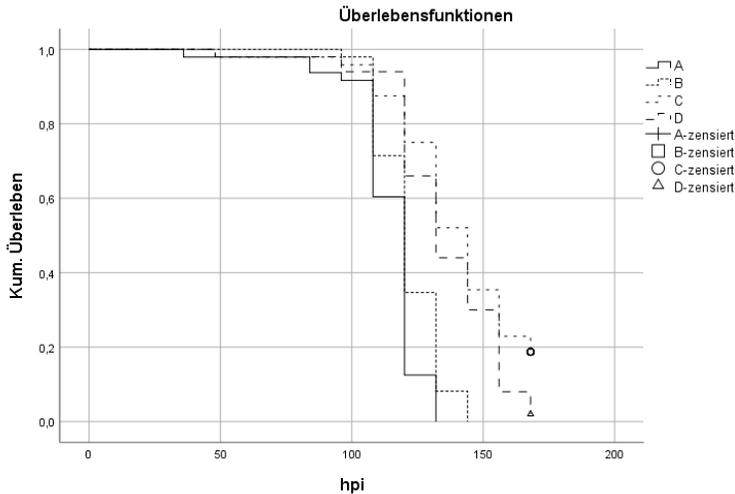


Abbildung 18: Kaplan-Meier Kurven für die Überlebenszeit in Stunden der eingesetzten Broilerisolate/Referenzstämmen. Die Kurven von B, C und D kreuzen sich, ein Hinweis auf eine ungleichmäßige Verteilung der Ereignisse (Tod der Embryonen).

Da die Verteilungen der Todeszeitpunkte nicht normalverteilt waren, erfolgte der Vergleich der Kaplan-Meier Kurven mittels generalisiertem Wilcoxon-Test. Zur Verhinderung einer Alpha-Fehler-Kumulierung durch multiples Testen wurde das Signifikanzniveau durch eine Bonferroni-Korrektur von ursprünglich  $p < 0,05$  auf  $p < 0,0125$  festgelegt. Hierdurch ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen den beiden Broilerisolaten ( $p = 0,021$ ) und der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen den beiden Referenzstämmen ( $p = 0,256$ ). Für die nachfolgende Untersuchung konnten somit die Versuchsgruppen A1 bis B3 als Broilerisolate und die Versuchsgruppen C1 bis D3 als Referenzstämmen zusammengefasst und miteinander verglichen werden.

Abbildung 19 zeigt die Verteilung der Todeszeitpunkte der mit den Broilerisolaten und Referenzstämmen infizierten Embryonen. Die in der Abbildung angedeutete Ungleichmäßigkeit der Verteilung konnte mittels Shapiro-Wilk Test ( $p < 0,001$ ) bestätigt werden.

## Ergebnisse

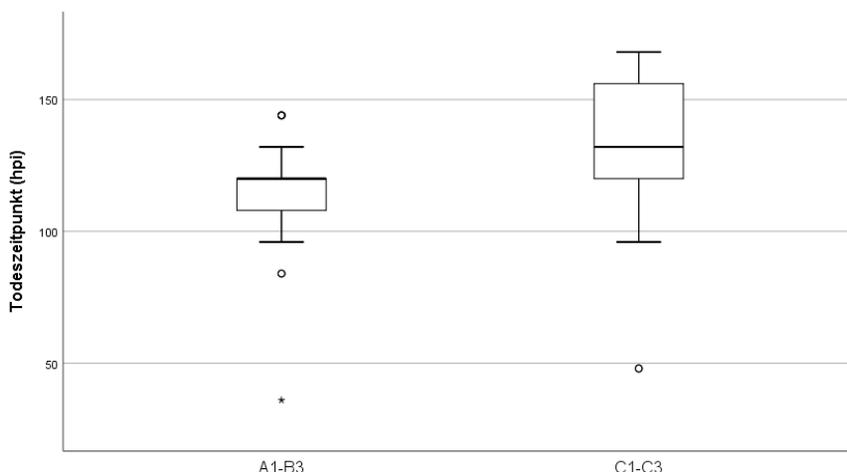


Abbildung 19: Verteilung der beobachteten Todeszeitpunkte in hpi. Vergleich zwischen Broilerisolaten (A1-B3) und Referenzstämmen (C1-D3).

Die Überlebenszeitanalyse umfasste 195 Hühnerembryonen (Ausschluss der unspezifisch abgestorbenen Embryonen 20 hpi und der Kontrollgruppe). Bei den Hühnerembryonen, die mit einem Broilerisolat beimpft worden waren, erreichte die Absterberate 100 %, bei den mit den Referenzstämmen infizierten Gruppen 89,8 % (88/98). In Tabelle 25 sind die verarbeiteten Fälle für die Kaplan-Meier-Analyse zusammengefasst und in Abbildung 20 sind die Kaplan-Meier-Kurven der Broilerisolate im Vergleich zu den Referenzstämmen aufgetragen. Beim Vergleich der beiden Kaplan-Meier Kurven mittels generalisiertem Wilcoxon-Test wurde ein hochsignifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen Broilerisolaten und Referenzstämmen gefunden. Die Art des Inokulums scheint sich daher auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Embryonen auszuwirken.

Tabelle 25: Verarbeitete Fälle für die Kaplan-Meier-Analyse der Untersuchung der Überlebenszeit in Abhängigkeit der Pathogenität des inokulierten Virus

Broilerisolat/ Referenzstamm	Gesamtzahl	Anzahl der abgestorbenen Embryonen	zensiert	
			Anzahl der überlebenden Embryonen	Anteil in % der überlebenden Embryonen
Broilerisolate (A1-B3)	97	97	0	0
Referenzstämmen (C1- D3)	98	88	10	10,2
Gesamt	195	185	10	5,1

## Ergebnisse

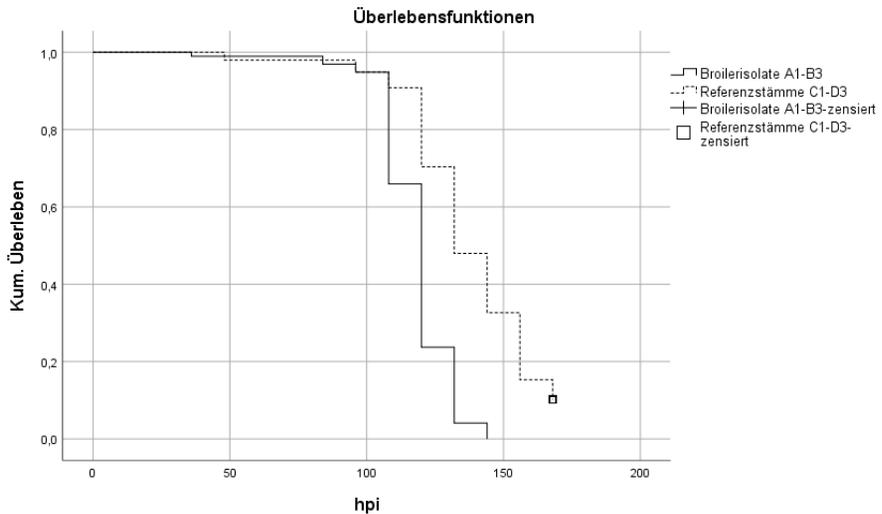


Abbildung 20: Kaplan-Meier Kurven für die Überlebenszeit in Stunden der mit den Broilerisolaten (A1-B3) und Referenzstämmen (C1-D3) infizierten Embryonen. Die beiden Kurven kreuzen sich, was als Hinweis auf eine ungleichmäßige Verteilung der Ereignisse (Tod der Embryonen) gewertet werden kann.

In der letzten statistischen Analyse sollte der Einfluss der Infektionsdosis auf das Überleben der Embryonen untersucht werden. Hierbei wurden jeweils die Versuchsgruppen A1, B1, C1, D1 als ID1, A2, B2, C2, D2 als ID2 und A3, B3, C3, D3 als jeweils eine Kategorie zusammengefasst. Das Auftreten der Todeszeitpunkte war in den Gruppen laut Shapiro-Wilk Test nicht normalverteilt (ID 1  $p = 0,001$ , ID2 und ID3  $p < 0,001$ ). Dies zeigte sich auch grafisch bei der Verteilung der Todeszeitpunkte (Abbildung 21).

## Ergebnisse

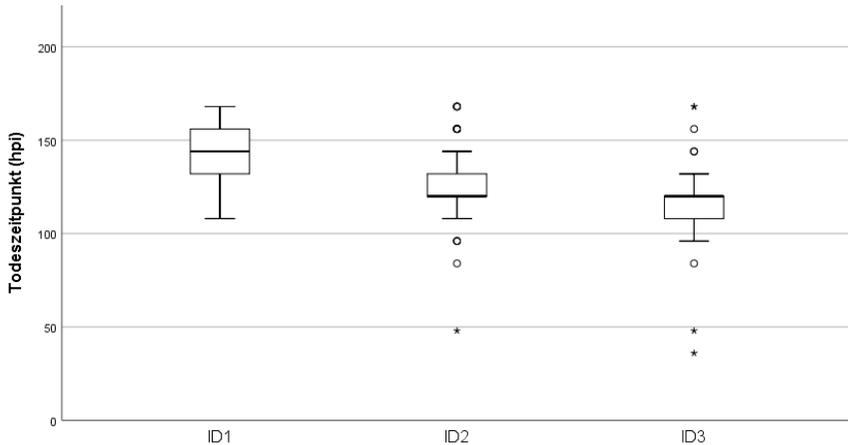


Abbildung 21: Verteilung der beobachteten Todeszeitpunkte. Vergleich zwischen drei Infektionsdosen (ID1, ID2, ID3)

Die Überlebenszeitanalyse umfasste 195 Hühnerembryonen (Ausschluss der unspezifisch abgestorbenen Embryonen 20 hpi und der Kontrollgruppe). Die Absterberate bei ID1 erreichte 91,8 % (65/61), ID2 95,5 % (63/66) und ID3 98,5 % (67/68). In Tabelle 26 sind die verarbeiteten Fälle für die Kaplan-Meier-Analyse zusammengefasst. Abbildung 22 zeigt die ermittelten Kaplan-Meier-Kurven. Die Kurven der ID2 und ID3 kreuzen sich; dies unterstützt das Ergebnis des Shapiro-Wilk Tests. Für den Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven wurde der generalisierte Wilcoxon-Test angewandt. Hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit der Embryonen in Abhängigkeit von der Infektionsdosis konnte ein hochsignifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied festgestellt werden, die Höhe der ID schien also einen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Embryonen zu haben.

Tabelle 26: Verarbeitete Fälle für die Kaplan-Meier-Analyse der Untersuchung der Überlebenszeit in Abhängigkeit von der Inokulationsdosis

Infektionsdosis	Gesamtzahl	Anzahl der abgestorbenen Embryonen	zensiert	
			Anzahl der überlebenden Embryonen	Anteil in % der überlebenden Embryonen
ID1 = $10^2$ TCID <sub>50</sub> /0,1 ml	61	56	5	8,2
ID2 = $10^3$ TCID <sub>50</sub> /0,1 ml	66	63	3	4,5
ID3 = $10^4$ TCID <sub>50</sub> /0,1 ml	68	66	2	2,9
Gesamt	195	185	10	5,1

\*TCID = Tissue Culture Infective Dose

## Ergebnisse

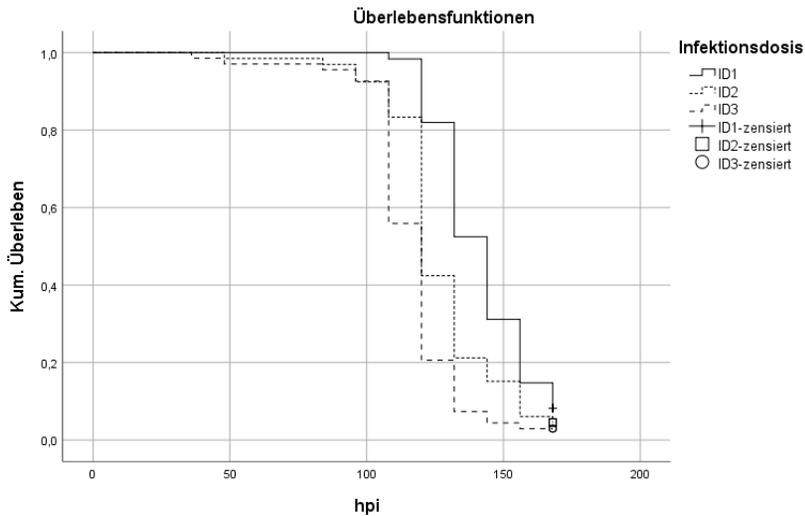


Abbildung 22: Kaplan-Meier Kurven für die Überlebenszeit in Stunden in Abhängigkeit von der Infektionsdosis. Die Kurven von ID2 und ID3 kreuzen sich, ein Hinweis auf eine ungleichmäßige Verteilung der Ereignisse (Tod der Embryonen).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verteilung der Todeszeitpunkte in den Versuchsgruppen nicht gleichmäßig war. Dies wurde zum einen durch die Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests abgeleitet, zum anderen kreuzten sich bei allen drei Untersuchungen die Kaplan-Meier-Kurven (Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 22). Der Vergleich der Kaplan-Meier-Kurven wurde daher in allen Fällen mittels generalisiertem Wilcoxon-Test durchgeführt, da er unter der Annahme der Nicht-Normalverteilung die größte Power bei der Überlebenszeitanalyse hat. Die Wahl des Isolates bzw. Stammes (Broilerisolat versus Referenzstamm) hatte einen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Embryonen, jedoch war es hierbei irrelevant, welches Broilerisolat (A oder B), bzw. welcher Referenzstamm (C oder D) eingesetzt wurde. Darüber hinaus hatte die Höhe der Infektionsdosis einen Einfluss auf das Überleben der Embryonen.

### 4.3. Charakterisierung der Putenisolate

#### 4.3.1. Untersuchung einer partiellen Hexongenregion

Alle 21 Putenisolate wurden mittels HexAB-PCR untersucht. Bei allen Isolaten konnte ein Amplifikat mit der erwarteten Länge von ca. 897 bp nachgewiesen werden. Die erhaltenen Amplifikate wurden in einem weiteren Schritt sequenziert.

Für die weitere Sequenzanalyse und phylogenetische Untersuchung wurden alle erhaltenen Sequenzen verwendet. Zum Vergleich wurden 27 GenBank-Sequenzen mit einbezogen. Zur Alinierung wurden alle Sequenzen auf eine einheitliche Länge von 544 bp gekürzt. Da es sich bei dem untersuchten Genabschnitt um eine Protein-kodierende Region handelt, wurden die NT-Sequenzen in AS-Sequenzen übersetzt. Es wurden AS-Sequenzen von 196 AS Länge generiert.

In der phylogenetischen Analyse gruppieren sich die Putenisolate zu drei TAdV- und zwei FAdV-Spezies.

Sieben Sequenzen gruppieren sich zu TAdV-B (P3, P7a, P8a, P9, P11, P16 und P17 (Abbildung 23). Diese zeigten eine Ähnlichkeit von 90,2 % bis 99,3 % (AS) bzw. von 92,19 % bis 99,02 % (NT) zu TAdV-1. Untereinander waren sie auf AS-Ebene zu 88,8 % bis 100 % bzw. auf NT-Ebene zu 91,99 % bis 100 % ähnlich (Tabelle 27). Neun der Sequenzen (P1, P2, P7b, P8b, P10, P13, P15, P18 und P19) clusterten zusammen mit TAdV-D (Abbildung 23). Diese waren zu 100 % untereinander und zu TAdV-5 identisch. Drei weitere Putensequenzen (P4, P12 und P14) gruppieren sich zu TAdV-C, wobei P4 und P12 eine Ähnlichkeit von 98,6 % (AS) bzw. 99,61 % (NT) zu TAdV-4 zeigten. Untereinander stimmten sie zu 100 % überein. Die Sequenz von P14 zeigte eine 100%ige Übereinstimmung zu TAdV-2 (Tabelle 28). Die Sequenz von P5 clusterte mit FAdV-B und zeigte eine Ähnlichkeit von 90,9 % (AS) bzw. 91,99 % (NT) zu FAdV-5 (Abbildung 23, Tabelle 29). Die Sequenz von P6 grupperte sich zu FAdV-E und zeigte eine Ähnlichkeit von 98,6 % (AS) bzw. 96,88 % (NT) zu FAdV-8b (Abbildung 23, Tabelle 29). Zu den TAdV-Spezies zeigten P5 und P6 eine Ähnlichkeit von 59,4 % bis 72,2 % (AS) bzw. von 60,16 % bis 66,21 % (NT) und untereinander von 60,7 % (AS) bzw. von 63,67 % (NT) (Tabelle 29).

## Ergebnisse

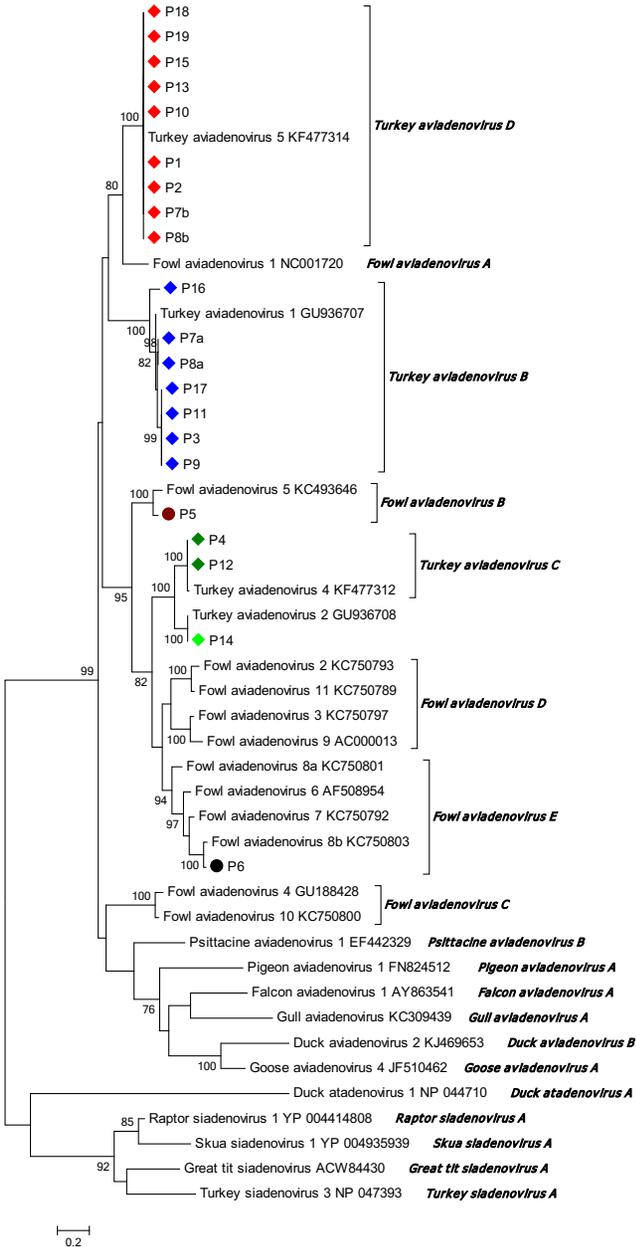


Abbildung 23: Maximum Likelihood Analyse der partiellen Hexongen-Aminosäure-Sequenz (196 AS) mit 1000 Bootstrapwiederholungen. Zum Vergleich wurden GenBank-Sequenzen einbezogen. GenBank-Sequenzen sind anhand ihrer Zugangsnummern gekennzeichnet.

Ergebnisse

Tabelle 27: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der TAdV-B Isolate. Die Ähnlichkeiten wurden anhand der p-Distanzen berechnet.

		Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen in %									
		P3	P7a	P8a	P9	P11	P16	P17	TAdV-1 GU936707		
Ähnlichkeit der Nukleotidsequenzen in %	P3	-	96,5	96,5	100	100	88,81	100	95,8		
	P7a	98,63	-	100	96,5	96,5	89,51	96,5	99,3		
	P8a	98,63	100	-	96,5	96,5	89,51	96,5	99,3		
	P9	100	98,63	98,63	-	100	88,81	100	95,8		
	P11	100	98,63	98,63	100	-	88,81	100	95,8		
	P16	92,19	91,99	91,99	92,19	92,19	-	88,81	90,21		
	P17	100	98,63	98,63	100	100	92,19	-	95,8		
TAdV-1 GU936707	98,44	99,02	99,02	98,44	98,44	98,44	92,19	98,44	-		

Tabelle 28: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des TAdV-C-Clusters. Die Ähnlichkeiten wurden anhand der p-Distanzen berechnet.

		Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen in %					
		P4	P12	P14	TAdV-2* GU936708	TAdV-4 KF477312	
Ähnlichkeit der Nukleotidsequenzen in %	P4	-	100	87,41	87,41	98,6	
	P12	100	-	87,41	87,41	98,6	
	P14	76,95	76,95	-	100	86,71	
	TAdV-2 GU936708	76,95	76,95	100	-	86,71	
	TAdV-4 KF477312	99,61	99,61	76,56	76,56	-	

\* bisher unklassifiziert

## Ergebnisse

Tabelle 29: Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der FAdV-B und FAdV-E Isolate. Die Ähnlichkeiten wurden anhand der p-Distanzen berechnet.

		Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen in %									
		P5	P6	TAdV-1 GU936707	TAdV-2* GU936708	TAdV-4 KF477312	TAdV-5 KF477314	FAdV-5 KC493646	FAdV-8b KC750803		
Ähnlichkeit der Nukleotidsequenzen	P5	-	70,63	60,14	69,93	70,63	62,24	90,91	69,93		
	P6	63,67	-	60,14	72,03	72,73	59,44	70,63	98,60		
	TAdV-1 GU936707	63,67	60,16	-	58,74	57,34	66,43	60,84	58,74		
	TAdV-2* GU936708	63,28	65,63	57,23	-	86,71	61,54	69,93	72,03		
	TAdV-4 KF477312	62,50	65,63	54,1	76,56	-	60,84	72,03	72,73		
	TAdV-5 KF477314	66,21	60,74	65,23	59,18	57,23	-	62,94	58,04		
	FAdV-5 KC493646	91,99	63,28	64,65	67,70	62,50	67,97	-	69,93		
	FAdV-8b KC750803	63,48	96,88	61,13	65,63	64,84	60,35	63,48	-		

\* bisher unklassifiziert

### 4.3.2. Untersuchung des partiellen DNA-Polymerasegens

#### 4.3.2.1. Amplifikation des partiellen DNA-Polymerasegens

Die Einteilung der Aviadenovirus-Spezies beruht auf mindestens zwei Kriterien. Ein Kriterium ist die phylogenetische Distanz auf Basis der AS-Sequenz der DNA-Polymerase. Darum wurde zur Bestätigung der Ergebnisse der Hexongenanalyse zusätzlich auch das DNA Polymerasegen ausgewählter Isolate untersucht. Zu diesem Zweck wurde auf Basis der GenBank-Sequenzen eines TAdV-C (GenBank-Nr. KF477312) und TAdV-D Isolates (GenBank-Nr. KF477314) eine Konsensus-Sequenz für die DNA-Polymerase erstellt und anhand dieser ein Primer-Paar abgeleitet, das innerhalb des DNA-Polymerasegens ein 1207 bp langes Fragment amplifiziert. Es wurden nicht alle Putenisolate untersucht, sondern exemplarisch P8a, P9, P16 und P17 als Vertreter der Isolate, die aufgrund ihrer Hexongensequenz als TAdV-B klassifiziert worden waren, sowie P1, P8b, P15 und P19 als Vertreter der TAdV-D Isolate. Ferner die beiden als TAdV-C typisierten Putenisolate P4 und P12 sowie P14, welches zu 100 % mit TAdV-2 übereinstimmte. Bei allen untersuchten TAdV-C und TAdV-D Isolaten ließ sich ein Amplifikat der erwarteten Größe generieren (Abbildung 24). Darüber hinaus gelang dies auch bei P14. Die untersuchten TAdV-B Isolate waren mit Ausnahme des Isolats P8a negativ (Tabelle 30, Abbildung 25).

Tabelle 30: Ergebnis der DNA-Polymerase-PCR

Spezies / Typ	Kennzeichnung	Amplifikation DNA-Polymerase-Gen
TAdV-B	P8a	positiv
	P9	negativ
	P16	negativ
	P18	negativ
TAdV-C	P4	positiv
	P12	positiv
TAdV-D	P1	positiv
	P8b	positiv
	P15	positiv
	P19	positiv
TADV-2	P14	positiv

## Ergebnisse

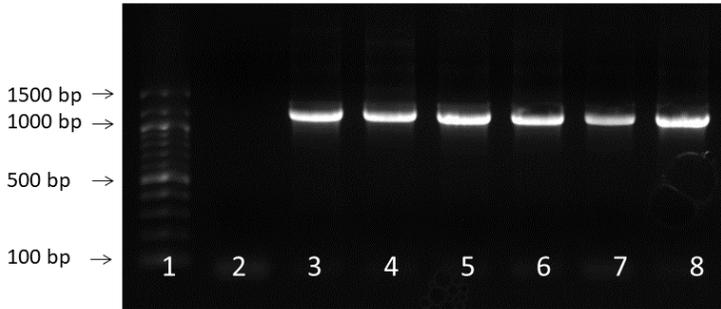


Abbildung 24: Ergebnis der DNA-Polymerase-PCR. Spur 1: 100 bp Marker; Spur 2: Negativkontrolle; Spur 3: P1; Spur 4: P4; Spur 5: P8b; Spur 6: P12; Spur 7: P15; Spur 8: P18

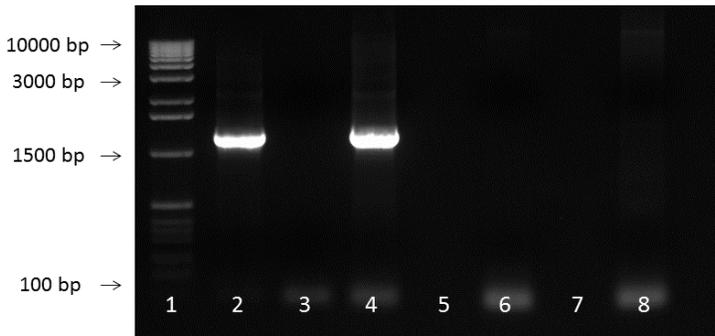


Abbildung 25: Ergebnis der DNA-Polymerase-PCR. Spur 1: 1 kbp Marker; Spur 2: Positivkontrolle (P18); Spur 3: Negativkontrolle; Spur 4: P8a; Spur 5: nicht belegt; Spur 6: P16; Spur 7: nicht belegt; Spur 8: P17

### 4.3.2.2. Sequenz- und phylogenetische Analyse des partiellen DNA-Polymerasegens

Im Weiteren erfolgte eine Sequenz- und phylogenetische Analyse der erhaltenen Sequenzen.

## Ergebnisse

Zum Vergleich wurden GenBank-Sequenzen mit Vertretern der verschiedenen Aviadenovirusspezies mit in die Untersuchung einbezogen.

Zur Alinierung wurden alle Sequenzen auf eine einheitliche Länge von 751 bp gekürzt und aus den Nukleotidsequenzen die Aminosäuresequenzen abgeleitet. Es wurden AS-Sequenzen von 289 AS Länge generiert.

Die Sequenzen von P1, P8a, P15 und P18 clusternten mit TAdV-D zusammen. Diese waren in der untersuchten Region zu 100 % identisch und bestätigten somit die in der Hexongenanalyse erhobenen Befunde. Hinzu gruppierte sich das Isolat P8b, das in der Hexongensequenz als TAdV-B klassifiziert worden war, dieses war ebenfalls zu 100 % identisch mit TAdV-D. Die beiden TAdV-C Isolate gruppierten sich zu TAdV-C und waren zu 100 % identisch. Die Sequenz des Isolates P14 gruppierte sich ebenfalls zu TAdV-C und wies eine Ähnlichkeit von 93,77 % auf AS-Ebene zu TAdV-4 auf (Abbildung 26, Tabelle 31). Dieses Isolat war auf Basis des Hexogens als TAdV-2 klassifiziert worden. Vergleichssequenzen für den Bereich der DNA-Polymerase von TAdV-2 standen nicht zur Verfügung.

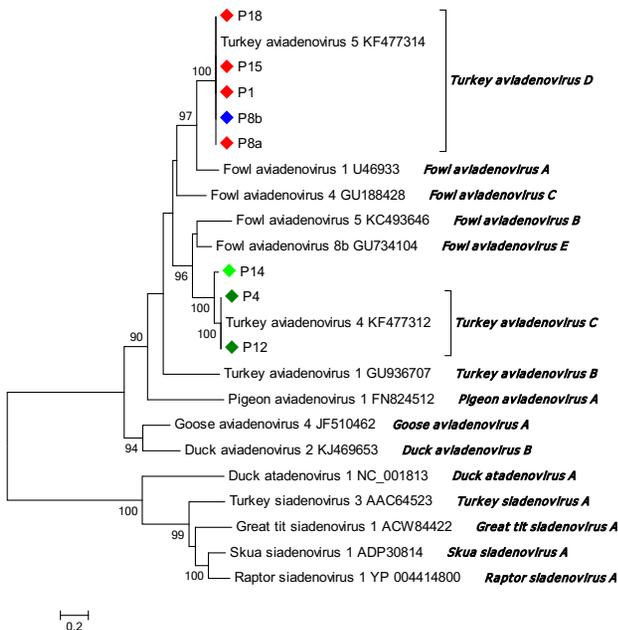


Abbildung 26: Maximum Likelihood Analyse der partiellen Aminosäure-Sequenz der DNA-Polymerase (289 AS) mit 1000 Bootstrapwiederholungen. Zum Vergleich wurden GenBank-Sequenzen einbezogen. GenBank-Sequenzen sind anhand ihrer Zugangsnummern gekennzeichnet.

## Ergebnisse

Tabelle 31: Vergleich der DNA-Polymerase Aminosäure-Sequenzen. Die Ähnlichkeiten wurden anhand der p-Distanzen berechnet.

		Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen in %												
	P1	P4	P8a	P8b	P12	P14	P15	P18	TAdV-1 GU936707	TAdV-4 KF477312	TAdV-5 KF477314			
P1		70,04	100	100	70,04	69,65	100	100	67,70	70,04	100			
P4			70,04	70,04	100	93,77	70,04	70,04	65,76	100	70,04			
P8a				100	70,04	69,65	100	100	67,70	70,04	100			
P8b					70,04	69,65	100	100	67,70	70,04	100			
P12						93,77	70,04	70,04	65,76	100	70,0			
P14							69,65	69,65	66,93	93,77	69,65			
P15								100	67,70	70,04	100			
P18									67,70	70,04	100			
TAdV-1 GU936707														
TAdV-4 KF477312										65,76	67,70			
TAdV-5 KF477314														

### 4.3.3. Zusammenfassende Analyse der Vorberichte

Insgesamt wurden aus 19 Einsendungen von Putenmastbetrieben 21 Putenisolate isoliert. Bei 17 Einsendungen wurde jeweils ein Aviadenovirus detektiert, während bei zwei Einsendungen zwei verschiedene Spezies isoliert werden konnten. In beiden Fällen wurde TAdV-B aus Darmproben isoliert, während TAdV-D aus den Organpool-Proben gewonnen werden konnten.

Bei sechs Einsendungen, aus denen acht Isolate gewonnen werden konnten, lag leider kein Vorbericht vor.

Bei den verbleibenden 13 Einsendungen wurde vorberichtlich vor allem von Enteritis, Hepatitis, Splenitis und Polyserositis berichtet, wobei die Splenitis und Polyserositis stets zusammen und in Kombination mit einem Nachweis von *E. coli* auftrat. Insgesamt wurde elfmal von einer Enteritis, achtmal von einer Hepatitis, sechsmal von einer Splenitis und Polyserositis berichtet. TAdV-B wurde zweimal bei Enteritis (P3 und P11), einmal bei Hepatitis sowie Splenitis und Polyserositis (P7) festgestellt. Für vier der sieben TAdV-B Isolate lag leider kein Vorbericht vor (P7a, P8a, P9 und P16). Isolate des TAdV-C Clusters wurden zweimal im Zusammenhang mit Enteritis isoliert (P12 und P14), einmal lag kein Vorbericht vor (P4). Bei TAdV-D wurde viermal von einer Enteritis (P1, P2, P10 und P13), fünfmal von einer Hepatitis (P2, P10, P13, P18 und P19) sowie dreimal von einer Splenitis und Polyserositis (P2, P10 und P13) berichtet. Bei drei TAdV-D Isolaten lag kein Vorbericht vor (P7b, P8b und P15). Bei FAdV-B (P5) und FAdV-E (P6) traten vorberichtlich Enteritis, Hepatitis, Splenitis und Polyserositis auf (Abbildung 27).

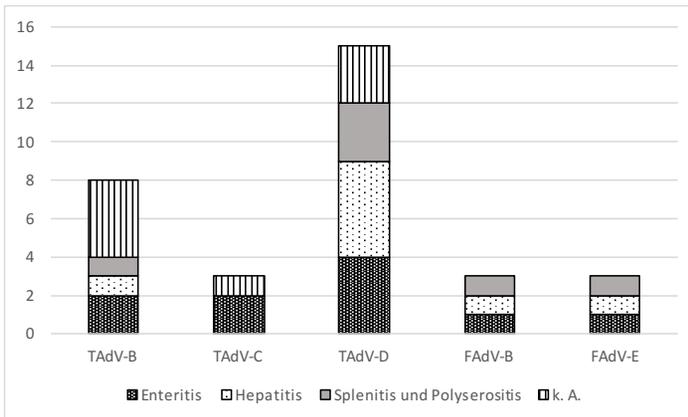


Abbildung 27: Ergebnis der Typisierung der Putenisolate und beobachtete Symptome.

## Ergebnisse

Die verschiedenen Symptome wurden ab der zweiten Lebenswoche bis zur 13. Lebenswoche beobachtet. TAdV-B wurde bei Tieren im Alter von sechs (P6), sieben (P17) und acht Lebenswochen (P3) festgestellt. Zu fünf TAdV-B Isolaten lag kein Vorbericht vor. Nachweise des Clusters TAdV-C erfolgten bei Tieren im Alter von zwei bis vier Lebenswochen (P12 und P14). Bei P4 lag kein Vorbericht vor. Fünf der acht TAdV-D Isolate wurden bei Mastputen im Alter von sieben bis 13 Lebenswochen isoliert (P1, P2, P10, P13 und P18), bei den verbleibenden drei Isolaten lag kein Vorbericht vor. Das FAdV-B Isolat (P5) wurde bei Puten im Alter von zehn Lebenswochen und das FAdV-E Isolat (P6) bei Tieren im Alter von vier Lebenswochen isoliert (Abbildung 28).

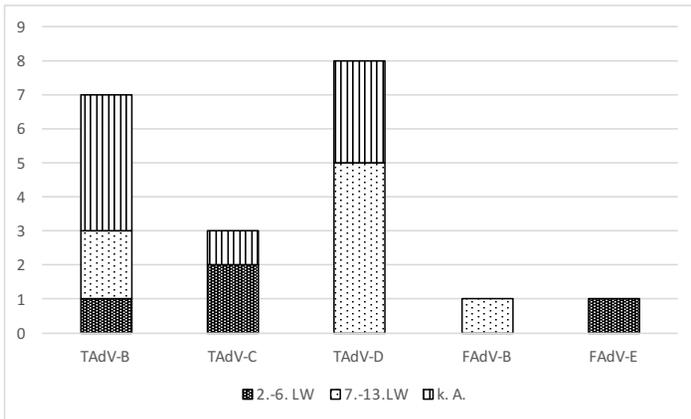


Abbildung 28: Ergebnis der Typisierung der Putenisolate und Alter der betroffenen Tiere.

## 5. Diskussion

### 5.1. Broilerisolate

Im Jahr 2011 wurden im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Geflügelkrankheiten der FU Berlin 20 Aviadenovirusisolate aus insgesamt 33 Broilermastbetrieben isoliert. Zehn dieser Isolate ließen sich anhand ihrer Hexongensequenz als FAdV-A, zwei als FAdV-B, fünf als FAdV-D und weitere zwei als FAdV-E typisieren. Die phylogenetische Untersuchung des Hexongens bestätigte diese Ergebnisse. Bei einem Isolat gelang die Typisierung leider nicht und es wurde auch nicht in die phylogenetische Untersuchung einbezogen. Insgesamt überwogen die FAdV-A (Serotyp 1 (FAdV-1)) Isolate, die alle im Kontext von Muskelmagenerosionen standen. Für die FAdV-B und FAdV-E Isolate lagen keine Vorberichte vor. Bei einem FAdV-D Isolat (B11) wurden ebenfalls Veränderungen des Muskelmagens festgestellt. Zusätzlich lag Aszites, Zellulitis und HHS vor. Aviadenoviren führen zwar zum HHS, aber an erster Stelle werden hier FAdV-4 Stämme der Spezies FAdV-C und nicht FAdV-D genannt. Aszites und Zellulitis sind hingegen nicht mit FAdV-Infektionen assoziiert (Hess 2020). Zwar werden vereinzelt auch die Serotypen FAdV-4 (FAdV-C), FAdV-8a (FAdV-E), FAdV-8b (FAdV-E) und FAdV-11 (FAdV-E) im Zusammenhang mit AGE nachgewiesen (Okuda et al. 2004; Mase und Nakamura 2014; Grafl et al. 2018; Grafl et al. 2018; Niczyporuk und Czekaj 2018; Mirzazadeh et al. 2019), jedoch gelang es nur mit FAdV-1 Stämmen, das Krankheitsbild der AGE zu reproduzieren (Grafl et al. 2018; Niczyporuk und Czekaj 2018).

Die Bedeutung der Hühneraviadenoviren von Kommensalen, zu Erregern multifaktorieller Erkrankungen bis hin zu primär pathogenen Keimen diskutieren Schachner et al. (2020) aus zwei Perspektiven. Zum einen spielt der Wirt bei der Entwicklung der Krankheitsanfälligkeit eine Rolle, zum anderen kann aber auch von einer Virulenzsteigerung des Pathogens ausgegangen werden (Schachner et al. 2020).

Verschiedene mögliche Virulenzfaktoren der Hühneraviadenoviren wurden diskutiert, insbesondere die Hexon- und Fibergene gerieten in den Fokus. So konnten Pallister et al. (1996) durch Rekombination von einem wenig virulenten FAdV-8a Stamm mit einem hochvirulenten FAdV-8a Stamm nachweisen, dass das Fibergen für Pathogenitätsunterschiede verantwortlich war. Sohaimi et al. (2018) zeigten, dass die Attenuierung eines im Zusammenhang mit IBH isolierten FAdV-8b Stammes in Hühnerembryonen zu Veränderungen in der Hexon- und Fibergensequenz führte und im Tierversuch keine IBH ausgelöst werden konnte. Untersuchungen zu einer Rekombinanten eines virulenten FAdV-4 Stammes und des apathogenen Referenzstamm ON1 zeigten ebenfalls, dass das Fiber-2-Gen sowie das Hexongen an Pathogenitätsunterschieden von FAdV-4 beteiligt sind (Zhang et al. 2018).

Auch bei FAdV-1 (FAdV-A) scheinen Stämme unterschiedlicher Pathogenität vorzuliegen. So verursachen die Referenzstämme CELO und Ote keine Muskelmagenläsionen, während sogenannte pathogene Feldisolat das Krankheitsbild der AGE hervorrufen (Nakamura et al. 2002; Grafl et al. 2014). Neben pathogenen Feldisolaten werden jedoch auch apathogene FAdV-1 (FAdV-A) Isolate aus klinisch unauffälligen Tieren gewonnen (Okuda et al. 2006).

Alle zehn FAdV-A Broilerisolate waren untereinander in der untersuchten Hexongensequenz identisch. Sie zeigten eine geringfügig höhere Ähnlichkeit zu dem europäischen FAdV-A Referenzstamm CELO als zu dem japanischen Referenzstamm Ote. Dies galt ebenfalls für andere Broilersequenzen aus Deutschland, Japan und Korea sowie für eine Legehennensequenz aus Polen. Dagegen wies eine polnische Vergleichssequenz aus Broilern eine 100%ige Übereinstimmung auf AS-Ebene zu Ote auf. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit iranischen Sequenzen. Mirzazadeh et al. (2019) wiesen am Schlachthof vermehrt Fälle von Muskelmagenerosionen nach. Hier konnten elf FAdV-1 Isolate gewonnen werden, die basierend auf der Hexongensequenz in zwei Subcluster geteilt werden konnten. Auf NT-Ebene zeigte ein Subcluster eine Ähnlichkeit von 99,6 % zu Ote, während das zweite Subcluster eine Ähnlichkeit von 99,7 % zu CELO aufwies. Zwischen diesen beiden Subclustern wurde eine Ähnlichkeit von 98,9 % festgestellt. Die Sequenzen mit einer höheren Ähnlichkeit zu Ote clusterten dabei mit Sequenzen von apathogenen FAdV-1 Feldisolaten. Inwieweit die am Schlachthof gewonnen Isolate tierexperimentell das Krankheitsbild reproduzieren können oder ob es ein Zufallsbefund ist, blieb leider unklar (Mirzazadeh et al. 2019).

Worauf eventuelle Pathogenitätsunterschiede zwischen den FAdV-1 Stämmen bzw. Isolaten beruhen ist bisher nicht bekannt. Allerdings zeigte Literaturangaben zufolge die REA von Amplifikaten der Long-Fibergene unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *HinfI* Unterschiede im Restriktionsmuster zwischen pathogenen FAdV-1 Isolaten und dem Referenzstamm Ote. FAdV-1-Feldisolat, die von klinisch gesunden Broilern gewonnen worden waren, ließen sich einerseits dem Restriktionsmuster von Ote zuordnen, andererseits aber auch dem eines pathogenen Feldisolats. Ein weiteres apathogenes FAdV-1 Feldisolat ließ sich einem dritten Restriktionsmuster zuordnen. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die REA des Amplifikates des Long-Fibergens zur *in-vitro* Unterscheidung von apathogenen und pathogenen FAdV-1 Isolaten genutzt werden könne (Okuda et al. 2006). Mittels der REA des Long-Fiber-Amplifikates der in der vorliegenden Arbeit untersuchten zehn FAdV-A Broilerisolaten konnte kein Unterschied im Restriktionsmuster unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *HinfI* im Vergleich zu den Referenzstämmen CELO und Ote festgestellt werden. Für unsere Isolate eignet sich die REA entsprechend nicht als *in-vitro* Methode zur Differenzierung apathogener und pathogener FAdV-A Isolate bzw. Stämme.

Dieses Ergebnis entspricht auch der Feststellung von Marek et al. (2010b).

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich das Short-Fibergen einer REA unterzogen. Auf Basis der publizierten Sequenzen von CELO (U46933) und Ote (FN557186) wurde dazu die Restriktionsendonuklease *Hae*III gewählt. Zwei unterschiedliche Restriktionsmuster wurden festgestellt, allerdings zeigten alle zehn untersuchten Broilerisolate das gleiche Restriktionsmuster wie Ote. Daher ist auch die REA der Short-Fibergen-Amplifikate unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *Hae*III als Differenzierungsmöglichkeit zwischen pathogenen und apathogenen FAdV-A Feldisolaten nicht geeignet.

Da die REA der Fibergen-Amplifikate keine Differenzierung ermöglichte, wurden in einem weiteren Schritt die amplifizierten Bereiche sequenziert. Die Sequenzanalyse umfasste die eigenen zehn FAdV-A Isolate, die Referenzstämme CELO und Ote sowie Vergleichssequenzen aus Japan, Polen und Großbritannien. Während die zehn FAdV-A Isolate untereinander zu 100 % identisch waren, ergab sich beim Vergleich der veröffentlichten GenBank-Sequenz von CELO und der selbst ermittelten Sequenz geringfügige Abweichungen, die auch zu einem Aminosäureaustausch führten. Zwischen der Durchführung der Gesamtgenomsequenzierung von CELO (GenBank-Nr. U46933) und der Sequenzierung des Institutsstammes liegen ca. 20 Jahre. Es ist durchaus möglich, dass es durch weitere Passagierung des Institutsstammes zu Punktmutationen gekommen war. Ein Vergleich der beiden Ote-Sequenzen ergab dagegen übereinstimmende Ergebnisse.

In der Aminosäuresequenz der untersuchten Broilerisolate fanden sich zwei Aminosäureaustausche im Vergleich zu CELO (Institutsstamm). In diesem Bereich stimmten jedoch auch die AS-Sequenzen der Broilerisolate und von Ote überein. Ähnliches konnte beim Vergleich der Short-Fibersequenzen festgestellt werden. Die untersuchten Broilerisolate zeigten fünf Aminosäureaustausche in der Knob-Region im Vergleich zu CELO, im Vergleich zu Ote waren die Sequenzen jedoch wiederum identisch. Als Ursache der Pathogenitätsunterschiede kommen diese Mutationen daher nicht in Betracht. Dies ist vergleichbar mit zuvor veröffentlichten Ergebnissen aus Europa (Marek et al. 2010b). Einzig das japanische Isolat zeigte geringe Abweichungen, die in zwei zusätzlichen Aminosäureaustauschen in der Schaft-Region und einem weiteren Austausch in der Knob-Region der Long-Fibersequenz im Vergleich zu CELO und Ote resultierten. Auch Mirzazadeh et al. (2019) stellten weitere Aminosäureaustausche in Schaft- und Knob-Region im Vergleich zu den beiden Referenzstämmen fest. Ob diese Mutationen für Pathogenitätsunterschiede zwischen den FAdV-A Isolaten verantwortlich sind, bleibt weiterhin fraglich, da sich diese nicht bei anderen pathogenen FAdV-A Isolaten finden lassen.

Der Sequenzvergleich der zehn untersuchten Broilerisolate zeigte eine 100%ige Übereinstimmung der untersuchten Gen-Regionen mit Sequenzen aus zuvor berichteten

Ausbrüchen (Marek et al. 2010b). Im Jahr 2011 kam es zudem zu einer großen Anzahl von AGE-Ausbrüchen in deutschen Broilerbetrieben (Schade et al. 2013). Einer Arbeitsgruppe gelang es, 22 dieser Ausbruchsgeschehen auf einen einzigen Mastelternbetrieb zurückzuführen (Grafl et al. 2014). Dies unterstreicht die Bedeutung der vertikalen Übertragung der Aviadenoviren. Allerdings darf auch die Möglichkeit der horizontalen Infektion nicht außer Acht gelassen werden. Diese wurde experimentell als direkte Übertragung von Tier zu Tier sowie als Aerosolübertragung nachgewiesen (Ono et al. 2007) und darüberhinaus auch im Feld festgestellt, als AGE bei Junghennen in zwei aufeinanderfolgenden Durchgängen auftraten (Grafl et al. 2018). Zur Prävention gegen die horizontale Infektion würde sich der orale Einsatz des apathogenen Referenzstammes CELO als Lebendvaccine eignen. Der experimentelle Einsatz am ersten Lebenstag bei Broilern, die frei von maternalen Antikörpern waren, führte zu einem Schutz gegen die Ausbildung klinischer Erscheinungen der AGE nach einem Challenge drei Wochen später mit einem pathogenen Feldstamm, leider aber nicht zu einer sterilen Immunität (Grafl et al. 2014). Auch der Einsatz dieser Vakzine bei naiven SPF-Legehennen bewirkte einen Schutz gegen AGE. Die Schutzwirkung wurde sowohl bei einer doppelten Immunisierung in der 14. und 17. Lebenswoche als auch bei einer einfachen Vakzinierung in der 17. Lebenswoche erreicht (Grafl et al. 2019).

Wie bereits erwähnt, wiesen die untersuchten Gen-Regionen der FAdV-A Isolate eine sehr hohe Ähnlichkeit auf. Diese hohe Sequenzidentität ist aber nicht nur auf die Hexon- und Fibergene beschränkt. So zeigte die Gesamtgenomsequenzierung von zwei pathogenen FAdV-A Isolaten, gewonnen von Broilern bzw. Legehennen, im Vergleich zu CELO auf NT-Ebene eine 99%ige Ähnlichkeit. Untereinander wiesen die Isolate mit 99,7% eine noch höhere Ähnlichkeit auf (Matczuk et al. 2017). Die meisten Abweichungen wurden hierbei in den Regionen von ORF0, ORF1, ORF14, Iva2, pIIa, in den Penton- und Fibrogenen sowie in der DNA-Polymerase festgestellt. Hinweise auf Virulenzfaktoren ergaben sich dabei aber leider nicht (Matczuk et al. 2017). Im Gegensatz dazu konnten Schachner et al. (2019) einen ungewöhnlich verkürzten ORF20 am rechten Genomende nachweisen, der nur im Referenzstamm CELO vorhanden war. Inwieweit dies für Pathogenitätsunterschiede ausschlaggebend ist, bedarf aber weiterer Untersuchungen.

Die hohe Übereinstimmung der Sequenzen apathogener und pathogener FAdV-A Stämme ist keine Seltenheit. So belegen Studien eine 98,1%ige bis 99,2%ige Ähnlichkeit zwischen apathogenen und pathogenen FAdV-4 bzw. FAdV-11 Stämmen. Bei diesen Untersuchungen wurden die meisten Abweichungen an den Genomenden und in der Anzahl der Tandem Repeats (TR) festgestellt (Slaine et al. 2016; Vera-Hernández et al. 2016; Absalon et al. 2017). Besonders die TR sind anfällig für Mutationen und könnten daher für die Pathogenitätsunterschiede mit verantwortlich sein (Schachner et al. 2020). Auch bei humanen

Adenoviren sind teilweise große Übereinstimmungen der Gensequenzen zwischen pathogenen und apathogenen Stämmen beschrieben. Der HAdV-14p1-Stamm führte weltweit zu Ausbrüchen von schweren Atemwegserkrankungen, teilweise mit akutem Atemnotsyndrom einhergehend. Dieser Stamm unterscheidet sich jedoch nur zu 0,3 % vom Prototyp HAdV-14 deWit-Stamm. Als Ursache der Pathogenitätsunterschiede wurde eine Veränderung in der Genexpression vermutet (Cook und Radke 2017). Neben diesen vergleichsweise geringen genomischen Abweichungen zeigte ein hochvirulentes FAdV-4 Isolat Deletionen im ORF19 und ORF27 im Vergleich zu den apathogenen Stämmen ON1 und KR5 (Pan et al. 2017). Diese wurden zunächst als ein möglicher Grund für die Erhöhung der Virulenz angenommen, tierexperimentelle Untersuchungen mit rekombinanten Stämmen zeigten allerdings, dass diese Deletionen nicht ursächlich für die Erhöhung der Virulenz waren (Pan et al. 2018).

Die Frage nach der Ursache für die Pathogenitätsunterschiede verschiedener Hühneraviadenoviren ist also weiter offen und bedarf dringend weiterer Forschung. Von nicht zu unterschätzendem Wert ist in diesem Kontext die weitere Untersuchung in den Beständen. Dabei ist eine exakte Charakterisierung der isolierten Viren essenziell (Hess 2017). Ein *in-vitro* Verfahren, welches verlässlich zwischen pathogenen und apathogenen FAdV-A Stämmen unterscheidet, ist derzeit nicht bekannt. Zwar entwickelten (Grafl et al. 2014) eine qPCR, die zwischen CELO und einem pathogenen FAdV-A Feldvirus differenzieren kann, diese basiert aber auf den Einzelnukleotid-Polymorphismen der Short-Fibergene und wurde für eine Studie verwendet, die zwischen Impf- und Challengevirus unterscheiden sollte. Darüber hinaus zeigte die PCR eine geringe Sensitivität (Grafl et al. 2014). Inwieweit sich diese Methode also zur Differenzierung pathogener und apathogener FAdV-A Feldisolate eignet, ist fraglich.

Einige Untersuchungen zur Überprüfung der Pathogenität verschiedener FAdV-1 (FAdV-A) Isolate bzw. Stämme fanden bisher im Tierversuch statt. Tiere, die mit einem pathogenen Feldisolat infiziert worden waren, zeigten jedoch selten klinische Symptome und wenn doch, waren diese unspezifisch, so dass die Pathogenitätsbestimmung post mortem anhand von Läsionen im Muskelmagen getroffen werden musste (Nakamura et al. 2002; Okuda et al. 2006; Domanska-Blicharz et al. 2011; Lim et al. 2012). Als alternative *in-vivo* Methode zur Pathogenitätsbestimmung aviärer Erreger eignet sich der Embryoletalitäts-Assay (ELA). So wurde dies beispielsweise bereits für bakterielle Pathogene wie *E. coli* (Wooley et al. 2000; Gibbs et al. 2003; Oh et al. 2012), *Riemerella anatipestifer* (Seo et al. 2013) *Enterococcus spp.* (Blanco et al. 2017; Jung et al. 2017; Maasjost et al. 2019), aber auch im Rahmen von Untersuchungen zu FAdV-4 Feldisolaten beschrieben (Mazaheri et al. 1998).

Im Gegensatz zu anderen Hühneraviadenoviren führt FAdV-1 bei der Bruteibeimpfung unabhängig von der Inokulationsroute zu einer hohen Embryomortalität (Cowen 1988). Daher ergab sich die Frage, ob sich, obgleich der hohen Mortalität, Unterschiede zwischen

apathogenen Referenzstämmen und pathogenen Feldstämmen feststellen lassen, und ob sich somit der ELA als eine alternative *in-vivo* Methode für die Pathogenitätsbestimmung von FAdV-A Isolaten eignet. Als Inokulationsroute wurde die Beimpfung des Dottersacks gewählt. Der Vorteil besteht neben seiner einfachen Handhabung darin, dass die Inokulation bereits am siebten Bebrütungstag erfolgt. Der Zeitpunkt, an dem ein Hühnerembryo zur Nozizeption befähigt ist, ist wissenschaftlich noch nicht eindeutig geklärt. Als wissenschaftlicher Konsens gilt aber, dass das Schmerzempfinden nicht vor dem siebten Bebrütungstag einsetzt, sich aber ab diesem Zeitpunkt kontinuierlich weiterentwickelt (Bartels et al. 2020). Demnach sollten potenziell schmerzhaftes Eingriffe so früh wie möglich stattfinden.

In dem in dieser Arbeit durchgeführten ELA zeigten sich unabhängig vom verwendeten Isolat bzw. Stamm und der eingesetzten Infektionsdosis hohe Mortalitätsraten innerhalb kurzer Zeit. Allerdings konnte die Auswertung mittels Kaplan-Meier und generalisiertem Wilcoxon-Test zeigen, dass die Art des Stammes – pathogen oder apathogen - einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der infizierten Embryonen hatte. Der ELA eignet sich demnach zur Unterscheidung der Referenzstämme CELO und Ote von den FAdV-A Isolaten hinsichtlich ihrer Pathogenität. Die Beobachtung, dass pathogene FAdV-A Isolate zu einer höheren Embryomortalität führen können, scheint sich auch im Feld zu bestätigen. So wurde beobachtet, dass eine Infektion mit einem pathogenen FAdV-A Stamm bei Mastelterntieren zu einer geringeren Schlupfrate führte und abgestorbene Embryonen entwicklungsverzögert waren (Grafl et al. 2012). Im Gegensatz dazu führte eine Infektion mit CELO zu keinem nennenswerten Effekt auf die Schlupffähigkeit der betroffenen Herden (Cook 1968; Dawson et al. 1979).

Auch die Höhe der Infektionsdosis zeigte einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Embryonen. Dies konnte vor allem bei CELO gezeigt werden. Hier führte keine der gewählten Infektionsdosen zu einer 100%igen Absterberate, es konnte aber eine eindeutige Abstufung zwischen den einzelnen Infektionsdosen festgestellt werden. Diese Beobachtung des Einflusses der Infektionsdosis ist in Übereinstimmung mit anderen Studien (Yates et al. 1962; Mazaheri et al. 1998).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, obwohl hohe Mortalitätsraten sowohl bei den Referenzstämmen als auch bei den Broilerisolaten gezeigt wurden, ein signifikanter Einfluss auf das Überleben der infizierten Embryonen bestand, was auf eine höhere Pathogenität der untersuchten FAdV-A Broilerisolate hinweist. Beim möglichen Einsatz des ELAs als alternatives *in-vivo* Modell sollte jedoch unbedingt in vergleichsweisen engen Zeiträumen die Vitalität der Embryonen überprüft werden, um mögliche Unterschiede deutlich aufzuzeigen.

Zusätzlich wäre denkbar, dass der ELA für weiterführende Pathogenitätsstudien hinsichtlich möglicher Virulenzfaktoren eingesetzt werden könnte. So erfolgt dies bereits bei bakteriellen

Erregern (Gibbs et al. 2003; Townsend et al. 2008; Oh et al. 2012; Jung et al. 2017; Blanco et al. 2018; Maasjost et al. 2019). Die Überprüfung der Pathogenität von rekombinanten FAdV-4 Varianten zur Untersuchung einzelner Gene hinsichtlich ihrer Eigenschaften als Virulenzfaktoren wurde bisher stets im Tierversuch überprüft (Pan et al. 2018; Zhang et al. 2020). Dies sind vielversprechende Ansätze, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in Zukunft weiterverfolgt werden. Vor dem Hintergrund des 3R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine) bei der Durchführung von Tierversuchen könnte der ELA in diesem Zusammenhang ein alternatives *in-vivo* Modell darstellen.

### 5.2. Putenisolate

Zu der Verbreitung von Putenaviadenoviren liegen kaum Daten vor. Zwar wurden epidemiologische Studien in den 1970er-Jahren durchgeführt (Mcferran und Adair 1977), seitdem ist jedoch nur vereinzelt von Putenaviadenovirusinfektionen berichtet worden. Der in dieser Arbeit beschriebene Nachweis von 21 Aviadenovirusisolaten aus 19 verschiedenen Putenmastbetrieben belegt erstmalig, dass sie zumindest in Deutschland weit verbreitet sind. Dabei überwiegen die neu beschriebenen Spezies TAdV-B und TAdV-D.

Eine Erklärung für die bisherige Datenlage könnte sein, dass die Isolierung der Aviadenoviren am besten in homologen Zellkultursystemen gelingt (Mcferran 1998). Zur virologischen Routinediagnostik werden jedoch in der Regel Eier von SPF-Hühnern verwendet, so dass die Bedingungen zur Virusisolierung bei Putenaviadenoviren nicht optimal sind. Dies lässt sich gut bei der Erstbeschreibung von TAdV-4 (ursprünglich als TAdV-1 bezeichnet, später als TAdV-4 umklassifiziert) und TAdV-2 nachvollziehen. Hier gelang die Isolierung zwar auf Putennierenzellen, aber nicht in verschiedenen heterologen Zellkultursystemen (Scott und Mcferran 1972). Allerdings wurden in diesem Fall Hühnerembryofibroblasten verwendet, die generell weniger geeignet zur Isolierung von Aviadenoviren sind (Miller und Yates 1972; Kraft und Tischer 1978; Hess 2020). Auch bei Guy et al. (1988) war die Isolierung in heterologer Zellkultur im Gegensatz zu Putennierenzellen nicht möglich. In diesem Fall wurden Hühnerierenzellen verwendet. Die Isolierung von TAdV-1 gelang hingegen in Hühnerembryoleberzellen (HEL) (Kajan et al. 2010). Es ist durchaus denkbar, dass bei Verwendung von Hühnerzellkulturen eine nicht ausreichende Anzahl an Passagen durchgeführt wurde und somit die Isolierung nicht gelang. Im Vergleich waren bei der Anzucht der Putenisolate aus dem Jahr 2012 mit durchschnittlich 2,12 Passagen tendenziell mehr Passagen notwendig als bei den Broilerisolaten aus dem Jahr 2011 mit durchschnittlich zwei Passagen. So wurde bei einer Publikation nur von der Durchführung von zwei Passagen mit

## Diskussion

anschließender negativer Bewertung berichtet (Guy et al. 1988), während bei den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten teilweise vier Passagen erforderlich waren.

Während ein Fallbericht einen eher ziegelsteinförmigen CPE beschrieb, bei dem sich die Zellen mosaikartig anordnen (Simmons et al. 1976), wurde bei der Isolierung der 21 TAdV-Isolate der vorliegenden Arbeit ein CPE vom Rundzelltyp festgestellt. Dieser für Aviadenoviren typische CPE wurde auch zuvor bei Puten berichtet (Scott und McFerran 1972; Guy et al. 1988; Guy und Barnes 1997).

Bei zwölf der 19 Einsendungen erfolgte eine getrennte Untersuchung der Organe. Bei sieben dieser Einsendungen gelang die Virusisolierung nur aus einer Probenart. Frühe Versuche zu der Pathogenese verschiedener Hühneraviadenoviren zeigten eine unterschiedliche Verteilung innerhalb des Wirtskörpers. Nach initialer Vermehrung kann es zu einer Virämie und einer anschließenden körperweiten Verbreitung kommen (McFerran und Adair 1977). Aviadenoviren konnten somit aus dem Atmungssystem, den Gonaden, der Leber, der Milz, der Bursa fabricii und einige Hühneraviadenoviren sogar aus dem Gehirn isoliert werden. Die höchsten Viruslasten wurden jedoch in verschiedenen Teilen des Verdauungstrakts festgestellt, entweder im Drüsenmagen, Zäkum oder Ileum, die zusammen mit den Zäkaltonsillen die Organe der Viruspersistenz sind und somit geeignete Proben zur Virusisolierung darstellen (Hess 2017). Darüber hinaus kann auch verändertes Organmaterial verwendet werden (McFerran 1998).

Interessanterweise wurde bei zwei Einsendungen vorberichtlich eine Hepatitis erwähnt. In diesen zwei Fällen (P10 und P13) gelang die Virusisolierung jedoch nur aus den Zäkaltonsillen, während ohne vorberichtliche Hepatitis die Isolierung aus der Leber bei P3 gelang. Auch bei P19 wurde von einer Hepatitis und einem Hydroperikard berichtet, hier gelang die Virusisolierung allerdings nur aus dem Darm. Überraschenderweise wurden nur in sehr seltenen Fällen Organe des Respirationstraktes eingesandt, obwohl in den wenigen beschriebenen Fallberichten zum Nachweis von Aviadenoviren bei der Pute insbesondere Atemwegserkrankungen eine Rolle spielten (Scott und McFerran 1972; Blalock et al. 1975; Cho 1976; McFerran und Adair 1977; Kajan et al. 2010). In den zwei Fällen, in denen Trachea bzw. Lunge als Probenmaterial vorlag, verlief die Virusisolierung aus diesen Organen negativ. Insgesamt betrachtet, stellten sich, bis auf eine Ausnahme, Zäkaltonsillen bzw. Darmproben den anderen Probenmatrices als überlegen heraus.

Bei der phylogenetischen Untersuchung der Hexongensequenzen clusterte die Mehrzahl der Putenisolate mit TAdV-D. Diese waren zu 100 % identisch. Dies deutet auf eine weite Verbreitung der Spezies in deutschen Putenbeständen hin und bestätigt die bereits vermutete hohe Relevanz in europäischen Putenbetrieben, da TAdV-D ebenfalls in Ungarn und Großbritannien nachgewiesen wurde (Marek et al. 2014). Im Gegensatz zu den TAdV-D

## Diskussion

Isolaten wiesen die gewonnen TAdV-B Isolate eine höhere Heterogenität auf. Marek et al. (2010a) schlugen eine Differenzierung von FAdV auf Genomebene vor. Als Abgrenzungskriterium eines Genotyps gilt demnach eine Ähnlichkeit von 95 % in der Hexongensequenz. Basierend auf diesem Schwellenwert lassen sich die in dieser Arbeit charakterisierten TAdV-B Isolate mindestens in zwei Genotypen einteilen. Neben der großen Anzahl von TAdV-D und TAdV-B Isolaten clusterten drei weitere Isolate mit TAdV-C, wovon zwei Isolate (P4 und P12) eine hohe Ähnlichkeit zu TAdV-4 aufwiesen und ein Isolat (P14) zu 100 % mit TAdV-2 in der Hexongensequenz übereinstimmte. Dieser Nachweis von TAdV-2 ist bislang der erste Nachweis seit 1988 (Guy et al. 1988) und zeigt, dass TAdV-2 immer noch in den Putenbeständen zirkuliert, wenn auch mit geringer Prävalenz.

Nachfolgend wurden einige TAdV-D und alle Isolate des TAdV-C Clusters auf Ebene der DNA-Polymerase weiter untersucht. Die DNA-Polymerase gilt als das am stärksten konservierte Protein und wurde daher als wichtigstes Kriterium für die Speziesabgrenzung innerhalb des Genus Aviadenvirus herangezogen (Harrach et al. 2019). Bei der Sequenz- und phylogenetischen Analyse waren die TAdV-D Isolate zu 100 % identisch, was die Klassifizierung mittels Hexongenanalyse bestätigt. Das als TAdV-2 typisierte Putenisolat zeigte in dieser Region eine Ähnlichkeit von 93,77 % zu TAdV-4, während die Ähnlichkeit zu TAdV-1 und TAdV-5 unter 70 % betrug. Dies deutet daraufhin, dass der bisher unklassifizierte Typ TAdV-2 neben TAdV-4 einen weiteren Typen in der Spezies TADV-C darstellt.

Eine Amplifikation der TAdV-B Isolate war dagegen mit der Ausnahme von P8a nicht möglich. Amplifikationsversuche der gleichen Region mit einem weiteren Primerpaar, das anhand der publizierten TAdV-1 Sequenz GU936707 abgeleitet worden war, schlug aus unbekanntem Gründen ebenfalls fehl (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Ursachen für die vermutlich unzureichende Primerbindung konnten in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Die ermittelte Sequenz von P8a war zu 100 % mit TAdV-D identisch, was im Widerspruch zu den Ergebnissen der Hexongenanalyse steht.

Neben dem Nachweis von TAdV-B, TAdV-C und TAdV-D wurde in zwei Fällen auch FAdV-B bzw. FAdV-E isoliert. Es ist bekannt, dass Infektionen mit Hühneraviadenoviren auch bei anderen Vogelarten vorkommen (Hess 2020). So konnte FAdV-A aus Perlhühnern (Ojkic et al. 2008), FAdV-B aus Wellensittichen (Mcferran und Adair 1977), FAdV-C aus Straußen, FAdV-D aus verschiedenen Wildvögeln (Mcferran und Adair 1977; Niczyporuk et al. 2020) und FAdV-E aus einem Wellensittich und einer Taube isoliert werden (Mcferran und Adair 1977).

Es wird die These vertreten, dass es zu einer Koevolution von Adenoviren und aviären Wirten kam. Gelegentliche Wirtswechsel können dabei fatal verlaufen (Changjing et al. 2016; Hess 2017; Harrach et al. 2019). Von einem besonders fatalen Verlauf wurde bei den in dieser Arbeit vorliegenden aus Puten gewonnenen FAdV-B und FAdV-E Isolaten nicht berichtet.

In zwei Fällen konnten zwei verschiedene TAdV-Spezies aus einem Probenmaterial isoliert werden. In beiden Fällen gelang die Isolierung dabei von TAdV-B aus Darmproben und von TAdV-D aus Sehnenmaterial bzw. aus einem Organpool bestehend aus Leber, Milz und Nieren. McFerran und Adair (1977) berichteten über Doppel- oder auch gar Mehrfachinfektionen, so konnten teilweise bis zu drei verschiedene FAdV-Serotypen aus einem Vogel isoliert werden. Als Erklärung führten sie an, dass es durch die vertikale Übertragung und den Bezug der Tiere aus unterschiedlichen Elterntierbetrieben nach Absinken des maternalen Antikörperspiegels zu einer horizontalen Verbreitung innerhalb des Betriebes kommen kann (McFerran und Adair 1977). Auch heute noch können verschiedene Hühneraviadenoviren aus einem Bestand isoliert werden (Kajan et al. 2013; Niczyporuk 2016).

Die vorliegende Doppelinfektion ist vermutlich auch die Erklärung dafür, dass es bei der DNA-Polymerase-PCR zu einer erfolgreichen Amplifikation bei Untersuchung des Isolates P8a kam, obwohl es zuvor als TAdV-B mittels Hexongensequenz klassifiziert worden war. Bei der Virusisolierung und -vermehrung wurde keine Plaquereinigung durchgeführt, daher ist es durchaus möglich, dass der eigentlich hintergründige TAdV-D aus dem Isolat P8a amplifiziert werden konnte, während dies bei TAdV-B mittels der verwendeten Primer nicht möglich war. Eine Verwechslung der beiden Proben wurde durch mehrfache Überprüfung ausgeschlossen. Auch wenn jüngst von der Möglichkeit der Rekombination im Bereich des Hexogens bei Hühneraviadenoviren berichtet wurde (Schachner et al. 2019), erscheint dies im vorliegenden Fall fraglich und müsste erst durch eine erneute Anzucht und Plaquereinigung überprüft werden.

Die Pathogenität von Putenaviadenoviren ist generell unklar, da nur wenige Fallberichte vorliegen. Die untersuchten Putenisolate standen vorberichtlich vor allem im Zusammenhang mit Enteritis, Hepatitis, Splenitis und Polyserositis, wobei bei den letzteren pathologischen Veränderungen auch *E. coli* isoliert worden war. Es gab Hinweise aus der Literatur, dass Aviadenoviren Teil des Poult Enteritis Complexes seien (Barnes et al. 2000; Woolcock und Shivaprasad 2008; Moura-Alvarez et al. 2013), wobei sie erst zu einem späteren Zeitpunkt als eigentlich üblich nachgewiesen (Moura-Alvarez et al. 2013) und als eher untergeordneter Auslöser verstanden worden waren (Barnes et al. 2000). In einem publizierten Fall war auch unklar, ob tatsächlich Adenoviren der Gruppe I eine Rolle am Krankheitsgeschehen spielten, oder ob es sich dabei um einen Nachweis eines Impfstoffes handelte, da die Tiere zuvor gegen den Erreger der hämorrhagischen Enteritis (*Turkey siadenovirus A*, Genus *Siadenovirus*) immunisiert worden waren (Woolcock und Shivaprasad 2008). Von Leberveränderungen in Form von IBH bei Puten wurde bereits im Zusammenhang mit TAdV-2 berichtet (Guy et al. 1988). Eine weitere Fallbeschreibung berichtete von zwei IBH-Ausbrüchen bei jeweils vier Wochen alten Puten im Zusammenhang mit einem Nachweis von Adenoviren der Gruppe I

(Shivaprasad et al. 2001). Allerdings zeigten retrospektive Studien über einen Zeitraum von zwölf Jahren und von über 5000 Einsendungen nur zwei weitere Fälle einer Adenovirus-assoziierten IBH bei Puten (Shivaprasad et al. 2001). Inwieweit die Putenaviadenoviren somit zu einer Lebererkrankung beitragen, ist daher ungewiss. Neben Adenoviren scheinen insbesondere Picornaviren eine Rolle als virale Hepatitisserreger bei der Pute zu spielen (Younus et al. 2017), der Kenntnisstand über ihre Bedeutung bei der Pute ist aber ebenfalls insgesamt noch gering (Yugo et al. 2016).

In der Vergangenheit wurde vor allem von respiratorischen Symptomen berichtet, die aber im Fall von TAdV-4 im Tierversuch nicht reproduzierbar waren (Scott und McFerran 1972) oder wie bei TAdV-1 und TAdV-2 nicht weiter untersucht wurden (McFerran und Adair 1977; Kajan et al. 2010). Weitere Aviadenovirusinfektionen des Atmungstraktes bei Puten wurden durch FAdV-1 oder nicht näher klassifizierbare Adenoviren ausgelöst (Blalock et al. 1975; Cho 1976) oder wurden zusammen mit anderen Erregern festgestellt (Dillman und Simmons 1977; Simmons und Gray 1978; Crespo et al. 1998). Interessanterweise waren Atemwegssymptome bei den Einsendungen aus dem Jahr 2012 in keinem Fall Teil des Vorberichtes, was aber auch dafürsprechen könnte, dass derartige Problematiken von den praktizierenden Tierärzten im Feld nicht in Zusammenhang mit möglichen Adenovirusinfektionen gesehen werden.

Anhand der eingesendeten Proben konnte kein Zusammenhang zwischen dem geschilderten Vorbericht und den verschiedenen TAdV-Spezies hergestellt werden. Einzig auffällig war, dass TAdV-D bei fünf von acht Isolaten bei Tieren, die älter als sechs Wochen waren, festgestellt wurde. Bei den anderen drei Isolaten fehlte leider der Vorbericht. Zwei der drei Isolate des Clusters TAdV-C wurden bei Tieren jünger als sechs Wochen festgestellt, bei dem anderen Isolat lag ebenfalls kein Vorbericht vor. Putenisolate, die als TAdV-B klassifiziert wurden, konnten bei Tieren ab der zweiten bis zur 13. Lebenswoche festgestellt werden. Eine statistische Auswertung ist leider nicht möglich, da hierfür zu wenig Isolate und zu wenig Vorberichte vorlagen. Einzelne Literaturangaben beschreiben Aviadenovirusinfektionen der Puten bereits am ersten bzw. am zehnten Lebenstag (Scott und McFerran 1972; Guy et al. 1988), was für die mögliche vertikale Übertragung spricht. In der Mehrzahl der Fallbeschreibungen waren die betroffenen Tiere allerdings älter als vier Wochen (Cho 1976; Simmons et al. 1976; Crespo et al. 1998; Moura-Alvarez et al. 2013). Dies steht im Kontrast zu FAdV-Infektionen bei Hühnern. Hier treten klinische Symptome eher bei Hühnern jünger als fünf Wochen auf, mit Ausnahme der AGE, die auch bei Jung- und Legehennen auftreten kann (Lim et al. 2012; Hess 2017; Grafl et al. 2018; Grafl et al. 2019).

Insgesamt bleibt die klinische Relevanz der Putenaviadenoviren unklar, da ausschließlich Proben aus erkrankten Putenbeständen untersucht wurden. Allerdings scheint die Verbreitung innerhalb der Putenbestände größer zu sein als bisher vermutet. Weitere epidemiologische

## Diskussion

Studien sowie Pathogenitätsuntersuchungen wären wünschenswert. Solche Studien sollten zukünftig die Virusisolierung mit der Serologie kombinieren, um ein vollständigeres Bild der Infektionsdynamik zu erhalten (Schachner et al. 2020).

## 6. Zusammenfassung

### Untersuchungen zu ausgewählten Aviadenovirusisolaten von Broilern und Puten

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden 20 Aviadenovirusisolaten, die im Jahr 2011 im Rahmen der Routinediagnostik des Institutes für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin aus Probenmaterial von Broilerbeständen isoliert worden waren, näher untersucht. Zehn dieser 20 Isolate wurden als FAdV-A typisiert und standen alle im Kontext von Muskelmagenerosionen. Jeweils zwei weitere Isolate wurden als FAdV-B bzw. FAdV-E typisiert, während fünf verbleibende Isolate der Spezies FAdV-E zugeordnet werden konnte. Ein Isolat konnte nicht typisiert werden. Nachfolgend wurde sich auf die weitere Untersuchung der FAdV-A Isolate beschränkt. Die molekulare Untersuchung der Hexon-, Long- und Shortfibergene dieser zehn FAdV-A Isolate zeigte, dass sie in untersuchten Regionen sowohl untereinander als auch im Vergleich zu Sequenzen aus zuvor berichteten Fällen von Muskelmagenerosionen identisch waren oder zumindest eine sehr hohe genetische Übereinstimmung aufwiesen. Eine hohe genetische Ähnlichkeit bestand auch zu den apathogenen FAdV-A Referenzstämmen CELO und Ote. Festgestellte Mutationen im Bereich der Long- und Short-Fibergene stimmten entweder mit CELO oder mit Ote überein, so dass diese Mutationen höchstwahrscheinlich nicht ursächlich für die Pathogenitätsunterschiede waren.

Der Embryoletalitäts-Assay sollte auf seine Eignung als alternative *in-vivo* Methode zur Differenzierung zwischen apathogenen Referenzstämmen und pathogenen FAdV-A Isolaten untersucht werden. Hier zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen apathogenen Referenzstämmen und pathogenen Feldisolaten hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit der untersuchten Hühnerembryonen was auf eine höhere Pathogenität der untersuchten Feldisolate hinweist. Dies spricht für seine Eignung als alternatives *in-vivo* Modell für bestimmte Fragestellungen von Pathogenitätsstudien insbesondere auch vor dem Hintergrund des 3R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine) bei der Durchführung von Tierversuchen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit Aviadenovirusisolaten, die ebenfalls im Rahmen der Routinediagnostik aus Putenbeständen gewonnen werden konnten. Insgesamt gelang es, 21 Aviadenovirusisolaten aus 19 verschiedenen Putenmastbetrieben zu isolieren. Von diesen 21 Isolaten ließen sich neun Isolate als TAdV-B, zwei als TAdV-C, sieben als TAdV-D und jeweils ein Isolat als TAdV-2, FAdV-B und FAdV-E typisieren. Dies belegt eine weite Verbreitung von Aviadenoviren in deutschen Putenbetrieben - vor allem der neu beschriebenen Spezies TAdV-B und TAdV-D. Darüber hinaus gelang erstmalig der Nachweis von TAdV-2 seit dem Jahr 1988, was beweist, dass dieser Typ nach wie vor in Putenbeständen

## Zusammenfassung

zirkuliert. Durch die Untersuchung der partiellen DNA-Polymerasegenesequenz konnte außerdem gezeigt werden, dass TAdV-2 vermutlich einen weiteren Vertreter der Spezies TAdV-C darstellt.

Insgesamt bleibt die klinische Relevanz der Putenaviadenoviren jedoch unklar, da ausschließlich Proben aus erkrankten Putenbeständen untersucht wurden. Ein Zusammenhang zwischen den vorberichtlich beschriebenen klinischen und pathologischen Veränderungen und den nachgewiesenen TAdV-Spezies konnte nicht hergestellt werden.

## 7. Summary

### Investigations on selected aviadenovirus isolates from broilers and turkeys

In the first part of the present thesis, 20 aviadenovirus isolates were cultured from samples originated from broiler flocks during routine diagnostics of the Institute of Poultry Diseases of the Freie Universität Berlin in 2011 and were further investigated.

Ten out of 20 isolates were typed as FAdV-A from broilers with gizzard erosions. Two additional isolates were typed as FAdV-B and FAdV-E, respectively, while five remaining isolates could be assigned to the FAdV-E species. One isolate could not be typed. Subsequently, further investigation was focused on the FAdV-A isolates. Molecular examination of the hexon-, long-, and short-fibergenes of these ten FAdV-A isolates showed, that in examined regions they were identical to each other and to sequences from previously reported cases of gizzard erosions, or at least showed very high genetic similarity. High genetic similarity also existed to the apathogenic FAdV-A reference strains CELO and Ote. Detected mutations in the long and short fiber gene regions were consistent with either CELO or Ote, so these mutations were not responsible for the differences in pathogenicity.

The embryo lethality assay should be evaluated for its suitability as an alternative *in-vivo* method to differentiate between apathogenic reference strains and pathogenic FAdV-A isolates. The obtained results revealed that there was a statistically significant difference between apathogenic reference strains and pathogenic field isolates with regard to the survival probability of the examined chicken embryos, which indicates a higher pathogenicity of the examined field isolates. This suggests its suitability as an alternative *in-vivo* model for certain questions of pathogenicity studies, especially in the context of the 3R principle (Replace, Reduce, Refine) in animal experiments.

The second part of the work concerned aviadenovirus isolates, which were obtained from samples originated from turkey flocks during routine diagnostics of the Institute of Poultry Diseases of the Freie Universität Berlin in 2012. A total of 21 aviadenovirus isolates were isolated from 19 different turkey flocks. Nine isolates could be typed as TAdV-B, two as TAdV-C, seven as TAdV-D, and one isolate each as TAdV-2, FAdV-B, and FAdV-E. This proves the wide spread of aviadenoviruses in turkey farms in Germany, especially the newly described species TAdV-B and TAdV-D. Additionally, the detection of TAdV-2, which, was achieved for the first time since the year 1988, proving that this type still circulates in turkey flocks in Germany. By examination of the partial DNA-polymerase gene sequence, it was also shown that TAdV-2 probably is an additional representative of the TAdV-C species.

## Summary

However, the clinical relevance of turkey adenoviruses remains unclear because only samples from diseased turkey flocks were examined. In general, there was no correlation between the reported clinical and pathological lesions and the detected TAdV species.

## 8. Literaturverzeichnis

Abe T, Nakamura K, Tojo T, Yuasa N (2001):

Gizzard erosion in broiler chicks by group I avian adenovirus.

Avian Dis, 2001; 45: 234-239

Absalon A E, Morales-Garzon A, Vera-Hernandez P F, Cortes-Espinosa D V, Uribe-Ochoa S M, Garcia L J, Lucio-Decanini E (2017):

Complete genome sequence of a non-pathogenic strain of Fowl Adenovirus serotype 11: Minimal genomic differences between pathogenic and non-pathogenic viruses.

Virology, 2017; 501: 63-69. DOI: 10.1016/j.virol.2016.11.006.

Adair B M, McFerran J B, Calvert V M (1980):

Development of a microtitre fluorescent antibody test for serological detection of adenovirus infection in birds.

Avian Pathol, 1980; 9: 291-300. DOI: 10.1080/03079458008418414.

Alemnesh W, Hair-Bejo M, Aini I, Omar A R (2012):

Pathogenicity of fowl adenovirus in specific pathogen free chicken embryos.

J Comp Pathol, 2012; 146: 223-229. DOI: 10.1016/j.jcpa.2011.05.001.

Almquist H J, Stokstad E L R (1936):

A nutritional deficiency causing gizzard erosions in chicks.

Nature, 1936; 137: 581-582. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/137581b0>.

Altschul S F, Gish W, Miller W, Myers E W, Lipman D J (1990):

Basic local alignment search tool.

J Mol Biol, 1990; 215: 403-410. DOI: 10.1016/s0022-2836(05)80360-2.

Barnes H J, Guy J S, Vaillancourt J P (2000):

Poult enteritis complex.

Rev Sci Tech, 2000; 19: 565-588. DOI: 10.20506/rst.19.2.1234.

Bartels, T., I. Wilk and L. Schrader (2020):

## Literaturverzeichnis

Entwicklung von Nozizeption und Schmerzempfinden bei Hühnerembryonen: [Stellungnahme des FLI].

Informationen des FLI: Empfehlungen und Informationen. Greifswald - Insel Riems, Friedrich-Loeffler-Inst.

Blalock H D G, Simmons, Muse K E (1975):

Adenovirus Respiratory Infection in Turkey Poults.

Avian Dis, 1975; 19: 707-716.

Blanco A E, Barz M, Icken W, Cavero D, Sharifi A R, Voss M, Preisinger R, Buxade C (2017):

Chicken embryo lethality assay for determining the lethal dose and virulence of *Enterococcus faecalis*.

Avian Pathol, 2017; 46: 548-555. DOI: 10.1080/03079457.2017.1324942.

Blanco A E, Barz M, Cavero D, Icken W, Sharifi A R, Voss M, Buxade C, Preisinger R (2018):

Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates by chicken embryo lethality assay and ERIC-PCR.

Avian Pathol, 2018; 47: 23-32. DOI: 10.1080/03079457.2017.1359404.

Burke C N, Luginbuhl R E, Williams L F (1968):

Avian adeno-like viruses--characterization and comparison of seven isolates.

Avian Dis, 1968; 12: 483-505.

Burmester B R, Sharpless G R, Fontes A K (1960):

Virus isolated from avian lymphomas unrelated to lymphomatosis virus.

J Natl Cancer Inst, 1960; 24: 1443-1447.

Calnek B W, Shek W R, Menendez N A, Stiube P (1982):

Serological cross-reactivity of avian adenovirus serotypes in an enzyme-linked immunosorbent assay.

Avian Dis, 1982; 26: 897-906.

Cho B R (1976):

An Adenovirus from a Turkey Pathogenic to Both Chicks and Turkey Poults.

Avian Dis, 1976; 20: 714-723. DOI: 10.2307/1589451.

## Literaturverzeichnis

Cook J, Radke J (2017):

Mechanisms of pathogenesis of emerging adenoviruses.

F1000Res., 2017; 6: 90. DOI: 10.12688/f1000research.10152.1.

Cook J K (1968):

Isolation of a CELO virus from fertile chicken eggs.

Vet Rec, 1968; 82: 294.

Cowen B S (1988):

Chicken Embryo Propagation of Type I Avian Adenoviruses.

Avian Dis, 1988; 32: 347-352.

Crespo R, Shivaprasad HL, Droual R, Chin R P, Woolcock P R, Carpenter T E (1998):

Inclusion Body Tracheitis Associated with Avian Adenovirus in Turkeys.

Avian Dis, 1998; 42: 589-596.

Davison A J, Wright K M, Harrach B (2000):

DNA sequence of frog adenovirus.

J Gen Virol, 2000; 81: 2431-2439. DOI: 10.1099/0022-1317-81-10-2431.

Dawson G J, Yates V J, Chang P W, Orsi L N, Pronovost A D (1979):

Egg transmission of avian adenovirus-associated virus and CELO virus during a naturally occurring infection.

Am J Vet Res, 1979; 40: 1624-1627.

Dawson G J, Orsi L N, Yates V J, Chang P W, Pronovost A D (1980):

An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to avian adenovirus and avian adenovirus-associated virus in chickens.

Avian Dis, 1980; 24: 393-402.

de Herdt P, Timmerman T, Defoort T, Lycke K, Jaspers R (2013):

Fowl adenovirus infections in Belgian broilers: a ten-year survey.

Vlaams Diergeneeskd Tijdschr, 2013; 82: 127-132.

Dillman R C, Simmons D G (1977):

## Literaturverzeichnis

Histopathology of a Rhinotracheitis of Turkey Poults Associated with Adenoviruses.  
Avian Dis, 1977; 21: 481-491.

Dinev I (2010):

Enzootic outbreak of necrotic gastritis associated with *Clostridium perfringens* in broiler chickens.

Avian Pathol, 2010; 39: 7-10. DOI: 10.1080/03079450903431382.

Domanska-Blicharz K, Tomczyk G, Smietanka K, Kozaczynski W, Minta Z(2011):

Molecular characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens with gizzard erosions.

Poult Sci, 2011; 90: 983-989. DOI: 10.3382/ps.2010-01214.

Doszpoly A B, Harrach B, LaPatra S, Benkő M (2019):

Unconventional gene arrangement and content revealed by full genome analysis of the white sturgeon adenovirus, the single member of the genus *Ichtadenovirus*.

Infect Genet Evol, 2019; 75: 103976. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103976.

Du Bose R T, Grumbles L C (1959):

The Relationship between Quail Bronchitis Virus and Chicken Embryo Lethal Orphan Virus.

Avian Dis, 1959; 3: 321-344.

Fadly A M, Winterfield RW, Olander J (1976):

Role of the bursa of Fabricius in the pathogenicity of inclusion body hepatitis and infectious bursal disease viruses.

Avian Dis, 1976; 20: 467-477.

Feichtner F A, Schachner A, Berger E, Hess M (2017):

Development of sensitive indirect enzyme-linked immunosorbent assays for specific detection of antibodies against fowl adenovirus serotypes 1 and 4 in chickens.

Avian Pathol, 2017; 47: 1-10. DOI: 10.1080/03079457.2017.1372561.

Feichtner F A, Schachner A, Berger E, Hess M (2018):

Fiber-based fluorescent microsphere immunoassay (FMIA) as a novel multiplex serodiagnostic tool for simultaneous detection and differentiation of all clinically relevant fowl adenovirus (FAdV) serotypes.

J Immunol Methods, 2018; 458: 33-43. DOI: 10.1016/j.jim.2018.03.002.

Felsenstein J (1985):

CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP.

Evolution, 1985; 39: 783-791. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

Fossum O, Sandstedt K, Engstrom BE (1988):

Gizzard erosions as a cause of mortality in White Leghorn chickens.

Avian Pathol, 1988; 17: 519-525. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079458808436471>.

Garmyn A, Bosseler L, Braeckmans D, Van Erum J, Verlinden M (2018):

Adenoviral Gizzard Erosions in Two Belgian Broiler Farms.

Avian Dis, 2018; 62: 322-325. DOI: 10.1637/11826-030918-Case.1.

Gelderblom H, Maichle-Lauppe I (1982):

The fibers of fowl adenoviruses.

Arch Virol, 1982; 72: 289-298.

Gibbs P S, Maurer J J, Nolan L K, Wooley R E (2003):

Prediction of Chicken Embryo Lethality with the Avian Escherichia coli Traits Complement Resistance, Colicin V Production, and Presence of the Increased Serum Survival Gene Cluster (iss).

Avian Dis, 2003; 47: 370-379.

Gjevre A G, Kaldhusdal M, Eriksen G S (2013):

Gizzard erosion and ulceration syndrome in chickens and turkeys: a review of causal or predisposing factors.

Avian Pathol, 2013; 42: 297-303.

Goodwin M A (1993):

Adenovirus inclusion body ventriculitis in chickens and captive bobwhite quail ( *Colinus virginianus* ).

Avian Dis, 1993; 37: 568-571. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/1591688>.

Grabarevic Z, Tisljar M, Dzaja P, Artukovic B, Seiwerth S, Sikiric P (1993):

Stress induced gizzard erosion in chicks. I. Gross and histopathological findings.

J Vet Med, 1993; 40: 265-270.

## Literaturverzeichnis

Grafl B, F. Aigner, D. Liebhart, A. Marek, I. Prokofieva, J. Bachmeier and M. Hess (2012):

Vertical transmission and clinical signs in broiler breeders and broilers experiencing adenoviral gizzard erosion.

Avian Pathol, 2012; 41: 599-604. DOI: 10.1080/03079457.2012.740614.

Grafl, B., Liebhart D, Günes A, Wernsdorf P, Aigner F, Bachmeier J, Hess M (2013):

Quantity of virulent fowl adenovirus serotype 1 correlates with clinical signs, macroscopical and pathohistological lesions in gizzards following experimental induction of gizzard erosion in broilers.

Vet Res, 2013; 44: 38. DOI: 10.1186/1297-9716-44-38.

Grafl B, Prokofieva I, Wernsdorf P, Steinborn R, Hess M (2014):

Infection with an apathogenic fowl adenovirus serotype-1 strain (CELO) prevents adenoviral gizzard erosion in broilers.

Vet Microbiol, 2014; 172: 177-185. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.05.020.

Grafl B., Prokofieva I, Wernsdorf P, Dublec K, Hess M (2015):

Clinical signs and progression of lesions in the gizzard are not influenced by inclusion of ground oats or whole wheat in the diet following experimental infection with pathogenic fowl adenovirus serotype 1.

Avian Pathol, 2015; 44: 230-236. DOI: 10.1080/03079457.2015.1028886.

Grafl B, Garcia-Rueda C, Cargill P, Wood A, Schock A, Liebhart D, Schachner A, Hess M (2018):

Fowl aviadenovirus serotype 1 confirmed as the aetiological agent of gizzard erosions in replacement pullets and layer flocks in Great Britain by laboratory and in vivo studies.

Avian Pathol, 2018; 47: 63-72. DOI: 10.1080/03079457.2017.1367364.

Grafl B., Berger E, Wernsdorf P, Hess M (2019):

Successful reproduction of adenoviral gizzard erosion in 20-week-old SPF layer-type chickens and efficacious prophylaxis due to live vaccination with an apathogenic fowl adenovirus serotype 1 strain (CELO).

Vaccine, 2019; 38: 143-149. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.10.039.

Grimes T M, King D T (1977):

Effect of Maternal Antibody on Experimental Infections of Chickens with a Type-8 Avian Adenovirus.

Avian Dis, 1997; 21: 97-112.

## Literaturverzeichnis

Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010):

New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0.

Syst Biol, 2010; 59: 307-321. DOI: 10.1093/sysbio/syq010.

Gunes A, Marek A, Graf B, Berger E, Hess M (2012):

Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E).

J Virol Methods, 2012; 183: 147-153. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.04.005.

Gunes, A. Marek A, Hess M (2013):

Species determination of fowl adenoviruses based on the 52K gene region.

Avian Dis, 2013; 57: 290-294.

Guy J S, Schaeffer J L, Barnes H J (1988):

Inclusion-Body Hepatitis in Day-Old Turkeys.

Avian Dis, 1988; 32: 587-590.

Guy J S, Barnes H J (1997):

Characterization of an Avian Adenovirus Associated with Inclusion Body Hepatitis in Day-Old Turkeys.

Avian Dis, 1997; 41: 726-731.

Harrach B, Benko M, Both G W, Brown M, Davison A J, Echavarría M, Hess M, Jones M S, Kajon A, Lehmkuhl H D, Mautner V, Mittal S K, Wadell G (2011):

Family Adenoviridae - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

Virus Taxonomy. King A M Q, Lefkowitz E, Adams M J, Carstens E B: 125-141.

978-0-12-384684-6

Harrach B, Tarjan Z L, Benko M (2019):

Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo.

FEBS Lett, 2019; 593: 3660-3673. DOI: 10.1002/1873-3468.13687.

Hess M (2000):

Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review.

## Literaturverzeichnis

Avian Pathol, 2000; 29: 195-206. DOI: 10.1080/03079450050045440.

Hess M (2017):

Commensal or pathogen – a challenge to fulfil Koch's Postulates.

Br Poult Sci, 2017; 58: 1-12. DOI: 10.1080/00071668.2016.1245849.

Hess M (2020):

Aviadenovirus Infections.

In: Diseases of Poultry/Hrsg.: Swayne D E, Rautenschlein S, Boulianne M, Logue C M, McDougald L R, Nair V L, Suarez D L, de Wit S, Grimes T, Johnson D, Kromm M, Prajitno T Y, Rubinoff I, Zavala G, 14. Auflage, S. 322-332

Hoboken; NJ: Wiley-Blackwell - Online ISBN 9781119371199. DOI:10.1002/9781119371199

Holst W F, Halbrook E R (1933):

A "SCURVY-LIKE" DISEASE IN CHICKS.

Science, 1933; 77: 354.

Johnson D C, Pinedo C D (1971):

Case Report: Gizzard Erosion and Ulceration in Peru Broilers.

Avian Dis, 1971; 15: 835-837.

Jung A, Metzner M, Ryll M (2017):

Comparison of pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus cecorum* strains from different animal species.

BMC Microbiol, 2017; 17: 33. DOI: 10.1186/s12866-017-0949-y.

Junnu S, Lertwatcharasarakul P, Jala S, Phattanakunanan S, Moonjit P, Songserm T (2014):

Developing an indirect ELISA based on recombinant hexon protein for serological detection of inclusion body hepatitis in chickens.

J Vet Sci, 2014; 76: 289-293. DOI: 10.1292/jvms.13-0196.

Kajan G L, Stefancsik R, Ursu K, Palya V, Benko M (2010):

The first complete genome sequence of a non-chicken aviadenovirus, proposed to be turkey adenovirus 1.

Virus Res, 2010; 153: 226-233. DOI: 10.1016/j.virusres.2010.08.006.

## Literaturverzeichnis

Kajan G L, Davison A J, Palya V, Harrach B, Benko M (2012):

Genome sequence of a waterfowl aviadenovirus, goose adenovirus 4.

J Gen Virol, 2012; 93: 2457-2465. DOI: 10.1099/vir.0.042028-0.

Kajan G L, Kecskemeti S, Harrach B and Benko M (2013):

Molecular typing of fowl adenoviruses, isolated in Hungary recently, reveals high diversity.

Vet Microbiol, 2013; 167: 357-363. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.09.025.

Kaplan E L, Meier P (1958):

Nonparametric Estimation from Incomplete Observations.

J Am Stat Assoc, 1958; 53: 457-481.

Kawamura H, Shimizu F, Tsubahara H (1964):

AVIAN ADENOVIRUS: ITS PROPERTIES AND SEROLOGICAL CLASSIFICATION.

Natl Inst Anim Health Q (Tokyo), 1964; 4: 183-193.

Kleine A, Hafez H M, Luschow D (2017):

Investigations on aviadenoviruses isolated from turkey flocks in Germany.

Avian Pathol, 2017; 46: 181-187. DOI: 10.1080/03079457.2016.1237013.

Kraft V, Tischer I (1978):

Cell cycle-dependent multiplication of avian adenoviruses in chicken embryo fibroblasts.

Arch Virol, 1978; 57: 243-254. DOI: 10.1007/bf01315088.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018):

MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.

Mol Biol Evol, 2018; 35: 1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

Lemey P (2009):

The phylogenetic handbook : a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing.

2. Auflage, Cambridge [u.a.]: Cambridge Univ. Press - ISBN 978-0-521-73071-6

Lenz S D, Hoerr F J, Ellis A C, Toivio-Kinnucan M A, Yu M (1998):

## Literaturverzeichnis

Gastrointestinal pathogenicity of adenovirus and reoviruses isolated from broiler chickens in Alabama.

J Vet Diagn Invest, 1998; 10: 145-151.

Li Y, Fu J, Chang S, Fang L, Cui S, Wang Y, Cui Z, Zhao P (2017):

Isolation, identification, and hexon gene characterization of fowl adenoviruses from a contaminated live Newcastle disease virus vaccine.

Poult Sci, 2017; 96: 1094-1099. DOI: 10.3382/ps/pew405.

Lim T H, Kim B Y, Kim M S, Jang J H, Lee D H, Kwon Y k, Lee J B, Park S Y, Choi I S, Song C S (2012):

Outbreak of gizzard erosion associated with fowl adenovirus infection in Korea.

Poult Sci, 2012; 91: 1113-1117. DOI: 10.3382/ps.2011-02050.

Lu H, Wang W, Zhang J, Shao H, Li L, Li T, Xie Q, Wan Z, Qin A, J (2020):

An efficient fiber-based ELISA for detection of antibody against fowl adenovirus serotypes 7 and 8.

J Vet Diagn Invest, 2020; 32: 444-449. DOI: 10.1177/1040638720913354.

Maasjost J, Lüschoew D, Kleine A, Hafez H M, Mühldorfer K (2019):

Presence of Virulence Genes in *Enterococcus* Species Isolated from Meat Turkeys in Germany Does Not Correlate with Chicken Embryo Lethality.

Biomed Res Int 2019; 6147695. DOI: 10.1155/2019/6147695.

Manarolla G, Pisoni G, Moroni P, Gallazzi D, Sironi G, Rampin T (2009):

Adenoviral gizzard erosions in Italian chicken flocks.

Vet Rec, 2009; 164: 754-756.

Marek A, Gunes A, Schulz E, Hess M (2010a):

Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region.

J Virol Methods, 2010; 170: 147-154. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.09.019.

Marek A, Schulz E, Hess C, Hess M (2010b):

Comparison of the fibers of Fowl adenovirus A serotype 1 isolates from chickens with gizzard erosions in Europe and apathogenic reference strains.

J Vet Diagn Invest, 2010; 22: 937-941.

## Literaturverzeichnis

Marek A, Ballmann M Z, Kosiol C, Harrach B, Schlötterer C, Hess M (2014):

Whole genome sequences of two turkey adenovirus types reveal the existence of two unknown lineages that merit the establishment of novel species within the genus *Aviadenovirus*.

J Gen Virol, 2014; 95: 156-170. DOI: 10.1099/vir.0.057711-0.

Mase M, Mitake H, Inoue T, Imada T (2009):

Identification of Group I-III Avian Adenovirus by PCR Coupled with Direct Sequencing of the Hexon Gene.

J Vet Med Sci, 2009; 71: 1239-1242. DOI: 10.1292/jvms.71.1239

Mase M, Nakamura N (2014):

Phylogenetic Analysis of Fowl Adenoviruses Isolated from Chickens with Gizzard Erosion in Japan.

J Vet Med Sci, 2014; 76: 1535-1538. DOI: 10.1292/jvms.14-0312

Matczuk A K, Niczyporuk J S, Kuczkowski M, Wozniakowski G, Nowak M, Wieliczko A (2017):

Whole genome sequencing of *Fowl aviadenovirus A* - a causative agent of gizzard erosion and ulceration, in adult laying hens.

Infect Genet Evol, 2017; 48: 47-53. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.12.008.

Matos M, Graf B, Liebhart D, Hess M (2016):

The outcome of experimentally induced inclusion body hepatitis (IBH) by fowl aviadenoviruses (FAdVs) is crucially influenced by the genetic background of the host.

Vet Res, 2016; 47: 69. DOI: 10.1186/s13567-016-0350-0.

Mazaheri A, Prusas C, Voss M, Hess M (1998):

Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens.

Avian Pathol, 1998; 27: 269-276.

McFarlane W D, Graham W R, Hall G E (1931):

Studies in Protein Nutrition of the Chick: I. The Influence of Different Protein Concentrates on the Growth of Baby Chicks, when Fed as the Source of Protein in Various Simplified Diets.

J Nutr, 1931; 4: 331-349.

McFerran J B, Adair B M (1977):

## Literaturverzeichnis

Avian adenoviruses-a review.

Avian Pathol, 1977; 6: 189-217. DOI: 10.1080/03079457708418228.

McFerran JB (1997):

Group I adenovirus infections.

In: Diseases of Poultry/Hrsg.: Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, McDougald L R, Saif Y M, 10. Auflage, S. 608-620

Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press - ISBN 0-8138-0427-2

McFerran JB (1998):

Adenoviruses.

In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens/Hrsg.: Swayne D E, Glisson J R, Jackwood M W, Pearson J E, Reed W M, 4. Auflage, S. 100-105

Pennsylvania: AAAP - ISBN 0-915538-07-5

McFerran JB, Smyth J A (2000):

Avian Adenoviruses.

Rev Sci Tech, 2000; 19: 589-601.

Meulemans G, Boschmans M, v. d. Berg T P, Decaesstecker M (2001):

Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses.

Avian Pathol, 2001; 30: 655-660. DOI: 10.1080/03079450120092143.

Meulemans G, Couvreur B, Decaesstecker M, Boschmans M, v. d. Berg T P (2004):

Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses.

Avian Pathol, 2004; 33: 164-170. DOI: 10.1080/03079450310001652086.

Miller L T, Yates V J (1972):

Cytochemistry and immunofluorescence of CELO virus, an oncogenic avian adenovirus, in chicken embryo kidney and chicken embryo fibroblastic cell cultures.

Avian Dis, 1972; 16: 558-573.

Mirzazadeh A, Asasi K, Schachner A, Mosleh N, Liebhart D, M. Hess M, Graf B (2019):

Gizzard Erosion Associated with Fowl Adenovirus Infection in Slaughtered Broiler Chickens in Iran.

## Literaturverzeichnis

Avian Dis, 2019; 63: 568-576. DOI: 10.1637/aviandiseases-D-19-00069.

Mockett A P, Cook J K (1983):

The use of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect IgG antibodies to serotype-specific and group-specific antigens of fowl adenovirus serotypes 2, 3 and 4.

J Virol Methods, 1983; 7: 327-335.

Moura-Alvarez J, Chacon J V, Scanavini L S, Nunez L F, Astolfi-Ferreira C S, Jones R C, Piantino Ferreira A J (2013):

Enteric viruses in Brazilian turkey flocks: Single and multiple virus infection frequency according to age and clinical signs of intestinal disease.

Poult Sci, 2013; 92: 945-955. DOI: 10.3382/ps.2012-02849.

Muroga N, Taharaguchi S, Ohta H, Yamazaki K, Takase K (2006):

Pathogenicity of fowl adenovirus isolated from gizzard erosions to immuno-suppressed chickens.

J Vet Med Sci, 2006; 68: 289-291.

Nakamura K, Ohyama T, Yamada M, Abe T, Tanaka H, Mase M (2002):

Experimental gizzard erosions in specific-pathogen-free chicks by serotype 1 group I avian adenoviruses from broilers.

Avian Dis, 2002; 46: 893-900.

Niczyporuk J S, Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E (2015):

Application of cross-priming amplification (CPA) for detection of fowl adenovirus (FAdV) strains.

Arch Virol, 2015; 160: 1005-1013. DOI: 10.1007/s00705-015-2355-9.

Niczyporuk J S (2016):

Phylogenetic and geographic analysis of fowl adenovirus field strains isolated from poultry in Poland.

Arch Virol, 2016; 161: 33-42. DOI: 10.1007/s00705-015-2635-4.

Niczyporuk J S, Czekaj H (2018):

A comparative pathogenicity analysis of two adenovirus strains, 1/A and 8a/E, isolated from poultry in Poland.

Arch Virol, 2018; 163: 3005-3013. DOI: 10.1007/s00705-018-3965-9.

Niczyporuk J S, Kozdruń W, Czekaj H, Styś-Fijoł N, Piekarska K (2020):

Detection of fowl adenovirus D strains in wild birds in Poland by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP).

BMC Vet Res, 2020; 16: 58. DOI: 10.1186/s12917-020-2271-4.

Novoa-Garrido M, Larsen S, Kaldhusdal M (2006):

Association between gizzard lesions and increased caecal *Clostridium perfringens* counts in broiler chickens.

Avian Pathol, 2006; 35: 367-372. DOI: 10.1080/03079450600924150.

Oh J Y, Kang M S, Yoon H, Choi H W, An B K, Shin E G, Kim Y J, Kim M J, Kwon J H, Kwon Y K (2012):

The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes.

Poult Sci, 2012; 91: 370-375. DOI: 10.3382/ps.2011-01807.

Okuda Y, Ono M, Yazawa S, Imai Y, Shibata I, Sato S (2001a):

Pathogenicity of serotype 1 fowl adenovirus in commercial broiler chickens.

Avian Dis, 2001; 45: 819-827.

Okuda Y, Ono M, Yazawa S, Shibata I, Sato S (2001b):

Experimental infection of specific-pathogen-free chickens with serotype-1 fowl adenovirus isolated from a broiler chicken with gizzard erosions.

Avian Dis, 2001; 45: 19-25.

Okuda Y, Ono M, Shibata I, Sato S (2004):

Pathogenicity of serotype 8 fowl adenovirus isolated from gizzard erosions of slaughtered broiler chickens.

J Vet Med Sci, 2004; 66: 1561-1566.

Okuda Y, Ono M, Shibata I, Sato S, Akashi H (2006):

Comparison of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism pattern of the fiber gene and pathogenicity of serotype-1 fowl adenovirus isolates from gizzard erosions and from feces of clinically healthy chickens in Japan.

J Vet Diagn Invest, 2006; 18: 162-167.

## Literaturverzeichnis

Ono M, Okuda Y, Yazawa S, Shibata I, Tanimura N, Kimura K, Haritani M, Mase M, Sato S (2001):

Epizootic outbreaks of Gizzard Erosion Associated with Adenovirus Infection in Chickens. *Avian Dis*, 2001; 45: 268-275.

Ono M, Okuda Y, Yazawa S, Imai Y, Shibata I, S. Sato S, Okada K (2003):

Adenoviral gizzard erosion in commercial broiler chickens. *Vet Pathol*, 2003; 40: 294-303. DOI: <http://dx.doi.org/10.1354/vp.40-3-294>.

Ono M, Okuda Y, Shibata I, Sato S, Okada K (2004):

Pathogenicity by parenteral injection of fowl adenovirus isolated from gizzard erosion and resistance to reinfection in adenoviral gizzard erosion in chickens. *Vet Pathol*, 2004; 41: 483-489. DOI: 10.1354/vp.41-5-483.

Ono M, Okuda Y, Shibata I, Sato S, Okada K (2007):

Reproduction of adenoviral gizzard erosion by the horizontal transmission of fowl adenovirus serotype 1. *J Vet Med Sci*, 2007; 69: 1005-1008.

Pallister J, Wright P J, Sheppard M (1996):

A single gene encoding the fiber is responsible for variations in virulence in the fowl adenoviruses. *J Virol*, 1996; 70: 5115-5122.

Pan Q, Liu L, Gao Y, Liu C, Qi X, Zhang Y, Wang Y, Li K, Gao L, Wang X, Cui H (2017):

Characterization of a hypervirulent fowl adenovirus 4 with the novel genotype newly prevalent in China and establishment of reproduction infection model of hydropericardium syndrome in chickens. *Poult Sci*, 2017; 96: 1581-1588. DOI: 10.3382/ps/pew431.

Pan Q, Wang J, Gao Y, Cui H, Liu C, Qi X, Zhang Y, Wang Y, Wang X (2018):

The Natural Large Genomic Deletion Is Unrelated to the Increased Virulence of the Novel Genotype Fowl Adenovirus 4 Recently Emerged in China. *Viruses*, 2018; 10: 494. DOI: 10.3390/v10090494.

Pizzuto M S, De Battisti C, Marciano S, Capua I, Cattoli G (2010):

Pyrosequencing analysis for a rapid classification of fowl adenovirus species.

Avian Pathol, 2010; 39: 391-398. DOI: 10.1080/03079457.2010.510499.

Rajasekhar R, Roy P (2014):

Recombinant hexon antigen based single serum dilution ELISA for rapid serological profiling against fowl adenovirus-4 causing hydropericardium syndrome in chickens.

J Virol Methods, 2014; 207: 121-127. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.06.017.

Raue R, Hess M (1998):

Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus.

J Virol Methods, 1998; 73: 211-217.

Raue R, Gerlach H, Müller H (2005):

Phylogenetic analysis of the hexon loop 1 region of an adenovirus from psittacine birds supports the existence of a new psittacine adenovirus (PsAdV).

Arch Virol, 2005; 150: 1933-1943.

Romanova N, Corredor JC, Nagy E (2009):

Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay.

J Virol Methods, 2009; 159: 58-63. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.02.026.

Rosenberger JK, Klopp S, R. Eckroade J, Krauss WC (1975):

The roles of the infectious bursal agent and several avian adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic-anemia syndrome and gangrenous dermatitis.

Avian Dis, 1975; 19: 717-729.

Ross E (1979):

Effect of pelleted feed on the incidence of gizzard erosion and black vomit in broilers.

Avian Dis, 1979; 23: 1051-1054. DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/1589621>.

Schachner A, Matos M, Graf B, Hess M (2017):

Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control - a review on the current global situation.

Avian Pathol, 2017; 47: 1-16. DOI: 10.1080/03079457.2017.1385724.

Schachner A, Gonzalez G, Endler L, Ito K, Hess M (2019):

## Literaturverzeichnis

Fowl Adenovirus (FAdV) Recombination with Intertypic Crossovers in Genomes of FAdV-D and FAdV-E, Displaying Hybrid Serological Phenotypes.

Viruses, 2019; 11: 1094. DOI: 10.3390/v11121094.

Schachner A, Grafl B, Hess M (2020):

Spotlight on avian pathology: fowl adenovirus (FAdV) in chickens and beyond - an unresolved host-pathogen interplay.

Avian Pathol, 2020; 1-4. DOI: 10.1080/03079457.2020.1810629.

Schade B, Schmitt F, Böhm B, Alex M, Fux R, Cattoli G, Terregino C, Monne I, Currie R J W, Olias P (2013):

Adenoviral Gizzard Erosion in Broiler Chickens in Germany.

Avian Dis, 2013; 57: 159-163. DOI: 10.1637/10330-082312-Case.1

Scott M, McFerran J B (1972):

Isolation of adenoviruses from turkeys.

Avian Dis, 1972; 16: 413-420.

Seo H S, Cha S Y, Kang M, Jang H K (2013):

Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of *Riemerella anatipestifer* isolates.

Avian Pathol, 2013; 42: 387-392. DOI: 10.1080/03079457.2013.816654.

Shivaprasad H L, Woolcock P R, McFarland M D (2001):

Group I avian adenovirus and avian adeno-associated virus in turkey poults with inclusion body hepatitis.

Avian Pathol, 2001; 30: 661-666. DOI: 10.1080/03079450120092152.

Simmons D G, Gray J G (1978):

Transmission of Acute Respiratory Disease (Rhinotracheitis) of Turkeys.

Avian Dis, 1978; 23: 132-138.

Simmons D G, Miller S E, Gray J G, Blalock H G, Colwell W M (1976):

Isolation and Identification of a Turkey Respiratory Adenovirus.

Avian Dis, 1976; 20: 65-74.

## Literaturverzeichnis

Slaine P D, Ackford J G, Kropinski A M, Kozak R A, Krell P J, Nagy E (2016):

Molecular characterization of pathogenic and nonpathogenic fowl adenovirus serotype 11 isolates.

Can J Microbiol, 2016; 62: 993-1002. DOI: 10.1139/cjm-2016-0297.

Sohaimi N M, Bejo M H, Omar A R, Ideris A, Isa N M (2018):

Hexon and fiber gene changes in an attenuated fowl adenovirus isolate from Malaysia in embryonated chicken eggs and its infectivity in chickens.

J Vet Sci, 2018; 19: 759-770. DOI: 10.4142/jvs.2018.19.6.759.

Steer P A, Kirkpatrick N C, O'Rourke D, Noormohammadi A H (2009):

Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region.

J Clin Microbiol, 2009; 47: 311-321. DOI: 10.1128/JCM.01567-08.

Su Q, Li Y, Meng F, Cui Z, Chang S, Zhao P (2018):

Newcastle disease virus-attenuated vaccine co-contaminated with fowl adenovirus and chicken infectious anemia virus results in inclusion body hepatitis-hydropericardium syndrome in poultry.

Vet Microbiol, 2018; 218: 52-59. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.03.019.

Sutjipto S, Miller S E, Simmons D G, Dillman R C (1977):

Physicochemical Characterization and Pathogenicity Studies of Two Turkey Adenovirus Isolants.

Avian Dis, 1977; 21: 549-556.

Tan P K, Michou A I, Bergelson J, M. Cotton M (2001):

Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral fibre proteins.

J Gen Virol, 2001; 82: 1465–1472.

Tanimura N, Nakamura K, Imai K, Maeda M, Gobo T, Nitta S, Ishihara T, Amano H (1993):

Necrotizing Pancreatitis and Gizzard Erosion Associated with Adenovirus Infection in Chickens.

Avian Dis, 1993; 37: 606-611.

Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J (1994):

## Literaturverzeichnis

CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.

Nucleic Acids Res, 1994; 22: 4673-4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673.

Tisljar M, Grabarevic Z, Artukovic B, Simec Z, Dzaja P, Vranesic D, Bauer A, Tudja M, Herak-Perkovic V, Juntas P, Pogacnik M (2002):

Gizzerosine-induced histopathological lesions in broiler chicks.

Br Poult Sci, 2002; 43: 86-93. DOI: 10.1080/00071660120109845.

Townsend M K, Carr N J, Iyer J G, Horne S M, Gibbs P S, Pruss B M (2008):

Pleiotropic phenotypes of a *Yersinia enterocolitica* flhD mutant include reduced lethality in a chicken embryo model.

BMC Microbiol, 2008; 8: 12. DOI: 10.1186/1471-2180-8-12.

v. Bülow V, Rudolph R, Fuchs B (1986):

Folgen der Doppelinfection von Kühen mit Adenovirus oder Reovirus und dem Erreger der aviären infektiösen Anämie (CAA)\*.

J Vet Med, 1986; 33: 717-726. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1986.tb00092.x>.

Vera-Hernández P F, Morales-Garzón A, Cortés-Espinosa D V, Galiote-Flores A, García-Barrera L J, Rodríguez-Galindo E T, Toscano-Contreras A, Lucio-Decanini E, Absalón A E (2016):

Clinicopathological characterization and genomic sequence differences observed in a highly virulent fowl Aviadenvirus serotype 4.

Avian Pathol, 2016; 45: 73-81. DOI: 10.1080/03079457.2015.1125443.

Villegas P (1998):

Titration of Biological Suspensions.

In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens/Hrsg.: Swayne D E, Glisson J R, Jackwood M W, Pearson J E, Reed W M, 4. Auflage, S. 248-253

Pennsylvania: AAAP - ISBN 0-915538-07-5

Vrati S, Brookes D E, Strike P, Khatri A, Boyle D B, Both G W (1996):

Unique genome arrangement of an ovine adenovirus: identification of new proteins and proteinase cleavage sites.

Virology, 1996; 220: 186-199. DOI: 10.1006/viro.1996.0299.

Woolcock P R, Shivaprasad H L (2008):

Electron Microscopic Identification of Viruses Associated with Poult Enteritis in Turkeys.  
Avian Dis, 2008; 52: 209-213.

Wooley R E, Gibbs P S, Brown T P, Maurer J J (2000):  
Chicken Embryo Lethality Assay for Determining the Virulence of Avian *Escherichia coli*  
Isolates.  
Avian Dis, 2000; 44: 318-324.

Xie Z, Luo S, Fan Q, Xie L, Liu J, Xie Z, Pang Y, Deng X, Wang X (2013):  
Detection of antibodies specific to the non-structural proteins of fowl adenoviruses in infected  
chickens but not in vaccinated chickens.  
Avian Pathol, 2013; 42: 491-496. DOI: 10.1080/03079457.2013.829553.

Xie Z, Tang Y, Fan Q, Liu J, Pang Y, Deng X, Xie Z, Peng Y, Xie L, Khan M I (2011):  
Rapid Detection of Group I Avian Adenoviruses by a Loop-Mediated Isothermal Amplification.  
Avian Dis, 2011; 55: 575-579, 575.

Yates V J, Ablashi D V, Chang P W, Fry D E (1962):  
The Chicken-Embryo-Lethal-Orphan (CELO) Virus as a Tissue-Culture Contaminant.  
Avian Dis, 1962; 6: 406-411.

Yates V J, Fry D E (1957):  
Observations on a Chicken Embryo Lethal Orphan (CELO) Virus.  
Am J Vet Res, 1957; 18: 657-660.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T L (2012):  
Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.  
BMC Bioinformatics, 2012; 13: 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

Younus, M., Q. Nisa, M. T. Munir, T. Jamil, K. Kaboudi, Z. U. Rehman, S. Umar and M. A. Shah (2017):  
Viral hepatitis in chicken and turkeys.  
Worlds Poult Sci J, 2017; 73: 379-394. DOI: 10.1017/S0043933917000228.

Yugo D M, Hauck R, Shivaprasad H L, Meng X J (2016):

## Literaturverzeichnis

Hepatitis Virus Infections in Poultry.

Avian Dis, 2016; 60: 576-588. DOI: 10.1637/11229-070515-Review.1.

Zhang J, Liu J, An D, Fan Y, Cheng Z, Tang Y, Diao Y (2020):

A novel recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of epidemic fowl adenovirus.

Poult Sci, 2020; 99: 6446-6453. DOI: 10.1016/j.psj.2020.08.021.

Zhang Y, Liu R, Tian K, Wang Z, Yang X, Gao D, Zhang Y, Fu J, Wang H, Zhao J (2018):

Fiber2 and hexon genes are closely associated with the virulence of the emerging and highly pathogenic fowl adenovirus 4.

Emerg Microbes Infect, 2018; 7: 199. DOI: 10.1038/s41426-018-0203-1.

Ziegler A, Lange S, Bender R (2007):

Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rang-Test

Dtsch Med Wochenschr, 2007; 132 Suppl 1: 39-41. DOI: 10.1055/s-2007-959040.

## Anhang

### GenBank-Nummern der untersuchten Isolate:

#### Broiler

Kennzeichnung	Long-Fiber	Short-Fiber
B3	MW238773	MW238783
B4	MW238774	MW238784
B5	MW238775	MW238785
B8	MW238776	MW238786
B9	MW238777	MW238787
B10	MW238778	MW238788
B12	MW238779	MW238789
B13	MW238780	MW238790
B14	MW238781	MW238791
B15	MW238782	MW238792

#### Puten

Kennzeichnung	Hexon	DNA-Polymerase
P1	KP828387	KR014810
P2	KP828386	/
P3	KP828385	/
P4	KP828384	KR014809
P5	KP828383	/
P6	KP828367	/
P7a	KP828382	/
P7b	KP828381	/
P8a	KP828380	KR014813
P8b	KP828379	KR014812
P9	KP828378	/
P10	KP828377	/
P11	KP828376	KR014811
P12	KP828375	/
P13	KP828374	/
P14	KP828373	KR014808
P15	KP828372	KR014807
P16	KP828371	/
P17	KP828370	/
P18	KP828369	/
P19	KP828368	KR014806

/ keine Sequenz vorhanden

## Publikationsverzeichnis

- Kleine A, LüschoD, Hafez H M (2013):  
Aktuelle Untersuchungen zur Adenovirusinfektion beim Geflügel bei Puten in Deutschland  
In: Tagung der DVG-Fachgruppe Geflügelkrankheiten und der Deutschen Gruppe der WVPA/Hrsg.: Rautenschlein S  
84. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten: Hannover, 2. und 3. Mai 2013; Gießen: DVG, S. 47–49  
ISBN 978-3-86345-146-2
- Kleine A, LüschoD, Hafez H M (2013):  
Recent investigations on Adenovirus infections of turkeys  
In: Continuous improvement of turkey production and health: never-ending story: proceedings of the 7th "Hafez" International Symposium on Turkey Production/Hrsg.: Hafez H M  
7th "Hafez" International Symposium on Turkey Production Berlin, 30.05.-01.06.2013, Berlin: Mensch & Buch Verlag, S. 238–240, ISBN 978-3-86387-400-1
- LüschoD, Kleine A, Hafez H M (2013):  
Virological and molecular biological investigations on recent fowl adenoviruses isolated from broiler chickens in Germany  
XVIIIth of the Congress of the World Veterinary Poultry Association, Nantes, France – 19.08.-23.08.2013
- Kleine A, LüschoD, Hafez H M (2014):  
Investigations on adenovirus infections of turkeys  
AAA/AVMA Annual Convention; Denver – 25.07.-29.07.2014
- LüschoD, Kleine A, Hafez H M (2015):  
Diagnostic investigations on aviadenoviruses from turkey and chicken flocks  
In: Proceedings of the XIX Congress of the World Veterinary Poultry Association  
XIX Congress of the World Veterinary Poultry Association, Cape Town, South Africa – 07.09.-11.09.2015, Cape Town, South Africa, S. 146
- LüschoD, Kleine A, Hafez H M (2015):  
Aktuelle diagnostische Untersuchungen zur Adenovirusinfektion des Geflügels  
In: 89. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten  
89. Geflügelfachgespräch, Hannover, Deutschland – 05.11.-06.11.2015, Gießen: Verlag der DVG Service GmbH, S. 41–43, ISBN 978-3-86345-284-1
- Kleine A, Hafez H M, LüschoD (2017):  
Investigations on aviadenoviruses isolated from turkey flocks in Germany.  
Avian Pathol 46: 181-187. DOI: 10.1080/03079457.2016.1237013.

- Kleine A, Hafez H M, Lüscho D (2017):

Investigations on the pathogenicity of fowl aviadenoviruses isolated from broiler chickens in Germany

XXth Congress of the World Veterinary Poultry Association (WVPA), Edinburgh – 04.09.-08.09.2017

- Lüscho D, Kleine A, Hafez H M (2018):

Langzeituntersuchungen zum Vorkommen aviärer Adenoviren bei Puten

37. Arbeits- und Fortbildungstagung der FG AVID / Virologie, Kloster Banz, Bad Staffelstein – 12.10.-14.10.2018

- Lüscho D, Kleine A, Hafez H M (2019):

Langzeituntersuchungen zum Nachweis und zur Charakterisierung von Aviadenoviren in Putenbeständen

In: 96. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten/Hrsg.: DVG- Fachgruppe "Geflügelkrankheiten" und Deutsche Gruppe der WVPA

96. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten, Hannover – 09.05.-10.05.2019, Gießen: Verlag der DVG Service GmbH, S. 35–36, ISBN 978-3-86345-475-3

## **Danksagung**

Prof. Dr. H. M. Hafez, Ihnen möchte ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas danken, aber viel mehr für Ihre große Hilfsbereitschaft und den enormen Wissenszuwachs, den ich dank Ihnen auf dem Gebiet der Geflügelkrankheiten und der mikrobiologischen Diagnostik erlangen konnte. Es ist immer wieder beeindruckend von wo und wie schnell Publikationen herbeigezaubert werden können.

Dörte, deine schier unendliche Geduld bei der Betreuung dieser Arbeit, das stets offene Ohr, die Bereitschaft bei allen Problemen eine Lösung zu finden – vielen herzlichen Dank!

Gerne möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Geflügelkrankheiten der FU Berlin bedanken. Insbesondere gilt hier mein Dank Frau Schurich, Gabi, Elke, Carola und Michaela für das Einarbeiten und die fortlaufende Unterstützung bei der Laborarbeit. Aber auch bei Birgit, Christina, Dominic und Kathrin möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit, die Kaffee-, Kuchen- und Pommepausen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdokterierenden, hier vor allem Gerzón, Susann und Darja für die stets offenen Ohren und herzhaften Lacher.

Anna und Andrea, danke fürs Rücken freihalten in den letzten Wochen!

Von Herzen danke ich auch meiner Familie für ihre Unterstützung über alle Höhen und Tiefen der vergangenen Jahre.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 04.05.2021

Anne Kleine