

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

Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV): Molekularbiologische Untersuchungen zur Diagnostik  
und zum Vorkommen sowie zur Pathogenität des Genotyps IBV QX in spezifisch  
pathogenfreien (SPF) Broilern

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

vorgelegt von  
Valter Leonardo de Quadros  
Tierarzt aus Passo Fundo (Brasilien)

Berlin 2011  
Journal-Nr: 3518

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dieter Ebner

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

poultry diseases, coronavirus, infectious bronchitis virus, molecular biology, epidemiology, experimental infection, genotypes, strain, real time PCR, RT-PCR

Tag der Promotion: 12.10.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-116-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**INHALTVERZEICHNIS**

<b>1. EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV) .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Taxonomie .....	2
2.1.2 Morphologie und Genom .....	2
2.1.3 Strukturproteine .....	3
2.1.4 Genotypen .....	4
<b>2.2 Die Infektiöse Bronchitis des Huhns (IB) .....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Geschichte .....	6
2.2.2 Vorkommen und wirtschaftliche Bedeutung .....	7
2.2.3 Epidemiologie und Pathogenese .....	8
2.2.4 Klinische Erscheinungen sowie pathologisch anatomische und histologische Veränderungen .....	9
2.2.5 Diagnose .....	11
2.2.5.1 Erregernachweis .....	11
2.2.5.1.1 Virusisolierung .....	11
2.2.5.1.2 Antigennachweis .....	12
2.2.5.1.3 Genomnachweis .....	12
2.2.5.2 Antikörpernachweis .....	17
2.2.6 Bekämpfung .....	18
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Verwendete Virus- und Bakterienstämme, Feldproben .....	20
3.1.2 Spezifisch Pathogen Freie (SPF) Hühnereier und permanente Zellen .....	21
3.1.3 SPF Tiere .....	21
3.1.4 Antiseren .....	21
3.1.5 Primer .....	21
3.1.6 Puffer und Lösungen .....	21
3.1.6.1 Allgemeine Puffer und Lösungen .....	21
3.1.6.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur .....	22
3.1.6.3 Medien und Lösungen für die Klonierung .....	22
3.1.6.4 Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese .....	24

3.1.7 Kits .....	25
3.1.8 Sonstige Reagenzien und Chemikalien .....	27
3.1.9 Verbrauchsmittel .....	28
3.1.10 Geräte und Laborhilfsmittel .....	28
3.1.11 Software .....	30
<b>3.2 Beschreibung der angewandten Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	31
3.2.1.1 Aufbereitung und Lagerung der Proben zur RNA-Extraktion .....	31
3.2.1.2 RNA-Extraktion .....	31
3.2.1.2.1 RNA-Extraktion aus Tupfer, Zellkulturmaterial, Impfstoffen und Antigenen .....	31
3.2.1.2.2 RNA-Extraktion aus Gewebeprobe(n) .....	32
3.2.1.2.3 RNA Extraktion mit Extraktion der Internen Kontrolle (IK) .....	32
3.2.1.3 Auswahl und Design von Primer- und Sonden .....	32
3.2.1.4 Durchführung von PCR-Verfahren .....	35
3.2.1.4.1 RT-PCR im One Step Verfahren .....	35
3.2.1.4.2 PCR und Nested-PCR .....	35
3.2.1.4.3 Real-time RT-PCR (RT-qPCR) .....	35
3.2.1.5 DNA Gelelektrophorese .....	38
3.2.1.6 Qualitätskontrolle der RNA Extraktion und der verschiedenen PCR-Verfahren .....	38
3.2.1.7 Gelreinigung von PCR-Produkten .....	39
3.2.1.8 Restriktionsenzymanalyse (REA) von PCR-Produkten .....	39
3.2.1.9 Klonierung von Amplifikaten .....	40
3.2.1.9.1 Ligation .....	40
3.2.1.9.2 Transformation .....	40
3.2.1.9.3 Präparation von Plasmid-DNA - Mini-Präparation .....	40
3.2.1.9.3.1 Screening Methode .....	40
3.2.1.9.3.2 Plasmid-DNA Präparation mittels QIAprep <sup>®</sup> Miniprep Kit .....	41
3.2.1.10 RNA <i>in vitro</i> Transkription .....	41
3.2.1.11 Herstellung von PCR Positivkontrollen (PK), Standards und Interner Kontrolle (IK) .....	42
3.2.2 Virologische Methoden .....	43
3.2.2.1 Subkultivierung von permanenten VERO Zellen .....	43

3.2.2.2 Virus Anzucht im embryonierten SPF Hühnerei .....	43
3.2.2.3 Virustitration .....	44
3.2.2.3.1 Virustitration in Verozellen .....	44
3.2.2.3.2 Virustitration in embryonierten Hühnereiern .....	44
3.2.2.4 Hämagglutinationstest (HA-Test) .....	44
3.2.2.5 Agar-Gel-Präzipitationstest (AGPT) .....	45
3.2.3 Serologische Methoden .....	45
3.2.3.1 Nachweis von Antikörpern im ELISA .....	45
<b>3.3 Tierversuch .....</b>	<b>46</b>
3.3.1 Versuchstiere und Haltung .....	46
3.3.2 Infektion .....	46
3.3.3 Klinische Erscheinungen .....	46
3.3.4 Pathologisch-anatomische Untersuchungen .....	46
3.3.5 Überprüfung der Virusausscheidung .....	46
3.3.6 Überprüfung der Virusausbreitung .....	47
3.3.7 Untersuchung auf Antikörper gegen IBV .....	47
<b>4. DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Untersuchungen zum molekularen Nachweis und Differenzierung des     Infektiösen Bronchitis Virus (IBV) .....</b>	<b>48</b>
4.1.1 Etablierung einer Duplex Real-time RT-PCR (RT-qPCR) zum universellen Nachweis von IBV unter Verwendung einer Internen Kontrolle (IK) .....	48
4.1.1.1 Auswahl und Optimierung von IBV spezifischen Primern und Sonden .....	48
4.1.1.2 Konstruktion und Etablierung der Internen Kontrolle (IK) .....	50
4.1.1.3 Bestimmung der Sensitivität .....	51
4.1.1.4 Überprüfung der Spezifität .....	54
4.1.1.5 Anwendung der Duplex RT-qPCR zur Untersuchung von Feldproben .....	56
4.1.2 Untersuchungen zur molekularen Differenzierung von IBV.....	57
4.1.2.1 Differenzierung mittels subtypspezifischer RT-PCR Verfahren .....	57
4.1.2.1.1 IBV 4/91 spezifische RT-PCR .....	57
4.1.2.1.2 Etablierung der IBV QX spezifischen RT-PCR .....	58
4.1.2.1.2.1 Auswahl der IBV QX spezifischen Primer .....	58
4.1.2.1.2.2 Bestimmung der Sensitivität .....	60

---

4.1.2.1.2.3 Überprüfung der Spezifität .....	60
4.1.2.2 Differenzierung mittels verschiedener konventioneller RT-PCR Verfahren in Kombination mit der Restriktionsenzymanalyse (REA) und Sequenzierung .....	62
4.1.2.2.1 Differenzierung mittels S1Oligo5/Srev RT-PCR in Kombination mit der REA .....	63
4.1.2.2.2 Differenzierung mittels S1Oligo5/S6 RT-PCR in Kombination mit der REA .....	66
4.1.2.2.3 Anwendung des etablierten Systems auf Feldproben .....	76
<b>4.2 Epidemiologische Untersuchungen zum Nachweis von IBV .....</b>	<b>79</b>
4.2.1 Charakteristik des Probenmaterials .....	79
4.2.2 Nachweis von IBV .....	81
4.2.3 Nachweis der Genotypen IBV 4/91 und QX in IBV positiven Einsendungen .....	83
<b>4.3 IBV QX Infektionsversuche .....</b>	<b>87</b>
4.3.1 Bestimmung des Virustiters .....	87
4.3.2 Versuchsdurchführung .....	87
4.3.3 Klinische Erscheinungen .....	88
4.3.4 Pathologisch anatomische Veränderungen .....	89
4.3.5 Überprüfung der Virusausscheidung .....	93
4.3.5.1 Untersuchung von Tracheal- und Kloakentupfern mittels IBV RT- qPCR .....	93
4.3.5.2 Virusreisolierung aus Kloakentupfern .....	94
4.3.6 Überprüfung der Virusausbreitung durch Untersuchung von Organproben mittels IBV RT-qPCR .....	95
4.3.7 Untersuchung auf Antikörper gegen IBV mittels ELISA .....	96
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>112</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>114</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>116</b>
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>135</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AF	Allantoisflüssigkeit
AGPT	Agargelpräzipitationstest
AIV	Aviäres Influenza A Virus
AMPV	Aviäres Metapneumovirus
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	Chorioallantoismembran
CPE	Zytopathischer Effekt
Ct-Wert	Schwellenzyklus (Threshold cycle)
°C	Grad Celsius
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescence protein
EID <sub>50</sub>	Ei-infektiöse Dosen 50
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FAdV	Fowl Adenovirus
FKS	Fetales Kälberserum
FPV	Hühnerpockenvirus (Fowlpox virus)
g	Gramm
GB	Institutsinterne Bezeichnung für Diagnostikmaterial
HA	Hämagglutinationstest
HAH	Hämagglutinationshemmtest
IB	Infektiöse Bronchitis des Hühnes
IBV	Infektiöses Bronchitis Virus
IFT	Immunfluoreszenztest
IK	Interne Kontrolle
ILTV	Infektiöse Laryngotracheitis
IPTG	Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MG	Mykoplasma gallisepticum
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

NDV	Newcastle Disease Virus
ng	Nanogram
nm	Nanometer
ORT	Ornithobakterium Rhinotrachealis
p.i.	nach der Infektion (post infectionem)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	Negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol
REA	Restriktionsenzymanalyse
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
RT-qPCR	Realtime Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
SNT	Serumneutralizationstest
SPF	Spezifisch pathogen frei
Std.	Stunde
TBE	Tris-Borat-Elektrophoresepuffer
TCID <sub>50</sub>	Zellkultur-infektiöse Dosen 50
TE	Tris-EDTA
U	Einheit (Unit)
UTR	Untranslatierte Region
x g	Fallbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
PhCoV	Fasanen-Coronavirus
TCoV	Puten-Coronavirus
IgM	Immunglobulin M
M	Molar
l	Liter
VT	Volumenteile
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit (volume/volume)
Hz	Hertz
OD	Optische Dichte
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm

## 1. EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT

Die Infektiöse Bronchitis des Huhns (IB) ist eine weltweit verbreitete, hoch kontagiöse, akut verlaufende Erkrankung des Atmungsapparates und des Urogenitaltraktes von Hühnern, verbunden mit großen wirtschaftlichen Einbußen für die weltweite Geflügelindustrie. Die Erkrankung ist bei Broilern in erster Linie durch eine respiratorische Symptomatik geprägt. Darüber hinaus können einige Stämme aber auch zu Nephritiden und Nephrosen führen. Bei Legehennen sind die respiratorischen Symptome weniger ausgeprägt. Hier stehen Legeleistungsabfälle und verminderte Eiqualität im Vordergrund. Die hohe genetische Variabilität des Infektiösen Bronchitis Virus (IBV) als infektiösem Agens ist für das Vorhandensein und Neuauftreten zahlreicher Sero- und Genotypen bzw. Stämme verantwortlich. Das Vorkommen dieser Genotypen bzw. Stämme, wie z.B. der in jüngerer Zeit neu aufgetretene Genotyp IBV QX, variiert von Land zu Land und innerhalb eines Landes von Region zu Region. Dies macht nicht nur eine effiziente Bekämpfung der IB schwierig, sondern erfordert auch eine stetige Anpassung diagnostischer Verfahren. Dabei ist neben dem allgemeinen Nachweis der Infektion eine Differenzierung der auftretenden IBV Stämme hinsichtlich erfolgreicher Bekämpfungsstrategien in heutiger Zeit unabdingbar.

Zur Diagnosestellung einer IBV Infektion stehen unterschiedliche Testverfahren zur Verfügung. Molekularbiologische Verfahren wie die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktionen (RT-PCR) in Kombination mit der Restriktionsenzymanalyse (REA) und Sequenzierung, die sowohl den Nachweis als auch eine Genotypisierung von IBV ermöglichen, haben in jüngerer Zeit stark an Bedeutung gewonnen. Eine Genotypisierung kann darüber hinaus ebenfalls mittels typspezifischer RT-PCR Verfahren erfolgen.

Vor diesem Hintergrund ergeben sich im Rahmen dieser Arbeit folgende Zielstellungen:

- Die Etablierung einer real time RT-PCR (RT-qPCR) zum universellen Nachweis von IBV unter Verwendung einer internen Kontrolle zur Anwendung in der Routinediagnostik sowie eines Systems zur weiteren molekularen IBV Differenzierung.
- Epidemiologische Untersuchungen zum Nachweis von IBV in deutschen Geflügelbeständen unter besonderer Berücksichtigung der IBV Genotypen 4/91 und QX über einen Zeitraum von sechs Jahren.
- Untersuchungen zur Pathogenität und zu den Eigenschaften des neu aufgetretenen Genotyps IBV QX in einem in vivo Infektionsversuch bei Broilern.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV)

#### 2.1.1 Taxonomie

Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV) wird innerhalb der Ordnung Nidovirales und der Familie der Coronaviridae dem Genus Coronavirus zugeordnet (Enjuanes et al., 2000). Die Familie Coronaviridae selbst umfasst nach aktuell gültiger Taxonomie neben dem Genus Coronavirus das Genus Torovirus (Walker et al., 2005) (Abbildung 1). Aufgrund serologischer und molekularer Eigenschaften werden Coronaviren in drei Gruppen eingeteilt. Während Vertreter der Gruppen 1 und 2 für Infektionen bei Säugetieren verantwortlich sind, werden die Coronaviren der Vögel in die Gruppe 3 eingeordnet (Lai et al., 2007). Diese enthält neben dem Hauptvertreter, dem Infektiösen Bronchitis Virus (IBV), das Fasanen-Coronavirus (PhCoV) und das Puten-Coronavirus (TCoV) (Cavanagh, 2003). Im Laufe der Zeit wurden neben dem TCoV und PhCoV weitere Coronaviren bei verschiedenen Vogelarten beschrieben, die sich von den bisher bekannten Coronaviren der Vögel unterscheiden. Die jüngst bei Säugetieren (Chinesische Sonnenachs, Bengalkatze und Weißwal) entdeckten Coronaviren ließen sich eher der bisher den Vögeln vorbehaltenen Gruppe 3 zuordnen (Dong et al., 2007; Mihindukulasuriya et al., 2008).

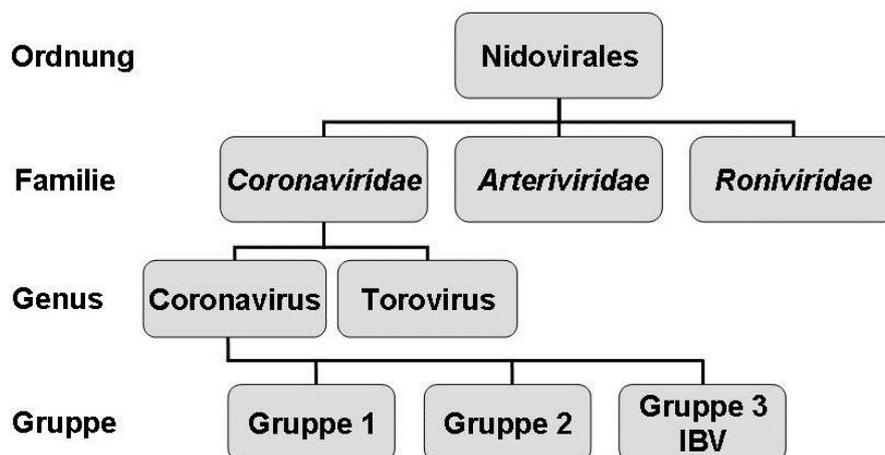
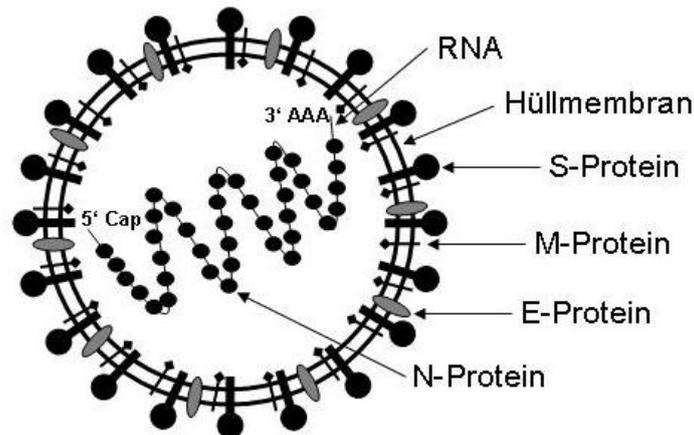


Abbildung 1: Taxonomie der Coronaviren.

#### 2.1.2 Morphologie und Genom

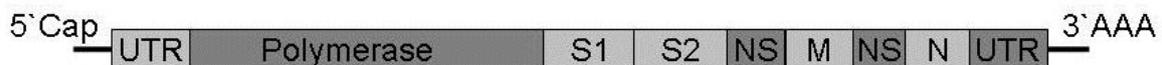
IBV ist ein behülltes Virus von pleomorpher, oft auch sphärischer Gestalt mit einem Durchmesser von ca. 120 nm (Davies und Macnaughton, 1979). Die Partikel bestehen aus einer Membranhülle, die aus der inneren Zellmembran entsteht, verbunden mit drei Strukturproteinen: das Spikeprotein (S-Protein), das Membranprotein (M-Protein) sowie das kleine Hüllprotein (E-Protein). Im Inneren der Partikel bildet das Nukleokapsidprotein (N-

Protein) mit dem RNA Genom das helikale Nukleokapsid (Abbildung 2). In ihrer Hüllmembran tragen die Virionen die für Coronaviren typischen, ca. 20 nm großen, keulenförmigen Oberflächenprojektionen. Diese so genannten Spikes sind für die namensgebende elektronenmikroskopische Struktur (Corona – Strahlenkranz) der Virionen verantwortlich (Lai et al., 2007).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau der IB Viruspartikel (basierend auf Vorlage von Modrow et al., 2003; Lai et al., 2007).**

Das einzelsträngige, plusstrangorientierte RNA Genom hat eine Größe von 27.600 Basen. Die RNA trägt an ihrem 5' Ende eine CAP-Struktur und ist am 3' Ende polyadenyliert. Sie kodiert für die vier Strukturproteine S-, M-, E- und N-Protein sowie eine Reihe verschiedener Nichtstrukturproteine (NS), welche teilweise eine Rolle bei der Virusreplikation spielen (Casais et al., 2005; Hodgson et al., 2006) (Abbildung 3). Die Funktion weiterer kleiner NS-Proteine ist bis heute unklar (Cavanagh, 2005).



**Abbildung 3: IBV Genomorganisation.**

### 2.1.3 Strukturproteine

Das glykosylierte S-Protein ist verantwortlich für die Bindung an zellulären Rezeptoren und für die Fusion mit der Wirtszelle. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 174 kDa (Casais et al., 2003) und wird posttranslational in zwei Untereinheiten, die aminoterminal S1 und die carboxyterminale S2 Untereinheit, mit einer jeweiligen Größe von ca. 520 bzw. 625 Aminosäuren gespalten (Lai und Cavanagh, 1997). Die S1-Untereinheit stellt die hauptimmunogene Komponente von IBV dar und induziert die Bildung neutralisierender Antikörper. Mittels Sequenzanalyse konnten innerhalb dieser Untereinheit

zwei hyper-variable Regionen (HVR) nachgewiesen werden (Niesters et al., 1986; Cavanagh et al., 1988). Die hohe Sequenzvariabilität innerhalb der S1-Untereinheit bedingt das Vorhandensein zahlreicher verschiedener Varianten von IBV (Cavanagh und Naqi, 2003).

Das M-Protein ist ein an der aminoterminalen Domäne glykosyliertes Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 23-34 kDa (Cavanagh, 1981; Stern et al., 1982; Cavanagh, 1983). Neben den aminoterminalen Bereichen, die sich auf der Oberfläche des Virions befinden, besitzt es drei Transmembranregionen. Die carboxyterminale Domäne ist im Inneren des Virions lokalisiert und interagiert mit dem N-Protein des Nukleokapsids (Masters, 2006). Während des Infektionszykluses bleibt das M-Protein in der Membran des endoplasmatischen Reticulums, wo es in Kombination mit dem E-Protein bei der Partikelbindung eine wichtige Rolle spielt (Modrow et al., 2003; Lai et al., 2007). Inwieweit das M-Protein hinsichtlich Immunogenität und Pathogenität wichtig ist, ist bisher noch unbekannt (Xing et al., 2009).

Das E-Protein, welches nur in geringen Mengen vorhanden ist, ist ein sehr kleines, membranassoziertes, nicht glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 9-12 kDa (Cavanagh, 2005; Cavanagh, 2007; Lai et al., 2007). Es spielt ebenfalls eine Rolle bei der Partikelbildung (Cavanagh, 2005; Lai et al., 2007).

Das N-Protein ist ein phosphoryliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 50-54 kDa (Lomniczi und Morser, 1981; Mockett, 1985; Cavanagh, 2007). Es ist im Inneren des Virions lokalisiert (Cavanagh, 2005; Lai et al., 2007), wo es mit dem RNA-Genom den Ribonukleoproteinkomplex bildet. Darüber hinaus interagiert das N-Protein mit der carboxyterminalen Domäne des M-Proteins.

#### **2.1.4 Genotypen**

Die hohe genetische Variabilität innerhalb des S1 Gens von IBV bedingt das Vorhandensein zahlreicher IBV Varianten mit unterschiedlichen antigenen Eigenschaften und einem unterschiedlichen Organtropismus (Cook, 1984; Cook und Huggins, 1986; Cavanagh et al., 1997; Cavanagh und Naqi, 2003). So können nur wenige Austausch in der Aminosäuresequenz der S1 Untereinheit des S-Proteins infolge Rekombination nach Mischinfektion oder spontaner Mutation zum Entstehen neuer Varianten mit ausbleibender Neutralisation bzw. mit neuer Pathogenität führen (Cavanagh et al., 1992; Cavanagh, 1995; Cavanagh und Naqi, 2003). Traditionell wurden diese Varianten auf Basis serologischer Verfahren, wie dem Neutralisationstest in Serotypen unterteilt. In jüngerer Zeit erfolgte jedoch basierend auf molekularen Analysen eine Einteilung in Genotypen, die nicht zwangsläufig mit den nachgewiesenen Serotypen übereinstimmen (Clewley et al., 1981; Kusters et al., 1987; Capua et al., 1998; Hein et al., 1998; Minta et al., 1998). Zur

---

Vereinfachung der Nomenklatur wird dennoch im Rahmen dieser Arbeit einheitlich der Begriff Genotyp auch für die verschiedenen Serotypen genutzt.

Während einige IBV Genotypen eine weltweite Verbreitung zeigen, bleiben andere auf bestimmte Länder oder Regionen begrenzt (Woernle und Hafez, 1992). Zu den ersten zählen Vertreter des nach dem Ort der Erstisolierung im Jahr 1942 benannten Massachusetts Typs (Van Roeckel et al., 1942) (Tabelle 1), die weltweit nachgewiesen werden. Zu seinen in Europa vorkommenden Vertretern gehören die Impfstämme H52/H120 (Bijlenga, 1956; 1960; Hoekstra und Rispens, 1960).

Zu den derzeit in Europa vorkommenden bedeutsamen Genotypen zählen die in Holland im Zusammenhang mit Atemwegsproblemen isolierten Genotypen D1466 und D274 (Cook, 1984; Davelaar et al., 1984). Meulemans et al. (1987) beschrieben in Belgien das Vorkommen von B1648, der, auch als D8880 bekannt und mit einer Nephritis-Nephrose assoziiert war. Ein dem Genotyp D1466 sehr ähnlicher und wahrscheinlich infolge einer Rekombination mit diesem hervorgegangener Stamm stellt V1397 dar (Kusters et al., 1987; Kusters et al., 1989). In den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts hat darüber hinaus der erstmalig in England in Verbindung mit einer Myopathie isolierte Genotyp 793B bzw. 4/91 an Bedeutung gewonnen (Gough et al., 1992; Parsons et al., 1992; Cook et al., 1996). Verschiedene Studien belegen seine weite Verbreitung in Europa (Worthington et al., 2008; Monne et al., 2009). Im Jahr 2002 wurde in Italien bei Broilern Masthähnchen mit Atemwegsproblemen der IBV Genotyp Italy 02 isoliert (Worthington et al., 2004; Jones et al., 2005a; Jones et al., 2005b).

Eine wichtige neue Variante stellt der Genotyp IBV QX dar. Erste ursprüngliche Berichte über IBV QX stammen aus China, wo er seit dem Jahr 1998 als Ursache einer Drüsenmagenentzündung bei Hühnern beschrieben wurde (Wang et al., 1998). Bereits im Jahr 2001 wurde IBV QX nahe der chinesischen Grenze in Russland und ein Jahr später im europäischen Teil Russlands detektiert (Bochkov et al., 2006). In Europa wurde über einen sehr eng verwandten Stamm (ursprünglich als IBV QX like bezeichnet) erstmalig im Jahr 2004 in Holland im Zusammenhang mit einem Legeleistungsabfall bei Legehennen berichtet (Landman et al., 2005). Wenig später erfolgte auch der Nachweis von IBV QX in Italien (Beato et al., 2005; Zanella et al., 2006), in Polen (Domanska-Blicharz et al., 2006a;) sowie in Belgien, Frankreich und Deutschland (Worthington und Jones, 2006) und in den nachfolgenden Jahren in weiteren europäischen Ländern (Gough et al., 2008; Benyeda et al., 2009; Dolz et al., 2009; Handberg et al., 2009; Krapez et al., 2009).

Bei der in Europa auftretenden Variante stehen nach Infektion respiratorische Symptome und Nierenschädigungen, einhergehend mit einer erhöhten Mortalität, im Vordergrund. Eine sehr frühe Infektion im Kükenalter kann darüber hinaus infolge der Schädigung des Eileiters bei den späteren Legetieren zu dem „Falsche Leger Syndrom“ führen (Landman et al., 2005). In Deutschland ist IBV QX mittlerweile zu einem der

dominierenden IBV Genotypen, einhergehend mit Nierenschädigungen bei Broilern und „Falschen Legern“ bei Legetieren, geworden (Worthington et al., 2008). Die Affinität von IBV QX zum Urogenitaltrakt konnte auch in tierexperimentellen Untersuchungen bestätigt werden (Terregino et al., 2008; Benyeda et al., 2009; Benyeda et al., 2010).

Ein Überblick über das Vorkommen der verschiedenen IBV Genotypen in verschiedenen europäischen Ländern wurde kürzlich in zwei Studien erstellt (Worthington et al., 2008; Monne et al., 2009). Beide Arbeiten belegen übereinstimmend das Vorkommen der Genotypen IBV 793B (4/91), Massachusetts, D274, B1648/D8880, D1466, V1397, Italy-02, Arkansas und QX in Europa, allerdings mit unterschiedlichen Nachweisraten. Die zwei am häufigsten nachgewiesenen Genotypen waren dabei IBV 793B (4/91) und die IBV Stämme vom Massachusetts Genotyp (M41, H52, H120). Ein Grund dafür ist die verbreitete Nutzung dieser Stämme als Impfstämme.

**Tabelle 1: Bedeutsame in Europa vorkommende IBV Genotypen**

Bezeichnung	Vorkommen	Erkrankungsform	Referenz
Massachusetts: M41	1941	Respiratorische Form	Van Roekel et al., 1942
Massachusetts: H52/H120	1956	Impfstamm	Bijlenga, 1956, 1960; Hoekstra und Rispens, 1960
D1466	1979	Respiratorische Form	Davelaar et al., 1984
D274	1979	Respiratorische Form	Cook, 1984 ; Davelaar et al., 1984
B1648/D8880	1984	Nephritis-Nephrose Form	Meulemans et al. 1987
V1397	1984	Respiratorische Form	Kusters et al., 1987
793B/4/91/CR88	1991	Myopathie der Pektoralismuskulatur	Gough et al., 1992
Italy 02	2002	Respiratorische Form	Worthington et al., 2004; Jones et al., 2005a, b
QX	2004	Respiratorische, Reproduktive und Nephritis-Nephrose Form	Landman et al., 2005; Worthington und Jones, 2006

## 2.2 Die Infektiöse Bronchitis des Huhns (IB)

### 2.2.1 Geschichte

Die erste Beschreibung der Infektiösen Bronchitis (IB) stammt aus dem Jahr 1931. In Nord-Dakota wurde bei wenige Tage alten Küken eine Erkrankung der Atemwege,

---

einhergehend mit Atemnot, Apathie und bis zu 90%iger Mortalität beobachtet (Schalk und Hawn, 1931). Wenig später berichteten Bushnell und Brandy (1933) über die Filtrierbarkeit des Erregers, der eine Erkrankung mit ähnlichen Erscheinungen wie die Infektiöse Laryngotracheitis hervorrief. 1936 bestätigten Beach und Schalm (1936) die Virusätiologie und belegten, dass es sich bei dem Agens der IB und der Infektiösen Laryngotracheitis um zwei unterschiedliche Erreger handelte. Ein Jahr später gelang es, das Virus erstmalig in embryonierten Hühnereiern anzuzüchten (Beaudette und Hudson, 1937).

Ende der 30iger Jahre gewann die IB an wirtschaftlicher Bedeutung, da nun auch Ausbrüche in Legehennenbeständen auftraten. So beschrieben Delaplane und Stuart (1939) erstmalig das Auftreten von IBV bei erwachsenen Hühnern, verbunden nicht nur mit respiratorischen Symptomen, sondern auch mit einem Legeleistungsabfall.

Weitere wichtige Schritte bei der Erforschung der Erkrankung waren Untersuchungen zur Immunisierung (Van Roeckel et al., 1942) und die Feststellung immunologischer Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen, die eine Kreuzprotektivität verhinderten (Jungherr et al., 1956). Beginnend im Jahr 1948 wurde über das Vorkommen der IB auch in zahlreichen anderen Ländern Europas sowie Kanada und Japan berichtet. In den 50iger Jahren wurde in Deutschland eine neuartige Erkrankung der Atemwege bei Hühnern diagnostiziert, bei der es sich wahrscheinlich um die IB gehandelt hat (Sassenhoff, 1950). Über die Nephritis-Nephrose Form der IB wurde bereits zu Beginn der 60iger Jahre in den USA von Winterfield und Hitchner (1962) und in Australien von Cumming (1963) berichtet.

### **2.2.2 Vorkommen und wirtschaftliche Bedeutung**

Über Ausbrüche der IB wird heute weltweit auf allen Kontinenten berichtet. Besonders betroffen sind Länder mit intensiver Geflügelproduktion (Cavanagh und Naqi, 2003; Callison et al., 2005a; Jones et al., 2009). Trotz intensiver Impfmaßnahmen macht die hohe Kontagiosität des Erregers und das Auftreten und Entstehen zahlreicher Sero- und Genotypen eine umfassende Bekämpfung schwierig. So können Ausbrüche auch häufig in geimpften Herden auftreten (Cavanagh und Naqi, 2003).

Die wirtschaftlichen Verluste beim Broiler resultieren zum einen aus einer verringerten Futteraufnahme und den damit verbundenen verringerten Gewichtszunahmen sowie zum anderen aus der erhöhten Mortalität. Weitere Verluste entstehen aufgrund hoher Behandlungskosten infolge bakterieller Sekundärinfektionen und hoher Verwurfraten bei der Schlachtung (Cavanagh und Naqi, 2003; Pena et al., 2005).

Obwohl bei Legehennen und Elterntieren kaum Mortalität zu beobachten ist, treten ebenfalls hohe wirtschaftliche Verluste durch einen bis zu 55%igen starken Legeleistungsabfall und eine verminderte Eiquantität auf (Bisgaard, 1976; Landman et al., 2005). Eine wiedereintretende Steigerung der Legeleistung ist dabei in den meisten Fällen

nicht zu verzeichnen (Crinion, 1972; Bisgaard, 1976; Woernle und Hafez, 1992; Cavanagh, 2003; Cavanagh, 2007).

### **2.2.3 Epidemiologie und Pathogenese**

Die Übertragung von IBV in einem Bestand erfolgt horizontal sowohl durch direkten Kontakt von Tier zu Tier als auch über kontaminierte Gegenstände, Trinkwasser und den Menschen (Hofstad und Yoder, 1966; Hofstad, 1967; Cavanagh und Naqi, 2003; Cavanagh, 2007). Zwischen verschiedenen Beständen kann die Übertragung durch virushaltige Luft und Kotstaub erfolgen (Hofstad, 1967; Cumming, 1970; Cavanagh, 2007).

Das Vorkommen von verschiedenen, IBV verwandten Coronaviren bei verschiedenen Vogelarten, darunter Zugvögel, unterstützt die Hypothese, dass das Virus sich über weite Entfernungen ausbreiten kann und somit auch die Entstehung neuer Virusvarianten fördert (Cavanagh, 2005; Bochkov et al., 2006; Hughes et al., 2009).

Die Möglichkeit der Persistenz des Erregers in einigen Organen wie Nieren (Chong und Apostolov, 1982) und Zäkaltonsillen (Cook, 1968; Alexander und Gough, 1978) kann darüber hinaus zu einer monatelangen intermittierenden (Woernle, 1961; Hofstad, 1967; Jones und Ambali, 1987) oder kontinuierlichen Virusausscheidung führen (Alexander und Gough, 1977) und somit eine stetige Infektionsquelle darstellen (Woernle, 1968).

Nach Infektion einzelner Tiere führt die hohe Kontagiosität des Erregers zu einer schnellen Ausbreitung im gesamten Bestand. Die Inkubationszeit ist sehr kurz und beträgt in Abhängigkeit von dem Stamm zwischen 18 und 36 Stunden. Hühner aller Altersgruppen sind empfänglich, wobei die Erkrankung im Kükenalter stärker ausgeprägt ist (Woernle und Hafez, 1992; Cavanagh und Naqi, 2003).

Unabhängig von dem Tropismus des Virusstamms erfolgt die Aufnahme von IBV über die Atemwege, wo es zu einer Besiedlung der Schleimhäute des oberen Respirationstraktes und einer ersten Virusvermehrung kommt (Dhinakar Raj und Jones, 1997). Diese Virusvermehrung führt zu einer Schädigung der Epithelien von Nase und Trachea mit nachfolgender Virusausscheidung über virushaltige Aerosole beim Niesen (Dhinakar Raj und Jones, 1997; Cavanagh und Naqi, 2003). Nach der ersten Virusvermehrung folgt eine Ausbreitung des Virus in Lunge (Janse et al., 1994) und Luftsäcke (Nauwynck und Pensaert, 1988; Otsuki et al., 1990) sowie eine Besiedlung der Epithelien der Gonaden (Boltz et al., 2004; Boltz et al., 2006; Villarreal et al., 2007a) und Nieren (Cumming, 1963, 1969; Ignjatovic et al., 2002), wo der Erreger ebenfalls Schädigungen hervorrufen kann. Des Weiteren vermehrt sich IBV in verschiedenen Zellen des Magen-Darm-Trakts, jedoch häufig ohne klinische Relevanz (Ambali und Jones, 1990; Lucio und Fabricant, 1990). Darüber hinaus konnte der Erreger in weiteren Organen wie Hardersche Drüse, Thymus, Leber, Milz, Bursa Fabrici und auch im Blut nachgewiesen werden (Hofstad und Yoder, 1966; Ambali und Jones, 1990; Toro und Fernandez, 1994; Toro et al., 1996; Van Ginkel et al., 2008).

## **2.2.4 Klinische Erscheinungen sowie pathologisch anatomische und histologische Veränderungen**

Je nach Alter der Tiere und Tropismus des vorliegenden Virusstamms führt eine Infektion mit IBV zu unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildern. Während die Morbidität in fast allen Fällen 100 % beträgt, ist die Mortalitätsrate in Abhängigkeit vom Alter der Tiere, Impfstatus, Virusstamm und dessen Pathogenität schwankend (Woernle und Hafez, 1992; Ignjatovic et al., 2002; Ziegler et al., 2002; Liu und Kong, 2004; Abdel-Moneim et al., 2006). Sie kann bis zu 25 % erreichen, bei einigen nephropathogenen Stämmen und bei gleichzeitigem Vorliegen bakterieller Sekundärinfektionen wie z. B. mit Mykoplasmen und *E. coli* kann sie jedoch auch bis auf 80 % ansteigen (Cook et al., 1986; Cook et al., 1991; Avellaneda et al., 1994; Tottori et al., 1997).

Die charakteristischen respiratorischen Symptome treten insbesondere bei Jungtieren unter sechs Wochen auf. Neben einem gestäubten Gefieder und Mattigkeit zeigen infizierte Tiere Niesen, Nasenausfluss, Husten, Schnabelatmung und rasselnde Atemgeräusche (Cumming, 1969; Ambali und Jones, 1990; Dhinakar Raj und Jones, 1997; Ignjatovic et al., 2002; Cavanagh und Naqi, 2003; Grgic et al., 2008). Des Weiteren können eine Konjunktivitis und Sinusitis auftreten (Terregino et al., 2008). Die Dauer der Erkrankung beträgt ca. ein bis zwei Wochen. Während dieser Zeit sind verminderte Futteraufnahme und Entwicklungsstörungen zu beobachten. Bei Jung- und Legehennen kommt es zu einer deutlich geringeren Ausprägung der respiratorischen Symptomatik (Dhinakar Raj und Jones, 1997; Cavanagh und Naqi, 2003).

Pathologisch anatomisch steht eine katarrhalische Entzündung der Trachea, welche aufgrund der starken Schleimansammlung zum Tod durch Ersticken führen kann, im Vordergrund. Daneben können pneumonische Herde in der Lunge sowie eine Trübung und Verdickung der Luftsäcke beobachtet werden (Dhinakar Raj und Jones, 1997; Cavanagh und Naqi, 2003). Käsig fibrinöse Ansammlungen sprechen für Sekundärinfektionen, insbesondere mit *E. coli*. Histologisch zeigen sich in der Trachea ein Ödem der Submukosa, Zilienverlust und lymphoplasmazytäre Infiltrate in der Lamina propria mit Epitheldesquamation (Chen et al., 1996; Benyeda et al., 2010).

Eine sehr frühe Infektion bei Jungtieren unter zwei Lebenswochen kann darüber hinaus zu einer dauerhaften Schädigung des Eileiters führen, so dass die spätere Legefähigkeit der erwachsenen Tiere komplett verloren geht oder nur Eier von geringer Qualität gelegt werden (Crinion et al., 1971a; b). Derart gesund erscheinende, aber nicht legende Hennen werden als „Falsche Leger“ bezeichnet (Broadfoot et al., 1956; Jones und Jordan, 1970).

Als makroskopisch sichtbare Veränderungen können eine Involution oder Verkürzung des Eileiters, fokale Hypoplasien im Bereich des Isthmus und Magnum sowie Vorhandensein von Dotterflüssigkeit in der Leibeshöhle beobachtet werden. Darüber hinaus können sich mit

einer klaren Flüssigkeit gefüllte Zysten des rechten Eileiters bilden (Crinion et al., 1971a; b; Crinion und Hofstad, 1972a; b; Landman et al., 2005; Benyeda et al., 2009; Benyeda et al., 2010).

Als histopathologische Veränderungen der Eileiter sind Abflachung der Epithelzellen und Zilienverlust, zelluläre Infiltration mit heterophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen sowie Ödembildung und Fibroplasie in der Lamina propria (Crinion et al., 1971a; b; Crinion und Hofstad, 1972a; b; Landman et al., 2005; Chousalkar und Roberts, 2007; Benyeda et al., 2010) zu finden.

Die Infektion bei Legehennen geht in der Regel nicht mit respiratorischen Symptomen einher, sondern ist durch einen starken Legeleistungsabfall, der bis zu 55 % betragen kann, geprägt (Bisgaard, 1976). Dieser Rückgang in der Legeleistung kann von Herde zu Herde schwanken und ist vom Virusstamm, Produktionsphase und Immunstatus abhängig (Crinion und Hofstad, 1972a; Van Eck, 1983; Chew et al., 1997). Neben der Legeleistung sind auch die Schlupfrate und die Eiqualität beeinträchtigt. Erkrankte Herden legen dünnschalige, missgebildete Eier mit Farbveränderungen und wässrigem Eiklar (Crinion, 1972; Cook und Huggins, 1986; Cavanagh und Naqi, 2003).

Darüber hinaus konnten Villarreal et al. (2007a) bei Hähnen eine IBV Infektion einhergehend mit einer Verringerung der Fruchtbarkeit aufgrund einer Steinbildung in den Nebenhoden, einer Atrophie der Samenleiter und der damit verbundenen niedrigen Konzentration von lebensfähigen Spermien feststellen.

Eine weitere Manifestation der IB ist die Nephritis-Nephrose-Form, welche durch nephropathogene IBV Stämme hervorgerufen wird. Von dieser Form sind insbesondere Broiler betroffen (Pryor und Woo, 1964). Die Infektion führt zunächst zu einer Störung des Allgemeinbefindens und einer unterschiedlich stark ausgeprägten respiratorischen Symptomatik. Im Anschluss wird bei den Tieren wässriger Kot, eine erhöhte Wasseraufnahme und verminderte Futteraufnahme beobachtet (Cumming, 1969). Todesfälle mit Mortalitätsraten zwischen 15 % und 60 % resultieren aus der Retention von Harnsäure und der erhöhten Ausscheidung von Elektrolyten, was schließlich zu einem akuten Nierenversagen führt (Condron und Marshall, 1986).

Makroskopisch finden sich Uratablagerungen in den Harnleitern und in den blassen und geschwollenen Nieren (Cumming, 1963). In einigen Fällen kann auch eine Eingeweidegicht beobachtet werden. Histologische Veränderungen zeigen sich in Form einer interstitiellen Nephritis mit granulärer Degeneration, Vakuolisierung und Desquamation des tubulären Epithels und einer Infiltration des Interstitiums mit heterophilen Granulozyten (Chen et al., 1996).

Eine weitere klinische Verlaufsform der IB wurde in den 90iger Jahren in Großbritannien bei Mastelertieren, hervorgerufen durch den Stamm 793B (auch als 4/91 und CR88 bezeichnet), beobachtet (Gough et al., 1992). Erkrankte Tiere zeigten eine

Myopathie der Pektoralismuskulatur, erhöhte Mortalität und einen Legeleistungsabfall (Cook et al., 1996; Gough et al., 1996). Die tiefe Pektoralismuskulatur war blass und geschwollen, während sich oberflächlich Ödeme und Hämorrhagien entwickelten (Gough et al., 1992).

### **2.2.5 Diagnose**

Die Diagnosestellung der IB beruht auf Angaben zum Vorbericht, den klinischen Erscheinungen, den pathologisch-anatomischen Veränderungen sowie der Labordiagnose. Klinische Erscheinungen und pathologisch anatomische Veränderungen sind allerdings nur hinweisend und schwer von weiteren Erkrankungen des Respirations- und Urogenitaltraktes zu unterscheiden. Daher muss eine ätiologisch gesicherte Diagnose durch den Erreger- bzw. Antikörpernachweis erfolgen. Als Probenmaterial dienen in der akuten Phase der Erkrankung insbesondere Trachealtupfer und Tracheen, in späteren Phasen der Erkrankung sind Kloakentupfer sowie Nieren und Zäkaltonsillen das bevorzugte Probenmaterial (Gelb, 1989; Cavanagh und Naqi, 2003).

#### **2.2.5.1 Erregernachweis**

##### **2.2.5.1.1 Virusisolierung**

Die Isolierung von IBV erfolgt durch Inokulation des Probenmaterials in embryonierte Hühnereier oder Gewebekulturen, vorzugsweise von spezifiziert pathogen freien (SPF) Hühnern (Gelb, 1989; De Wit, 2000). Die Verwendung von Zellkulturen wie z. B. Kükennierenzellen ist für die Erstisolierung nicht geeignet, da der Feldstamm zuerst im Hühnerei passagiert und adaptiert werden muss, bevor eine Vermehrung in der Zellkultur möglich ist (Gelb, 1989; De Wit, 2000).

Zur Isolierung in embryonierten Hühnereiern werden SPF Eier zwischen dem 9. und 11. Bebrütungstag in die Allantoishöhle inokuliert. Die Infektion führt zu einer Virusvermehrung, die ca. 36 bis 72 Stunden nach Inokulation ihren Höhepunkt erreicht (Darbyshire, 1975; Cavanagh und Naqi, 2003). Als IBV typische, makroskopisch sichtbare Veränderungen zeigen sich fünf bis sieben Tage post inokulationem Verzweigungen, Verkrümmungen, Hämorrhagien in der Haut und Uratablagerungen auf der Niere sowie das Absterben des Embryos (Loomis et al., 1950; Gelb, 1989; Abdel-Moneim et al., 2009). Bei Feldstämmen sind in der Regel jedoch mehrere Passagen notwendig, bevor diese Veränderungen sichtbar werden. Ähnliche Veränderungen können ebenfalls nach Infektion mit dem Hühneradenovirus, dem Newcastle Disease Virus und dem Aviären Enzephalomyelitis Virus beobachtet werden (Gelb et al., 1987; Gelb, 1989), so dass nach erfolgter Anzucht eine Identifizierung mittels Antigen- bzw. Genomnachweis erfolgen muss.

Eine weitere Möglichkeit zur IBV Isolierung stellt die Inokulation von Gewebekulturen in Form von Trachealringkulturen von 20 Tage alten SPF Hühnerembryonen (Cherry und

Taylor-Robinson, 1970; Cook, 1984; Winter et al., 2008) oder wenige Wochen alten SPF Hühnerküken (Cook et al., 1976; Abd El Rahman et al., 2009) dar. Diese Methode ist ebenfalls für die Isolierung von Feldstämmen geeignet, da eine Voradaptierung in embryonierten Hühnereiern nicht notwendig ist (Darbyshire et al., 1979; Cook, 1984). Die Vermehrung von IBV in den Trachealringen führt innerhalb von 24 – 96 Stunden zu einer Ziliostase (Colwell und Lukert, 1969; Cavanagh und Naqi, 2003; Abd El Rahman et al., 2009), die jedoch auch durch weitere virale Erreger induziert werden kann (Gelb, 1989; De Wit, 2000). Daher ist auch bei der Verwendung von Trachealringkulturen eine anschließende Virusidentifizierung mittels Antigen- bzw. Genomnachweis unabdingbar (De Wit, 2000).

#### **2.2.5.1.2 Antigennachweis**

Als serologische Methoden zum Antigennachweis kommen insbesondere der Agargelpräzipitationstest (AGPT), der Immunfluoreszenztest (IFT), der Immunperoxidasetest (IPT) sowie der Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) infrage.

Der AGPT ist ein gruppenspezifischer Test zum Nachweis von IBV Antigen. Er ist ein kostengünstiges, schnelles und wenig aufwendiges Verfahren, besitzt allerdings im Vergleich zur Virusisolierung nur eine 50%ige Sensitivität bei direkter Untersuchung von Tracheamaterial aus Felddausbrüchen. Eine gute Einsatzmöglichkeit findet der AGPT bei der Identifizierung von IBV nach erfolgreicher Virusisolierung (Woernle, 1966; Alexander und Gough, 1977).

IFT und IPT stellen weitere serologische Verfahren zum direkten Nachweis von IBV Antigen in Abklatsch- bzw. Organpräparaten dar. Aufgrund unspezifischer Reaktionen sind die Ergebnisse jedoch nicht immer leicht interpretierbar. Die Verwendung monoklonaler Antikörper im IFT führt zu einer Erhöhung der Spezifität. Der Einsatz typspezifischer monoklonaler Antikörper ermöglicht auch einen typspezifischen Nachweis (Yagyu und Ohta, 1990; De Wit et al., 1995).

Darüber hinaus sind verschiedene ELISA Verfahren zum Nachweis von IBV Antigen beschrieben, die aber aufgrund von Sensitivitätsproblemen eher zur Identifizierung von IBV in der Allantoisflüssigkeit nach Inokulation in embryonierten Hühnereiern geeignet sind (Nagano et al., 1990; Naqi et al., 1993).

#### **2.2.5.1.3 Genomnachweis**

Zum molekularen Nachweis des Virusgenoms wurden verschiedene Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktionen (RT-PCRs) etabliert. Die Anwendung dieser Methodik erlaubt einen schnellen, sensitiven und spezifischen Nachweis des Erregers, wobei eine Unterscheidung zwischen infektiösen und nicht infektiösen Viruspartikeln allerdings nicht möglich ist (De Wit, 2000). Darüber hinaus ist die RT-PCR geeignet, Virusgenom im

---

unterschiedlichsten Probenmaterial wie Gewebeproben, Tupferproben und Allantoisflüssigkeit nachzuweisen (Jackwood et al., 1992; Kwon et al., 1993; Handberg et al., 1999).

Ein Überblick über die Charakteristik der verschiedenen beschriebenen PCR Verfahren ist in Tabelle 2 dargestellt. Um einen gruppenspezifischen bzw. universellen Nachweis zur ermöglichen, müssen die gewählten Primer in konservierten Regionen des Virusgenoms liegen. Dafür sind insbesondere die konservierten Bereiche des M- und N-Protein Gens geeignet. In der Literatur finden sich verschiedene PCR Verfahren, die Bereiche innerhalb dieser zwei Gene amplifizieren (Tabelle 2). Darüber hinaus sind auch verschiedene nested RT-PCRs zum IBV Nachweis beschrieben worden, die aber aufgrund ihrer hohen Sensitivität und des damit verbundenen Kontaminationsrisikos selten in der Routinediagnostik angewandt werden.

Eine neue Entwicklung in der IBV Diagnostik stellt die Anwendung der RT-PCR im real time Format dar (RT-qPCR). Jackwood et al. (2003) berichten über eine RT-qPCR unter Verwendung der Förster-Resonanzenergietransfer Technologie (FRET), die neben der Detektion auch eine Differenzierung auf dem Beaudette Stamm basierender Vakzinen mittels Schmelzkurvenanalyse erlaubt. Darüber hinaus wurden RT-qPCR Verfahren unter Verwendung von Taqman Sonden und der locked nucleic acid (LNA) Sonden Technologie entwickelt. Hewson et al. (2009) beschreiben die Entwicklung einer RT-qPCR in Kombination mit der hochauflösenden Schmelzkurven-Analyse (HRM), die der schnellen Identifizierung neuer und Vakzine basierter IBV Stämme dient.

Zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung von IBV Stämmen empfiehlt sich dagegen aufgrund der hohen genetischen Variabilität eine Lokalisation der Primer innerhalb der S1 Untereinheit. Die darauf beruhenden PCR Verfahren können entweder als typspezifische PCR unter Verwendung typspezifischer Primer angewandt oder in Kombination mit der Restriktionsenzymanalyse (REA) und Sequenzanalyse für die Differenzierung genutzt werden. Darüber hinaus wurden in verschiedenen Studien auch Verfahren, basierend auf weiteren IBV Genen, wie z. B. dem M- und N Protein Gen und auch in Kombination mit S1 Protein Gen oder auf mehreren Genen beruhend, beschrieben (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Übersicht über in der Literatur beschriebenen molekularbiologische Verfahren zum Nachweis, Charakterisierung und Differenzierung von IBV Stämmen**

<b>Methode des Nachweises/ der Differenzierung</b>	<b>Zielgen</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Referenz</b>
RT-PCR	M + N	Universeller IBV Nachweis	Andreasen et al., 1991
RT-PCR	M + N	Universeller IBV Nachweis	Jackwood et al., 1992
RT-PCR + Sequenzierung	N	IBV Nachweis und Differenzierung	Zwaagstra et al., 1992
RT-PCR + Sequenzierung	N + S1	IBV Nachweis und molekulare Charakterisierung	Farsang et al., 2002
Typspezifische RT-PCR (Massachusetts, 793B, D274, D1466)	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Handberg et al., 1999
RT-PCR + Typspezifische nested PCR (Massachusetts, 793B, D274, B1648)	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Cavanagh et al., 1999
RT-PCR + Typspezifische nested PCR (Massachusetts, 793B, D274, B1648)	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Capua et al., 1999
RT-PCR + Typspezifische nested PCR (Massachusetts, 793B, D274, B1648)	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Meulemans et al., 2001
RT-PCR + Typspezifische nested PCR (Massachusetts, 793B, D274)	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Zanella et al., 2003
RT-qPCR (FRET, Schmelzkurvenanalyse)	S1	IBV Nachweis und Differenzierung	Jackwood et al., 2003
RT-qPCR (SYBR Green, Schmelzkurveanalyse)	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Callison et al., 2005b
RT-qPCR (Taqman)	5'UTR	Universeller IBV Nachweis	Callison et al., 2006
RT-qPCR (LNA)	3'UTR	Universeller IBV Nachweis	Chousalkar et al., 2009

Methode des Nachweises/ der Differenzierung	Zielgen	Verwendungszweck	Referenz
RT-qPCR/HRM (SYBR Green, Schmelzkurveanalyse)	3'UTR	IBV Nachweis und Differenzierung	Hewson et al., 2009
RT-qPCR (Taqman)	N	Universeller IBV Nachweis	Meir et al., 2010
RT-PCR + REA	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Lin et al., 1991
RT-PCR + REA	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Kwon et al., 1993
RT-PCR + REA	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Song et al., 1998a
RT-PCR + REA	S1	Differenzierung von IBV Stämmen	Jackwood et al., 2005
RT-PCR + REA	S - N	Differenzierung von IBV Stämmen	Mardani et al., 2006
RT-PCR + REA	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Montassier et al., 2008
RT-PCR + REA + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Meir et al., 2004
RT-PCR + REA + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Gelb et al., 2005
RT-PCR + REA + Sequenzierung	N	Molekulare Charakterisierung von IBV	Abreu et al., 2006
RT-PCR + REA + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Jang et al., 2007
RT-PCR + REA + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Jackwood et al., 2007
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Gelb et al., 2001
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Yu et al., 2001a
RT-PCR + Sequenzierung	S1 + N	Molekulare Charakterisierung von IBV	Yu et al., 2001b
RT-PCR + Sequenzierung	S1 + N	Molekulare Charakterisierung von IBV	Huang et al., 2004
RT-PCR + Sequenzierung	S1 + N	Molekulare Charakterisierung von IBV	Shieh et al., 2004
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Zhou et al., 2004
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Alvarado et al., 2005

<b>Methode des Nachweises/ der Differenzierung</b>	<b>Zielgen</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Referenz</b>
RT-PCR + Sequenzierung	S1 + N	Molekulare Charakterisierung von IBV	Bochkov et al., 2007
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Dolz et al., 2006
RT-PCR + Sequenzierung	S1 + N + 3'UTR	Molekulare Charakterisierung von IBV	Ignjatovic et al., 2006
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Liu et al., 2006
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Bing et al., 2007
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Villarreal et al., 2007b
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Xu et al., 2007
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Dolz et al., 2008
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Lee et al., 2008
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Liu et al., 2008
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	McFarlane und Verma, 2008
RT-PCR + Sequenzierung	M	Molekulare Charakterisierung von IBV	Ren et al., 2009
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Ducatez et al., 2009
RT-PCR + Sequenzierung	S1 + S2 + M + N + E	Molekulare Charakterisierung von IBV	Liu et al., 2009
RT-PCR + Sequenzierung	S2	Molekulare Charakterisierung von IBV	Mase et al., 2009
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Rimondi et al., 2009
RT-PCR + Sequenzierung	S1 + S2 + M + N	Molekulare Charakterisierung von IBV	Zulperi et al., 2009
RT-PCR + Sequenzierung	S1	Molekulare Charakterisierung von IBV	Villarreal et al., 2010

### 2.2.5.2 Antikörpernachweis

Zum Antikörpernachweis stehen generell verschiedene Verfahren zur Verfügung. Zu den gebräuchlichsten Tests zählen sowohl der AGPT und der ELISA, die beide gruppenspezifische Testverfahren darstellen, als auch der Serumneutralisationstest (SNT) und der Hämagglutinationshemmtest (HAH), die dem Nachweis serotypspezifischer Antikörper dienen. Um eine IBV Infektion mittels Antikörpernachweis zu diagnostizieren, sollten gepaarte Serumproben, entnommen im Abstand von zwei bis vier Wochen, zum Nachweis der Serokonversion untersucht werden.

Das Prinzip des AGPTs zum Antikörpernachweis entspricht dem des Antigennachweises. Der Nachweis ist vom 7. bis 12. Tag nach Infektion möglich (Woernle und Hafez, 1992). Positive AGPT Ergebnisse sprechen damit für eine frische Infektion. Allerdings ist der AGPT aufgrund der häufig zu beobachtenden geringen Sensitivität und der fehlenden Standardisierung in der Testdurchführung eine nicht routinemäßig durchzuführende Methode (De Wit, 2000).

Der ELISA stellt dagegen ein in der Routinediagnostik sehr häufig durchgeführtes Verfahren zum Nachweis von IBV spezifischen Antikörpern, auch zur Überprüfung des Impferfolges, dar. Zu diesem Zwecke stehen verschiedene kommerzielle Testkits zur Verfügung. Positive Reagenten sind bereits eine Woche nach Infektion und damit früher als im SNT und HAH zu detektieren (Marquardt et al., 1981; Mockett und Darbyshire, 1981). Sowohl serotypspezifische ELISAs unter Verwendung monoklonaler Antikörper (Karaca und Naqi, 1993) als auch ELISA Verfahren zum Nachweis von IgM sind bereits in der Literatur beschrieben (Mockett und Cook, 1986; Martins et al., 1991; De Wit, 1998), werden aber aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in der Routinediagnostik nicht eingesetzt (De Wit, 2000).

SNT und HAH repräsentieren typspezifische Tests zum Antikörpernachweis, wobei insbesondere im HAH auch Kreuzreaktionen zwischen den Serotypen auftreten können. Derartige Kreuzreaktionen sind vor allem nach mehrfachen IBV Infektionen bzw. Impfungen zu beobachten (Cavanagh und Naqi, 2003). Der SNT ist der Goldstandard zum Nachweis serotypspezifischer Antikörper. Seine Durchführung kann sowohl im embryonierten Hühnerei als auch in der Zellkultur bzw. in der Trachealringkultur erfolgen (De Wit, 2000). Das Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Spezifität nach Erstinfektion bzw. Impfung aus (Marquardt et al., 1981; Karaca und Naqi, 1993; De Wit et al., 1997). Unter diesen Umständen besteht auch eine gute Korrelation zwischen SNT und HAH, wobei der HAH insgesamt eine geringere Spezifität aufweist (King und Hopkins, 1983; Gelb und Killian, 1987; De Wit et al., 1997). Da IBV nicht in der Lage ist, Hühnererythrozyten spontan zu agglutinieren, ist zur Durchführung des HAHs eine Vorbehandlung des Virusantigens mit Phospholipase C (Alexander und Chettle, 1977; Lashgari und Newman, 1982; King und Hopkins, 1983; Gelb, 1989) oder Neuraminidase (Schultze et al., 1992; Ruano et al., 2000)

notwendig. Insgesamt sind beide Testverfahren zum routinemäßigen Antikörpernachweis nur wenig praktikabel.

### **2.2.6 Bekämpfung**

Eine spezifische Behandlung der IB ist nicht möglich. Um jedoch weitere Verluste durch Sekundärinfektionen vor allem durch *E. coli* und Mykoplasmen, zu vermeiden, kann eine antibiotische Behandlung durchgeführt werden (Woernle und Hafez, 1992; Cavanagh und Naqi, 2003).

Grundlegende Bekämpfungsstrategien stellen prophylaktische Maßnahmen in Form der Einhaltung von Biosicherheitsmaßnahmen und der Anwendung eines passenden Impfprogramms dar. Daraus ergibt sich die regelmäßige und vollständige Reinigung und Desinfektion der Stalleinrichtungen und des Stalls, die Beachtung einer Mindestleerzeit für die Neueinstellung von Küken, die Kontrolle des Personen- und Fahrzeugverkehrs, die Nutzung eines „all in“ und „all out“ Systems sowie die Einstallung von Tieren einer Alterstufe (Cavanagh und Naqi, 2003; Pena et al., 2005; Cavanagh, 2007).

Eine letztlich erfolgreiche Bekämpfung der IB kann jedoch nur auf Grundlage der Immunprophylaxe erfolgen. Dafür stehen attenuierte Lebend- und inaktivierte Impfstoffe zur Verfügung. Attenuierte Impfstoffe werden durch Viruspassagierung im embryonierten Hühnerei hergestellt. Durch diese kontinuierliche Passagierung wird das Virus an das neue Kultursystem angepasst, einhergehend mit einem Virulenzverlust für Hühner und Küken und einer steigenden Virulenz für Hühnerembryonen (Cavanagh und Naqi, 2003). Die Vorteile der Nutzung von Lebendimpfstoffen im Vergleich zu inaktivierten Impfstoffen liegen in einer gering benötigten und damit kostengünstigen Virusdosis und in der Stimulierung der humoralen, zellulären und lokalen Immunität (Woernle und Hafez, 1992). Darüber hinaus können Lebendimpfstoffe mittels Spray, Augentropfen oder Trinkwasser verabreicht werden, während inaktivierte Impfstoffe nur parenteral zu applizieren sind. Diese werden nach Grundimmunisierung mit Lebendimpfstoffen häufig zur Boosterung des Impfschutzes verwendet (Woernle und Hafez, 1992; Cavanagh und Naqi, 2003).

Der Erfolg eines Impfprogramms ist dabei von verschiedenen Faktoren, wie maternaler Antikörper-Status, Alter der Tiere, Infektionsdruck und dem Impfstoff selbst abhängig. Besondere Bedeutung kommt dabei der Wahl des geeigneten Impfstoffes unter Berücksichtigung der vorliegenden Genotypen und der Beachtung von Kreuzimmunitäten zu (Woernle und Hafez, 1992; Cavanagh und Naqi, 2003).

So wird seit mehr als 50 Jahren der zum Genotyp Massachusetts gehörige stark attenuierte Impfstamm IBV H20 sowohl bei Broilern als auch bei Legehennen und Mastelertieren erfolgreich zur Erst-Immunsierung eingesetzt (Bijlenga et al., 2004). Zur Boosterung von älteren Tieren wird häufig der geringer attenuierte Impfstamm IBV H52 angewendet, welcher eine bessere Kreuz-Protektivität gegen weitere IBV Genotypen verleiht

---

(Winterfield et al., 1976). Um einen noch breiteren Schutz zu erlangen, können in den nachfolgenden Impfungen Impfstoffe basierend auf weiteren Genotypen wie z. B. 4/91, D274 oder Arkansas eingesetzt werden (Gelb et al., 1991; Cavanagh und Naqi, 2003). Legehennen und Mastelertiere werden häufig noch vor Eintritt in die Legeperiode mit einem inaktivierten Impfstoff geboostert. Die Vorteile des inaktivierten Impfstoffes in dieser Lebensphase liegen ebenfalls in einer breiteren Kreuz-Immunität, da sie unterschiedliche Genotypen bzw. Stämme enthalten (Box et al., 1980; Box und Ellis, 1985; Box et al., 1988). Bei Broilern kann nachfolgend auf die Erst-Immunsierung eine zweite Impfung mit dem gleichen oder einem anderen Genotyp erfolgen, wenn der Infektionsdruck dies erfordert (Cavanagh und Naqi, 2003; Cavanagh, 2007).

Vor diesem Hintergrund besteht nach wie vor das Bedürfnis, neue Impfstoffe und Applikationsmethoden zum Schutz gegen eine IBV Infektion zu entwickeln. So wurden in jüngerer Zeit Untersuchungen mit verschiedenen rekombinanten und DNA Vakzinen durchgeführt (Song et al., 1998b; Wang et al., 2002; Johnson et al., 2003; Zhou et al., 2003; Wang et al., 2009). Eine weitere Applikationsmöglichkeit stellt die *in ovo*-Applikation dar. Diese Impfmethode wurde zwar bereits mit vielversprechenden Ergebnissen untersucht, bleibt aber aufgrund des bestehenden Pathogenitätsrisikos für die Embryonen noch in der Entwicklung (Kapczynski et al., 2003; Tarpey et al., 2006; Zeshan et al., 2010).

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Virus- und Bakterienstämme, Feldproben

**Tabelle 3: Verwendete Virus- und Bakterienstämme, Feldproben**

Virus und Bakterien <sup>1</sup>	Stammbezeichnung	Material	Herkunft
IBV	H120	Nobilis IB H52 Impfstoff	Intervet/Schering-Plough Animal Health
	H52	Nobilis IB H120 Impfstoff	Intervet/Schering-Plough Animal Health
	M41	Antigen	Animal Health Service Deventer
	Beaudette	Referenzstamm	Institutsammlung
	4/91	Antigen	Veterinary Laboratories Agency
	D274	Antigen	Animal Health Service Deventer
	D8880	Antigen	Animal Health Service Deventer
	GB237/08 (V1397)	Feldisolat	Institut / Diagnostik
	GB341/06 (QX)	Feldisolat/Interner Laborstamm	Institutsammlung
AIV H5N2	A/Duck/Potsdam/619/85	Feldisolat	FLI, Insel Riems
AMPV	STG 761/88 (Subtyp A) STG 1493 (Subtyp B)	Laborstamm	Institutsammlung
NDV	Lasota	AviPro ND LASOTA Impfstoff	Lohmann Animal Health
Reovirus	S1133	Referenzstamm	Institutsammlung
FAdV	YR 36	Referenzstamm	Institutsammlung
FPV	HP B	Hühnerpockenimpfstoff	Lohmann Animal Health
ILT	ASL	Laborstamm	Institutsammlung
MG	S-6 Adler	Nobilis Antigen	Intervet/Schering-Plough Animal Health
ORT	B3263/91 Serotype A	Referenzstamm	Intervet/Schering-Plough Animal Health

<sup>1</sup> IBV – Infektiöses Bronchitis Virus, AIV - Aviäres Influenza Virus, AMPV – Aviäres Metapneumovirus, NDV - Newcastle Disease Virus, FAdV – Fowl Adenovirus, FPV – Fowlpox virus, ILTV - Infektiöse Laryngotracheitis Virus, MG - Mykoplasma gallisepticum, ORT - Ornithobacterium rhinotracheale.

Das Feldprobenmaterial stammte aus 576 Einsendungen, die im Zeitraum 2004 bis 2009 zur IBV Routinediagnostik an das Institut für Geflügelkrankheiten eingeschickt wurden.

### **3.1.2 Spezifisch Pathogen Freie (SPF) Hühnereier und permanente Zellen**

Valo SPF Hühnereier stammten von der Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven. Die permanente VERO Zelllinie, ursprünglich erstellt aus Nierenepithelzellen von Grünen Meerkatzen („African green monkey“), wurde von Prof. Pauli, Robert Koch Institut Berlin, zur Verfügung gestellt und im Institut weiter vermehrt.

### **3.1.3 SPF Tiere**

Die Durchführung des Tierversuchs erfolgte unter Verwendung von Eintagsküken aus SPF Broiler Bruteiern, die in unserem Institut ausgebrütet wurden. Die Bruteier wurden von der Firma Intervet/Schering-Plough Animal Health, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

### **3.1.4 Antiseren**

Das IBV Antiserum (VLDIA021) zur Durchführung des Agar-Gel Präzipitationstests (AGPT) wurde vom GD Animal Health Service Deventer, Niederlande, bezogen.

### **3.1.5 Primer**

Alle verwendeten Primer und Sonden wurden bei der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert.

### **3.1.6 Puffer und Lösungen**

#### **3.1.6.1 Allgemeine Puffer und Lösungen**

##### Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Phosphate Buffered Saline (PBS)

Natriumchlorid	37 mM
Kaliumchlorid	1,47 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,47 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	6,46 mM
pH 7,4	

##### Präzipitationsagar

Agar-Agar 5 g mit 495 ml 8%iger NaCl-Lösung, pH 7,5 einstellen  
autoklavieren bei 120 °C für 20 min., pH 7,2 einstellen  
im Dampftopf für 20 min. bei 100 °C

### 3.1.6.2 Medien und Lösungen für die Zellkultur

#### Fötale Kälberserum (FKS)

#### Erhaltungs- und Anzuchtmedium - M 199

#### PBS Trypsin-Versen Lösung (PBS-TV)

PBS	100 ml
Trypsin-Stammlösung	1 %
Versen-Stammlösung	2 %

#### Trypsin-Stammlösung

dH <sub>2</sub> O	475 ml
Natriumchlorid	4 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Trypsin	25 g

1 h bei RT rühren

2200 x g, 15 min., Sterilfiltration

#### Versen-Stammlösung

PBS

Versen Titriplex III	1 %
----------------------	-----

autoklavieren bei 121 °C, 15 min.

### 3.1.6.3 Medien und Lösungen für die Klonierung

#### Ampicillin Stammlösung

Ampicillin	100 µg/ml
------------	-----------

in dH<sub>2</sub>O

#### 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)

X-Gal	50 mg/ml
-------	----------

in Dimethylformamid (DMFA)

#### Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid (IPTG)

IPTG	100 mM
------	--------

in dH<sub>2</sub>O

Luria Bertani (LB-Medium)

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Natriumchlorid	10 g/l
pH 7,5	

LB-Agargel

LB Medium	300 ml
Agar	4,5 g
60 min. dampfkochen	
autoklavieren, 121 °C/15 min.	

LB-Ampicillin Medium

LB Medium	300 ml
Ampicillin Stammlsg.	300 µl

Phenol-Chloroform

Phenol	24 VT
Chloroform	1 VT

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol

Phenol	125 VT
Chloroform	24 VT
Isoamylalkohol	1 VT

Puffer I (Resuspensionspuffer)

Glukose	50 mM
Tris-HCL (pH 8,0)	25 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
autoklavieren 121 °C/15 min.	

Puffer II (Lysispuffer)

Natriumhydroxid (1 M)	4 ml
SDS (10 %)	2 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 20 ml

Puffer III (Neutralisationspuffer)

Kaliumazetat	29,4 g
Eisessig	11,5 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Salz-optimiertes Medium (SOB)

Trypton	6,0 g
Hefeextrakt	1,5 g
Natriumchlorid (5M)	600 µl
Kaliumchlorid (1M)	750 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 300 ml

pH 7,5, autoklavieren 121 °C/15 min.

Magnesiumchlorid/Magnesiumsulfat (1 M) 1 % (V/V)

Salz-optimiertes Medium mit Glukose (SOC)

SOB Medium

Glukose (2 M) 1 % (V/V)

TE

Tris Cl	10 mM
EDTA	1 mM
in dH <sub>2</sub> O	

TE-RNase A

TE (1 mg/ml)	1 ml
RNase A (20 µg/ml)	20 µl

**3.1.6.4 Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese**Agarose Gel

Agarose/Agarose Sieve 0,5 - 3 %  
in 1x TBE aufkochen, auf 60 °C abkühlen

DNA Probenladepuffer

Bromphenolblau	0,25 ml
Xylencyanol	0,25 ml
Glycerin	30,0 ml
in TBE-Puffer (4x)	Ad 100 ml

Größenmarker DNA 50 bp

50 bp Ladder (1 µg/µl)	15 µl
Probenladepuffer	30 µl
dH <sub>2</sub> O	200 µl

Größenmarker DNA 100 bp

100 bp Ladder (0,5 µg/µl)	30 µl
Probenladepuffer	30 µl
dH <sub>2</sub> O	185 µl

Größenmarker DNA 1 kb

1 kb Ladder (1 µg/µl)	30 µl
Probenladepuffer	50 µl
dH <sub>2</sub> O	200 µl

Tris-Borat-Elektrophoresepuffer (TBE)

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA Dinatriumsalz	2 mM
pH 7,5	

**3.1.7 Kits**illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)

puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (enthält BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 U puReTaq DNA Polymerase, Reaktion Puffer).

iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR Green (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

2x SYBR Green RT-PCR Reaktion Mix (enthält 0,4 mM je dNTP, Magnesium, iTaq DNA Polymerase, 20 nM Fluorescein, SYBR Green I dye) und iScript reverse Transkriptase (enthält 50 x MMLV Reverse Transkriptase).

MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

MinElute Spin Columns, Puffer QG, Puffer PE, Puffer EB, Collection Tubes (2 ml), Loading Dye.

pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I (Promega, Frankfurt am Main)

2x Rapid Ligation Puffer, pGEM<sup>®</sup>T Vektor, T4 DNA Ligase (3 U/μl), Bakterienzellen JM 109 High Efficiency Competent Cells (1 x 10<sup>8</sup> cfu/ug DNA).

QIAGEN<sup>®</sup> OneStep RT-PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

5 x QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer (enthält Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, DTT) dNTP Mix (enthält 10 mM je dNTP), QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix (enthält 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 % Nonidet<sup>®</sup> P-40, 0,5 % Tween<sup>®</sup> 20, 50 % Glycerol).

QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

Proteinsase K (20 mg/ml), Lysispuffer ATL, Lysispuffer AL, QIAamp<sup>®</sup> Filterröhrchen, Waschpuffer AW 1 und AW 2, Elutionspuffer AE.

QIAGEN Quantitect<sup>™</sup> Probe RT-PCR (Qiagen GmbH, Hilden)

2x QuantiTect Probe RT-PCR Maser Mix (enthält HotStarTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase, Quantitect<sup>®</sup> Probe RT-PCR Puffer, dNTP-Mix inclusive dUTP, ROX passive reference dye und 8 mM MgCl<sub>2</sub>), Quantitect RT Mix (enthält Omniscript<sup>®</sup> Reverse Transcriptase und Sensiscript<sup>®</sup> Reverse Transcriptase), RNase freies Wasser.

QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

QIAamp<sup>®</sup> Mini Spin Säulen, Auffanggefäße, Lysispuffer AVL, Waschpuffer AW1 und AW2, Elutionspuffer AVE, Carrier RNA (poly A).

Riboprobe<sup>®</sup> in vitro Transcription System-SP6/T7 (Promega, Frankfurt am Main)

Transcription Puffer (5x), DTT (100mM), RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor, rATP, rGTP und rUTP (2.5mM), T7 RNA Polymerase, RQ1 RNase-Free DNase.

RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

RNeasy<sup>®</sup> Mini Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml), Collection Tubes (2 ml), Puffer RLT, Puffer RW1, Puffer RPE, RNase-Free Wasser.

IDEXX FlockChek IBV (IDEXX, Ludwigsburg)

Mit IBV-Antigen beschichtete Platten, IBV-Positivkontrolle, Negativkontrolle, Meerrettichperoxidase-Konjugat anti Huhn von der Ziege, Probenverdünnungspuffer, TMB-Substratlösung, Stopplösung.

### 3.1.8 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

Agar	Gibco Brl, Galthersburg, USA
Ammoniumazetat	Merck, Darmstadt
Ampicilin	Biochrom AG, Berlin
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Biozym Sieve 3 : 1 Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Börsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Carl Roth, Karlsruhe
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidium Bromide 10 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Glukose	Sigma Aldrich, München
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Michigan, USA
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumazetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
M 199	Biochrom AG, Berlin
Natriumazetat	Serva GmbH & Co., Heidelberg
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraffin	Merck, Darmstadt
pEGFP-N3*	CLONTECH Laboratoies
Phenol-Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
RNase A	Sigma Aldrich, München
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva GmbH & Co., Heidelberg
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin	Difco, Michigan, USA
Trypton	Difco, Michigan, USA

Versen	Carl Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Carl Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, München
* Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD. Dr. K. Borchers.	

### 3.1.9 Verbrauchsmittel

Biopur-Zentrifugen-Gefäße 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläschen 12 x 30 mm	Menzel-Glaser GmbH & Co. KG, Braunschweig
Einmalkanülen 0,45 x 12 mm	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Filter 0,45 $\mu$ m	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
HS Einmalspritzen 1 ml	Henry Schein, Langen
Küvetten Uvette	Eppendorf AG, Hamburg
Objektträger	Menzel-Glaser GmbH & Co. KG, Braunschweig
Petrischale mit Nocken 60 x 15 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10, 20, 100 und 1000 $\mu$ l	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen SafeSeal-Tips 10, 20, 100, 1000 $\mu$ l	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
PS-Microplatte V-Form 96 Well	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,2 ml, dünnwandig	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße 0,5 ml, dünnwandig	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkulturflaschen 25 und 75 cm <sup>2</sup> mit Filterdeckel	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten 24 Well	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen 22 cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugengefäße 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugenröhrchen 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

### 3.1.10 Geräte und Laborhilfsmittel

Biophotometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg
BDK	BDK Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Brutmaschine Schlupfbrüter TC2004M	J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co. KG, Verl
Brutmaschine Thermo de Luxe 400	J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co. KG, Verl
Brutschrank Hera Cell 240	Heraeus, Hanau

---

Brutschrank Heraeus Instruments	Heraeus, Hanau
Edmund Bühler Schüttelinkubator TH30	J. Otto GmbH, Hechingen
Eierschierlampe	J. Hemel Brutgeräte GmbH & Co. KG, Verl
ELISA-Reader MRX	Dynex Technologies, Denkendorf
Gelelektrophoresekammern V-Gel, Sub-Cell® GT, Wide-mini-Sub Cell® GT Bio-rad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Herasafe KS12, HS12	Heraeus, Hanau
iCycler iQ™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kühlzentrifugen Minifuge GL und RF	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Labormikroskop	Esselte Leitz GmbH & Co. KG, Stuttgart
Magnetrührer	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
PCR Workstation	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten Eppendorf Reference 100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Eppendorf Research 10, 20, 100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Power Supply Bio-rad HC™	Bio-rad Laboratories GmbH, München
Power Supply Bio-rad Model 1000/500	Bio-rad Laboratories GmbH, München
QIAcube	Qiagen GmbH, Hilden
Software Revelation V. 3.04	Dynex Technologies, Denkendorf
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Thermozykler DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermozykler T3	Biometra, Göttingen
TissueLyser Qiagen	Qiagen GmbH, Hilden
Ultra Turrax	Ika Labortechnik, Staufen
UV-Transilluminator Typ UVT 2053	Herolab, Wiesloch
Videodokumentationssystem mit Software Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen 5418, 5424, 5417R	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.1.11 Software

Die Ableitung von Primern erfolgte mittels des Programms Beacon-Designer 3.0 (PremierBiosoft, Palo Alto, USA) sowie des online Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen und Skaletsky, 2000).

Zur Sequenzanalyse wurden die online Programme MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/>) (Corpet, 1988) und ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (Thompson et al., 1994) verwendet. Die Sequenzähnlichkeitssuche wurde mittels NCBI Blast Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al., 1990) durchgeführt. Die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme erfolgte unter zur Hilfenahme des online Programms Webcutter2 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>) (Heiman, 1997).

---

## 3.2 Beschreibung der angewandten Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Aufbereitung und Lagerung der Proben zur RNA-Extraktion

Tracheal- und Kloakentupfer sowie ungelöste Impfstoffe und Antigene wurden in PBS aufgenommen und bis zur RNA-Extraktion bei -70 °C aufbewahrt. Gewebeproben und Zellkulturmaterialien wurden, wenn nicht sofort bearbeitet, ebenfalls bis zur RNA-Extraktion bei -70 °C gelagert.

#### 3.2.1.2 RNA-Extraktion

In Abhängigkeit von den verschiedenen Probenmaterialien wurde die RNA unter Verwendung verschiedener Kits extrahiert. Bei jedem Extraktionsansatz wurde eine Extraktionsnegativkontrolle parallel zu den Proben mit aufgearbeitet.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zur Zentrifugation wurde eine Eppendorfszentrifuge und zum Mischen der Proben das Vortex-Genie 2 verwendet.

##### 3.2.1.2.1 RNA-Extraktion aus Tupfer, Zellkulturmaterial, Impfstoffen und Antigenen

Die RNA-Extraktion wurde mittels des QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Kits entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Als Vorbereitung der RNA-Extraktion wurde die lyophilisierte Carrier RNA mit 310 µl Puffer AVE gelöst, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Nutzung aufbewahrt.

In einem 2 ml Eppendorfgefäß wurden 560 µl AVL Puffer und 5,6 µl gelöste Carrier RNA vorsichtig gemischt. Danach wurden 140 µl Probe dazugegeben, kräftig gemischt und bei Raumtemperatur (RT) 10 Minuten (min.) inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zugabe von 560 µl absoluten Ethanol und nach gründlichem Mischen wurde der gesamte Ansatz in 630 µl Schritten auf das Filterröhrchen pipettiert und 1min. bei 6000 x g zentrifugiert. Das jeweilige Filtrat wurde verworfen. Das Filterröhrchen wurde in eine neue Sammeltube verbracht und durch Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW 1 und eine einminütige Zentrifugation bei 6000 x g gewaschen. Im Anschluss erfolgte ein zweiter Waschschrift durch Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW2 und bei dreiminütiger Zentrifugation 20000 x g. Das Filtrat wurde jeweils verworfen. Im letzten Schritt wurde die RNA nach Zugabe von 60 µl AVE Puffer und einer einminütigen Inkubation durch Zentrifugation 1min. bei 6000 x g eluiert.

Neben der manuellen Extraktion erfolgte die RNA Extraktion auch automatisiert mittels QIAcube unter Verwendung des QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Kits in analoger Weise.

### 3.2.1.2.2 RNA-Extraktion aus Gewebeproben

Die RNA-Extraktion aus Gewebeproben wurde mittels des RNeasy Mini Kits durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden 1 ml RLT Puffer mit 10 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) gemischt.

Die Gewebeprobe wurde entnommen, gewogen (30 mg) und mit 600 µl RLT Puffer in einem 2 ml Eppendorfgefäß gemischt. Nach Zugabe eines Stahl-Beeds wurde die Probe im TissueLyser für 2 x 2 min. bei 20 Hz homogenisiert. Das Lysat wurde 3 min. bei 20000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 Volumen 70 % Ethanol wurde der gemischte Ansatz auf ein RNeasy Filtrerröhrchen pipettiert und 15 Sekunden (sek.) bei 8000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das Filtrerröhrchen wurde in eine neue Sammeltube gestellt. Nach Zugabe von 700 µl Puffer RW1 wurde der Ansatz durch die Säule 15 sek. bei 8000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Im Anschluss erfolgte eine zweimalige Zugabe von 500 µl RPE Puffer und ein Zentrifugationsschritt für 15 sek. bei 8000 x g bzw. 2 min. bei 20000 x g. Nachdem das Filtrerröhrchen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt wurde, wurde 50 µl RNase freies Wasser hinzupipettiert. Dieses Gemisch wurde anschließend 1 min. bei 8000 x g zentrifugiert um die RNA zu eluieren.

### 3.2.1.2.3 RNA Extraktion mit Extraktion der Internen Kontrolle (IK)

Bei gleichzeitiger Extraktion der IK erfolgte das Versetzen der Feldprobe mit der IK nach Hinzufügen des Lysispuffers zur Probe durch Zugabe von 5 µl Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) *in vitro* RNA (ca. 10<sup>5</sup> Kopien/µl). Die weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

### 3.2.1.3 Auswahl und Design von Primer- und Sonden

Die IBV Primer qIBf, qIBr sowie die Sonde qIBs wurden mittels des Programms Beacon-Designer 3.0 entworfen. Zum Nachweis der Internen Kontrolle (IK) auf Basis des Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) wurden die veröffentlichten Primer und Sonden EGFP14f, EGFP12f, EGFP10r und EGFP-Cy5 von Hoffmann et al. (2006) verwendet.

Für die konventionellen RT-PCR Verfahren wurden die Primer IBVN+, IBVN-, 793 B1, 793 B2, 793 B3, S1oligo5, S7, S9, Srev, S8, S1PR2, S6 und S1oligo3 der Literatur entnommen (Kwon et al., 1993; Handberg et al., 1999; Yu et al., 2001b; Bochkov et al., 2006; Dolz et al., 2006). Die Primer QXf und QXr wurden mittels des Programms Primer3 entwickelt. Die selbst entworfenen und veröffentlichten Primer und Sonden mit ihren Eigenschaften sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 4: Verwendete PCR-Verfahren, Primer, Sonden und ihre Eigenschaften

PCR	Name	Sequenz (5' – 3')	Polarität	Zielgen / Accession- Nr.	Position*	Amplikon	Referenz
<b>PCR zur Konstruktion der Internen Kontrolle</b>							
EFGP PCR	EGPF14f EGFP10r	CCCTGAAGTTCATCTGCA CTTGACAGCTCGTCCATGC	Vorw. <sup>1</sup> Rückw. <sup>2</sup>	pEGFP-N1 (U55761)	227-244 813-794	587 bp	Hoffmann et al., 2006
<b>Universelle IBV RT-PCR Verfahren</b>							
Universelle IBV Duplex RT-qPCR	qIBf	ATACTCCTAACTAATGGTCAACAATG	Vorw.	IBV M-Gen (DQ834384)	366-392	134 bp	Selbst entworfen
	qIBr	GGCAAGTGGTCTGGTTCAC	Rückw.		500-482		
	qIBs	FAM <sup>1</sup> -CAAGCCACTGACCCTCACAATAA AGA-BHQ <sup>2</sup>	Vorw.		450-477		
	EGFP12f	TCGAGGGCGACACCCTG	Vorw.	pEGFP-1 (U55761)	439-456	384 bp	Hoffmann et al., 2006
	EGFP10r	CTTGACAGCTCGTCCATGC	Rückw.		813-794		
EFGP-Cy5	Cy5 <sup>3</sup> -AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCA-BHQ	Vorw.		703-724			
Universelle IBV RT-PCR	IBVN+ IBVN-	GAAGAAAACCAGTCCCAGATGCTTGG GTTGGAATAGTGCGCTTGCAATACCG	Vorw. Rückw.	IBV N-Gen (M28566)	349-374 802-777	453 bp	Handberg et al., 1999
<b>Subtypspezifische IBV RT-PCR Verfahren</b>							
IBV 4/91 RT-PCR	793 B1	CCAAAGTGCCTTGAGGCCTGG	Vorw.	IBV S-Gen (Z83978)	90-110	480 bp	Handberg et al., 1999
	793 B2	CGCCTGCACCCGTAACGTG	Rückw.		570-550		
	793 B3	AACGCCTGCACCCGTAACGTA	Rückw.		570-550		
IBV QX RT-PCR	QXf	TGCAAATTTGTTTGATTCTGA	Vorw.	IBV S-Gen (DQ431199)	50-71	219 bp	Selbst entworfen
	QXr	CCCTGAAGAGGTGCTGTCAT	Rückw.		269-249		
<b>IBV RT-PCR Verfahren zur Differenzierung</b>							
RT-PCR	S1Oligo 5	TGAAAACCTGAACAAAAGACA	Vorw.	IBV S-Gen (M21883)	17-37	599 bp	Kwon et al., 1993

PCR	Name	Sequenz (5' – 3')	Polarität	Zielgen / Accession- Nr.	Position*	Amplikon	Referenz
	Srev	TTAGADGTRWAVACAAGRTCACCATT	Rückw.		599-573		Yu et al., 2001
RT-PCR	S1Oligo 5	TGAAAACCTGAACAAAAGACA	Vorw.	IBV S-Gen (M21883)	17-37	719 bp	Kwon et al., 1993 Bochkov et al., 2006
	S6	ACA TCW TGT GCG GTG CCA TT	Rückw.		719-699		
<b>IBV Semi-nested- und nested PCR Verfahren zur Differenzierung (im Anschluss an S1 Oligo/S6)</b>							
Semi-nested PCR	S7	TACTACTACCAGAGTGCTT	Vorw.	IBV S-Gen (M21883)	147-168	572 bp	Bochkov et al., 2006
	S6	ACATCWTGTGCGGTGCCATT	Rückw.		719-699		
Nested PCR	S7	TACTACTACCAGAGTGCTT	Vorw.	IBV S-Gen (M21883)	147-168	517 bp	Bochkov et al., 2006
	S8	TGGTGGKCCRATAACTTATAAAG	Rückw.		664-641		
Nested PCR	S7	TACTACTACCAGAGTGCTT	Vorw.	IBV S-Gen (M21883)	147-168	560 bp	Bochkov et al., 2006 Dolz et al., 2006
	S1PR2 -	GTACCATTAACAAAATAAGCCA	Rückw.		707-685		
Semi-nested PCR	S9	GATGGTTGGCATTTRCAYGG	Vorw.	IBV S-Gen (M21883)	177-197	542 bp	Bochkov et al., 2006
	S6	ACATCWTGTGCGGTGCCATT	Rückw.		719-699		
Nested PCR	S9	GATGGTTGGCATTTRCAYGG	Vorw.	IBV S-Gen (M21883)	177-197	487 bp	Bochkov et al., 2006
	S8	TGGTGGKCCRATAACTTATAAAG	Rückw.		664-641		
Nested PCR	S9	GATGGTTGGCATTTRCAYGG	Vorw.	IBV S-Gen (M21883)	177-197	530 bp	Bochkov et al., 2006, Dolz et al., 2006
	S1PR2 -	GTACCATTAACAAAATAAGCCA	Rückw.		707-685		

<sup>1</sup> Vorw. = Vorwärts; <sup>2</sup> Rückw. = Rückwärts

<sup>1</sup> FAM: Karboxifluoreszein; <sup>2</sup> BHQ: Black Hole Quencher; <sup>3</sup> Cy5: Cyaninefluoreszein

\* bezogen auf die jeweilig angegebene Genbanksequenz

### 3.2.1.4 Durchführung von PCR-Verfahren

#### 3.2.1.4.1 RT-PCR im One Step Verfahren

Die Durchführung der verschiedenen konventionellen RT-PCRs (Tabelle 4) erfolgte unter Verwendung des Qiagen One Step RT-PCR Kits. Sämtliche Pipettierschritte sowie der Proben- bzw. Reagenzientransport wurden auf Eis durchgeführt.

Die RT-PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl optimiert. Zu 5 µl 5x OneStep RT-PCR Puffer wurden 1 µl dNTP Mix, die jeweiligen Primergemische (Mengenangabe siehe Tabelle 5), 1 µl OneStep RT-PCR Enzyme Mix, 5 µl RNA und nukleasefreies H<sub>2</sub>O zu einem Endvolumen von 25 µl zugegeben. Bei der IBVN, 4/91 und QX RT-PCR wurden zusätzlich 5 µl 5x Q-Solution eingesetzt. Die Thermoprofile der verschiedenen PCR-Verfahren sind in Tabelle 6 dargestellt.

#### 3.2.1.4.2 PCR und Nested-PCR

Die PCR und semi-nested-PCR Verfahren (Tabelle 4) wurden mittels illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads durchgeführt. Zu dem PCR Bead, welches in lyophilisierter Form Puffer, Nukleotide und einen Polymerasemix enthält, wurden das jeweilige Primergemisch (Mengenangabe siehe Tabelle 5), 50 ng Plasmid DNA bzw. 1 µl PCR-Produkt aus der ersten PCR Runde und nukleasefreies dH<sub>2</sub>O zu einem Endvolumen von 25 µl hinzugefügt. Die Thermoprofile der verschiedenen PCR-Verfahren sind in Tabelle 6 dargestellt.

#### 3.2.1.4.3 Real-time RT-PCR (RT-qPCR)

Die Durchführung der Real-time RT-PCR (Tabelle 4) erfolgte unter Verwendung des Quantitect™ Probe RT-PCR Kits. Die Real-time PCR wurde sowohl als Uniplex als auch als Duplex Verfahren durchgeführt. Der Ansatz enthielt im Endvolumen von 25 µl, 12,5 µl 2x Quantitect Probe RT-PCR Master Mix, Primer und Sonden (Mengenangabe siehe Tabelle 5), 0,25 µl Quantitect RT Mix, 5 µl RNA und nukleasefreies dH<sub>2</sub>O ad 25 µl. Die Durchführung der RT-qPCR erfolgte im iCycler iQ™ Thermozykler. Das Thermoprofil der RT-qPCR ist in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 5: Eingesetzte Primer bzw. Sondenmengen bei den verschiedenen PCR-Verfahren**

PCR Verfahren	Primerkombinationen/Sonde	Eingesetzte Mengen Primer/Sonde	Menge/ 25µl
EGFP PCR	EGFP14f/EGFP10r	je 5 pmol	1 µl
Universelle IBV Duplex RT-qPCR	EGFP12f/EGFP10r/EGFP-Cy5	5 pmol – 2,5 pmol	1 µl
	qIBf/qIBr/qIBs	30 pmol – 5 pmol	1 µl
Universelle RT-PCR	IBVN+/IBVN-	je 12,5 pmol	1 µl
IBV 4/91 RT-PCR	793 B1/B2/B3	je 12,5 pmol	1 µl
IBV QX RT-PCR	QXf/QXr	je 10 pmol	1 µl
RT-PCR	S1Oligo5/Srev	je 10 pmol	1 µl
	S1Oligo5/S6	je 10 pmol	1 µl
Semi-nested PCR	S7/S6	je 10 pmol	1 µl
Nested PCR	S7/S8	je 10 pmol	1 µl
	S7/S1PR2-	je 10 pmol	1 µl
Semi-nested PCR	S9/S6	je 10 pmol	1 µl
Nested PCR	S9/S8	je 10 pmol	1 µl
	S9/S1PR2-	je 10 pmol	1 µl

Tabelle 6: Temperaturprofil der verschiedenen Primerkombinationen

Primerkombinationen	Reverse Transkription	Initiale Denaturierung	Zyklen	Denaturierung	Annealing	Synthese	Finale Synthese
EGFP12f/EGFP10r/EGFP-Cy5 qIBf/qIBr/qIBs	30 min., 50 °C	15 min., 95 °C	42	30 sek., 94 °C	45 sek., 57 °C	45 sek., 72 °C	-
S1Oligo5/Srev	30 min., 50 °C	15 min., 95 °C	42	30 sek., 95 °C	1 min., 56 °C	1 min., 72 °C	10 min., 72 °C
S1Oligo5/S6	30 min., 50 °C	15 min., 95 °C	42	30 sek., 95 °C	1 min., 50 °C	1 min., 72 °C	10 min., 72 °C
QXf/QXr	30 min., 50 °C	15 min., 95 °C	42	30 sek., 95 °C	1 min., 60 °C	1 min., 72 °C	10 min., 72 °C
IBVN+/IBVN-, 793 B1/B2/B3	30 min., 50 °C	15 min., 95 °C	40	30 sek., 95 °C	1 min., 60 °C	2 min., 72 °C	10 min., 72 °C
S7/S6, S7/S8, S7/S1PR2- S9/S6, S9/S8, S9/S1PR2-	-	5 min., 94 °C	35	30 sek., 94 °C	30 sek., 50 °C	1 min., 72 °C	10 min., 72 °C
EGFP14f/EGFP10r	-	2 min, 94 °C	42	30 sek., 94 °C	45 sek., 57 °C	45 sek., 68 °C	5 min., 68 °C

### 3.2.1.5 DNA Gelelektrophorese

Zur Produktanalyse von PCR Produkten und zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Der Prozentgehalt des Gels und Typ an Agarose war abhängig von der erwarteten Fragmentgröße und betrug zwischen 0,5 % und 3,0 % (Tabelle 7). Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Agarosemenge in 100 ml 1x TBE aufgekocht, mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt, auf 60 °C abgekühlt und in einem horizontalen Gelträger zu ca. 5mm starken Gelen mit 14 bzw. 15 Probestaschen gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel in eine mit 1x TBE gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die aufzutrennende DNA wurde mit Probenladepuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard wurden 8 µl eines 50 bp, 100 bp bzw. 1 kb DNA Ladders aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 60 bis 80 Volt über 1,5 - 2 Std. durchgeführt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mittels Videodokumentationssystem und der Software Quantity One.

**Tabelle 7: Größen von verschiedenen PCR Produkten und DNA Fragmenten und entsprechende Agarosegehalte in %**

Fragmentgröße	Agarosegehalt in %
REA <sup>1</sup> Ansätze von PCR Produkten	3
220 bp	2
480 bp – 750 bp	1,5
980 bp – 1600 bp	1
≥3000 bp	0,5

<sup>1</sup> Restriktionsenzymanalyse

### 3.2.1.6 Qualitätskontrolle der RNA Extraktion und der verschiedenen PCR-Verfahren

Zur Verringerung des Kontaminationsrisikos während der RNA Extraktion bzw. der PCR-Durchführung und zum Schutz vor RNasen wurden folgenden Maßnahmen ergriffen.

- Nutzung von RNasefreien Einwegmaterialien
- Getrennte Arbeitsräume und Arbeitsmaterialien für die einzelnen Arbeitsschritte
- Arbeitsraumabhängige Laborkleidung
- Nutzung von Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern
- Getrennte Reagenzien und Lösungen für jeden Untersucher
- Mitführen von negativen RNA- Extraktionskontrollen (EK) und PCR-Negativkontrollen

### 3.2.1.7 Gelreinigung von PCR-Produkten

Zur Gelreinigung von PCR Produkten zur anschließenden Klonierung, Sequenzierung und in vereinzelt Fällen auch zur Restriktionsenzymanalyse (REA) wurde das gesamte Volumen des PCR Produktes mit der entsprechenden Menge Probenladepuffer vermischt, ins Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.2.1.5). Die gewünschten Banden wurden auf einem UV Transilluminator aus dem Ethidiumbromid gefärbten Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des MinElute Gel Extraktion Kit aufgereinigt. Dazu wurde das ausgeschnittene Gelfragment in ein 2 ml Zentrifugen-Gefäß überführt, gewogen, zerkleinert und mit 3 Volumen Puffer QG versetzt und für 10 min. bei 50 °C bis zur Auflösung des Gelfragmentes erhitzt. Nach Auflösung wurde der Ansatz mit 1 Volumen Isopropanol geschwenkt, auf das mitgelieferte Filterröhrchen pipettiert und 1 min. bei 10000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Das Filterröhrchen wurde in eine neue Sammeltube verbracht, mit 500 µl Puffer QG erneut versetzt, auf das Filterröhrchen pipettiert und 1 min. bei 10000 x g zentrifugiert. Nach erneutem Wechsel der Sammeltube wurden 700 µl PE Waschpuffer auf das Filterröhrchen gegeben. Nach dreiminütiger Inkubation folgte eine erneute einminütige Zentrifugation bei 10000 x g mit erneutem Verwerfen des Durchflusses. Ein zweiter Zentrifugationsschritt wurde für 2 min. bei 10000 x g durchgeführt. Im letzten Schritt erfolgte die Elution der DNA durch Zugabe von 11 µl Puffer EB, einminütiger Inkubationszeit bei RT und anschließender Zentrifugation bei 10000 x g. Zur Kontrolle der Gelextraktion wurde 1 µl des gereinigten PCR-Produktes gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.2.1.5). Eine Abschätzung der DNA Konzentration erfolgte durch Vergleich mit den mitgeführten Größenstandards.

### 3.2.1.8 Restriktionsenzymanalyse (REA) von PCR-Produkten

Für die Restriktionsenzymanalyse wurden pro Reaktions-Ansatz ca. 500-1000 ng des PCR-Produktes, 20 Einheiten (U) des Enzyms (Tabelle 8), 2 µl des entsprechenden Reaktionspuffers, je nach Enzym 2 µl zehnfach konzentriertes Bovines Serumalbumin (BSA) und dH<sub>2</sub>O bis zum Endvolumen von 20 µl vermischt und für ca. 2 h in einem Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Spaltansätze erfolgte mittels Gelelektrophorese unter Verwendung eines 3%igen Agarosegels (3.2.1.5)

**Tabelle 8: Verwendete Restriktionsenzyme**

Enzym	Spaltstelle	BSA
<i>Hinfl</i>	5' – G/ANTC – 3'	nein
<i>NlaIII</i>	5' – CATG/ – 3'	ja
<i>MseI</i>	5' – T/TAA – 3'	ja
<i>SalI</i>	5' – G/TCGAC – 3'	ja

### 3.2.1.9 Klonierung von Amplifikaten

Die Klonierung von Amplifikaten erfolgte unter Verwendung des pGEM<sup>®</sup>-T Vektor Systems I.

#### 3.2.1.9.1 Ligation

Das gelgereinigte PCR Produkt (3.2.1.7) wurde unter Beachtung eines optimalen Insert : Vektor Verhältnisses von 3 : 1 – 1 : 3 in den pGEM-T Vektor ligiert. Dazu wurden ca. 25 ng gereinigtes PCR-Produkt mit 5 µl 2x Ligationspuffer, 1 µl (50 ng) pGEM<sup>®</sup>-T Vektor DNA, 1 µl T4 DNA Ligase (3 U) und nukleasefreiem dH<sub>2</sub>O zu einem Endvolumen von 10 µl vermischt und der Ansatz bei 4 °C über Nacht inkubiert.

#### 3.2.1.9.2 Transformation

Zur Transformation von Bakterien mit der Plasmid-DNA wurden 2 µl Ligationsansatz mit 50 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterienzellen vermischt, durch vorsichtiges Antippen gemischt und für 20 min. auf Eis verbracht. Die Bakterien wurden für 45 sek. einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und im Anschluss 2 min. auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 950 µl SOC wurde der Ansatz für 90 min. bei 37 °C und 150 rpm schüttelnd inkubiert.

Zuvor präparierte LB/Ampicillin Agarplatten wurden auf Raumtemperatur gebracht, mit 100 µl IPTG und 20 µl X-Gal versetzt und für 30 min. bei 37 °C äquilibriert. 100 µl der transformierten Bakterien wurden direkt auf einer LB/ Ampicillin Agarplatte ausplattiert. Der Rest wurde für 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert, in 100 µl SOC resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Die Beurteilung des Klonierungserfolges erfolgte anhand einer Blau-Weiß-Selektion der Bakterienkolonien. Aufgrund der durch den Vektor kodierten Ampicillin-Resistenz konnten auf den mit Ampicillin supplementierten Agarplatten nur transformierte Bakterien wachsen. Bakterienklone mit dem nativen Vektor bildeten blaue Kolonien, demgegenüber waren Bakterienklone, die das Plasmid mit Insert trugen, an der Ausbildung weißer Kolonien zu erkennen.

#### 3.2.1.9.3 Präparation von Plasmid-DNA - Mini-Präparation

##### 3.2.1.9.3.1 Screening Methode

Zur Präparation der Plasmid-DNA als screening Methode wurden weiße Einzelkolonien in 2,5 ml LB/Ampicillin Medium überführt und in einem Schüttelinkubator bei 150 g und 37 °C über Nacht inkubiert.

2 ml der Übernacht Kultur wurden für 1min. bei 20000 x g pelletiert und nach Verwerfen des Überstandes in 100 µl Puffer I (Resuspensionspuffer) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer II (Lysispuffer) und 3-4maligem vorsichtigem Schwenken wurde der

Ansatz 5 min. auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 150 µl Puffer III (Neutralisationspuffer) für weitere 5 min. auf Eis gekühlt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 20000 x g wurde der Überstand mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) ausgeschüttelt und erneut für 5 min. bei 20000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 2 Volumen eiskaltem absoluten Ethanol versetzt. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT wurde die Zentrifugation wiederholt und das Pellet mit 200 µl 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-30 µl Puffer TE + RNase gelöst. Die so gereinigte Plasmid-DNA wurde durch anschließende Gelelektrophorese (3.2.1.5) und durch Überprüfung in der jeweiligen PCR (3.2.1.4.2) näher charakterisiert.

### 3.2.1.9.3.2 Plasmid-DNA Präparation mittels QIAprep® Miniprep Kit

Zum Erhalt reinerer Plasmid-DNA für weitere Anwendungen wurde der QIAprep® Miniprep Kit nach Herstelleranleitung verwendet. Der plasmidtragende Bakterienklon wurde in 2 ml LB/Ampicillin Medium in einem Schüttelinkubator bei 150 rpm und 37 °C über Nacht inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 6000 x g wurde das Bakterienpellet in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendiert. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 250 µl Puffer P2 versetzt und durch 4-6maliges Schwenken sorgfältig gemischt. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 und sofortigem Mischen durch Schwenken folgte eine zehninütige Zentrifugation bei 20000 x g. Danach wurde der Überstand auf ein QIAprep Filterröhrchen pipettiert und für 1 min. bei 20000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Filterröhrchen wurde durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und eine zweimalige Zentrifugation für 1 min. bei 20000 x g gewaschen. Schließlich wurde das Filterröhrchen in ein neues Zentrifugegefäß überführt und die DNA nach Zugabe von 50 µl Puffer EB und einer einminütigen Inkubation durch Zentrifugation für 1 min. bei 6000 x g eluiert.

### 3.2.1.10 RNA *in vitro* Transkription

Zur *in vitro* Transkription wurde das Riboprobe® *in vitro* Transcriptions Systems unter Anwendung der T7 RNA Polymerase nach Herstellerangaben verwendet.

1 µg Plasmid-DNA wurde in einem 40 µl Restriktionsansatz mittels des Enzyms Sall gespalten (3.2.1.8). Nach erfolgter Linearisierung der Plasmid-DNA wurde der Ansatz mittels TE auf 300 µl aufgefüllt, mit einem Volumen Phenol-Chloroform ausgeschüttelt und 10 min. bei 20000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in analoger Weise mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Danach wurde die wässrige Phase mit 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat und 3 Volumen Ethanol gut gemischt, 30 min. bei -70 °C inkubiert und für 20 min. bei 20000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und in 10 µl TE aufgenommen.

Zur *in vitro* Transkription wurde 1 µl linearisierte Plasmid-DNA mit 4 µl 5x Transkription Puffer, 2 µl DTT (100 mM), 1 µl (20-40 U) RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 4 µl

rATP, rGTP, rUTP, rCTP –Gemisch (je 2,5 mM), 1 µl T7 RNA Polymerase und 7 µl H<sub>2</sub>O vermischt (20 µl Reaktionsansatz) und 1 Std. bei 37 °C inkubiert.

Zur Reinigung von DNA-Resten wurde der Ansatz mit 1 µl RQ1 RNase-freier DNase vermischt und für 15 min. bei 37 °C inkubiert. Ein weiterer Reinigungsschritt der in vitro RNA erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits mit wiederholtem DNase Verdau. Zur Vorbereitung wurde 1 ml RLT Puffer mit 10 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) gemischt. Zu 15 µl in vitro RNA wurden 85 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O hinzupipettiert und mit 350 µl RTL Puffer gemischt. Nach Zugabe von 250 µl absolutem Ethanol und sorgfältigem Mischen wurde der gesamte Ansatz (700 µl) auf das RNeasy Filterröhrchen pipettiert und bei 8000 x g für 15 sek. zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und das Filterröhrchen in eine neue Sammeltube verbracht. Nach Zugabe von 350 µl RW1 Puffer und erneuter Zentrifugation wurden 80 µl DNase I auf das Filterröhrchen dazupipettiert und für 15 min. bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 350 µl RW1 Puffer hinzupipettiert und bei 8000 x g für 15 sek. zentrifugiert. Darauf erfolgte eine zweimalige Zugabe von 500 µl RPE Puffer und ein Zentrifugationsschritt für 15 sek. bei 8000 x g bzw. 2 min. bei 20000 x g. Nachdem das Filterröhrchen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt wurde, wurden 25 µl nukleasefreies dH<sub>2</sub>O hinzupipettiert und für 1 min. bei 8000 x g zentrifugiert, um die RNA zu eluieren.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte in einem Biophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen dH<sub>2</sub>O als Leerwert. Dazu wurde die RNA in einem Verhältnis von 1 : 50 in dH<sub>2</sub>O verdünnt und die Konzentration mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration [ng/µl]} = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Anhand des Verhältnisses  $OD_{260}/OD_{280}$  wurde auch die Reinheit der RNA überprüft. Werte unter 2 sprachen für eine Verunreinigung mit genomischer DNA oder Proteinen.

Die genaue RNA Kopienanzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{RNA Konz. (g/µl)} \times 6.022 \times 10^{23}}{\text{Transkriptlänge in Nukleotiden} \times 340} = (\text{Kopien/µl})$$

### 3.2.1.11 Herstellung von PCR Positivkontrollen (PK), Standards und Interner Kontrolle (IK)

Für die Herstellung der Positivkontrolle bzw. des Standards der RT-qPCR wurde der IBV Referenzstamm H52 verwendet. Dazu wurde ein 134 bp großes Fragment (Primerpaar qIBf/qIBr) mittels RT-PCR amplifiziert (3.2.1.4.1), geextrahiert (3.2.1.7), in den pGEM-T Vektor kloniert (3.2.1.9) und nach Linearisierung in vitro transkribiert (3.2.1.10). Die Positivkontrolle bzw. der Standard der QX RT-PCR wurde in analoger Weise unter Verwendung des Feldisolats GB 341/06 und des Primerpaares QXf/QXr hergestellt. Die IK

wurde auf Basis des Enhanced Green Fluorescence Proteins konstruiert. Dazu wurde ein 587 bp großes Fragment des EGFP Gens mittels PCR (Primerpaar EGFP14f/EGFP10r) aus dem Vektor pEGFP-N3 amplifiziert und entsprechend obiger Beschreibung in vitro transkribiert hergestellt.

### **3.2.2 Virologische Methoden**

#### **3.2.2.1 Subkultivierung von permanenten VERO Zellen**

Die Subkultivierung von permanenten VERO Zellen wurde im Abstand von 3 - 4 Tagen durchgeführt. Nach Verwerfen des Mediums wurde der Zellrasen zunächst mit Trypsin-Versen-Lösung gewaschen und anschließend für 10 min. mit Trypsin-Versen-Lösung bei 37 °C inkubiert. Nach Ablösung des Zellrasens wurden die Zellen mit Hilfe einer Pipette vereinzelt und im M199 Medium mit 10 % FKS im Verhältnis von 1 : 2 bis 1 : 4 in neue Zellkulturflaschen umgesetzt.

Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml bzw. 0,5 und 0,2 ml Virussuspension beimpft. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit M199 Medium mit 2 % FKS versehen und bis sechs Tage bis Ausbildung eines zytopathogenen Effekts (CPE) inkubiert.

#### **3.2.2.2 Virus Anzucht im embryonierten SPF Hühnerei**

Die Anzucht und Vermehrung von IBV erfolgte unter Verwendung zehn bis zwölf Tage alter embryonierter SPF Hühnereier. 0,2 ml Ausgangsmaterial bzw. Virussuspension wurden in die Allantoishöhle von fünf Eiern inokuliert. Nach der Beimpfung wurden die Eier bei 37 °C weiter bebrütet und täglich geschickt. Am zweiten Tag nach Beimpfung wurden zwei Eier durch Kühlung abgetötet und die Allantoisflüssigkeit (AF) und Chorioallantoismembran (CAM) entnommen. Zur Ausbildung IBV spezifischer Veränderungen, wie Verzweigung und Verkrümmung der Embryonen, wurden die drei verbleibenden Eier bis zum sechsten Tage post Infektion (p.i.) weiter bebrütet, dann abgetötet und geerntet. AF und CAM wurden entnommen und mittels Hämagglutinationstest (HA-Test 3.2.2.4) und Agar-Gel-Präzipitationstests (AGPT 3.2.2.5) näher untersucht.

Das Inokulationsmaterial wurde in Abhängigkeit von der Probeart hergestellt. Tupferproben wurden in 1 ml PBS aufgenommen, friergetaut, homogenisiert und filtriert. 1 g Organmaterial wurde in 5 ml PBS versetzt mit Penicillin/Streptomycin aufgenommen, mit Ultra Turrax homogenisiert und 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Friertauprozessen und einer Zentrifugation für 15 min. bei 3000 x g, wurde der Überstand gewonnen und als Inokulum verwendet.

### 3.2.2.3 Virustitration

Die Bestimmung des IBV Virustiters wurde in Verozellen sowie in embryonierten Hühnereiern durchgeführt.

#### 3.2.2.3.1 Virustitration in Verozellen

Zur Titerbestimmung der Virussuspension wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^0$  bis  $10^{-6}$  in M199 hergestellt und als 0,2 ml Inokulum auf konfluente Verozellen in einer 24 Well Platte in Triplikat wie oben beschrieben gegeben. Die Platten wurden täglich bis zum sechsten Tag nach Infektion auf Ausbildung eines CPEs kontrolliert. Die Zellkultur – Infektiose-Dosis ( $TCID_{50}$ ) wurde nach der Spearman-Kärber Methode (Spearman, 1908; Kärber 1931) berechnet.

$$\text{Titer: } V + 0,5 - n/p = TCID_{50}/0,1 \text{ ml}$$

V : Höchste Verdünnungsreihe mit 100 % CPE

p : Anzahl Parallelbestimmungen

n : Anzahl Proben mit CPE

#### 3.2.2.3.2 Virustitration in embryonierten Hühnereiern

Von der AF aus der Virus Anzucht wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$  in PBS hergestellt und jede Verdünnungsstufe in fünf bebrütete SPF Hühnereier inokuliert (siehe 3.2.2.2). Als Negativkontrolle wurden zwei Eier mit sterilem PBS beimpft. Zur Bestimmung der Ei-Infektiosen-Dosis ( $EID_{50}$ ) wurden die AF von allen Verdünnungsstufen mittels PCR untersucht und der Titer nach Spearman-Kärber Methode analog zur Titration in Verozellen unter Berücksichtigung der PCR positiven Proben berechnet. Die CAMs wurden homogenisiert und im AGPT getestet.

#### 3.2.2.4 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Zum Nachweis der hämagglutinierenden Eigenschaften von IBV wurden 250  $\mu$ l Allantoisflüssigkeit mit 25  $\mu$ l (1 U/ml) Neuraminidase gründlich gemischt und bei 37 °C für 60 min. und anschließend bei 4 °C für 5 min. inkubiert. Drei Volumenteile (VT) Blut von SPF-Hühnern wurden in einer VT Natriumzitratlösung aufgefangen und zur Abtrennung der Erythrozyten 10 min. bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach drei Waschvorgängen in PBS wurde das Erythrozytensediment mit PBS auf eine 1%ige Suspension eingestellt.

Der HA-Test wurde in Anlehnung an die OIE Richtlinien (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Kapitel 2.3.2, 2008) durchgeführt. In einer 96 Well Mikrotiterplatte wurden 25  $\mu$ l PBS in allen Kavitäten vorgelegt. 25  $\mu$ l der vorbehandelten Allantoisflüssigkeit wurden in die erste Kavität einer Reihe pipettiert und mit PBS zu einer

geometrischen Verdünnungsreihe von 1 : 2 bis 1 : 2048 verdünnt. Nach Zugabe von 25 µl PBS in jede Kavität wurden 25 µl 1%ige Erythrozyten Suspension in jede Vertiefung pipettiert. Die Auswertung erfolgte nach 40 min. Inkubation bei 4 °C. Dem HA-Titer entsprach die höchste Verdünnungsstufe, in der die Erythrozyten noch eine vollständige Agglutination zeigten.

### **3.2.2.5 Agar-Gel-Präzipitationstest (AGPT)**

Für die Untersuchung im AGPT zum Nachweis IBV spezifischen Antigens wurde CAM Material in einem Verhältnis von 1 : 5 mit sterilem PBS versetzt, mittels Ultra Turrax homogenisiert und drei Friertau-Prozessen unterzogen.

In eine Petrischale mit 15 ml erstarrtem Agar wurden mit Hilfe eines Stempels ein zentraler und sechs äußere Lochkreise ausgestanzt.

Je 30 µl der zu untersuchenden CAM-Homogenate wurden in die äußeren Lochkreise und 30 µl IBV Serum in den zentralen Lochkreis pipettiert. Nach 24, 48 und 72 Std. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten über einer Lichtquelle ausgewertet. Bei einer positiven Reaktion bildete sich eine sichtbare spezifische Präzipitationslinie zwischen Antigen und Serum.

## **3.2.3 Serologische Methoden**

### **3.2.3.1 Nachweis von Antikörpern im ELISA**

Zum Nachweis von Antikörpern gegen IBV wurde der FlockChek\* IBV Antikörper ELISA entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Serumproben wurden im Verhältnis 1 : 500 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt. Anschließend wurden 100 µl der Positiv- und Negativkontrollen in je zwei Kavitäten und 100 µl der verdünnten Serumproben in je eine Kavität der Testplatte pipettiert. Nach 30minütiger Inkubation wurden die Kavitäten dreimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Im Anschluss wurden in jede Kavität 100 µl der Anti-Huhn : HRPO Konjugatlösung pipettiert und erneut für 30 min. inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dH<sub>2</sub>O folgte die Zugabe von 100 µl TMB-Substratlösung in jede Kavität. Die Reaktion wurde nach 15minütiger Inkubation durch Zugabe von 100 µl Stopplösung in jede Kavität gestoppt. Die optische Dichte wurde bei 650 nm mittels des ELISA-Readers MRX unter Verwendung der xChek Software gemessen und das S/P-Verhältnis und der Titer ermittelt. Proben mit einem S/P-Verhältnis ≤ 0.20 wurden als negativ und Proben mit einem S/P-Verhältnis > 0.20 (Titer > 396) wurden als positiv bewertet.

### **3.3 Tierversuch**

#### **3.3.1 Versuchstiere und Haltung**

Für den Versuch wurden aus SPF-Bruteiern (Intervet/Schering-Plough Animal Health, Niederlande) geschlüpfte Broiler Eintagsküken verwendet. Die Aufstallung erfolgte einstreulos und nach Gruppen getrennt in Isolatoren mit separater Lüftung. Die Be- und Entlüftung sowie die Temperatur wurden automatisch gesteuert. Die Gabe von Futter und Wasser erfolgte ad libitum.

#### **3.3.2 Infektion**

Die Eintagsküken wurden per Zufallsprinzip in 2 Gruppen geteilt und mit nummerierten Flügelmarken gekennzeichnet. Die Kontrollgruppe enthielt 15 Tiere, die Versuchsgruppe 45 Tiere. Die Tiere der Versuchsgruppe wurden am 1. Lebenstag mit 0,2 ml Virussuspension (AF) okulonasal infiziert. Die Infektionsdosis betrug  $10^{5,94}$  EID<sub>50</sub>/ml.

#### **3.3.3 Klinische Erscheinungen**

Die Beobachtung der klinischen Erscheinungen erfolgte mehrmals täglich.

#### **3.3.4 Pathologisch-anatomische Untersuchungen**

Im Versuchsablauf zu sezierende bzw. moribund erkrankte Tiere wurden durch Kopfschlag betäubt und durch Blutentzug aus der Vena jugularis bei gleichzeitiger Blutprobenentnahme getötet. Im Anschluss wurden die Tiere sezieren und pathologisch anatomisch auf makroskopische Veränderungen untersucht. Für die weiteren Untersuchungen wurden Tracheal- und Kloakentupferproben zur Überprüfung der Virusausscheidung sowie Organproben aus Thymus, Lunge, Leber, Niere und Zäkaltonsillen zur Überprüfung der Virusausbreitung entnommen.

#### **3.3.5 Überprüfung der Virusausscheidung**

Zur Überprüfung der Virusausscheidung wurden zusätzlich zu den während der Sektion gewonnenen Tupferproben an zwei Terminen weitere Tracheal- und Kloakentupferproben entnommen. Nach Entnahme wurden die Proben unverzüglich in 500 µl PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -70 °C gelagert. Die Tupfer der Versuchsgruppe wurden als Einzelproben bearbeitet, während die Tupfer der Kontrollgruppe zu jedem Entnahmeterrn entsprechend der Probenart gepoolt wurden. Im weiteren Verlauf wurde zunächst die RNA aus dem Probenmaterial extrahiert (siehe 3.2.1.2.1) und anschließend in der IBV RT-qPCR bei gleichzeitiger Koamplifikation der IK (siehe 3.2.1.4.3) analysiert. Die Zugabe der IK erfolgte bei Durchführung der RT-PCR. Die Analyse der Ct (threshold cycle) - Werte, an dem die Proben den Fluoreszenzschwellenwert überschritten,

---

erlaubte eine grobe Einschätzung der vorliegenden Viruslasten einschließlich eventuell vorliegender mRNA. Je niedriger der Ct-Wert war, desto höher die Viruslast bzw. die Virusausscheidung in der entsprechenden Probe. Ein Teil der Kloakentupferproben wurde darüber hinaus Versuchen zur Virusisolierung im embryonierten SPF Hühnerei unterzogen (siehe 3.2.2.2).

### **3.3.6 Überprüfung der Virusausbreitung**

Zur Überprüfung der Virusausbreitung wurden die während der Sektion entnommenen Organe in analoger Weise zu den Tupferproben mittels IBV RT-qPCR untersucht. Die Extraktion der RNA erfolgte wie unter 3.2.1.2.2 beschrieben. Bei Proben, bei denen eine Inhibition der IK zu beobachten war, wurde die RNA mit dH<sub>2</sub>O in einem Verhältnis von 1 : 10 verdünnt und anschließend erneut in der IBV RT-qPCR untersucht. Um diesen Verdünnungsfaktor bei der anschließenden Analyse der Ct-Werte mit einzubeziehen, wurde der ermittelte Ct-Wert um 3,3 Zyklen erhöht.

### **3.3.7 Untersuchung auf Antikörper gegen IBV**

Zusätzlich zu den bei der Sektion entnommenen Blutproben erfolgten an zwei weiteren Terminen Beprobungen durch Punktion der Vena cutanea ulnaris superficialis. Die gewonnenen Blutproben wurden nachfolgend bei Raumtemperatur gelagert und am nächsten Tag für 10 min. bei 3000 U/min. zur Gewinnung des Serums zentrifugiert. Die Untersuchung auf Antikörper gegen IBV erfolgte im ELISA (3.2.3.1).

## 4. DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

### 4.1 Untersuchungen zum molekularen Nachweis und Differenzierung des Infektiösen Bronchitis Virus (IBV)

#### 4.1.1 Etablierung einer Duplex Real-time RT-PCR (RT-qPCR) zum universellen Nachweis von IBV unter Verwendung einer Internen Kontrolle (IK)

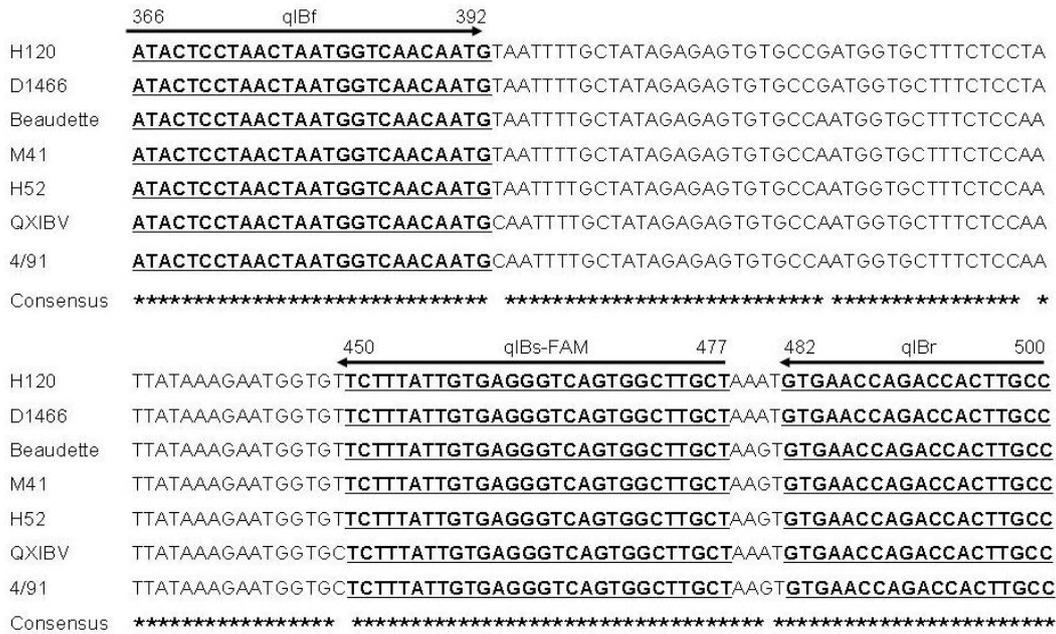
Zum universellen IBV Nachweis wurde ein Duplex RT-qPCR unter Verwendung von TaqMan Sonden etabliert. Durch die Koamplifikation einer IK in diesem System sollte die Gefahr falsch negativer Ergebnisse aufgrund von PCR-Inhibitoren im Probenmaterial ausgeschlossen werden.

##### 4.1.1.1 Auswahl und Optimierung von IBV spezifischen Primern und Sonden

Die Auswahl der IBV spezifischen Primer und einer Sonde erfolgte innerhalb hochkonservierter Bereiche des Matrixprotein Gens (M Gen) auf Grundlage einer Konsensussequenz verschiedener IBV Genotypen und Stämme (Tabelle 9, Abbildung 4). Die gewählten Primer qIBf und qIBr flankierten ein 134 bp großes Fragment, die zwischen den Primern lokalisierte, FAM markierte Sonde qIBs hatte eine Länge von 28 bp. Bei der generellen Überprüfung der Spezifität von Primern und Sonden mittels BLAST-Analyse wurden mit Ausnahme des Puten Coronavirus (TCoV) nur für verschiedene IBV Stämme ausreichende Homologien festgestellt.

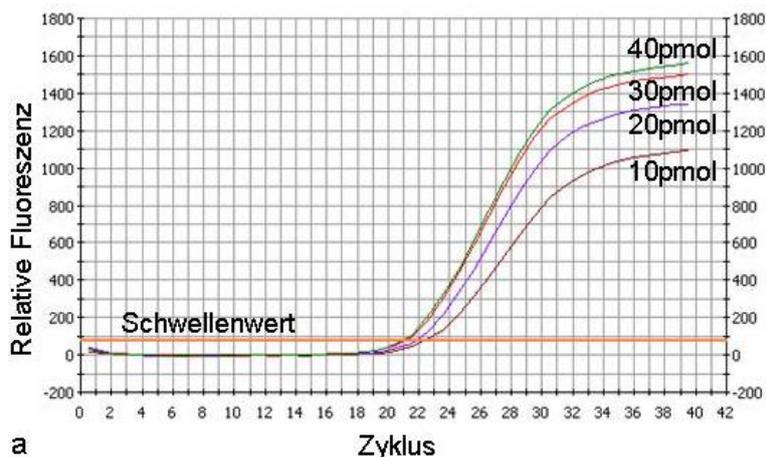
**Tabelle 9: Zur Primerauswahl herangezogene Sequenzen**

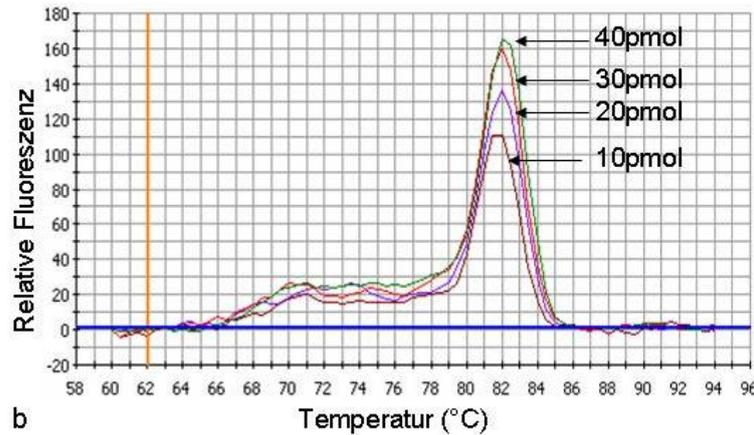
IBV Genotyp	IBV Stamm	Genbank Accession-Nummer	Referenz
Massachusetts	H52	AF286185	Brooks et al., 2004
	H120	AY028295	nicht veröffentlicht
	M41	DQ834384	nicht veröffentlicht
	Beaudette	NC001451	Boursnell et al., 1984
4/91	4/91	GQ227602	nicht veröffentlicht
D1466	D1466	AF203004	Lee und Jackwood, 2000
QX	QX	AF221667	nicht veröffentlicht



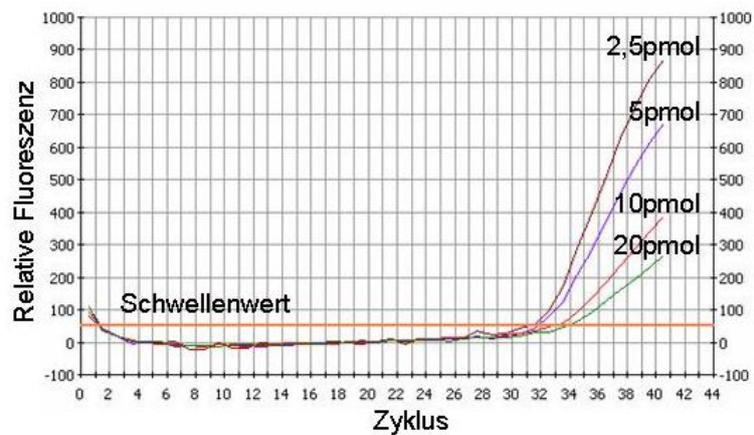
**Abbildung 4: Sequenzvergleich innerhalb des M Gens von sieben verschiedenen IBV Genotypen/Stämmen mit den entsprechend gewählten Primer und Sonden Positionen. Fett und unterstrichen gedruckte Buchstaben bezeichnen die Primer- und Sondenbereiche, Sterne konservierte Nukleotidpositionen, Pfeile Primer und Sonden Orientierung. Die Nummerierung bezieht sich auf die Nukleotidsequenz von IBV H52 (AF286185).**

Zur Optimierung der RT-qPCR wurde der *in vitro* synthetisierte RNA Standard IBV H52 verwendet. Um eine möglichst effiziente Amplifikation zu ermöglichen, wurden verschiedene Primer und Sonden Mengen in einem Uniplex Ansatz überprüft. Dazu wurden in einem ersten Schritt verschiedene Primermengen (10 , 20 , 30 und 40 pmol pro Reaktion) in einer SYBRGreen basierten RT-PCR ausgetestet. Als geeignetste Menge wurden 30 pmol je Primer ausgewählt (Abbildung 5 a, b). Unter Beibehaltung dieser Menge wurden anschließend verschiedene Sondenmengen (2, 5, 10 und 20 pmol) untersucht. Als optimale Sondenmenge wurden 5 pmol pro Reaktion in der TaqMan Sonden basierten RT-PCR ausgewählt (Abbildung 6, Tabelle 10).





**Abbildung 5: Austestung verschiedener Primermengen im SYBR Green-Verfahren. a) Amplifikationskurve, b) Schmelzkurve.**



**Abbildung 6: Austestung verschiedener Sondenmengen bei konstantem Primergehalt von 30 pmol**

#### 4.1.1.2 Konstruktion und Etablierung der Internen Kontrolle (IK)

Die Konstruktion der IK erfolgte in Anlehnung an Hoffmann et al. (2006) auf Basis einer EGFP *in vitro* synthetisierten RNA. Zunächst wurde ein 587 bp großes Fragment des EGFP Gens unter Verwendung des Primerpaares EGFP-14F/EGFP10R mittels PCR aus dem Vektor pEGFP-N3 amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert. Nach Linearisierung der Vektor-DNA erfolgte die *in vitro* Transkription unter Verwendung der T7 RNA Polymerase (Abbildung 7). Die derart synthetisierte EGFP *in vitro* RNA wurde im Weiteren als heterologe IK in der Duplex RT-qPCR eingesetzt. Ihre Detektion erfolgte unter Verwendung der EGFP spezifischen Primer EGFP12f und EGFP10r, die ein 374 bp großes Fragment flankierten, und einer Cy5 markierten EGFP spezifische Sonde. Um einen negativen Einfluss der IK Amplifikation auf die IBV Amplifikation zu vermeiden, wurden die nachfolgenden Untersuchungen mit jeweils 12,5 pmol EGFP Primer, 2,5 pmol EGFP Sonde und einer EGFP Kopienzahl von  $10^4$  pro Reaktion durchgeführt (Tabelle 10).

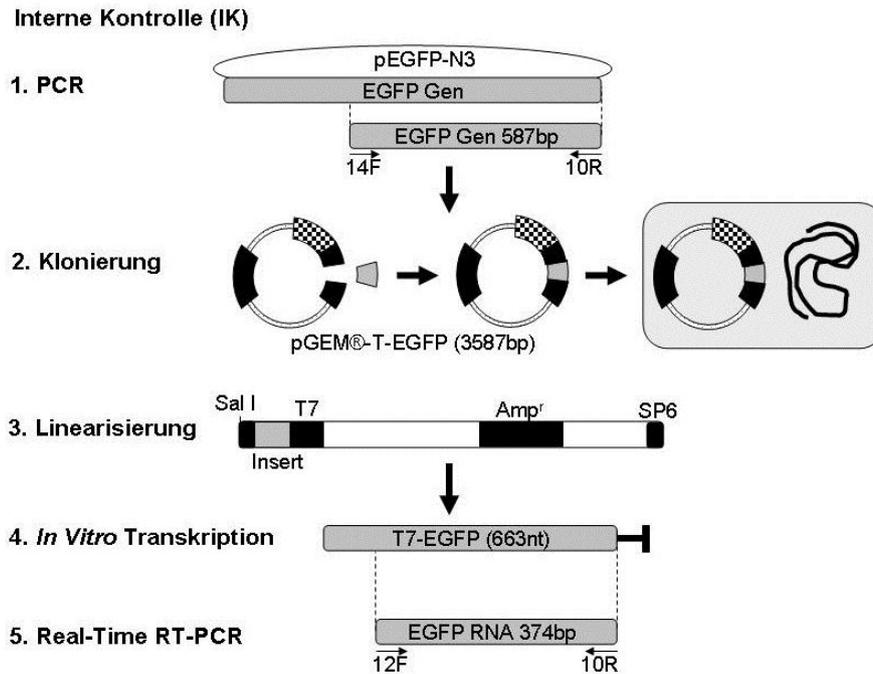


Abbildung 7: Schematische Darstellung der IK Konstruktion

Tabelle 10: Anpassung der Amplifikationsbedingungen für die Duplex RT-qPCR

Nachweis	Amplifikat	Primermenge pro Reaktion	Sondenmenge pro Reaktion	RNA-Kopienzahl pro Reaktion
IBV	134 bp	30 pmol	5 pmol	-
EGFP	374 bp	12,5 pmol	2,5 pmol	10 <sup>4</sup>

#### 4.1.1.3 Bestimmung der Sensitivität

Die Bestimmung der Nachweisgrenze bzw. der analytischen Sensitivität sowie der Effizienz des IBV Nachweises erfolgte vergleichend sowohl im Uniplex (ohne IK) als auch im Duplex Ansatz (mit IK) unter Verwendung des *in vitro* synthetisierten RNA Standards IBV H52. Dabei zeigte sich bei Untersuchung einer dekadischen Verdünnungsreihe mit 10<sup>7</sup> bis 10<sup>0</sup> Kopien pro Reaktion im Uniplex Ansatz eine IBV Nachweisgrenze von 10<sup>2</sup> Kopien pro Reaktion. Die Amplifikationseffizienz betrug 94 % (Abbildungen 8 a, b). Für die Untersuchung im Duplex Ansatz wurden die einzelnen Verdünnungsstufen mit ca. 10<sup>5</sup> Kopien der IK versetzt. Mit 10<sup>2</sup> Kopien pro Reaktion wurde das gleiche Detektionslimit des IBV Nachweises bei einer Amplifikationseffizienz von 98,4 % (Abbildung 9 a, c) nachgewiesen. In nahezu allen Verdünnungsstufen konnte die IK amplifiziert werden. Eine Hemmung ihrer Amplifikation wurde lediglich in den zwei Stufen mit den höchsten IBV Kopienzahlen festgestellt (Abbildung 9 b). Zur genaueren Ermittlung der Nachweisgrenze wurde der RNA Standard darüber hinaus in einer Verdünnungsreihe von 100 bis 10 Kopien pro Reaktion untersucht. Dabei ergab sich sowohl im Uniplex als auch im Duplex Ansatz nach Versetzen der Verdünnungsstufen mit der IK eine Nachweisgrenze von 20 Kopien pro Reaktion (Tabelle 11).

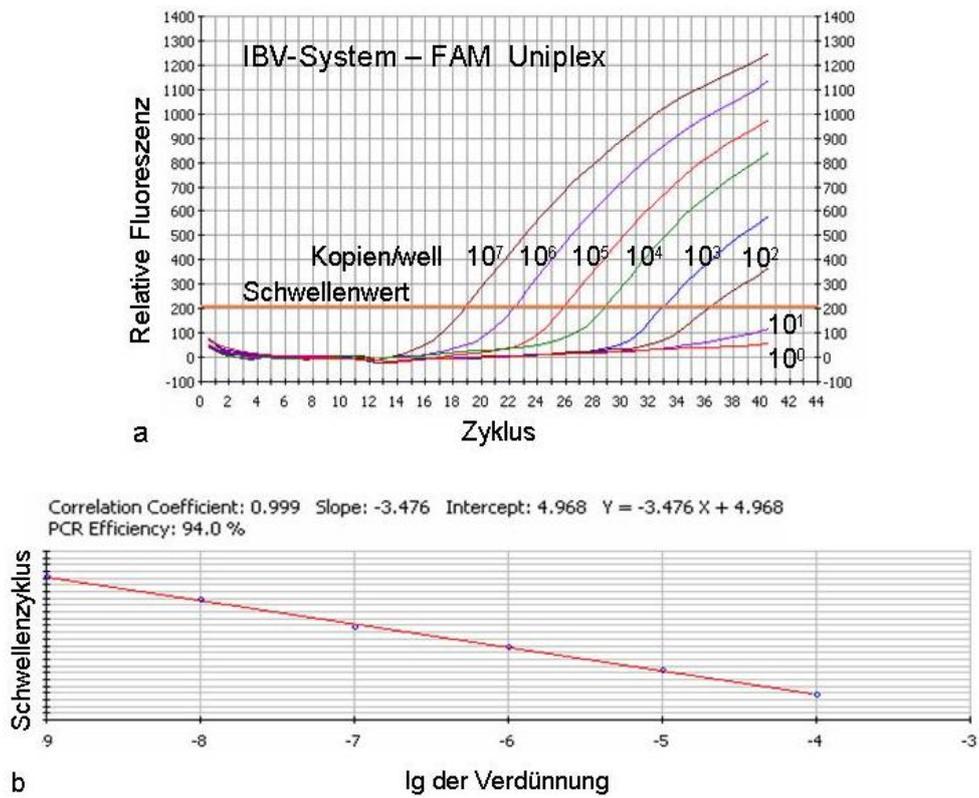
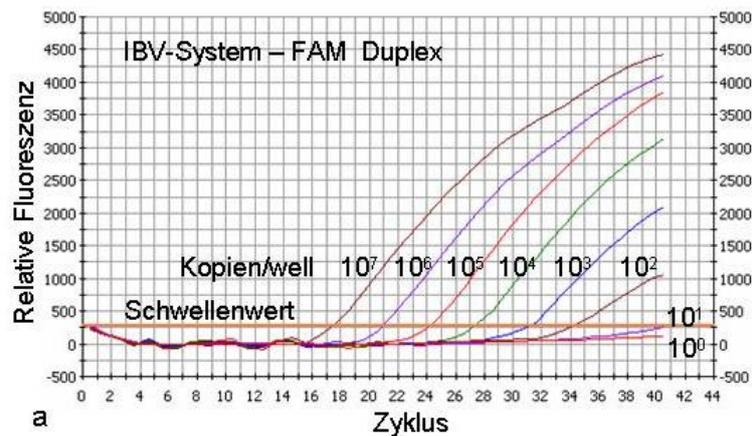


Abbildung 8: Überprüfung der Sensitivität der RT-qPCR im Uniplex Ansatz. a) Amplifikations-kurven der Verdünnungsreihe des IBV H52 RNA Standards, b) dazugehörige Eichgerade zur Ermittlung der Amplifikationseffizienz



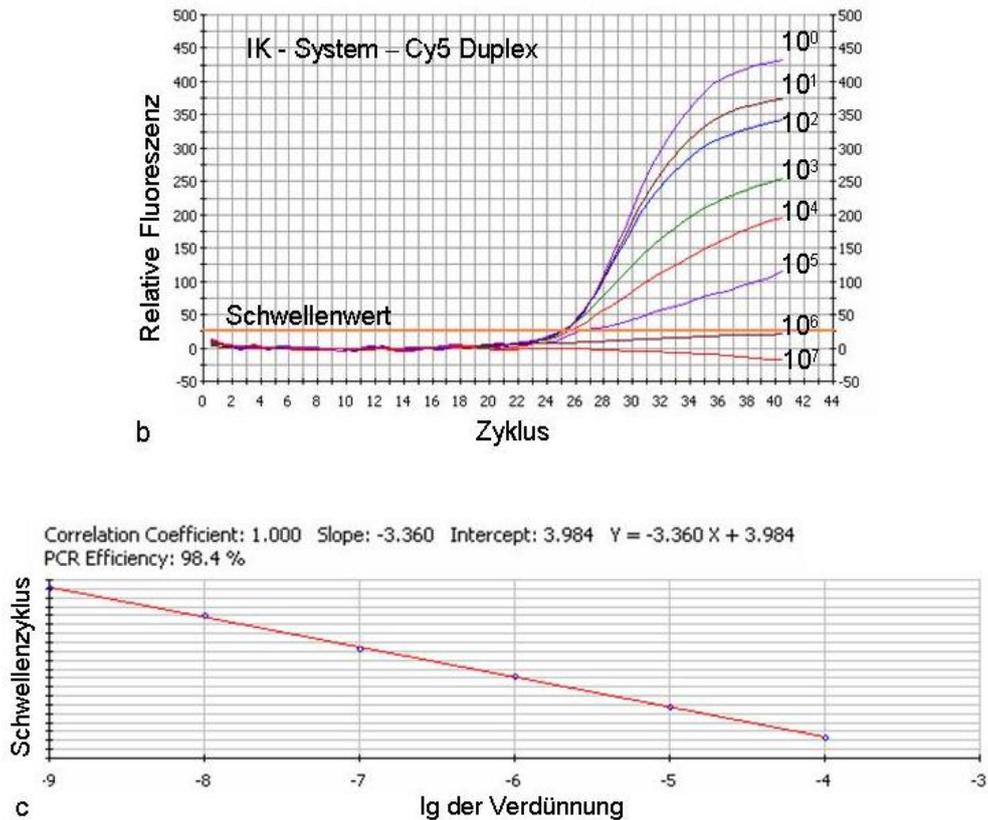


Abbildung 9: Bestimmung der Sensitivität der RT-qPCR im Duplex Ansatz. a) IBV Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe des IBV H52 RNA-Standards, b) Amplifikationskurven der IK, c) IBV Eichgerade zur Ermittlung der Amplifikationseffizienz

Tabelle 11: Nachweisgrenze der RT-qPCR im Uniplex sowie im Duplex Ansatz

IBV Kopien / Reaktion	IBV Nachweis	
	Uniplex	Duplex*
100	+	+
80	+	+
60	+	+
40	+	+
20	+	+
10	-	-

\*Für die Untersuchung im Duplex Ansatz wurden die einzelnen Verdünnungsstufen mit  $10^5$  Kopien der IK versetzt.

Die Sensitivität der Duplex RT-qPCR wurde darüber hinaus auch anhand der Untersuchung von Zellkulturmaterial unter Verwendung des zelladaptierten Stamms IBV Beaudette überprüft. Die Titration auf Vero Zellen ergab einen Virustiter von  $10^{5.2}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Bei der anschließenden Untersuchung einer Verdünnungsreihe der Virus-RNA wurde eine Nachweisgrenze von  $10^{-2.2}$  TCID<sub>50</sub> pro Reaktion ermittelt.

#### 4.1.1.4 Überprüfung der Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität der Duplex RT-qPCR wurden alle zu untersuchenden Proben mit der IK versetzt. In einem ersten Schritt wurde die RNA bzw. DNA von neun verschiedenen viralen bzw. bakteriellen Erregern respiratorischer Erkrankungen (AIV, AMPV Subtyp A und B, ARV, FAdV, FPV, ILTV, NDV, ORT und MG) untersucht. Dabei wurden in allen Fällen negative Ergebnisse erzielt (Abbildung 10 a). Darüber hinaus verlief die Untersuchung von 26 Tupferproben von SPF-Hühnern, zusammengefasst zu sechs Pools, ebenfalls negativ (Abbildung 11 a). Die IK konnte in allen Fällen detektiert werden (Abbildung 10 b, 11 b). Das TCoV stand für die praktische Überprüfung nicht zur Verfügung.

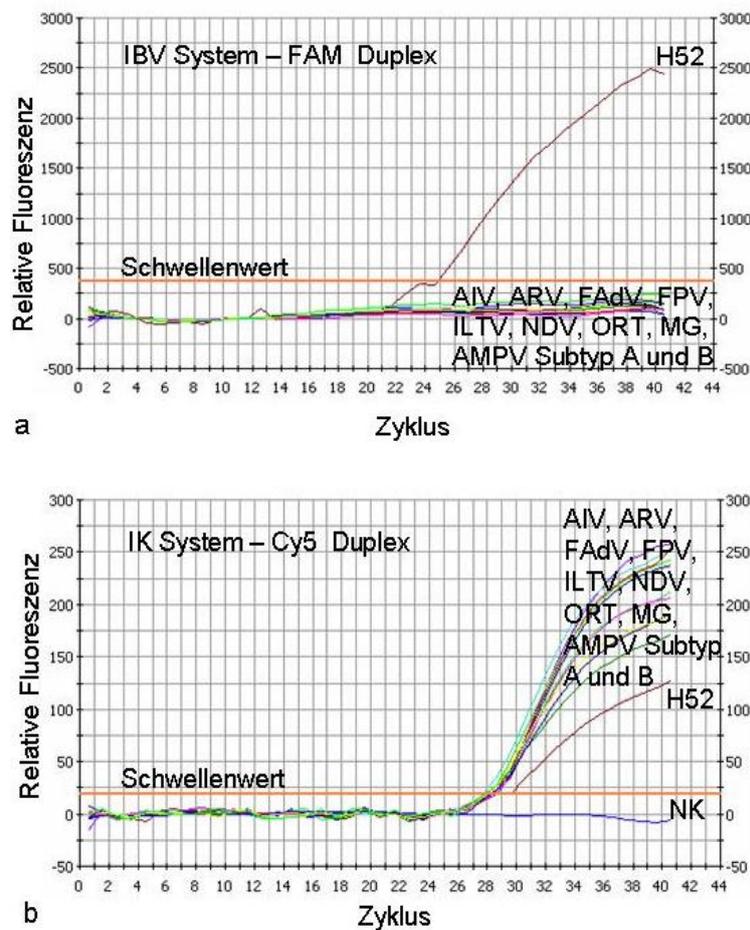


Abbildung 10: Überprüfung der Spezifität der Duplex RT-qPCR anhand weiterer respiratorischer Pathogene. a) IBV Amplifikationskurven, b) IK Amplifikationskurven  
 AIV - Aviäres Influenza Virus, ARV – Aviäres Reovirus, NDV - Newcastle Disease Virus, AMPV – Aviäres Metapneumovirus, ILTV - Infektiöses Laryngotracheitis Virus, FAdV – Fowl adenovirus, FPV Hühnerpockenvirus, ORT - Ornithobakterium rhinotracheale, MG - Mycoplasma gallisepticum.

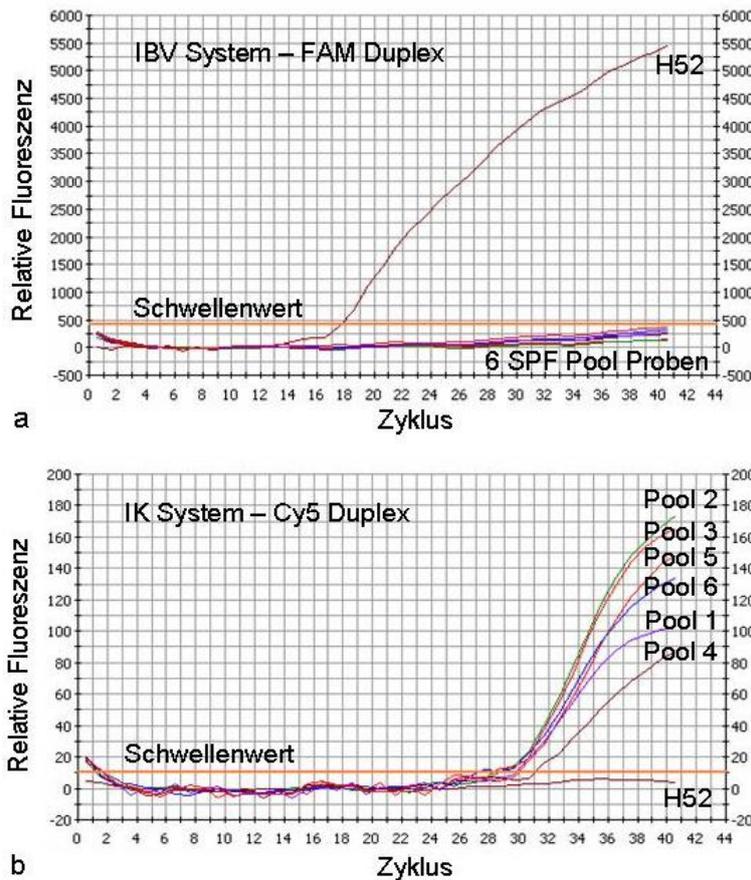
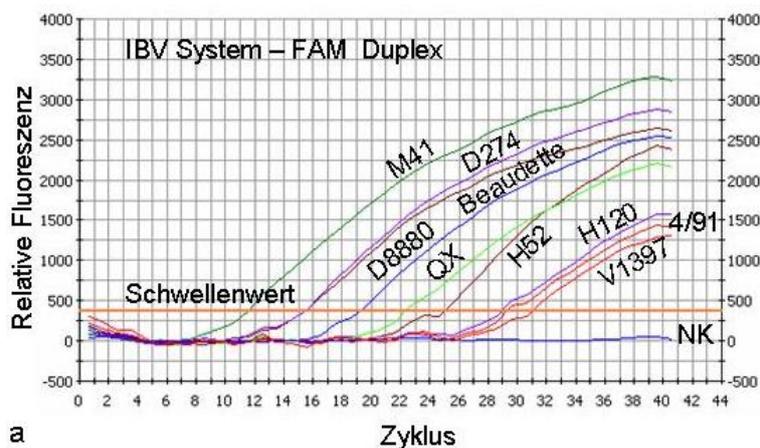
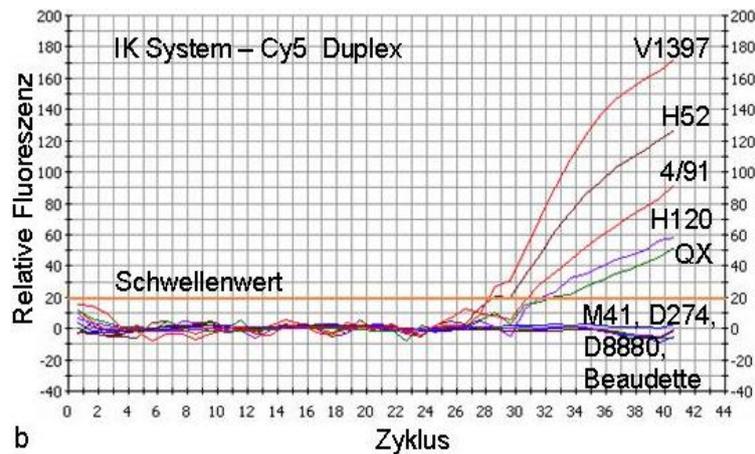


Abbildung 11: Überprüfung der Spezifität der Duplex RT-qPCR anhand von SPF Tupferproben. H52: IBV Positivkontrolle; a) IBV Amplifikationskurve, b) IK Amplifikationskurve

Demgegenüber konnten neun verschiedene IBV Genotypen und Stämme (H120, H52, Beaudette, M41, 4/91, D274, D8880, V1397 und QX) alle sicher detektiert werden (Abbildung 12 a). Der Nachweis der IK in diesen Proben war abhängig von dem Ct-Wert des IBV Nachweises. In Proben mit einem niedrigen IBV Ct-Wert (Beaudette, M41, D8880 und D274) war die IK aufgrund der starken IBV Amplifikation gehemmt (Abbildung 12 b).





**Abbildung 12 : Überprüfung der Spezifität der Duplex RT-qPCR anhand verschiedener IBV Genotypen und Stämme. a) IBV Amplifikationskurven b) IK Amplifikationskurven**

#### 4.1.1.5 Anwendung der Duplex RT-qPCR zur Untersuchung von Feldproben

Um zu ermitteln, ob die Duplex RT-qPCR auch bei Feldproben erfolgreich angewandt werden konnte, wurden 48 Tupferproben aus diagnostischen Einsendungen vor Extraktion der RNA mit  $10^5$  Kopien der IK versetzt. In 36 von 48 untersuchten Proben konnte IBV spezifische RNA detektiert werden. In 27 dieser positiven Proben in einem IBV Ct-Wert Bereich von 25 bis 36 verlief der IK Nachweis ebenfalls positiv. In neun Proben mit einem IBV Ct-Wert  $<25$  wurde die IK aufgrund der starken IBV Amplifikation nicht nachgewiesen, was jedoch als tolerabel einzustufen war. In den zwölf IBV negativen Proben konnte in allen Fällen die IK nachgewiesen werden, womit falsch negative Ergebnisse aufgrund von fehlerhafter RNA-Extraktion oder infolge des Vorliegens von Inhibitoren sicher ausgeschlossen werden konnten (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Untersuchung von Feldproben mittels der Duplex RT-qPCR**

	Positiv				Negativ	
IBV	36				12	
	Ct 25 - 36		Ct 17 - 25		Ct $\geq$ 42	
	27		9			
EGFP	+	-	+	-	+	-
	27	0	0	9	12	0

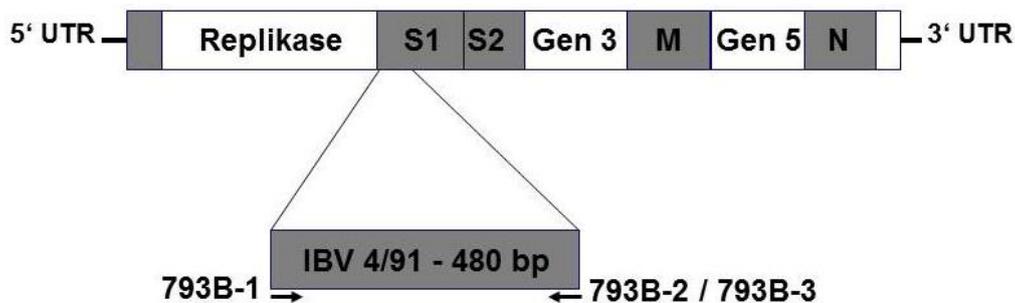
#### 4.1.2 Untersuchungen zur molekularen Differenzierung von IBV

Zur Differenzierung von IBV Genotypen und Stämmen wurden sowohl zwei typspezifische RT-PCRs zum Nachweis der Genotypen IBV 4/91 und IBV QX als auch verschiedene RT-PCR Verfahren kombiniert mit der Restriktionsenzymanalyse (REA) und Sequenzierung verwandt.

##### 4.1.2.1 Differenzierung mittels subtypspezifischer RT-PCR Verfahren

###### 4.1.2.1.1 IBV 4/91 spezifische RT-PCR

Der Nachweis von IBV 4/91 erfolgte mittels einer konventionellen RT-PCR unter Verwendung der veröffentlichten Primer 793B1, B2 und B3, die ein 480 bp großes Fragment innerhalb des für die S1 Untereinheit des S Proteins kodierenden Genomabschnittes (S1 Gen) amplifizierten (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Schematische Lage der IBV 4/91 spezifischen Primer innerhalb des S1 Gens**

Eine Überprüfung der Spezifität der verwendeten Primer zeigte, dass das erwartete Amplifikat von 480 bp nur für IBV 4/91 nachgewiesen werden konnte. Die Untersuchung aller weiteren IBV Stämme verlief negativ (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Überprüfung der Spezifität der IBV 4/91 spezifischen RT-PCR. M: 100 bp Größenmarker, Spur 1: H120, Spur 2: H52, Spur 3: M41, Spur 4: Beaudette, Spur 5: D8880, Spur 6: D274, Spur 7: 4/91, Spur 8: QX**

#### 4.1.2.1.2 Etablierung der IBV QX spezifischen RT-PCR

Zum Nachweis von IBV QX wurde eine konventionelle RT-PCR auf Basis des für die S1 Untereinheit des S Proteins kodierenden Genomabschnittes (S1 Gen) entwickelt.

##### 4.1.2.1.2.1 Auswahl der IBV QX spezifischen Primer

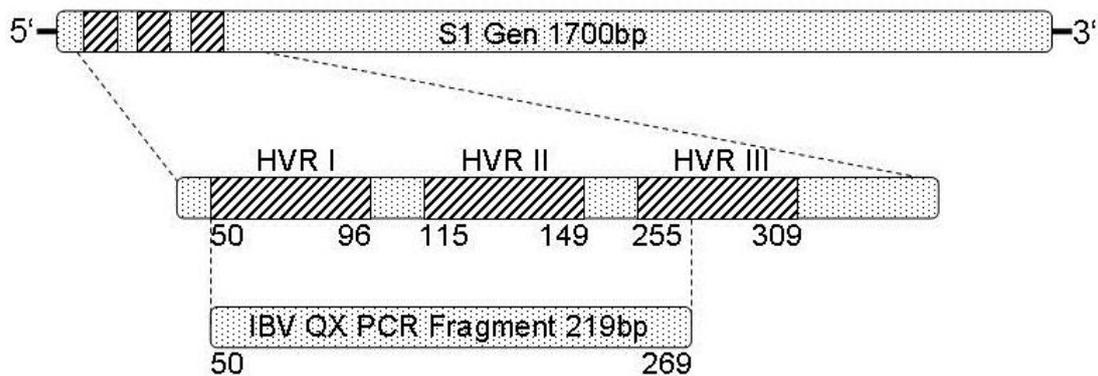
Die Auswahl der IBV QX spezifischen Primer erfolgte auf Grundlage eines Sequenzvergleiches des S1 Gens verschiedener IBV Stämme. Dabei wurden die Primer QXf und QXr innerhalb variabler bzw. hypervariabler Abschnitte des S1 Gens so gewählt, dass sie eine alleinige Hybridisierung mit IBV QX erlaubten (Tabelle 13; Abbildung 15). Ein Vergleich verschiedener veröffentlichter Sequenzen von IBV QX ergab dagegen, dass die ausgewählten Primerregionen, die einen Bereich von 219 bp flankierten, innerhalb dieses Genotyps hoch konserviert waren (Abbildung 15). Die schematische Lage der Primer innerhalb des S1 Gens ist in Abbildung 16 wiedergegeben.

**Tabelle 13: Zur Primerauswahl und nachfolgende Untersuchungen herangezogene Sequenzen**

IBV Genotyp	IBV Stamm	Genbank Accession-Nummer	Referenz
QX	L-1449K	EF079115	Worthington et al., 2008
	L-1449T	EF079116	Worthington et al., 2008
	L-1450L	EF079117	Worthington et al., 2008
	L-1450T	EF079118	Worthington et al., 2008
	L-1148	DQ431199	Worthington et al., 2008
Massachusetts	H120	M21970	Kusters et al., 1989
	H52	AF352315	nicht veröffentlicht
	M41	M21883	Niesters et al., 1986
	Beaudette	M95169	Bourns und Brown, 1984
	4/91	AF093794	Callison et al., 2001
	D274	X15832	Jordi et al., 1989
	B1648	X87238	Shaw et al., 1996
	D1466	M21971	Kusters et al., 1989
	V1397	M21968	Kusters et al., 1989
	Italy-02	AJ457137	Bochkov et al., 2007

	1	QXf	73
L-1449T	<b><u>TGCAAATTTGTTTGATTCTG</u></b> ATAATAATTATGTGTACTACTACCAAAGTGCTTTTACACCGCCAAATGGGTGG		
L-1450L	.....		
L-1148	.....		
L-1450T	.....		
L-1449K	.....		
H120	...TGC...A...--A...G.TC...C.....C..C...A..TG...T...		
H52	...TGT...A...--A...G.TC...C.....C..C...A..TG...T...		
Beaudette	...TGT...A...--A...G.TC...C..T.....C..C...A..T.G...T...		
M41	...TGC...A...--A...G.TC...C..T.....C.....A..T...T...		
B1648	...T.T...CA.....G.....AAT..T.....C..C...A..CTCA.....		
D274	...C...C.....G---A...TC...C.....C..C...A..TG...T...		
Italy-02	...CCT...A.A...---A..GG..C...C..T.....G.....C..C...A..TTT...T...		
4/91	...TTTGC.T.A...---A.A...C...C..T.....C.....G..TGGT.C.A..T...		
D1466	...TG.A..A.AG.--A.G.G.A...CACA...T...G...CAG...G...T...C...		
V1397	...TG.A..A.AG.--A.G.G.A...CACA...T...G...CAG...T...C...		
	74		146
L-1449T	CACCTACAAGGAGGTGCTTATGCAGTAGTCAATTCTACTAATTATACTAATAATGCCGGTTCTGCACATGAGT		
L-1450L	.....		
L-1148	.....		
L-1450T	.....		
L-1449K	.....		
H120	..TT...T..G...G...G...T..T..AT.T...G.G.AT.....A..C...T..TC..G..		
H52	..TT...T..G...G...G...T..T..AT.T...G.G.AT.....A..C...T..TC..G..		
Beaudette	..TT...G.....G.....T..CAT.T...GCG.ATT.....A..C...T..TCA..G..		
M41	..TT...C..G.....G.....T..AT.T...GCG.AT.....A..C...T..C..G..		
B1648	..TT...T..G.....CA...G...GT...G.A.A.....A...AT...CAACA..		
D274	..TT...T..T.....A.....A...GT.TT...CGG.AT...G.....A..CA---GAC..G..		
Italy-02	..TG.T..T...C..G.....T...GTA.G...CGG.GTA.GC.....GCACGG---ACCAGC..		
4/91	..T...T..G.....AT..GGT.TT...GGA..C..C...A.TCAG..T.TC...T..		
D1466	..TAA...T..T..A..C...CTT...AC...GAA...G.CATAT.CT...GT.TG...-----		
V1397	..TAA...T..T..A..C...CTT...T...GAA...G..ATAT.CT..G...T..CG...-----		
	147	QXr	219
L-1449T	GCACTGTTGGTGTTATTAAGGATGTTTATAATCAAAGTGTGGCTTCCATAGCT <b><u>ATGACAGCACC-TCTTCAGG</u></b>		
L-1450L	.....		
L-1148	.....		
L-1450T	.....		
L-1449K	.....		
H120	.T.....A.....C.T.G..G.CG.GT.GTT.A..CTT...T.....G...G..A.....		
H52	.T.....A.....C.T.G..G.CG.GT.GTT.A..CTT...T.....G...G..A.....		
Beaudette	.T.....A.....C.T.G..G.CG.GT.GTT.A..CTT...T.....G...G..A.....		
M41	.T.T.....AC...C.T.G..G.CG.GT.GTT.A..CTT...T.....G...G..A.....		
B1648	.....CA.....T.TT..AG.A.A...TTT.C..CTT...TG...C...T...AC.AC...		
D274	.T.....C...C...T.TTGGAG.A.G...TTC...CT...G.G.....TCAAAAT..		
Italy-02	.....C...AC...CTCTTGGAG.A.G...TTT.C..CT...TG...C.....TA...T..		
4/91	.....C...AC.T..T.T..AAGC.....ATTTC..CT...TG...C.....T...AC..G.T..		
D1466	.T.....G...ACA..A..A.GC.GCAT.GTCATT.A..A.AG.G.T...T..T.TGTTA..AAAA.AC.CAT		
V1397	.T.....G...ACA..A..A.GC.GCAT.GTCATT.A..A.AG.G.T...T..T.TGTTA.TAAAA.AC.TAT		

**Abbildung 15: Sequenzvergleich der ausgewählten S1 Genregionen von fünf veröffentlichten IBV QX Sequenzen mit Sequenzen weiterer IBV Genotypen und Stämme. Punkte bezeichnen konservierte Nukleotidpositionen, Striche Deletionen, fett und unterstrichene Buchstaben Primerpositionen**

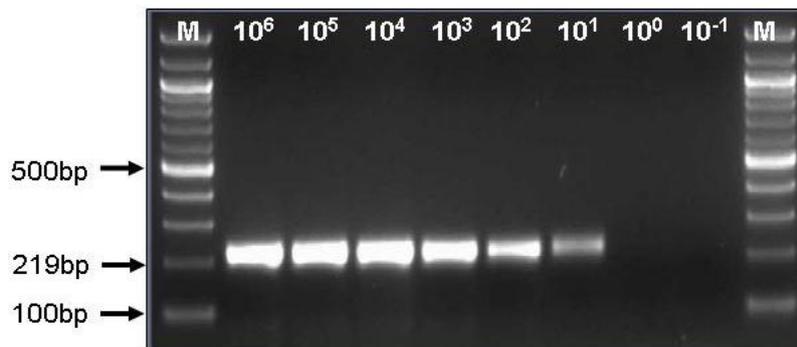


**Abbildung 16:** Schematische Lage der IBV QX spezifischen Primer innerhalb des S1 Gens. Die schraffierten Abschnitte kennzeichnen die hypervariablen Regionen I, II und III. Die markierten Nukleotidpositionen beziehen sich auf die veröffentlichte Sequenz des IBV QX Stammes L-1148.

Um eine möglichst hochspezifische Primerbindung zu gewährleisten, wurde die RT-PCR mit einer Anlagerungstemperatur von 60 °C und unter Zusatz der vom Hersteller mitgelieferten Q-Solution durchgeführt.

#### 4.1.2.1.2.2 Bestimmung der Sensitivität

Die Bestimmung der Nachweisgrenze bzw. der analytischen Sensitivität der IBV QX RT-PCR erfolgte unter Verwendung des *in vitro* transkribierten RNA Standards IBV QX GB341/06. Bei Untersuchung einer dekadischen Verdünnungsreihe mit  $10^6$  bis  $10^{-1}$  Kopien pro Reaktion ergab sich eine Nachweisgrenze von  $10^0$  Kopien pro Reaktion (Abbildung 17).

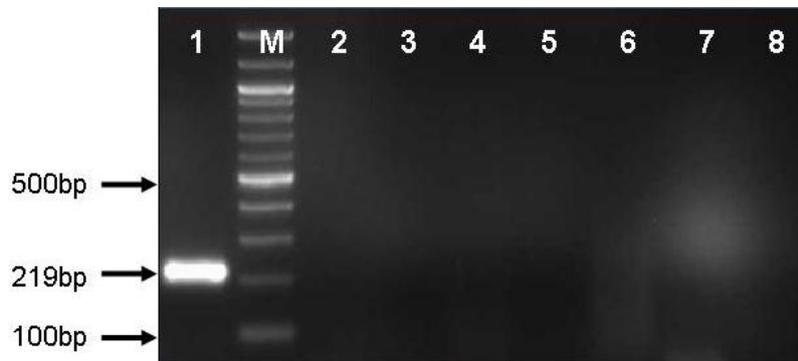


**Abbildung 17:** Bestimmung der Sensitivität der IBV QX spezifischen RT-PCR. M: 100 bp DNA Größenmarker, Spur 2 bis 9: Verdünnungsreihe des RNA-Standards IBV QX GB341/06 mit  $10^6$  bis  $10^{-1}$  Kopien pro Reaktion

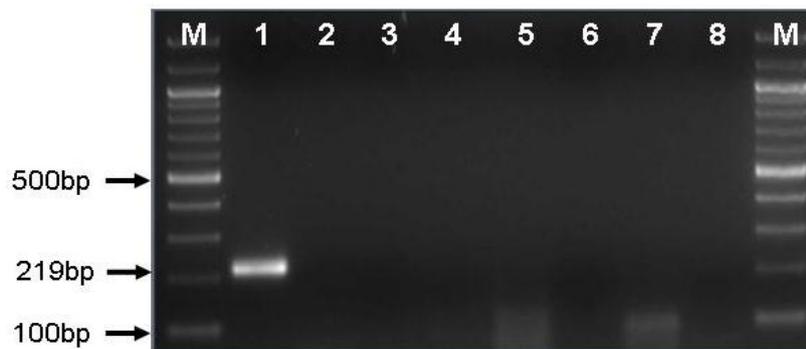
#### 4.1.2.1.2.3 Überprüfung der Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität der IBV QX RT-PCR wurden sieben weitere IBV Genotypen bzw. Stämme getestet. Ein Amplifikat der erwarteten Größen konnte nur bei dem Laborstamm IBV QX GB341/06 nachgewiesen werden, bei allen weiteren IBV Stämmen verlief die Untersuchung negativ (Abbildung 18). Darüber hinaus konnte auch in 26

Tupferproben von SPF-Hühnern, zusammengefasst zu sechs Pools, keine IBV QX spezifische RNA detektiert werden (Abbildung 19).



**Abbildung 18: Überprüfung der Spezifität der IBV QX spezifischen RT-PCR anhand verschiedener IBV Stämme. M: 100 bp DNA Marker, Spur 1: IBV QX GB341/06, Spur 2: H120, Spur 3: H52, Spur 4: M41, Spur 5: Beaudette, Spur 6: 4/91, Spur 7: D274, Spur 8: D8880**



**Abbildung 19: Überprüfung der Spezifität der QX RT-PCR anhand SPF Tupferproben. M: 100 bp DNA Marker, Spur 1: IBV QX GB341/06, Spur 2 bis 7: Poolproben von SPF Tupfern, Spur 8: Negativkontrolle**

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurden zusätzlich die erhaltenen PCR Produkte von vier verschiedenen IBV QX positiven Feldproben (Abbildung 20) einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei zeigte sich in dem analysierten Abschnitt eine 98 % - 99%ige Homologie auf Nukleotidebene zu den englischen QX Stämmen L-1148, L-1449K, L-1449T, L-1450L und L-1450T (Tabelle 14). Zu weiteren IBV Genotypen und Stämmen lagen die ermittelten Homologien in einem Bereich von 55 % bis 75 %.

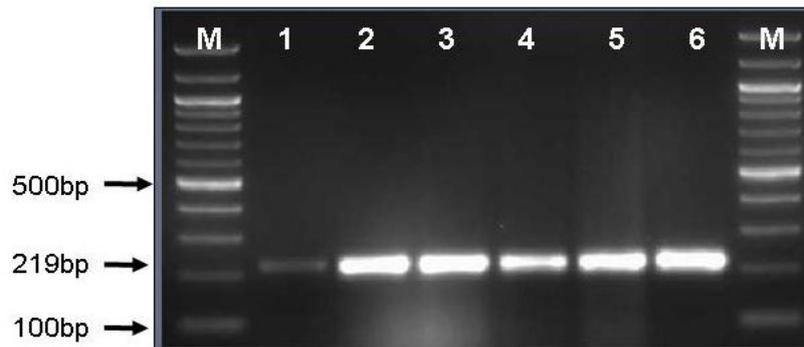


Abbildung 20: QX RT-PCR mit Feldproben. M: 100 bp DNA Marker, Spur 1: GB237/08, Spur 2: GB 492/06, Spur 3: GB 793/07, Spur 4: GB 892/07, Spur 5: 926/06, Spur 6: IBV QX 341/06

Tabelle 14: Vergleich der ermittelten IBV QX Sequenzen mit entsprechenden IBV Genbanksequenzen (Nukleotidhomologie in %, 171 bp innerhalb des S1 Gens)

IBV Genotyp	Feldproben/IBVStamm	341/06	237/08	892/06	926/06
QX	GB 341/06	-	98	98	99
	GB 237/08	98	-	99	99
	GB 892/06	98	99	-	99
	GB 926/06	99	99	99	-
	L-1148 <sup>1</sup>	99	99	99	100
	L-1149K	98	98	98	99
	L-1450T	98	98	98	99
	L-1450L	99	99	99	100
	L-1449T	99	99	99	100
Massachusetts	H120	73	72	72	72
	H52	73	72	72	72
	M41	73	72	72	72
	Beaudette	74	75	75	75
	4/91	70	69	70	70
	D274	70	69	69	69
	B1648	71	71	71	71
	D1466	58	57	57	55
	V1397	55	55	55	56
	Italy-02	66	67	67	67

<sup>1</sup> Zu den Genbank AccessionNummern siehe Tabelle 13

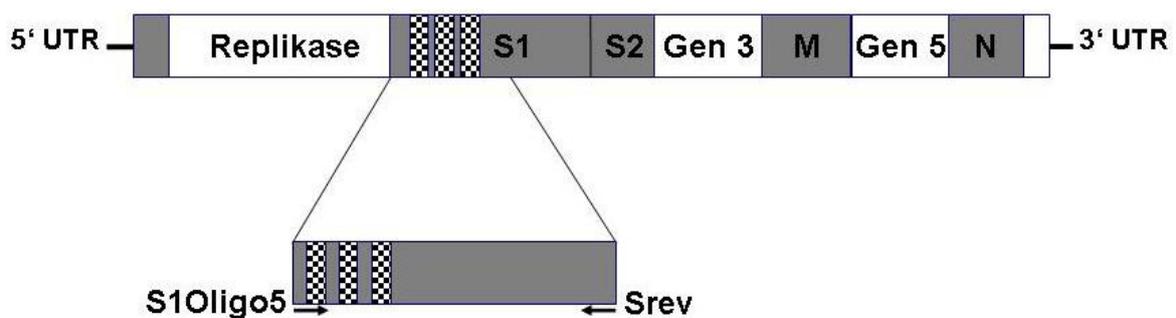
#### 4.1.2.2 Differenzierung mittels verschiedener konventioneller RT-PCR Verfahren in Kombination mit der Restriktionsenzymanalyse (REA) und Sequenzierung

Zur weiteren Differenzierung von IBV Genotypen und Stämmen wurde ein System basierend auf der Restriktionsenzym- und Sequenzanalyse eines S1 Gen Fragmentes

etabliert. Als Grundlage diente dazu eine RT-PCR unter Verwendung von Primern, welche die hypervariable Region im S1 Gen umschlossen, gleichzeitig aber auch eine Amplifikation aller verschiedenen Genotypen bzw. Stämme ermöglichen sollte. Durch eine sich anschließende Restriktionsenzymanalyse (REA) der erhaltenen PCR Produkte sollte die Differenzierung erfolgen. In den Fällen, in denen mittels REA kein Ergebnis zu erzielen war, sollten die PCR Produkte einer Sequenzanalyse unterzogen werden. Sämtliche verwendete Primer des etablierten Systems waren der Literatur entnommen, allerdings unter Erstellung neuer Kombinationen.

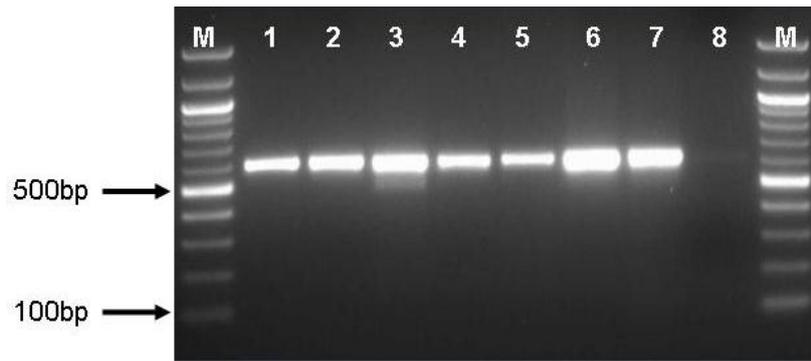
#### 4.1.2.2.1 Differenzierung mittels S1Oligo5/Srev RT-PCR in Kombination mit der REA

Als Grundlage des etablierten Systems diente eine konventionelle RT-PCR unter Verwendung des Primerpaares S1Oligo5/Srev. Beide Primer waren in relativ konservierten Bereichen des S1 Gens lokalisiert, umschlossen aber die hypervariablen Regionen (Abbildung 21).



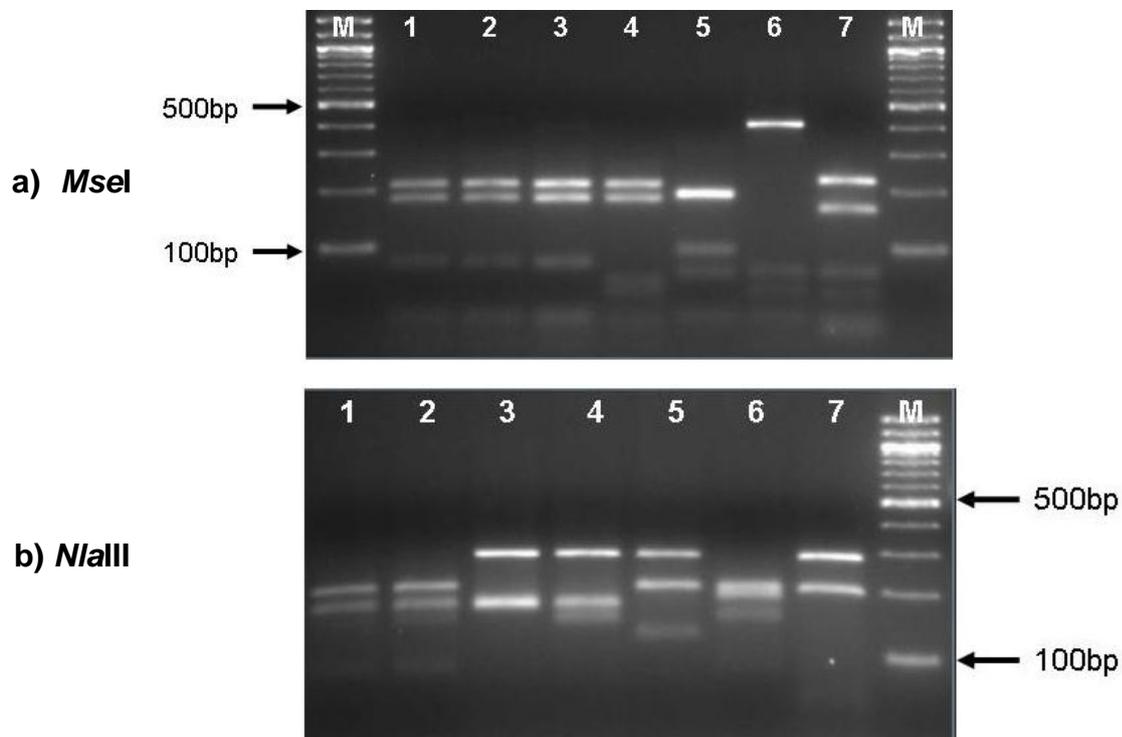
**Abbildung 21: Lokalisation der Primer S1Oligo5 und Srev innerhalb des S1 Gens. Die gestrichelten Bereiche kennzeichnen die hypervariablen Regionen.**

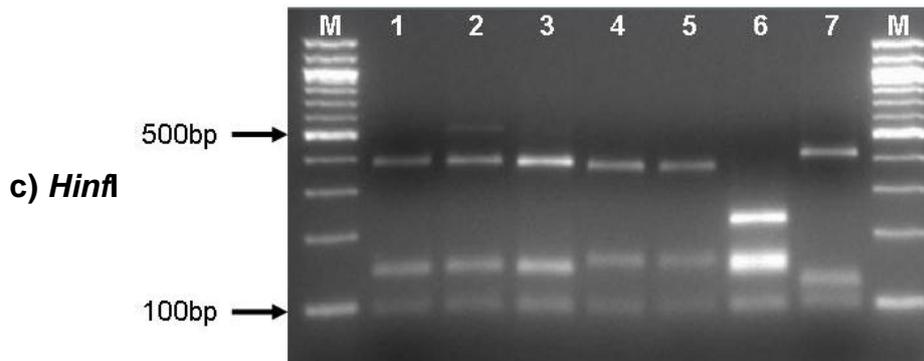
Erste Untersuchungen mit diesem Primerpaar zeigten, dass ein deutliches Amplifikat der erwarteten Größe von 599 bp bei den getesteten IBV Genotypen und Stämmen H120, H52, M41, Beaudette, 4/91, D274 und D8880 nachweisbar war. Bei IBV V1397 war dagegen nur eine sehr schwache und nicht sicher reproduzierbare Bande sichtbar (Abbildung 22). Der Genotyp IBV QX konnte nicht amplifiziert werden.



**Abbildung 22: S1Oligo5/Srev RT-PCR mit verschiedenen IBV Genotypen bzw. Stämmen. M: 100 bp DNA Marker, Spur 1: H120, Spur 2: H52, Spur 3: M41, Spur 4: Beaudette, Spur 5: 4/91, Spur 6: D274, Spur 7: D8880, Spur 8: V1397.**

Alle deutlich sichtbaren Amplifikate wurden im Folgenden einer REA mit den Restriktionsenzymen *MseI*, *NlaIII* und *HinfI* und unterzogen. Mit Ausnahme der IBV Stämme vom Massachusetts Genotyp (H120/H52, M41 und Beaudette) konnten mittels *MseI* Spaltung alle untersuchten Stämme differenziert werden (Abbildung 23 a). Die zusätzliche Verwendung des Enzyms *NlaIII* erlaubte darüber hinaus eine Differenzierung der Stämme M41 und Beaudette vom Stamm H120 bzw. H52 (Abbildung 23 b). Eine Absicherung der Ergebnisse und eine deutliche Unterscheidung der Stämme M41 und Beaudette erlaubte die Spaltung mit *HinfI* (Abbildung 23 c).





**Abbildung 23:** REA der S1Oligo5/Srev RT-PCR Produkte verschiedener IBV Genotypen und Stämme. M: 100bp DNA Marker, Spur 1: H120, Spur 2: H52, Spur 3: M41, Spur 4: Beaudette, Spur 5: 4/91, Spur 6: D274, Spur 7: D8880. a) Spaltung mit *MseI*, b) Spaltung mit *NlaIII*, c) Spaltung mit *HinfI*.

Um die Ergebnisse der REA zu bestätigen, wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Dazu wurde aus den IBV Stämmen H52, M41, 4/91, D274 und D8880 ein etwas größeres PCR Produkt von 707 bp mittels der Primer S1Oligo5 und S1PR2-amplifiziert, kloniert und sequenziert. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen ergab für IBV H52, M41, 4/91 und D274 Nukleotidhomologien zwischen 98 % und 100 % zu den entsprechenden, veröffentlichten Sequenzen aus der Genbank (Tabelle 15). Für den Stamm IBV D8880 war keine korrespondierende Sequenz verfügbar. Ein Vergleich mit dem Stamm B1648, der dem gleichen Genotyp angehört, belegte einen Homologiegrad von 97 %.

**Tabelle 15:** Vergleich der ermittelten IBV Sequenzen (S1Oligo5/S1PR2- PCR Produkt) mit korrespondierenden Genbanksequenzen (Homologie auf Nukleotidebene in %)

Ermittelte IBV Sequenz	Genbanksequenz		Sequenzvergleich	
	Bezeichnung	Accession - Nr.	Größe <sup>1</sup>	Homologie
H52	H52	EU817497	665 bp	98 %
M41	M41	DQ834384	665 bp	99 %
4/91	4/91	AF093793	625 bp	100 %
D274	D274	X15832	668 bp	99 %
D8880	D8880: Nicht verfügbar		-	-
	B1648 <sup>2</sup>	X87238	631 bp	97 %

<sup>1</sup> Größe des verglichenen Sequenzbereiches.

<sup>2</sup> Die Stämme D8880 und B1648 gehören dem gleichen IBV Genotyp an.

Darüber hinaus wurden anhand der ermittelten Sequenzen die zu erwartenden Fragmentgrößen nach Spaltung mit den Restriktionsenzymen *HinfI*, *NlaIII* und *MseI* berechnet (Tabelle 16). Dabei zeigte sich, dass die nach der REA erhaltenen Spaltmuster in allen Fällen mit den errechneten Fragmentgrößen übereinstimmten.

Für die in Europa vorkommenden, aber nicht zur Verfügung stehenden IBV Genotypen Italy-O2 und D1466, konnte nur anhand der entsprechenden veröffentlichten Nukleotidsequenzen überprüft werden, dass diese Genotypen mit dem Primerpaar S1Oligo5/Srev theoretisch amplifizierbar waren. Die auf dieser Grundlage zu erwartenden und rechnerisch ermittelten Fragmentgrößen nach REA sind ebenfalls in Tabelle 16 dargestellt. Auf Basis dieser Berechnung sollten die zwei IBV Genotypen von den übrigen IBV Genotypen und Stämmen differenzierbar sein.

**Tabelle 16: Errechnete Fragmentgrößen der IBV Genotypen/Stämme bei Verwendung der Restriktionsenzyme *MseI*, *NlaIII* und *HinfI* auf Grundlage der ermittelten Sequenzen**

IBV Genotyp	IBV Stamm	Errechnete Fragmentgrößen (bp) <sup>1</sup>		
		<i>MseI</i> <sup>2</sup>	<i>NlaIII</i>	<i>HinfI</i>
Massachusetts	H120	4-31 <sup>3</sup> , <b>175, 206</b>	23, <b>84, 138, 158, 196</b>	<b>93, 136, 370</b>
	H52	4-31, <b>78, 175, 206</b>	23, <b>84, 138, 158, 196</b>	<b>93, 136, 370</b>
	M41	4-31, <b>78, 175, 206</b>	<b>158, 161, 280</b>	<b>93, 136, 370</b>
	Beaudette	4-49, <b>60, 175, 206</b>	23, <b>138, 158, 280</b>	<b>93, 149, 357</b>
4/91		28, 31, <b>95, 184, 186</b>	<b>119, 196, 290</b>	9, <b>93, 149, 354</b>
D274		18- 69, <b>402</b>	7, <b>83, 142, 174, 196</b>	9, <b>93, 136, 149, 215</b>
D8880		9-49, <b>69, 157, 219</b>	26-64, <b>193, 273</b>	<b>93, 121, 397</b>
D1466		<b>109, 135, 172, 177</b>	<b>193, 400</b>	<b>63, 93, 437</b>
Italy02		18-51, <b>75, 192, 215</b>	6, 26, <b>116, 190, 270</b>	<b>93, 515</b>

<sup>1</sup> Bezogen auf das S1Oligo5/Srev PCR Produkt mit einer Größe von 599 bp.

<sup>2</sup> Im Gel deutlich sichtbare Banden sind fettgedruckt.

<sup>3</sup> Größenbereiche nicht sichtbarer Fragmente.

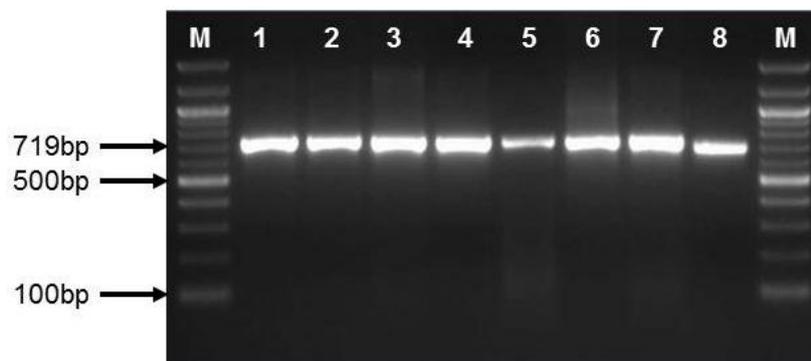
<sup>4</sup> Für die Stämme D1466 (M21971) und Italy-O2 (AJ457137), erfolgte die Berechnung der Fragmentgrößen nur anhand der veröffentlichten Sequenzen.

#### 4.1.2.2 Differenzierung mittels S1Oligo5/S6 RT-PCR in Kombination mit der REA

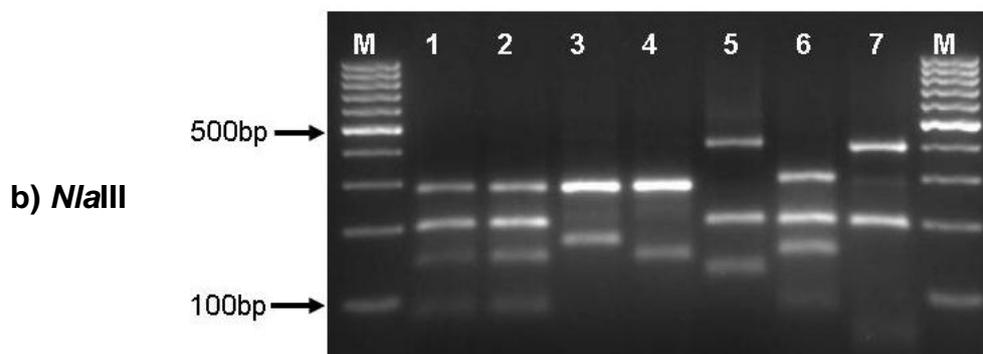
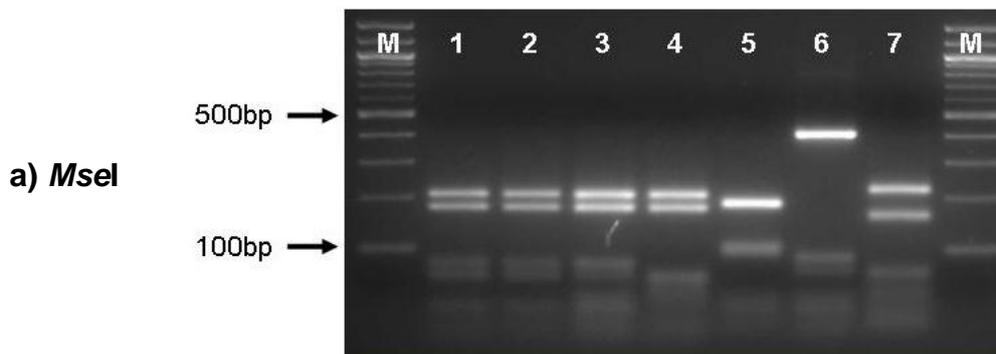
Obwohl mit Ausnahme von IBV QX und V1397 alle untersuchten Genotypen mittels der oben beschriebenen Methode differenziert werden konnten, zeigte die Analyse von zuvor in der universellen IBV RT-qPCR positiv und IBV QX RT-PCR negativ getesteten Feldproben, dass die Primerkombination S1Oligo5/Srev nicht bei allen Proben zu einer Amplifikation führte. Aus diesem Grund wurde das System um den weiteren Primer S6 in Kombination mit S1Oligo5 und ein Satz von nested-Primern in verschiedenen Kombinationen erweitert.

Mittels der Primer S1Oligo5/S6 wurde bei allen untersuchten Genotypen und Stämmen mit Ausnahme von IBV QX ein Amplifikat der erwarteten Größe von 719 bp nachgewiesen (Abbildung 24). Analog zur REA der S1Oligo5/Srev RT-PCR Produkte

konnten unter Verwendung des Enzyms *MseI* die IBV Stämme vom Massachusetts Genotyp von den weiteren Genotypen und Stämmen differenziert werden (Abbildung 25 a). Mittels *NlaIII* war darüber hinaus eine Differenzierung der Stämme H120 bzw. H52 und der weiteren Massachusetts Genotypen möglich (Abbildung 25 b). Eine Absicherung der Ergebnisse und eine deutliche Unterscheidung der Stämme M41 und Beaudette erlaubte die Verwendung des Enzyms *HinfI* (Abbildung 25 c). Ein Vergleich der erhaltenen Spaltmuster mit den rechnerisch ermittelten Fragmentgrößen (Tabelle 17) zeigte in allen Fällen Übereinstimmungen. Für die IBV Genotypen D1466 und Italy-O2 konnte wiederum nur anhand der rechnerisch ermittelten Fragmentgrößen eine theoretische Differenzierbarkeit gezeigt werden.



**Abbildung 24: Untersuchung von verschiedenen IBV Genotypen und Stämmen mittels S1Oligo5/S6 RT-PCR. M: 100 bp DNA Marker, Spur 1: H120, Spur 2: H52, Spur 3: M41, Spur 4: Beaudette, Spur 5: 4/91, Spur 6: D274, Spur 7: D8880, Spur 8: V1397.**



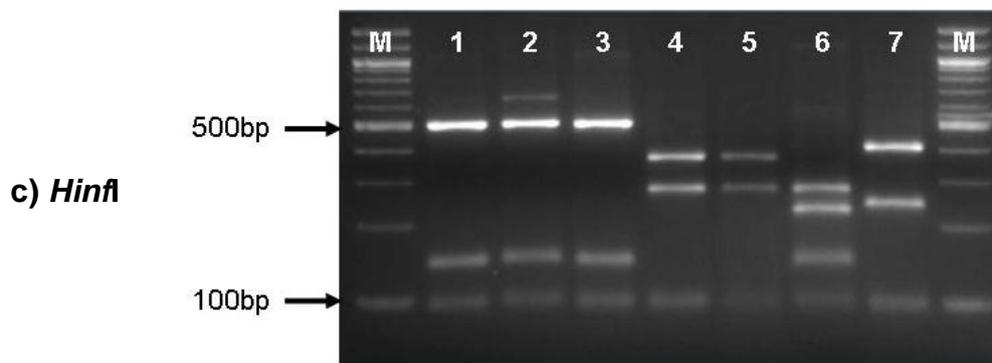


Abbildung 25 : REA der S1Oligo5/S6 RT-PCR Produkte verschiedener IBV Genotypen und Stämme. M: 100 bp DNA Marker, Spur 1: H120, Spur 2: H52, Spur 3: M41, Spur 4: Beaudette, Spur 5: 4/91, Spur 6: D274, Spur 7: D8880. a) Spaltung mit *MseI*, b) Spaltung mit *NlaIII*, c) Spaltung mit *HinfI*.

Tabelle 17: Errechnete Fragmentgrößen der IBV Genotypen / Stämme bei Verwendung der Restriktionsenzyme *MseI*, *NlaIII* und *HinfI* auf Grundlage der ermittelten Sequenzen

IBV Genotyp	IBV Stamm	Errechnete Fragmentgrößen (bp) <sup>1</sup>		
		<i>MseI</i> <sup>2</sup>	<i>NlaIII</i>	<i>HinfI</i>
Massachusetts	H120	4-64 <sup>3</sup> , 69, 78, 175, 206	23, 84, 138, 196, 278	95, 136, 490
	H52	4-64, 69, 78, 175, 206	23, 84, 138, 196, 278	95, 136, 490
	M41	4-64, 69, 78, 175, 206	161, 278, 280	95, 136, 490
	Beaudette	4-49, 60, 64, 175, 206	23, 138, 278, 280	93, 269, 357
4/91		4-42, 64, 95, 184, 186	119, 196, 410	9, 93, 269, 354
D274		18-42, 69, 87, 402	7, 83, 142, 196, 294	9, 93, 136, 215, 269
D8880		9-49, 64, 69, 157, 219	4-55, 64, 193, 389	93, 241, 397
D1466		109, 172, 177, 260	193, 525	63, 93, 562
V1397		69, 177, 212, 260	193, 525	63, 93, 562
Italy02		18-42, 75, 87, 192, 219	6, 26, 116, 194, 390	97, 635

<sup>1</sup> Bezogen auf das S1Oligo5/S6 PCR Produkt mit einer Größe von 719 bp.

<sup>2</sup> Im Gel deutlich sichtbare Banden sind fettgedruckt.

<sup>3</sup> Größenbereiche nicht sichtbarer Fragmente.

<sup>4</sup> Für die Stämme D1466 (M21971), V1397 (M21968) und Italy-O2 (AJ457137) erfolgte die Berechnung der Fragmentgrößen nur anhand der veröffentlichten Sequenzen.

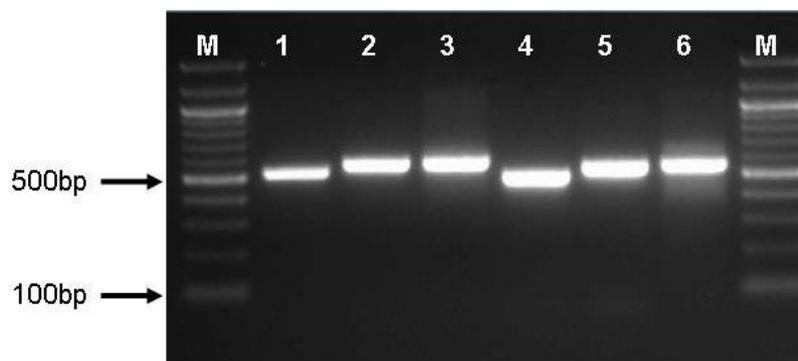
Für IBV positive Feldproben, bei denen auch das Primerpaar S1Oligo5/S6 zu keinem bzw. nur zu einem schwachen Amplifikat führte, wurden an die erste RT-PCR sukzessiv verschiedene nested bzw. seminested PCRs mittels verschiedener Primerkombinationen

angeschlossen. Die Amplifizierung des Stammes IBV H120 ergab bei allen verwendeten Primerkombinationen eine Bande der erwarteten Größe (Tabelle 18, Abbildung 26).

**Tabelle 18: Nested und seminested PCRs mit der entsprechenden Fragmentgröße und verwendete Restriktionsenzyme**

RT-PCR	Sukzessiv durchzuführende nested PCRs		Restriktionsenzyme
	Primerkombination	Erwartete Fragmentgröße	
S1Oligo5/S6	S7/S8	517bp	<i>Hinfl</i> , <i>NlaIII</i> , <i>MseI</i>
	S7/S1PR2-	560bp	
	S7/S6*	572bp	
	S9/S8	487bp	
	S9/S1PR2-	530bp	
	S9/S6*	542bp	

\* Seminested-PCR



**Abbildung 26: Amplifizierung des IBV Stammes H120 mittels nested bzw. seminested PCRs unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen. M: 100 bp DNA Marker, Spur 1: S7/S8, Spur 2: S7/S1PR2, Spur 3: S7/S6, Spur 4: S9/S8, Spur 5: S9/S1PR2, Spur 6: S9/S6.**

Die nachfolgend durchgeführten REAs der jeweilig erhaltenen PCR Produkte mittels der Enzyme, *NlaIII*, *Hinfl* und *MseI* erlaubten analog zu den Ergebnissen der vorherigen Analysen eine Differenzierung der verschiedenen IBV Genotypen und Stämme. Die dabei zu erwartenden Spaltpmuster sind schematisch in Tabelle 19 bis 24 dargestellt.

**Tabelle 19: Darstellung der Spaltmuster und Fragmentgrößen der S7/S8 PCR Produkte der verschiedenen IBV Genotypen und Stämme bei Verwendung der Enzyme *NlaIII*, *HinfI* und *MseI***

IBV Genotyp	Massachusetts				4/91	D274	D8880	D1466	V1397	Italy02	
	H120	H52	M41	Beaudette							
<b><i>NlaIII</i></b>	223				355	239	338	476		335	
	138		161	133 + 138	119	142				116	
	84						83	55 + 64			
	49					49				43	
	23		23					26			26
							7				6
<b><i>HinfI</i></b>	435		303		300	215	346	513		0	
	82		214				186				
							82				
						9		12			
<b><i>MseI</i></b>	206					186	286	263	211		192
			137						137 + 177	177	
	78					77 + 95	87				75 + 87
			69					69		69	
	68									68	
	64				64		64				
				60							
	31		49		31 + 41	31	49				31
	29						26+29				26+29
	18						23				18
	15										
8							9				

Tabelle 20: Darstellung der Spaltmuster und Fragmentgrößen der S7/S1PR2- PCR Produkte der verschiedenen IBV Genotypen und Stämme bei Verwendung der Enzyme *NlaIII*, *HinfI* und *MseI*

IBV Genotyp	Massachusetts				4/91	D274	D8880	D1466	V1397	Italy02	
	H120	H52	M41	Beaudette							
<b><i>NlaIII</i></b>	266				398	282	381	508		378	
	138		161	133 + 138	119	142				116	
	84						83	55 + 64			
	49					49				43	
	23		23					26			26
							7				6
<b><i>HinfI</i></b>	478		303		300		346	545		0	
			257				229				
							215				
	82						82				
						9		12			
<b><i>MseI</i></b>	206					186	286	263	243		192
			137						137 + 177	177	
	78					77 + 95	87				75 + 87
			69				69			69	
	68								68		
	64						64				
	63		60								
			49					49			
			42			41 + 42		42			42
	31					31		26			26 + 31
			21					21 + 23			21
	15 + 18						18				18
8 + 9					9		9 + 9			9	

**Tabelle 21: Darstellung der Spaltmuster und Fragmentgrößen der S7/S6 PCR Produkte der verschiedenen IBV Genotypen und Stämme bei Verwendung der Enzyme *NlaIII*, *HinfI* und *MseI***

IBV Genotyp	Massachusetts				4/91	D274	D8880	D1466	V1397	Italy02
	H120	H52	M41	Beaudette						
<b><i>NlaIII</i></b>	278				410	294	389	520		390
	138		161	138	119	142				116
	84		133			83	55 + 64			
	49				49				43	
	23			23			26			26
						7	4			6
<b><i>HinfI</i></b>	490		303	300		346	0	567	0	
			269			241				
						215				
	82					82				
					9			12		
<b><i>MseI</i></b>	206				186	286	263	255	255	192
				137				137 + 177	177	
	78				77 + 95	87				75 + 87
				69		69			69	
	68								68	
	64						64			
	63			60						
				49			49			
			42		41 + 42	42	42			42
	31				31	31	23 + 26			26 + 31
	21		21 + 21							21 + 21
	15 + 18					18				18
	8						9			

**Tabelle 22: Darstellung der Spaltmuster und Fragmentgrößen der S9/S8 PCR Produkte der verschiedenen IBV Genotypen und Stämme bei Verwendung der Enzyme *NlaIII*, *HinfI* und *MseI***

IBV Genotyp	Massachusetts				4/91	D274	D8880	D1466	V1397	Italy02
	H120	H52	M41	Beaudette						
<b><i>NlaIII</i></b>	223		224		356	240	339	473		335
	138		161	138		142				
			103		119					116
	84					83	55 + 64			
	23			23			26			26
	19						19			13
						7				6
<b><i>HinfI</i></b>	435		273		270		316	0	0	0
				215	216	215 + 215	187			
	52					52				
					9					
<b><i>MseI</i></b>	206				186	256	233	208	208	192
				137				177	177	
	78			94	95	87		107		75 + 87
				69		69			69	
	64				64		64			
				60						
				49	47		49			
	38				41				38	
	31				30 + 31		30			31
	29									29
							23 + 26			26
	15 + 18					18				18
8						9				

**Tabelle 23: Darstellung der Spaltmuster und Fragmentgrößen der S7/S1PR2- PCR Produkte der verschiedenen IBV Genotypen und Stämme bei Verwendung der Enzyme *NlaIII*, *HinfI* und *MseI***

IBV Genotyp	Massachusetts				4/91	D274	D8880	D1466	V1397	Italy02	
	H120	H52	M41	Beaudette							
<b><i>NlaIII</i></b>	266				398	282	381	508		378	
	138		161	138		142					
			103		119					116	
	84					83	55 + 64				
	23			23			26			26	
	19				19					13	
						7				6	
<b><i>HinfI</i></b>	478				273	270		316	0	0	
				257			229				
						215					
	52						52				
					9						
<b><i>MseI</i></b>	206					186	256	233	243		192
				137				177	177		
	78					95	87		107	75 + 87	
				69			69	69		69	
	64					64		64			
	63				60						
				49	47		49				
				42	41 + 42	42	42			42	
	38								38	38	
	31					31	31	26		26 + 31	
				21	21	21	21 + 23			21	
	15 + 18						18			18	
8 + 9						9	9				

**Tabelle 24: Darstellung der Spaltmuster und Fragmentgrößen der S9/S6 PCR Produkte der verschiedenen IBV Genotypen und Stämme bei Verwendung der Enzyme *NlaIII*, *HinfI* und *MseI***

IBV Genotyp	Massachusetts				4/91	D274	D8880	D1466	V1397	Italy02
	H120	H52	M41	Beaudette						
<b><i>NlaIII</i></b>	278				410	294	389	520	520	390
	138		161	138		142				
			103		119					116
	84					83	55 + 64			
	23			23			26			26
	19					19				13
						7	4			6
<b><i>HinfI</i></b>	490						316	0	0	0
				269 + 273	269 + 270	269	241			
						215				
	52					52				
				9						
<b><i>MseI</i></b>	206				186	256	233	255	255	192
				137				177	177	
	78				95	87		107		75 + 87
				69		69			69	
	64						64			
	63			60						
				49	47		49			
			42		41 + 42	42				42
	38								38	
	31				31		23 + 26			26 + 31
	21		21 + 21							21 + 21
	15 + 18					18				18
8						9				

#### 4.1.2.2.3 Anwendung des etablierten Systems auf Feldproben

Insgesamt wurden 63 IBV positive Feldproben aus den Jahren 2006 bis 2009, die zuvor in IBV QX RT-PCR negativ reagiert hatten, auf Basis des entwickelten Systems (Abbildung 27) untersucht.

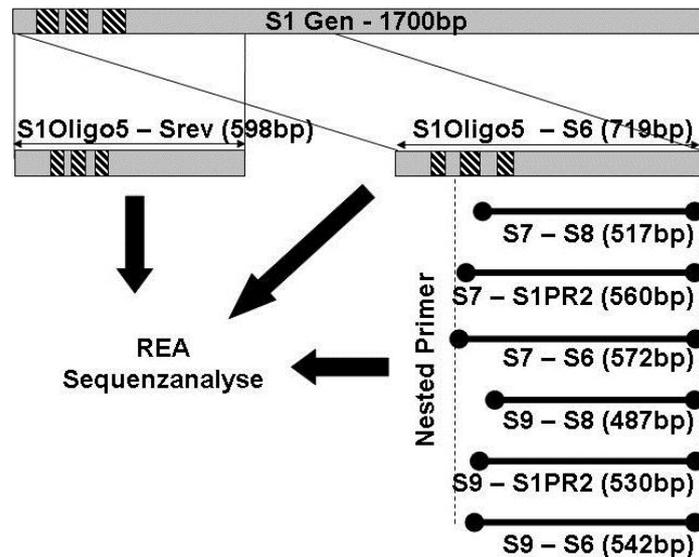


Abbildung 27: Schematische Darstellung des IBV Differenzierungs-Systems.

41 Proben konnten anhand nachfolgender Vorgehensweise differenziert werden. Alle Proben wurden zunächst in der **S1Oligo5/Srev** RT-PCR getestet. Bei 25 Feldproben führte dies zu einem positiven PCR Ergebnis. Die nachfolgende REA erlaubte in 24 Fällen eine Differenzierung, in einem Fall wurde aufgrund nicht zuordenbarer Spaltpmuster eine Sequenzierung zur Differenzierung angeschlossen. In den mittels REA differenzierbaren Proben wurde in 16 Fällen der Stamm IBV H120/H52, in sieben Fällen IBV 4/91 und in einem Fall IBV Massachusetts (M41) nachgewiesen (Tabelle 25). Die sequenzierte Feldprobe entsprach einer IBV 4/91 Variante (Tabelle 26). Die 16 negativen Proben wurden einer weiteren RT-PCR mit dem Primerpaar **S1Oligo5/S6** unterzogen, welche in fünf Fällen positiv war. In vier dieser Feldproben gelang eine Differenzierung mittels REA. Dabei handelt es sich in drei Fällen um IBV M41 und in einem Fall um IBV 4/91. Bei einer weiteren Feldprobe musste wiederum eine Sequenzierung angeschlossen werden. Diese Analyse ergab das Vorliegen eines Virus vom Massachusetts Genotyp (Tabelle 26). Die PCR Produkte der verbleibenden elf Feldproben wurden nachfolgend in den verschiedenen nested PCRs untersucht. Eine Differenzierung mittels REA war bei sechs Proben erfolgreich. Dabei wurden die IBV Genotypen und Stämme H120/H52, 4/91 und D274 nachgewiesen. Bei fünf weiteren Proben wurden mittels Sequenzierung die IBV Genotypen bzw. Stämme H120/H52, D274 und M41 differenziert (Tabelle 26).

Bei 22 Feldproben konnte mit dem entwickelten System keine bzw. keine eindeutige Differenzierung erfolgen. In vierzehn Fällen wurde trotz Verwendung verschiedener Primerkombination kein Amplifikat gewonnen. Bei einigen Feldproben, die amplifizierbar waren, war weder mittels REA (acht Proben) noch angeschlossener Sequenzierung (fünf Proben) eine eindeutige Zuordnung zu einem bekannten Genotyp möglich. Zwei dieser Proben zeigten dabei eine ca. 90%ige Nukleotidhomologie zu IBV V1397 und eine Probe eine 89%ige Homologie zu IBV QX (Tabelle 26).

Insgesamt konnten in den einundvierzig differenzierbaren Feldproben vier verschiedene IBV Stämme und drei unterschiedliche Genotypen differenziert werden. Der am häufigsten nachgewiesene Stamm war H120/H52 mit 21 Nachweisen, gefolgt von 4/91 mit zehn Nachweisen und weiteren Massachusetts Stämmen wie M41 mit sechs Nachweisen sowie D274 mit vier Nachweisen.

**Tabelle 25: Angewandte Methodik und Ergebnisse bei der Differenzierung von Feldproben**

Primer Kombination	Anzahl Proben	Differenzierungsmethode	
		REA	Sequenzanalyse
S1Oligo5/Srev	25	16 x H120/H52 7 x 4/91 1 x M41	1 x 4/91 Variante
S1Oligo5/S6	5	1 x 4/91 3 x M41	1 x Massachusetts
S7/S8*	5	3 x H120/H52	2 x D274
S7/S1PR2*	2	-	1 x H120/H52 1 x D274
S9/S8*	2	1 x H120/H52 1 x 4/91	-
S9/S1PR2*	2	1 x D274	1 x M41
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>34</b>	<b>7</b>
<b>22 Proben nicht differenzierbar</b>			

\* Nested-PCR im Anschluss an die S1Oligo5/S6 RT-PCR

Tabelle 26: Vergleich der ermittelten IBV Sequenzen von Feldproben mit IBV Genbanksequenzen (Nukleotidhomologie in %)

Feldproben \ Genbanksequenzen	H120*	H52	M41	Beaudette	4/91	D274	B1648	D1466	V1397	Italy-02	QX
GB 997/06 (S1Oligo5/S6, 408bp)	97	97	96	96	75	76	73	51	53	76	73
GB 512/07 (S1Oligo5/Srev, 514bp)	73	73	73	73	93	74	70	52	52	75	72
GB 533/07 (S1Oligo5/S6, 659bp)	58	62	62	62	54	61	54	86	90	56	55
GB 631/07 (S9/S1PR2-, 252bp)	95	95	100	95	67	68	67	55	53	63	72
GB 237/08 S1Oligo5/S6, 395bp)	55	58	57	57	51	55	50	88	91	53	52
GB 67/09 (S1Oligo5/Srev, 428bp)	75	75	76	77	72	74	67	50	52	72	89
GB 673/09 (S7/S1PR2-, 460bp)	99	99	96	96	74	75	73	54	56	74	78
GB 680/09 (S7/S1PR2-, 316bp)	79	79	79	72	72	98	79	57	57	72	72
GB 1077/09 (S7/S8, 506bp)	75	75	75	76	74	99	77	57	57	83	73
GB 1087/09 (S7/S8, 506bp)	75	75	75	76	74	99	78	57	57	83	73

\*H120 (M21970.1), H52 (AF352315.1), M41 (M21883.1), Beaudette (M95169), 4/91 (AF093794.1), QX (DQ431199), V1397 (M21968.1), D1466 (M21971.1), D274 (X15832.1), Italy-02 (AJ457137.1), B1648 (X87238.1).

## 4.2 Epidemiologische Untersuchungen zum Nachweis von IBV

Um einen Überblick über die epidemiologische Situation der IBV Infektion in Deutschland zu bekommen, wurden die im Rahmen der IBV Routinediagnostik ermittelten Ergebnisse der Jahre 2004 bis 2009 ausgewertet. Von 2004 bis einschließlich 2008 erfolgte der IBV Nachweis mit einer konventionellen RT-PCR unter Verwendung der in der Literatur beschriebenen universellen Primer IBVN+ und IBVN-, die ein Fragment innerhalb des N-Gens amplifiziert. Im Jahr 2009 wurde die Diagnostik mittels der in dieser Arbeit etablierten IBV RT-qPCR fortgesetzt.

Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg wurden IBV positive Proben anschließend mittels typspezifischer RT-PCR auf das Vorkommen des Genotyps IBV 4/91 getestet. Dabei war eine Unterscheidung zwischen IBV 4/91 Impf- und Feldvirus nicht möglich. Untersuchungen zum Vorkommen des Genotyps IBV QX wurden dagegen erst ab 2009 mittels RT-PCR routinemäßig durchgeführt. Um einen Überblick über die Ausbreitung dieses Genotyps zu erhalten, wurden Proben aus dem Zeitraum 2004 bis einschließlich 2008 retrospektiv untersucht. Da über den gesamten Untersuchungszeitraum kein kommerzieller Impfstoff gegen IBV QX erhältlich war, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei positiven Ergebnissen um eine Feldinfektion handelte. Das Vorliegen weiterer Genotypen bzw. Stämme wurde innerhalb dieser Studie nicht näher analysiert.

### 4.2.1 Charakteristik des Probenmaterials

Insgesamt wurden 576 Einsendungen, die in der Regel eine Herde darstellten, aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands auf das Vorliegen einer IBV Infektion untersucht. Als Probenmaterial dienten dabei Tracheal-, Rachen- und Kloakentupfer sowie Organproben in Form von Tracheen, Nieren und Zäkaltonsillen. Die meisten Einsendungen stammen aus dem Jahr 2009 (207 Einsendungen). Deutlich weniger Einsendungen waren in den Jahren 2006 und 2007 (47 bzw. 49 Einsendungen) zu verzeichnen (Tabelle 27).

Mit Ausnahme der Jahre 2004 und 2005, in denen vermehrt Monitoringuntersuchungen bei Mastelternieren durchgeführt wurden, stammte das Untersuchungsmaterial, das zu diagnostischen Zwecken eingesandt worden war, in der Regel aus Beständen mit Verdacht einer IBV Infektion. Angaben zum Vorbericht inklusive Angaben zu vorausgegangenem Impfungen lagen in den meisten Fällen jedoch nicht vor und wurden daher nicht ausgewertet.

Die untersuchten Nutzungsrichtungen umfassten Broiler, Mastelterniere und Legehennen. Die meisten Proben (39,6 %) wurden aus Broilerbeständen eingesandt, gefolgt von Legehennen (37,3 %) und Mastelternierbeständen (14,4 %). Bei 8,7 % der Einsendungen war die Nutzungsrichtung unbekannt. Insgesamt betrachtet war der Anteil untersuchter Proben je Nutzungsrichtung über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg erheblichen Schwankungen unterworfen (Tabelle 27).

**Tabelle 27: Absolute und prozentuale Anteile der untersuchten Einsendungen zwischen den Jahren 2004 und 2009 unter Berücksichtigung der verschiedenen Nutzungsrichtungen**

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Total
<b>Broiler</b>	35 (38,5%)	8 (7,8%)	22 (46,8%)	31 (63,3%)	37 (46,2%)	95 (45,9%)	<b>228 (39,6%)</b>
<b>Legehennen</b>	29 (31,8%)	27 (26,5%)	16 (34%)	14 (28,5%)	30 (37,5%)	99 (47,8%)	<b>215 (37,3%)</b>
<b>Masteltern</b>	21 (23,1%)	57 (55,9%)	2 (4,3%)	0 (0%)	1 (1,3%)	2 (1%)	<b>83 (14,4%)</b>
<b>Unbekannt</b>	6 (6,6%)	10 (9,8%)	7 (14,9%)	4 (8,2%)	12 (15%)	11 (5,3%)	<b>50 (8,7%)</b>
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>102</b>	<b>47</b>	<b>49</b>	<b>80</b>	<b>207</b>	<b>576</b>

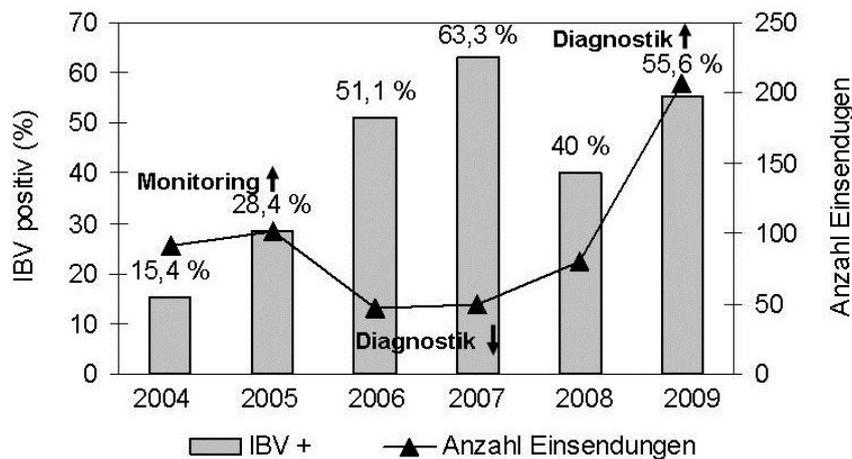
Die Verteilung der 576 Einsendungen hinsichtlich ihrer geographischen Herkunft (nach Anschrift des einsendenden Tierarztes) stellte sich folgendermaßen dar. Insgesamt gingen Proben aus zehn verschiedenen Bundesländern Deutschlands ein. Die meisten Einsendungen stammten aus Niedersachsen (45,4 %), gefolgt von Brandenburg (18,2 %), Baden-Württemberg (12,5 %), Sachsen (9,7%) und Bayern (6,8 %). Aus den übrigen Bundesländern Sachsen-Anhalt, Nordrhein-Westfalen, Hessen, Thüringen und Mecklenburg-Vorpommern wurden je Bundesland weniger als 20 Einsendungen untersucht (Abbildung 28). Dabei handelte es bei den Proben aus Niedersachsen insbesondere um Proben aus Broiler- bzw. Mastelternbeständen, während Proben aus Baden-Württemberg und Bayern vor allem aus Legehennenbeständen stammen. Aus Sachsen stammen fast ausschließlich Proben aus Broilerbeständen und aus Brandenburg nahezu ausschließlich aus Legehennenbeständen.



**Abbildung 28: Geographische Herkunft der untersuchten Einsendungen. Dargestellt sind die absoluten und prozentualen Anteile in den jeweiligen Bundesländern sowie der absolute Anzahl pro Nutzungsrichtung (Broiler / Legehennen / Masteltern / Unbekannt).**

#### 4.2.2 Nachweis von IBV

Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg wurde in 245 der 576 untersuchten Einsendungen IBV spezifische RNA nachgewiesen. Dies entsprach einem prozentualen Anteil von 42,5 % positiver Proben. Bei Betrachtung der IBV Nachweisraten in den einzelnen Jahren zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg von 15,4 % im Jahr 2004, 28,4 % im Jahr 2005 und 63,3 % im Jahr 2007. Im Jahr 2008 sank die Nachweisrate auf 40 % und stieg im Jahr 2009 wiederum auf 55,6 % an. Den niedrigen Nachweisraten der Jahre 2004 und 2005 muss jedoch gegenüber gestellt werden, dass in diesen Jahren vermehrt Monitoringuntersuchungen ohne Verdacht des Vorliegens einer IBV-Infektion durchgeführt worden waren. Hierbei handelte es sich insbesondere um Einsendungen von Mastelertieren. In den Jahren 2006 und 2007 fielen dagegen die diagnostischen Einsendungen geringer aus (Abbildung 29). Anschließend kam es zu einem deutlichen Anstieg diagnostischen Einsendungen.



**Abbildung 29: Prozentuale Anteile IBV positiver Einsendungen im Untersuchungszeitraum im Vergleich zur Anzahl der untersuchten Einsendungen.**

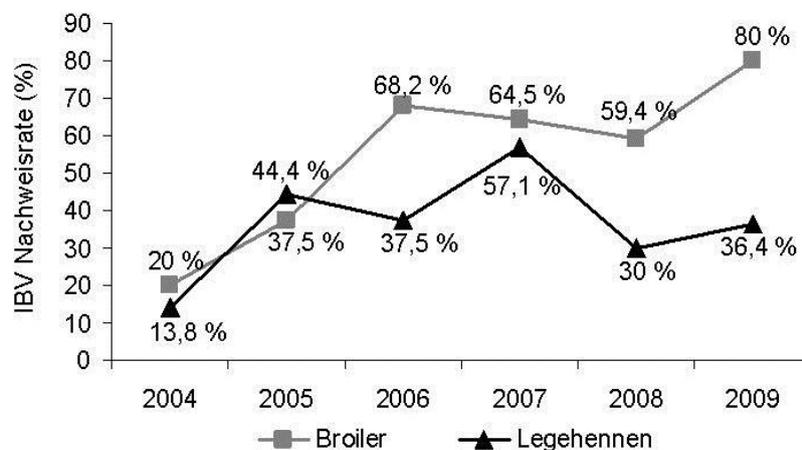
Eine Analyse hinsichtlich der verschiedenen Nutzungsrichtungen belegte, dass mit 62,7 % die höchste IBV Nachweisrate in Broilerbeständen zu verzeichnen war. Demgegenüber ergab sich bei Legehennen lediglich eine Nachweisrate von 34,9 % und bei Mastelertieren von 19,3 % (Tabelle 28).

**Tabelle 28: IBV Nachweisraten bei den verschiedenen Nutzungsrichtungen**

	IBV positiv	
	Anzahl	% <sup>1</sup>
<b>Broiler</b>	143	62,7 %
<b>Legehennen</b>	75	34,9 %
<b>Mastelertiere</b>	16	19,3 %
<b>Unbekannt</b>	11	22 %

<sup>1</sup> bezogen auf die Anzahl an Einsendungen der jeweiligen Nutzungsrichtung

Für die beiden zahlenmäßig am stärksten vertretenen Nutzungsrichtungen Broiler und Legehennen wurde darüber hinaus der zeitliche Verlauf der IBV Nachweisraten näher analysiert. Beim Broiler zeigte sich ein insgesamt ähnlicher Trend im Verlauf im Vergleich zu den Gesamt-IBV Nachweisraten. So konnte ein deutlicher Anstieg von 20 % im Jahr 2004 über 68,2 %, im Jahr 2006 bis auf 80 % und im Jahr 2009 verzeichnet werden. Zwischen den Jahren 2006 und 2008 kam es zu leicht schwankenden Nachweisraten zwischen 68,2 % und 59,4 %. Bei Legehennen wurde vergleichbar zu den Broilern die niedrigste Nachweisrate im Jahr 2004 mit 13,8 % detektiert, danach schwankten die Nachweisraten in einem Bereich von 30 % bis maximal 57,1 % im Jahr 2007. Ein zeitlicher Trend zeichnete sich dabei nicht ab (Abbildung 30).



**Abbildung 30: IBV Nachweisrate bei Broilern und Legehennen pro Untersuchungsjahr.**

Für die Berechnung der IBV Nachweisrate wurden nur Bundesländer mit über 20 Einsendungen in die Auswertung einbezogen. Dabei ergab sich, dass die höchste IBV Nachweisrate mit 51,8 % im Bundesland Sachsen detektiert wurde. In Niedersachsen, Bayern und Baden-Württemberg ergaben sich Nachweisraten in einer ähnlichen Größenordnung zwischen 46,1 % und 40,3 %. Die niedrigste Nachweisrate wurde mit 30,5 % in Brandenburg ermittelt (Abbildung 31).

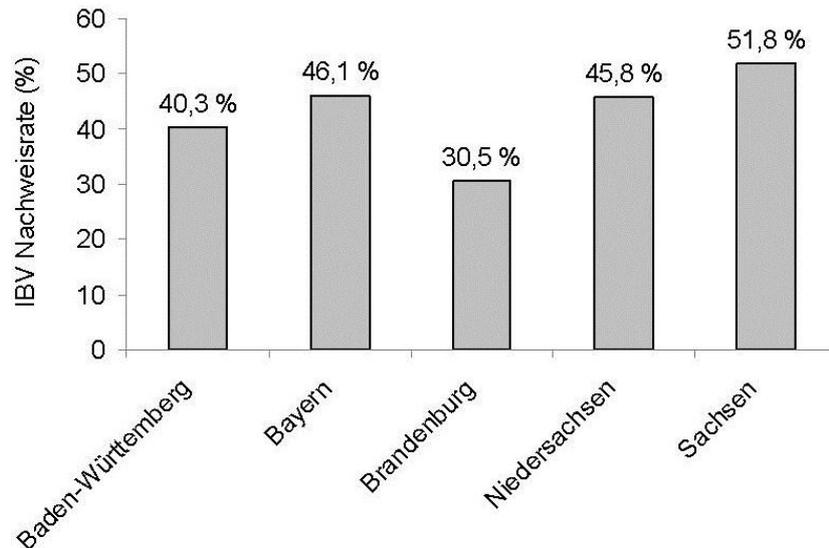


Abbildung 31: IBV Nachweisrate in den Bundesländern.

#### 4.2.3 Nachweis der Genotypen IBV 4/91 und QX in IBV positiven Einsendungen

Untersuchungen zur Differenzierung zeigten, dass in insgesamt 24,5 % der 245 IBV positiven Einsendungen der Genotyp IBV 4/91 und in 55,9 % der Genotyp IBV QX nachgewiesen werden konnte. In 9,4 % der IBV positiven Einsendungen wurden beide Genotypen im Rahmen einer Doppelinfektion detektiert (Abbildung 32).

Während sich für IBV 4/91 zwischen den einzelnen Jahren sehr schwankende Anteile, minimal 15,6 % im Jahr 2009 und maximal 41,7 % im Jahr 2006, ergaben und sich kein zeitlicher Trend abzeichnete, konnte für IBV QX ein nahezu kontinuierlicher Anstieg innerhalb des Untersuchungszeitraums festgestellt werden. So wurde dieser Genotyp zu Beginn der Untersuchungen in den Jahren 2004 und 2005 in ca. 35 % der positiven Einsendungen detektiert, gefolgt von einem Anstieg auf 45,8 % im Jahr 2006 und 54,8 % im Jahr 2007. Im Jahr 2008 stieg der Anteil IBV QX positiver Einsendungen schließlich auf 68,7 %, gefolgt von einem leichten Rückgang im Jahr 2009 auf 62,6 % (Abbildung 33).

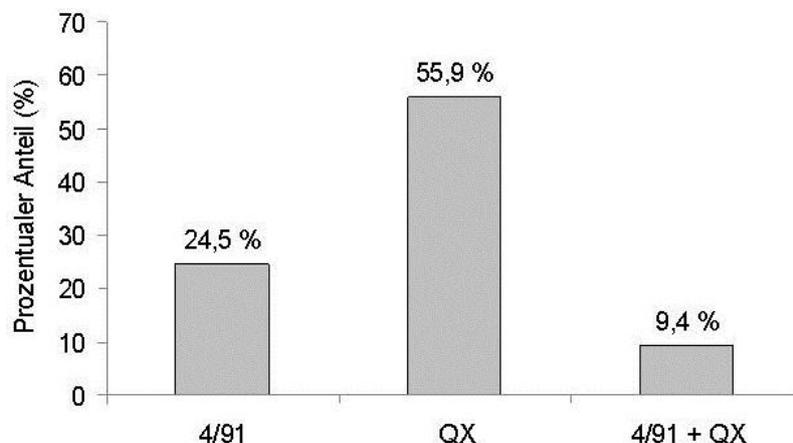
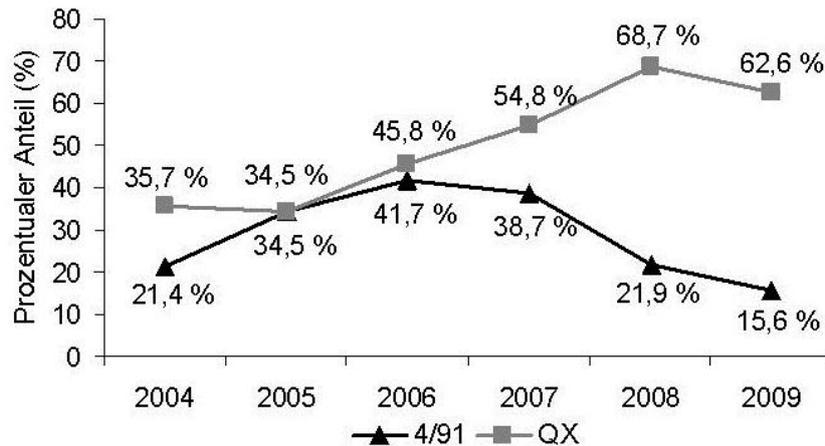
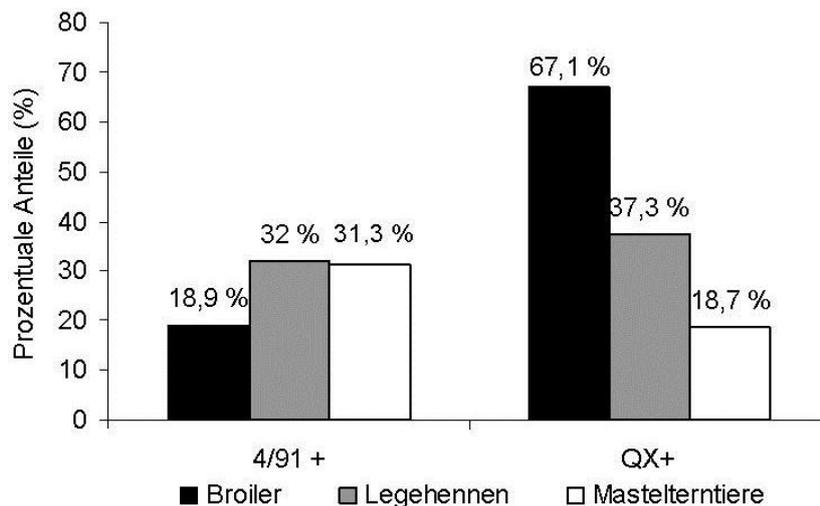


Abbildung 32: Nachweis der Genotypen IBV 4/91 und IBV QX (als prozentualer Anteil an den IBV positiven Einsendungen).



**Abbildung 33: Nachweis der Genotypen IBV 4/91 und IBV QX in den einzelnen Untersuchungsjahren (als prozentualer Anteil an den IBV positiven Einsendungen).**

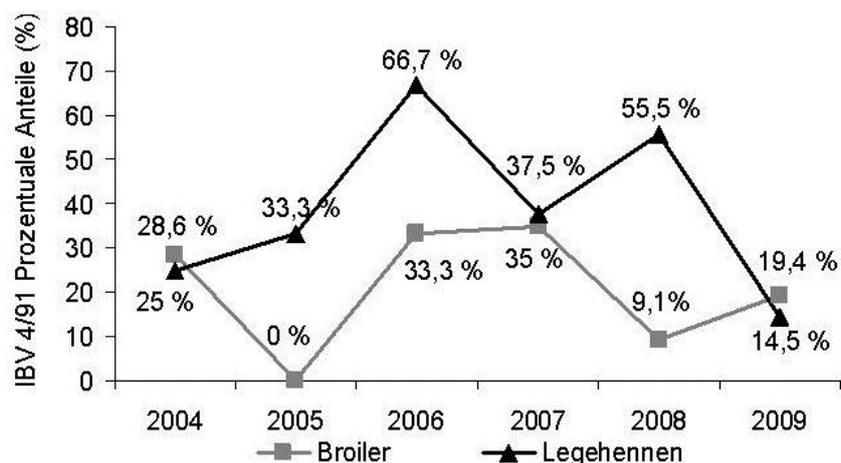
Hinsichtlich der verschiedenen Nutzungsrichtungen ergaben sich für den Genotyp IBV 4/91 bei Legehennen und Mastelertieren annähernd gleiche Anteile von 32 % bzw. 31,3 %. In Broilerbeständen konnte IBV 4/91 lediglich in 18,9 % der IBV positiven Einsendungen dieser Nutzungsrichtung nachgewiesen werden. Demgegenüber war der Genotyp IBV QX mit 67,1 % in mehr als 2/3 der positiven Einsendungen aus Broilerbeständen detektierbar. In Legehennen und Mastelertierbeständen wurde dieser Genotyp dagegen nur in 37,3 % bzw. 18,7 % der IBV positiven Einsendungen der entsprechenden Nutzungsrichtung nachgewiesen (Abbildung 34).



**Abbildung 34: Nachweis der Genotypen IBV 4/91 und IBV QX bei den verschiedenen Nutzungsrichtungen (als prozentualer Anteil an den IBV positiven Einsendungen der jeweiligen Nutzungsrichtung).**

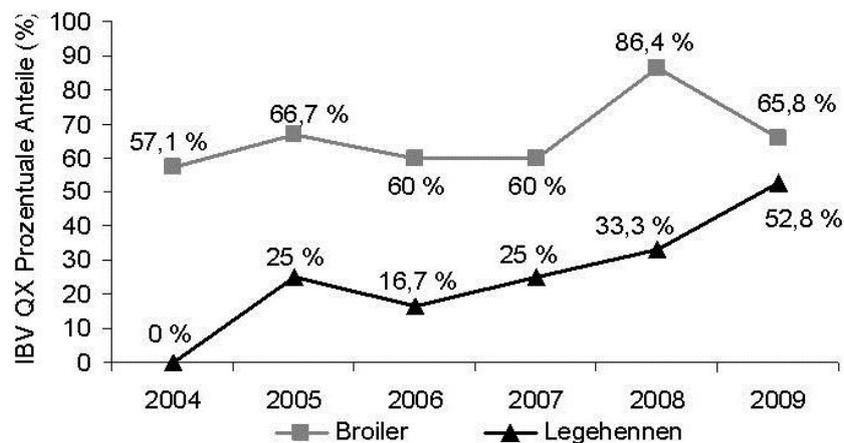
Bei Betrachtung der prozentualen Anteile des IBV Genotyps 4/91 bei Broilern und Legehennen in den einzelnen Jahren zeigt sich eine größere Schwankung (Abbildung 35).

Trotzdem ist die Nachweisrate von IBV 4/91 bei Legehennen wesentlich höher als bei Broilern. Am Anfang des Untersuchungszeitraums im Jahr 2004 war der Anteil bei beiden Nutzungsrichtungen ähnlich. Im Jahr 2005 stieg jedoch der Anteil bei Legehennen um ca. 5 % auf 33,3 %, während er bei Broilern auf 0 % sank. Im nachfolgenden Jahr wurde eine deutliche Erhöhung des prozentualen Anteils bei beiden Nutzungsrichtungen beobachtet. Bei Legehennen waren 66,7 % aller IBV positiven Einsendungen 4/91, was das Maximum darstellte. Im Jahr 2007 sank der prozentuale Anteil bei Legehennen auf ein ähnliches Niveau wie 2005, während gleichzeitig der Anteil bei Broilern bei 35 % lag, und somit von allen Jahren am höchsten lag. Im Jahr 2008 stieg der prozentuale Anteil bei Legehennen wieder um ca. 18 % auf 55,5 %, während bei Broilern erneut ein Rückgang auf 9,1 % zu beobachten war. Auch bei den Legehennen zeigte sich ein Rückgang im Jahr 2009 und es wurde mit 14,5 % das niedrigsten Niveau während des Untersuchungszeitraums erreicht. Im Gegensatz dazu trat bei den Broilern IBV 4/91 öfter auf. Der Anteil an den IBV-positiven Einsendungen stieg um 10 % auf 19,4 % (Abbildung 35).



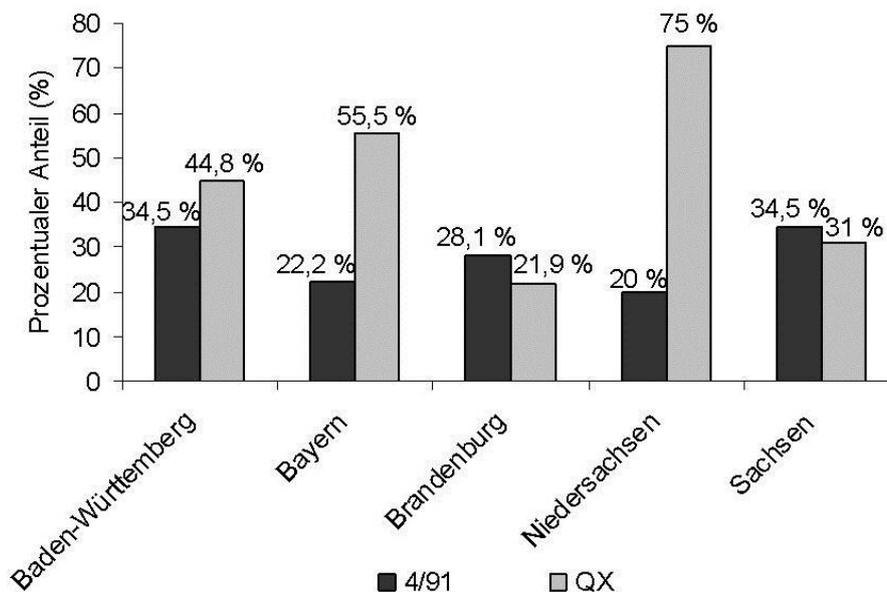
**Abbildung 35: Prozentuale Anteile der IBV 4/91 positiven Einsendungen an den IBV-positiven Einsendungen bei Broilern und Legehennen in den Jahren 2004 bis 2009.**

Der prozentuale Anteil des IBV Genotyp QX bei Broilern war über den gesamten Untersuchungszeitraum höher als bei Legehennen (Abbildung 36). Bei Broilern lag der prozentuale Anteil im ersten Untersuchungsjahr (2004) bei 57,1 % und stieg im folgenden Jahr (2005) um rund 10 % auf 66,7 %. In den Jahren 2006 und 2007 sank der Anteil von IBV QX wieder auf 60 %. 2008 wurde dann mit 86,4 % der höchste prozentuale Anteil von IBV QX nachgewiesen. Im letzten Untersuchungsjahr (2009) sank der prozentuale Anteil mit 65,8 % auf das Niveau der ersten vier Jahre des Untersuchungszeitraums. Bei Legehennen stieg der prozentuale Anteil von IBV QX von 0 % im Jahr 2004 auf 25 % im Jahr 2005. Im Jahr 2006 sank der prozentuale Anteil wieder auf 16,7%. Danach zeigte sich in den folgenden Jahren ein kontinuierlicher Anstieg bis zum vorläufigen Höhepunkt im Jahr 2009 mit 52,8 % (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Prozentuale Anteile der IBV QX positiven Einsendungen an den IBV-positiven Einsendungen bei Broilern und Legehennen in den Jahren 2004 bis 2009.**

Bezogen auf die positiven Proben in dem jeweiligen Bundesland ergaben sich für den Genotyp IBV 4/91 für Baden-Württemberg und Sachsen mit 34,5 % und Brandenburg mit 28,1 % Anteile in einer ähnlichen Größenordnung. In Bayern und Niedersachsen wurden dagegen nur 22,2 % bzw. 20 % der positiven Proben als IBV 4/91 identifiziert. Demgegenüber betrug in Niedersachsen der Anteil IBV QX positiver Proben 75 %, gefolgt von Bayern und Baden-Württemberg mit 55,5 % bzw. 44,8 %. In Sachsen lag der Anteil deutlich niedriger bei 31 % und in Brandenburg noch unter 30 % (Abbildung 37). Bundesländer mit Probenanzahlen unter 20 wurden nicht näher untersucht.



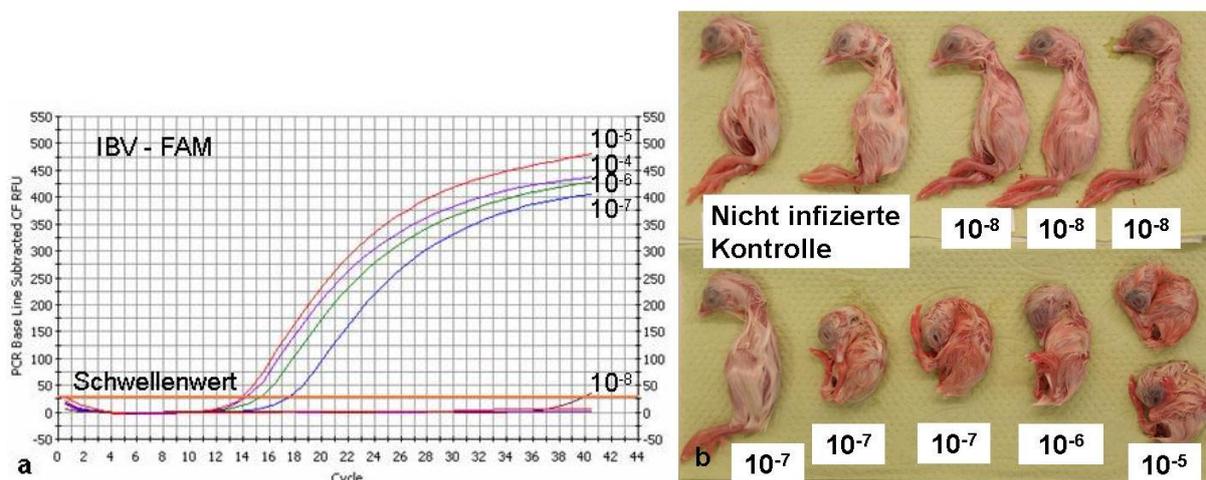
**Abbildung 37: Nachweis der Genotypen IBV 4/91 und IBV QX in den verschiedenen Bundesländern (als prozentualer Anteil an den IBV positiven Einsendungen der jeweiligen Bundesländer).**

### 4.3 IBV QX Infektionsversuche

Um die Pathogenität, die Ausbreitung im Wirtsorganismus und die Antikörperinduktion des neu aufgetretenen Genotyps IBV QX zu untersuchen, wurde ein Infektionsversuch mit SPF-Broilern mit dem Feldisolat IBV QX GB 341/06 durchgeführt.

#### 4.3.1 Bestimmung des Virustiters

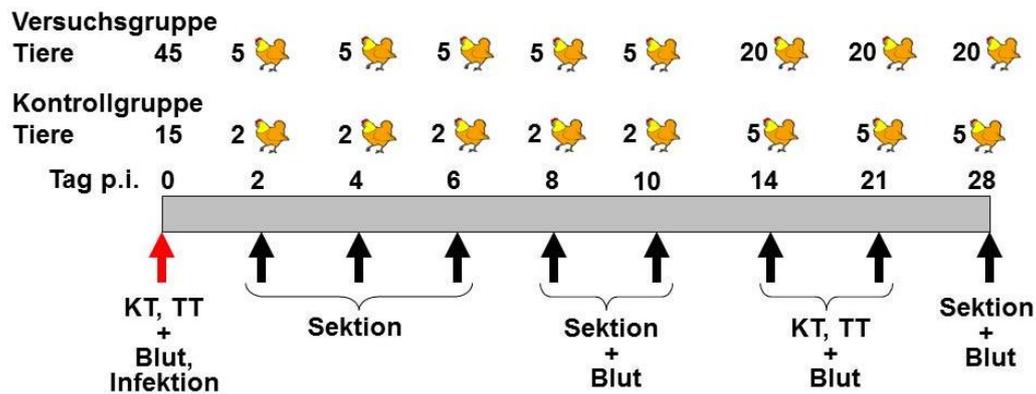
Die Bestimmung des Virustiters des Feldisolates IBV QX GB 341/06 erfolgte durch Titration in embryonierten SPF-Hühnereiern. Dazu wurden verschiedene Verdünnungsstufen der zweiten Ei-Passage von IBV QX GB 341/06 via Allantoishöhle inokuliert. Bei der anschließenden Untersuchung der gewonnenen Allantoisflüssigkeiten mittels IBV RT-qPCR konnte bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-7}$  IBV RNA nachgewiesen werden (Abbildung 38 a). Bis zur gleichen Verdünnungsstufe zeigten die Embryonen darüber hinaus IBV typische Veränderungen wie Verzerrung und Verkrümmung (Abbildung 38 b). Der ermittelte Titer betrug  $10^{7,94}$  EID<sub>50</sub>/ml.



**Abbildung 38: Bestimmung des Virustiters: a) Nachweis von IBV RNA in der Allantoisflüssigkeit der verschiedenen Verdünnungsstufen am 2. Tag p.i., b) IBV Veränderungen der Hühnerembryonen am 6. Tag p.i..**

#### 4.3.2 Versuchsdurchführung

Am Tag der Infektion wurden Blutproben von zehn Tieren gewonnen und die Seren auf das Vorhandensein von IBV spezifischen Antikörpern im ELISA untersucht. Die Untersuchung verlief in allen Proben mit negativem Ergebnis. Im Anschluss wurden die 45 {27 männliche (♂) und 18 weibliche (♀)} Tiere der Infektionsgruppe mit dem Feldisolat IBV QX GB 341/06 mit einer Dosis von  $10^{5,94}$  EID<sub>50</sub>/ml/Tier okulonasal infiziert. Die 15 Tiere der Kontrollgruppe wurden nicht infiziert (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Graphische Darstellung der Versuchsdurchführung. KT - Entnahme von Kloakentupfern; TT - Entnahme von Trachealtupfern.**

Am 2., 4., 6., 8. und 10. Tag post Infektion (p.i.) wurden jeweils zwei Tiere der Kontrollgruppe und fünf Tiere der Versuchsgruppe schmerzlos getötet und pathologisch anatomisch untersucht. Dabei erfolgte sowohl die Entnahme von Tracheal- und Kloakentupfern zur Überprüfung der Virusausscheidung als auch die Entnahme von Thymus, Lunge, Leber, Niere und Zäkaltonsillen zur Überprüfung der Virusausbreitung (Abbildung 40). Am 8. und 10. Tag p.i. wurden zusätzlich Blutproben von den zu tötenden Tieren gewonnen und der serologischen Untersuchung zugeführt. Am 14. und 21. Tag p.i. wurden von allen Tieren der Versuchs- und Kontrollgruppe Blutproben sowie Tracheal- und Kloakentupferproben entnommen. Am Ende des Versuches 28 Tag p.i. wurden von allen verbleibenden Tieren beider Gruppen Blutproben gewonnen und die Tiere nach schmerzlosem Töten pathologisch anatomisch untersucht. Dabei erfolgte die analoge Entnahme der oben beschriebenen Tupfer- und Organproben.



**Abbildung 40: a) Entnahme von Trachealtupferproben. b) Entnahme von Kloakentupferproben. c) Entnahme von verschiedenen Organproben.**

#### 4.3.3 Klinische Erscheinungen

Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten über die gesamte Versuchsdauer hinweg keine klinischen Erscheinungen.

Bei den Tieren der Versuchsgruppe wurde vom 2. Tag p.i. bis zum 9. Tag p.i. ein gestörtes Allgemeinbefinden in Form von gesträubtem Gefieder, Mattigkeit und Depression sowie Durchfall beobachtet (Abbildung 41 a, b). Ab dem 3. Tag p.i. waren mehr als 50 % der

Tiere und ab 4. Tag p.i. nahezu die gesamte Versuchsgruppe in ihrem Allgemeinbefinden gestört. 6 Tiere zeigten ab dem 3. Tag p.i. bis zum 7. Tag p.i. respiratorische Symptome in Form einer Schnabelatmung (Abbildung 41 c).

Zwischen dem 3. und 9. Tag p.i. wurde eine verminderte Futter und erhöhte Wasseraufnahme, welche sich ab dem 10. Tag p.i. wieder normalisierten, beobachtet. Insgesamt starben in der Versuchsgruppe sechs Tiere zwischen dem 4. und 9. Tag p.i.. Diese Tiere zeigten die oben beschriebenen Symptome (s. Tabelle 7 Anhang).



**Abbildung 41: a) Mattigkeit und Depression. b) Durchfall. c) Schnabelatmung.**

#### 4.3.4 Pathologisch anatomische Veränderungen

Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen zu allen Sektionsterminen keine pathologisch anatomischen Veränderungen auf.

Am 2. Tag p.i. zeigten die untersuchten Tiere (drei ♂ und zwei ♀) der Versuchsgruppe ebenfalls keine pathologisch anatomischen Veränderungen. Zwischen dem 4. und 10. Tag p.i. standen Veränderungen der Harnorgane, wie Nierenschwellungen und Uratablagerungen auf der Niere und weiteren Organen (Herzbeutel, Magendarm und Skelettmuskulatur) im Vordergrund (Abbildung 42). Dabei ist jedoch zu beachten, dass diese eventuell auch durch eine nicht ausreichende Wasseraufnahme infolge der allgemeinen Schwäche der Tiere bedingt gewesen sein könnte. Veränderungen im Respirationstrakt waren trotz der klinisch beobachteten Dyspnoe makroskopisch nicht erkennbar.

Im Einzelnen stellten sich die pathologisch anatomischen Veränderungen wie folgt dar.

Am 4. Tag p.i. wies ein Tier (♂) eine Hyperämie der Lunge und ein weiteres Tier (♂) eine Hyperämie von Skelettmuskulatur und Organen sowie eine Schwellung der Nieren und Harnleiter auf. Weiterhin wurden bei einem Tier (♂) Uratablagerungen auf den Nieren festgestellt. Bei den verbleibenden Tieren waren keine Veränderungen sichtbar. Ein am 4. Tag p.i. gestorbenes Tier (♂) zeigte eine ausgeprägte Exsikkose und Uratablagerungen auf verschiedenen Organen, wie Lunge, Niere und Herzbeutel (Tabelle 29).

Ein weiteres, am 5. Tag p.i. gestorbenes Tier (♀) war abgemagert und stark exsikkotisch, die Skelettmuskulatur war hyperämisch, die Nieren geschwollen und mit Uratablagerung, die sich auch auf dem Herzbeutel befand, versehen.

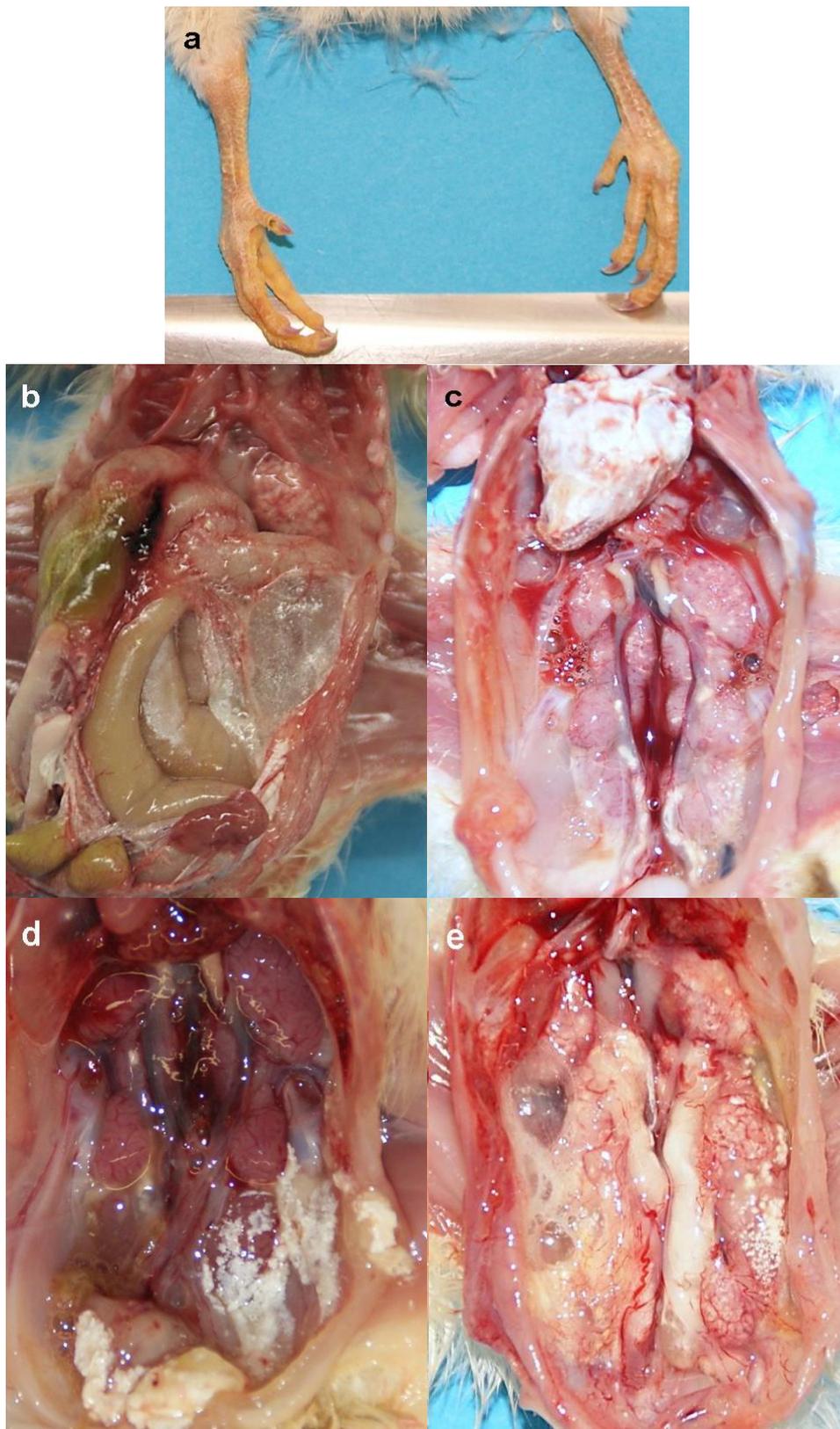
Am 6. Tag p.i. wurden bei jeweils einem Tier (♂) eine Schwellung bzw. Hellverfärbung der Nieren und bei einem Tier (♂) Uratablagerungen auf den Nieren festgestellt. Drei Tiere (♂, ♀) zeigten keine Veränderung. Ein an diesem Tag verstorbenes Tier (♂) war abgemagert und exsikkotisch. Die Nieren waren geschwollen und trugen Uratablagerungen.

Am 8. Tag p.i. waren alle drei getöteten (♀) sowie zwei gestorbene Tiere (♂) abgemagert und exsikkotisch. Zwei Tiere (♂, ♀) zeigten eine Nierenschwellung. Darüber hinaus wies ein Tier (♀) einen persistierenden Dottersack auf. Bei einem der zwei gestorbenen Tiere zeigten sich ebenfalls geschwollene Nieren und Uratablagerungen auf den inneren Organen. Zwei Tiere (♂), eins davon gestorben, zeigten keine Veränderungen.

Ein am 9. Tag p.i. gestorbenes Tier (♂) war ebenfalls abgemagert und exsikkotisch und wies neben Uratablagerungen im Harnleiter und auf den Nieren einen persistierenden Dottersack auf.

Am 10. Tag p.i. war ein Tier (♂) abgemagert. Bei einem Tier (♀) wurden eine hell gefärbte und bei zwei Tieren (♂, ♀) eine Nierenschwellung festgestellt. Des Weiteren wies ein Tier (♂) Uratablagerungen auf einer Niere auf. Zwei Tiere (♂, ♀) zeigten keine sichtbaren Veränderungen.

Zu Ende des Versuchs am 28. Tag p.i. wurden bei elf der 16 untersuchten Tiere keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen festgestellt. Ein Tier zeigte eine Hyperämie der Lunge und zwei Tiere eine geringfügige Trübung der Luftsäcke. Bei zwei Tieren wurden geschwollene und blasse Nieren nachgewiesen (Tabelle 30).



**Abbildung 42: Makroskopisch sichtbare pathologisch anatomische Veränderungen. a) Exsikkose, b und c) Eingeweidegicht, d und e) Nierenschwellung und Uratablagerung auf den Nieren.**

**Tabelle 29: Im Vordergrund stehende pathologisch anatomische Veränderungen von Tieren der Versuchsgruppe zwischen dem 2. und 10. Tag p.i.**

Tag p.i.	getötete Tiere	gestorbene Tiere	ohne Veränderungen	Veränderungen					
				Exsikkose/ Abmagerung	Lunge Hyperämie	Harnorgane			Uratablagerungen Organe
						Nieren		Harnleiter Schwellung	
						Schwellung	Uratablagerungen		
2.	5		5						
4.	5	1	2	1	1	1	1	1	1
5.		1		1		1	1		1
6.	5		3	2		2	1		
6.		1		1		1	1		
8.	3		1	3		2			
8.		2	1	2		1	1		1
9.		1		1		1	1	1	
10.	5		2	1		2	1		

**Tabelle 30: Im Vordergrund stehende pathologisch anatomische Veränderungen von Tieren der Versuchsgruppe am Versuchsende**

Tag p.i.	Getötete Tiere	Ohne Veränderungen	Veränderungen		
			Lunge Hyperämie	Luftsack Trübung	Nieren Schwellung
28.	16	11	1	2	2

### 4.3.5 Überprüfung der Virusausscheidung

#### 4.3.5.1 Untersuchung von Tracheal- und Kloakentupfern mittels IBV RT-qPCR

Um die Virusausscheidung nach Infektion zu ermitteln, wurden die entnommenen Tracheal- und Kloakentupferproben mittels IBV RT-qPCR auf das Vorhandensein IBV spezifischer RNA untersucht. Als positiv bewertet wurden Proben mit einem Ct-Wert < 40. Während die Proben von Tieren der Versuchsgruppe als Einzelprobe untersucht wurden, wurden die Proben von Tieren der Kontrollgruppe bei jedem Entnahmeterrin jeweils gepoolt getestet. Dabei war in keinem Pool von Tieren der Kontrollgruppe IBV spezifische RNA detektierbar.

Bei der Untersuchung der Versuchsgruppe ergaben sich folgende Ergebnisse. Während vom 2. bis 28. Tag p.i. in allen entnommenen Kloakentupfern IBV spezifische RNA und so eine kontinuierliche Virusausscheidung nachgewiesen werden konnte, war dies bei Untersuchung der Trachealtupfer nur bis zum 21. Tag p.i. möglich. Bei den am 28. Tag p.i. entnommenen Trachealtupfern verlief die Untersuchung bei fünf der 16 untersuchten Tiere negativ (Tabelle 31). Die Analyse der Ct-Mittelwerte der Kloakentupfer zeigte eine relativ konstante Viruslast über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg (Abbildung 43). Die höchste Ausscheidung, ermittelt an einem niedrigen Ct-Mittelwert und verbunden mit einer geringen Streuung zwischen den Tieren, ist sechs Tag p.i. zu verzeichnen (Abbildung 44). Die danach zu beobachtende Erhöhung der Ct-Mittelwerte, die eine Reduktion der Viruslasten anzeigt, erlaubt jedoch auch 28 Tag p.i. und unter Einbeziehung einer erhöhten Streuung zwischen den einzelnen Tieren immer noch einen deutlichen Nachweis der Ausscheidung bei allen untersuchten Tieren. Auch in den untersuchten Trachealtupfern konnten die höchste Virusausscheidung am 6. Tag p.i. nachgewiesen werden. Im Anschluss kam es zu einem deutlicheren Rückgang der Viruslasten, verbunden mit negativen Ergebnissen in einzelnen Proben 28 Tag p.i. (Abbildung 44).

**Tabelle 31: Ergebnisse der Untersuchung von Kloaken- und Trachealtupfern der Versuchsgruppe mittels IBV RT-qPCR**

Tag p.i.	Kloakentupfer	Trachealtupfer
2.	5/5 <sup>†</sup>	5/5
6.	5/5	5/5
10.	5/5	5/5
14.	16/16	16/16
21.	16/16	16/16
28.	16/16	11/16

<sup>†</sup> Anzahl positiver (Ct-Wert<40)/Anzahl untersuchter Tupfer

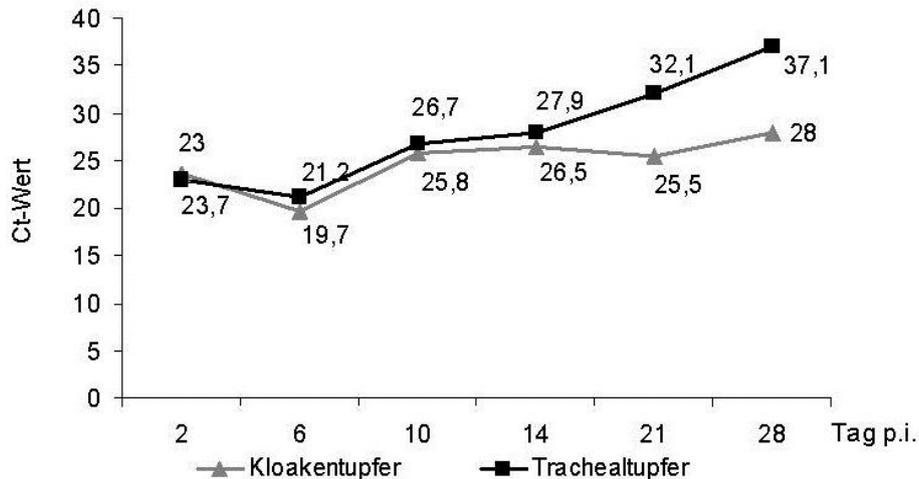


Abbildung 43: Darstellung der Ct-Mittelwerte der untersuchten Kloaken- und Trachealtupfer der Versuchsgruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum.

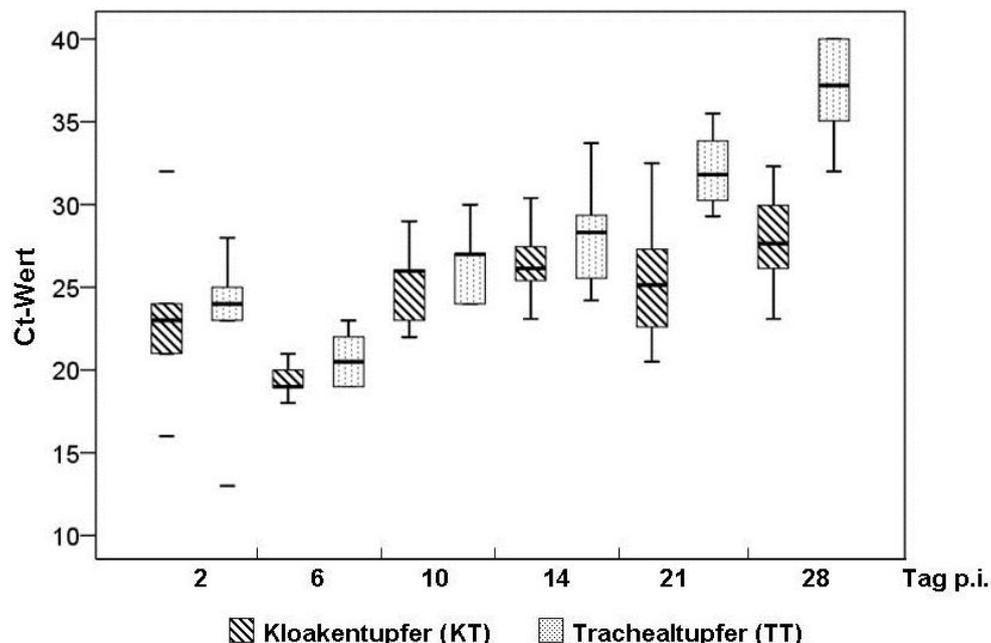


Abbildung 44: Boxplot der Ct-Werte der untersuchten Kloaken- und Trachealtupfer der Versuchsgruppe. Dargestellt ist die 50 % Box sowie die Spannweite mit Minimum und Maximum (vertikale Linie) und der Median (horizontale Linie).

#### 4.3.5.2 Virusreisolierung aus Kloakentupfern

Um zu ermitteln, in wie weit die bei Untersuchung der Virusausscheidung ermittelten RT-qPCR Ergebnisse mit Ergebnissen der Virusreisolierung korrelierten, wurden die am 28. Tag p.i. entnommenen Kloakentupfer der Versuchsgruppe Versuchen zur IBV Reisolierung in embryonierten SPF-Hühnereiern unterzogen. Dazu wurden die Tupfer entsprechend ihren Ct-Werten zu vier Pools (I-IV) zusammengefasst. Obwohl nur die Embryonen von Pool I IBV spezifische Veränderungen zeigten, ergab die Untersuchung der Allantoisflüssigkeiten mittels IBV RT-qPCR, dass nach insgesamt vier durchgeführten Passagen aus allen Pools

IBV erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Eine Übersicht über die ermittelten Ergebnisse ist in Tabelle 32 dargestellt.

**Tabelle 32: Ergebnisse der Virusreisolierung aus Kloakentupfern der Versuchsgruppe 28 Tag p.i.**

Pool	Ausgangsmaterial Kloakentupfer	Virusreisolierung	
	Ct-Wert Bereich IBV RT-qPCR	IBV spezifische Embryo Veränderungen	IBV RT- qPCR
I	23,1 – 26,6	+*	+ <sup>#</sup>
II	26,8 – 28,1	-	+ <sup>#</sup>
III	28,3 – 30,3	-	+ <sup>#</sup>
IV	31,2 – 32,3	-	+ <sup>#</sup>

\* Veränderungen ab der zweiten Passage

# Ct-Werte immer deutlich niedriger als Ct-Werte des Ausgangsmaterials

#### 4.3.6 Überprüfung der Virusausbreitung durch Untersuchung von Organproben mittels IBV RT-qPCR

Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wie sich das Virus im Organismus ausbreitet und wie lange es in unterschiedlichen Organen nachweisbar ist, wurden die am 2., 6., 10. und 28. Tag p.i. entnommenen Organproben (Thymus, Lunge, Leber, Niere und Zäkaltonsillen) mittels IBV RT-qPCR untersucht (Tabelle 33). Als positiv bewertet wurden Proben mit einem Ct-Wert < 40. In fünf IBV negativ reagierenden Thymus- und zwei IBV negativ reagierenden Leberproben wurde eine Inhibition der IK beobachtet. Die RNA dieser Proben wurde 1 : 10 verdünnt und erneut in der RT-qPCR untersucht. Dabei war die IK in allen fünf Proben amplifizierbar, in einer Leberprobe konnte zusätzlich IBV detektiert werden. Um den Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen, wurde der ermittelte Ct-Wert der positiven Probe bei der anschließenden Auswertung um 3,3 Zyklen verringert.

Während alle Proben von Tieren der Kontrollgruppe zu jedem Entnahmezeitpunkt negativ reagierten, ergaben sich bei Untersuchung der Versuchsgruppe folgende Ergebnisse. Bereits am 2. Tag p.i. konnte in allen untersuchten Organtypen IBV spezifische RNA nachgewiesen werden. Dies setzte sich über die nächsten zwei Entnahmezeitpunkte fort (Abbildung 45, Tabelle 33). Der am 6. Tag p.i. positive Nachweis in allen untersuchten Proben korrelierte darüber hinaus mit dem Nachweis der jeweilig höchsten Viruslasten in allen Organtypen zu diesem Zeitpunkt, wobei die höchsten Viruslasten in den Nieren und Zäkaltonsillen detektiert wurden (Abbildung 45). Bereits vier Tage später kam es zu einer Reduktion der Viruslasten, verbunden mit negativen Ergebnissen einzelner Thymusproben. Zum Versuchsende, 28. Tage p.i., wurde nur noch in Lungen und Zäkaltonsillen IBV spezifische RNA mit deutlich geringeren Viruslasten nachgewiesen. Die Proben der weiteren Organtypen reagierten negativ.

Tabelle 33: Untersuchung von Organproben der Versuchsgruppe mittels IBV RT-qPCR

Organproben	Tag p.i.			
	2	6	10	28
Thymus	5/5 <sup>1</sup>	5/5	2/5	0/5
Lunge	4/5	5/5	5/5	3/5
Leber	2/5	5/5	5/5	0/5
Niere	3/5	5/5	5/5	0/5
Zäkaltonsillen	5/5	5/5	5/5	4/5

<sup>1</sup> Anzahl positiver (Ct-Wert<40)/Anzahl untersuchter Organproben

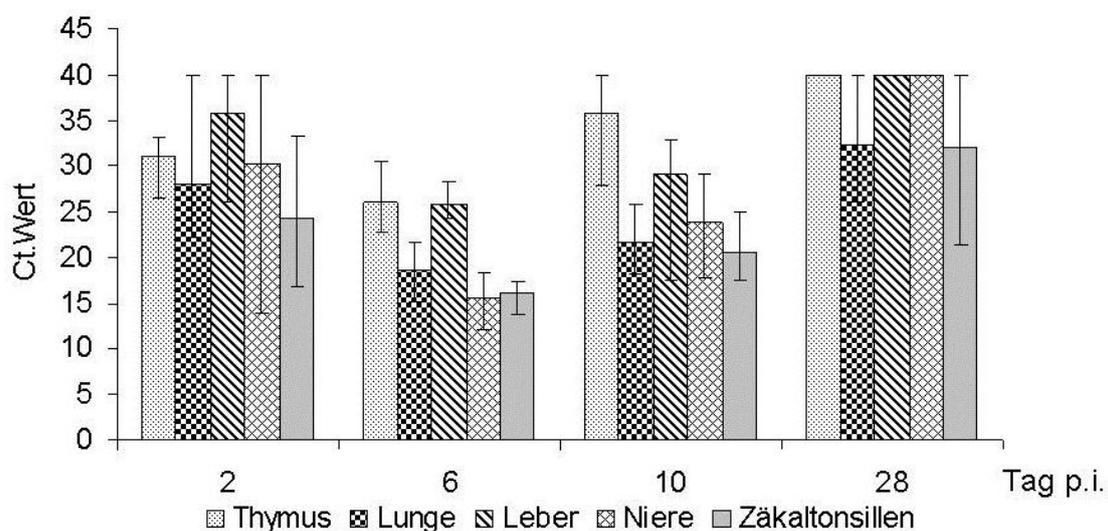
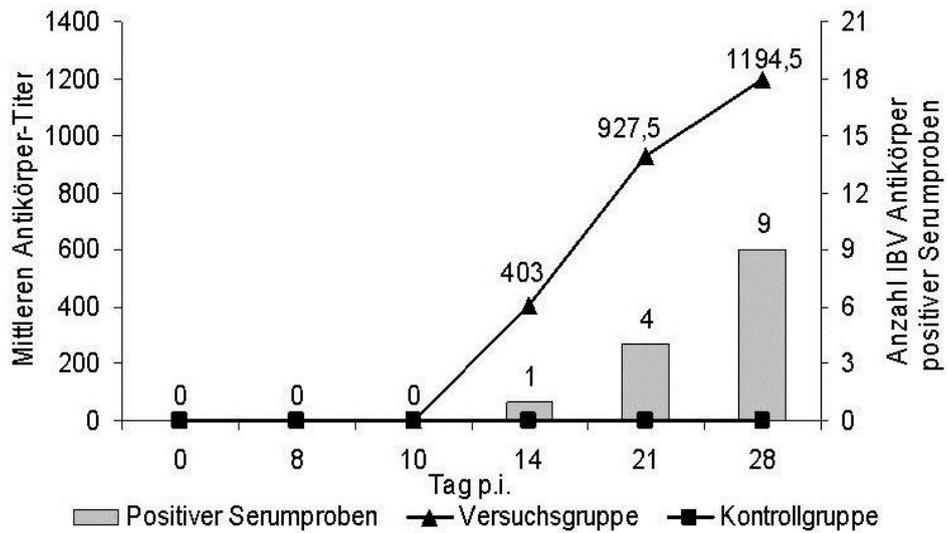


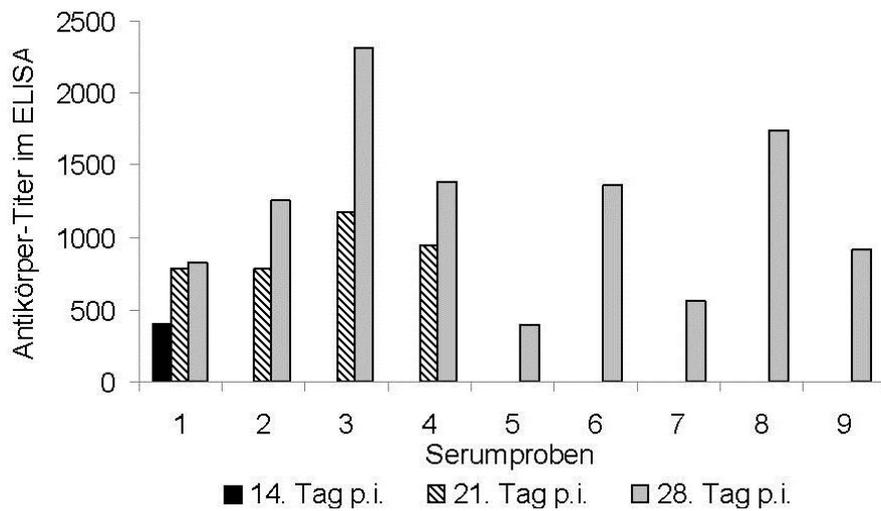
Abbildung 45: Darstellung der Ct-Wert Mittelwerte und Bandbreiten der untersuchten Organproben der Versuchsgruppe.

#### 4.3.7 Untersuchung auf Antikörper gegen IBV mittels ELISA

Bei keinem Tier der Kontrollgruppe konnten Antikörper gegen IBV nachgewiesen werden (Abbildung 46). In der Versuchsgruppe waren die ersten Antikörper bereits bei einem Tier am 14. Tag p.i. nachweisbar, allerdings mit einem niedrigen Antikörper-Titer. Danach stieg die Anzahl seropositiver Tiere langsam an. Zum Versuchsende, 28 Tage p.i., konnte bei knapp mehr als der Hälfte der Tiere eine Serokonversion nachgewiesen werden (Abbildung 46). Die ermittelten Antikörper-Titer lagen dabei auf einem insgesamt niedrigen Niveau (Abbildung 46). Darüber hinaus zeigt sich die Entwicklung der Antikörper-Titer zwischen den seropositiver Tiere sehr schwankend (Abbildung 47).



**Abbildung 46: Anzahl IBV Antikörper positiver Serumproben und Entwicklung der Antikörper-Titer (Mittelwerte) im ELISA.**



**Abbildung 47: Entwicklung der Antikörper-Titer bei 12 positiven Serumproben.**

## 5. DISKUSSION

Die Infektiöse Bronchitis des Huhns (IB) ist eine der wichtigsten viral bedingten Erkrankungen des Respirations- und Urogenitaltraktes von Hühnern (Dhinakar Raj und Jones, 1997). Sie wird hervorgerufen durch eine Infektion mit dem Infektiösen Bronchitis Virus (IBV). Trotz intensiver Impf- und Biosicherheitsmaßnahmen ist die IB weltweit verbreitet und mit beträchtlichen wirtschaftlichen Verlusten verbunden (Cavanagh und Naqi, 2003; Jones, 2010). Die hohe genetische Variabilität des Erregers bedingt das stetige Auftreten neuer Genotypen und Varianten (Cavanagh, 2007). Dies macht nicht nur eine ständige Überprüfung und Anpassung vorhandener Impfprogramme erforderlich, sondern auch der diagnostischen Methoden (Cavanagh und Naqi, 2003). Aus diesem Grund wurde im ersten Teil der vorliegenden Dissertation eine real time RT-PCR (RT-qPCR) zum universellen IBV Nachweis und ein System zur weiteren molekularen IBV Differenzierung etabliert. Der zweite Abschnitt der Dissertation beschäftigt sich mit epidemiologischen Untersuchungen zum Vorkommen von IBV in Deutschland unter besonderer Berücksichtigung der Genotypen IBV 4/91 und IBV QX. Im dritten Teil wurden Untersuchungen zur Pathogenität und zu den Eigenschaften des neu aufgetretenen Genotyps IBV QX durchgeführt.

Aufgrund der weiten Verbreitung von IBV und der mit einer Infektion verbundenen wirtschaftlichen Verluste (Cavanagh und Naqi, 2003; Jones, 2010) ist eine frühe, präzise und zuverlässige Diagnosestellung unabdingbar. Darüber hinaus erfordert das weltweit seuchenhafte Auftreten der Hochpathogenen Aviären Influenza (Capua und Alexander, 2004) eine schnelle Differenzialdiagnostik bei Erkrankungen, die mit einer respiratorischen Symptomatik und Legeleistungsabfällen einhergehen (Callison et al., 2006). Prinzipiell kann die Diagnosestellung mittels verschiedener konventioneller Methoden erfolgen (De Wit, 2000). Diese Methoden sind jedoch häufig zeitintensiv, und die Interpretation der Ergebnisse ist, bedingt durch das Vorkommen zahlreicher Genotypen, erschwert. Vor diesem Hintergrund und in Anbetracht des Entwicklungsfortschritts molekularer Techniken haben sich molekularbiologische Verfahren, wie z. B. die RT-PCR, auch in der Routinediagnostik weitgehend durchgesetzt. Eine Fortentwicklung der PCR findet sich in der Anwendung von real time PCR (qPCR) Verfahren (Schweitzer und Kingsmore, 2001). Neben der Zeitersparnis ist ein großer Vorteil der real time PCR die verringerte Kontaminationsgefahr, da die PCR Gefäße nicht mehr zur weiteren Analyse geöffnet werden müssen (Mackay et al., 2002). Darüber hinaus bietet sie die Möglichkeit, auch bei nicht quantitativen Läufen eine Einschätzung der Viruslast anhand der generierten Ct-Werte vorzunehmen.

Wie in jedem Amplifikationsverfahren müssen jedoch auch in der RT-qPCR negative Ergebnisse von falsch negativen Ergebnissen infolge von PCR Inhibitoren abgegrenzt werden. Durch Koamplifikation einer internen Kontrolle (IK) kann diese Fehlerquelle

---

ausgeschlossen werden (Burggraf und Olgemoller, 2004). Gleichzeitig ermöglicht die Zugabe der IK direkt zum Probenmaterial auch eine Überprüfung der RNA Extraktion (Stöcher et al., 2002).

Aus diesen Gründen wurde für den universellen IBV Nachweis eine duplex RT-qPCR unter Verwendung einer heterologen internen Kontrolle und der Nutzung von TaqMan Sonden etabliert. Um zu gewährleisten, dass möglichst alle zirkulierenden IBV Genotypen und Varianten mit dieser PCR nachgewiesen werden, erfolgte die Auswahl IBV spezifischer Primer und Sonden innerhalb hochkonservierter Bereiche des Matrixprotein Gens.

Die in dieser Studie verwendete heterologe IK basierte in Anlehnung an Hoffmann et al. (2006) auf einem enhanced green fluorescent protein (EGFP) *in vitro* Transkript. Bei dieser Art der IK handelt es sich um eine Fremd-DNA, welche durch spezifische Primer und Sonden im selben Reaktionsgefäß mit der eigentlichen Zielsequenz koamplifiziert wird. Obwohl die heterologe IK eine Konkurrenzreaktion für die Amplifikation der Zielsequenz darstellt, wird durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Primer und Sonden Sets dieser kompetitive Effekt relativ niedrig gehalten (Hofmann, 2003). Insgesamt ist bei dieser Methode jedoch ein höherer Optimierungsaufwand erforderlich. Homologe IK führen vergleichsweise zu einer größeren kompetitiven Hemmung, da die IK unter Verwendung einer anderen Sonde mit den gleichen Primern wie die Zielsequenz amplifiziert wird (Heath et al., 2003; Hofmann, 2003; Westcott et al., 2003). Darüber hinaus erlauben sie keinen universellen Einsatz bei verschiedenen PCR Verfahren (Hoffmann et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit der IK stellt die Anwendung der so genannten housekeeping Gene dar, die den Vorteil haben, dass sie nicht nur das Vorliegen von Inhibitoren aufzeigen, sondern gleichzeitig eine Kontrolle der Qualität der extrahierten Nukleinsäuren erlauben. Aufgrund ihrer nicht kalkulierbaren Konzentration kann es jedoch zu einer kompetitiven Hemmung der Amplifikation der Zielsequenz kommen (Thellin et al., 1999; Hoffmann et al., 2006), zum anderen sind negative IK Ergebnisse aufgrund der zum Teil sehr geringen Zellzahl in Tupferproben nicht auszuschließen.

Die PCR wurde unter Verwendung einer TaqMan Sonde etabliert. Im Vergleich zu einer SYBR Green basierten PCR ist eine Sonden PCR wesentlich spezifischer, da die spezifische Sonde ausschließlich an die Zielsequenz bindet. Weitere Vorteile liegen in der Möglichkeit der Durchführung von Multiplex Ansätzen. TaqMan Sonden wurden in den letzten Jahren bereits für die molekulare Diagnosen von IBV verwendet (Callison et al., 2006; Meir et al., 2010).

Um mögliche Einflüsse der IK Amplifikation auf die IBV Amplifikation zu verhindern, wurde die duplex RT-qPCR unter Berücksichtigung folgender Grundsätze entwickelt. Da die Amplifikation von kleineren Fragmenten effizienter ist (King et al., 2003; Hoffmann et al., 2006; Meir et al., 2010), wurde für IBV ein 134 bp großes Fragment und für die IK eine Fragmentgröße von 374 bp ausgewählt. Darüber hinaus wurden die Primer- und

---

Sondenmengen der IK minimiert. Zuletzt wurde eine relativ niedrige Kopienzahl der IK pro Reaktion eingesetzt (Hoffmann et al., 2006).

Für die Verwendung einer PCR in der Routinediagnostik ist die Kenntnis ihrer möglichen Leistungsfähigkeit von großer Bedeutung. Wichtige Parameter in diesem Zusammenhang stellen die analytische Sensitivität sowie die Spezifität der Methode dar. Die analytische Sensitivität der IBV RT-qPCR wurde anhand eines RNA *in vitro* Standards sowohl im uniplex (ohne IK), als auch im duplex Ansatz (mit IK) bestimmt. Übereinstimmende Ergebnisse in beiden Ansätzen belegen, dass die Amplifikation der IK keinen negativen Einfluss auf die Amplifikation der IBV RNA hatte. Demgegenüber konnte eine Hemmung der IK bei hohen IBV Kopienzahlen festgestellt werden, was jedoch aufgrund der vorgegebenen Bedingungen als tolerabel zu bewerten war (Hofmann, 2003). Mit einer Nachweisgrenze von 20 Kopien pro Reaktion ergab sich eine gute und für diagnostische Zwecke sicher ausreichende Sensitivität.

Eine Gegenüberstellung zu den in der Literatur beschriebenen IBV real time Verfahren ist hinsichtlich dieses Kriteriums schwierig, da die Nachweisgrenze häufig anhand unterschiedlicher Kenngrößen ermittelt wird. Im Vergleich zu der von Callison et al. (2006) entwickelten RT-qPCR, die in ihren Untersuchungen die gleiche Kenngröße nutzten, zeigte das eigene Verfahren jedoch eine niedrigere Nachweisgrenze.

Insgesamt muss jedoch bedacht werden, dass die analytische Sensitivität anhand eines RNA *in vitro* Standards beruhend auf dem Stamm H52 ermittelt wurde. Abweichungen sind daher sowohl bei Untersuchungen unterschiedlicher Genotypen als auch bei Untersuchungen von Feldprobenmaterial möglich.

Die Spezifität der Methode wurde durch negative Ergebnisse bei Untersuchung weiterer viraler bzw. bakterieller Erreger respiratorischer Erkrankungen des Geflügels sowie SPF Tupferproben belegt. Im Gegensatz dazu konnten alle neun verschiedenen IBV Genotypen und Stämme erfolgreich amplifiziert werden. Basierend auf einer BLAST-Analyse der Sequenzen von Primern und Sonde erscheint darüber hinaus auch für nicht zur Verfügung stehende IBV Genotypen bzw. für neu auftretende Varianten eine sichere Detektion als sehr wahrscheinlich. Mit dem von Callison et al. (2006a) entwickelten Verfahren wurde neben IBV auch das Puten Coronavirus (TCoV) detektiert. Inwieweit dies auch für die eigene RT-qPCR zu trifft, konnte praktisch nicht überprüft werden. BLAST-Analysen mit jüngst veröffentlichten Sequenzen (Gomaa et al., 2008) lassen dies jedoch als wahrscheinlich erscheinen, was vor dem Hintergrund, dass die Strukturproteingene von IBV und TCoV mit Ausnahme des S Proteingens eine sehr hohe Sequenzhomologie aufweisen (Gomaa et al., 2008; Jackwood et al., 2010), jedoch nicht unerwartet ist.

Meir et al. (2010) wiesen in ihren Untersuchungen 3% falsch negative Ergebnisse aufgrund von PCR Inhibitoren nach. In einem weiteren Schritt wurde daher ermittelt, ob das Prinzip der IK auch bei Feldproben erfolgreich angewandt werden konnte. Dazu wurden zu

---

diagnostischen Zwecken eingesandte Tupferproben in der Duplex qRT-PCR untersucht. Durch den Nachweis der IK in allen IBV negativen Feldproben konnten falsch negative Ergebnisse infolge fehlerhafter RNA-Extraktion oder des Vorliegens von Inhibitoren ausgeschlossen werden. Die kompetitive Hemmung der IK in Feldproben mit hohen IBV Lasten war dagegen aufgrund der vorgegebenen Amplifikationsbedingungen ein zu erwartendes Ergebnis.

Insgesamt stellte sich die etablierte Duplex RT-qPCR als ein sehr sensitives und spezifisches Testverfahren zum universellen Nachweis von IBV in Feldproben und zum Einsatz in Routinediagnostik dar. Die Koamplifikation der internen Kontrolle ermöglicht den Ausschluss falsch negativer Proben aufgrund von PCR Inhibitoren bzw. fehlerhafter RNA Extraktion, ohne zu einer negativen Beeinflussung der IBV Amplifikation zu führen. Die Eignung des Systems zu diagnostischen Zwecken wird darüber hinaus durch Ergebnisse des Infektionsversuches untermauert. So konnte bereits am 2. Tag p.i. sowohl in Kloaken- und Trachealtupfern als auch in verschiedenen Organproben ein sicherer IBV Nachweis mittels der etablierten RT-qPCR geführt werden. Der Nachweis von Inhibitoren in einzelnen Organproben unterstreicht die Notwendigkeit eines mitzuführenden Kontrollsystems, wie z. B. in Form der hier etablierten IK.

Nicht nur aus epidemiologischen Gründen, sondern auch vor dem Hintergrund erfolgreicher Bekämpfungsstrategien, die eine Kontrolle und Anpassung des Impfprogramms erforderlich machen, ist die Differenzierung nachgewiesener IBV Stämme in heutiger Zeit unabdingbar. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch ein System zur molekularen Differenzierung aktuell zirkulierender Genotypen entwickelt. Grundsätzlich kann die IBV Differenzierung entweder mittels typspezifischer RT-PCR (Capua et al., 1999; Handberg et al., 1999) oder mittels RT-PCR in Verbindung mit der Restriktionsenzymanalyse (REA) (Kwon et al., 1993; Mardani et al., 2006) und Sequenzanalyse erfolgen (Gelb et al., 2001; Farsang et al., 2002). Das eigene System wurde unter Nutzung beider Vorgehensweisen etabliert. So wurden für den Nachweis der in Deutschland häufig vorkommenden Genotypen IBV 4/91 und QX (Worthington et al., 2008) zwei konventionelle, typspezifische RT-PCR Verfahren eingesetzt. Die Primer der RT-PCR zum Nachweis des Genotyps 4/91 wurden nach Angaben von Handberg (1999) gewählt, die QX RT-PCR stellte eine Eigenentwicklung dar. Im Gegensatz zur universellen RT-qPCR waren die Primer für beide Verfahren nun in variablen Bereichen des S1-Gens lokalisiert, was eine alleinige Amplifikation des jeweiligen Genotyps ermöglichte, während weitere Genotypen nicht detektierbar waren. Mit einer Nachweisgrenze von zehn Kopien pro Reaktion zeigte sich die QX RT-PCR in weiteren Untersuchungen zur Validierung ähnlich sensitiv wie die universelle RT-qPCR. Die Spezifität des Verfahrens wurde darüber hinaus durch die Sequenzanalyse erhaltener PCR Produkte bestätigt. Damit stellt die QX RT-PCR ein sensitives und spezifisches Verfahren für die Routinediagnostik dar. Die Vorteile in der Anwendung einer typspezifischen RT-PCR liegen

zum einem in der Schnelligkeit, zum anderen in der hohen Spezifität des Nachweises. Beides sind besonders wichtige Kriterien für die IBV Routinediagnostik. Nachteile ergeben sich daraus, dass Mutationen im Primerbereich zu einer nicht ausreichenden Primerhybridisierung und damit zu fehlerhaften Ergebnissen der typspezifischen RT-PCR führen können (Cavanagh et al., 1999). Ebenso besteht die prinzipielle Gefahr einer nicht ausreichenden Spezifität (Cavanagh et al., 1999). Darüber hinaus werden Doppel- und Mischinfektionen mit anderen IBV Genotypen mittels dieser Methode nicht erkannt (Meulemans et al., 2001). Vor dem Hintergrund einer hohen Sequenzhomologie von IBV QX Feldstämmen aus Deutschland über mehrere Jahre (Lüschow, persönliche Mitteilung) und der besonderen Bedeutung der Genotypen 4/91 und QX in Deutschland (Worthington et al., 2008) wurden diese Nachteile jedoch als tolerabel eingestuft.

Die Differenzierung weiterer IBV Genotypen sollte als routinetaugliche Methode ebenfalls mit einem möglichst schnellen und daneben auch relativ kostengünstigen Verfahren erfolgen. Aus diesen Gründen wurde in einem ersten Schritt eine konventionelle RT-PCR unter Nutzung von Primern etabliert (Kwon et al., 1993; Yu et al., 2001b; Bochkov et al., 2006; Dolz et al., 2006), die, lokalisiert in relativ konservierten Regionen, die hypervariablen Regionen im S1 Gen umschlossen. Die angeschlossene REA unter Verwendung von drei Enzymen sollte die Differenzierung anhand der erhaltenen Spaltmuster ermöglichen. Nur für Fälle, in denen die REA zu keinem Ergebnis führte, war eine direkte Sequenzierung der PCR Produkte geplant. Obwohl dieses System bei den meisten zur Verfügung stehenden Genotypen erfolgreich anzuwenden war, zeigte sich bei der ersten Untersuchung von IBV positiven Feldproben eine nicht ausreichende oder fehlende Amplifikation in einigen Fällen. Um die genetische Variabilität von IBV Feldstämmen zu berücksichtigen, wurde das Verfahren daher um einen weiteren Primer und einen Satz verschiedener nested Primer erweitert. Insgesamt ergab sich damit ein System, welches in der Lage war, acht verschiedene IBV Genotypen bzw. Stämme auf mehreren Ebenen zu differenzieren. Lediglich die beiden Impfstämme H52 und H120, bei denen es sich um denselben Stamm in unterschiedlicher Passagezahl handelt (Bijlenga, 1960; Hoekstra und Rispens, 1960), konnten nicht unterschieden werden.

Das etablierte System wurde in einem weiteren Schritt auch auf seine Anwendbarkeit auf Feldproben überprüft. Dazu wurden IBV positive und QX negative Proben unter Verwendung der verschiedenen Primer bzw. nested Primerkombinationen, die bei negativen Ergebnissen sukzessive angewendet wurden, untersucht. Mehr als die Hälfte der Proben konnte bereits mit der ersten Primerkombination S1Oligo5/Srev und nachfolgender REA differenziert werden. Bei weiteren Proben war die Verwendung zusätzlicher Primerkombinationen und in einigen Fällen auch die nachfolgende Sequenzierung aufgrund nicht zuordenbarer Spaltmuster nötig, um eine Differenzierung zu ermöglichen. Dabei zeigte die Sequenzierung in einigen Fällen das Vorliegen von Varianten eines bekannten Genotyps,

---

wie z. B. einer 4/91 Variante. Bei einzelnen Proben führte jedoch auch die Sequenzanalyse, trotz auswertbarer Sequenzen, zu keinem eindeutigen Ergebnis, da keine ausreichenden Homologien zu bekannten Genbanksequenzen ermittelt wurden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Ergebnissen einer russischen Studie, in der bei 32 % der mittels Sequenzanalyse untersuchten Isolate IBV Varianten nachgewiesen wurden, die nicht einzuordnen waren (Bochkov et al., 2006). Darüber hinaus konnte bei einigen Proben trotz Verwendung unterschiedlicher Primerkombinationen keine IBV RNA amplifiziert werden. Grund dafür ist vermutlich die hohe genetische Variabilität innerhalb der S1 Untereinheit, die eine effiziente Primerhybridisierung, insbesondere bei geringen Viruslasten erschwert. Eine Überarbeitung und Anpassung der Primersequenzen könnte möglicherweise die Effizienz des Systems erhöhen.

Eine abschließende Beurteilung, ob REA oder Sequenzierung das geeignete Mittel zur Differenzierung darstellt, ist schwierig. Die REA stellt im Rahmen der Routinediagnostik sicher die schnellere und auch kostengünstigere Methode dar. Sie kann darüber hinaus Hinweise auf das Vorliegen von Mischinfektionen liefern, die in der Sequenzierung ohne vorherige Klonierung lediglich zu nicht auswertbaren Ergebnissen führt. Demgegenüber bietet die Sequenzierung prinzipiell ein höheres Maß an Sicherheit und ermöglicht das Aufzeigen von Varianten, die mittels REA nicht sicher zu erfassen sind. Ferner erlaubt die Sequenzierung die weitere Durchführung umfassender phylogenetischer Analysen, wie in anderen Publikationen beschrieben (Gelb et al., 2001; Ignjatovic et al., 2006; Jackwood et al., 2007; Villarreal et al., 2007b; Dolz et al., 2008), während die REA ausschließlich der Identifizierung zirkulierende IBV Genotypen und Stämme dient (Kwon et al., 1993). Die Kombination beider Methoden, wie in dieser Arbeit beschrieben, unter verstärkter Einbeziehung der Sequenzierung bei Nachweis von eher selten auftretenden Genotypen, könnte für diagnostische Aspekte den geeigneten Mittelweg darstellen. Letztendlich muss das genutzte System jedoch den eigenen Laboranforderungen angepasst werden.

Hinsichtlich des Vorkommens der verschiedenen Genotypen zeigte sich, dass neben IBV QX und 4/91, auf die im zweiten Teil der Arbeit gesondert eingegangen wird, der Massachusetts Typ sowie D274 nachgewiesen werden konnten. Dabei wurden insbesondere verschiedene Vertreter des Massachusetts Typs wie IBV H120 bzw. H52 und M41 detektiert.

Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit der Studie von Worthington et al. (2008), die bei der Untersuchung von Proben aus Deutschland, Belgien, Frankreich und Holland vergleichbare Ergebnisse festgestellt haben, sowie mit den Untersuchungen von Handberg et al. (2009) in Dänemark und von Bochkov et al. (2006) in Russland. In Spanien und England wurde dagegen IBV QX bis zum Jahr 2006 nicht detektiert (Worthington et al., 2008). Dabei kann der Nachweis von Massachusetts Stämmen, 4/91 und D274 auch auf dem Nachweis von Impfstämmen beruhen. So sind in Deutschland derzeit 24 Impfstoffe gegen IBV zugelassen, die alle auf einem dieser drei Genotypen beruhen (Paul Ehrlich

Institut, 2011). Demgegenüber handelt es sich bei IBV QX und Italy02 in jedem Fall um Feldstämme.

Der Nachweis von zwei IBV Varianten, die in der Sequenzanalyse nicht eindeutig zugeordnet werden konnten, aber die größte Ähnlichkeit zu V1397 zeigten, könnte für ein Zirkulieren von Varianten dieses Genotyps sprechen. Auch Monne et al. (2009) detektierten zwei Feldproben aus England und Holland mit 92%iger bzw. 96%iger Homologie zu V1397. Entsprechend anderer Studien wurde D1466 in Deutschland selten nachgewiesen (Philipp und Voss, 2006; Worthington et al., 2008). Das Vorkommen weiterer Genotypen wie Italy02 und B1648, die bereits in Deutschland nachgewiesen wurden (Philipp und Voss, 2005; Worthington et al., 2008), konnte in der vorliegende Studie nicht festgestellt werden.

Um einen Überblick über die epidemiologische Situation der IBV Infektion in Deutschland zu bekommen, beschäftigte sich der zweite Teil der vorliegenden Arbeit mit einer Auswertung der in den Jahren 2004 bis 2009 durchgeführten IBV Routinediagnostik. Dabei wurden ein besonderer Schwerpunkt auf den Nachweis der Genotypen IBV 4/91 und IBV QX gelegt. Insgesamt konnte in 42,5 % der 576 untersuchten Einsendungen IBV nachgewiesen werden. Aufgrund mangelhafter oder komplett fehlender Informationen zum Vorbericht, einschließlich Angaben zum Impfstatus der untersuchten Bestände, konnte leider nicht unterscheiden werden, ob es sich dabei um nachgewiesene Feld- oder Impfstämme handelte.

Dieses Ergebnis steht jedoch in Übereinstimmung mit dem durchschnittlichen IBV Nachweis in 617 untersuchten Proben aus verschiedenen europäischen Ländern, einschließlich Deutschland, von ca. 44 % im Jahr 2008 (Monne et al., 2009). Dabei wurden in dieser Veröffentlichung keine detaillierten Angaben zu Proben aus Deutschland gemacht. In einer weiteren Untersuchung unter Einbeziehung von über 4000 Proben aus verschiedenen westeuropäischen Ländern zwischen den Jahren 2002-2006 ergab sich eine höhere Nachweisrate von 59 % (Worthington et al., 2008). Für Deutschland lag der Anteil positiver Proben nach Untersuchung von 655 Proben bei ca. 53 % (Worthington et al., 2008). Auch eine russische Studie zwischen den Jahren 1998 und 2002 belegte eine ähnliche Nachweisrate von 50 % (Bochkov et al., 2006). Insgesamt betrachtet ist ein Vergleich jedoch schwierig, da in den verschiedenen Veröffentlichungen Proben unterschiedlicher Herkunft aus verschiedenen Zeiträumen untersucht wurden. So wurden auch im Rahmen der eigenen Untersuchungen in den verschiedenen Jahren sehr unterschiedliche Nachweisraten ermittelt.

Bei Analyse der selbst erhobenen jährlichen Nachweisraten sind sowohl die Untersuchungsgründe als auch die untersuchten Nutzungsrichtungen mit zu berücksichtigen. So wurden zu Beginn des Studienzeitraums vermehrt Mastelertiere ohne Verdacht des Vorliegens einer IBV-Infektion zu Monitoringzwecken untersucht (Lüschow, persönliche Mitteilung). Dieser Aspekt in Kombination mit den hohen Anforderungen an

---

Hygienestandards in derartigen Betrieben (Hafez, 2007; Lister, 2008) könnte die niedrigen Nachweisraten mit 15 % bzw. 28 % in den Jahren 2004 und 2005 erklären. Die darauf folgenden zwei Jahre sind nur schwerlich vergleichbar, da insgesamt nur wenige Proben zur Untersuchung eingesandt wurden. Demgegenüber kam es zum Ende des Untersuchungszeitraums im Jahr 2009 zu einem deutlichen Anstieg eingesandter Proben, wobei es sich gleichermaßen hauptsächlich um Proben von Broilern als auch von Legehennen mit klinischem Verdacht auf eine IBV Infektion handelte. Die damit einhergehende hohe Nachweisrate von mehr als 55 % in diesem Jahr korrelierte dabei insbesondere mit der hohen Nachweisrate bei Broilern.

Dies ist zum einen dadurch erklärbar, dass aufgrund der kurzen Lebensdauer von Broilern die Zeitspanne zwischen der generell üblichen Impfung und Probenentnahme kurz ist. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Zimmermann und Hafez (2001), die zeigten, dass in Abhängigkeit von der Applikationsmethode der verwendete Impfstamm mehr als 50 Tage p.i. mittels PCR nachzuweisen war, muss davon ausgegangen werden, dass es sich insbesondere bei Broilern bei einem Teil der positiven Ergebnisse um die Detektion von Impfstämmen handelte. So beruhen insbesondere Nachweise von viraler RNA des Massachusetts Typs auf dem weit verbreiteten Einsatz von Impfstoffen (Cavanagh und Naqi, 2003; Worthington et al., 2008; Monne et al., 2009). Leider stehen zurzeit keine geeigneten diagnostischen Methoden zur Verfügung, um IBV Feld- und Impfstämme weitere Genotypen wie z. B. 4/91 zu differenzieren. Worthington et al. (2008) versuchten dieser Problematik durch Sequenzvergleiche entgegenzutreten. So sprechen in ihren Untersuchungen Sequenzhomologien von 100 % der üblich verwendeten Impfstämme für das Vorliegen von Impfstämmen, während Homologien von < 99 % auf das Vorliegen von Feldstämmen hinweisen. In wie weit dies den tatsächlichen Gegebenheiten entspricht, kann nicht beurteilt werden.

Darüber hinaus sind Broiler aufgrund ihrer niedrigeren Immunkompetenz für Feldinfektionen empfänglicher als andere Nutzungsrichtungen (De Wit, 2000) und verfügen infolge der häufig nur einmalig durchgeführten Impfung über einen weniger breiten Impfschutz gegenüber anderen Varianten (Cook et al., 1999; Cavanagh und Naqi, 2003). So ist bei Broilern ein Nachweis von bis zu vier unterschiedlichen IBV Stämmen möglich (Cavanagh et al., 1999). Ein weiterer wichtiger Grund für die hohen IB Nachweisraten bei Broilern in den vergangenen Jahren ist die hohe Prävalenz des Genotyps IBV QX, auf den später ausführlich eingegangen wird.

Demgegenüber wurden bei Legehennen deutlich niedrigere IBV Nachweisraten erreicht. Dies könnte auf einen besseren Immunstatus der Legehennen aufgrund der mehrfach erfolgten Impfungen während der Aufzuchtphase beruhen (Woernle und Hafez, 1992). Des Weiteren ist infolge der längeren Lebenszeit die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von Impfstämmen wesentlich geringer als beim Broiler.

Bei der Untersuchung der geographischen Verteilung ergaben sich zwischen den verschiedenen Bundesländern Nachweisraten zwischen ca. 31 % und 52 %. Auch hier könnte die untersuchte Nutzungsrichtung einen gewissen Einfluss auf die ermittelten Ergebnisse haben. So wurde die höchste Nachweisrate in Sachsen erzielt, wo vor allem Proben von Broilern untersucht worden waren, während in Brandenburg, das die niedrigste Nachweisrate aufwies, überwiegend Legehennen in die Untersuchungen einbezogen worden waren.

Die weitere Analyse der zurzeit wichtigsten in Deutschland zirkulierenden Genotypen IBV 4/91 (Philipp und Voss, 2005) und QX (Worthington et al., 2008) belegt, dass IBV 4/91 über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg in knapp einem Viertel der IBV positiven Einsendungen detektiert werden konnte. Dabei zeigten sich über den Untersuchungszeitraum hinweg deutliche Schwankungen. Zum Ende der Untersuchungen im Jahr 2009 ist ein deutlicher Rückgang des Anteils IBV 4/91 positiver Proben vor allem bei Legehennen zu beobachten. Ein möglicher Grund dafür könnte in einem geringeren Einsatz von IBV 4/91 Impfstoffen liegen. Informationen dazu liegen allerdings nicht vor.

Im Gegensatz zum Nachweis von IBV 4/91 beruht der Nachweis von IBV QX in jedem Fall auf einer Feldinfektion, da im Untersuchungszeitraum kein kommerzieller IBV QX Impfstoff zur Verfügung stand. Die weite Verbreitung dieses Genotyps in Europa seit dem Jahr 2004 ist durch eine Vielzahl verschiedener Studien belegt (Beato et al., 2005; Landman et al., 2005; Beato et al., 2006; Domanska-Blicharz et al., 2006a; Domanska-Blicharz et al., 2006b; Philipp und Voss, 2006; Zanella et al., 2006; Gough et al., 2008; Worthington et al., 2008; Handberg et al., 2009; Monne et al., 2009; Krapez et al., 2010).

Auch im Rahmen der eigenen Untersuchungen konnte IBV QX, der in einer anderen Untersuchung erstmalig in Proben aus dem Jahr 2004 in Deutschland nachgewiesen wurde (Worthington et al., 2008), in mehr als der Hälfte aller IBV positiven Einsendungen detektiert werden. Dies unterstreicht die schnelle und weite Ausbreitung des Genotyps in Deutschland, analog zu den Ergebnissen von Worthington et al. (2008). Auch in den selbst durchgeführten retrospektiven Untersuchungen zu diesem Genotyp fanden sich positive Ergebnisse bereits im Jahr 2004. Danach kam es zu einem beinahe kontinuierlichen Anstieg, so dass im Jahr 2008 nahezu 70 % der positiven Proben QX positiv waren.

Dabei waren in besonderem Maße Broilerbestände und erst zum Ende des Untersuchungszeitraums auch vermehrt Legehennenbestände betroffen. Schon seit Längerem ist bekannt, dass Mehrfachimpfungen mit Stämmen des Massachusetts-Typs zum Aufbau einer Kreuzimmunität und damit zu einem ausreichend belastbaren Schutz vor den meisten IBV Stämmen führen können (Winterfield et al., 1976; Lohr, 1986). Dieser Aspekt, eventuell verstärkt durch eine zusätzliche Impfung mit Variantenstämmen, könnte eine mögliche Ursache für die geringere Betroffenheit von Legehennen darstellen. Neue Untersuchungen belegen, dass die Impfung mit der Kombinationen IB Primer (H120 + D274)

---

und 4/91 (Worthington und Jones, 2006) oder Ma5 (Massachusetts-Typ) und 4/91 (Terregino et al., 2008) die wirtschaftlichen Verluste der QX Infektion sowohl bei Broilern als auch bei Legehennen reduzieren kann. Eine alleinige Impfung mit IBV H120 bietet dagegen wenig Schutz (Sun et al., 2011).

In nahezu 1/10 der IBV positiven Einsendungen konnte sowohl IBV 4/91 als auch QX nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass Mischinfektionen mit bis zu vier Impf- und Feldgenotypen in derselben Herde nachgewiesen werden konnten (Cavanagh et al., 1999). Dabei ist das Entstehen neuer Genotypen infolge Rekombination nicht auszuschließen. Mischinfektionen in ähnlicher Höhe wurden bereits in Belgien beschrieben (Meulemans et al., 2001). Molekulare Untersuchungen in Frankreich zwischen den Jahren 2005 und 2007 belegen ebenfalls das Vorhandensein von Doppelinfektionen mit unterschiedlichen IBV Genotypen (Finalab, 2010).

Hinsichtlich der geographischen Verteilung ergaben sich für IBV 4/91 unabhängig von der untersuchten Nutzungsrichtung relativ ähnliche Anteile in den verschiedenen Bundesländern. Für IBV QX wurden dagegen sehr unterschiedliche Anteile ermittelt, mit einem deutlich verstärkten Nachweis in Niedersachsen. Eine Bewertung ist jedoch insgesamt schwierig, da vielfältige Faktoren hinsichtlich der Probenherkunft einen Einfluss auf diese Ergebnisse haben könnten. So könnten zwar die hohen IBV QX Anteile in Niedersachsen mit der Anzahl untersuchter Broilerproben korrelieren, dies lässt sich jedoch nicht auf andere Bundesländer wie Sachsen und Baden-Württemberg übertragen.

Die Ergebnisse der eigenen epidemiologischen Untersuchungen und anderer europäischer Prävalenzstudien unterstreichen die Bedeutsamkeit des neu aufgetretenen Genotyps IBV QX. Um Kenntnisse über seine Pathogenität und weitere Eigenschaften zu gewinnen, wurde im letzten Teil der Arbeit ein Infektionsversuch durchgeführt. Um eine möglichst praxisrelevante Prüfung zu ermöglichen, wurde der Versuch unter Berücksichtigung der eigenen Beobachtung, dass Broiler im Vergleich zu anderen Nutzungsrichtungen stärker betroffen sind, mit SPF Broilerküken und einem, von Broilern isolierten, deutschen Feldisolat durchgeführt.

Erste ursprüngliche Berichte über IBV QX stammen aus China, wo der Erreger als Ursache einer Drüsenmagenentzündung bei Hühnern beschrieben wurde (Wang et al., 1998). In Europa sowie in Deutschland ist IBV QX vor allem mit Atemwegssymptomen, Legeleistungsabfällen, dem „Falsche Leger Syndrom“, nasser Einstreu und Durchfall infolge Nierenschädigungen und erhöhter Mortalität assoziiert (Ladman et al., 2006; Worthington et al., 2008; Block, 2009).

Während in den eigenen Untersuchungen respiratorische Symptome nur bei wenigen Tieren auftraten, waren bei den meisten Tieren klinische Anzeichen einer Nephritis wie Mattigkeit, Depression und Durchfall bei einer insgesamt mäßigen Gesamtmortalität zu

beobachten. Ähnliche Beobachtung wurden auch von Sun et al. (2011) gemacht. Demgegenüber konnte in zwei anderen tierexperimentellen Studien mit IBV QX Isolaten aus verschiedenen Ländern eine ausgeprägtere respiratorische Symptomatik, jedoch ohne assoziierte Mortalität, induziert werden (Terregino et al., 2008; Benyeda et al., 2009). Dies könnte zum einem auf die unterschiedlich verwendeten Stämme und Passagezahlen aber auch auf verschiedene Bedingungen im Tierversuch selbst, wie Infektionsdosis und Art sowie Alter der verwendeten Tiere, zurückzuführen sein.

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung standen in Übereinstimmung mit der beobachteten klinischen Symptomatik insbesondere Veränderungen des Urogenitaltraktes in Form von Nierenschwellungen und Uratablagerungen im Vordergrund (Sun et al., 2011). Diese waren bereits ab dem 4. Tag p.i. zu beobachten. Der Respirationstrakt war dagegen kaum betroffen. Auch von Benyeda et al. (2009) wurden nach IBV QX Infektion Veränderungen der Nieren beobachtet, allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt. Dies könnte auf einen ausgeprägten Nierentropismus des eigenen Isolats hindeuten.

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Nephritis-Nephrose-Syndroms und der IBV Infektion wurde bereits in den 60er Jahren erkannt (Winterfield und Hitchner, 1962; Cumming, 1963). Ignjatovic et al. (2002) versuchten auf Basis der beobachteten klinischen Nephritisanzeichen, der Mortalität sowie der pathologisch-anatomischen und histologischen Nierenveränderungen eine Einschätzung der Nephropathogenität australischer IBV Stämme nach experimenteller Infektion vorzunehmen. So wurden neben den respiratorischen Stämmen die nephropathogenen Stämme in die Kategorien hoch, mittelgradig und niedrig pathogen eingeteilt. Die Anwendung dieses Schemas auf das in den eigenen Untersuchungen verwendete IBV QX Isolat erlaubt die eindeutige Klassifizierung als nephropathogener Stamm. Hinsichtlich der Klinik und der pathologisch anatomischen Veränderungen ergab sich eine mittelgradige Nephropathogenität, während die Mortalitätsrate eher für eine niedrige Pathogenität sprach.

Makroskopisch sichtbare Veränderungen des Legedarms bei den weiblichen Tieren, wie bei Benyeda et al. (2009) beschrieben, konnten in den eigenen Untersuchungen nicht beobachtet werden. Allerdings traten die bei Benyeda et al. (2009) festgestellten Veränderungen (Dilation und Flüssigkeitsansammlung im Legedarm) nur bei vereinzelt Tieren und ohne eindeutige histologische Veränderungen und messbare Virusreplikation im Legedarm auf. Daher vermuten die Autoren keinen direkten viralen Effekt, sondern eher eine postembryonale Entwicklungsstörung des Legedarms infolge der sehr frühen Virusinfektion (Benyeda et al., 2009).

Die durchgeführten Untersuchungen zur Virusausscheidungen von IBV QX belegen in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Alexander und Gough (1977) eine längere und mit höheren Viruslasten verbundene Ausscheidung über den Kot als über die Trachea. Auch in

---

weiteren Studien konnte IBV im Kot noch nach über 100 bzw. 200 Tagen p.i. detektiert werden (Woernle, 1961; Alexander und Gough, 1978), während aus Trachealtupfern bzw. Trachea ein Nachweis bis längstens 30 Tage p.i. möglich war (Fabricant und Levine, 1951; Hofstad und Yoder, 1966; Cook, 1968; Alexander und Gough, 1977; Benyeda et al., 2009).

Der Nachweis von IBV im Kot impliziert die Replikation des Virus im Darmtrakt bzw. mit in Verbindung stehenden Organen wie z. B. in den Zäkaltonsillen (Alexander und Gough, 1977). In den eigenen Untersuchungen ergab sich zum Ende des Versuches 28 Tage p.i., mit Ausnahme der Lunge, ein positiver Nachweis analog zu vorherigen Untersuchungen (Alexander und Gough, 1977) nur noch in den Zäkaltonsillen. Allerdings sprechen die dort im Vergleich zu in Kloakentupfern nachgewiesenen Viruslasten dafür, dass auch eine Replikation im Darmtrakt stattgefunden haben muss. Die in den Nieren ermittelten negativen Ergebnisse stehen dagegen der von Chong und Apostolov (1982) dargelegten Vermutung entgegen, dass die Virusausscheidung über die Nieren den Nachweis von IBV im Kot bedingt. Die höchste Virusausscheidung zeigte sich analog zur Virusausbreitung in unterschiedlichen Organen sowohl in Tracheal- als auch in Kloakentupfern am 6. Tag p.i..

Vergleichsuntersuchungen zur Virusreisolierung aus Kloakentupfern unterstreichen, dass die RT-qPCR eine geeignete Methode zur Überprüfung der Virusausscheidung darstellt. Auch wenn sich IBV typische Embryonenveränderungen nur bei Untersuchung des Kloakentupferpools mit der ursprünglich höchsten Viruslast zeigten, belegten die anschließend durchgeführten PCR Untersuchungen bei einer Erniedrigung der Ct-Werte das Vorhandensein vermehrungsfähigen Viruses in allen untersuchten Pools. Ferner ermöglicht diese Technik, auch bei nicht quantitativen Läufen eine Einschätzung der vorliegenden Viruslasten, ohne Durchführung zeitaufwendiger Virustitrationen. Warum es nicht in allen Pools zu den zuvor beobachteten Embryonenveränderungen kam, kann nicht abschließend beurteilt werden. Virustiter und erneute Passage im Tier könnten hier eine Rolle spielen. Insbesondere bei Feldstämmen sind Embryonenveränderungen erst nach Durchführung mehrerer Passagen sichtbar (De Wit, 2000). Clarke et al (1972) konnten jedoch bei einer Reihe verschiedener Feldstämmen zeigen, dass diese auch nach Durchführung von drei Passagen keine Verzweigung induzierten, obwohl der anschließende IBV Antigennachweis zu einem positiven Ergebnis führte.

In einem weiteren Schritt wurde die Ausbreitung und Nachweisbarkeit von IBV QX in verschiedenen Organen im Organismus näher untersucht. Der Nachweis des Virus in allen untersuchten Organtypen, darunter auch Thymus und Leber als Nicht-Zielorgane, bereits am 2. Tag p.i., unterstreicht den bereits in anderen Untersuchungen belegten weiten Gewebstropismus (Ambali und Jones, 1990; Benyeda et al., 2009) und die schnelle Ausbreitung im Körper. So konnte zu diesem Zeitpunkt bereits auch eine deutliche Virusausscheidung in Kloakentupfern nachgewiesen werden. Um detaillierte Kenntnisse über die Ausbreitung zu gewinnen, wäre allerdings ein früherer Entnahmezeitpunkt notwendig

gewesen. Die höchsten Viruslasten in allen Organtypen am 6. Tag p.i. korrelieren mit den aus den Tupferproben ermittelten Ergebnissen. Auch Benyeda et al. (2009) wiesen bereits zwischen dem 4. und 7. Tag p.i. die jeweilig höchsten QX Virustiter in den untersuchten Organtypen nach.

Interessanterweise zeigte sich trotz der geringen Ausprägung respiratorischer Symptome und fehlender pathologisch anatomischer Veränderungen ein Nachweis von QX in der Lunge einzelner Tiere bis zum Versuchsende, während in den Nieren kein Virus mehr nachweisbar war. Die dabei detektierten Viruslasten waren jedoch deutlich niedriger als zu den vorherigen Untersuchungszeitpunkten. Demgegenüber ergab sich in einer anderen Studie verschiedener IBV QX Isolate eine maximale Nachweisdauer in der Niere von bis zu 42 Tagen, während in der Lunge bereits am 28. Tag p.i. keine virale RNA zu detektieren war (Benyeda et al., 2009). In wie weit versuchsbedingte Einflussfaktoren wie z. B. Art und Alter der Tiere, Infektionsdosis und -weg, aber auch die verwandte Nachweismethodik eine Rolle spielen, kann hier nicht geklärt werden. Insgesamt gesehen sprechen jedoch die in verschiedenen Studien unter Nutzung verschiedener Methoden ermittelten Ergebnisse dafür, dass es in den meisten Organen nach längstens 30 Tagen zu einer Virustilgung kommt (Hofstad und Yoder, 1966; Benyeda et al., 2009). Längere Nachweise in einzelnen Fällen sind sowohl im Kot als auch in Zäkaltonsillen möglich (Alexander und Gough, 1977; 1978; Benyeda et al., 2009). Hinsichtlich ihrer Diagnostiktauglichkeit zeigt sich auf Basis der hier ermittelten Ergebnisse, dass insbesondere zu einem späteren Zeitpunkt nach Infektion Kloakentupfer das am besten geeignete Untersuchungsmaterial zum Nachweis einer IBV QX Infektion darstellen. Demgegenüber sind Organproben nur in einem relativ schmalen Zeitfenster zur Diagnostik geeignet.

Erste Antikörper gegen IBV können mittels ELISA bereits sieben Tage nach Infektion bzw. Vakzination nachgewiesen werden (De Wit, 2000). In den eigenen Untersuchungen wurden unter Verwendung eines kommerziellen Testkits, der einen gruppenspezifischen Antikörpernachweis erlaubte, erste Antikörper bei einem einzelnen Tier 14 Tage p.i. festgestellt. Bis zum Ende des Versuchs konnten bei ca. 50 % der Tiere Antikörper nachgewiesen werden, allerdings mit insgesamt niedrigen Titern. Auch in Untersuchungen von Benyeda et al. (2009) induzierten mit Ausnahme eines chinesischen Isolats die meisten verwandten IBV QX-Isolate Antikörper auf einem insgesamt niedrigen Niveau. Eine mögliche Ursache für die insgesamt schwache Antikörperbildung könnte am Alter der infizierten Tiere liegen. So ist aufgrund der geringen Immunkompetenz von sehr jungen Tieren, die humorale Immunantwort bei einer sehr frühen Infektion niedriger ausgeprägt (De Wit, 2000). Dies wird unterstrichen von den Untersuchungen von Ignjatovic und Galli (1995), die zeigten, dass die Infektion von SPF Küken am 1. und 7. Lebenstag zu deutlich niedrigeren Antikörpertitern führte als am 14. Lebenstag. Eventuell war auch das gewählte Zeitfenster zu kurz, um eine höhere Antikörperbildung zu detektieren. Daher wären zur Ermittlung weiterer Ursachen

---

weiterführende Untersuchungen eventuell auch unter Einbeziehung der zellulären Immunantwort erforderlich.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

### **Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV): Molekularbiologische Untersuchungen zur Diagnostik und zum Vorkommen sowie zur Pathogenität des Genotyps IBV QX in spezifisch pathogenfreien (SPF) Broilern**

Zum universellen und routinemäßigen Nachweis des Infektiösen Bronchitis Virus (IBV) wurde im ersten Teil der vorliegenden Doktorarbeit eine duplex Real-time Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) unter Verwendung einer heterologen internen Kontrolle (IK) etabliert. Dabei ermöglichte die Lokalisation der IBV spezifischen Primer und Sonde innerhalb hochkonservierter Bereiche des Matrixprotein- Gens eine sichere Detektion verschiedener IBV Genotypen und Stämme. Als IK diente eine enhanced green fluorescent protein (EGFP) in vitro RNA. Durch Zugabe der IK direkt zum Probenmaterial vor der extraktion konnten falsch negative Ergebnisse auf Grund fehlerhafter RNA-Extraktion und / oder infolge von PCR Inhibitoren sicher ausgeschlossen werden. Bei der Überprüfung der Sensitivität anhand eines RNA *in vitro* Standards ergab sich eine Nachweisgrenze von 20 Kopien/Reaktion. Die Spezifität des Verfahrens wurde durch Untersuchung weiterer viraler bzw. bakterieller geflügelrelevanter Atemwegserreger und SPF Trachealtupfernproben von SPF Hühnern belegt. Die diagnostische Anwendbarkeit des Testverfahrens wurde darüber hinaus durch Untersuchung von Feldproben bestätigt. Dabei konnte die IK in IBV negativen Feldproben sicher amplifiziert werden, während sich bei IBV positiven Proben kein negativer Einfluss auf die IBV Amplifikation ergab.

Die Genotypisierung nachgewiesener IBV Stämme erfolgte in einem ersten Schritt anhand zweier typspezifischer RT-PCRs zum Nachweis von IBV 4/91 und IBV QX. Zur weiteren Differenzierung wurde ein System auf Basis verschiedener RT-PCRs und nested-PCRs, die verschiedene Fragmente innerhalb des S1 Protein Gens amplifizieren, mit nachfolgender Restriktionsenzymanalyse (REA) und Sequenzanalyse entwickelt. Bei der Untersuchung von Feldproben konnten mittels des entwickelten Differenzierungssystems neben IBV 4/91 und QX verschiedene Vertreter des Massachusetts Genotyps als auch der Genotyp D274 erfolgreich differenziert werden.

In zweiten Teil der Arbeit erfolgte eine epidemiologische Auswertung des im Rahmen der IBV Routinediagnostik in den Jahren 2004 bis 2009 eingesandten Probenmaterials. Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg wurde IBV in 42,5 % der untersuchten Proben nachgewiesen, wobei eine Unterscheidung zwischen Feld- und Impfstämmen nicht erfolgen konnte. Bei Analyse der jährlichen Nachweisraten waren insbesondere Untersuchungsgründe als auch untersuchte Nutzungsrichtungen zu berücksichtigen. So korrelierte die relativ hohe Nachweisrate im Jahr 2009 insbesondere mit der hohen Nachweisrate bei Broilern. Eine weitere Analyse der zurzeit wichtigsten in Deutschland zirkulierenden Genotypen IBV 4/91 und QX unterstreicht die derzeit besondere Bedeutung des Genotyps IBV QX, der in mehr als der Hälfte der positiven Einsendungen mit insgesamt

---

eher steigender Tendenz detektiert werden konnte. Davon waren in besonderem Maße Broilerbestände und erst zu Ende des Untersuchungszeitraums auch vermehrt Legehennenbestände betroffen. Für den Genotyp IBV 4/91 zeigte sich dagegen zu Ende der Untersuchungen ein deutlicher Rückgang des Anteils positiver Proben insbesondere bei Legehennen.

Im letzten Teil der Arbeit wurden *in vivo* Untersuchungen zur Pathogenität des Genotyps IBV QX bei SPF Broilerküken durchgeführt. Dabei waren nach okulonasaler Infektion sowohl klinisch als auch pathologisch anatomisch Anzeichen einer Nephritis zu beobachten, was eine Klassifizierung des Isolats als nephropathogenen Stamm erlaubte. Untersuchungen zur Ausbreitung des Virus im Organismus und zur Virusausscheidung mittels RT-qPCR belegten darüber hinaus den weiten Gewebstropismus als auch die schnelle Ausbreitung von IBV QX im Körper in Kombination mit einer wiederum schnellen Virustilgung in betroffenen Organen. Hinsichtlich der Virusausscheidung fand sich eine längere und mit höheren Viruslasten verbundene Ausscheidung über den Kot als über den Respirationstrakt. In Anbetracht Ihrer Diagnostiktauglichkeit sprechen diese Ergebnisse damit dafür, dass insbesondere zu einem späteren Zeitpunkt nach Infektion Kloakentupfer das beste Untersuchungsmaterial zum Nachweis von IBV QX darstellen. Organproben sind dagegen nur in einem relativ schmalen Zeitfenster zur Diagnostik geeignet. Dabei ist die RT-qPCR ein geeignetes diagnostisches Verfahren, welches neben dem Nachweis auch eine Quantifizierung der Viruslast ermöglicht.

## 7. SUMMARY

### **Infectious Bronchitis virus (IBV): Molecular biological investigations on diagnosis and prevalence as well as on the pathogenicity of the genotype QX IBV in specific pathogen free (SPF) broilers.**

In the first part of this study a duplex real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) with a heterologous internal control (IC) was established as a tool to detect RNA of the Infectious Bronchitis Virus (IBV) in routine diagnostics. The localization of primers and probe within a highly conserved region of the matrix protein gene allowed a reliable detection of different IBV genotypes and strains. As IC an *in vitro* RNA of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) was used. It was directly added to investigate field samples before RNA extraction in aim to exclude false negative results due to faulty RNA extraction and/or PCR inhibitors. The detection limit of RT-qPCR using an *in vitro* RNA standard was determined to be 20copies/reaction. The specificity of the new method was checked using further avian viral and bacterial respiratory pathogens as well as tracheal swabs from specific pathogen free (SPF) chickens. In addition, the diagnostic applicability of the established method was determined by examination of field samples. While in IBV negative samples a reliable IC amplification was observed, IC did not have a negative influence IC on the amplification of IBV positive samples.

Molecular genotyping of IBV strains was firstly carried out by using two genotype-specific RT-PCRs amplifying the IBV genotypes 4/91 and QX, respectively. For further genotyping a system was developed based on several RT-PCRs and nested PCRs amplifying different fragments within the S1 protein gene coupled with restriction enzyme analysis (REA) and genetic sequencing. By examinations of field samples using this system besides IBV 4/91 and QX genotypes, other genotypes like D274 and Massachusetts as well as some strains belonging to the Massachusetts genotype were successfully differentiated.

In the second part of this study field samples submitted to IBV routine diagnostic between 2004 and 2009 were investigated epidemiologically analyzed. IBV-RNA was detected in 42.5 % of examined samples. However, differentiation between field and vaccine strains could not be achieved. By analysing annual detection rates of IBV several factors should be considered such as the reason of the investigation (monitoring / diagnosis) as well as the type of production (broilers, breeders, layers). The relatively high IBV detection rate in 2009 was correlated with the high detection rate in broilers. The current major circulating genotypes in Germany are 4/91 and QX IBV. The results revealed that the genotype OX is the currently the most detected type and was found in more than 50 % of IBV positive field samples with increasing tendency. Chicken broiler flocks were particularly affected by QXIBV, but in later years the number of affected layer flocks was increased as well. In

contrast, at the same time a clear decline of the detection rate of genotype 4/91 was observed especially in layers.

In the last part of this work an *in vivo* experiment was carried out in SPF broilers to investigate the pathogenicity of an isolate of the IBV genotype QX. After oculo-nasal infection clinical signs and pathological manifestations indicating nephritis were observed. This allowed a classification of this isolate as nephropathogen. The viral dissemination in the organism and its shedding as investigated by RT-qPCR gave evidence for a broad tissue tropism as well as a rapid spread of QX IBV in the body in combination with a rapid viral elimination in the affected organs. The faeces showed a longer and higher viral load in comparison with the respiratory tract. These results of virus shedding suggest that cloacal swabs are the more appropriate material for diagnostic of QX IBV at a later time after infection. In contrast, organ samples are suitable for diagnosis only in a relatively short time interval. Furthermore, RT-qPCR proved to be a suitable diagnostic method not only for detection of IBV but also for quantification of viral load.

**8. LITERATURVERZEICHNIS**

- Abd El Rahman, S., El-Kenawy, A.A., Neumann, U., Herrler, G und Winter, C. (2009): Comparative analysis of the sialic acid binding activity and the tropism for the respiratory epithelium of four different strains of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 38: 41-45.
- Abdel-Moneim, A. S., El-Kady, M. F., Ladman, B. S. und Gelb, J., Jr. (2006): S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virology* 3: 78.
- Abdel-Moneim, A. S., Zlotowski, P., Veits, J., Keil, G. M. und Teifke, J. P. (2009): Immunohistochemistry for detection of avian infectious bronchitis virus strain M41 in the proventriculus and nervous system of experimentally infected chicken embryos. *Virology* p 15.
- Abreu, J. T., Resende, J. S., Flatschart, R. B., Folgueras-Flatschart, A. V., Mendes, A. C., Martins, N. R., Silva, C. B., Ferreira, B. M. und Resende, M. (2006): Molecular analysis of Brazilian infectious bronchitis field isolates by reverse transcription-polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, and partial sequencing of the N gene. *Avian Dis* 50: 494-501.
- Alexander, D. J. und Chettle, N. J. (1977): Procedures for the haemagglutination and the haemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 6: 9-17.
- Alexander, D. J. und Gough, R. E. (1977): Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. *Res Vet Sci* 23: 344-347.
- Alexander, D. J. und Gough, R. E. (1978): A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis virus. *Res Vet Sci* 24: 228-233.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Alvarado, I. R., Villegas, P., Mossos, N. und Jackwood, M. W. (2005): Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Colombia during 2003. *Avian Dis* 49: 494-499.
- Ambali, A. G. und Jones, R. C. (1990): Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 34: 809-817.
- Andreasen, J. R., Jr., Jackwood, M. W. und Hilt, D. A. (1991): Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 35: 216-220.
- Avellaneda, G. E., Villegas, P., Jackwood, M. W. und King, D. J. (1994): In vivo evaluation of the pathogenicity of field isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 38: 589-597.
- Beach, J. R. und Schalm, O. W. (1936): A filterable virus, distinct from that of laryngotracheitis, the cause of a respiratory disease of chicks. *Poult Sci* 15: 199-206.
- Beato, M. S., De Battisti, C., Terregino, C., Drago, A., Capua, I. und Ortali, G. (2005): Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *Vet Rec* 156: 720.

- 
- Beato, M. S., Ortali, G., Bianchi, E., Terregino, C. und Capua, I. (2006): Clinical disease caused by the chinese variant of infectious bronchitis (QXIBV) in broiler and layer farms in northern Italy. In: "V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 157-160.
- Beaudette, F. R. und Hudson, C. B. (1937): Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J Am Vet Med Assoc* 90: 51-58.
- Benyeda, Z., Mato, T., Suveges, T., Szabo, E., Kardi, V., Abonyi-Toth, Z., Rusvai, M. und Palya, V. (2009): Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. *Avian Pathol* 38: 449-456.
- Benyeda, Z., Szeredi, L., Mato, T., Suveges, T., Balka, G., Abonyi-Toth, Z., Rusvai, M. und Palya, V. (2010): Comparative Histopathology and Immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B Serotypes of Infectious Bronchitis Virus Infection in Chickens. *J Comp Pathol* 1-8.
- Bijlenga, G. (1956): Het infectieuze bronchitis virus bij kuikens in Nederland aangetoond met behulp van ei-enting, dierexperimenteel onderzoek en serumneutralisatieproeven. (The infectious bronchitis virus of chicks detected in the Netherlands by means of egg-inoculation, animal experiments and serum neutralisation tests). *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 81: 43-55.
- Bijlenga, G. (1960): Untersuchungen über die Wirksamkeit eines lebenden Impfstoffes gegen die Infektiöse Bronchitis der Hühner mit einem am bebrüteten Hühnerei adaptierten, dem Trinkwasser zugefügte, autochthonen Virus-Stamm (Investigations on the activity of a living vaccine against bronchitis of chickens with an embryonated egg-adapted autogenous virus strain applied in the drinking water. Dissertation. Bern, Schweiz.
- Bijlenga, G., Cook, J. K., Gelb, J., Jr. und de Wit, J. J. (2004): Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathol* 33: 550-557.
- Bing, G. X., Liu, X., Pu, J., Liu, Q. F., Wu, Q. M. und Liu, J. H. (2007): Different genotypes of nephropathogenic infectious bronchitis viruses co-circulating in chicken population in China. *Virus Genes* 35: 333-337.
- Bisgaard, M. (1976): The influence of infectious bronchitis virus on egg production, fertility, hatchability and mortality rate in chickens. *Nord Vet Med* 28: 368-376.
- Block, H. (2009): False layers IB-case report in broiler breeders. In: "VI. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 38-39.
- Bochkov, Y. A., Batchenko, G. V., Shcherbakova, L. O., Borisov, A. V. und Drygin, V. V. (2006): Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathol* 35: 379-393.

- Bochkov, Y. A., Tosi, G., Massi, P. und Drygin, V. V. (2007): Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Virus Genes* 35: 65-71.
- Boltz, D. A., Nakai, M. und Bahra, J. M. (2004): Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Dis* 48: 909-915.
- Boltz, D. A., Zimmerman, C. R., Nakai, M., Bunick, D., Scherba, G. und Bahr, J. M. (2006): Epididymal stone formation and decreased sperm production in roosters vaccinated with a killed strain of avian infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 50: 594-598.
- Bournsnel, M. E. and Brown, T. D. (1984): Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. *Virus Res* 1: 303-313.
- Bournsnel, M. E., Brown, T. D. und Binns, M. M. (1984): Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. *Virus Res* 1: 303-313.
- Box, P. G., Beresford, A. V. und Roberts, B. (1980): Protection of laying hens against infectious bronchitis with inactivated emulsion vaccines. *Vet Rec* 106: 264-268.
- Box, P. G. und Ellis, K. R. (1985): Infectious bronchitis in laying hens: interference with response to emulsion vaccine by attenuated live vaccine. *Avian Pathol* 14: 9-22.
- Box, P. G., Holmes, H. C., Finney, P. M. und Froymann, R. (1988): Infectious bronchitis in laying hens: the relationship between haemagglutination inhibition antibody levels and resistance to experimental challenge. *Avian Pathol* 17: 349-361.
- Broadfoot, D. I., Pomeroy, B. S. und Smith, W. M., Jr. (1956): Effects of infectious bronchitis in baby chicks. *Poult Sci* 35: 757-762.
- Brooks, J. E., Rainer, A. C., Parr, R. L., Woolcock, P., Hoerr, F. und Collisson, E. W. (2004): Comparisons of envelope through 5B sequences of infectious bronchitis coronaviruses indicates recombination occurs in the envelope and membrane genes. *Virus Res* 100: 191-198.
- Burggraf, S. und Olgemoller, B. (2004): Simple technique for internal control of real-time amplification assays. *Clin Chem* 50: 819-825.
- Bushnell, L. D. und Brandly, C. A. (1933): Laryngotracheitis in chicks. *Poult Sci* 12: 55-60.
- Bournsnel, M.E. and Brown, T.D. (1984): Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: a 195-base open reading frame encoded by mRNA B. *Gene* 29 (1-2): 87-92.
- Callison, S., Hilt, D. A. und Jackwood, M. (2005a): Using DNA shuffling to create novel infectious bronchitis virus s1 genes: implications for s1 gene recombination. *Virus Genes* 31: 5-11.
- Callison, S. A., Hilt, D. A., Boynton, T. O., Sample, B. F., Robison, R., Swayne, D. E. und Jackwood, M. W. (2006): Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J Virol Methods* 138: 60-65.
- Callison, S. A., Hilt, D. A. und Jackwood, M. W. (2005b): Rapid differentiation of avian infectious bronchitis virus isolates by sample to residual ratio quantitation using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 124: 183-190.

- 
- Callison, S.A., Jackwood, M.W. und Hilt, D.A. (2001): Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Dis* 45: 492-499.
- Capua, I. und Alexander, D. J. (2004): Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol* 33: 393-404.
- Capua, I., Mawditt, K., Cavanagh, D. & Gough, R.E. (1998). Serological and molecular characterisation of recent infectious bronchitis virus strains from Italy. In "Proceedings of International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus infections in Poultry": Herausgegeben von Kaleta, E.F. Heffels-Redmann, U. Rauschholzhausen, Germany. pp 210-214.
- Capua, I., Minta, Z., Karpinska, E., Mawditt, K., Britton, P., Cavanagh, D. und Gough, R. E. (1999): Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathol* 587-592.
- Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D. und Britton, P. (2005): Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *J Virol* 79: 8065-8078.
- Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D. und Britton, P. (2003): Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J Virol* 77: 9084-9089.
- Cavanagh, D. (1981): Structural polypeptides of coronavirus IBV. *J Gen Virol* 53: 93-103.
- Cavanagh, D. (1983): Coronavirus IBV glycopolypeptides: size of their polypeptide moieties and nature of their oligosaccharides. *J Gen Virol* 64: 1187-1191.
- Cavanagh, D. (1995): The coronavirus surface protein. In: "*The Coronaviridae*". Herausgegeben von Siddell, S.G. Plenum Press, New York, 73-113.
- Cavanagh, D. (2003): Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol* 32: 567-582.
- Cavanagh, D. (2005): Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 34 (6): 439-448.
- Cavanagh, D. (2007): Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res* 38: 281-297.
- Cavanagh, D., Davis, P. J. und Mockett, A. P. (1988): Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res* 11: 141-150.
- Cavanagh, D., Davis, P. J., Cook, J. K., Li, D., Kant, A., Koch, G. (1992): Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 21: 33-43.
- Cavanagh, D., Elus, M. M. und Cook, J. K. (1997): Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol* 26: 63-74.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P. und Naylor, C. (1999): Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol* 28: 593-605.

- Cavanagh, D. und Naqi, S. A. (2003): Infectious Bronchitis. In: "Diseases of Poultry". Herausgegeben von Saif, Y. M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Swayne, D.E. 11th. Iowa State Press, Ames, Iowa, 101-119.
- Chen, B. Y., Hosi, S., Nunoya, T. und Itakura, C. (1996): Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. *Avian Pathol* 25: 269-283.
- Cherry, J. D. und Taylor-Robinson, D. (1970): Large-quantity production of chicken embryo tracheal organ cultures and use in virus and mycoplasma studies. *Appl Microbiol* 19: 658-662.
- Chew, P. H., Wakenell, P. S. und Farver, T. B. (1997): Pathogenicity of attenuated infectious bronchitis viruses for oviducts of chickens exposed in ovo. *Avian Dis* 41: 598-603.
- Chong, K. T. und Apostolov, K. (1982): The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. *J Comp Pathol* 92: 199-211.
- Chousalkar, K. K., Cheetham, B. F. und Roberts, J. R. (2009): LNA probe-based real-time RT-PCR for the detection of infectious bronchitis virus from the oviduct of unvaccinated and vaccinated laying hens. *J Virol Methods* 155: 67-71.
- Chousalkar, K. K. und Roberts, J. R. (2007): Ultrastructural study of infectious bronchitis virus infection in infundibulum and magnum of commercial laying hens. *Vet Microbiol* 122: 223-236.
- Clarke, J. K., McFerran, J. B. und Gay, F. W. (1972): Use of allantoic cells for the detection of avian infectious bronchitis virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 36: 62-70.
- Clewley, J.P., Morser, J., Avery, R.J. und Lomniczi, B. (1981). Oligonucleotide fingerprinting of ribonucleic acids of infectious bronchitis virus strains. *Infection and Immunity*, 32, 1227-1233.
- Colwell, W.M. und Lukert, P.D. (1969): Effects of avian infectious bronchitis virus (IBV) on tracheal organ cultures. *Avian Dis* 13: 888-894.
- Condron, R. J. und Marshall, A. T. (1986): Pathogenesis of infectious bronchitis nephritis. 1. Morphometric analysis of kidney proximal tubular epithelium in chickens. *J Comp Pathol* 96: 47-61.
- Cook, J. K. (1984): The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathol* 13: 733-741.
- Cook, J. K., Darbyshire, J. H. und Peters, R. W. (1976): The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Arch Virol* 50: 109-118.
- Cook, J. K. und Huggins, M. B. (1986): Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus: their role in disease. *Avian Pathol* 15: 129-138.
- Cook, J. K., Huggins, M. B. und Ellis, M. M. (1991): Use of an infectious bronchitis virus and *Escherichia coli* model infection to assess the ability to vaccinate successfully against infectious bronchitis in the presence of maternally-derived immunity. *Avian Pathol* 20: 619-626.

- 
- Cook, J. K., Orbell, S. J., Woods, M. A. und Huggins, M. B. (1996): A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). *Vet Rec* 138: 178-180.
- Cook, J. K., Smith, H. W. und Huggins, M. B. (1986): Infectious bronchitis immunity: its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J Gen Virol* 67: 1427-1434.
- Cook, J. K. A. (1968): Duration of experimental infectious bronchitis in chickens. *Res Vet Sci* 9: 506-514.
- Cook, J. K. A., Orbell, S. J., Woods, M. A. und Huggins, M. B. (1999): Breath of protection of the respiratory tract provided by different live.attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol* 477-485.
- Corpet, F. (1988): Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-10890.
- Crinion, R. A. (1972): Egg quality and production following infectious bronchitis virus exposure at one day old. *Poult Sci* 51: 582-585.
- Crinion, R. A., Ball, R. A. und Hofstad, M. S. (1971a): Abnormalities in laying chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old. *Avian Dis* 15: 42-48.
- Crinion, R. A., Ball, R. A. und Hofstad, M. S. (1971b): Pathogenesis of oviduct lesions in immature chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old. *Avian Dis* 15: 32-41.
- Crinion, R. A. und Hofstad, M. S. (1972a): Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Dis* 16: 351-363.
- Crinion, R. A. und Hofstad, M. S. (1972b): Pathogenicity of two embryo-passage levels of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Dis* 16: 967-973.
- Cumming, R. B. (1963): Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Aust Vet J* 39: 145-147.
- Cumming, R. B. (1969): The control of avian infectious bronchitis/nephrosis in Australia. *Aust Vet J* 45: 200-203.
- Cumming, R. B. (1970): Studies on Australian infectious bronchitis virus. IV. Apparent farm-to-farm airborne transmission of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 14: 191-195.
- Darbyshire, J. H., Cook, J. K. und Peters, R. W. (1975): Comparative growth kinetic studies on avian infectious bronchitis virus in different systems. *J Comp Path.* 85: 623-630.
- Darbyshire, J. H., Rowell, J. G., Cook, J. K. und Peters, R. W. (1979): Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. *Arch Virol* 61: 227-238.
- Davelaar, F. G., Kouwenhoven, B. und Burger, A. G. (1984): Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in the Netherlands. *Vet Q* 6: 114-120.

- Davies, H. A. und Macnaughton, M. R. (1979): Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Arch Virol* 59: 25-33.
- De Wit, J. J. (1998): Detection of IgM by ELISA after IBV vaccination. In: "International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus infections in Poultry." Herausgegeben von Kaleta, E. F. und Heffels-Redmann, U. Rauschholzhausen, Germany. pp 361-365.
- De Wit, J. J. (2000): Detection of Infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 29: 71-93.
- De Wit, J. J., Koch, G., Kant, A. und Van Roozelaar, D. J. (1995): Detection by immunofluorescent assay of serotype-specific and group-specific antigens of infectious bronchitis virus in tracheas of broilers with respiratory problems. *Avian Pathol* 24: 465-474.
- De Wit, J. J., Mekkes, D. R., Kouwenhoven, B. und Verheijden, J. H. (1997): Sensitivity and specificity of serological tests for infectious bronchitis virus antibodies in broilers. *Avian Pathol* 26: 105-118.
- Delaplane, J. P. und Stuart, H. O. (1939): Studies of infectious bronchitis. Rhode Island Agricultural Experiment Station. Bulletin 273.
- Dhinakar Raj, G. und Jones, R. C. (1997): Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol* 26: 677-706.
- Dolz, R., Bertran, K. und Majó, N. (2009): First report of IBV QX-like strains in Spain. In: "VI. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 27-33.
- Dolz, R., Pujols, J., Ordonez, G., Porta, R. und Majo, N. (2006): Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathol* 35: 77-85.
- Dolz, R., Pujols, J., Ordonez, G., Porta, R. und Majo, N. (2008): Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. *Virology* 374: 50-59.
- Domanska-Blicharz, K., Minta, Z. und Smietanka, K. (2006a): Molecular studies on infectious bronchitis virus isolated in Poland. In: "V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 147-153.
- Domanska-Blicharz, K., Minta, Z., Smietanka, K. und Porwan, T. (2006b): New variant of IBV in Poland. *Vet Rec* 158: 808.
- Dong, B. Q., Liu, W., Fan, X. H., Vijaykrishna, D., Tang, X. C., Gao, F., Li, L. F., Li, G. J., Zhang, J. X., Yang, L. Q., Poon, L. L., Zhang, S. Y., Peiris, J. S., Smith, G. J., Chen, H. and Guan, Y. (2007): Detection of a novel and highly divergent coronavirus from asian leopard cats and Chinese ferret badgers in Southern China. *J Virol* 81: 6920-6926.

- 
- Ducatez, M. F., Martin, A. M., Owoade, A. A., Olatoye, I. O., Alkali, B. R., Maikano, I., Snoeck, C. J., Sausy, A., Cordioli, P. und Muller, C. P. (2009): Characterization of a new genotype and serotype of infectious bronchitis virus in Western Africa. *J Gen Virol* 90: 2679-2685.
- Enjuanes, L., Brian, D., Cavanagh, D., Holmes, K., Lai, M. M. C., Laude, H., Masters, P. S., Rottier, P., Siddell, S., Spaan, W., Taguchi, F. and Talbot, P. (2000): In: "Virus Taxonomy". Herausgegeben von Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. und Summers, M. D. Academic Press:, New York, 835-849.
- Fabricant, J. und Levine, P. P. (1951): The persistence of infectious bronchitis virus in eggs and tracheal exudates of infected chickens. *Cornell Vet* 41: 240-246.
- Farsang, A., Ros, C., Renstrom, L. H., Baule, C., Soos, T. und Belak, S. (2002): Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathol* 31: 229-236.
- Finalab (2010): IBV QX Serotypes. <http://www.finalab.fr/docs/en/BI.pdf>:
- Gelb, J. (1989): Infectious Bronchitis. In: "A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, ." Herausgegeben von Purchase, H. G., Arp, L. H., Domermuth, C. H. und Pearson, J. E. 3th. American Association of Avian Pathologists., 124-127.
- Gelb, J., Jr. und Killian, S. L. (1987): Serum antibody responses of chickens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Dis* 31: 513-522.
- Gelb, J., Jr., Fries, P.A., Crary, C.K.Jr., Donahoe, J.P. und Roessler, D.E. (1987): Sentinel bird approach to isolating infectious bronchitis virus. *J Am Vet Med Assoc* 190: 1628.
- Gelb, J., Jr., Ladman, B. S., Tamayo, M., Gonzalez, M. und Sivanandan, V. (2001): Novel infectious bronchitis virus S1 genotypes in Mexico 1998-1999. *Avian Dis* 45: 1060-1063.
- Gelb, J., Jr., Wolff, J. B. und Moran, C. A. (1991): Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis* 35: 82-87.
- Gelb, J., Weisman, Y., Ladman, B. S. und Meir, R. (2005): S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol* 34: 194-203.
- Gomaa, M. H., Barta, J. R., Ojkic, D. und Yoo, D. (2008): Complete genomic sequence of turkey coronavirus. *Virus Res* 135 (2): 237-246.
- Gough, R. E., Cox, W. J., de, B. W. D., Worthington, K. J. und Jones, R. C. (2008): Chinese QX strain of infectious bronchitis virus isolated in the UK. *Vet Rec* 162: 99-100.
- Gough, R. E., Cox, W. J., Gutierrez, E., MacKenzie, G., Wood, A. M. und Dagless, M. D. (1996): Isolation of 'variant' strains of infectious bronchitis virus from vaccinated chickens in Great Britain. *Vet Rec* 139: 552.
- Gough, R. E., Randall, C. J., Dagless, M., Alexander, D. J., Cox, W. J. und Pearson, D. (1992): A 'new' strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet Rec* 130: 493-434.

- Grgic, H., Hunter, D. B., Hunton, P. und Nagy, E. (2008): Pathogenicity of infectious bronchitis virus isolates from Ontario chickens. *Can J Vet Res* 72: 403-410.
- Hafez, H. M. (2007): Breeder farms and hatchery as integrated operation. *Lohmann Information*. 42 (1): 29-34.
- Handberg, K. J., Kabell, S., Olesen, L. und Jorgensen, P. H. (2009): Sequence Analysis of IBV from outbreaks in Denmark 2006-2009. In: "VI. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 7-12.
- Handberg, K. J., Nielsen, O. L., Pedersen, M. W. und Jorgensen, P. H. (1999): Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. *Avian Pathol* 28: 327-335.
- Heath, G. S., King, D. P., Turner, J. L., Wakeley, P. R. und Banks, M. (2003): Use of an internal standard in a TaqMan nested reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 96: 357-366.
- Heiman, M. (1997): <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>:
- Hein, R.G., Slacum, G. & Lynch, P. (1998). In-vivo characterization of recent infectious bronchitis virus (IBV) variants isolated from broilers in the USA. In: "Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus infections in Poultry". Herausgegeben von Kaleta, E.F. und Heffels-Redmann, U. Rauschholzhausen, Germany. pp. 220–225.
- Hewson, K., Noormohammadi, A. H., Devlin, J. M., Mardani, K. und Ignjatovic, J. (2009): Rapid detection and non-subjective characterisation of infectious bronchitis virus isolates using high-resolution melt curve analysis and a mathematical model. *Arch Virol* 154: 649-660.
- Hodgson, T., Britton, P. und Cavanagh, D. (2006): Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication. *J Virol* 80: 296-305.
- Hoekstra, J. und Rispens, B. (1960): Infectieuze bronchitis bij pluimvee. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 85: 398-403.
- Hoffmann, B., Depner, K., Schirrmeier, H. und Beer, M. (2006): A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods* 136: 200-209.
- Hofmann, M. A. (2003): Construction of an infectious chimeric classical swine fever virus containing the 5'UTR of bovine viral diarrhoea virus, and its application as a universal internal positive control in real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 114: 77-90.
- Hofstad, M. S. (1967): Immunity following aerosol exposure to high-embryo-passage avian infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 11: 452-458.
- Hofstad, M. S. und Yoder, H. W., Jr. (1966): Avian infectious bronchitis--virus distribution in tissues of chicks. *Avian Dis* 10: 230-239.

- 
- Huang, Y. P., Lee, H. C., Cheng, M. C. und Wang, C. H. (2004): S1 and N gene analysis of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Avian Dis* 48: 581-589.
- Hughes, L. A., Savage, C., Naylor, C., Bennett, M., Chantrey, J. und Jones, R. (2009): Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. *Emerg Infect Dis* 15: 1091-1094.
- Ignjatovic, J., Ashton, D. F., Reece, R., Scott, P. und Hooper, P. (2002): Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus. *J Comp Pathol* 126: 115-123.
- Ignjatovic, J. und Galli, U. (1995): Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 24: 313-332.
- Ignjatovic, J., Gould, G. und Sapats, S. (2006): Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Arch Virol* 151: 1567-1585.
- Jackwood, M. W., Boynton, T. O., Hilt, D. A., McKinley, E. T., Kissinger, J. C., Paterson, A. H., Robertson, J., Lemke, C., McCall, A. W., Williams, S. M., Jackwood, J. W. und Byrd, L. A. (2010): Emergence of a group 3 coronavirus through recombination. *Virology* 398 (1): 98-108.
- Jackwood, M. W., Hilt, D. A. und Callison, S. A. (2003): Detection of infectious bronchitis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and identification of a quasispecies in the Beaudette strain. *Avian Dis* 47: 718-724.
- Jackwood, M. W., Hilt, D. A., Lee, C. W., Kwon, H. M., Callison, S. A., Moore, K. M., Moscoso, H., Sellers, H. und Thayer, S. (2005): Data from 11 years of molecular typing infectious bronchitis virus field isolates. *Avian Dis* 49: 614-618.
- Jackwood, M. W., Hilt, D. A., Williams, S. M., Woolcock, P., Cardona, C. und O'Connor, R. (2007): Molecular and serologic characterization, pathogenicity, and protection studies with infectious bronchitis virus field isolates from California. *Avian Dis* 51: 527-533.
- Jackwood, M. W., Kwon, H. M. und Hilt, D. A. (1992): Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Dis* 36: 403-409.
- Jang, J. H., Sung, H. W., Song, C. S. und Kwon, H. M. (2007): Sequence analysis of the S1 glycoprotein gene of infectious bronchitis viruses: identification of a novel phylogenetic group in Korea. *J Vet Sci* 8: 401-407.
- Janse, E. M., van Roozelaar, D. und Koch, G. (1994): Leukocyte subpopulations in kidney and trachea of chickens infected with infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 23: 513-523.
- Johnson, M. A., Pooley, C., Ignjatovic, J. und Tyack, S. G. (2003): A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine* 21: 2730-2736.
- Jones, R., Worthington, K. und Gough, R. (2005a): Detection of the Italy O2 strain of infectious bronchitis virus in the UK. *Vet Rec.* 156: 260.
- Jones, R. C. (2010): Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control? *British Poultry Science* 51: 1-11.

- Jones, R. C. und Ambali, A. G. (1987): Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. *Vet Rec* 120: 617-618.
- Jones, R. C. und Jordan, F. T. (1970): The exposure of day-old chicks to infectious bronchitis and the subsequent development of the oviduct. *Vet Rec* 87: 504-505.
- Jones, R. C., Savage, C. E., Worthington, K. J. und Hughes, L. A. (2009): Observations on global and local epidemiology of avian coronavirus. In: "VI International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 2-6.
- Jones, R. C., Worthington, K. J., Capua, I. und Naylor, C. J. (2005b): Efficacy of live infectious bronchitis vaccines against a novel European genotype, Italy 02. *Vet Rec* 156: 646-647.
- Jordi, B. J., Kremers, D. A., Kusters, H. G. und van der Zeijst, B. A. (1989): Nucleotide sequence of the gene coding for the peplomer protein (spike protein) of infectious bronchitis virus, strain D274. *Nucleic Acids Res* 17 (16): 6726.
- Jungherr, E. I., Chomiak, T. W. und Luginbuhl, R. E. (1956): Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In: "60th Annual Meeting U.S. Livestock Sanitary Association". Chicago, 203-209.
- Kapczynski, D. R., Hilt, D. A., Shapiro, D., Sellers, H. S. und Jackwood, M. W. (2003): Protection of chickens from infectious bronchitis by in ovo and intramuscular vaccination with a DNA vaccine expressing the S1 glycoprotein. *Avian Dis* 47: 272-285.
- Karaca, K. und Naqi, S. (1993): A monoclonal antibody blocking ELISA to detect serotype-specific infectious bronchitis virus antibodies. *Vet Microbiol* 34: 249-257.
- King, D. J. und Hopkins, S. R. (1983): Evaluation of the hemagglutination-inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. *Avian Dis* 27: 100-112.
- King, D. P., Reid, S. M., Hutchings, G. H., Grierson, S. S., Wilkinson, P. J., Dixon, L. K., Bastos, A. D. und Drew, T. W. (2003): Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* 107: 53-61.
- Krapez, U., Slavec, B., Barlic-Maganja, D. und Rojs, O. Z. (2010): Molecular analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Slovenia between 1990 and 2005: a retrospective study. *Virus Genes* 41: 414-416.
- Krapez, U., Slavec, B., Barlic-Maganja, D. und Zorman Rojs, O. (2009): Molecular epidemiology of slovene infectious bronchitis virus strains isolated between 1990 and 2005. In: "VI. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 13-26.
- Kusters, J. G., Niesters, H. G., Bleumink-Pluym, N. M., Davelaar, F. G., Horzinek, M. C. und Van der Zeijst, B. A. (1987): Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in The Netherlands. *J Gen Virol* 68 ( Pt 2): 343-352.

- 
- Kusters, J. G., Niesters, H. G., Lenstra, J. A., Horzinek, M. C. und van der Zeijst, B. A. (1989): Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology* 169: 217-221.
- Kwon, H. M., Jackwood, M. W. und Gelb, J., Jr. (1993): Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis* 37: 194-202.
- Ladman, B. S., Loupos, A. B. und Gelb, J., Jr. (2006): Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathol* 35: 127-133.
- Lai, M. M. und Cavanagh, D. (1997): The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 48: 1-100.
- Lai, M. M. C., Perlman, S. und Anderson, L. J. (2007): Coronaviridae. In: "Fields Virology". Herausgegeben von Knipe, D. M. H., Peter M. 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 1305-1335.
- Landman, W. J., Dwars, R. M. und De Wit, J. J. (2005): High incidence of false Layers in (re) production hens supposedly attributed to a juvenile infectious bronchitis virus infection. In: "Fifty-fourth Western Poultry Disease Conference". Vancouver, pp 105-107.
- Lashgari, M. S. und Newman, J. A. (1982): Preparing hemagglutinating antigen from isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 26: 508-519.
- Lee, C. W. und Jackwood, M. W. (2000): Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. *Arch Virol* 145: 2135-2148.
- Lee, E. K., Jeon, W. J., Lee, Y. J., Jeong, O. M., Choi, J. G., Kwon, J. H. und Choi, K. S. (2008): Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolates in Korea between 2003 and 2006. *Avian Dis* 52: 332-337.
- Lin, Z., Kato, A., Kudou, Y. und Ueda, S. (1991): A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Arch Virol* 116: 19-31.
- Lister, S. A. (2008): Biosecurity in poultry management. In: "Poultry Diseases". Herausgegeben von Pattinson, M., McMullin, P. F., Bradbury, J. M. und Alexander, D. J. 6th Edition. Saunders Elsevier, 48-65.
- Liu, S. und Kong, X. (2004): A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol* 33: 321-327.
- Liu, S., Wang, Y., Ma, Y., Han, Z., Zhang, Q., Shao, Y., Chen, J. und Kong, X. (2008): Identification of a newly isolated avian infectious bronchitis coronavirus variant in China exhibiting affinity for the respiratory tract. *Avian Dis* 52: 306-314.
- Liu, S. W., Zhang, Q. X., Chen, J. D., Han, Z. X., Liu, X., Feng, L., Shao, Y. H., Rong, J. G., Kong, X. G. und Tong, G. Z. (2006): Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Arch Virol* 151: 1133-1148.

- Liu, X. L., Su, J. L., Zhao, J. X. und Zhang, G. Z. (2009): Complete genome sequence analysis of a predominant infectious bronchitis virus (IBV) strain in China. *Virus Genes* 38: 56-65.
- Lohr, J. E. (1986): Das Problem der Variantstämme bei der infektiösen Bronchitis des Huhnes. In: "33. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten". Herausgegeben von Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, e. V. Hannover.
- Lomniczi, B. und Morser, J. (1981): Polypeptides of infectious bronchitis virus. I. Polypeptides of the virion. *J Gen Virol* 55: 155-164.
- Loomis, L.N., Cunningham, C.H., Gray, M.L. and Thorp, F. (1950): Pathology of the chicken embryo infected with infectious bronchitis virus. *Am J Vet Res* 11: 245-251.
- Lucio, B. und Fabricant, J. (1990): Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 34: 865-870.
- Mackay, I. M., Arden, K. E. und Nitsche, A. (2002): Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 30: 1292-1305.
- Mardani, K., Noormohammadi, A. H., Ignatovic, J. und Browning, G. F. (2006): Typing infectious bronchitis virus strains using reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis to compare the 3' 7.5 kb of their genomes. *Avian Pathol* 35: 63-69.
- Marquardt, W. W., Snyder, D. B. und Schlotthober, B. A. (1981): Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 25: 713-722.
- Martins, N. R., Mockett, A. P., Barrett, A. D. und Cook, J. K. (1991): IgM responses in chicken serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines. *Avian Dis* 35: 470-475.
- Mase, M., Inoue, T., Yamaguchi, S. und Imada, T. (2009): Genetic diversity of avian infectious bronchitis viruses in Japan based on analysis of s2 glycoprotein gene. *J Vet Med Sci* 71: 287-291.
- Masters, P. S. (2006): The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 66: 193-292.
- McFarlane, R. und Verma, R. (2008): Sequence analysis of the gene coding for the S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus (IBV) strains from New Zealand. *Virus Genes* 37: 351-357.
- Meir, R., Maharat, O., Farnushi, Y. und Simanov, L. (2010): Development of a TaqMan RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus in chickens, and comparison of RT-PCR and virus isolation. *J Virol Methods* 163: 190-194.
- Meir, R., Rosenblut, E., Perl, S., Kass, N., Ayali, G., Perk, S. und Hemsani, E. (2004): Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis* 48: 635-641.
- Meulemans, G., Boschmans, M., Decaesstecker, M., Berg, T. P., Denis, P. und Cavanagh, D. (2001): Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathol* 30: 411-421.

- 
- Meulemans, G., Carlier, M. C., Gonze, M., Petit, P. und Vandebroeck, M. (1987): Incidence, characterisation and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. *Vet Rec* 120: 205-206.
- Mihindukulasuriya, K. A., Wu, G., St Leger, J., Nordhausen, R. W. und Wang, D. (2008): Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *J Virol* 82: 5084-5088.
- Minta, Z., Bugajak, P., Karpinska, E., Gough, R., Cavanagh, D., Mawditt, K., Cox, W.J., Bartnicka, B. & Wiercinski, J. (1998). Isolation of new strains of IBV from broiler chickens in Poland. In: "Proceedings of International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus infections in Poultry". Herausgegeben von Kaleta, E.F. und Heffels-Redmann, U. Rauschholzhausen, Germany. pp. 180–188.
- Mockett, A. P. (1985): Envelope proteins of avian infectious bronchitis virus: purification and biological properties. *J Virol Methods* 12: 271-278.
- Mockett, A. P. und Cook, J. K. (1986): The detection of specific IgM to infectious bronchitis virus in chicken serum using an ELISA. *Avian Pathol* 15: 437-446.
- Mockett, A. P. und Darbyshire, J. H. (1981): Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 10: 1-10.
- Modrow, S., Falke, D. und Truyen, U. (2003): *Molekulare Virologie*. 2th Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Monne, I., Drago, A., Fasolato, M., Capua, I. und Cattoli, G. (2009): Molecular survey of infectious bronchitis virus in Europe in 2008. In: "VI. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 34-37.
- Montassier, M. D. S., Brentano, L., Montassier, H. J. und Richtzenhain, L. J. (2008): Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 28: 190-194.
- Nagano, H., Tsuchimoto, M., Hohdatsu, T., Yamagami, T., Ide, S., Eiguchi, Y., Tanaka, Y. und Yamagishi, H. (1990): Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bronchitis virus (IBV) antigen with monoclonal antibody. *Nippon Juigaku Zasshi* 52: 657-659.
- Naqi, S. A., Karaca, K. und Bauman, B. (1993): A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Pathol* 22: 555-564.
- Nauwynck, H. und Pensaert, M. (1988): Studies on the pathogenesis of infections with a nephropathogenic variant of infectious bronchitis virus in chickens. In: "I International Symposium on Infectious Bronchitis". Herausgegeben von Rauschholzhausen, Germany. pp 113-119.
- Niesters, H. G., Lenstra, J. A., Spaan, W. J., Zijderveld, A. J., Bleumink-Pluym, N. M., Hong, F., van Scharrenburg, G. J., Horzinek, M. C. und van der Zeijst, B. A. (1986): The peplomer protein sequence of the M41 strain of coronavirus IBV and its comparison with Beaudette strains. *Virus Res* 5: 253-263.

- Otsuki, K., Huggins, M. B. und Cook, J. K. A. (1990): Comparison of the susceptibility to avian infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of white leghorn chickens. *Avian Pathol* 19: 467-475.
- Parsons, D., Ellis, M. M., Cavanagh, D. und Cook, J. K. (1992): Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. *Vet Rec* 131: 408-411.
- Paul Ehrlich Institut (2011): Zugelassene Geflügelimpfstoffe in Deutschland. [http://www.pei.de/clin\\_180/nn\\_161774/DE/arzneimittel/vet-mittel/gefluegel/gefluegel-node.html?\\_\\_nnn=true](http://www.pei.de/clin_180/nn_161774/DE/arzneimittel/vet-mittel/gefluegel/gefluegel-node.html?__nnn=true):
- Pena, L. J., Dos Santos, B. M., Roberti, R. P. und Marin, S. Y. (2005): Bronquite infecciosa das galinhas. *Arq. Inst. Biol.* 72: 397-404.
- Philipp, H. C. und Voss, M. (2005): Infektiöse Bronchitis: Typisierungsergebnisse aktueller Feldisolate aus Deutschland. *Lohmann Information*. Juli - Sept. Lohmann Tierzucht GmbH.
- Philipp, H. C. und Voss, M. (2006): Infectious bronchitis virus infectious in German chicken flocks-recent field observations. In: "V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 154-156.
- Pryor, W. J. und Woo, K. K. (1964): Relationship between protein/energy levels and uraemia in chickens. *Aust Vet J* 40: 236-237.
- Ren, X., Yin, J., Ma, D. und Li, G. (2009): Characterization and membrane gene-based phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus Chinese strain HH06. *Virus Genes* 38: 39-45.
- Rimondi, A., Craig, M. I., Vagnozzi, A., König, G., Delamer, M. und Pereda, A. (2009): Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). *Avian Pathol* 38: 149-153.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386.
- Ruano, M., El-Attrache, J. und Villegas, P. (2000): A rapid-plate hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 44: 99-104.
- Sassenhoff, I. (1950): A new enzootic tracheitis of fowl. *Berl. Tierarztl. Wochenschr.* 10: 224-226.
- Schalk, A. F. und Hawn, M. C. (1931): An apparently new respiratory disease of chicks. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78: 413-422.
- Schultze, B., Cavanagh, D. und Herrler, G. (1992): Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. *Virology* 189: 792-794.
- Schweitzer, B. und Kingsmore, S. (2001): Combining nucleic acid amplification and detection. *Curr Opin Biotechnol* 12: 21-27.

- 
- Shaw, K., Britton, P. und Cavanagh, D. (1996): Sequence of the spike protein of the Belgian B164S isolate of nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 25: 607-611.
- Shieh, H. K., Shien, J. H., Chou, H. Y., Shimizu, Y., Chen, J. N. und Chang, P. C. (2004): Complete nucleotide sequences of S1 and N genes of infectious bronchitis virus isolated in Japan and Taiwan. *J Vet Med Sci* 66: 555-558.
- Song, C. S., Lee, Y. J., Kim, J. H., Sung, H. W., Lee, C. W., Izumiya, Y., Miyazawa, T., Jang, H. K. und Mikami, T. (1998a): Epidemiological classification of infectious bronchitis virus isolated in Korea between 1986 and 1997. *Avian Pathol* 27: 409-416.
- Song, C. S., Lee, Y. J., Lee, C. W., Sung, H. W., Kim, J. H., Mo, I. P., Izumiya, Y., Jang, H. K. und Mikami, T. (1998b): Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. *J Gen Virol* 79 ( Pt 4): 719-723.
- Stern, D. F., Burgess, L. und Sefton, B. M. (1982): Structural analysis of virion proteins of the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* 42: 208-219.
- Stöcher, M., Leb, V., Holzl, G. und Berg, J. (2002): A simple approach to the generation of heterologous competitive internal controls for real-time PCR assays on the LightCycler. *J Clin Virol* 25 Suppl 3: 47-53.
- Sun, C., Han, Z., Ma, H., Zhang, Q., Yan, B., Shao, Y., Xu, J., Kong, X. und Liu, S. (2011): Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenicity and evaluation of protection induced by Massachusetts serotype H120 vaccine against QX-like strains. *Avian Pathol* 40: 43-54.
- Tarpey, I., Orbell, S. J., Britton, P., Casais, R., Hodgson, T., Lin, F., Hogan, E. und Cavanagh, D. (2006): Safety and efficacy of an infectious bronchitis virus used for chicken embryo vaccination. *Vaccine* 24: 6830-6838.
- Terregino, C., Toffan, A., Beato, M. S., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M. und Capua, I. (2008): Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol* 37: 487-493.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. und Heinen, E. (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75: 291-295.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Toro, H. und Fernandez, I. (1994): Avian infectious bronchitis: specific lachrymal IgA level and resistance against challenge. *Zentralbl Veterinarmed B* 41: 467-472.
- Toro, H., Godoy, V., Larenas, J., Reyes, E. und Kaleta, E. F. (1996): Avian infectious bronchitis: viral persistence in the harderian gland and histological changes after eyedrop vaccination. *Avian Dis* 40: 114-120.

- Tottori, J., Yamaguchi, R., Murakawa, Y., Sato, M., Uchida, K. und Tateyama, S. (1997): Experimental production of ascites in broiler chickens using infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *Avian Dis* 41: 214-220.
- Van Eck, J. H. (1983): Effects of experimental infection of fowl with EDS'76 virus, infectious bronchitis virus and/or fowl adenovirus on laying performance. *Vet Q* 5: 11-25.
- Van Ginkel, F. W., van Santen, V. L., Gulley, S. L. und Toro, H. (2008): Infectious bronchitis virus in the chicken Harderian gland and lachrymal fluid: viral load, infectivity, immune cell responses, and effects of viral immunodeficiency. *Avian Dis* 52: 608-617.
- Van Roeckel, H., Bullis, K. L., Flint, O. S. und Clarke, M. K. (1942): Poultry disease control service. Massachusetts Agricultural Experiment Station. Bulletin 388: 99-103.
- Villarreal, L. Y., Brandao, P. E., Chacon, J. L., Assayag, M. S., Maiorka, P. C., Raffi, P., Saidenberg, A. B., Jones, R. C. und Ferreira, A. J. (2007a): Orchitis in roosters with reduced fertility associated with avian infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus infections. *Avian Dis* 51: 900-904.
- Villarreal, L. Y., Brandao, P. E., Chacon, J. L., Saidenberg, A. B., Assayag, M. S., Jones, R. C. und Ferreira, A. J. (2007b): Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis* 51: 974-978.
- Villarreal, L. Y., Sandri, T. L., Souza, S. P., Richtzenhain, L. J., de Wit, J. J. und Brandao, P. E. (2010): Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Dis* 54: 894-898.
- Walker, P. J., Bonami, J. R., Boonsaeng, V., Chang, P. S., Cowley, J. A., Enjuanes, L., Flegel, T. W., Lightner, D. V., Loh, P. C., Snijder, E. J. und Tang, K. (2005): Family Roniviridae. In: "Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." Herausgegeben von Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. und Ball, L. A. Elsevier/Academic Press, 1259.
- Wang, X., Schnitzlein, W. M., Tripathy, D. N., Girshick, T. und Khan, M. I. (2002): Construction and immunogenicity studies of recombinant fowl poxvirus containing the S1 gene of Massachusetts 41 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 46: 831-838.
- Wang, Y. D., Wang, Y. L., Zhang, Z. C., Fan, G. C., Jiang, Y. H., Liu, X., Ding, E. J. und Wang, S. S. (1998): Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chin J Anim Quarant* 1-3.
- Wang, Y. F., Sun, Y. K., Tian, Z. C., Shi, X. M., Tong, G. Z., Liu, S. W., Zhi, H. D., Kong, X. G. und Wang, M. (2009): Protection of chickens against infectious bronchitis by a recombinant fowlpox virus co-expressing IBV-S1 and chicken IFN $\gamma$ . *Vaccine* 27: 7046-7052.
- Westcott, D. G., King, D. P., Drew, T. W., Nowotny, N., Kindermann, J., Hannant, D., Belak, S. und Paton, D. J. (2003): Use of an internal standard in a closed one-tube RT-PCR for the detection of equine arteritis virus RNA with fluorescent probes. *Vet Res* 34: 165-176.

- 
- Winter, C., Herrler, G. und Neumann, U. (2008): Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent. *Microbes Infect* 10: 367-373.
- Winterfield, R. W., Fadly, A. M. und Hoerr, F. J. (1976): Vaccination and revaccination with a Holland (H) strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis* 20: 369-374.
- Winterfield, R. W. und Hitchner, S. B. (1962): Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am J Vet Res* 23: 1273-1279.
- Woernle, H. (1961): Impfversuche mit Adsorbat-Vakzine bei der infektiösen Bronchitis des Huhnes. *Mh. Tierheilk.* 13: 136-142.
- Woernle, H. (1966): The use of the agar gel diffusion technique in the identification of certain avian virus diseases. *The Veterinarian* 4: 17-28.
- Woernle, H. (1968): Probleme der Impfung gegen die infektiöse Bronchitis (IB) des Huhnes. *Tierärztl. Umschau* 23: 58-63.
- Woernle, H. und Hafez, H. M. (1992): Infektiöse Bronchitis. In: "Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels: Ein Handbuch für Wissenschaft und Praxis". Herausgegeben von Heider, G., Monreal, G. und Mészáros, J. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 787-815.
- Worthington, K. J., Currie, R. J. und Jones, R. C. (2008): A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol* 37: 247-257.
- Worthington, K. J. und Jones, R. C. (2006): An update on the European RT-PCR IBV survey and recent findings on a novel IBV genotype. In: "V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 176-188.
- Worthington, K. J., Savage, C., Naylor, C., Wijmenga, W. und Jones, R. C. (2004): An RT-PCR survey of infectious bronchitis genotypes in the UK and selected European countries between 2002 and 2004 and the results from a vaccine trial. In: "IV international Symposium on Avian Corona- and Penumovirus Infections". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Kaleta, E. F. und Sommer, D. Rauschholzhausen, Germany. pp 125-133.
- Xing, J., Liu, S., Han, Z., Shao, Y., Li, H. und Kong, X. (2009): Identification of a novel linear B-cell epitope in the M protein of avian infectious bronchitis coronaviruses. *J Microbiol* 47: 589-599.
- Xu, C., Zhao, J., Hu, X. und Zhang, G. (2007): Isolation and identification of four infectious bronchitis virus strains in China and analyses of their S1 glycoprotein gene. *Vet Microbiol* 122: 61-71.
- Yagyu, K. und Ohta, S. (1990): Detection of infectious bronchitis virus antigen from experimentally infected chickens by indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibody. *Avian Dis* 34: 246-252.
- Yu, L., Jiang, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S. J., Liu, W. und Kwangac, J. (2001a): Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from China associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis* 45: 416-424.

- Yu, L., Wang, Z., Jiang, Y., Low, S. und Kwang, J. (2001b): Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus isolates from China and Southeast Asia. *Avian Dis* 45: 201-209.
- Zanella, A., Barbieri, I., Gavazzi, L. und Tosi, G. (2006): Avian infectious bronchitis: Isolations of an umpteenth new serotype of virus in Italy. In: "V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens". Herausgegeben von Heffels-Redmann, U., Sommer, D. und Kaleta, E. F. Rauschholzhausen, Germany. pp 161-168.
- Zanella, A., Lavazza, A., Marchi, R., Moreno Martin, A. und Paganelli, F. (2003): Avian infectious bronchitis: characterization of new isolates from Italy. *Avian Dis* 47: 180-185.
- Zeshan, B., Zhang, L., Bai, J., Wang, X., Xu, J. und Jiang, P. (2010): Immunogenicity and protective efficacy of a replication-defective infectious bronchitis virus vaccine using an adenovirus vector and administered in ovo. *J Virol Methods* 166: 54-59.
- Zhou, J. Y., Wu, J. X., Cheng, L. Q., Zheng, X. J., Gong, H., Shang, S. B. und Zhou, E. M. (2003): Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes. *J Virol* 77: 9090-9093.
- Zhou, J. Y., Zhang, D. Y., Ye, J. X. und Cheng, L. Q. (2004): Characterization of an avian infectious bronchitis virus isolated in China from chickens with nephritis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51: 147-152.
- Ziegler, A. F., Ladman, B. S., Dunn, P. A., Schneider, A., Davison, S., Miller, P. G., Lu, H., Weinstock, D., Salem, M., Eckroade, R. J. and Gelb, J., Jr. (2002): Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997-2000. *Avian Dis* 46: 847-858.
- Zimmermann, M. und Hafez, H. M. (2001): Infectious bronchitis: duration of detection of 4/91 vaccinal strain using polymerase chain reaction in chickens. In: "XII International Congress of the World Veterinary Poultry Association". Herausgegeben von Cairo, Egypt. pp 264.
- Zulperi, Z. M., Omar, A. R. und Arshad, S. S. (2009): Sequence and phylogenetic analysis of S1, S2, M, and N genes of infectious bronchitis virus isolates from Malaysia. *Virus Genes* 38: 383-391.
- Zwaagstra, K. A., van der Zeijst, B. A. und Kusters, J. G. (1992): Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. *J Clin Microbiol* 30: 79-84.

## 9. ANHANG

Tabelle 1: Anzahl und Nachweisrate von IBV, IBV 4/91 und IBV QX bei verschiedenen Nutzungsrichtungen in dem Jahr 2004

	Einsendungen	IBV +	4/91	QX
<b>Broiler</b>	35 (38,5 %)	7 (20 %)	2 (28,6 %)	4 (57,1 %)
<b>LH</b>	29 (31,9 %)	4 (13,8 %)	1 (25 %)	0
<b>MET</b>	21 (23 %)	2 (9,5 %)	0	0
<b>Unbekannt</b>	6 (6,6 %)	1 (16,7 %)	0	1 (100 %)
<b>Total</b>	<b>91 (100 %)</b>	<b>14/91 (15,8 %)</b>	<b>3/14 (21,4 %)</b>	<b>5/14 (35,7 %)</b>

Tabelle 2: Anzahl und Nachweisraten von IBV, IBV 4/91 und IBV QX bei verschiedenen Nutzungsrichtungen in dem Jahr 2005

	Einsendungen	IBV +	4/91	QX
<b>Broiler</b>	8 (7,8 %)	3 (37,5 %)	0	2 (66,7 %)
<b>LH</b>	27 (26,5 %)	12 (44,4 %)	4 (33,3 %)	3 (25 %)
<b>MET</b>	57 (55,9 %)	12 (21 %)	5 (41,7 %)	3 (25 %)
<b>Unbekannt</b>	10 (9,8 %)	2 (20 %)	1 (50 %)	2 (100 %)
<b>Total</b>	<b>102 (100 %)</b>	<b>29/102 (28,4 %)</b>	<b>10/29 (34,5 %)</b>	<b>10/29 (34,5 %)</b>

Tabelle 3: Anzahl und Nachweisraten von IBV, IBV 4/91 und IBV QX bei verschiedenen Nutzungsrichtungen in dem Jahr 2006

	Einsendungen	IBV +	4/91	QX
<b>Broiler</b>	22 (46,8 %)	15 (68,2 %)	5 (33,3 %)	9 (60 %)
<b>LH</b>	16 (34,1 %)	6 (37,5 %)	4 (66,7 %)	1 (16,7 %)
<b>MET</b>	2 (4,2 %)	1 (50 %)	0	0
<b>Unbekannt</b>	7 (14,9 %)	2 (28,6 %)	1 (50 %)	1 (50 %)
<b>Total</b>	<b>47 (100 %)</b>	<b>24/47 (51,1 %)</b>	<b>10/24 (41,7 %)</b>	<b>11/24 (45,8 %)</b>

Tabelle 4: Anzahl und Nachweisraten von IBV, BV 4/91 und IBV QX bei verschiedenen Nutzungsrichtungen in dem Jahr 2007

	Einsendungen	IBV +	4/91	QX
<b>Broiler</b>	31 (63,3 %)	20 (64,5 %)	7 (35 %)	12 (60 %)
<b>LH</b>	14 (28,6 %)	8 (57,1 %)	3 (37,5 %)	2 (25 %)
<b>MET</b>	0	0	0	0
<b>Unbekannt</b>	4 (8,1 %)	3 (75 %)	2 (66,7 %)	3 (100 %)
<b>Total</b>	<b>49 (100 %)</b>	<b>31/49 (63,3 %)</b>	<b>12/31 (38,7 %)</b>	<b>17/31 (54,8 %)</b>

**Tabelle 5: Anzahl und Nachweisraten von IBV, IBV 4/91 und IBV QX bei verschiedenen Nutzungsrichtungen in dem Jahr 2008**

	Einsendungen	IBV +	4/91	QX
<b>Broiler</b>	37 (46,2 %)	22 (59,4 %)	2 (9,1 %)	19 (86,4 %)
<b>LH</b>	30 (37,5 %)	9 (30 %)	5 (55,5 %)	3 (33,3 %)
<b>MET</b>	1 (1,3 %)	1 (100 %)	0	0
<b>Unbekannt</b>	12 (15 %)	0	0	0
<b>Total</b>	<b>80 (100 %)</b>	<b>32/80 (40 %)</b>	<b>7/32 (21,9 %)</b>	<b>22/32 (68,7 %)</b>

**Tabelle 6: Anzahl und Nachweisraten von IBV, IBV 4/91 und IBV QX bei verschiedenen Nutzungsrichtungen in dem Jahr 2009**

	Einsendungen	IBV +	4/91	QX
<b>Broiler</b>	95 (45,9 %)	76 (80 %)	11 (14,5 %)	50 (65,8 %)
<b>LH</b>	99 (47,8 %)	36 (36,4 %)	7 (19,4 %)	19 (52,8 %)
<b>MET</b>	2 (1 %)	0	0	0
<b>Unbekannt</b>	11 (5,3 %)	3 (27,3 %)	0	3 (100 %)
<b>Total</b>	<b>207 (100 %)</b>	<b>115/207 (55,6 %)</b>	<b>18/115 (15,6 %)</b>	<b>72/115 (62,6 %)</b>

**Tabelle 7: Klinische Erscheinungen und Sektionsbeschreibung der gestorbenen Tiere**

Tiernummer	Tag des Todes	Klinische Erscheinung	Sektion Beschreibung
4761	4. Tag p.i.	Durchfall und Mattigkeit ab dem 2. Tag p.i.	Exsikkotisch mit geschwollene Nieren und Eingeweidegicht
4792	5. Tag p.i.	Mattigkeit und Depression ab dem 3. Tag p.i., gesträubtes Gefieder, Atmungsstörung am 3. und 4. Tag p.i.	Geringfügiger Nasenausfluss, starke Abmagerungen, Exsikkotisch mit blutige Körpermuskulatur, vergrößerte und geschwollene Nieren mit Uratablagerung in der Niere und Herzbeutel
4754	6. Tag p.i.	Depression und Mattigkeit seit dem 5. Tag p.i., gesträubtes Gefieder	ausgetrocknet, exsikkotisch, Nierengicht
4769	8. Tag p.i.	Mattigkeit, Depression und Atemnot seit dem 3. Tag p.i., blieb liegen	ausgetrocknet, Lunge, Herzbeutel und Nieren mit Uratablagerung sowie geschwollene und vergrößerte Nieren

---

4801	8. Tag p.i.	Durchfall seit dem 4. Tag p.i., Mattigkeit, Atemnot seit dem 5. Tag p.i., bleib liegen	ausgetrocknet und abgemagert
4774	9. Tag p.i.	Mattigkeit und Depression	ausgetrocknet, abgemagert, mit persistierende Dottersack, Harnleiter und Nieren mit Uratablagerung

## Publikationsverzeichnis

Teile der Arbeit wurden bereits auf den unten genannten Kongressen/Tagungen vorgestellt und in den Proceedings/Tagungsberichten veröffentlicht.

### Vorträge

Lüschow, D., **De Quadros, V. L.**, Hafez, H. M. (2011): Untersuchungen zum Vorkommen und zur Pathogenität von IBV QX in Deutschland. In: 81. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten. Hannover, Deutschland.

**De Quadros, V.L.**, Lüschow, D., Hafez, M.H. (2011): Pathogenicity of a German Infectious Bronchitis Virus (IBV) QX isolate for 1-day-old specific pathogen free broiler chickens after experimental infection. In: XVII Congress of the World Veterinary Poultry Association, Cancun, México.

**De Quadros, V.L.**, Lüschow, D., Hafez, M.H. (2009): Identification of a QX variant strain of infectious bronchitis virus (IBV) in commercial poultry flocks in Germany between 2004 and 2009. In: 4<sup>o</sup> Doktorandensymposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Berlin, Deutschland. p. 20.

Lüschow, D., **De Quadros, V.L.**, Hafez, M.H. (2009): Molecular detection and typing of IBV. In: VI International Symposium on Avian Corona- And Pneumoviruses and Complicating Pathogens, Rauschholzhausen, Germany. p. 114-117.

Hafez, M.H., **De Quadros, V.L.**, Lüschow, D. (2009): Molecular typing of infectious bronchitis virus. In: 58th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California.

Lüschow, D., **De Quadros, V.L.**, Hafez, M.H. (2007): Molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis und zur Differenzierung von Infektiöse Bronchitis Virus (IBV) Variantstämmen. In: 73. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten. Hannover, Deutschland. p. 7-8.

### Poster

**De Quadros, V.L.**, Lüschow, D., Hafez, M.H. (2008): Untersuchungen zur Epidemiologie und zur Differenzierung des Infektiösen Bronchitis Virus (IBV) mittels Molekularbiologische Verfahren. In: 3<sup>o</sup> Doktorandensymposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Berlin, Deutschland. p. 67.

**De Quadros, V.L.**, Lüschow, D., Hafez, M.H. (2007): Development of a duplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT\_PCR) with internal control (IC) for detection of infectious bronchitis virus (IBV). In: 2<sup>o</sup> Doktorandensymposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Berlin, Deutschland. p. 32.

---

## DANKSAGUNGEN

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez, Leiter des Institutes für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin, für die Vergabe des Themas und die hervorragende fachliche Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung und Anfertigung der Arbeit. Darüber hinaus möchte ich mich für seine Menschlichkeit, seinen einzigartigen Humor sowie für seine Geduld und sein Verständnis in allen Lebenslagen bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Dörte Lüschoff für tadellose und jahrelange Betreuung dieser Arbeit. Ohne ihre Unterstützung wäre mit Sicherheit die Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für ihre Fachkenntnisse im Bereich der Virologie und Molekularbiologie. Darüber hinaus danke ich ihr für ihre immense Geduld und ihr Verständnis für mein „brasilianisches Temperament“ und für ihre Unterstützung beim Erlernen der deutschen Sprache. Nicht minder möchte ich ihr für ihre Herzlichkeit und Freundschaft in vielen Privatangelegenheiten (Sonntags-Brunch, Spaziergang durch Berlin, Abendessen, Ausflug zur Insel Riems, Weihnachtsmarkt Besuch) außerhalb der Instituts danken.

Herrn Dr. Rüdiger Hauck möchte ich danken für die netten Tipps und für die Zusammenarbeit in der Molekularbiologie, für die Hilfe zur biometrischen Planung des Tierversuchs, aber vor allem für die viele leckeren Kuchen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Mannschaft des Institutes bedanken: Frau Czech, Frau Göllner, Frau Bertram, Frau Valder, Frau Mann, Frau Grotehenn, Frau Kelz, Frau Schurich, Frau Sabl, Frau Mendes und Herrn Schumacher für das angenehme Arbeitsklima und nette Zeit, die wir zusammen verbracht haben. Ohne eure kleine oder große Unterstützung und Hilfestellung wäre die Durchführung dieser Arbeit schwierig gewesen. Von jedem habe ich etwas Fachliches, aber auch viel Menschliches gelernt. Ich hoffe, dass dieser Brasilianer mit deutschen Wurzeln Euch auch etwas beigebracht hat.

Mein Dank gilt auch an meinen aktuellen und ehemaligen Mit-Doktoranden Abdulrahman Lotfi, El-Sayed Abdelwhab, Wael Gad, Numees Suareet, Steffanie Balczulat, Steffanie Günzer, Steffanie Gasche, Johanna Schülz, Sabine Düpre, Bianca Schink, Frau Dr. Kohls, Frau Dr. Bianchi dos Santos und Frau Dr. Konstanze Zacharias für die wunderbare Zeit und nette Zusammenarbeit im Labor, aber auch bei der Organisation und Durchführung verschiedener Instituts-Veranstaltungen. Danke auch für die Gelegenheiten, mit Euch auch außerhalb der Arbeit etwas zu unternehmen und besser in unser multikulturelles Institut integriert zu werden.

Ich bedanke mich bei Matthias und Astrid Kay für das grammatikalische Korrekturlesen dieser Arbeit und ihren Jungs (Lennard, Roman und Gunner) für die wunderbare Zeit, die ich bei Euch gewohnt habe. Auch bei meinem Mitbewohner Herr Prof. Dr. Ulrich Böcker möchte ich mich bedanken. Er gab mir die Gelegenheit, die Deutsche Kultur näher zu erleben.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Bredemeier, Leiter der Kommission für bilaterale Abkommen zwischen der Bundesuniversität Santa Maria (UFMS) und deutschen Partnerorganisationen und Generaldirektor der Genossenschaft der ehemaligen Stipendiaten in Deutschland (AEBA) in Santa Maria bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und Betreuung bei Erstellung meines Bewerbungsprojektes für die Promotion.

Herrn Prof. Dr. Carlos Augusto Malmann der Bundesuniversität Santa Maria (UFMS) danke ich für die Unterstützung und Motivation, meine Doktorarbeit im Deutschland zu schreiben sowie für die Empfehlung und Kontakt zu Herrn Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez als Doktorvater.

Bei Herrn Prof. PhD. Rudi Weiblen der Bundesuniversität Santa Maria (UFMS), meinem ehemaligen „Chef“ danke ich für die wertvolle Betreuung und freundliche Unterstützung bei meiner Ausbildung als Tierarzt und Mensch.

Herzlichen Dank auch an Frau Wilma Behr, meiner so zu sagen „Stiefmutter“ im Berlin, für ihre Freundschaft und Sorge vor allem bezüglich meines Ernährungszustandes.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. PhD. Celso Leonardo Weydmann, meinem Patenonkel und Vorbild für die stetige Unterstützung und den Glauben an mich, trotz weiter Entfernung und seltener Kontakte. Auch bei meinen Paten Guido und Denise Lain möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Bei Paula Branco bedanke ich mich für ihr offenes Ohr, ihre Motivation aber vor allen für ihre unermüdliche Geduld und Liebe nach so vielen Jahren Fernbeziehung.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern und Geschwistern für die stetige Unterstützung, Liebe, Glauben und Vertrauen danken. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Euch für meine Abwesenheit in diese vielen Jahre entschuldigen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei dem Deutschen Akademischen Austausch Dienst (DAAD) für die Finanzierung des Deutschkurses vor Beginn meiner Promotion. Mein besonderer Dank gilt dem Nationalen Forschungsrat (CNPq) Brasilien, der mich während meiner Promotion in Deutschland finanziert hat.

**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 01.08.2011

Valter Leonardo de Quadros