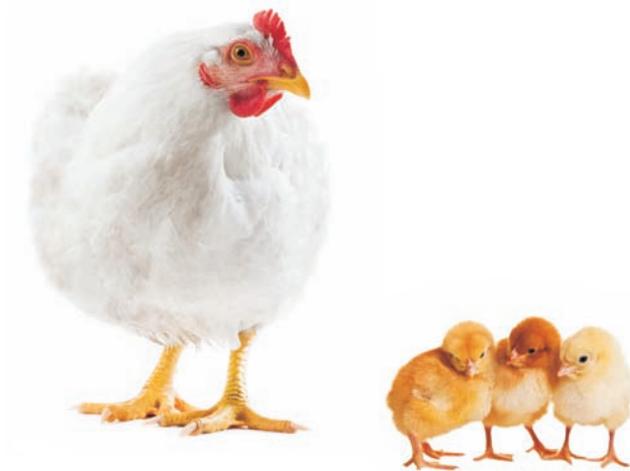


Molekularbiologische Untersuchungen an 82 Feldisolaten  
und 9 Reisolaten aus Lebendimpfstoffen des Virus der  
Infektiösen Bronchitis (Coronaviridae, Speziesgruppe 3)  
des Haushuhns (*Gallus gallus*)

**ALI ANTAKLI**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische  
Der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. E. F. Kaleta**

**Molekularbiologische Untersuchungen an 82 Feldisolaten und 9 Reisolaten aus  
Lebendimpfstoffen des Virus der Infektiösen Bronchitis  
(Coronaviridae, Speziesgruppe 3) des Haushuhns (*Gallus gallus*)**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Ali Antakli**

Tierarzt aus Antakya/Türkei

Gießen, 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. E. F. Kaleta

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Rümenapf

Tag der Disputation: 11.07.2011

Erklärung nach § 10, Absatz 5 der Promotionsordnung der Justus-Liebig-Universität Gießen:

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ali Antakli



Meinen lieben Eltern Meryem und Ibrahim  
und  
meiner Tante Mediha



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	3
2.1	Ordnung Nidovirales .....	
2.2.	Das Virus des Infektiösen Bronchitis der Hühner .....	5
2.2.1	Taxonomische Einordnung des Virus der Infektiösen Bronchitis .....	5
2.2.2	Morphologie des IBV .....	6
2.2.3	Chemische Eigenschaften des IBV .....	7
2.2.4	Replikation des IBV .....	9
2.2.5	Tenazität gegenüber chemischen und physikalischen Agenzien.....	9
2.2.6	Experimentelle Wirtssysteme für IBV .....	10
2.2.6.1	Embryonierte Hühnereier .....	10
2.2.6.2	Organkulturen des IBV .....	11
2.2.6.3	Zellkulturen des IBV .....	12
2.2.7	Varianten des IBV .....	13
2.2.8	Historische Entwicklung der Forschungen zur Infektiösen Bronchitis .....	17
2.2.9	Epidemiologie und Pathogenese .....	18
2.2.9.1	Hühner als natürliche und experimentelle Wirte für IBV .....	18
2.2.9.2	Symptome bei anderen Vogelarten nach Infektion mit aviären Coronaviren .....	18
2.2.9.3	Übertragung und Verbreitung des IBV .....	19
2.2.9.4	Inkubation und Verbreitung des IBV im Organismus.....	19
2.2..10.	Pathogenität .....	21
2.2.11	Symptomatik der IB .....	22
2.2.12	Morbidität und Mortalität .....	24
2.2.13	Pathologie .....	24
2.2.14	Histopathologie .....	25
2.2.15	Immunität gegen IBV .....	26
2.2.15.1	Maternale Antikörper .....	26
2.2.15.2	Erworbene Immunität .....	27
2.2.16	Diagnose der IB .....	28
2.2.16.1	Virusisolation .....	28
2.2.16.2	Detektion von IBV-Antigen .....	29
2.2.16.3	Detektion des IBV-Genoms .....	30
2.2.16.4	Typisierung des IBV .....	31

---

2.2.16.5	Methoden zum Antikörpernachweis .....	33
2.2.17	Differenzialdiagnosen .....	33
2.2.18	Bekämpfung der IB .....	34
2.2.18.1	Management .....	35
2.2.18.2	Vakzination .....	35
2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	40
2.3.1	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	41
2.3.2	Real Time PCR.....	41
2.3.3	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) .....	41
2.3.4	Nested-PCR .....	41
2.3.5	Multiplex-PCR .....	42
2.4	Fragestellung .....	43
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>44</b>
3.1	Material .....	44
3.1.1	Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien.....	44
3.1.2	RNA-Isolierung und PCR-Kits .....	46
3.1.3	PCR-Primer .....	47
3.1.4	Gelelektrophorese.....	49
3.1.5	Restriktionsenzyme .....	49
3.1.6	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	51
3.1.7	Embryonierte SPF-Eier .....	54
3.1.8	IBV-Isolate und Referenzstämme .....	54
3.2	Methoden.....	58
3.2.1	Vermehrung und Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274, D1466 sowie einiger Feldvirusisolate in Hühnerembryonen .....	58
3.2.2	Herstellung von Hühnerküken-Nierenzell-Kulturen .....	58
3.2.3	Vermehrung und Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274, D1466 sowie einiger Feldisolate in Hühnerküken-Nierenzell-Kulturen (HKNZ).....	59
3.2.4	Kristallviolettfröbung IBV infizierter Hühnerküken-Nierenzell-Kulturen .....	59
3.2.5	Vermehrung der IB-Impfstoffviren in embryonierten Hühnereiern.....	60
3.2.6	Hämagglutinationsstest .....	60
3.2.7	PCR-vermittelte Untersuchungen der IBV-Isolate.....	61
3.2.7.1	RNA-Isolation .....	61
3.2.7.1.1	RNA-Isolation mit dem „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ .....	61
3.2.7.1.2	RNA Isolation mit dem „NucleoSpin® Viral RNA Isolation Kit“ .....	62

---

3.2.7.2	Nachweis des IBV mittels N-Gen-Amplifizierung .....	62
3.2.7.2.1	Nachweis des IBV mittels konventioneller RT-PCR .....	62
3.2.7.2.2	Nachweis des IBV mittels Real Time „one step“ RT-PCR.....	65
3.2.7.3	Genotypisierung des IBV .....	66
3.2.7.3.1	Restriktionsenzymanalyse des gesamten S1-Gens des IBV .....	66
3.2.7.3.1.1	Amplifizierung des gesamten S1-Gens .....	66
3.2.7.3.1.2	Restriktionsverdau des gesamten S1-Gens.....	67
3.2.7.3.2	Genotypspezifische Nested-Multiplex PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274 und 793B.....	68
3.2.7.3.2.1	Äußere-RT-PCR und Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274 und 793B.....	69
3.2.7.3.2.2	Nested-Multiplex-PCR für die Genotypen Massachusetts, D274 und 793/B .....	70
3.2.7.3.2.3	Genotypspezifische Äußere-RT-PCR und Innere-PCR zum Nachweis des Genotyps D1466 .....	71
3.2.7.3.3	Genotypspezifische Äußere-RT-PCR und Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis von Genotypen Italy 02, Massachusetts, D1466, D274 und 793B .....	73
3.2.7.3.3.1	Genotypspezifische Äußere „one step“ RT-PCR.....	73
3.2.7.3.3.2	Genotypspezifische Nested-Multiplex-PCR .....	75
3.2.7.3.4	Sequenzierung .....	76
3.2.8	Agarosegel-Elektrophorese .....	77
3.2.8.1	Beladung des Gels .....	78
3.2.8.2	Geräteeinstellung.....	78
3.2.9	Ethidiumbromidfärbung .....	78
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>79</b>
4.1	Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274 und D1466 sowie einiger IBV-Feldisolate an Hühnerembryonen .....	79
4.2	Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274 und D1466 sowie einiger Feldisolate an Hühnerembryo-Nierenzell-Kulturen .....	82
4.3	Hämagglutinationstest .....	86
4.4	Nachweis des IBV mittels N-Gen-Amplifizierung .....	86
4.4.1	Nachweis des IBV mittels konventioneller RT-PCR .....	86
4.4.2	Nachweis des IBV mittels „one step“ Real Time RT-PCR.....	88
4.5	Genotypisierung des IBV .....	90
4.5.1	Amplifizierung des gesamten S1-Gens des IBV und Restriktionsenzymanalyse .....	90
4.5.2	Genotypspezifische RT- und Nested-Multiplex-PCR.....	92

---

4.5.2.1	Genotypspezifische RT- und Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis von Massachusetts, D274 und 793B.....	92
4.5.2.2	Genotypspezifische Äußere-RT-PCR und Innere-RT-PCR zum Nachweis vom Genotyp D1466 .....	94
4.5.2.3	Genotypspezifische Äußere-RT-PCR und Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Italy 02, Massachusetts, D1466, D274 und 793B .....	96
4.6	Sequenzierung .....	99
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	108
5.1	Vermehrung des IBV in Hühnerembryonen .....	109
5.2	Vermehrung des IBV in HKNZ .....	110
5.3	Hämagglutinationstest .....	111
5.4	RT-PCR-vermittelte Untersuchungen .....	111
5.4.1.	Nachweis des Virus der Infektiösen Bronchitis mittels RT-PCR .....	112
5.4.2	Genotypisierung des IBV .....	113
5.4.2.1	S1-Gen-RT-PCR und RFLP .....	113
5.4.2.2	Genotypisierung von Isolaten des Virus der Infektiösen Bronchitis mittels genotypspezifischer RT- und Nested-Multiplex-RT-PCR .....	114
5.5.	Sequenzierung einiger Isolate des Virus der Infektiösen Bronchitis .....	115
5.6	Vorkommen des Virus der Infektiösen Bronchitis .....	116
5.7	Schlussfolgerungen .....	119
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	121
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	123
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	125
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	149
	<b>Anhang</b> .....	150

---

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b>	Übersicht zur Ordnung Nidovirales (CAVANAGH, 2005 mit Ergänzungen).....	5
<b>Tabelle 2:</b>	Die Serotypen, die weltweit in den letzten 50 Jahren am häufigsten beschrieben wurden (modifiziert nach ZANELLA und Martino, 1998) .....	15
<b>Tabelle 3:</b>	In Deutschland zugelassene IBV-Lebendimpfstoffe (PEI, 2010) .....	38
<b>Tabelle 4:</b>	In Deutschland zugelassene IB-Inaktivatimpfstoffe (PEI, 2010).....	39
<b>Tabelle 5:</b>	Übersicht zu Herkunft und Bezeichnungen der verwendeten IBV-Isolate aus der KVRAF.....	55
<b>Tabelle 6:</b>	Übersicht zu Herkunft und Bezeichnungen der verwendeten IBV-Isolate aus dem Veterinärlabor Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven .....	56
<b>Tabelle 7:</b>	Als Positivkontrollen verwendete IBV-Referenzstämme.....	57
<b>Tabelle 8:</b>	Primer-Mix zur Durchführung der Reversen Transkription.....	63
<b>Tabelle 9:</b>	Mastermixrezept für die Nachweis-PCR.....	64
<b>Tabelle 10:</b>	Temperaturprofil des Thermocyclers für die Nachweis-PCR .....	64
<b>Tabelle 11:</b>	Mastermixrezept für den Nachweis des IBV mittels Real Time „one step“ RT-PCR.....	65
<b>Tabelle 12:</b>	Temperaturprofil des Thermocyclers für den Nachweis von IBV mittels Real Time „one step“ RT-PCR .....	65
<b>Tabelle 13:</b>	Mastermixrezept für S1-PCR .....	67
<b>Tabelle 14:</b>	Temperaturprofil des Thermocyclers für die S1-PCR.....	67
<b>Tabelle 15:</b>	Mastermixrezept für Restriktionsverdau des gesamten S1-Gens.....	68
<b>Tabelle 16:</b>	Mastermixrezept für die Äußere-PCR.....	69
<b>Tabelle 17:</b>	Mastermixrezept für die Nested-Multiplex-PCR.....	70
<b>Tabelle 18:</b>	Temperaturprofil des Thermocyclers für Äußere RT- und Nested-Multiplex-PCR.....	71
<b>Tabelle 19:</b>	Mastermixrezept für die Äußere PCR für D1466.....	72
<b>Tabelle 20:</b>	Mastermixrezept für die Innere PCR für D1466 .....	72
<b>Tabelle 21:</b>	Temperaturprofil des Thermocyclers für Äußere PCR und Innere PCR für D1466 .....	73
<b>Tabelle 22:</b>	Mastermixrezept für für die Äußeren „one step“ RT-PCR .....	73
<b>Tabelle 23:</b>	Temperaturprofil des Thermocyclers für Äußere „one step“ RT-PCR .....	74

---

<b>Tabelle 24:</b>	Mastermixrezept für genotypspezifische Nested-Multiplex-PCR.....	75
<b>Tabelle 25:</b>	Temperaturprofil des Thermocyclers für genotypspezifische Nested-Multiplex-PCR.....	75
<b>Tabelle 26:</b>	Mastermixrezept für die Amplifikation der oben erwähnten Isolate.....	76
<b>Tabelle 27:</b>	Temperaturprofil des Thermocyclers für oben erwähnten RT-PCRs.....	76
<b>Tabelle 28:</b>	Adaptation der Referenzstämme und einiger Feldisolate an Hühnerembryonen ..	81
<b>Tabelle 29:</b>	Adaptation der Referenzstämme und einiger Feldisolate an HKNZ .....	83
<b>Tabelle 30:</b>	KID <sub>50</sub> -Titer der verschiedenen Referenzstämme bzw. Feldisolate nach mehreren Ei- und Zellkulturpassagen .....	84

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Coronavirus .....	4
<b>Abbildung 2:</b>	Schematische Darstellung des IB-Virus .....	8
<b>Abbildung 3:</b>	Genomaufbau des IBV .....	9
<b>Abbildung 4:</b>	Replikationsorte des IBV .....	20
<b>Abbildung 5:</b>	Durch IBV verursachte Embryoveränderungen .....	80
<b>Abbildung 6:</b>	Durch IBV verursachter zytopathischer Effekt .....	85
<b>Abbildung 7:</b>	Amplifikate mit einer erwarteten Größe (453 bp) des N-Gens der untersuchten Referenzstämme .....	86
<b>Abbildung 8:</b>	Amplifikate mit einer erwarteten Größe (453 bp) des N-Gens der untersuchten Feldisolate .....	87
<b>Abbildung 9:</b>	Darstellung des Amplifikationsplots der Real-Time RT-PCR unter Berücksichtigung des Zielgens „N“ zum Nachweis des IBV .....	88
<b>Abbildung 10:</b>	Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des Referenzstammes H120 .....	89
<b>Abbildung 11:</b>	Amplifikate des S1-Gens in erwarteter Größe (1720 bp) auf Elektrophoresegel-A und deren Verdauung mit dem Restriktionsenzym <i>HaeIII</i> auf Gelelektrophoresegel-B .....	90
<b>Abbildung 12:</b>	Amplifikate des S1-Gens in erwarteter Größe (1720 bp) auf Elektrophoresegel-A und deren Verdauung mit dem Restriktionsenzym <i>XcmI</i> auf Elektrophoresegel-B .....	91
<b>Abbildung 13:</b>	Amplifikate des S1-Gens in erwarteter Größe (1720 bp) auf Elektrophoresegel-A und deren Verdauung mit dem Restriktionsenzym <i>BstYI</i> auf Elektrophoresegel-B .....	91
<b>Abbildung 14:</b>	Amplifikate in erwarteten Größen für Genotypen Massachusetts, D274 und 793B .....	92
<b>Abbildung 15:</b>	Amplifikate in der Nested-Multiplex-PCR in erwarteten Größen für die Genotypen Massachusetts, D274 und 793B .....	93
<b>Abbildung 16:</b>	Erwartete Amplifikate der Äußeren-RT-PCR zum Nachweis des Genotyps D1466 .....	94
<b>Abbildung 17:</b>	Erwartete Amplifikate der Inneren-RT-PCR zum Nachweis des Genotyps D1466 .....	95
<b>Abbildung 18:</b>	Gesamtüberblick über die Genotypen, die mit der konventionellen N- Gen-RT-PCR und Real Time RT-PCR als IBV-positiv festgestellt werden konnten (Lfd. Num. 1-24, Tabelle 5) .....	95
<b>Abbildung 19:</b>	Erwartete Amplifikate der Äußeren-RT-PCR .....	96
<b>Abbildung 20:</b>	Amplifikate für Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Italy 02, Massachusetts, D1466, D274 und 793B, .....	97

- 
- Abbildung 21:** Verteilung der nachgewiesenen IBV-Genotypen nach Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis bzw. zur Differenzierung der Genotypen Italy 02, Massachusetts, D1466, D274 und 793B ..... 97
- Abbildung 22:** Vorkommen von durch Nested-Multiplex-PCR identifizierte IBV-Genotypen in der Zeit von 1978 bis 2006 ..... 98
- Abbildung 23:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats IB291 mit dem avian infectious bronchitis virus Isolat IS/885, Accessionsnummer AY279533.1. Sequenzvergleichprogramm MegAlign 5.0, DNASTar Inc. .. 102
- Abbildung 24:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats IB764 mit dem Isolat FR/L-1450L/05 (QX-IBV), Accessionsnummer EF079117. Sequenzvergleichsprogramm MegAlign 5.0, DNASTar Inc..... 104
- Abbildung 25:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats IB787 mit dem Isolat AZ-40/05, Accessionsnummer EF186233. Sequenzvergleichprogramm MegAlign 5.0, DNASTar Inc. .... 104
- Abbildung 26:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats IB444 mit dem avian infectious bronchitis Isolat Belgian B1648, Accessionsnummer X87238.1. Sequenzvergleichprogramm MegAlign 5,0, DNASTar Inc..... 105
- Abbildung 27:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats IB719 mit dem FR-94047-94, Accessionsnummer AJ618987. Sequenzvergleichprogramm MegAlign 5,0, DNASTar Inc. .... 106
- Abbildung 28:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats EK313/06 mit dem aviären IBV-Isolat Pa/1220/98, Accessionsnummer AY789942. Sequenzvergleichsprogramm MegAlign 5.0, DNASTar Inc..... 107

---

**Anhang**

- Anhang 1:** Übersicht über den Nachweis und die Differenzierung der IBV-Isolate (Nr. 1-24) aus der KVRAF mittels N-Gen-RT-PCR und genotypspezifischer RT-PCR ..... 150
- Anhang 2:** Übersicht über die Ergebnisse aus dem Nachweis des IBV mittels „one step“ Real Time RT-PCR und genotypspezifischer RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274, D1466, 793B und Italy 02, Isolate aus der KVRAF ..... 151
- Anhang 3:** Übersicht über die Ergebnisse für den Nachweis des IBV mittels „one step“ RT-PCR und die genotypspezifische RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274, D1466, 793B und 02, Isolate aus dem Veterinärlabor Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven) .... 152

## Abkürzungen

A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
AGPT	Agargelpräzipitationstest
BME	Basal Medium Eagle´s mit Earleschen Salzen
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ct	Cycle Threshold
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTPS	Desoxynukleosidtriphosphat
DPB	Dulbecco`s Phosphate Buffer
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EID <sub>50</sub>	Embryo-infektiöse Dosis 50 %
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
FKS	Fetales Kälberserum
HAH	Hämagglutinationshemmungstest
HEF	Hühnerembryo-Fibroblasten
Hepes	Hydroxyethyl-piperazinylethansulfonsäure
HENZ	Hühnerembryo-Nierenzellen
HKNZ	Hühnerküken-Nierenzellen
IB	Infektiöse Bronchitis
IBV	Virus der Infektiösen Bronchitis
kDa	1.000 Dalton
KID <sub>50</sub>	Kultur Infektiöse Dosis 50 %
KVRAF	Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
l	Liter
Lfd. Nr.	Laufende Nummer
Mabs	Monoclonal antibodies
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Potentia hydrogenii
p.i.	post infectionem
REA	Restriktionsenzymanalyse
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphismus
Rn	Normalized reporter
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Reverstranskription
RT-PCR	Reverstranskriptionpolymerasekettenreaktion
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus
SPF	Spezifiziert pathogenfrei
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tgb-Nr.	Tagebuch-Nummer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Internationale Einheit)
UV	Ultraviolett
VNT	Virusneutralisationstest
<	Kleiner als
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter



## 1 EINLEITUNG

Die Infektiöse Bronchitis (IB) des Huhnes ist eine hoch kontagiöse, akut verlaufende Erkrankung der Atmungsorgane und der Urogenitalorgane, die Spätschäden verursacht und durch sekundäre Infektionen kompliziert werden kann. Nicht selten sind nach Infektionen mit dem Virus der infektiösen Bronchitis (IBV) auch Newcastle Disease Virus (NDV), Avian Adenovirus Group 1, Mykoplasmen und *E. coli* involviert, welche die Diagnose erschweren können.

Hühner aller Altersgruppen können von einer IBV-Infektion betroffen sein. Die Erkrankung ist in erster Linie durch respiratorische Symptome geprägt. Sie kann aber auch zu Enteritiden, Nephritiden und Nephrosen sowie zu Legeleistungsabfällen und verminderter Eiqualität führen. Das IBV gilt als eine der weltweit bedeutendsten Ursachen für wirtschaftliche Verluste in der Hühnerhaltung.

Das IBV wird dem Genus Coronavirus der Familie Coronaviridae zugeordnet. Coronaviren sind mit einer lipidhaltigen Membran umhüllt. Ihre Oberfläche ist mit glykoproteinhaltigen Fortsätzen, sogenannten „Spikes“ besetzt. Das Genom der Coronaviren besteht aus einer einsträngigen, linearen, nicht segmentierten RNA mit positiver Polarität.

Es gibt zahlreiche IBV-Isolate, sogenannte „Variantstämme“, die unterschiedliche antigenetische Eigenschaften und Organaffinitäten aufweisen. Das Vorkommen dieser IBV-Varianten variiert von Land zu Land und innerhalb eines Landes sogar von Region zu Region. Die Feststellung, welche Varianten in einem Land vorkommen, ist für die Kontrolle der IBV-Infektion von großer Bedeutung, da die Immunität nach einer IBV-Infektion, oder nach einer Impfung mit einem bestimmten IBV-Stamm, nicht vor einer Infektion mit einem anderen Variantstamm schützen kann.

Zur Serodiagnose einer IBV-Infektion stehen verschiedene Methoden, wie Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Virusneutralisationstest (VNT) und Hämagglutinationshemmungstest (HAH) zur Verfügung, die kommerziell erhältlich sind. Für die Typisierung von IBV-Varianten werden monoklonale Antikörper eingesetzt. Insbesondere haben heutzutage molekularbiologische Verfahren an Bedeutung gewonnen. Zum Nachweis des IBV werden in der „reverse transcription polymerase chain reaction“ (RT-PCR) universelle Primer verwendet, die alle bekannten IB-Viren erfassen. Dagegen werden die Varianten durch typspezifische Primer erkannt. Zu diesem Zweck sind auch Sequenzanalysen bestimmter Genbereiche oder Restriktionsenzymanalysen möglich.

Die vorliegende Arbeit gibt zunächst einen Überblick zur Fachliteratur der IB und des IBV und zu deren molekularbiologische Verfahren zur Differenzierung von Varianten mittels RT-PCR und Restriktionsenzymanalyse (REA). Die eigenen Untersuchungen dienen sowohl dem Nachweis des IBV des Haushuhns mittels konventioneller RT-PCR, als auch mit der Real Time RT-PCR. Die hierzu verwendeten Referenzstämme und Feldvirusisolate stammen aus einem Zeitraum von nahezu 30 Jahren.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Ordnung Nidovirales

Zur Ordnung Nidovirales gehören gemäß SPAAN et al. (2005) drei Familien mit den Genera und *Typspezies*:

- Coronaviridae
  - Coronavirus
    - Infectious bronchitis virus*
  - Torovirus
    - Bovine, equine, human, porcine toroviruses*
- Arteriviridae
  - Arterivirus
    - Equine arteritis virus*
- Roniviridae
  - Okavirus
    - Gill-associated virus*

Alle Viren der Ordnung Nidovirales enthalten unsegmentierte, lineare Ribonukleinsäure (RNA) mit positiver Polarität.

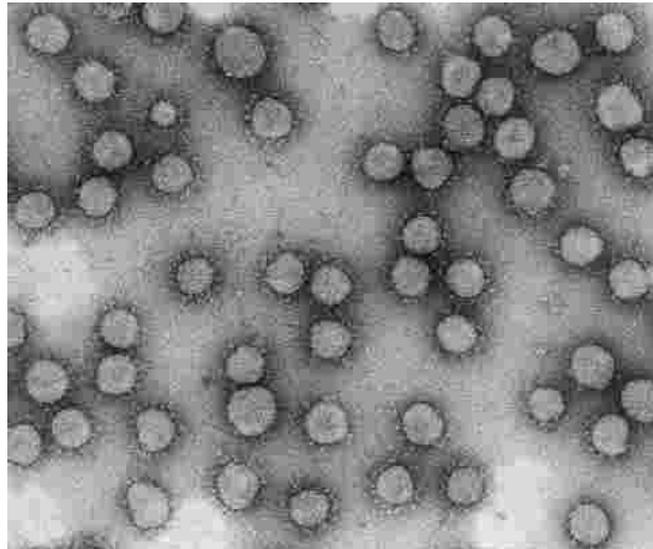
Der Name „Nido“ (lat. Nidus – Set) leitet sich von der diesen Viren eigenen besonderen Replikationsstrategie ab. Es kommt während der Replikation zur Bildung eines 3`-coterminalen „nested-set“ von subgenomischen mRNAs, von denen jeweils nur das Gen am 5`-Ende der mRNA translatiert wird (DE VRIES et al., 1997; VAN VLIET et al., 2002; SPAAN et al., 2005). Eine Übersicht zur Taxonomie vermittelt Tabelle 1. Einen Eindruck vom Aussehen der Viruspartikel zeigt Abbildung 1.

Zur **Familie Coronaviridae** gehören zwei Genera Coronavirus und Torovirus (SPAAN et al., 2005). Das Genus Coronavirus wird unterteilt in drei Gruppen, wobei die Gruppe 3 aus Coronaviren der Vögel besteht (Tabelle 1). Das Virus der Infektiösen Bronchitis des Huhnes (IBV) gehört zur Vogelgruppe, jedoch wurde für zahlreiche IB-Feldvirus- und Impfvirus-Isolate und Varianten noch keine Position in der taxonomischen Ordnung zu erkannt. Gleiches gilt für weitere „Coronavirus-ähnliche Isolate“ aus Enten (*Anas sp.*), Pfauen (*Pavo cristatus*), Tauben (*Columba livia*), Gänsen (*Anser anser*), Perlhühnern (*Numida meleagris*) und Fasanenartigen (*Alectoris sp.*).

Das Anfang 2003 entdeckte SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) unterscheidet sich phylogenetisch von den bisher bekannten Coronaviren. Deshalb wurde empfohlen, das SARS-CoV entweder in eine 4. Gruppe oder in eine Untergruppe der Gruppe 2 einzuordnen (MARRA et al., 2003; SNIJDER et al., 2003).

Equine Arteritis Virus ist der Prototyp der **Familie Arteriviridae**, zu der auch das *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (seuchenhaften Spätabort der Schweine), das *Lactate-dehydrogenase elevating virus* der Mäuse (LDV) und das *Simian haemorrhagic fever virus* der Affen gehören (SNIJDER und MEULENBERG, 1998).

Seit dem Jahr 2003 ist auch die **Familie Roniviridae** in die Ordnung Nidovirales einbezogen worden (GONZALES et al., 2003).



**Abbildung 1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Coronavirus (<http://www.cnb.uam.es/~webcoron/img/ME.jpg>, eingesehen im 2010).

**Tabelle 1:** Übersicht zur Ordnung Nidovirales (CAVANAGH, 2005 mit Ergänzungen)

<b>Ordnung</b>	Nidovirales
<b>Familie</b>	Arteriviridae Roniviridae Coronaviridae
<b>Genus</b>	<b>Coronavirus</b>
<b>Gruppe 1</b>	
<b>Subgruppe 1a</b>	Porcine transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) Canine enteric coronavirus (CECoV) Feline coronavirus (FCoV)
<b>Subgruppe 1b</b>	Porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) Human coronavirus 229E (HCoV) and other species (e.g. NL-63) Bat coronavirus
<b>Gruppe 2</b>	
<b>Subgruppe 2a</b>	Murine hepatitis coronavirus (MHV) Human coronavirus OC43 (HCoV OC43) and other species Bovine coronavirus (BCoV) Canine respiratory coronavirus (CRCoV) Porcine haemagglutinating encephalomyelitis coronavirus (HEV) Puffinosis coronavirus (engl. shearwater, <i>Puffinus puffinus</i> )
<b>Subgruppe 2b</b>	SARS-coronavirus (SARS-CoV)
<b>Gruppe 3</b>	Infectious bronchitis coronavirus (IBV) Turkey coronavirus (TCoV) Pheasant coronavirus (PhCoV) Goose coronavirus (GCoV) Duck coronavirus (DCoV) Pigeon coronavirus (PiCoV) Amazon coronavirus (PaCoV) Peacock coronavirus Guinea fowl coronavirus

## 2.2 Das Virus der Infektiösen Bronchitis der Hühner

### 2.2.1 Taxonomische Einordnung des Virus der Infektiösen Bronchitis

Das Virus der Infektiösen Bronchitis ist ein Mitglied der Familie Coronaviridae, die häufig einen Durchmesser von 60 bis 200 nm (SIDELL et al., 1983) haben. Sie sind von runder bis pleomorpher Gestalt und sind umgeben von ca. 20 nm langen keulenförmigen Oberflächenfortsätzen, welche der Namensgebung dienen (*lat.: corona* = Kranz).

Innerhalb des Genus „Coronavirus“ ist IBV in die Gruppe 3 einzuordnen. IBV ist aufgrund des unterschiedlichen Genomaufbaus und der Gensequenzen vom Coronavirus der Säugetiere zu unterscheiden (CAVANAGH, und NAQI, 2003). Es ist aber sowohl mit Puten-Coronaviren als auch mit Fasanen-Coronaviren eng verwandt (CAVANAGH et al., 2001; 2002).

Außer bei Haushühnern, Puten und Fasanen wurden Coronaviren in China und Brasilien aus Pfauen (*Pavo christatus*), Perlhühnern (*Numida meleagris*), Fasanenartigen (*Alectoris sp.*) und Enten (*Anas sp.*) isoliert (LIU et al., 2005).

In den letzten Jahren konnten weitere aviäre Coronaviren der Gruppe 3 aus Graugänsen (*Anser anser*) und Tauben (*Columba livia*) isoliert werden (JONASSEN et al., 2005). In China aus Tauben (QIAN et al., 2006) und Pfauen (*Pavo sp.*) (SUN et al., 2007) isolierte IBV-ähnliche Coronaviren waren auch für Hühner pathogen. Mit einem aus einer Krickente (*Nettion crecca*) stammenden Isolat konnte man bei experimenteller Inokulation von Haushühnern eine Krankheit, die mit Nierenproblemen einherging, hervorrufen (LIU et al., 2005). Andererseits wurden Coronaviren auch aus Papageien (*Amazona viridigenalis Cassin*) isoliert (GOUGH et al., 2006).

### 2.2.2 Morphologie des IBV

Das IBV hat im elektronenmikroskopischen Bild eine annähernd runde, häufig aber auch pleomorphe Form mit Durchmessern zwischen 80 bis 200 nm (BERRY et al., 1964; CUNNINGHAM, 1966; MCINTOSCH et al., 1967). Die Oberfläche der äußeren Hülle ist mit Fortsätzen besetzt (BERRY et al., 1964). Diese keulenförmigen Fortsätze sind ca. 20 nm lang und an den freien Enden 10 nm breit. Die Virushülle besteht aus einer doppelten, lipidhaltigen Membran (BECKER et al., 1967).

Das Genom des IBV ist eine einsträngige, nicht segmentierte RNA von positiver Polarität und weist eine Länge von über 27.600 Basen auf. Sie hat vier Strukturproteine, die im Einzelnen als N- (Nukleokapsidprotein), M- (Membranprotein), S- (Spikeprotein) und E-Proteine bezeichnet werden (Abbildung 2).

Das N-Protein ist mit der viralen RNA assoziiert und hat ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa (CAVANAGH, 1981; STERN et al., 1982). Sequenzierungsuntersuchungen der N-Gene vieler verschiedener IBV-Isolate haben gezeigt, dass die N-Gensequenz der IB-Viren sehr hoch konserviert ist.

Das M-Protein ist mit der viralen Membran assoziiert und ist für die Formation der viralen Membran und für das „Budding“ essentiell (STERN und SEFTON, 1982a).

Das phosphorylierte Nukleokapsidprotein (N) bildet mit der viralen RNA das helikale Nukleokapsidprotein in der Virushülle. Die Membranglykoproteine (M) ragen dagegen mit ihrem kleinen hydrophilen Anteil aus der Lipidschicht hervor. Die keulenförmigen Spikeglykoproteine (S) bestehen aus den S1- und S2-Untereinheiten und sind ca. 20 nm lang. Die S1- und S2-Untereinheiten besitzen ein Molekulargewicht von 92 kDa bzw. 84 kDa (CAVANAGH et al., 1983a; STERN und SEFTON, 1982b). Die S2-Untereinheit ist fest in der Membran verankert, während die S1-Untereinheit peripher liegt und keinen direkten Kontakt zur Virushülle hat. Die langen S-Proteine vermitteln die Anlagerung des Virus an die Oberfläche der Wirtszellen und die Fusion von Virus- und Zellmembran. So kann virale RNA ins Zytoplasma gelangen. Für diese Vorgänge spielt die S1-Untereinheit eine wesentliche Rolle. Sie induziert außerdem die Bildung sowohl von hämagglutinationshemmenden als auch von neutralisierenden Antikörpern und ermöglicht die Hämagglutination (CAVANAGH et al. 1984, MOCKETT et al., 1984). Die S1-Untereinheit enthält die meisten der antigenen Epitope des S-Proteins, welches insgesamt das Hauptantigen von IBV darstellt. Die große Variabilität der Sequenz der S1-Untereinheit ist maßgeblich am Auftreten verschiedener Serotypen bzw. Varianten beteiligt. Diese Variabilität führt zu praktischen Schwierigkeiten bei der Immunprophylaxe, weil der Bedarf an neuen Impfstoffen und Bekämpfungsstrategien dadurch ungebrochen ist.

### 2.2.3 Chemische Eigenschaften des IBV

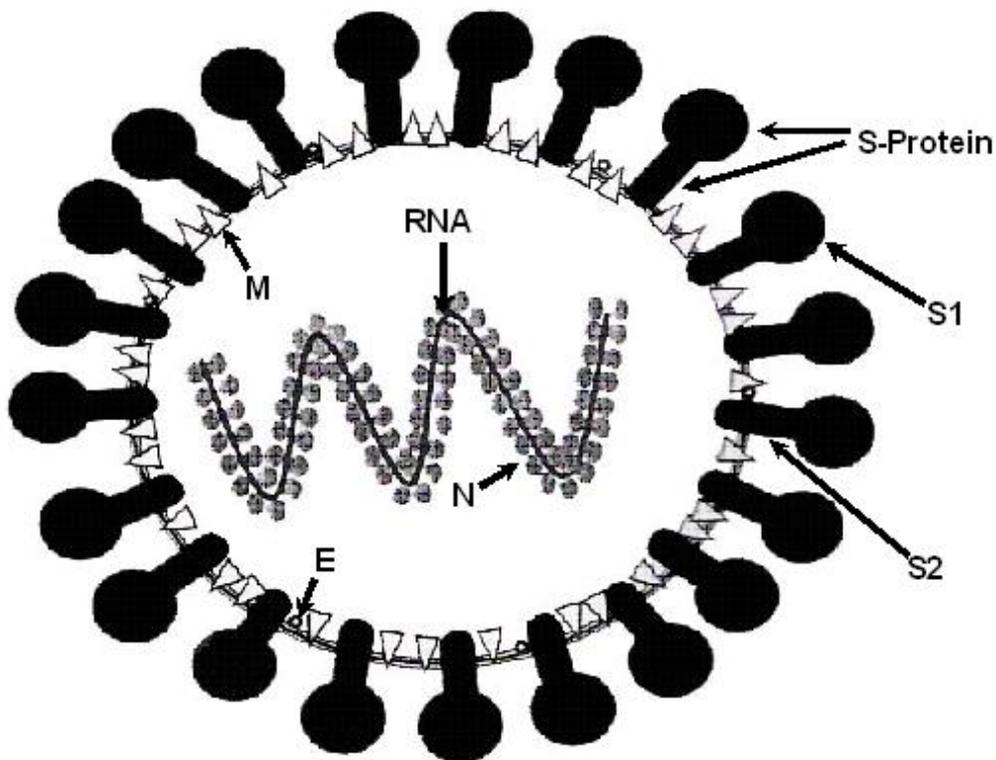
Das erste sequenzierte und veröffentlichte S-Gen der IB-Viren ist das S-Gen des Beaudette-Stammes (BINNS et al., 1985). Danach wurden weitere S-Gene verschiedener Stämme und Isolate sequenziert (NIESTERS et al., 1986; SUTOU et al., 1988; JIA et al., 1995; LEE und JACKWOOD, 2001). Das S1-Gen hat eine Länge von 1.611 Basen (520 Aminosäuren), das S2-Gen ist sogar 1.875 Basen (625 Aminosäuren) lang (BINNS et al., 1985, 1986).

NIESTERS et al. haben 1987 innerhalb des S1-Gens zwei hypervariable Regionen festgestellt. Die erste entspricht der 59. bis 69. Stelle und die zweite der 117. bis 131. Stelle der Aminosäuresequenz (aa-Sequenz). Es wurde später gezeigt, dass weniger als sieben aa-Unterschiede in diesen Regionen zu einem anderen Serotyp führen. IBV zeigt einen ausgeprägten Wirts- und Zelltropismus, der durch das S-Protein vermittelt wird. CASAIS et al. wiesen 2003 nach, dass ein rekombinantes IBV, welches das Spike-Protein eines anderen IBV-Stammes exprimiert, einen veränderten Zelltropismus aufweist.

Die E-Proteine sind in sehr geringen Mengen im Virus vorhanden und sind am „Budding“ von Viruspartikeln beteiligt.

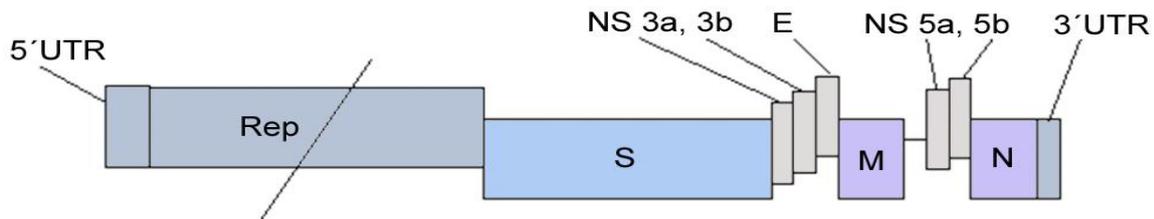
Außer M-, N-, S- und E- Strukturproteinen sind innerhalb des IBV-Genoms auch Nicht-Strukturproteine zu finden, die als 3a, 3b, 5a und 5b bezeichnet werden (Abbildung 3 [LIU und INGLIS, 1991; 1992a]).

Eine Behandlung von IBV mit Neuraminidase bewirkt, dass das Virus über das S-Protein an Erythrozyten binden und eine Hämagglutinationsreaktion auslösen kann (BINGHAM et al., 1975; SCHULZE et al., 1992).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des IB-Virus (CAVANAGH, 2005).

Das IBV besteht aus einer Lipidhülle, die mit vier Strukturproteinen und einem RNA-Genom (27.600 bp) assoziiert ist. Das N-Protein umgibt die RNA, die anderen Strukturproteine S1, S2, E und M liegen in der Lipidhülle. Die kleinen E-Proteine sind nur in geringen Mengen vorhanden. Auf der Virusoberfläche ragen die langen S-Proteine hervor. Die M-Proteine bilden den größten Anteil in der Lipidhülle und stehen mit den anderen Strukturproteinen in Kontakt.



**Abbildung 3:** Genomaufbau des IBV (LIU UND INGLIS, 1991, 1992a, CAVANAGH, 2005).

Alle Coronaviren besitzen die Gene für die Strukturproteine S, M, N und E in derselben Reihenfolge. Coronaviren unterscheiden sich voneinander im Bezug auf die Anzahl und die Lokalisation der Gene der Nicht-Strukturproteine (ns). IBV hat zwei solche Gene (3 und 5), die für die Nicht-Strukturproteine 3a/3b und 5a/5b codieren. Die E-Proteine werden vom ORF (open reading frame) des Gen-3 codiert.

#### 2.2.4 Replikation des IBV

Die Replikation des IBV findet nur im Zytoplasma der Wirtszelle statt, wobei das RNA-Genom des IBV als mRNA wirkt. Von der viralen mRNA wird zunächst eine RNA-abhängige RNA-Polymerase translatiert. Diese RNA-abhängige RNA-Polymerase schreibt die Plusstrang-RNA in einen Negativstrang um. Dieser Negativstrang dient als Matrize für die Synthese von neuen Plusstrang-RNA-Genomen sowie für die Transkription einer Reihe von subgenomischen mRNAs, deren 3`-Enden miteinander identisch, aber deren 5`-Enden voneinander unterschiedlich sind. Von diesen subgenomischen mRNAs werden die viralen Strukturproteine translatiert (MODROW, 2003). Dieser Mechanismus kann rekombinante IB-Viren erzeugen (LAI und CAVANAGH, 1997). Die neu entstandenen Viruspartikel akkumulieren in „smooth-Vesikeln“. Wie sie die Wirtszelle verlassen, ist nicht bekannt. Die ersten neuen IB-Viren sind 3-4 Stunden nach der Infektion fertiggestellt. Das Maximum der Virusproduktion wird bei 37 °C zwölf Stunden p.i. erreicht.

#### 2.2.5 Tenazität gegenüber chemischen und physikalischen Agenzien

Wie alle behüllte Viren ist auch das IBV gegen chemische und physikalische Agenzien wenig widerstandsfähig. Alle handelsüblichen Stalldesinfektionsmittel, die in der 12. DVG-Liste unter dem Titel „begrenzt viruzid, wirksam gegen Viren mit Hülle“ aufgeführt sind, eignen sich für die Inaktivierung der Infektiosität des IBV.

IBV gilt als ätherlabil, aber einige Stämme können in 20 %igem Äther bei 4 °C 18 Stunden überleben. 50 %iges Chloroform zerstört das IBV bei Zimmertemperatur innerhalb von zehn Minuten, ebenso 0,1 %iges Natriumdesoxycholat bei 4 °C in 18 Stunden (CAVANAGH und GELB, 2008). Formalin und Oxidationsmittel inaktivieren IBV. Starke Basen (5 %ige

Natronlauge) (CUNNINGHAM und STUART, 1946), sowie Säuren mit einem pH-Wert von 3 oder weniger (COWEN und HITCHNER, 1975a) inaktivieren die meisten IB-Viren innerhalb weniger Stunden.

Während die meisten IBV-Stämme bei 45 °C in 90 Minuten oder bei 56 °C in 15 Minuten inaktiviert werden (CAVANAGH und NAQI, 1997, CAVANAGH und GELB, 2008), verlieren einige IBV-Stämme ihre Infektiosität erst bei 56 °C nach 160 Minuten (VON BÜLOW, 1967).

Die Aufbewahrung des IBV in Form von virushaltiger Allantoisflüssigkeit wird bei –20 °C nicht empfohlen, dagegen bleibt das IBV bei –30 °C mehrere Jahre infektiös. Die Aufbewahrung der mit IBV infizierten Organe in Glycerol verlängert die Überlebensfähigkeit des Virus (HOFSTAD, 1984). Mit der Zunahme der Eipassagen nimmt die Hitzelabilität zu. Unter Umweltbedingungen ist das IBV im Frühling 12 Tage, im Winter 56 Tage lang infektiös (CAVANAGH und GELB, 2008).

Nach Lyophilisierung IBV-haltiger Allantoisflüssigkeit ist die Infektiosität nach CUNNINGHAM (1957) bei 37 °C noch 106 Tage, bei 20-30 °C noch 458 Tage und bei 4 °C noch 500 Tage erhalten. Bei Aufbewahrung des IBV im Kühlschrank im lyophilisierten Zustand blieb das IBV nach HOFSTAD (1984) 30 Jahre lang vermehrungsfähig, wobei die Zugabe von 10 %iger Glucoselösung dem Virus im lyophilisierten Zustand mehr Stabilität verleiht. Nach MAZURNINA (1980) eignet sich für die Lyophilisierung auch ein Zusatz von 4 %iger Peptonlösung mit Glucose und Gelatine.

## **2.2.6 Experimentelle Wirtssysteme für IBV**

### **2.2.6.1 Embryonierte Hühnereier**

Mit der Inokulation des Virusmaterials in die Allantoishöhle von 8-12 (optimal 9-11) Tage bebrüteten, embryonierten Hühnereiern gelingt die Virusvermehrung am besten (DELAPLANE, 1947). Neben der Inokulation in die Allantoishöhle eignet sich auch die Amnionhöhle zur Fortführung der Viruspassagen. Die Virulenz des Virus für Embryonen steigt bei steigender Passagenzahl an, dagegen nimmt sie für Hühner ab (BEAUDETTE und HUDSON, 1937). Bei den ersten Eipassagen treten kaum Embryoveränderungen auf. Meistens treten erst nach fünf oder mehr Passagen, bei einigen Isolaten werden sogar über 10 Eipassagen benötigt, um Krümmung („curling effect“), Verzerrung („dwarfing effect“) oder Tod der Embryonen auszulösen. Weitere Veränderungen im embryonierten Hühnerei, die nach der Inokulation des IBV in die Allantoishöhle hervorgerufen werden, sind wie folgt:

- herabgesetzte Beweglichkeit der Embryonen
- das Volumen der Amnionflüssigkeit ist verringert, sie ist verdickt, mit Fibrinflocken durchsetzt und der Embryo klebt an der Amnionmembran
- das Volumen der Allantoisflüssigkeit ist vermehrt und sie ist klarer als gewöhnlich
- Verzögerung der Größenzunahme der Embryonen
- die Zehen der verzwergten Embryonen liegen meistens am Hinterkopf
- die Nieren sind blass, hämorrhagisch und weisen kleine Nekroseherde auf
- Uratablagerungen können in den Mesonephronen beobachtet werden
- in der Leber sind diffus-gelbe nekrotische Bezirke erkennbar
- Ikterus und Milzschwellung, eine fettähnliche Masse in der Kloake und manchmal ein unvollkommener Verschluss des Nabels können auftreten (LOOMIS et al., 1950).

Solche Veränderungen sind allerdings nicht pathognomisch. Bei Adenovirus-Infektionen, dem Picornavirus der Aviären Enzephalomyelitis, dem Picornavirus der Entenhepatitis und den Paramyxovirus Typ 1-Isolaten der lentogenen Form der Newcastle-Krankheit können solche oder sehr ähnliche Veränderungen in embryonierten Hühnereiern ebenfalls auftreten (WOERNLE und HAFEZ, 1992).

Außer diesen makroskopischen Läsionen sind folgende mikroskopische Läsionen von LOOMIS et al. (1950) registriert worden:

- Kongestion mit perivaskulären Manschetten
- Leberzellnekrose
- Lunge mit Kongestion, zellulärer Infiltration und mit serösem Exsudat gefüllte Bronchien
- interstitiale Nephritis, ödematöse und hypertrophe Tubuli
- ödematöse Chorioallantois- und Amnionmembran

Auch die histopathologischen Veränderungen sind nicht charakteristisch für IBV-Infektionen.

#### **2.2.6.2 Organkulturen des IBV**

Für die Vermehrung des IBV in Organkulturen können Chorioallantoismembranen (FAHEY UND CRAWLEY, 1956), Magnum- und Uterusabschnitte, Lunge, Luftsackmembran (DARBYSHIRE et al., 1978) und Trachealringkulturen (TRK) von Hühnerküken oder 20 Tage alten Hühnerembryonen (COOK et al., 1976) verwendet werden, wobei sich die in Zellkulturmedium suspendierten Trachealringkulturen dafür am besten eignen.

Der Vorteil der TRK gegenüber Hühnerkükennierenzellen (HKNZ), Hühnerembryonierenzellen (HENZ) oder embryonierten Hühnereiern ist, dass keine vorherige Adaptation des Virus an die Zellen nötig ist.

Für die Herstellung von Trachealringkulturen werden 20 Tage bebrütete, embryonierte Hühnereier oder einige Wochen alte Hühnerküken benötigt (COOK et al., 1976). Aus Embryonen explantierte Trachealringe können entweder in Zellkulturmedium eingelegt werden („submersed cultures“) oder als „open-air“-Kulturen eingesetzt werden (NEUMANN und KALETA, 1975). In Trachealringkulturen bewirkt das IBV (z. B.  $10^{2,5}$  ID<sub>50</sub>/ml) bei 6-8 Wochen SPF-Küken zunächst einen Stillstand der Zilienbewegung, führt dann zum Zilienverlust und schließlich zur Abrundung der oberflächlichen Epithelzellen. Zum Schluss lösen sich die Zellen des Flimmerepithels von der Basalmembran ab. Trachealringkulturen eignen sich neben der Virusisolation auch zur Durchführung von Virusneutralisationstests, zur Titration, Detektion und Serotypisierung neuer IBV-Isolate (DARBYSHIRE et al., 1979).

### 2.2.6.3 Zellkulturen des IBV

Kultivierte Hühnerembryonierenzellen (HENZ) und Hühnerkükennierenzellen (HKNZ) werden für die Viruszüchtung am häufigsten und auch am erfolgreichsten verwendet (CAVANAGH und NAQI, 2003). Für die IBV-Erstisolierung eignen sie sich jedoch nicht. Erst nach mehreren Zellkulturpassagen, denen mehrere Eipassagen vorausgegangen sind, ist es möglich, einen deutlichen zytopathischen Effekt (ZPE) zu sehen. Im Allgemeinen ist der ZPE in Zellkulturen mit Granulation und Vakuolisierung des Zytoplasmas, Synzytienbildung, Zellnekrose, Pyknose der Zellkerne, Verklumpen und Schrumpfen der Zellen und anschließender Ablösung des Zellrasens vom Kulturgefäß und Lysis charakteristisch. Eine Zugabe von Trypsin kann den ZPE verstärken.

OTSUKI et al. (1979) haben die Vermehrung von IBV in HKNZ-, in HEF- (Hühnerembryofibroblasten-), in HeLa- und in BHK-21-Zellkulturen untersucht. In HKNZ-Zellkulturen erschienen Virusgenerationen 4-6 Stunden p.i. und der Virustiter erreichte sein Maximum ( $10^{6,5}$ -  $10^{8,5}$  KID<sub>50</sub>/0,1 ml) 36 Stunden nach der Infektion. Ein zytopathogener Effekt (ZPE) wurde innerhalb von 24 Stunden beobachtet. Obwohl sich das IBV in HEF replizierte, wurde kein ZPE beobachtet. Nur die IBV Stämme Holte und Beaudette 42 vermehrten sich in BHK-21-Zellkulturen. In HeLa-Zellen hingegen vermehrten sich keine der untersuchten Stämme.

Einige IBV-Stämme wurden erfolgreich in Hühnerembryoleberzell- und in Verozellkulturen vermehrt. So konnten die Stämme M41 und Iowa 97 in Verozellkulturen vermehrt werden.

Voraussetzung dafür ist, dass zuvor Passagen in embryonierten Hühnereiern oder in Hühnerembryozellkulturen stattgefunden haben (CORIA und RITCHIE, 1973).

### 2.2.7 Varianten des IBV

Der weltweit häufigste IBV-Stamm ist der im Mai 1941 von VAN ROEKEL isolierte Stamm Massachusetts oder synonym M41 (JUNGHERR et al., 1956).

WOERNLE (1959, 1963) hat durch Agargelpräzipitationstests nachgewiesen, dass die IBV-Stämme Massachusetts, Beaudette, Connecticut, Gray, Holte, T-Virus und die von ihm im Staatlichen Tierärztlichenuntersuchungsamt in Stuttgart isolierten IBVs einheitlich reagierten. Deshalb sprach Woernle von einem einheitlichen präzipitierenden Antigen. Spätere Untersuchungen, u.a. von KOCH et al. (1986) haben gezeigt, dass IB-Viren neben gruppenspezifisch reagierenden Antigenen, die in M- und N-Strukturproteinen lokalisiert sind, auch typspezifische Antigene, die in Spike-Proteinen, vor allem in S1-Untereinheiten, lokalisiert sind, (CAVANAGH et al., 1986; CAVANAGH und DAVIS, 1986) besitzen. Mit Hilfe der M- und N-Gene, die für M- und N-Strukturproteine kodieren, kann IBV nur detektiert werden aber nicht typisiert werden. Die Typisierung von IBV erfolgt durch das S-Gen, vor allem durch die S1-Untereinheit. Durch molekularbiologische Untersuchungen wurde bewiesen, dass neue IBV durch wenige Änderungen der Aminosäuresequenz der S1-Gene entstehen können.

Zur serologischen Klassifikation und zur Differenzierung der antigenetischen Eigenschaften der IB-Viren werden der Virusneutralisationstest in embryonierten Hühnereiern, Trachealringkulturen, verschiedene primäre und permanente Zellkulturen, Hämagglutinationshemmungstests, ELISA und heutzutage vermehrt molekularbiologische Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Es wurde bislang keine einheitliche und validierte Methode festgelegt, um die IBV-Stämme zu differenzieren und je nach Ergebnis zu klassifizieren. Je nach verwendeter Methodik erfolgten verschiedene Klassifikationen der IBV-Isolate.

Zum Beispiel können Pathotypen durch *in vivo*-Untersuchungen (respiratorische, enterale, nephritische, urogenitale Pathotypen), Serotypen durch Kreuzneutralisationstests in Zellkulturen mit monospezifischen bzw. monoklonalen Antiseren, Genotypen durch molekularbiologische Untersuchungen mittels PCR-Technologie, Protektotypen durch Impf- und Infektionsversuche im Huhn (Stämme, die im Huhn Kreuzprotektion hervorrufen) eingeteilt werden.

Da es noch keine einheitliche Methode zur Gruppierung der IBV-Stämme gibt, ist es möglich, dass unterschiedliche Virusnamen für denselben Stamm verwendet werden. CAVANAGH hat 1998 vorgeschlagen, den Begriff Typ zu verwenden, um diese Problematik zu umgehen. Die Einrichtung von Referenzlaboratorien, die standardisierte und validierte Techniken verwenden, könnte in Zukunft für die Etablierung einer einheitlichen Klassifizierungsmethodik sorgen.

Die wichtigsten Serotypen, die weltweit in den letzten 50 Jahren eine Rolle gespielt haben, sind der Tabelle 2 zu entnehmen (modifiziert nach ZANELLA und MARTINO, 1998).

**Tabelle 2:** Die Serotypen, die weltweit in den letzten Jahren am häufigsten beschrieben wurden (modifiziert nach ZANELLA und MARTINO, 1998)

Nummer	Bezeichnung	Jahr der Erstisolierung oder Erstbeschreibung	Land	Form der Erkrankung
1	Massachusetts 41	1941	USA	Resp.
2	Connecticut 46	1956	USA	Resp.
3	Iowa 97	1958	USA	Resp.
4	Iowa 609	1958	USA	Resp.
5	Holte	1962	USA	N-N
6	Gray	1962	USA	N-N
7	JMK	1964	USA	N-N
8	SE-17	1969	USA	Resp.
9	Florida	(?)	USA	Resp.
10	Clarke 333	1971	USA	Resp.
11	Arkansas 99	1973	USA	Resp.
12	Arkansas 155	1973	USA	Resp.
13	California G	1975	USA	Resp.
14	California S	1975	USA	Resp.
15	Maine 209	1976	USA	Resp.
16	Maine 212	1976	USA	Resp.
17	Cal	1991	USA	N-N
18	1731/65-PV	1966	Italien	N-N
19	AZ-446/66	1966	Italien	N-N
20	AZ-693/66	1966	Italien	N-N
21	1663/66-PV	1966	Italien	N-N
22	1677/66/-PV	1966	Italien	N-N
23	215/67-PV	1967	Italien	N-N
24	AZ-529/67	1967	Italien	N-N
25	Cuxhaven 10	1969	Deutschland	Resp.
26	K-4	1969	Deutschland	Resp.
27	37/69-FO	1969	Italien	k. A.
28	269/69-PV	1969	Italien	k. A.
29	AZ-857/72	1972	Italien	N-N
30	AZ-23/74	1974	Italien	N-N
31	D-207	1981	Niederlande	Resp.
32	D-212	1981	Niederlande	Resp.
33	D-1466	1981	Niederlande	Resp.

Fortsetzung der Tabelle 2

Nummer	Bezeichnung	Jahr der Erstisolierung oder Erstbeschreibung	Land	Form der Erkrankung
34	AZ-156/81	1981	Italien	Resp.
35	HV-6/81	1982	Großbritannien	Resp.
36	3794/FO	1983	Italien	k. A.
37	NP 1648	1985	Belgien	N-N
38	AZ-266/86	1986	Italien	k. A.
39	PL-84084	1986	Frankreich	Resp.
40	CR-84221	1987	Frankreich	N-N
41	UK-4/91	1991	Großbritannien	Spezielle
42	D-3128	1991	Niederlande	Resp.
43	Australia T	1962	Australien	N-N
44	Massey/New Zeal.	1967	Neuseeland	Resp., N-N
45	Mendendez/Arg. (1716, 1859, 265)	1970	Argentinien	Resp., N-N
46	Kita 1/Japan	1981	Japan	Resp.
47	Morocco G	1986	Marokko	Spez.
48	MA-87/Japan	1996	Japan	N-N
49	ST/China	1996	China	N-N
50	QX-China	1998	China	Spezielle
51	Italy 02	1999	Italien	N-N

Resp.: Respiratorische Form,  
N-N : Nephritis-Nephrosis Form,  
k. A.: keine Angabe

- 1) Die Stämme NP 1648 und CR84221 gelten als identisch.
- 2) Der Stamm UK-4/91 ist identisch mit den Stämmen 793B und CR88121.

### 2.2.8 Historische Entwicklung der Forschungen zur Infektiösen Bronchitis

Die Infektiöse Bronchitis der Hühner wurde 1930 zum ersten Mal in den USA in Nord Dakota bei zwei Tage bis drei Wochen alten Hühnerküken beobachtet und von SCHALK und HAWN (1931) als neuartige respiratorische Erkrankung der Hühnerküken beschrieben. Zwei Jahre später wurde der Erreger von BUSHNELL und BRANDLY (1933) als filtrierbar erkannt und für eine Form der Infektiösen Laryngotracheitis (ILT) gehalten. Von BEACH und SCHALM (1936) wurde durch Kreuzimmunitätsstudien im Huhn bewiesen, dass sich IBV sowohl von ILTV und als auch von *Coryza contagiosa* unterscheidet. BEAUDETTE und HUDSON (1937) gelang es, das Virus in embryonierten Hühnereiern zu züchten. Sie erkannten, dass die Letalität der Embryonen bei zunehmender Passagenzahl anstieg. DELAPLANE und STUART (1939) konnten die Krankheit zum ersten Mal bei halberwachsenen und erwachsenen Hühnern beobachten. Sie beschrieben respiratorische Symptome und einen Rückgang der Legeleistung. VAN ROEKEL et al. (1942) führten mit IBV die ersten Serumneutralisationstests mit embryonierten Hühnereiern und Immunisationsversuche im Huhn durch.

Ab 1948 wurde weltweit über das Vorkommen von IB berichtet. Virologisch wurde IB 1948 in England (ASPLIN), 1955 in Japan (SATO et al.), 1956 in Holland (BIJLENGA), Belgien (RICHTER) und in Italien (PETEK), 1959 in der Bundesrepublik Deutschland (WOERNLE), in Österreich (KÖHLER und BURTSCHER) und in Frankreich (BRION), 1962 in Dänemark (VELLING), 1964 in der Deutschen Demokratischen Republik (EISENGARTEN) und in der Schweiz (KLINGLER) und 1966 in Finnland (ESTOLA) nachgewiesen.

Über das Nephritis-Nephrosis-Syndrom wurde zum ersten Mal 1962 in den USA und in Australien berichtet (WINTERFIELD und HITCHNER, 1962; CUMMING, 1963). Im Jahre 1991 wurde zum ersten Mal ein enteropathogenes IBV (Isolat G) in Marokko isoliert (EL HOUADFI et al., 1991) und in Großbritannien 1992 der Stamm 4/91 (GOUGH et al., 1992), der spezielle Symptome, vor allem eine Myopathie der Pectoralismuskulatur, Zyanose der Kämme und Stauungerscheinungen im gesamten Körper auslöst.

Nahezu kontinuierlich wird über neue Varianten des IBV berichtet (Tabelle 2), die unterschiedliche epidemiologische, pathologische und antigenetische Eigenschaften aufweisen. Solche Isolate weisen auch verschiedene Organaffinitäten auf (ZANELLA und MARTINO, 1998).

Die Infektiöse Bronchitis des Huhnes ist weltweit verbreitet und trotz regelmäßiger Impfungen kommt es immer wieder in den USA, Europa, Australien, Asien und Afrika zu neuen Ausbrüchen der Erkrankung und zur Isolation neuer Virusvarianten (CAVANAGH und NAQI, 2003; WORTHINGTON und JONES 2006; CAVANAGH und GELB, 2008 BOUROGÂA et al.,

2009; MASE et al., 2009; DUCATEZ et al., 2009; CHEN et al., 2009; HEWSON et al., 2010). Es existiert zwischen den neu isolierten und den „alten“ IBV-Isolaten nur eine geringe oder gar keine Kreuzimmunität.

Die IB ist aus wirtschaftlicher Hinsicht von enormer Bedeutung durch den Rückgang der Legeleistung, die verminderte Eiqualität, die unbefriedigende Futtermittelverwertung insbesondere bei Broilern und die hohen Mortalitätsraten bei Küken (CAVANAGH und NAQI, 2003).

## **2.2.9 Epidemiologie und Pathogenese**

### **2.2.9.1 Hühner als natürliche Wirte für IBV**

Haushühner (*Gallus gallus*) sind die einzigen Wirte, die natürlicherweise für das IBV empfänglich sind. Die Empfänglichkeit für eine Infektion mit IBV ist jedoch von Rasse zu Rasse und von Linie zu Linie unterschiedlich (CUMMING und CHUBB, 1988; BUMSTEAD et al., 1989; OTSUKI et al., 1990).

Das Alter der Hühner spielt eine wichtige Rolle bei der Empfänglichkeit für eine Infektion mit IBV. Obwohl alle Altersstufen für eine Infektion empfänglich sind, löst sie bei jüngeren Hühnern heftigere Symptome aus und verursacht eine höhere Mortalität (HOFSTAD, 1984) als bei erwachsenen Hühnern. Bei älteren Hühnern verläuft die Krankheit mit mildereren Symptomen (CRINION und HOFSTAD, 1972; ALBASSAM et al., 1986, CAVANAGH und GELB, 2008).

### **2.2.9.2 Symptome bei anderen Vogelarten nach Infektion mit aviären Coronaviren**

Nach Puten-Coronavirus-Infektionen sind die adulten Puten geschwächt, die Futteraufnahme vermindert und Futtermittelverwertung reduziert. Somit sind bei den erkrankten Puten Legeleistung und Entwicklungsrückstand zu beobachten (GUY 2000, 2003; GUY et al., 2000). Dagegen können Puten-Coronaviren bei Jungputen Mortalität verursachen. Nach experimenteller Inokulation von Hühnern mit Puten-Coronaviren wurde beobachtet, dass sich das inokulierte Virus im Darmtrakt repliziert aber keine Symptome hervorgerufen (GUY, 2000).

Vom IBV unterscheidbare Coronaviren wurden auch von Fasanen mit respiratorischen und/oder renalen Symptomen isoliert (LISTER et al., 1985; GOUGH et al., 1996). Sequenzanalysen der von Fasanen isolierten Coronaviren haben gezeigt, dass diese Isolate den IB-Viren des Huhnes sehr ähnlich aber nicht identisch sind (CAVANAGH et al., 1992). Infektionsversuche mit aus Fasanen isolierten Coronaviren blieben bei Verwendung von SPF-

Hühnern erfolglos (LISTER et al., 1985). Aus einer Pfau (*Pavo cristatus*) und aus einer Ente (*Anas sp*) stammende Coronavirus-Isolate lösten bei den betroffenen Tieren keine Sympomatik aus (LIU et al., 2005).

ITO et al. (1991) haben aus Perlhühnern (*Numida meleagris*) Coronavirus mit IBV-ähnliche antigenetische Eigenschaften isoliert. Bei den betroffenen Perlhühnern waren schlechte Futteraufnahme, Enteritis und hohe Mortalität zu beobachten. In Australien wurde 1988 ein Coronavirus aus erkrankten Tauben (*Columba livia*) isoliert. Die Tauben litten unter Dyspnoe und hatten übermäßiges Schleim am Schnabel und gekräuselt Gefieder (BARR et al., 1988). GOUGH et al., (2006) haben ein Coronavirus aus ein verendeten Papageinart (*Amazona viridigenalis* Cassin) isoliert. Das verendete Tier hatte Anorexie, Regurgitation, dilatierte Drüsenmagen und unverdaute Futterreste im Kot.

### 2.2.9.3 Übertragung und Verbreitung des IBV

Die Übertragung des IBV erfolgt horizontal von Huhn zu Huhn meistens durch Tröpfcheninfektion (air-borne disease) und seltener über kontaminiertes Trinkwasser, Futter oder kotstaubhaltige Luft (ALEXANDER und GOUGH, 1977). Das IB-Virus verbreitet sich innerhalb eines Bestandes sehr rasch. Virusausscheidungen einer infizierten Henne können binnen 36 Stunden zur Erkrankung des gesamten Bestandes führen. Inapparent infizierte oder rekonvaleszente Hühner können das Virus lange Zeit mit Kot und Nasensekret ausscheiden und spielen somit bei der Erregerausbreitung eine große Rolle. Weiterhin bilden kontaminiertes bewegliches und unbewegliches Inventar sowie Personal bei der Virusverbreitung eine potenzielle Gefahrenquelle (CAVANAGH und NAQI, 2003; CAVANAGH und GELB, 2008). In Anbetracht der geringen Tenazität des Virus spielt das unbelebte Equipment eine untergeordnete Rolle. CAVANAGH (2005) berichtet in seinem Review, dass IBV in galliformen und nicht-galliformen Vögeln repliziert und diese Tiere als Vektoren agieren können. So ist auch eine Verbreitung des Virus über längere Strecken möglich.

Als Ursache von IB-Ausbrüchen können auch Managementprobleme und prädisponierende Krankheiten in Betracht gezogen werden. Das Zusammensetzen inapparent infizierter oder rekonvaleszenter Hühner mit gesunden empfänglichen Hühnern kann als eine mögliche Ursache für IB-Ausbrüche gesehen werden (WOERNLE, 1961; ALEXANDER und GOUGH 1977; JONES und AMBALI, 1987)

#### 2.2.9.4 Inkubation und Verbreitung des IBV im Organismus

Die Inkubationszeit beträgt beim empfänglichen jungen Huhn 18-36 Stunden und hängt von folgenden Faktoren ab:

- Virulenz des jeweiligen IBV
- Organaffinität des jeweiligen IBV (Organotropismus)
- Infektionsdosis
- Infektionsweg
- Alter der Hühner
- Immunstatus der betroffenen Hühner

Das IBV breitet sich von der Eintrittspforte im oberen Respirationstrakt in verschiedene Organe aus. Das bevorzugte Zielorgan ist von Isolat zu Isolat unterschiedlich. So sind etwa die Schleimhäute der Atemwege, die Hardersche Drüse, die Eileiter, die Nieren, der Darmtrakt und die Bursa Fabricii betroffen (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Replikationsorte des IBV.

IBV repliziert sich in den Epithelzellen mehrerer Organe. Hauptsächlich werden die pathologischen Veränderungen im Respirationstrakt beobachtet. Allerdings sind einige IBV-Stämme hoch nephropathogen, urogenitalpathogen und enteropathogen (CAVANAGH, 2005).

### 2.2.10. Pathogenität

IB-Viren können sich je nach Organaffinität (Organotropismus) in verschiedenen Organen vermehren. In Frage kommen Respirationstrakt, Ösophagus, Duodenum, Ileum, Zäkum, Rektum, Nieren, Reproduktionstrakt, Bursa Fabricii und Hardersche Drüse. So konnten LUCIO und FABRICANT (1990) das IBV bei experimentell infizierten Hühnern aus Caecaltonsillen, Trachea, Bronchien, Lungen, Ösophagus und Nieren reisolieren. Ebenso konnten TORO et al. (1996) den IBV-Impfstamm H120 nach „Eyedrop“-Inokulation der Hühner bis 14 Tage p.i. mittels Immunfluoreszenztechnik in der Harderschen Drüse detektieren und mit Hilfe von embryonierten Hühnereiern reisolieren. Auch konnte der enteropathogene IBV-Stamm „Strain G“ aus Marokko nach intranasaler Inokulation von Hühnern aus Trachea, Nieren, Duodenum und Ileum reisoliert werden (JONES und AMBALI, 1987).

Im Allgemeinen können alle IBV den Respirationstrakt infizieren und dort die charakteristischen Symptome und Läsionen verursachen, die aber von Stamm zu Stamm unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die Anwesenheit von maternalen Antikörpern kann die jungen Küken nur in den ersten Wochen vor einer Belastungsinfektion schützen (MOCKETT et al., 1987). Ansonsten treten bei sehr jungen Hühnern meist heftige Symptome mit gesteigerter Mortalität auf. Ältere Hühner erkranken nicht so stark und genesen ohne weiteres. Luftsackentzündungen treten meist durch Komplikation mit Sekundärinfektionen auf.

Nierenläsionen werden durch nephropathogenes IBV hervorgerufen und fallen meistens bei sehr proteinreich gefütterten männlichen Tieren auf, die unter Stressbedingungen gehalten werden. Es gibt mehrere unterschiedlich virulente nephropathogene IB-Stämme, vor allem der australische Stamm T verursacht Nieren-Läsionen und hohe Mortalität. Die in den USA vorkommenden nephropathogenen Stämme Gray und Holte sowie der belgische Stamm B1648 sind weniger virulent. Der Stamm Connecticut, der normalerweise eine Affinität zum Respirationstrakt aufweist, kann nach mehreren *in-vivo*-Passagen nephropathogen werden (UENAKA et al., 1998).

GANAPATHY und BRADBURY (1999) haben die Pathogenität von *Mycoplasma imitans* für Küken bei Mischinfektionen mit IBV untersucht. Bei Monoinfektion mit *Mycoplasma imitans* und bei nicht infizierten Kontrollküken kam es zu keinen klinische Symptomen oder makroskopischen Veränderungen. Bei Monoinfektionen mit IBV (Stamm M41) und bei Mischinfektionen mit IBV und *Mycoplasma imitans* wurden makroskopische Veränderungen festgestellt. Außerdem war die Symptomatik bei Tieren mit Mischinfektion schwerer als bei Küken, die allein mit IBV infiziert waren.

TOTTORI et al. (1997) haben männliche Broiler intratracheal mit IBV (Stamm M41) und *E. coli* inokuliert und bei 15 Tieren (15 %) der infizierten Tiere einen Aszites festgestellt. Außerdem waren die Parabronchien reichlich mit einem Exsudat gefüllt, das Fibrin und heterophile Granulozyten enthielt. Es konnte keines der beiden kausativen Agenzien aus den Tieren mit Aszites re-isoliert werden. Bei sechs verendeten Tieren (6 %) waren heftige Pneumonien und Luftsackenzündung zu beobachten, fünf von denen hatten Perikarditis und Perihepatitis.

### 2.2.11 Symptomatik der IB

Die erkrankten Junghühner zeigen charakteristische respiratorische Symptome, wie z. B. Keuchen, Niesen, Husten, Rasselgeräusche, Kopfschütteln und Schnabelatmung. Manchmal können tränende Augen, Konjunktivitis und geschwollene Sinus beobachtet werden. Die infizierten Junghühner wirken depressiv, drängen sich aneinander und sammeln sich meistens an Wärmequellen. Wasser- und Futteraufnahme sind bei erkrankten Tieren deutlich reduziert, wodurch sie in der Entwicklung zurückbleiben. Sekundärinfektionen erschweren den Krankheitsverlauf und steigern die Mortalitätsrate (WOERNLE und HAFEZ, 1992; CAVANAGH und NAQI, 2003). Die Mortalitätsrate variiert und hängt von der Virulenz des IBV-Stammes, dem Alter, dem Immunstatus, dem aktuellen Stress der Tiere, sowie der Umgebungstemperatur oder Sekundärinfektionen ab. Die Mortalität bei Küken ohne maternale Antikörper kann bei mehr als 25 % liegen. Die Krankheitsdauer bei Küken beträgt 1-2 Wochen.

Infektionen in sehr jungem Kükenalter können später bei Hennen zur Dauerschädigung des Eileiters führen („Falsche Leger“). Nach Infektionen werden bei erwachsenen Hühnern in der Regel ein Rückgang der Legeleistung, aber keine Todesfälle beobachtet. Bei Legehennen kann der Rückgang der Legeleistung bis zu 55 % und der Ausfall an brutfähigen Eiern bis zu 92 % betragen. Die normale Legeleistung kann nach 6 bis 8 Wochen wieder erreicht werden. In einigen Fällen wird sie überhaupt nicht mehr erreicht. Erkrankungen des Eileiters führen zur Produktion von dünnchaligen und missgebildeten Eiern. Neben der Außenqualität ist auch die Innenqualität der Eier reduziert (CRINION, 1972; COOK und HUGGINS, 1986; COOK et al., 1987; WOERNLE und HAFEZ, 1992).

Der 1991 in England von GOUGH et al. (1992) aus mit Massachusetts geimpften Hühnern isolierte Stamm 793B (synonym 4/91) verursacht bei den betroffenen Tieren eine Myopathie der Pektoralismuskulatur, Zyanose der Kämme, Stauungserscheinungen am gesamten Körper, einen Anstieg der Mortalität und einen Abfall der Legeleistung um bis zu 30 %.

Die Nephritis-Nephrosis-Form der IB wird durch nephropathogene Stämme, wie z. B. den australischen T-Stamm, Gray, Holte, Cal, NP-1648, CR-84221, Ma-87, ST und in Italien isolierte verschiedene Virusstämme verursacht (siehe Tabelle 2). Diese Form der IB wird meistens bei wenige Wochen alten Küken und besonders bei eiweißreich ernährten Broilern beobachtet. Bei der Erkrankung ist zuerst eine leichte Störung des Allgemeinbefindens zu bemerken, die respiratorischen Symptome stehen hier im Hintergrund. Die weiteren Symptome sind Depression, wässriger Kot mit erhöhter Kalium- und Natriumausscheidung, erhöhte Wasser-, verminderte Futteraufnahme und struppiges Gefieder ( WINTERFIELD und HITCHNER, 1962; CUMMING, 1969). Die erhöhte Elektrolytausscheidung und Retention von Harnsäure können zum Tod führen. Ist die Krankheit bei Legehennen mit Urolithiasis verbunden, kann die Mortalität steigen (BROWN et al., 1987; COWEN et al., 1987; JONES und AMBALI, 1987).

PARSONS et al. (1992) berichten bei Broiler-Elterntieren, die gegen IB geimpft waren, von hohen Mortalitätsraten und einem deutlichen Rückgang der Legeleistung. Innen- und Außenqualität der Eier waren nicht beeinträchtigt. Andere Symptome waren geschlossene Augen mit geschwollener Augenumgebung und die typischen respiratorischen Symptome.

Der in Marokko aus erkrankten Hühnern isolierte Stamm G zeigt eine besondere Affinität zum Darm-Trakt und gilt deswegen als enterotrop. Er verursacht bei Küken und Legehennen, außer den typischen respiratorischen Symptomen, wässrigen, gelb-grünen Durchfall. Neben drastisch gesunkener Legeleistung sind auch die Innen- und Schalenqualität der Eier herabgesetzt (EL HOUADFI et al., 1991).

Seit 1996 wurde außerdem von IB-Ausbrüchen bei Broilern berichtet, die durch einen „Proventriculartyp IBV“ verursacht wurden, bei denen eine Mortalität von 15-80 % beobachtet wurde (ZHOU et al., 1998).

Ein anderes in China isoliertes IBV, genannt QX-IBV, löst bei betroffenen Hühnern außer den typischen respiratorischen Symptomen auch Depressionen, Diarrhoe und ödematisierte Augenlider mit Lakrimation aus (PAN et al., 1998; WANG et al., 1998). SUN et al. (2011) berichten von heftigen Nieren-Lesionen bei betroffenen Hühnern. In einer Studie bot die Immunisierung der Hühner mit H120 nicht genug Schutz gegen eine Infektion mit QX-IBV (SUN et al., 2011).

### 2.2.12 Morbidität und Mortalität

Die Morbiditätsrate der IB beträgt häufig bis zu 100 %. Die Mortalitätsrate kann dagegen sehr unterschiedlich sein und hängt ab vom IBV-Stamm, dem Alter der betroffenen Tiere, dem Immunstatus, Geschlecht, Rasse und den aktuellen Stresseinflüssen wie Kälte oder Sekundärinfektionen. Zusätzlich kann auch die Ernährung der Tiere, wie beim Nephritis-Nephrosis-Syndrom, eine wichtige Rolle spielen (COOK et al., 2001).

Die Mortalitätsrate kann bei Küken bis zum Alter von sechs Wochen 25 % oder mehr betragen. Bei älteren Tieren kommt es zu weniger Verlusten. Durch besonders pathogene IBV-Stämme (nephropathogene Stämme, QX-IBV, Proventriculartyp IBV) kann die Mortalität zwischen 15-80 % betragen.

### 2.2.13 Pathologie

Die makroskopischen pathologischen Läsionen sind nach einer Monoinfektion mit IBV wenig charakteristisch. In der Trachea der infizierten Küken und Junghühnern kann seröses, katarrhalisches oder käsiges Exsudat beobachtet werden. In der Regel weisen die erwachsenen Hühner außer einer leichten Rötung der Trachealschleimhaut und Exsudat in der Luftröhre keine Veränderungen auf. Bei Küken können fibrinös-gelbkäsige Exsudatmassen Trachea und Bronchien ganz verstopfen. In den gesamten Lungen sind Kongestion, Ödem und katarrhalische Pneumonie zu sehen. Die Membranen der Luftsäcke sind getrübt, verdickt und in vielen Fällen in Folge von Sekundärinfektionen mit gelbkäsigen Fibrinmassen gefüllt (HOFSTAD 1984; WOERNLE und HAFEZ, 1992; CAVANAGH und NAQI, 2003).

Bei durch nephropathogene Stämme ausgelösten Erkrankungen werden geschwollene, blasse Nieren und Uratablagerungen in den Harnleitern festgestellt. Diese Veränderungen entsprechen dem Bild einer interstitiellen Nephritis (CUMMING, 1963; GILETTE, 1973; SILLER, 1981). Milz und Leber bleiben unverändert.

Bei Legehennen kann es zur Involution des Eileiters und Eileiterverengungen kommen. Dadurch kommt es zur Retroperistaltik im Uterus und folglich zum Auftreten von Dotterkugeln und/oder Dotterflüssigkeit bzw. zu vollständig ausgebildeten Eiern in der Leibeshöhle. Am Ovar können blutdurchtränkte Eifollikel und im Legedarm missgebildete Eier vorkommen.

IBV-Infektionen während der ersten Lebenswochen können zur Entzündung der Schleimhaut mit nachfolgender Verengung und Verklebung der Schleimhaut des Infundibulum des Eileiters führen. SEVOLAN und LEVINE (1957) stellten bei Untersuchungen zur IB eine

reduzierte Länge und ein reduziertes Gewicht des Eileiters fest. Nach experimenteller Infektion kam es zu folgenden pathologischen Veränderungen:

- Rückgang der Eiproduktion, des durchschnittlichen Eigewichts und der inneren Eiqualität
- Beobachtung von missgebildeten, dünn- oder weichschaligen Eiern
- Feststellung von weißen, granulären Massen im Albumin
- freies Eidotter in der Leibeshöhle

Bei Infektionen mit dem IBV des Proventrikulartyps treten außerdem geschwollene Drüsenmägen mit hämorrhagischen Ulzerationen der Schleimhaut auf.

#### **2.2.14 Histopathologie**

In der Nasenhöhle sind eine Hypertrophie der Schleimhautdrüsen mit vermehrter Schleimabsonderung und Zilienverlust des Epithels zu beobachten (PURCELL und MCFERRAN, 1972; MALO VERGARA, 1987; CAVANAGH und NAQI, 2003). Trachea und Bronchien IBV-infizierter Hühner sind durch unterschiedlich stark ausgeprägte Hyperämie, Ödeme und Verdickungen der Schleimhäute gekennzeichnet. Binnen 18 Stunden nach der IBV-Infektion kommt es in der Schleimhaut der Trachea zum Verlust der Zilien, zur Abrundung und zum Verlust der Epithelzellen mit Infiltration von Heterophilen und Lymphozyten in der Submukosa (PURCELL und MCFERRAN, 1972; MALO VERGARA, 1987; CAVANAGH und NAQI, 2003). Diese erste Krankheitsphase wird als Stadium der akuten Desquamation bezeichnet. Ihr folgt als zweites Stadium die Epithelhyperplasie. Das dritte Stadium geht mit einer lymphozellulären Infiltration einher (3-6 Tage p.i.) und ist durch eine massive Infiltration der Lamina propria mucosae durch Lymphozyten und anderen Entzündungszellen charakterisiert. Im darauf folgenden vierten Stadium – der Regeneration – ab dem 7. Tag bis zum 14. Tag p.i. geht die Verdickung der Schleimhaut zurück und die Anzahl der Schleimdrüsen nimmt wieder ab. In deren Folge wird das Oberflächenepithel regeneriert und es bilden sich wieder Zilien und Mikrovilli aus (PURCELL und MCFERRAN, 1972; MALO VERGARA, 1987). Mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der respiratorischen Organe und des Uterus von experimentell mit dem Virusstamm „Voet EG 02“ infizierter Hühnerküken konnte der zeitliche Ablauf dieser Veränderungen einschließlich der Regeneration des Epithels eindrucksvoll dokumentiert werden (MALO VERGARA, 1987).

Die Wände der Luftsäcke sind ebenfalls verdickt, trüb und enthalten fibrinhaltiges Exsudat. Dieses kann zur Bildung von Pseudomembranen führen, die dann in Bindegewebe umgewandelt und später abgebaut werden (PURCELL und MCFERRAN, 1972; RIDELL, 1987).

Nach experimentellen Infektionen erwachsener Hühner werden am Eileiter ähnliche Veränderungen beobachtet wie bei spontanen Infektionen: Ödeme, Zilienverlust der Epithelzellen, Ausdehnung der Tubulidrüsen, Infiltration mit Lymphozyten-, Plasma- und Heterophilzellen (SEVOLAN und LEVINE, 1957; CAVANAGH und NAQI, 2003).

Die histopathologischen Läsionen der Nieren entsprechen dem Bild einer akuten bzw. einer chronischen interstitiellen Nephritis. In der akuten Phase der Infektion sind granuläre Degeneration, Vakuolisierung, Desquamation der Tubulusepithelien und massive Infiltration von heterophilen Zellen im Interstitium zu beobachten. Während der Genesung werden die Entzündungszellen von Plasmazellen und Lymphozyten ersetzt. In manchen Fällen bestehen die degenerativen Veränderungen weiterhin und führen zur Atrophie der Nephronen. Uratkristalle werden in Nieren, Harnleitern und manchmal auf den serösen Häuten der Organe der Leibeshöhle gefunden (SILLER, 1981; WOERNLE und HAFEZ, 1992; CAVANAGH und NAQI, 2003).

## **2.2.15 Immunität gegen IBV**

### **2.2.15.1 Maternale Antikörper**

Spontane Infektionen und Impfungen gegen die IB führen zur Bildung von Antikörpern, die im Blut zirkulieren. Während der Eibildung werden die maternalen Antikörper vom Blut der Legehennen auf den Dotter und in der zweiten Hälfte der Embryonalentwicklung vom Dotter in den Blutkreislauf des Embryos übertragen (SIEGMANN et al., 1975). Maternale Antikörper werden schon am ersten Lebenstag im Blut der Küken nachgewiesen, erreichen um den dritten Lebenstag ihre maximale Konzentration und nehmen danach in direkter Abhängigkeit von der jeweiligen Höhe in den ersten Lebenstagen bis etwa zur fünften Lebenswoche kontinuierlich ab. Danach sind sie nicht mehr nachweisbar (HERDT et al., 1998). Die Halbwertszeit der maternalen Antikörper beträgt etwa fünf Tage (SIEGMANN et al., 1975).

Sollte die Impfung der Küken mit dem gleichen Impfvirus wie bei den Elterntieren erfolgen, können die maternalen Antikörper den Grad des Aufbaus einer aktiven Immunität reduzieren (KLIEVE und CUMMING, 1988).

MOCKET et al. (1987) zeigen, dass Küken mit mütterlichen IgG-Antikörpern gegen das IB-Virus vor einer Testinfektion mit einer Mischung aus IBV und *E. coli* mindestens eine Woche

lang geschützt waren. In einer anderen Studie waren Küken mit hohem maternalen Antikörpertiter gegen ein „Challengevirus“ am 1. Lebenstag bis zu 95 %, aber am 7. Lebenstag weniger als zu 30 % geschützt (MONDAL und NAQI, 2001).

### **2.2.15.2 Erworbene Immunität**

Nach einer überstandenen IBV-Infektion sind die Tiere gegen homologe IB-Viren geschützt. Die Resistenz gegen heterologe IB-Viren ist allerdings sehr unterschiedlich. Eine Infektion mit einem heterologen Virus kann bei geimpften Tieren klinische Symptome hervorrufen.

Mit IBV infizierte Hühner produzieren humorale Antikörper vom IgM- und IgG-Typ, die mit mehreren Methoden zu detektieren sind. Die IgM-Antikörper sind schon drei bis fünf Tage nach der Infektion nachzuweisen (DE WIT, 1998). Der IgM-Antikörpertiter erreicht sein Maximum ein bis drei Wochen p.i. und nimmt danach kontinuierlich ab. Parallel dazu steigt der IgG-Antikörpertiter bis zur 3. Woche p.i. an und bleibt danach weiterhin auf einem hohen Niveau (GILETTE, 1974). Diese Antikörper können bei gegen IBV geimpften oder infizierten Hühnern nachgewiesen werden.

Es gibt verschiedene Berichte über unterschiedliche Korrelationen zwischen humoraler Immunantwort und Resistenz gegen eine IBV-Infektion. Nach einer intratrachealen Impfung mit einem attenuierten Virus haben die neutralisierenden Antikörper ihr Maximum in 6-8 Wochen p.i. erreicht (DIMOPOULLOS und CUNNINGHAM, 1956). ALEXANDER und GOUGH (1977) zeigten, dass bei vielen infizierten Hühnern bis zur 14. Woche p.i. keine neutralisierenden Antikörper nachzuweisen waren. Sie berichten außerdem von einer mangelhaften Korrelation zwischen dem hohen Titer der zirkulierenden Antikörper und der Resistenz gegen heterologe Re-Infektionen (GOUGH und ALEXANDER, 1977). Zirkulierende Antikörper können das Virus neutralisieren und verhindern, dass sich das Virus vom primären Zielorgan „Trachea“ zu anderen Organen wie Nieren oder Ovidukt ausbreitet.

Die lokale Immunität ist zumindest für einen Teil der Abwehrreaktionen gegen IBV wesentlich (DARBSHIRE und PETERS, 1985). Sie gewinnt an Bedeutung, wenn bedacht wird, dass die Trachea das Hauptzielorgan des IBV ist. Paraokuläre Lymphorgane, besonders die Hardersche Drüse, spielen bei der Produktion von lokalen Antikörpern eine große Rolle (POWELL et al., 1979). IgG und IgA wurden von GILETTE (1981) nach einer Impfung mit M41 und holländischen IBV-Stämmen im tracheobronchialen Sekret festgestellt. IBV-spezifisches IgA wurde auch in Tränenflüssigkeit nachgewiesen (COOK et al., 1992; TORO et al., 1996).

### 2.2.16 Diagnose der IB

Im Allgemeinen wird die Infektiöse Bronchitis entweder durch die Detektion des Erregers oder durch den Nachweis IBV-spezifischer Antikörper diagnostiziert. Es gibt mehrere Verfahren zur Diagnose von akuten IBV-Infektionen. Die am häufigsten verwendeten Methoden sind Virusisolation *in ovo*, Immunfluoreszenztest (IFA), Immunoperoxidase-Assay und die Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

Serologisch werden IBV-Infektionen durch den Nachweis einer Serokonversion oder durch IBV-spezifisches Immunglobulin M (IgM) detektiert. Darüber hinaus werden häufig auch Hämagglutinationshemmungstest (HAH), Agargelpräzipitationstest und Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA) bzw. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Dagegen wird der Virusneutralisationstest (VNT) seltener verwendet, da dieser Test sehr material-, zeit- und arbeitsaufwendig und deshalb relativ teuer ist (DE WIT, 2000; CAVANAGH und NAQI, 2003).

Auf Grund des Vorkommens verschiedener IBV-Serotypen, die miteinander nicht kreuzreagieren, sollte die Diagnose der IB auch die Serotyp-Identifikation umfassen. Eine genaue Identifikation der IB-Erreger ist für die Wahl und die Anwendung des Impfstoffes und damit für die Kontrolle der IB von enormer Bedeutung.

Eine erfolgreiche Isolierung und Typisierung des IBV hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie z. B. der Zeit zwischen der Infektion und der Probensammlung, dem Immunitätsstatus, der Anzahl und der Qualität der Proben, der Rasse der Hühner, der möglichen Immunsuppression und der Haltungsart der Hühner (DE WIT, 2000).

#### 2.2.16.1 Virusisolation

Die Isolation des IBV ist ein arbeits- und zeitaufwändiger und deshalb teurer Prozess. Unter Berücksichtigung der klinischen Symptome und der Anamnese muss Probenmaterial von Trachea, Lunge, Nieren, Caecaltonsillen, Ovidukt und anderen Organen entnommen werden. Die entnommenen Proben werden in 9 bis 11 Tage bebrütete embryonierte SPF-Hühnereier inokuliert. Die Proben müssen mindestens vier Mal *in ovo* passagiert werden, bevor sie als negativ bewertet werden können. Eine Probe ist erst dann als negativ zu beurteilen, wenn nach vier Eipassagen immer noch keine Embryomortalität und/oder Embryoläsionen feststellbar sind oder nach Inokulation von Allantoisflüssigkeit aus der vierten Eipassage in Trachealringkulturen keine Ziliostasis auftritt. Die Anwesenheit des IBV muss durch ELISA, IFA, Immunhistochemie, Nukleinsäureanalyse oder Elektronenmikroskopie bestätigt werden.

Darüber hinaus können empfängliche Versuchs-Hühner mit Probematerial intranasal infiziert werden. Im Falle der Anwesenheit eines IBV müssen klinische Symptome innerhalb von 36 Stunden auftreten. Alternativ zur Virusisolation können zu spontan erkrankten Hühnern IBV-empfindliche Hühner, wie z.B. SPF-Hühner, gesetzt werden (CAVANAGH und NAQI, 2003). Nach erfolgter Virusübertragung kann die Virusisolation aus diesen per direkten Kontakt infizierten Hühnern (sentinel chicken) erfolgen.

Durch nicht adäquate Verpackung, Lagerung und Transport des Probenmaterials an das untersuchende Laboratorium kann das IBV inaktiviert werden und nicht mehr vermehrungsfähig sein. Eine Virusisolation gelingt dann folglich nicht. Aus diesem Grund können andere Methoden, wie IFA, IPA, Antigen-ELISA oder RT-PCR verwendet werden, mit denen das IBV-Antigen oder das IBV-Genom nachweisbar sind. Außerdem kann eine Mischinfektion mit einem anderen Virus die Isolation von IBV verhindern, da es zu einer gegenseitigen Hemmung der Virusreplikation kommen kann (DE WIT, 2000).

#### **2.2.16.2 Detektion von IBV-Antigen**

Zur Detektion von IBV-Antigenen werden sowohl IBV-spezifische polyklonale Antiseren als auch monoklonale Antikörper (monoclonal antibodies = Mabs) verwendet. Während polyklonale Antiseren spezifische Antikörper gegen verschiedene Teile des IBV enthalten, reagieren die monoklonalen Antikörper mit einem oder nur wenigen Epitopen des IBV. Eine Mutation einzelner Nukleotide innerhalb eines Epitops kann die Bindung der monoklonalen Antikörper an diese Epitope verhindern und dadurch ein falsch negatives Ergebnis liefern (CAVANAGH et al., 1988; WAINRIGHT et al., 1989; KOCH et al., 1991a). Dies kann durch Verwendung monoklonaler Antikörper gegen hoch konservierte Regionen des IBV oder eine Mischung von verschiedenen monoklonalen Antikörpern vermieden werden.

**AGPT (Agar-Gel-Prezipitationstest):** Der gruppenspezifisch reagierende AGPT ist eine wenig arbeitsaufwändige, kostengünstige und relativ schnelle Nachweismethode (WOERNLE, 1959 und 1963). Für diesen Test können direkt Organproben (LOHR, 1981) oder nach deren Inokulation in embryonierte Hühnereier, auch antigenhaltige Allantoisflüssigkeit und/oder Chorioallantoismembran (CAM) verwendet werden (ALEXANDER und GOUGH, 1977; GELB et al., 1981). Der AGPT gilt als wenig sensitive Methode.

**IFA (Immunofluorescence Assay):** Dieser Test ermöglicht die Detektion des IBV in spontan mit IBV infizierten Hühnern, Organen inokulierter embryonierter Hühnerembryonen,

Zellkulturen und Organkulturen. IFA reagiert unter Verwendung polyklonaler Antiseren oder gruppenspezifischer Mabs gruppenspezifisch (LUKERT, 1969; LUCIO und HITCHNER, 1970; YAGYU und OHTA, 1990; DE WIT et al., 1995) und mit typspezifischen Mabs typspezifisch (DE WIT et al., 1995). Die Spezifität des IFA kann durch Verwendung von Mabs statt Hyperimmunserum gesteigert werden (YAGYU und OHTA, 1990; DE WIT et al., 1995).

**IPA (Immunoperoxidase Assay):** Diese Technik kann mit einem gewöhnlichen Durchlicht-Mikroskop an Stelle eines UV-Licht-Mikroskops durchgeführt werden. Jedoch ist dieser Test sehr arbeitsaufwändig und gilt als weniger sensitiv als der IFA.

**Antigen-ELISA:** Dieser Test erfordert einen relativ hohen Virusgehalt im untersuchten Material (YAGYU und OHTA, 1987; NAQI, 1990; IGNJATOVIC und ASHTON, 1996). Nach der Inokulation empfänglicher Hühner mit IBV ist es NAQI et al. (1993) nicht gelungen, IBV in der Trachea mit einem Antigen-ELISA nachzuweisen. NAGANO et al. (1990) konnten demgegenüber IBV durch einen Antigen-ELISA nur zwei Tage p.i. nachweisen, während es ihnen mit der Virusisolation noch 7 Tage p.i. gelungen war. Zahlreiche Autoren berichten über erfolgreiche Detektion des IBV aus antigen- bzw. virushaltiger Allantoisflüssigkeit (YAGYU und OHTA, 1987; HESSELINK et al., 1988; NAGANO et al., 1990; KOCH et al., 1991b; NAQI et al., 1993).

### 2.2.16.3 Detektion des IBV-Genoms

Das IBV-Genom wird entweder durch Nachweis des gesamten IBV-Genoms oder kleinerer Gensequenzen detektiert. Dies erfordert meistens ein 3-Schritt-Verfahren. In manchen Fällen sind auch ein oder zwei Schritte ausreichend. Der erste Schritt ist die Vermehrung des Virus in embryonierten Hühnereiern oder Organkulturen. Als zweiter Schritt wird nach der RNA-Isolation die genomische RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) in c-DNA transkribiert und durch eine PCR multipliziert. Der letzte Schritt ist die Klassifikation des Virus durch weitere Methoden.

**RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion):** Zunächst wird das IBV *in vitro* (in embryonierten Hühnereiern oder in Organkulturen) vermehrt oder die RNA wird direkt aus Organmaterial oder Tupfer isoliert. Nach der Isolation der genomischen RNA wird diese in c-DNA transkribiert und anschließend durch eine PCR amplifiziert. Nach der Amplifikation der c-DNA wird das Endprodukt entweder sequenziert (ANDREASEN et al., 1991; ZWAAGSTRA et al., 1992) oder an Hand des Restriktionsfragmentlängen-

Polymorphismus (RFLP) (LIN et al., 1991; KWON et al., 1993b; SONG et al., 1998) nach dem Restriktionsmuster identifiziert. Zum gleichen Zweck können auch die Hybridizationstechnik (JACKWOOD et al., 1992; KWON et al., 1993a) und eine genotypspezifische PCR (CAVANAGH et al., 1999; CAPUA et al., 1999) verwendet werden.

Die Auswahl der Primer ist für die Spezifität der RT-PCR von enormer Bedeutung. Für die gruppenspezifische RT-PCR müssen Primer ausgewählt werden, die an sehr hoch konservierten Genabschnitten aller bekannten IB-Viren binden. Wenn dies nicht der Fall ist, kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen. Für den Nachweis des IBV werden gruppenspezifische Primer meistens aus der Region des N-Proteins (Nukleokapsidprotein) oder des M-Proteins (Membranprotein) konstruiert (ANDREASEN, 1991, HANDBERG et al., 1999).

#### **2.2.16.4 Typisierung des IBV**

Die Tests zur Typisierung der zahlreichen IBV basieren auf zwei verschiedenen Ansätzen, was zur Bildung von zwei Gruppen führt: erstens funktionelle Tests, welche die biologischen Funktionen des Virus berücksichtigen und zweitens nicht-funktionelle Tests, mit denen das Genom des IBV untersucht wird. IB-Viren lassen sich durch die funktionellen Tests in Immunotypen (Protektotypen, Sero- oder Epitotypen) und durch nicht-funktionelle Tests in Genotypen unterteilen.

**Immunotyp (Protektotyp):** Diejenigen IBV-Isolate, die gegenseitigen (Impf)schutz induzieren, gehören demselben Immunotyp oder Protektotyp an. IBV-Isolate, die zu unterschiedlichen Genotypen und Serotypen gehören, können gleiche Epitope haben, die für die Kreuzimmunität (CAVANAGH et al., 1997) und zelluläre Immunität (BOOTS et al., 1992; IGNJATOVIC und GALLI, 1995) wichtig sind. Zur Bestimmung des Protektotyps eines Isolats werden Kreuzimmunitätsstudien im SPF-Huhn benötigt, die sehr arbeitsaufwändig und teuer sind.

**Serotyp:** Zur Bestimmung der Serotypen wird üblicherweise ein Virusneutralisationstest (VNT) durchgeführt, der auf der Reaktion zwischen einem IBV und einem IBV-typspezifischen Antikörper basiert. Dieser Test lässt sich in allen Wirtssystemen durchführen, in denen IB-Viren vermehrbar sind und erkennbare Läsionen verursachen.

**Epitoptyp:** Durch Verwendung bestimmter monoklonaler Antikörper (Mabs) können IBV-Isolate als Epitoptyp definiert werden.

**Genotyp:** IBV-Isolate können durch molekularbiologische Untersuchungen, die auf einem bestimmten Teil des Genoms (S1-Gen) basieren, genotypisiert werden. Die dafür verwendeten Methoden sind genotypspezifische RT-PCR, RFLP, Sequenzierung und RNase finger printing.

**Genotypspezifische RT-PCR:** KEELER et al. (1998) haben eine RT-PCR entwickelt, bei der zwei universale Primer und sechs innere Primer zum Einsatz kommen. Die universalen Primer binden außen und die inneren Primer binden innerhalb des Templates. Mit Hilfe dieser RT-PCR ist es gelungen, sechs IB-Isolate zu unterscheiden, die in Nordamerika vorkommen. Die Korrelation zwischen der RT-PCR und der parallel durchgeführten Serotypisierung durch einen VNT war sehr hoch. CAVANAGH et al. (1999) und CAPUA et al. (1999) konnten in ähnlicher Weise durch eine Nested-RT-PCR und anschließend eine Multiplex-PCR vier verschiedene IBV-Isolate, die besonders häufig in Europa vorkommen, ohne vorherige Vermehrung der Viren unterscheiden.

**RFLP (Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus):** Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, die DNA durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen spalten können. Die durch Spaltung entstandenen Fragmente werden als Restriktionsfragmente bezeichnet. Für jedes Restriktionsenzym gibt es optimale Reaktionspuffer und Inkubationstemperaturen. Zur Typisierung des IBV wurde zuerst das S1-Gen durch die RT-PCR amplifiziert. Nach der Purifikation des S1-Gens wurde dies mit Hilfe von Restriktionsenzymen, die an bekannten Stellen schneiden, verdaut und anschließend im Agarosegel aufgetrennt. Die dadurch entstandenen Fragmente wurden mit den Fragmenten bekannter IB-Viren verglichen. Auf diese Weise konnten sie je nach Restriktionsmuster genotypisiert werden (LIN et al., 1991; KWON et al., 1993b).

**Sequenzierung:** Meistens wird hier ein bestimmter Teil des S1-Gens (KEELER et al., 1998; CAVANAGH et al., 1992a, 1992b, 1998 und 1999), M-Gens (CAVANAGH und DAVIS, 1988 und 1992) und N-Gens (ZWAAGSTRA et al., 1992; WILLIAMS et al., 1992) sequenziert. Auf diesen Gensequenzen basierend können phylogenetische Stammbäume konstruiert und dadurch Verwandtschaften zwischen verschiedenen IBV-Isolaten festgestellt werden (WANG et al., 1998; WANG und HUANG, 2004; MEIR, 2004).

„*RNase finger printing*“: Diese Methode basiert auf der Verdauung der viralen RNA durch die Ribonuklease T1, einer RNase. Die entstandenen Oligonukleotide werden mit einer zweidimensionalen Gelelektrophorese voneinander separiert und ausgewertet (CLEWLEY et al., 1981; KUSTERS et al., 1987). Diese Methode hat sich allerdings zur Einteilung der IBV-Isolate bisher nicht durchgesetzt.

#### **2.2.16.5 Methoden zum Antikörpernachweis**

IBV-Infektionen können durch die Detektion der IBV-spezifischen Antikörper im Blutserum und Eidotter retrospektiv nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von Serumpaaren kann ein Anstieg nach einer kürzlich erfolgten Infektion erkannt werden.

Das IBV besitzt sowohl gruppen- als auch typspezifische Antigene. Zum Nachweis von Antikörpern gegen IBV werden routinemäßig VN, HI oder ELISA durchgeführt (DE WIT, 2000). Die Verwendung des gruppenspezifischen AGPT wird wegen des Auftretens unspezifischer Präzipitationslinien und der geringen Korrelation mit anderen serologischen Testergebnissen nicht mehr empfohlen (DE WIT et al., 2000). ELISA und Immunfluoreszenz reagieren sowohl gruppenspezifisch als auch typspezifisch. Deswegen kann das IBV mit diesen Methoden nicht differenziert werden. Kommerziell zu erhaltene ELISA-Kits reagieren gruppenspezifisch (DE WIT et al., 1997). Jedoch können IBV-Isolate unter Verwendung von typspezifischen monoklonalen Antikörpern durch den ELISA differenziert werden (NAQI, 1990; KARACA und NAQI, 1993). Während mit einem ELISA IBV-Antikörper bereits nach einer Woche p. i. detektiert werden können, ist das mit dem VNT und HI-Test nicht möglich (MARQUARDT et al., 1981; MOCKETT und DARBYSHIRE, 1981; DE WIT et al., 1997, 1998). VN- und HI-Test gelten im Allgemeinen als typspezifisch (GELB und KILLIAN, 1987; KARACA und NAQI, 1993; DE WIT et al., 1997) obwohl zwischen vielen IBV-Serotypen, insbesondere bei HI-Tests Kreuzreaktionen existieren können (BROWN und BRACEWELL, 1988). Der VNT gilt als Methode der Wahl (Goldstandard) zur Detektion IBV-typspezifischer Antikörper. Ein VNT lässt sich in embryonierten Hühnereiern, in verschiedenen Zell- und Trachealingkulturen durchführen.

#### **2.2.17 Differenzialdiagnosen**

Die Folgen von IBV-Infektionen ähneln anderen akut verlaufenden respiratorischen und mit Legeleistungsrückgang verbundenen Krankheiten, wie der Newcastle-Krankheit (ND), der

Infektiösen Laryngotracheitis (ILT), dem Egg-Drop-Syndrome 1976 (EDS-76) und dem durch *Haemophilus paragallinarum* hervorgerufenen Hühnerschnupfen.

Newcastle-Krankheit: Die durch ein Paramyxovirus Typ 1 hervorgerufene Newcastle-Krankheit ist mit Durchfall, zentralnervösen Störungen, Dyspnoe, Tortikollis, Opisthotonus und Ataxien verbunden (KALETA und WERNER, 2005). Der Rückgang der Legeleistung und die Reduktion des Allgemeinbefindens sind bei der Newcastle-Krankheit des Huhnes ausgeprägter als bei der IB.

Infektiöse Laryngotracheitis (ILT): Die durch ein Herpesvirus ausgelöste ILT breitet sich im Bestand langsamer aus als die IB (CAVANAGH und NAQI, 2003, CAVANAGH und GELB, 2008), führt aber zu heftigeren respiratorischen Symptomen. Blutig-fibrinöses Sekret in der Trachea und deutliche Dyspnoe sind zu beobachten (KALETA, 1993).

Egg-drop-Syndrome 1976 (EDS 76): Diese Krankheit wird durch ein Adenovirus hervorgerufen. Der Rückgang der Legeleistung beträgt bis zu 50 %. Es werden ähnlich wie bei der IB dünnschalige, schalenlose oder nicht gefärbte Eischalen beobachtet (MONREAL, 1993). Allerdings ist beim EDS 76 die innere Eiqualität nicht beeinträchtigt (HESS und MONREAL, 2005).

Hühnerschnupfen (*Haemophilus paragallinarum*): Die Schwellungen des Sinus infraorbitalis durch Ödeme treten beim Coryza contagiosa häufiger auf als bei der IB (HINZ, 1993). Der Rückgang der Legeleistung ist im Vergleich zur IB geringer.

Weitere Infektionskrankheiten, die Ähnlichkeiten mit der Infektiösen Bronchitis aufweisen, sind Reovirus-, Mykoplasmen- und Orthomyxovirusinfektionen (Klassische Geflügelpest und Aviäre Influenza).

Für eine exakte Diagnose und eine vollständige Differenzialdiagnose sind pathologisch-anatomische, bakteriologische, virologische, serologische, histologische und molekularbiologische Untersuchungen erforderlich.

### **2.2.18 Bekämpfung der IB**

Es gibt für die virusbedingte IB keine erregerspezifische Behandlung. Ziel der Bekämpfung der IB ist die weitest mögliche Eindämmung der durch IB hervorgerufenen wirtschaftlichen Verluste. Die Therapiemöglichkeiten nach Ausbruch der Erkrankung sind begrenzt. Es wird versucht, die Beschwerden zu lindern und den Bestand vor sekundären bakteriellen Infektionen zu bewahren. Gegen Sekundärinfektionen, an denen sehr häufig *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und weitere Bakterien beteiligt sind, sollten Antibiotika erst nach Erstellung eines Antibiotogramms eingesetzt werden. Im Kükenstall sollte die Raumtemperatur

erhöht und Zugluft vermieden werden. Bei Legehennen können diätetische Vorkehrungen getroffen werden. Der Einsatz von Vitamin- und von iodophorhaltigen Präparaten oder von immunstimulierenden Präparaten kann die Symptome lindern. Jedoch liegt der Schwerpunkt der Bekämpfung der IB auf hygienischen und immunprophylaktischen Maßnahmen.

### **2.2.18.1 Management**

Der Schlüssel zur Bekämpfung der Infektiösen Bronchitis der Hühner ist ein gutes Management. Strenge Isolierung des Bestandes, regelmäßige und vollständige Räumung des Stalles und gründliche Stalldesinfektion vor jeder Neueinstellung von Küken sind bei der Prävention sehr wichtig. Kältestress und Überpopulationen in den Beständen müssen vermieden werden (WOERNLE und HAFEZ, 1992; CAVANAGH und NAQI, 2003). Die weltweit größte Bedeutung bei der Verhütung der IB kommt der Immunprophylaxe durch Vakzination mit Lebend- und Inaktivat-Impfstoffen zu. Diese Impfungen können jedoch ein gutes Management nicht ersetzen.

### **2.2.18.2 Vakzination**

Die Erkrankung von Küken nach Infektion mit IBV kann durch eine Immunisierung vermieden werden. Durch Vakzinationen werden allerdings nachfolgende Infektionen mit virulentem Feldvirus und die Vermehrung dieses Virus nicht gänzlich verhindert. Impfstoffe bieten keinen vollständigen Schutz gegen IBV, die einem anderen Protektotypen angehören. Deswegen können IB-Ausbrüche auch in geimpften Beständen auftreten. Andere Ursachen für solche Ausbrüche sind Immunsuppression, sehr kurze oder sehr lange Zeitabstände zwischen Impfung und Challenge, inadäquate Impfmethode und die hohe Mutationsrate des IBV (DE HERDT et al., 1998; DE WIT, 1998; CAVANAGH und NAQI, 2003).

Es werden bei der Vakzination sowohl attenuierte Lebendimpfstoffe als auch inaktivierte Impfstoffe verwendet. Lebendimpfstoffe werden als Erstimpfung bei Broilern, Küken, Junghennen, Legehennen und Elterntieren verwendet. Inaktivierte Impfstoffe finden bei Legehennen und Elterntieren überwiegend vor dem Legebeginn Verwendung (BOX et al., 1988). Da IB-Viren durch Eipassagen ihre Pathogenität für ihren natürlichen Wirt relativ schnell verlieren, werden Ei-adaptierte IBV zur Herstellung der Lebendimpfstoffe verwendet. Mit dem Serotyp M41 (Massachusetts) verwandte IBV-Feldviren kommen weltweit am häufigsten vor (CAVANAGH und GELB, 2008). Deshalb sind die meisten Lebendimpfstoffe gegen diesen Serotyp gerichtet. Mehrfach wiederholte Impfungen mit dem Massachusettstyp

führen häufig zur Kreuzimmunität gegen andere Serotypen. Außer dem Massachusetts-Serotyp finden in den USA die Serotypen Connecticut und Arkansas als Impfstoffe Verwendung. Dagegen sind in Europa Impfungen mit den Serotypen D274, D1466 und 4/91 häufiger. IBV-Impfstoffe, die Varianten enthalten, müssen dann eingesetzt werden, wenn das Vorkommen dieser Varianten in einem Land oder einer Region nachgewiesen wurde.

Als Lebendimpfstoffe werden heutzutage am häufigsten unterschiedlich stark Ei-adaptierte Impfstoffe verwendet. Hierzu zählen das Impfvirus H120 (entspricht der 120. Eipassage von Massachusetts M41) und H52 (52. Eipassage von Massachusetts M41). Während das relativ gut verträgliche H120 als Erstimpfung bei bis zu vier Wochen alten Küken Verwendung findet, bewährt sich das etwas virulentere H52 als zweite (Boosterung) oder dritte Impfung. In Deutschland ist ein Kombinations-Lebendimpfstoff zugelassen, der die Impfstämme H120 und D274 enthält.

Die vorhandene maternale Immunität oder die Restimmunität nach vorausgegangenen Impfungen können die Wirksamkeit einer Impfung negativ beeinflussen. Deshalb ist eine zeitgerechte Impfung sinnvoll. Lebendimpfstoffe können via Trinkwasser, als Aerosol (RATANASETHAKUL und CUMMING, 1993), als Spray, mit Augentropfen oder intranasal (ANDRADE et al., 1983) angewendet werden.

Das attenuierte Impfvirus vermehrt sich im Wirt. Daher kann auch mit einer geringeren initialen Virusdosis z. B.  $10^3$  EID<sub>50</sub> je Dosis ein guter Immunschutz erreicht werden. Die Vermehrung und Ausscheidung des applizierten Impfvirus kann aber durch Virusstreuung zum Nachteil werden. Deshalb müssen die empfänglichen älteren Hühner, besonders die Legehennen, von kürzlich mit Lebendimpfstoff geimpften Tieren getrennt gehalten werden. Darüber hinaus gibt es mehrere Nachweise, dass das attenuierte Impfvirus durch wiederholte Passagen in Hühnern wieder virulenter wird (HOPKINS und YODER, 1986).

KUSTERS et al. (1987) haben durch Kreuzneutralisationstests und T1-Fingerprinting herausgefunden, dass drei von zwölf untersuchten holländischen IBV-Isolaten dem Stamm H120 und dem Stamm H52 genetisch ähnlich waren. Dadurch lässt es sich vermuten, dass manche virulente Feldviren aus den Impfstoffviren hervorgegangen sein können.

Durch die Anwendung von Lebendimpfstoffen werden neben der Bildung humoraler Antikörper auch die zelluläre und lokale Immunabwehr stimuliert. Die Lebendimpfstoffe sind wesentlich preiswerter in der Produktion und ihre Applikation erscheint einfacher als bei inaktivierten Impfstoffen. Nachteile der IB-Lebendimpfstoffe sind, dass sie zur Virusausscheidung, Virusausstreuung und ggf. zur Impfkrankheit führen können. Bei

gleichzeitiger Verwendung verschiedener Variantstämme kann es durch Virusinterferenz zu einer einseitigen Hemmung der Virusvermehrung kommen (WINTERFIELD, 1968).

Da die Impfstoffe H120 und H52 keinen vollen Schutz gegen Variantstämme bieten, sind monovalente und Kombinationen mit inaktivierten IB-Impfstoffen bzw. inaktivierten, anderen Impfviren entwickelt worden, die neben den Massachusettsserotyp, die IB-Variantstämme immunologisch einbeziehen. Die inaktivierten Impfstoffe führen nicht zur Virusstreuung oder Impfkrankheit. Hauptbestandteil aller inaktivierten IB-Impfstoffe ist der Stamm M41 (Massachusetts Serotyp). Zusätzlich enthalten manche Impfstoffe die Variantstämme D274 (Nobilis IB Multi, Intervet) oder CR 88121 (Gallimmun IB2, Merial). Sie können auch andere Impfvirusantigene, wie NK-, IBD-, Reovirus-, Rhinotracheitisvirus- und EDS-Antigene enthalten. Inaktivierte Impfviren vermehren sich nicht im Wirt und damit kann es zu keiner gegenseitigen Hemmung der Impfviren kommen.

Es wurden formalininaktivierte Aluminiumhydroxid-Adsorbatvakzine, Beta-Propiolakton-inaktivierte Vakzine und Ölemulsionsvakzine entwickelt. Mit den Ölemulsionsvakzinen konnten die besten Erfolge erzielt werden (WOERNLE und HAFEZ, 1992).

Es wird ein Impfschema empfohlen, das eine Kombination von attenuierten Lebend- und inaktivierten Impfstoffen einschließt, um einen guten Immunschutz zu bilden (KALETA und CEGLA, 1986; VOSS et al., 1988; CAVANAGH und NAQI, 2003). Prinzipiell werden vermehrungsfähige Impfviren zur Erst- und zur Zweitimpfung gewählt, die Ölemulsionsvakzinen werden als abschließende Impfung vor dem Zeitpunkt des Legebeginns eingesetzt. Die Elterntiere werden nach BEHR et al. (2003) erst in der 4. Lebenswoche mit dem hoch attenuierten H120 oder anderen attenuierten Stämmen geimpft. In der 10. und 16. Lebenswoche erfolgt die Impfung mit dem Stamm H52. Zusätzlich kann hier mit weiteren Variantstämmen wie D274 immunisiert werden. Die Boosterung erfolgt in der 18. Lebenswoche mit inaktiviertem Impfstoff. Zuchthühner können in der Produktionsperiode in 10-wöchigen Abständen nochmals mit inaktiviertem Impfstoff immunisiert werden, um hohe Titer der maternalen Antikörper zu erzeugen. Die Mastküken werden am ersten Lebenstag bereits in der Brüterei via Spray mit H120 und in der 4. Lebenswoche mit H120 geimpft.

Bei fortbestehenden Komplikationen nach der Anwendung kommerzieller Impfstoffe wurde die Herstellung inaktivierter stallspezifischer Impfstoffe empfohlen (CAVANAGH und NAQI, 2003).

Auch die inaktivierten Impfstoffe haben einige Nachteile. Sie stimulieren im Körper nicht die lokale Immunabwehr. Sie müssen parenteral (s.c. oder i.m.) angewendet werden. Außerdem

sind sie teurer in der Herstellung als Lebendimpfstoffe, weil sie vor ihrer Inaktivierung einen sehr hohen Virusgehalt aufweisen müssen.

Durch Impfung mit einem rekombinanten Pockenvirus, das auch das S1-Gen vom IBV beinhaltet (WANG et al., 2002), ist es möglich die Immunabwehr des Wirtes gegen IBV zu induzieren.

Die in Deutschland zugelassenen IBV-Lebendimpfstoffe und IBV-Inaktivimpfstoffe sind in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt.

**Tabelle 3:** In Deutschland zugelassene IBV-Lebendimpfstoffe (PEI, 2011)

<b>Handelsname</b>	<b>Bezeichnung des Impfvirus</b>	<b>Hersteller-Firma</b>
Nobilis IB H120	H120	Intervet
Poultvac IB H120	H120	Fort Dodge
Poultvac IB-Primer	H120 und D274	Pfizer
TAD IB vac I	H120	LAH
TAD IB/ND vac	H120 und NDV: La Sota	LAH
Nobilis IB H52	H52	Intervet
TAD IB vac II	H52	LAH
Nobilis IB Ma 5	Ma 5	Intervet
Nobilis Ma 5 + Clone 30	Ma 5 und NDV: Clone 30	Intervet
Nobilis IB 4-91	4-91	Intervet
Nobilis IB D274	D274	Intervet
Nobilis IB D1466	D1466	Intervet
Poultvac IB MM	1263	Pfizer
Gallivac IB88	CR88121	Merial
HatchPak Avinew IB H120	VG/GA strain, H120	Merial
HatchPak IB H120	H120	Merial
AviPro IB H120	H120	LAH
AviPro IB H52	H52	LAH
AviPro ND-IB LASOTA	La Sota und H120	LAH

**Tabelle 4:** In Deutschland zugelassene IB-Inaktivatimpfstoffe (PEI, 2011)

<b>Handelsname</b>	<b>Bezeichnung des Impfvirus</b>	<b>Hersteller-Firma</b>
Nobilis IB+G+ND	M41 IBDV: D 78 NDV: Clone 30	Intervet
Nobilis IB+ND	M41 NDV: Clone 30	Intervet
Nobilis IB+ND+EDS	M41 NDV: Clone 30 EDSV: BC-14	Intervet
Nobilis Reo+IB+G+ND	M41, IBDV: D 78 NDV: Clone 30 ReoV: 1733, 2408	Intervet
Gallimmune 302 ND+IB+EDS	M41, NDV: Ulster 2C EDSV: V127	Merial
Gallimmune 303 ND+IB+ART	M41, NDV: Ulster 2C ARTV: VC03	Merial
Gallimmune 407 ND+IB+EDS+ART	M41, NDV: Ulster 2C EDSV: V127, ARTV: VC03	Merial
Nobilis IB Multi	M41 und D207/274	Intervet
Nobilis IB Multi+ND	M41 und D207/274 NDV: Clone 30	Intervet
Nobilis IB Multi+G+ND	M41 und D207/274 NDV: Clone 30 IBDV. D78	Intervet
Nobilis IB Multi+ND+EDS	M41 und D207/D274 NDV: Clone 30 EDSV: BC-14	Intervet
Nobilis RT+IB+Multi+ G+ND	M41 und D207/274 NDV: Clone 30 IBDV:D78 ARTV: BUT1#8544	Intervet
Nobilis RT+IB+Multi+ ND+EDS	M41 und D207/274 NDV: Clone 30 ARTV: BUT1#8544 EDSV: BC14, 249g	Intervet
Gallimmune 401 ND+IB2+EDS	M41, CR 88121 NDV: Ulster 2C EDSV:V127	Merial
Gallimmune 402 ND+IB2+ART	M41, CR 88121 NDV: Ulster 2C, ARTV: VC03	Merial

### 2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die ursprünglich von SAIKI et al. (1985; 1988) und MULLIS et al. (1987) etablierte Methode ermöglicht eine exponentielle *in vitro*-Multiplikation (Amplifizierung) von spezifischen Gensequenzen aus einer geringen Menge an DNA oder RNA und wurde damit zu einem unverzichtbaren Hilfsmittel der Forschung im Bereich der experimentellen Biologie und der Medizin. Diese Methode bietet eine hohe Sensitivität und hat die Entwicklung einer Vielzahl von Möglichkeiten zur Diagnostik im Bereich der human- und veterinärmedizinischen Mikrobiologie ermöglicht. Durch Verwendung von PCR-Primersequenzen ist der Nachweis und die Differenzierung von bakteriellen, viralen, mykologischen und parasitären Erregern möglich, da jede Spezies individuelle DNA-Sequenzen besitzt.

Die PCR-Technologie benutzt eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), welche vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs: dCTP, dATP, dGTP, dTTP), einen geeigneten Puffer, MgCl<sub>2</sub>, das entsprechende Oligonukleotidprimerpaar und eine Template-DNA zur Multiplikation benötigt.

Der PCR-Verlauf besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Die Denaturierung erfolgt bei hoher Temperatur (ca. 94 °C). Bei dieser Temperatur trennen sich die beiden Stränge der doppelsträngigen Template-DNA. Beim Annealingschritt wird die Temperatur gesenkt (bis ca. 55-65 °C). Bei dieser Temperatur kommt es zur Anlagerung der im Reaktionspuffer vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA. Beim darauf folgenden Elongationsschritt wird die Temperatur auf 72 °C (Temperaturoptimum der Taq-Polymerase) erhöht. Die Synthese des komplementären DNA-Strangs mit Hilfe der Taq-Polymerase beginnt am 3'-Ende eines jeden Oligonukleotidprimers. Theoretisch findet bei jedem Zyklus eine Verdoppelung der Zielsequenz statt, so dass aus einer einzigen Startkopie innerhalb kurzer Zeit Millionen von Kopien erstellt werden können.

Die PCR-Produkte können mittels Elektrophorese, entweder in Agarose- oder in Polyacrylamidgelen, aufgetrennt werden und direkt durch Färbung mit Ethidiumbromid oder SYBR-Gold bzw. indirekt über die Bestimmung der Größe des PCR-Produktes nachgewiesen werden (PERSING, 1993; NEWTON und GRAHAM, 1997; REISCHL und WOLF, 1998; MÜHLHARDT, 2002).

### **2.3.1 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

RNA kann nicht direkt durch Einsatz der PCR amplifiziert werden, deshalb muss sie zuerst in DNA umgeschrieben werden. Das geschieht durch eine reverse Transkription (RT), bei der verschiedene reverse Transkriptasen (RTasen) verwendet werden können. Als Reverse Transkriptase werden meistens Enzymvarianten des Avian-Myeloblastosis-Virus (AMV) und des Moloney-Murine-Leukemia-Virus (M-MLV) verwendet. Als Oligonukleotidprimer können Oligo-dT-Primer, Hexamere oder spezifische Primer verwendet werden. Nach der reversen Transkription kann das Endprodukt (cDNA) der RT in der PCR als Template verwendet werden.

### **2.3.2 Real Time PCR**

Die Real Time PCR ist eine weitere Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht. Anders als bei der herkömmlichen PCR wird hier zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Das erfolgt durch Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Nach jedem Zyklus nehmen die Fluoreszenz-Signale proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Anhand dieser erhaltenen Fluoreszenz-Signale ist die Quantifizierung der DNA möglich. Deshalb unterscheidet sich die Real Time PCR von anderen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR eine quantitative oder qualitative Auswertung, meistens unter Einbeziehung einer gelelektrophoreschen Auftrennung der PCR-Fragmente, ermöglichen.

### **2.3.3 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)**

Bei der RFLP-Analyse handelt es sich um eine Technik, die auf der selektiven PCR-Amplifizierung beruht. Im Anschluss an die Amplifizierung erfolgt eine Verdauung des PCR-Produktes mit einem spezifischen Restriktionsenzym. In der darauf folgenden elektrophoretischen Auftrennung zeigt eine Anwesenheit oder Abwesenheit von spezifischen Schnittstellen die jeweiligen Restriktionsfragmente. Die Durchführung der RFLP kann zur Differenzierung verschiedener positiven PCR-Produkte dienen.

### **2.3.4 Nested-PCR**

In der Nested-PCR werden zwei aufeinander folgende Amplifikationen durchgeführt, um die Produktspezifität zu steigern. In der ersten Vervielfältigung werden Oligonukleotidprimer eingesetzt, die außerhalb der Zielsequenz binden, so dass ein größeres Amplifikat erhalten

wird. Anschließend wird das erste PCR-Produkt als Template für eine weitere PCR verwendet, wobei ein internes Oligonukleotidpaar zur Anwendung kommt. Auf diese Weise kann das Auftreten von unspezifischen Nebenprodukten minimiert werden.

Der Vorteil der Nested-PCR liegt darin, dass lineare und proteinfreie DNA-Fragmente für die Amplifikation als Template verwendet werden können, da die genomische DNA oft PCR-Inhibitoren enthalten kann.

### **2.3.5 Multiplex-PCR**

Die Multiplex-PCR ist eine sehr schnelle und effektive Methode zur Differenzierung verschiedener Spezies oder chromosomaler Aberrationen. Mit dieser Methode können Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen innerhalb eines Genoms detektiert werden. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der zu amplifizierenden Sequenz, von der die Oligonukleotidprimerpaare abgeleitet werden. In einem PCR-Ansatz lassen sich somit mehrere Oligonukleotidpaare vermengen. Nach einer erfolgten PCR und anschließender Gelelektrophorese können verschiedene spezifische Banden erkannt werden.

## 2.4 Fragestellung

Die seit mehr als einem halben Jahrhundert bekannte Infektiöse Bronchitis der Hühner (FABRICANT, 1998) stellt heutzutage immer noch ein sehr aktuelles, zudem ein sehr bedeutendes Problem des Wirtschaftsgeflügels dar. Trotz weltweiter intensiver Schutzimpfungen verursacht die IB große wirtschaftliche Verluste in der Geflügelindustrie vieler Länder einschließlich Deutschland. Aufgrund der großen Spanne der IBV-Stämme mit verschiedenen antigenetischen Eigenschaften ist dieses Problem allgegenwärtig. Vakzination ist eher gegen homologe als heterologen Stämme von Nutzen (CAVANAGH und NAQI 1997). Für IB Ausbrüche werden IBV-Stämme, die serologisch vom verwendeten Vakzinationstamm unterschiedlich sind, verantwortlich gemacht (IGNJATOVIC und SAPATS, 2000). Die Krankheit verläuft im Allgemeinen mit respiratorischen und urogenitalischen Symptomen oder mit einem Rückgang der Legeleistung. Diese Symptome sind für IB nicht pathognomonisch. Deshalb ist eine genauere Detektion des kausativen Erregers nötig. Die Detektion des Virus kann direkt oder indirekt durch den Nachweis der Antikörper geschehen. Der Nachweis und die Charakterisierung des IBV-Genoms mittels RT-PCR hat in den vergangenen zehn Jahren sehr viel an Bedeutung gewonnen. Die am meisten in einer Region verwendeten Vakzinationsprogramme richten sich nach den in dieser Region bekannten Feldstämmen. Kürzlich identifizierte Feldvirusstämme können zur Modifikation des Vakzinationsprogramms und damit zum besseren Schutz gegen endemisch auftretende Stämme führen. Zudem ist die Identifikation des Erregers sehr wichtig, um die Epidemiologie und die Evolution des IBV zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 82 IBV-verdächtige Isolate, die zwischen 1978-2006 in Deutschland isoliert und aufbewahrt wurden, mittels RT-PCR untersucht und das Spektrum der IBV-Varianten im genannten Zeitraum erforscht.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien

###### Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit Earle`schen Salzen

96 ml/l	MEM 10-fach	Seromed Biochrom, Berlin
56 ml/l	TPB (Tryptose-Phosphat-Brühe)	
13 ml/l	7,5 %iges Natriumbikarbonat	
11 ml/l	L-Glutamin-Lösung	
11 ml/l	Gentamicin-Lösung	
18 ml/l	Amphotericin B	

gelöst in A. dest. und bei 6 °C gelagert.

###### Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB)

29,5 g	TPB- Pulver	Difco, Michigan
--------	-------------	-----------------

in 1000 ml A. dest. gelöst und bei 6 °C gelagert.

###### L-Glutamin-Lösung

29,25 g	L-Glutamin (reinst)	Serva, Heidelberg
---------	---------------------	-------------------

in 1000 ml A. dest. gelöst und bei -20 °C gelagert.

###### Gentamicin-Lösung

1 g	Gentamicinsulfat (663 U/mg)	Seromed Biochrom, Berlin
-----	-----------------------------	--------------------------

in 20 ml A. dest. gelöst und bei 6 °C gelagert.

###### Dulbecco`s Phosphate Buffer (DPB), Lösung A

8,00 g/l	NaCl	Merck, Darmstadt
0,40 g/l	KCl	Merck, Darmstadt
1,15 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
0,20 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt

gelöst in A. dest.

Der Puffer wurde nach der Herstellung steril filtriert, portioniert und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

**Fetales Kälberserum (FKS)**

Seromed Biochrom, Berlin

**Erythrozytensuspension**

2 ml	3,8 %ig Na-Citratlösung
8 ml	SPF-Hühnerblut

Das Citratblut (10 ml) wurde in einem Röhrchen 5 m bei 3000 U/min zentrifugiert. Danach wurde das Plasma und Leukoytensaum mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurde das Röhrchen mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nochmals wurde der Überstand abgenommen. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Für die Herstellung einer 10 %ige Erythrozytensuspension wurden 2 ml sedimentierter Erythrozyten mit 18 ml physiologischer NaCl-lösung zusammengemischt, das Röhrchen mit Alufolie verschloßen und bis zum Gebrauch, maximal 14 Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

**Trypsin-Stammlösung**

4,0 g/l	Trypsin (1:250)	Difco, Michigan
10,0 g/l	D(+)-Glucose-Monohydrat	

gelöst in zehnfach konzentriertem DPB.

Die Lösung wurde steril filtriert, portioniert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung 1:10 mit A. dest. verdünnt.

**Phosphate Buffered Saline (PBS)**

8,09 g/l	NaCl	Merck, Darmstadt
0,20 g/l	KCl	Merck, Darmstadt
1,12 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck, Darmstadt
0,10 g/l	$\text{CaCl}_2$	Merck, Darmstadt
0,10 g/l	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt

gelöst in A. dest.

Der Puffer wurde mit 1 N HCl auf pH 7,0 eingestellt und bei  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Kristallviolett-Gebrauchslösung**

Merck-(VWR), Darmstadt

5 % Stammlösung (15 g Kristallviolett in 1000 ml 96 %igem Ethanol)
25 % Formalin (37 %ig)
70 % A. dest.

**Isopropanol**

Merck, Darmstadt

**Ethanol**

Roth, Karlsruhe

**3.1.2 RNA-Isolierung und PCR-Kits****Kits für die Isolation viraler RNA**

High Pure Viral Nucleic Acid Kit

Roche, Penzberg

NucleoSpin® Viral RNA Isolation Kit

Macherey-Nagel, Düren

**Reverse Transkription Kit**

Expand Reverse Transcriptase

Roche, Penzberg

aus *Escherichia coli*: Ap401**Prime RNase Inhibitor (7,500 U)**

Eppendorf AG, Hamburg

**Taq DNA Polymerase**

Konzentration: 5 U/μl

MBI Fermentas, St.Leon-Rot

dazugehörig: 10-fach PCR Buffer mit KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>**Platinum Taq DNA Polymerase**

Konzentration: 5 U/μl

Invitrogen, Karlsruhe

dazugehörig: 10-fach PCR Buffer mit KCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>**Natutec Taq-Polymerase**

Konzentration: 5 U/μl

GeneCraft, Lüdinghausen

Dazugehörig: 10-fach PCR Buffer (beinhaltet 15 mM MgCl<sub>2</sub>)

DNA Polymerisationsmix

**Qiagen QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit**

Qiagen, Hilden

**Qiagen Onestep RT-PCR Kit**

Qiagen, Hilden

**QIAquick PCR Purification Kit**

Qiagen, Hilden

**dNTP-Mix (10 mM)**

MBI Fermentas, St.Leon-Rot

### 3.1.3 PCR-Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden bei der Firma MWG-Biotech AG, München, bestellt.

In der RT-PCR zum Nachweis des IBV wurde das folgende Primerpaar verwendet (HANDBERG et al., 1999):

IBVN-rev: 5`-TGG AAT AGT GCG CTT GCA ATA CCG-3`

IBVN-for:5`-G AA GAA AAC CAG TCC CAG ATG CTT GC-3`

Zum Nachweis des IBV mittels „one Step“ Real Time RT-PCR wurde unten stehende Primerpaare verwendet. Die Nukleotidsequenzen der Primer wurden freundlicherweise von Dr. Hans-C. PHILIPP (Veterinärlabor, Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) ermittelt.

IBVNneu (-) 5` CAG CAA CCC ACA CTA TAC CAT C 3`

IBVNneu (+) 5`GGA AGA AAA CCA GTC CCA GAT 3`

In der S1-RT-PCR wurde das folgende Primerpaar verwendet (KWON et al., 1993b):

S1oligo-rev: 5`-CAT AAC TAA CAT AAG GGC AA-3`

S1oligo-for: 5`-TGA AAA CTG AAC AAA AGA CA-3`

In der Äußeren-RT- und Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274 und 793B wurden die folgenden Primer verwendet (CAVANAGH et al., 1999; CAPUA et al., 1999):

XCE2-rev 5` -CTC TAT AAA CAC CCT TAC A- 3`

XCE1-for 5` -CAC TGG TAA TTT TTC AGA TGG- 3`

XCE3-rev 5` -CAG ATT GCT TAC AAC CAC C- 3`

BCE1-for 5` -AGT AGT TTT GTG TAT AAA CCA- 3`

DCE1-for 5` -ATA CAA TTA TAT CAA ACC AGC- 3`

MCE1-for 5` -AAT ACT ACT TTT ACG TTA CAC-3`

Zum Nachweis des Genotyps D1466 wurden die folgenden Primerpaare verwendet (CAVANAGH et al., 1999):

D2-rev	5` -ATA TGC CAA AAC ATC AGT G-3`
D1-for	5` -AGA GTG CTA TAT CTT TTG TT-3`
D3-for	5` -AAA TAC AAA TCG CAT AGG CG-3`
D4-rev	5` -TTC TAC GTT TTA GAC CAT TGA-3`

In der Äußeren-RT- und Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D1466, D274, 793B und Italy 02 wurden die untenstehenden Primer verwendet. Die Nukleotidsequenzen dieser Primer wurden freundlicherweise von Dr. CLIVE J. NAYLOR (University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology) ermittelt.

X1 (+)	5` TTC TTA CGT TTA CTA CTA CCA RAG 3`
X2 (+)	5` GGT GGC ATT TAC ATG GDG GHG C 3`
793B (-)	5`GAA GCA GCA GAA ATA TTA TAG CTT TC 3`
D274 (-)	5`AGT AGA CCA TGA CAT ACC ATT TTG 3`
D1466 (-)	5`AAA CAC ATA TAA GCT GGA GT 3`
M41 (-)	5`TAG GAC ACC CAT CAT ATT TAT AAC 3`
Italy 02 (-)	5`AAA CAA GGA GTT ACT TCC TTC 3`
X3 (-)	5`TGA CAT GCT AAC AAR CCT STA GG 3`

R= A, G      D = A, G, T      H = A, C, T      S = C, G

Zur Sequenzierung versendete Amplifikate wurden mit folgenden Primern amplifiziert:

S1Uni (-)	5`CCT ACT AAT TTA CCA CCA GA 3`	(BINNS et al., 1985)
XCE1 (+)	5`CAC TGG TAA TTT TTC AGA TGG 3`	(CAPUA et al., 1999)
XCE3 (-)	5`CAG ATT GCT TAC AAC CAC C 3`	(CAPUA et al., 1999)

### 3.1.4 Gelelektrophorese

#### DNA-Ladder und Loading Dye

100 bp DNA Ladder, Mix, ready-to-use

MBI Fermentas, St.Leon-Rot

100 bp DNA Ladder

Natutec, Frankfurt/Main

6-fach Loading Dye Solution 5 x 1 ml

#### Agarose

Agarose NEEO Ultra-Qualität

Roth, Karlsruhe

Biozym LE Agarose for Elektrophoresis

Biozym, Hessisch-Oldendorf

#### Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)-Puffer

0,9 M Tris [MW 121,14] = 108 g/l

Roth, Karlsruhe

0,9 M Borsäure H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> [MW 61,83]

Merck, Darmstadt

40 ml 0,5 M EDTA (Roth) pH 8,0 (37,22 g/200 ml EDTA)

in 100 ml A. dest. gelöst und mit 4 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Für Herstellung von Agarosegel und zur Elektrophorese wurde 0,5-fach TBE benutzt.

#### 5 l TBE-Puffer (5x)

250 g Tris Base

137,5 g Borsäure

18,61 g EDTA in 100 ml A. dest. gelöst.

in A. dest. Gelöst und auf 5 l aufgefüllt. pH wurde mit 4 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

#### Ethidiumbromidlösung

1 % (10 g/l)

Serva, Heidelberg

### 3.1.5 Restriktionsenzyme

#### *Hae* III

3000 U

10 U/μl

MBI Fermentas MBI

Fermentas, St.Leon-Rot

Recognition Site:

5'...G G↓C C...3'

3'...C C↑G G...5'

dazu gehörig: 2 x 1 ml 10-fach Buffer R

1 ml 10-fach Buffer Tango™

**Xcm I**

1000 U                      5,000 U/ml                      New England BioLabs, Frankfurt/M

Recognition Site:

5`...CCANNNNN↓NNNNTGG...3`

3`...GGTNNNN↑NNNNNACC...5`

dazugehörig: 10-fach NE Puffer 2

**BstY I**

1000 U                      10,000 U/ml Lot: 20                      New England Biolabs, Frankfurt/M

Recognition Site:

5`...R↓GATCY...3`

3`...YCTAG↑R...5`

R = A oder G, Y = C oder T

dazugehörig: 10-fach NE Puffer 2

### 3.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### Zellkulturflächen

TC 25 cm <sup>2</sup>	Greiner, Frickenhausen
Easyflask mit Filterdeckel	Nunc, Wiesbaden
96-Loch-Multiwellplatten	Falcon / Becton-Dickinson, Heidelberg

#### Verbandmull ZZ

Hartman, Heidenheim

#### Automatische Pipetten GILSON

ABIMED, Langenfeld

#### Filterspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)

BIOZYM Diagnostik, Hessisch  
Oldendorf

#### Reaktionsgefäße 0,5 ml

BIOZYM Diagnostik, Hessisch  
Oldendorf

#### Reaktionsgefäße 1,65 ml und 2, ml

Eppendorf, Hamburg

#### Sterile Werkbänke

Microflow	Nunc, Wiesbaden
Safeflow 1.2	Nunc, Wiesbaden
Astec P.C.R omni	Nunc, Wiesbaden

#### Tischzentrifugen

Hettich Mikro 12-24	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Hettich/Rotanta	Hettich, Tuttlingen
Minizentrifuge F&E	Fröbel Labortechnik, Lindau

#### Vortex-Schüttler

Heidolph, Kelheim

#### Thermomixer

Eppendorf Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Vibrofix VF1 Electronic	Janke & Kunkel GmbH, Staufen

#### Magnetrührer

Kretschmer, Gießen

**Feinwaagen**

Präzisionwaage P160N	Mettler, Gießen
Sartorius Präzisionswaage R-200 D	Sartorius, Göttingen
PM Waage	Mettler, Gießen

**Mikroskope**

Mikroskop (Modell 62057)	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop (Diavert)	Leitz, Wetzlar
Olympus Mikroskop	Olympus, Tokyo
Mikroskop Fluovert FS	Leitz, Wetzlar

**Inkubatoren**

Inkubator (Modell B 5060 EK-CO2)	Heraeus, Hanau
Inkubator (Modell Cellstar QWJ300TVBA)	Nunc, Wiesbaden
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Brutschrank CO2 Auto Zero	Heraeus, Hanau

**Gefrierschränke**

Gefrierschrank (-85 °C)	Nunc, Wiesbaden
Gefrierschrank (-80 °C)	Siemens AG, München

**Ultraschallsonde**

CO, Branson Sonifier cell disruptor B15	Branson Sonic Power, Danbury, USA
---	-----------------------------------

**Wasserbad**

Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen

**Mikrowellen**

Mikrowellenherd M 702	Philips, Schweden
Mikrowelle Lunik-550	Hamburg

**Autoklaven**

Tuttnauer 3850 EL System

GmbH Labor-Systemtechnik,  
Wettenberg

Fedegari Autoclavispa

Integra Biosciences, Fernwald

Agarclav

Integra Biosciences

**Thermocycler**

TPersonal 48

Biometra, Göttingen

Mastercycler Gradient 528

Eppendorf AG, Hamburg

Real Time PCR System 7300

Applied Biosystem, USA

**Elektrophoresekammern**

Elektrophoresekammer

Keutz, Reiskirchen

Elektrophoresekammer

Fröbel Labortechnik, Lindau

Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-100

Amersham Pharmacia Biotech  
Uppsala, Schweden**Stromquellen**

Spannungsquelle

Desaga, Heidelberg

Unipack 250 Power, UNIEQUIP

Armin Baack Labortechnik,  
Schwerin**Elektrophorese Spannungsregler**

Fröbel Labortechnik, Lindau

**UV-Transilluminator**

Bioblock Scientific

Illkirch Cedex, Frankreich

Biometra TI 5

Biometra, Göttingen

**pH-Meter**

Knick, Berlin

**Einmalhandschuhe Nobaglove  
GmbH**NOBA Verbandmittel Danz  
u. CoKG, Wetter**Nitril-Einmalhandschuhe Nitra Touch**

Ansell GmbH, München

### **Dokumentationssysteme**

Spiegelreflex-Kamera	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
BioDocAnalyse digital	Biometra, Göttingen
Film APX 100	AGFA, Leverkusen
DS-34 Direct Screen Instant Camera	Polaroid, USA
Fluo-Link Fluorescent Labels Combi-Light	Flowgen Bioscience, UK

### **3.1.7 Embryonierte SPF-Eier**

Für die Vermehrung der IBV-Referenzstämme sowie von einigen Feldisolaten wurden embryonierte spezifiziert-pathogen-freie-(SPF)-Eier (VALO, Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) verwendet.

### **3.1.8 IBV-Isolate und Referenzstämme**

In dieser Arbeit wurden insgesamt 82 in Deutschland aus Hühnern isolierte IBV-Isolate (Tabelle 5 und 6), vorliegend in Form von virushaltigen Allantoisflüssigkeiten, untersucht. Die Untersuchungen wurden in zwei Laboratorien, der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische (KVRAF, Justus-Liebig-Universität, Gießen) und dem Veterinärlabor Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, durchgeführt.

Die mit den lfd. Nr. 1 bis 24 bezeichneten Isolate entstammen der Sammlung der KVRAF. Sie wurden in den Jahren zwischen 1978 und 1988 aus Hühnern isoliert (Tabelle 5).

Die weiteren Isolate (Lfd. Nr. 25 bis 82) wurden freundlicherweise vom Veterinärlabor Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven) zur Verfügung gestellt. Sie wurden in den Jahren zwischen 1981 und 2006 aus Hühnern isoliert (Tabelle 6). Diese Isolate wurden aufgrund klinischer Anamnesen und den Ergebnissen aus Eikulturpassagen, Agargelpräzipitationstests und Hämagglutinationshemmungstests vorläufig als IBV-Isolate diagnostiziert und bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren.

**Tabelle 5:** Übersicht zu Herkunft und Bezeichnungen der verwendeten IBV-Isolate aus der KVRAF

<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Isolat</b>	<b>Bemerkungen zur Herkunft</b>
1	8838/84/9	1984, Gießen, Mastelterntiere, 27 Wochen alt, mit Atemstörungen
2	313/78	k. A.
3	291/85/6	1985, Gießen, Legehennen, 27 Wochen alt, mit Atemstörungen
4	189/83-2	k. A.
5	684/80	1980, Hannover, Broiler, 38 Tage alt, mit Atemstörungen
6	U83-3	k. A.
7	185/88-1	k. A.
8	653/80	k. A.
9	390/1/84	1984, Rechterfeld, Mastküken, petechiale Blutungen in der Trachea
10	390/2/84	1984, Rechterfeld, Mastküken, petechiale Blutungen in der Trachea und der Kloakenschleimhaut
11	392/1/84	k. A.
12	1051/80	k. A.
13	55/80	k. A.
14	630/80	k. A.
15	502/80	1980, Hannover, Legehennen, 22 Wochen alt, mit Atemstörungen
16	465/80	k. A.
17	226/81	1981, Hannover, Broiler, 38 Tage alt, mit Atemstörungen
18	603/79	k. A.
19	6112/83	k. A.
20	293/80	k. A.
21	225/81	k. A.
22	816/80-1	k. A.
23	808/80-3	k. A.
24	345/81	k. A.

**Tabelle 6:** Übersicht zu Herkunft und Bezeichnungen der verwendeten IBV-Isolate aus dem Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven

Lfd. Nr.	Isolat	K-Nr.	EK-Nr.	Region	Wirt	Organ
25	IB279	333/81	5392	k. A.	k. A.	k. A.
26	IB281	361/81	5426	k. A.	k. A.	k. A.
27	IB283	284/82	5650	k. A.	k. A.	k. A.
28	IB289	357/83	5974	Essel	Broiler	Trachea
29	IB290	365/83	5986	k. A.	k. A.	k. A.
30	IB291	193/83	6228	k. A.	k. A.	k. A.
31	IB297	416/84	6412	k. A.	k. A.	k. A.
32	IB298	113/84	6529	k. A.	k. A.	k. A.
33	IB299	66/84	6502	Essel/Deinste	Broiler	k. A.
34	IB303	182/85	6802	Rechterfeld	Broiler	k. A.
35	IB304	283/85	6903	Rechterfeld	Mastelterniere	k. A.
36	IB311	89/87	7273	k. A.	k. A.	k. A.
37	IB312	83/87	7267	k. A.	k. A.	k. A.
38	IB320	304/87	7420	k. A.	k. A.	k. A.
39	IB326	383/87	7505	k. A.	k. A.	k. A.
40	IB327	327/88	8.P.Henz	Rechterfeld	Broiler	
41	IB331	91/88	3.P EK	Rechterfeld	Mastelterniere	Respirationstrakt
42	IB354	116/89	8612	Rechterfeld	Broiler	
43	IB358	415/89	8835	Rechterfeld	Mastelterniere	Tracheen
44	IB361	197/90	8995	k. A.	k. A.	k. A.
45	IB364	293/91	9265	Essel	Broiler	Trachea
46	IB367	354/91	9312/2.P	Essel	Broiler	Trachea
47	IB385	578/92	9686/3.P	Rechterfeld	SPF-Tiere	Caeca
48	IB386	630/92	9700/92			Trachea
49	IB387	705/92	9710/92-3P	Lohne	Broiler	Tracheen
50	IB398	144/94	20/94	Visbek	Mastelterniere	Tracheen/ Caeca
51	IB404	376/94	75/94	Lohne	Broiler	Tracheen
52	IB440	10/96	3&9/96	Lohne	Zwerg-hühner	Tracheen
53	IB444	190/96	64/96	Regenstauf	Masthühner	Kot/Darm
54	IB448	333/96	115/96	Regenstauf	Broiler	Blut/Caeca
55	IB465	453/96	171/96	Lohne	Broiler	Tracheen
56	IB472	551/96	211/96	Regenstauf	k. A.	Tracheen
57	IB480	751/96	263/96	Lohne	Broiler	Tracheen
58	IB526	162/97	44/97	Soltau	Hennen	k. A.
59	IB532	355/97	105/97	Möckern	Broiler	Caeca
60	IB537	533/97	185/97	Regenstauf	k. A.	Blinddarmtonsillen
61	IB542	794/97	231/97	Hoh-Viecheln	Broiler	Tracheen
62	IB544	794/97	233/97	Hoh-Viecheln	Broiler	Tracheen
63	IB584	1272/98	254/98	Regenstauf	Hennen	Organpool
64	IB659	622/00	218/00	Otterndorf	k. A.	Trachea
65	IB670	1174/00	341/00	K. Elmhohe	k. A.	Trachea
66	IB676	118/01	43/01	Visbek	Hennen	Tracheen
67	IB716	1498/01	455/01	Rhein/Main	k. A.	Trachea, Lunge
68	IB719	393/02	104/02	Visbek	k. A.	Organpool
69	IB721	440/02	125/02	Möckern	k. A.	Trachea

Abkürzungen: k. A.: Keine Angabe, K-Nr.: Kundennummer, EK-Nr.: Eikulturnummer

Fortsetzung der Tabelle 6

Lfd. Nr.	Isolat	K-Nr.	EK-Nr.	Region	Wirt	Organ
70	IB722	650/02	221/02	Visbek	k. A.	Organpool
71	IB723	719/02	251/02	Lohne	Broiler	Trachea
72	IB748	568/03	226/03	Thüringen	k. A.	Caeca
73	IB754	1469/03	524/03	Damme	k. A.	Caeca
74	IB756	1587/03	62/04	Seebeck	k. A.	Trachea
75	IB764	1050/04	385/04	Visbek	Hühner	Caeca
76	IB769	1301/04	484/04	Dillstädt	Hennen	Caeca
77	IB781	1477/04 -1	581/04	Visbek	Hühner	Caeca
78	IB787	1608/04	642/05	Cuxhaven	SPF- Kontakthühner	Caeca
79	IB804	0536/05	222/05	Dillstädt	Hühner	Tracheen
80	k. A.	k. A.	285/06	k. A.	k. A.	k. A.
81	k. A.	k. A.	313/06	k. A.	k. A.	k. A.
82	k. A.	717/06	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.

Abkürzungen: k. A.: Keine Angabe, K-Nr.: Kundennummer, EK-Nr.: Eikulturnummer

Die in der folgenden Tabelle 7 aufgelisteten IBV-Stämme wurden als Referenzvirusstämme verwendet und dienten in sämtlichen Untersuchungen als Positivkontrollen.

**Tabelle 7:** Als Positivkontrollen verwendete IBV-Referenzstämme

Lfd. Nr.	IBV- Impfstoffstämme (n=9)	Lfd. Nr.	IBV-Stämme (KVRAF) (n=7)	Lfd. Nr.	IBV- Referenzstämme des Veterinärlabors der Lohmann Tierzucht GmbH (n=5)
1	TAD IB vac I H120	1	M41	1	M41
2	TAD IB vac II H52	2	D274	2	D274
3	Nobilis IB H120	3	D1466	3	D1466
4	Nobilis IB H52	4	D207	4	793B
5	Nobilis IB D274	5	D212	5	Italy 02
6	Nobilis IB D1466	6	H52		
7	Nobilis IB 4/91	7	H120		
8	Nobilis MA5				
9	Gallivac IB-88				

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Vermehrung und Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274, D1466 sowie einiger Feldvirusisolate in Hühnerembryonen

Die institutseigenen IBV-Stämme (n = 3) M41, D274 und D1466 und die folgenden Feldisolate (n = 4) 8838/84/9, 291/85/6, 684/80 und 390/1/84 wurden in 9-11 Tage bebrüteten embryonierten Hühnereiern (VALO, Lohmann, Cuxhaven) vermehrt. Dafür wurden 0,1 ml virushaltiges Material mit 0,9 ml PBS vermischt. Danach wurden aus diesem Gemisch 0,2 ml in die Allantoishöhle verimpft. Die Bruteier wurden bei 37 °C für 72-96 Stunden inkubiert. Bis zu 24 Stunden *post inoculationem* (p.i.) abgestorbene Embryonen wurden verworfen, da ein so früher Embryotod als unspezifisch betrachtet wird und nicht als virusinduziert. Anschließend wurde die Allantoisflüssigkeit (AF) geerntet und durch Zentrifugieren bei 3.000 x g geklärt und für weitere Untersuchungen bei -85 °C aufbewahrt. Jedes Isolat wurde in embryonierten Hühnereiern so oft passagiert bis Embryoveränderungen oder embryonaler Tod induzierbar waren.

### 3.2.2 Herstellung von Hühnerküken-Nierenzell-Kulturen

Zur Herstellung von Hühnerküken-Nierenzell-Kulturen (HKNZ) wurden embryonierte SPF-Eier (VALO, Lohmann, Cuxhaven) 21 Tage lang bebrütet. Frisch geschlüpfte, euthanasierte Hühnerküken wurden zur Gewinnung der Nierenzellen verwendet. Nach der Eröffnung der Leibeshöhle wurden die inneren Organe entfernt und die Nieren mit Hilfe von Schere und Pinzette möglichst vollständig und ohne benachbart liegende Organe entnommen. Die Nieren wurden in einer Petrischale mittels Schere homogenisiert. Nach der Überführung in einen Erlenmeyerkolben wurde das Homogenisat mindestens 4 Mal mit DPB gewaschen, bis der Überstand klar blieb. Nach der Zugabe von Trypsin-Lösung wurde für 2 min gerührt und der Erlenmeyerkolben für 5 min zum Sedimentieren der Zellen schräg gestellt. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde wieder Trypsin-Lösung zum Zellsediment zugesetzt, 10 min gerührt und 10 min schräg gestellt. Der Überstand wurde nun in Zentrifugengläser mit ca. 2 ml fötalem Kälberserum überführt. Dieser letzte Schritt wurde noch 2 Mal wiederholt. Die Zentrifugengläser wurden im Anschluss 10 sec bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen im Anzuchtmedium MEM mit 20 % FKS resuspendiert. Nach der Filtration der Suspension durch einen 4-lagigen Verbandmull wurde die Suspension in entsprechende Zellkulturgefäße verteilt. Nach zweitägiger Inkubation bei

37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre waren die Zellen zu einem einschichtigen Zellrasen ausgewachsen.

### **3.2.3 Vermehrung und Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274, D1466 sowie einiger Feldisolate in Hühnerküken-Nierenzell-Kulturen (HKNZ)**

Die in der KVRAF vorrätigen IBV-Referenzstämme (n = 3) M41, D274, D1466 und die folgenden Feldisolate (n = 4) 8838/84/9, 291/85/6, 684/80 und 390/1/84 wurden nach mehreren Eipassagen auf HKNZ passagiert. Dafür wurde 1 ml virushaltige Allantoisflüssigkeit mit 9 ml Zellkulturmedium verdünnt und davon 5 ml in 5 ml-Zellkulturflaschen auf HKNZ verimpft. Nach 90-minütiger Absorptionszeit bei 37 °C wurde das Medium abgossen und Erhaltungsmedium (ohne FKS) zugegeben. Danach wurden die Zellkulturflaschen bei 37 °C für 72-96 Stunden inkubiert.

Die HKNZ wurden nach jeder Passage mittels Zellschaber geerntet und in ein Reagenzglas überführt. Nach einer Ultraschallbehandlung erfolgte eine Zentrifugation bei 1.000 x g für 5 min. Anschließend wurden 0,2 ml des Überstandes auf frische HKNZ verimpft.

Nach jeder Zellkulturpassage wurden die HKNZ auf das Auftreten eines zytopathischen Effekts (ZPE) untersucht. Bei eindeutigem ZPE wurde der Zellkulturüberstand in 96iger Mikrotiterplatten titriert und anschließend mittels Kristallviolettlösung fixiert und gefärbt. Die Kalkulation der Titer erfolgte nach der Formel von SPEARMAN und KAERBER (nach MAYR et al., 1974) als Kultur-Infektiöse-Dosis<sub>50</sub>/ml (KID<sub>50</sub>/ml).

### **3.2.4 Kristallviolettfärbung IBV infizierter Hühnerküken-Nierenzell-Kulturen**

Zuerst wurde das Zellkulturmedium aus den Mikrotiterplatten vollständig entfernt und die Platten in Kristallviolettlösung eingetaucht. Nach 8-minütiger Einwirkungszeit wurde die Fixier/Färbelösung abgossen und die überschüssige Farbstofflösung in den Mikrotiterplatten mit Leitungswasser abgespült. Nach Abtrocknung der Platten auf mehrere Lagen von Zellstoff wurden die Ergebnisse unter einem Lichtmikroskop abgelesen. Als IBV-positiv wurde eine nahezu vollständige Zerstörung des Zellrasens gewertet. blieb der Zellrasen noch vollständig erhalten, wurde dieser Befund als negativ hinsichtlich der Vermehrung des IBV beurteilt.

### 3.2.5 Vermehrung der IB-Impfstoffviren in embryonierten Hühnereiern

Die Vermehrung der in Tabelle 7 aufgeführten IB-Impfstoffviren in Hühnerembryonen erfolgte nach der unter Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Methode. Die gewonnenen Allantoisflüssigkeiten wurden bis zur Verwendung für die RNA-Isolation bei  $-85\text{ °C}$  aufbewahrt. Sie dienten sowohl bei der Isolierung von RNA als auch bei der Reversen Transkription (RT) und der Polymerase-Ketten-Reaktion als Positivkontrollen.

### 3.2.6 Hämagglutinationstest

*Durchführung der Hämagglutinationstests:* In alle Kavitäten der 96-Well-Mikrotiterplatten wurden  $25\ \mu\text{l}$  physiologische NaCl-Lösung vorgelegt. Danach wurde in die Wells der ersten Reihe  $25\ \mu\text{l}$  Virussuspension (AF) gegeben. Als Positivkontrolle wurde in das vorletzte Well  $25\ \mu\text{l}$  eines hämagglutinierenden Virus (Paramyxovirus Typ 1, PMV-1) gegeben.  $25\ \mu\text{l}$  NaCl-Lösung im letzten Well fungierten als Negativ-Kontrolle. Nach Vermischen der Virussuspension wurden  $25\ \mu\text{l}$  Virussuspension-NaCl-Gemisch in die nächste Reihe übersetzt. Dieser Vorgang wurde zur Anfertigung einer geometrischen Verdünnungsreihe ( $\log_2$ ) bis zur letzten Reihe wiederholt. Danach wurden  $25\ \mu\text{l}$  1 %iger Hühnererythrozyten-Suspension (aus 10 %iger Erythrozyten-Suspension in NaCl-Lösung) in alle Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben. Die Platten wurden nach einer 30-, 60- und 90-minütigen Inkubation bei Zimmertemperatur dreimal abgelesen. Nach Schrägstellung der Rundbodenplatten bildet sich bei vorhandener Hämagglutination ein aus Erythrozyten und IBV bestehender, am Boden der Wells haftender „Teppich“ aus, was als IBV-positive Hämagglutination bewertet wurde. Sedimentierten dagegen die Erythrozyten unter Bildung eines „Knopfes“, so wurde dies als IBV-negativ beurteilt. Als Titer eines Virus wurde diejenige höchste Virusverdünnung in  $\log_2$  angegeben, bei der noch eine vollständige Teppich-Bildung, d. h. Hämagglutination, vorhanden war.

### **3.2.7 PCR-vermittelte Untersuchungen der IBV-Isolate**

Die PCR-vermittelten Untersuchungen wurden in der KVRAF und im Veterinärlabor der Firma Lohmann Tierzucht (Cuxhaven) durchgeführt.

#### **3.2.7.1 RNA-Isolation**

Für die RNA-Isolation aus Probenmaterial (Allantoisflüssigkeit) wurden zwei verschiedene RNA-Isolationskits verwendet. Die RNA-Isolation von Probenmaterial der lfd. Nr. 1 bis 24 sowie von den in der Tabelle 7 aufgeführten IBV-Impfstoff-Stämmen und IBV-Stämmen der KVRAF erfolgte mit dem „High Pure Viral Nucleic acid Kit“ in der KVRAF (JLU, Gießen). Die RNA-Isolation von Probenmaterial der lfd. Nr. 24 bis 82 (Tabelle 6) sowie von den in der Tabelle 7 aufgeführten IBV-Referenzstämmen des Veterinärlabors der Lohmann Tierzucht GmbH erfolgte mit dem „NucleoSpin® Viral RNA Isolation Kit“ im Veterinärlabor von Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven).

##### **3.2.7.1.1 RNA-Isolation mit dem „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“**

Die Isolation der RNA aus Proben mit Hilfe des Kits „High Pure Viral Nucleic Acid Kit“ (Roche) erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Es wurden 200 µl Probenmaterial (AF) mit 200 µl Bindepuffer mit darin enthaltenem „Poly(A)carrier“ und 50 µl Proteinase K vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 72 °C wurden dem Gemisch 100 µl Isopropanol zugefügt. Danach wurde das Gemisch in Filtertubes pipettiert und 1 min bei 8.000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Filtertubes in ein neues Auffanggefäß gesetzt. Nun wurden 500 µl Inhibitor Removal Puffer hinzupipettiert. Es erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 8.000 x g. Danach wurde der Überstand verworfen und die Filtertubes wieder in ein neues Auffanggefäß gesetzt. Anschließend wurden den Filtertubes 450 µl Waschpuffer hinzugegeben und bei 8.000 x g 1 min zentrifugiert. Nach der Wiederholung dieses Schrittes wurde für 10 sec bei 13.000 x g zentrifugiert. Die Auffanggefäße wurden verworfen und die Filtertubes in ein nukleasefreies 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Nun wurden 50 µl Elutionspuffer hinzu pipettiert und bei 8.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die gewonnenen ca. 50 µl RNA wurden bis zur weiteren Verwendung bei -85 °C aufbewahrt.

### **3.2.7.1.2 RNA Isolation mit dem „NucleoSpin® Viral RNA Isolation Kit“**

Die Isolation der RNA aus Proben mit Hilfe des Kits „NucleoSpin® Viral RNA Isolations Kit“ (Macherey-Nagel) erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Es wurden 150 µl Probenmaterial mit 600 µl „carrier RNA“ enthaltenem RAV1 Lysispuffer gut vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 70 °C wurde dem Gemisch 600 µl Ethanol (96-100 %ig) zugefügt. Danach wurde die Mixtur in Filtertubes pipettiert und 1 min bei 8.000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Filtertubes in ein neues Auffanggefäß gesetzt und 500 µl RAW Puffer hinzu pipettiert. Es erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 8.000 x g. Danach wurde der Überstand verworfen und die Filtertubes wieder in ein neues Auffanggefäß gesetzt. Nun wurden auf die Filtertubes 600 µl RAV3 Puffer pipettiert und bei 8.000 x g für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde unter Verwendung von 200 µl RAV3 wiederholt und anschließend für 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Die Auffanggefäße wurden verworfen und die Filtertubes in ein nukleasefreies 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Nun wurden 50 µl RNase-free H<sub>2</sub>O hinzu pipettiert und 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde bei 11.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die gewonnenen ca. 50 µl RNA wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### **3.2.7.2 Nachweis des IBV mittels N-Gen-Amplifizierung**

#### **3.2.7.2.1 Nachweis des IBV mittels konventioneller RT-PCR**

Zum Nachweis von IBV mittels konventioneller RT-PCR wurde die gewonnene RNA in cDNA umgewandelt. Dies erfolgte durch Reverse Transkription der RNA.

#### ***Durchführung der Reversen Transkription***

Zunächst wurden je Probe 8 µl RNA mit 1 µl (25 pmol) RT-Primer und 1 µl H<sub>2</sub>O in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß zusammengemischt und zur Denaturierung 10 min bei 72 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf Eis gelegt. Danach wurden zu dem Gemisch 4 µl Expand RT-Puffer, 2 µl DTT, 2 µl dNTP's, 1 µl RNAsin und 1 µl Expand RT pipettiert. Nach Verschließen der Gefäße wurden die Proben in den Thermocycler verbracht und 1 Stunde bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Der Versuchsablauf ist in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8:** Primer-Mix zur Durchführung der Reversen Transkription

<b>Primer-Mix (je Probe)</b>	<b>Eingesetztes Volumen (µl)</b>
Proben-RNA	8
RT-Primer (25 pmol) (hier IBVN-rev)	1
H <sub>2</sub> O (A. bidest.)	1
<b>Primer-Mix Gesamt</b>	<b>10</b>
<b>RT-Mix (je 10 µl RT-Mix)</b>	<b>Eingesetztes Volumen (µl)</b>
Expand RT-Puffer	4
DTT	2
dNTP's (10 mM)	2
RNAsin	1
Expand RT	1
<b>Gesamtvolumen Primer- und RT-Mix</b>	<b>20</b>

***Durchführung der PCR zum Nachweis des IBV***

Zuerst wurden alle für eine PCR notwendigen Reagenzien in den erforderlichen Mengen, mit Ausnahme der cDNA, zu einem Mastermix vereinigt (Tabelle 9). Dafür wurden für einen 50 µl umfassenden Reaktionsansatz, 5 µl des Taq-Puffers, 5 µl dNTP's (2 mM), 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl des Primers IBVN-rev, 1 µl des Primers IBVN-for, 0,25 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) und 28,75 µl H<sub>2</sub>O verwendet. Diese wurden mit der benötigten Zahl der Reaktionsansätze multiplizierten Mengen der Reagenzien zusammen in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und das Gemisch gut durchgeschüttelt. Anschließend wurden davon in jedes Reaktionsgefäß 45 µl pipettiert. Zum Schluss wurden jeweils 5 µl cDNA hinzugegeben. Als Positiv- und Negativ-Kontrolle dienten als IBV identifizierte Kontroll-cDNA bzw. Wasser. Jegliches Pipettieren erfolgte auf Eis. Nach Zugabe der jeweiligen cDNA wurden die Gefäße dicht verschlossen und in einen vorprogrammierten Thermocycler (TPersonal 48, Biometra) verbracht. Für den Nachweis des IBV wurde das folgende Thermocyclerprogramm verwendet: 1 x 94 °C für 4 min, 40 x (94 °C für 30 s, 60 °C für 1 min, 72 °C für 2 min) und 72 °C für 10 min (Tabelle 10).

**Tabelle 9:** Mastermixrezept für die Nachweis-PCR

<b>Substanz</b>	<b>Eingesetztes Volumen (µl)</b>
Taq-Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4,0
dNTP`s (2 mM)	5,0
Primer: IBVN-rev (10 pmol)	1,0
Primer: IBVN-for (10 pmol)	1,0
Taq-DNA-Polymerase	0,25
Aqua bidestillata	28,75
cDNA	5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>

**Tabelle 10:** Temperaturprofil des Thermocyclers für die Nachweis-PCR

<b>Zyklus</b>	<b>PCR-Schritt</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Zeit</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
1	Denaturierung	94	4 min	1
2	Schmelzen (Melting)	94	30 sec	40
	Anlagerung (Annealing)	60	1 min	
	Verlängerung (Elongation)	72	2 min	
3	Kühlung	4	unbegrenzt	1

### 3.2.7.2.2 Nachweis des IBV mittels Real Time „one step“ RT-PCR

Für den Nachweis des IBV wurde eine Real Time „one step“ RT-PCR durchgeführt. Der Mastermix für die Bearbeitung jeder Probe bestand aus folgenden Komponenten (Tabelle 11):

**Tabelle 11:** Mastermixrezept für den Nachweis des IBV mittels Real Time „one step“ RT-PCR

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
2 x QuantiTect SYBR Green	12,5
Reverse Primer IBVNneu (-) (100 pmol)	0,125
Forward Primer IBVNneu (+)(100 pmol)	0,125
QuantiTect RT-Mix	0,25
RNase Free water	10
RNA	2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>

Nach Zusammenmischen der obigen Komponenten wurde ein Gesamtvolumen von 23 µl in die einzelnen Wells der 96er Reaktionsplatte pipettiert und 2 µl der jeweiligen RNA hinzugefügt, außer bei den Negativ-Kontrollen. Als Positiv-Kontrolle dienten verschiedene Verdünnungsstufen ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) der RNA des IBV-Impfstoffs H120. Als Negativ-Kontrolle diente H<sub>2</sub>O. Nach dem die Reaktionsplatte mit einer dafür vorgesehenen Folie bedeckt wurde, wurde sie in das „Real Time PCR System“ verbracht. Es wurde folgende Thermocyclerprogramme verwendet: 1 x (50 °C für 8 min), 1 x (95 °C für 15 min) und 40 x (95 °C für 15 s, 56 °C für 30 s) (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Temperaturprofil des Thermocyclers für den Nachweis von IBV mittels Real Time „one step“ RT-PCR

Zyklus	PCR-Schritt	Temp. (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	Reverse Transkription	50	8 min	1
1	Denaturierung	95	15 min	1
2	Schmelzen (Melting) Anlagerung (Annealing)	95 56	15 s 30 s	40
3	Kühlung	4	mindestens 15min	1

### 3.2.7.3 Genotypisierung des IBV

#### 3.2.7.3.1 Restriktionsenzymanalyse des gesamten S1-Gens des IBV

##### 3.2.7.3.1.1 Amplifizierung des gesamten S1-Gens

**Durchführung der S1-Reverse Transkription:** Die Reverse Transkription des S1-Gens wurde wie unter Abschnitt 3.2.7.2.1 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden hier S1oligo-rev als Primer anstatt IBVN-rev verwendet.

**Durchführung der S1-PCR:** Alle für die PCR notwendigen Reagenzien wurden in den erforderlichen Mengen, mit Ausnahme der cDNA, zu einem Mastermix vereinigt (Tabelle 13). Dafür wurden für einen 50 µl umfassenden Reaktionsansatz, 5 µl des Platinum Taq-Puffers, 10 µl dNTP's (1 mM), 3 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl des Primers S1oligo-rev, 1 µl des Primers S1oligo-for, 0,25 µl Platinum Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) und 24,75 µl H<sub>2</sub>O verwendet. Diese wurden mit der benötigten Zahl der Reaktionsansätze multiplizierten Mengen der Reagenzien zusammen in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und das Gemisch gut durchgeschüttelt. Anschließend wurden davon in jedes Reaktionsgefäß 45 µl pipettiert. Zum Schluss wurden jeweils 5 µl cDNA (aus S1-RT) hinzu gegeben. Als Positiv- und Negativ-Kontrolle dienten als IBV identifizierte Kontroll-cDNA bzw. Wasser. Jegliches Pipettieren erfolgte auf Eis. Nach Zugabe der jeweiligen cDNA wurden die Gefäße dicht verschlossen und in einen vorprogrammierten Thermocycler verbracht. Für die Amplifikation von S1 des IBV wurde das folgende Thermocyclerprogramm verwendet: 1 x 94 °C für 4 min, 35 x (94 °C für 1 min, 45 °C für 2 min, 72 °C für 3 min) und 1 x 72 °C für 10 min (Tabelle 14).

**Tabelle 13:** Mastermixrezept für die S1-PCR

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
Taq-Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3,0
dNTP's (1 mM)	10,0
Primer: IBVN-rev	1,0
Primer: IBVN-for	1,0
Platinum Taq-DNA-Polymerase	0,25
Aqua bidestillata	24,75
cDNA	5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>

**Tabelle 14:** Temperaturprofil des Thermocyclers für die S1-PCR

Zyklus	PCR-Schritt	Temp. (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	Denaturierung	94	4 min	1
2	Schmelzen (Melting)	94	1 min	35
	Anlagerung (Annealing)	45	2 min	
	Verlängerung (Elongation)	72	3 min	
3	Kühlung	4	mindestens 15 min	1

### 3.2.7.3.1.2 Restriktionsverdau des gesamten S1-Gens

Zum Restriktionsverdau des amplifizierten S1-Gens wurden die durch die S1-Gen-RT-PCR gewonnenen Amplifikate mit den Restriktionsenzymen HaeIII, BstY und XcmI verdaut und mit Hilfe der Agargelelektrophorese aufgetrennt.

Der Mastermix wurde für alle Proben des Verdau zusammenpipettiert und gemischt (Tabelle 15). Ein Volumen von 8 µl wurde auf die einzelnen Eppendorfgefäße verteilt und 22 µl des jeweiligen Produkts der S1-PCR hinzugefügt. Es wurden nur Produkte der S1-PCR und die eine deutliche Bande zeigten, verwendet. Anschließend wurde die DNA bei der für das jeweilige Enzym vorgeschriebenen Temperatur verdaut.

**Tabelle 15:** Mastermixrezept für Restriktionsverdau des gesamten S1-Genes

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
H <sub>2</sub> O (A. bidest.)	4
10 x Enzym-Puffer	3
Jeweilig benötigtes Enzym	1
DNA	22
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>30</b>

### 3.2.7.3.2 Genotypspezifische Nested-Multiplex PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274 und 793B

Hier wurden die Proben, die mittels N-Gen-RT-PCR als IBV-positiv nachgewiesen wurden, für eine Genotypisierung verwendet. Dafür wurden eine Äußere-RT-PCR und eine Nested-Multiplex-PCR, die auf S1-Gen basieren, durchgeführt (CAVANAGH, 1999). Diese Methode diente dazu, drei verschiedene IBV-Genotypen (Massachusetts, D274, 793/B) voneinander zu unterscheiden. Die Primer XCE2 (-) und XCE1 (+) sind für all diese Typen gemeinsam. Das durch diese Primer erhaltene Ampfikat (Äußere-RT-PCR) wurde für eine weitere PCR (Nested-Multiplex) verwendet. XCE3 (-) bindet sich innerhalb der durch die Äußere-RT-PCR erhaltene Ampfikaet und produziert mit Hilfe der Primer BCE1 (+), DCE1 (+) und MCE1 (+) neue Amplifikate in verschiedenen Längen, durch die die Genotypisierung ermöglicht wird:

XCE3 (-) ↔ BCE1 (+): 154 bp entspricht dem Genotyp 793/B

XCE3 (-) ↔ DCE1 (+): 217 bp entspricht dem Genotyp D274

XCE3 (-) ↔ MCE1 (+): 295 bp entspricht dem Genotyp Massachusetts.

Zum Nachweis des Genotyps D1466, dessen S1-Gen-Sequenz sich ca. zu 50 % von allen bekannten IB-Viren unterscheidet (KUSTER et al., 1989a), wurden andere Primerpaare benötigt: für äußere RT-PCR D2 (-) und D1 (+), für innere PCR D4 (-) und D3 (+). Die erwartete Basenpaarlänge für den Genotyp D1466 war 253 bp.

D4 (-) ↔ D3 (+): 253bp entspricht dem Genotyp D1466

### 3.2.7.3.2.1 Äußere-RT-PCR und Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274 und 793B

Die Durchführung der Reversen Transkription für die Äußere-RT-PCR zum Nachweis der Genotypen 793/B, Massachusetts und D274, wurde, wie bereits in Abschnitt 3.2.7.2.1 beschrieben, durchgeführt. Allerdings kam hier als Reverse-Primer XCE2 (-) zur Anwendung.

**Durchführung der Äußere-RT-PCR:** Alle für eine PCR notwendigen Reagenzien wurden in den erforderlichen Mengen, mit Ausnahme der cDNA, zu einem Mastermix vereinigt (Tabelle 16). Dafür wurden für einen 50 µl umfassenden Reaktionsansatz, 5 µl des Taq-Puffers, 10 µl dNTP's (1 mM), 3,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl des Primers XCE2-rev, 1 µl des Primers XCE1-for, 0,25 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) und 24,25 µl H<sub>2</sub>O verwendet. Diese wurden mit der benötigten Zahl der Reaktionsansätze multiplizierten Mengen der Reagenzien zusammen in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und das Gemisch gut durchgeschüttelt. Anschließend wurden hier von in jedes Reaktionsgefäß 45 µl pipettiert. Zum Schluss wurden jeweils 5 µl cDNA (aus Äußere-RT) hinzugegeben. Als Positiv- und Negativ-Kontrolle dienten die als IBV identifizierten Kontroll-cDNA bzw. das Wasser. Jegliches Pipettieren erfolgte auf Eis. Nach Zugabe der jeweiligen cDNA wurden die Gefäße dicht verschlossen und in einen vorprogrammierten Thermocycler verbracht. Für die Nested-PCR wurde folgendes Thermocyclerprogramm verwendet: 1 x 94 °C für 4 min, 30 x (94 °C für 1 min, 48 °C für 1,5 min, 72 °C für 2 min) und 1 x 72 °C für 10 min (Tabelle 18).

**Tabelle 16:** Mastermixrezept für die Äußere-PCR zum Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274 und 793B

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
Taq-Puffer	5,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,5
dNTP's (1 mM)	10,0
Primer: XCE2 (-) (10 pmol)	1,0
Primer: XCE1 (+) (10 pmol)	1,0
Taq-DNA-Polymerase	0,25
Aqua bidestillata	24,25
cDNA	5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>

### 3.2.7.3.2.2 Nested-Multiplex-PCR für die Genotypen Massachusetts, D274 und 793/B

Der Mastermix (Tabelle 17) für einen 20 µl umfassenden Reaktionsansatz bestand aus 2 µl des Taq-Puffers, 4 µl dNTP's (1 mM), 1,4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,8 µl des Primers XCE3 (-), 0,4 µl des Primers MCE1 (+), 0,4 µl des Primers DCE1 (+), 0,4 µl des Primers BCE1 (+), 0,1 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) und 9,5 µl H<sub>2</sub>O. Diese wurden mit der benötigten Zahl der Reaktionsansätze multiplizierten Mengen der Reagenzien zusammen in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und das Gemisch gut durchgeschüttelt. Anschließend wurden davon in jedes Reaktionsgefäß 19 µl pipettiert. Zum Schluss wurden jeweils 1 µl cDNA (1000-fach mit H<sub>2</sub>O verdünnt, aus Äußere-PCR) hinzugegeben. Als Positivkontrollen dienten verschiedene cDNA Proben aus Impfstoff-IB-Viren, 793/B, Massachusetts und D274. Als Negativkontrolle fungierte Wasser. Jegliches Pipettieren erfolgte auf Eis. Nach Zugabe der jeweiligen cDNA wurden die Gefäße dicht verschlossen und in einen vorprogrammierten Thermocycler verbracht. Für die Multiplex-PCR wurde folgendes Thermocyclerprogramm verwendet: 1 x 94 °C für 4 min, 30 x (94 °C für 1 min, 48 °C für 1,5 min, 72 °C für 2 min) und 1 x 72 °C für 10 min (Tabelle 18).

**Tabelle 17:** Mastermixrezept für die Nested-Multiplex-PCR

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
Taq-Puffer	2,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,4
dNTP's (1 mM)	4,0
Primer: XEC3 (-) (10 pmol)	0,8
Primer: MCE1 (+) (10 pmol)	0,4
Primer: BCE1 (+) (10 pmol)	0,4
Primer: DCE1 (+) (10 pmol)	0,4
Taq-DNA-Polymerase	0,1
Aqua bidestillata	9,5
cDNA	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

**Tabelle 18:** Temperaturprofil des Thermocyclers für Äußere RT- und Nested-Multiplex-PCR

Zyklus	PCR-Schritt	Temp. (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	Denaturierung	94	4 min	1
2	Schmelzen (Melting)	94	1 min	30
	Anlagerung (Annealing)	48	1,5 min	
	Verlängerung (Elongation)	72	2 min	
3	Kühlung	4	unbegrenzt	1

### 3.2.7.3.2.3 Genotypspezifische Äußere-RT-PCR und Innere-PCR zum Nachweis des Genotyps D1466

*Durchführung der Reversen Transkription:* Die Reverse Transkription wurde unter Verwendung von Reverse-Primer D2 (-) wie bereits unter Abschnitt 3.2.7.2.1 beschrieben, durchgeführt.

*Durchführung der Äußeren-PCR für D1466:* Der Mastermix (Tabelle 19) bestand für einen 50 µl Reaktionsansatz je Probe aus 5 µl des Taq-Puffers, 10 µl dNTP's (1 mM), 3,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl des Primers D2 (-), 1 µl des Primers D1 (+), 0,25 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) und 24,25 µl H<sub>2</sub>O. Diese werden mit der benötigten Zahl der Reaktionsansätze multiplizierten Mengen der Reagenzien zusammen in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und das Gemisch gut durchgeschüttelt. Anschließend wurden davon in jedes Reaktionsgefäß 45 µl pipettiert. Zum Schluss wurden jeweils 5 µl cDNA (aus RT für D1446) hinzugegeben. Als Positiv- und Negativ-Kontrolle dienten cDNA's aus Impfstoff-IB-Viren D1466 bzw. Wasser. Das Pipettieren erfolgte auf Eis. Nach Zugabe der jeweiligen cDNA wurden die Gefäße dicht verschlossen und in einen vorprogrammierten Thermocycler verbracht. Es wurde folgendes Thermocyclerprogramm verwendet: 94 °C für 4 min, 30 x (94 °C für 1 min, 48 °C für 1,5 min, 72 °C für 2 min), 72 °C für 10 min (Tabelle 21).

**Tabelle 19:** Mastermixrezept für die Äußere PCR für D1466

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
10 X Taq-Puffer	5,0
Magnesiumchlorid MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,5
dNTP's	10,0
Primer: D2 (-) (10 pmol)	1,0
Primer: D1 (+) (10 pmol)	1,0
Taq-DNA-Polymerase 5 U/µl	0,25
Aqua bidestillata	24,25
cDNA	5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>

**Durchführung der Inneren-PCR für den Genotyp D1466:** Das Volumen der Reaktionsgemische für die Innere PCR betrug 20 µl. Der Mastermix (Tabelle 20) wurde aus folgenden Komponenten zusammengestellt: 2 µl Taq-Puffers, 4 µl dNTP's (1 mM), 1,4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,4 µl Reverse-Primer D4 (-), 0,4 µl Forward-Primer D3 (+), 0,1 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) und 10,7 µl H<sub>2</sub>O. Nach guter Mischung der einzelnen Mastermix-Komponenten wurde unmittelbar vor Beginn des PCR-Thermocycler Programm, 1 µl cDNA (1000-fach verdünnt, aus Äußere-PCR) bzw. Kontroll-DNA zugegeben und das Reaktionsgefäß in den Thermocycler verbracht. Es wurde folgendes Thermocyclerprogramm verwendet: 1 x 94 °C für 4 min, 30 x (94 °C für 1 min, 48 °C für 1,5 min, 72 °C für 2 min) und 1 x 72 °C für 10 min. (Tabelle 21).

**Tabelle 20:** Mastermixrezept für die Innere PCR für D1466

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
Taq-Puffer	2,0
Magnesiumchlorid MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,4
dNTP's	4,0
Primer: D4 (-) (10 pmol)	0,4
Primer: D3 (+) (10 pmol)	0,4
Taq-DNA-Polymerase	0,1
Aqua bidestillata	10,7
cDNA	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

**Tabelle 21:** Temperaturprofil des Thermocyclers für Äußere PCR und Innere PCR für D1466

Zyklus	PCR-Schritt	Temp. (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	Denaturierung	94	4 min	1
2	Schmelzen (Melting)	94	1 min	30
	Anlagerung (Annealing)	48	1,5 min	
	Verlängerung (Elongation)	72	2 min	
3	Kühlung	4	unbegrenzt	1

### 3.2.7.3.3 Genotypspezifische Äußere „one step“ RT-PCR und Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis von Genotypen Italy 02, Massachusetts, D1466, D274 und 793B

Hier wurde eine PCR-Methode verwendet, durch die fünf unterschiedliche IBV-Genotypen gleichzeitig nachweisbar und voneinander unterscheidbar waren.

#### 3.2.7.3.3.1 Genotypspezifische Äußere „one step“ RT-PCR

**Durchführung der Äußeren „one step“ RT-PCR:** Die äußere „one step“ RT-PCR wurde mit Hilfe eines Kits „Qiagen Onestep RT-PCR Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Der Mastermix je Probe bestand aus folgenden Komponenten (Tabelle 22):

**Tabelle 22:** Mastermixrezept für die Äußeren „one step“ RT-PCR

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5
dNTP Mix (je 10 mM)	1
X3 (-) Reverse Primer (100 pmol)	0,25
X1 (+) Forward Primer (100 pmol)	0,25
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1
RNase-free water	15,5
RNA	2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>

Nach Zusammenmischen der obigen Komponenten wurde ein Volumen von 23  $\mu\text{l}$  in die einzelnen PCR-Tubes verteilt und 2  $\mu\text{l}$  der jeweiligen RNA-Probe hinzugefügt, außer bei der Negativ-Kontrolle. Nach Verschließen der Gefäße wurden die Proben in den Thermocycler verbracht und das folgende Thermocyclerprogramm gestartet: 1 x (50 °C für 30 min), 1 x (95 °C für 15 min), 30 x (94 °C für 30 s, 58 °C für 30 s, 72 °C für 40 s), 72 °C für 10 min (Tabelle 23).

**Tabelle 23:** Temperaturprofil des Thermocyclers für Äußere „one step“ RT-PCR

Zyklus	PCR-Schritt	Temp. (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	Reverse Transcription	50	30 min	1
2	Denaturierung	95	15 min	1
3	Schmelzen (Melting) Anlagerung (Annealing) Verlängerung (Elongation)	94 58 72	30 s 30 s 40 s	30
4	Kühlung	4	unbegrenzt	1

### 3.2.7.3.3.2 Genotypspezifische Nested-Multiplex-PCR

Die genotypspezifische Multiplex-PCR wurde mit Hilfe des Kits „Genecraft“ durchgeführt. Der Mastermix je Probe bestand aus folgenden Komponenten:

**Tabelle 24:** Mastermixrezept für genotypspezifische Nested-Multiplex-PCR

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
Natutec 10-fach Buffer (mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5
Natutec Taq-Polymerase 5 U/µl	0,2
Natutec DNA Polymerisationsmix	1
Italy (-) Reverse Primer	0,3
M41 (-) Reverse Primer	0,3
793 B (-) Reverse Primer	0,3
D274 (-) Reverse Primer	0,3
D1466 (-) Reverse Primer	0,3
X2 (+) Forward Primer	0,3
RNase-free water	41
DNA	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>

Nach Zusammenmischen der obigen Komponenten wurde ein Volumen von 49 µl in einzelnen PCR-Tubes verteilt. Als Template diente 1 µl DNA-Amplifikat aus vorausgegangener Äußerer RT-PCR. Nach Hinzufügen der jeweiligen DNA-Templates wurden die Gefäße verschlossen und die Proben in den Thermocycler verbracht. Für die Multiplex-PCR wurde folgendes Thermocyclerprogramm verwendet: 94 °C für 4 min, 30 x (94 °C für 30 s, 60 °C für 30 s, 72 °C für 40 s), 72 °C für 10 min (Tabelle 25).

**Tabelle 25:** Temperaturprofil des Thermocyclers für genotypspezifische Nested-Multiplex-PCR

Zyklus	PCR-Schritt	Temp. (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	Denaturierung	94	4 min	1
2	Schmelzen (Melting)	94	30 s	30
	Anlagerung (Annealing)	60	30 s	
	Verlängerung (Elongation)	72	40 s	
3	Kühlung	4	Mindestens 15 min	1

### 3.2.7.3.4 Sequenzierung

Die folgenden Isolate; IB291, IB764, IB787 wurden mit Hilfe des Primerpaars S1uni (-), XCE1 (+), die Isolate IB444, IB719 und EK313/06 mit Hilfe des Primerpaars XCE3 (-) und XCE1 (+) mit dem Protokoll in der Tabelle 26 amplifiziert. Die beiden erwähnten Primerpaare binden sich innerhalb des S1-Gens und amplifizieren jeweils einen Teilbereich.

**Tabelle 26:** Mastermixrezept für die Amplifikation der oben erwähnten Isolate

Substanz	Eingesetztes Volumen (µl)
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	10
dNTP mix (je 10 mM)	2
S1uni (-) bzw. XCE3 (-) Reverse Primer (100 pmol)	0,25
XCE1 (+) Forward Primer (100 pmol)	0,251
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2
RNase-free water	30,5
RNA	5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>

Nach Zusammenmischen der obigen Komponenten wurde ein Volumen von 45 µl in einzelnen PCR-Tubes verteilt und, außer bei der Negativ-Kontrolle, 5 µl der jeweiligen RNA-Probe hinzugefügt. Nach Verschließen der Gefäße wurden die Proben in den Thermocycler verbracht und das folgende Thermocyclerprogramm gestartet: 1 x (50 °C 30 min), 1 x (95 °C 15 min), 30 x (94 °C 30 Sek., 50 °C 1 min, 72 °C 1,5 min), 72 °C 10 min (Tabelle 27).

**Tabelle 27:** Temperaturprofil des Thermocyclers für oben erwähnten RT-PCR`s

Zyklus	PCR-Schritt	Temp. (°C)	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	Reverse Transkription	50	30 min	1
2	Denaturierung	95	15 min	1
3	Schmelzen (Melting)	95	30 s	30
	Anlagerung (Annealing)	50	1 min	
	Verlängerung (Elongation)	72	1,5 min	
4	Kühlung	4	Mindestens 15 min	1

Nach Erhalten der Amplifikate wurden sie mit Hilfe eines Kits „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers gereinigt und zur Sequenzierung zur Firma MWG-Biotech AG gesendet.

### 3.2.8 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Trennung der einzelnen DNA-Fragmente und ihrer Identifizierung wird die Agarosegel-Elektrophorese am häufigsten verwendet. Dafür wird Agarose in einem Elektrophoresepuffer (hier TBE-Puffer) aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Danach wird die Lösung in eine Elektrophoresekammer gegossen. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird es in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit Elektrophoresepuffer feucht gehalten. Anschließend werden die DNA-Amplifikate in die verschiedenen Geltaschen pipettiert und die Spannung angelegt.

**Herstellung eines 2 %igen Agarosegels:** Es wurden 70 ml TBE-Puffer mit 1,4 g Agarosepulver in einem Erlenmeyerkolben in einem Mikrowellenapparat bis zur Verflüssigung des Gemisches erhitzt. Danach wurde es zum Abkühlen mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Anschließend wurde das verflüssigte Gel in eine seitlich mit Tesa-Film abgedichtete Kammer gegossen und ein dementsprechender Kamm aufgesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt. Danach konnten die DNA-Amplifikate in die dafür vorgesehenen Geltaschen pipettiert werden.

**Herstellung eines Metaphor® Agarosegels:** Metaphor® Agarosegel wurde für das Auftrennen von Amplifikaten des S1-Gens verwendet, die zuvor mit Restriktionsenzymen verdaut wurden. Dafür wurden in einen Erlenmeyerkolben 50 ml gekühlter TBE-Puffer gefüllt. Unter kräftigem Rühren wurden 2 g Agarosepulver hinzugefügt und das Gemisch für 15 Minuten stehen gelassen. Der Kolben wurde mit seinem Inhalt gewogen und die Öffnung mit Frischhaltefolie verschlossen, in der kleine Löcher gestochen waren. Der Kolben wurde in der Mikrowelle für eine Minute bei mittlerer Hitze erhitzt und wieder für 15 Minuten stehen gelassen. Danach wurde der Kolben für zwei Minuten bei mittlerer Hitze erhitzt und anschließend sanft geschwenkt. Im Anschluss wurde der Kolben wieder gewogen und der Flüssigkeitsverlust durch heißes A. bidest. ersetzt und der Inhalt wieder gerührt. Bei einer Temperatur von 50-60 °C wurde das Gel in einen Plexiglasgelträger, der seitlich mit Tesafilm an den Rändern abgedichtet wurde, gegossen. Nach dem Erstarren wurde es für 20 Minuten bei 4 °C gekühlt.

### **3.2.8.1 Beladung des Gels**

Es wurden jeweils ca. 1-2 µl Loading Dye Tropfen auf einen Nesco-Film-Streifen gegeben. Jeder Tropfen Loading Dye wurde jeweils mit 10 µl DNA-Amplifikat vermischt und anschließend in die dafür vorgesehenen Geltaschen verbracht. Danach wurde das beladene Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und diese an die Stromquelle angeschlossen.

### **3.2.8.2 Geräteeinstellung**

Folgende Programme wurden verwendet: Für die Nachweis-PCR und Nested-Multiplex-PCR waren es 100 Volt für 100 min. Für S1-PCR war es 120 Volt für 120 min. Für Restriktionsenzymeanalyse war es 80 Volt für 150 min.

### **3.2.9 Ethidiumbromidfärbung**

Meistens wird Ethidiumbromid in der PCR-Technologie verwendet, um DNA-Amplifikate in Agarosegelen sichtbar zu machen. Ethidiumbromid ist eine Substanz, die durch Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Diese Substanz wird zwischen den Basenpaarungen der Nukleinsäuren eingebaut (interkaliert), so dass diese das UV-Licht emittieren und somit sichtbar gemacht werden.

Die Gele wurden in 0,1 %iger Ethidiumbromidlösung für 30 min gefärbt und danach 20 min in A. dest. entfärbt. Anschließend wurden sie auf einen UV-Illuminator bzw. auf die Fläche der Dunkelkammer gelegt und mit UV-Licht bestrahlt, um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen. Die Gele wurden mit einer Kamera fotografiert. Fotografieren von Gelen erfolgte nur unter UV-Lichtschutz.

## 4 ERGEBNISSE

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die pathologischen Embryoveränderungen und der ZPE mit drei Referenzstämmen M41, D274, D1466 und vier Feldisolaten 8838/84/9, 291/85/6, 684/80 und 390/1/84 dargestellt.

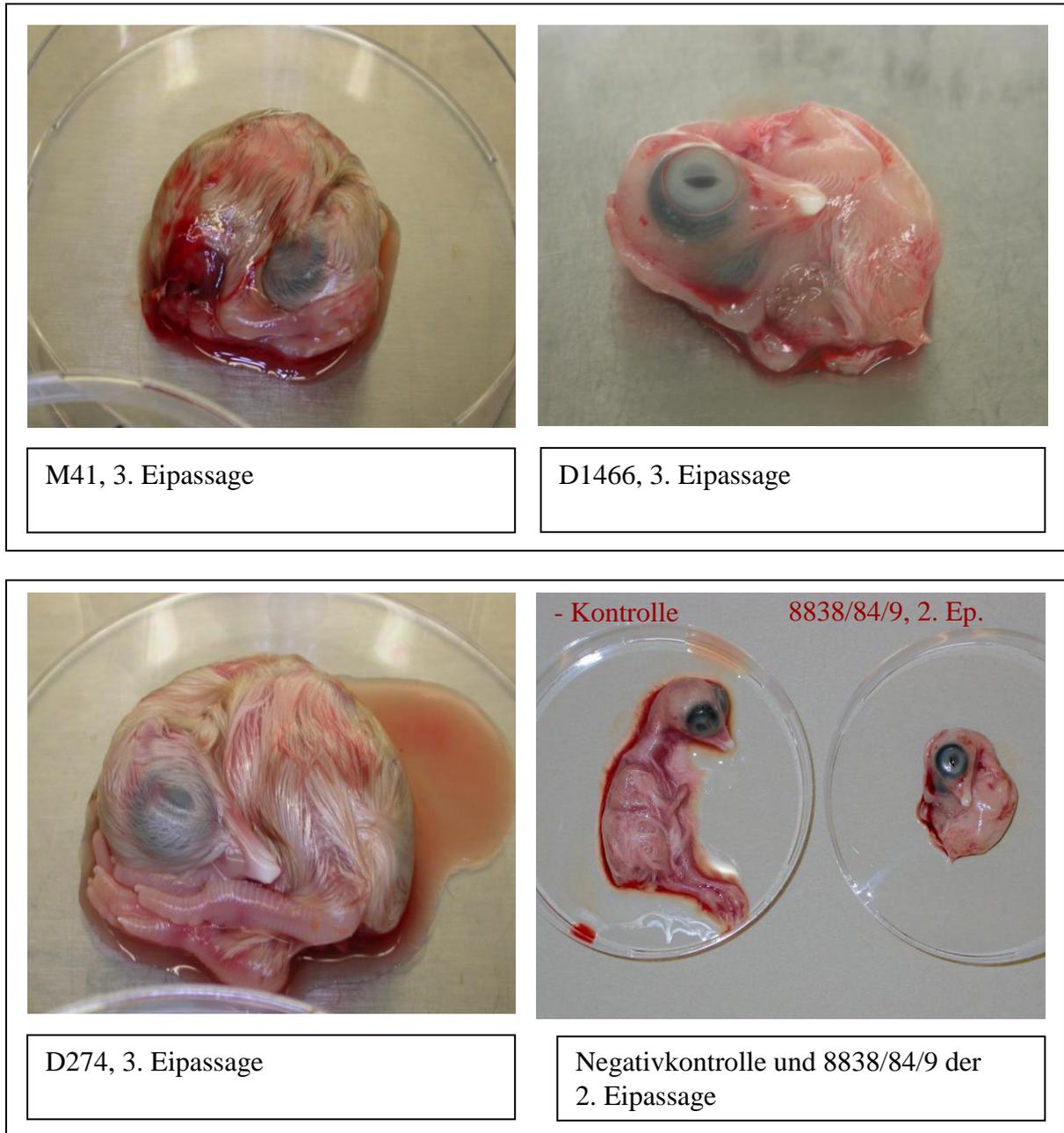
Im zweiten Teil dieser Arbeit werden PCR-vermittelte Untersuchungen beschrieben. Als erstes wurde das IBV bzw. einige IB-Feldvirusisolate durch den Nachweis des N-Gens sowohl mit Hilfe konventioneller RT-PCR als auch mit Real Time RT-PCR detektiert. Im Anschluss wurden sie durch zwei verschiedene Äußere-RT- und Nested-Multiplex-PCR-Verfahren genotypisiert. Außerdem wurden einige Isolate sequenziert.

### 4.1. Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274 und D1466 sowie einiger IBV-Feldisolate an Hühnerembryonen

Die IBV-Referenzstämme (n = 3) M41, D274, D1466 und die Feldvirusisolate (n = 4) 8838/84/9, 291/85/6, 684/80 und 390/1/84 wurden in 9-11 Tage bebrüteten embryonierten Hühnereiern vermehrt. Jedes Isolat bzw. jeder IBV-Referenzstamm wurde so oft passagiert bis Embryoveränderungen oder der embryonale Tod festgestellt werden konnten.

Schon in der ersten Eipassage verursachten alle oben genannten Referenzvirusstämme und Feldisolate pathologische Embryoveränderungen (Abbildung 5). Die infizierten Embryonen waren im Vergleich zu den Negativkontrollen unterentwickelt, klein und wiesen multiple Hämorrhagien am gesamten Körper auf. Die Federn waren wenig ausgebildet. Die Zehen der Embryonen lagen meistens am Hinterkopf. Die Flüssigkeit der Amnionhöhle war verdickt und verklebte mit dem Embryo. Das Volumen der Allantoisflüssigkeit war vermehrt, sie war klar und sehr flüssig. Bereits beim Schieren der Eier konnte eine herabgesetzte Beweglichkeit der Embryonen festgestellt werden. Der Embryontod trat von Stamm zu Stamm zu unterschiedlichen Zeiten p.i. auf und differierte bei verschiedenen Eipassagezahlen (Tabelle 28).

Die Referenzvirusstämme bzw. Feldisolate D274, 8838/84/9, 291/85/6 und 390/1/84 verursachten bereits in der zweiten Eipassage den embryonalen Tod. Bei den Referenzstämmen M41 und D1466 trat der embryonale Tod nach drei Eipassagen auf. Das Feldisolat 684/80 induzierte den Tod der infizierten Hühnerembryos erst nach vier Eipassagen. Tabelle 28 gibt einen Überblick zum Auftreten pathologischer Veränderungen und den Eintritt des Embryontods für das jeweilige IBV.



**Abbildung 5:** Durch IBV verursachte Embryoveränderungen.

Oben links: Mit M41 infizierter Embryo, 3. Eipassage: Hämorrhagien, Zehen am Hinterkopf verklebt

Oben rechts: Mit D1466 infizierter Embryo; 3. Eipassage: vereinzelt Hämorrhagien, verringerte Federbildung

Unten links: D274, 3. Eipassage: zusammengeballter Embryo

Unten rechts: Größenvergleich von Embryos: Embryo als Negativkontrolle auf der linken Seite, mit 8838/84/9 infizierter Embryo rechts.

**Tabelle 28:** Adaptation der Referenzvirusstämme und vier Feldisolate an Hühnerembryonen.

Stamm/Isolat	Eipassage	Stunden post inoculationem (p.i.)						
		24	36	48	60	72	84	96
<b>M41</b>	1.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	2.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	3.	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	-	
	4.	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	-	
<b>D274</b>	1.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	2.	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	-	
	3.	-	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	
<b>D1466</b>	1.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	2.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	3.	-	-	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	
	4.	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	-	
<b>8838/84/9</b>	1.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	2.	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	-	
	3.	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	-	
<b>291/85/6</b>	1.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	2.	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	-	-	
	3.	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	-	
<b>684/80</b>	1.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	2.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	3.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	4.	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	-	
<b>390/1/84</b>	1.	-	-	-	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	2.	-	-	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	
	3.	-	-	-	+ <sup>a</sup> + <sup>b</sup>	-	-	

+<sup>a</sup> = Nach der Öffnung der Eischale pathologische Embryoveränderungen festgestellt.

+<sup>b</sup> = Beim Schieren des Eies Embryontod festgestellt.

- = Beim Schieren des Eies vitaler Embryo festgestellt.

Durch IBV induzierte Embryoveränderungen oder der embryonale Tod traten erst nach mehreren Eipassagen auf.

#### **4.2. Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274 und D1466 sowie einiger Feldisolate an Hühnerküken-Nierenzell-Kulturen**

Die IBV-Referenzstämme (n = 3) M41, D274, D1466 und die folgenden Feldisolate (n = 4) 8838/84/9, 291/85/6, 684/80 und 390/1/84 wurden nach mehreren Eipassagen auf HKNZ passagiert. Nach jeder Zellkulturpassage wurden die HKNZ 24, 48, 72, 96 Stunden *p.i.* auf Entwicklung eines ZPE untersucht (Tabelle 29). Der ZPE in Zellkulturen konnte anhand der folgenden Zellveränderungen festgestellt werden: Synzytienbildung, Aggregation und Schrumpfung. Außerdem konnten eine Pyknose der Zellkerne, Zellnekrosen und Vakuolisierungen im Zytoplasma festgestellt werden. Diese Befunde konnten durch Färbung der infizierten Zellen mit Kristallviolett deutlicher sichtbar gemacht werden (Abbildung 6). Bei eindeutigem ZPE wurde der jeweilige IBV-Referenzstamm bzw. das Isolat in 96iger Mikrotiterplatten austitriert. Der Referenzstamm M41 erreichte nach vier Ei- und neun Zellkulturpassagen einen Titer von  $10^{5,6}$ /ml. Der Referenzstamm D274 wies nach drei Ei- und sieben Zellkulturpassagen einen Titer von  $10^{4,8}$ /ml auf. Nach vier Ei- und sechs Zellkulturpassagen hatte der Referenzstamm D1466 einen Titer von  $10^{5,1}$ /ml. Das Feldisolat 8838/84/9 besaß nach drei Ei- und sechs Zellkulturpassagen einen Titer von  $10^{4,7}$ /ml. Das Feldisolat 291/85/6 wies nach drei Ei- und sieben Zellkulturpassagen einen Titer von  $10^{4,5}$ /ml auf. Denselben Titer hatte das Feldisolat 684/80 nach jeweils vier Passagen im Ei bzw. auf Zellkultur. Das Feldisolat 390/1/84 erreichte nach drei Ei- und sechs Zellkulturpassagen einen Titer von  $10^{5,3}$ /ml. Dies ist unten nochmals übersichtlich in der Tabelle 30 dargestellt.

**Tabelle 29:** Adaptation der Referenzstämme M41, D274, D1466 und vier Feldisolate an Hühnerküken-Nierenzellen

Referenzstamm/ Isolat	Durchgeführte Eipassagen	ZKP	ZPE nach Stunden p.i.			
			24	48	72	96
M41	4	1.	-	-	-	-
		2.	-	-	-	-
		3.	-	-	-	-
		4.	-	-	-	-
		5.	-	-	-	-
		6.	-	-	-	-
		7.	-	-	-	-
		8.	-	-	+	+
		9.	-	+	+	+
D274	3	1.	-	-	-	-
		2.	-	-	-	-
		3.	-	-	-	-
		4.	-	-	-	-
		5.	-	-	-	-
		6.	-	-	-	+
		7.	-	+	+	+
D1466	4	1.	-	-	-	-
		2.	-	-	-	-
		3.	-	-	-	-
		4.	-	-	-	-
		5.	-	+	+	+
		6.	-	+	+	+
8838/84/9	3	1.	-	-	-	-
		2.	-	-	-	-
		3.	-	-	-	-
		4.	-	-	-	-
		5.	-	-	+	+
		6.	+	+	+	+
291/85/6	3	1.	-	-	-	-
		2.	-	-	-	-
		3.	-	-	-	-
		4.	-	-	-	-
		5.	-	-	-	-
		6.	-	+	+	+
		7.	-	+	+	+

ZKP = Zellkulturpassage  
 + = ZPE vorhanden  
 - = Zellrasen unverändert

Ein ZPE konnte erst nach mehreren Zellkulturpassagen mit vorausgegangenen Eipassagen beobachtet werden.

Fortsetzung der Tabelle 29

Referenzstamm/ Isolat	Durchgeführte Eipassagen	ZKP.	ZPE nach Stunden p.i.			
			24	48	72	96
<b>684/80</b>	<b>4</b>	<b>1.</b>	-	-	-	-
		<b>2.</b>	-	-	-	-
		<b>3.</b>	-	-	-	+
		<b>4.</b>	+	+	+	+
<b>390/1/84</b>	<b>3</b>	<b>1.</b>	-	-	-	-
		<b>2.</b>	-	-	-	-
		<b>3.</b>	-	-	-	-
		<b>4.</b>	-	-	-	-
		<b>5.</b>	-	-	+	+
		<b>6.</b>	-	+	+	+

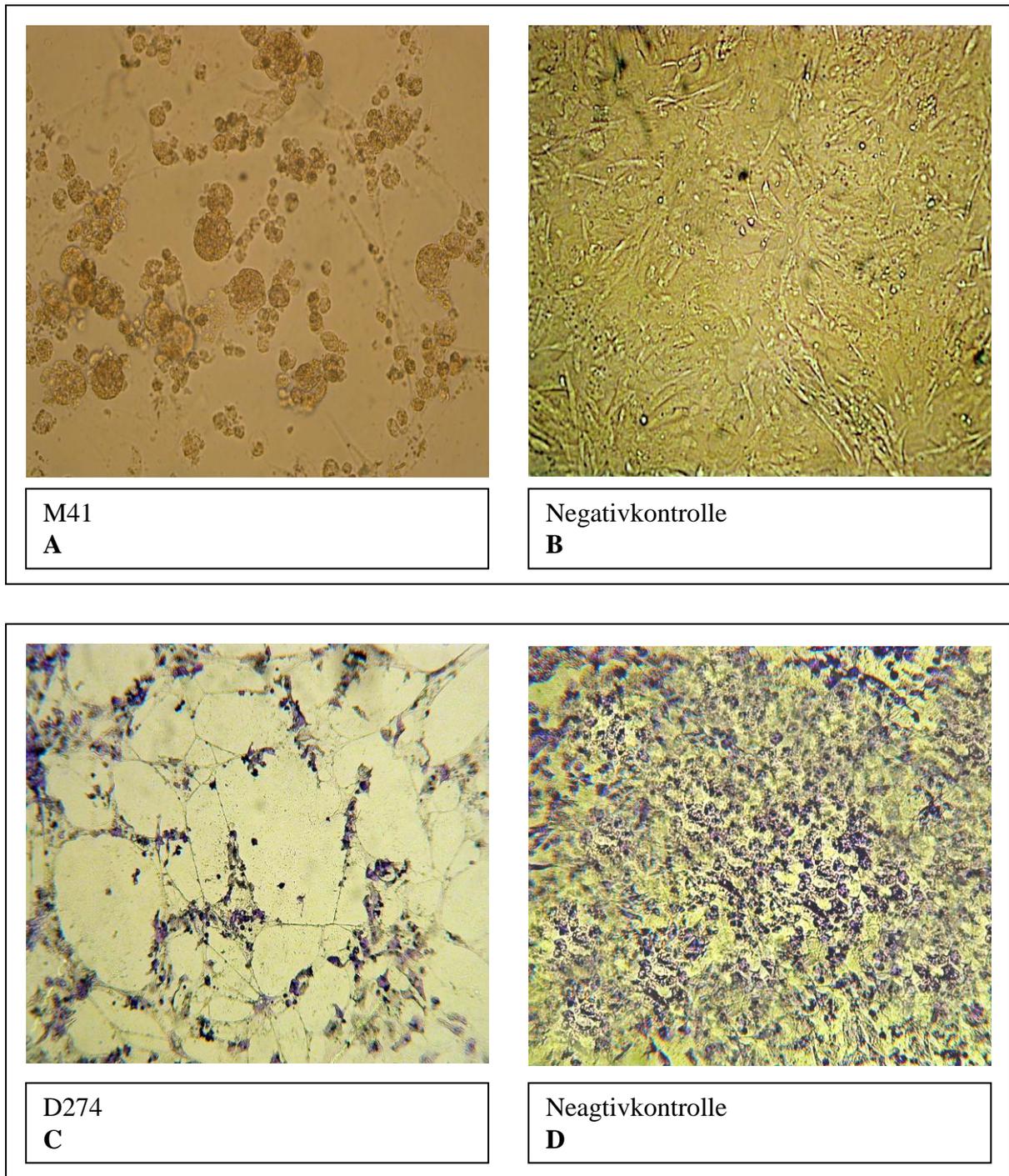
ZKP = Zellkulturpassage

+ = ZPE vorhanden

- = Zellrasen unverändert

**Tabelle 30:** KID<sub>50</sub>-Titer der Referenzstämme M41, D274, D1466 und vier Feldisolate nach mehreren Ei- und Zellkulturpassagen

Referenzstamm/ Isolat	Anzahl der Eipassagen	Anzahl der Zellkulturpassagen	KID <sub>50</sub> in log 10 /ml
<b>M41</b>	4	9	5,6
<b>D274</b>	3	7	4,8
<b>D1466</b>	4	6	5,1
<b>8838/84/9</b>	3	6	4,7
<b>291/85/6</b>	3	7	4,5
<b>684/80</b>	4	4	4,5
<b>390/1/84</b>	3	6	5,3



**Abbildung 6:** Durch IBV verursachter zytopathischer Effekt in HKNZ-Kulturen.

A: Mit Referenzstamm M41 infizierte Zellkultur. Zellen haben sich abgekugelt, Zellkontakte sind aufgelöst.

B: Negativkontrolle: geschlossener Zellteppich mit langgestreckten HKNZ und epitheloiden Fibroblasten.

C: Mit Referenzstamm D274 infizierte Zellkultur; nach Färbung mit Kristallviolett. Schrumpfung, Abkuglung und Ablösung der HKNZ.

D: Negativkontrolle nach Formolfixierung und Färbung mit Kristallviolett. Zellrasen homogener, Zellschrumpfung durch Fixation.

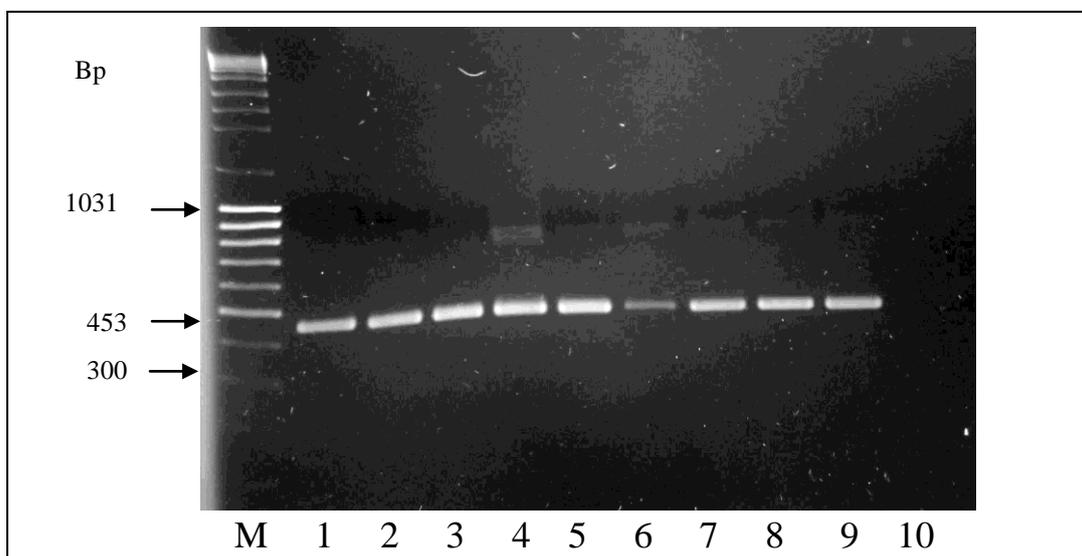
### 4.3. Hämagglutinationstest

Für diesen Test wurden alle in der Tabelle 7 aufgeführten neun Referenzvirusstämme (IBV-Impfstoffstämme) und alle in der Tabelle 5 aufgelisteten Isolate (lfd. Nr. 1-24) in Form von nativer Allantoisflüssigkeit verwendet. Nach jeweils 30-, 60- und 90-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaligem Ablesen der Platten, wurde für alle verwendeten 24 Isolate und neun Referenzvirusstämme ein unspezifischer Hämagglutinationstiter von  $\log_2 \leq 2$  HA-Einheiten festgestellt, d.h. es konnte wie erwartet kein hämagglutinierendes Virus festgestellt werden.

### 4.4. Nachweis des IBV mittels N-Gen-Amplifizierung

#### 4.4.1. Nachweis des IBV mittels konventioneller RT-PCR

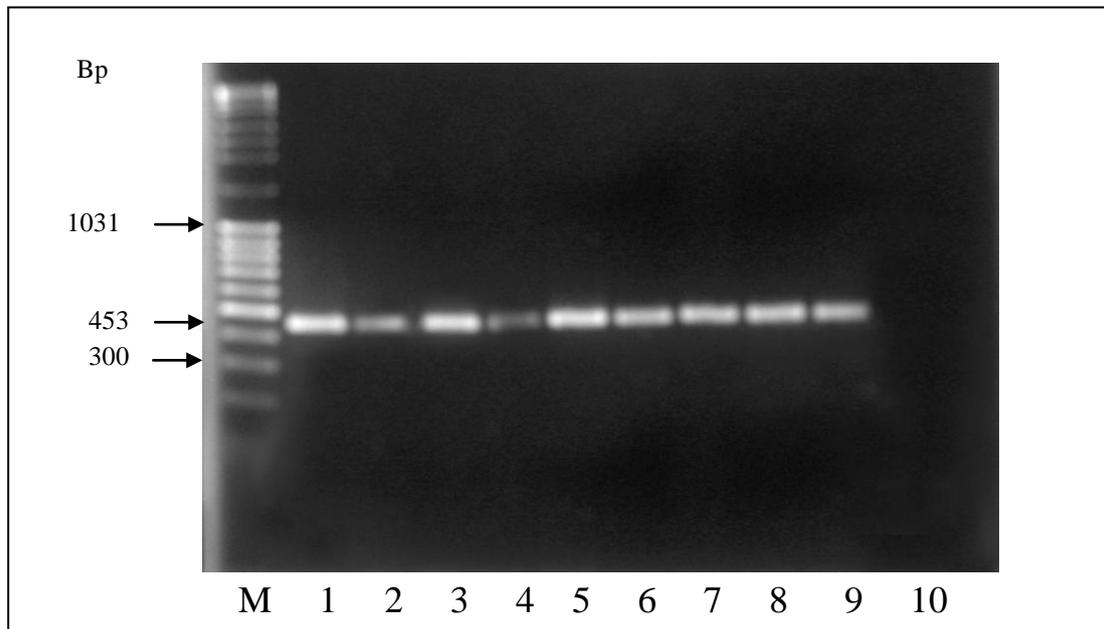
Die Amplifizierung des N-Gen-Abschnitts des IBV mit der unter 3.2.7.2.1 beschriebenen Methode ergab für alle in der Tabelle 5 aufgeführten Feldisolate (n=24) und Tabelle 7 aufgeführten Referenzvirusstämme und IB-Impfvirusstämme nach gelelektrophoretischer Auswertung ein einheitliches Amplifikat mit der erwarteten Größe von 453 bp (Abbildung 7 und 8 sowie Anhang 1). Damit konnte für alle Isolate das N-Gen nachgewiesen und sie als IBV identifiziert werden.



**Abbildung 7:** Amplifikate mit einer erwarteten Größe (453 bp) des N-Gens der untersuchten IB-Lebendimpfviren.

M = DNA Ladder 1 = TAD IB vac H120; 2 = TAD IB vac H52; 3 = Nobilis IB H120; 4 = Nobilis IB H52; 5 = Nobilis IB D274; 6 = Nobilis IB D1466; 7 = Nobilis IB 4/91; 8 = Nobilis MA5; 9 = Gallivac IB-88; 10 = Negativkontrolle

Die hinsichtlich N-Gen-Abschnitt positiven Feldisolate (n = 24) wurden mittels S1-RT-PCR und Restriktionsenzymanalyse bzw. genotypspezifische Äußere-RT und Nested-Multiplex-PCR weiter genotypisiert.



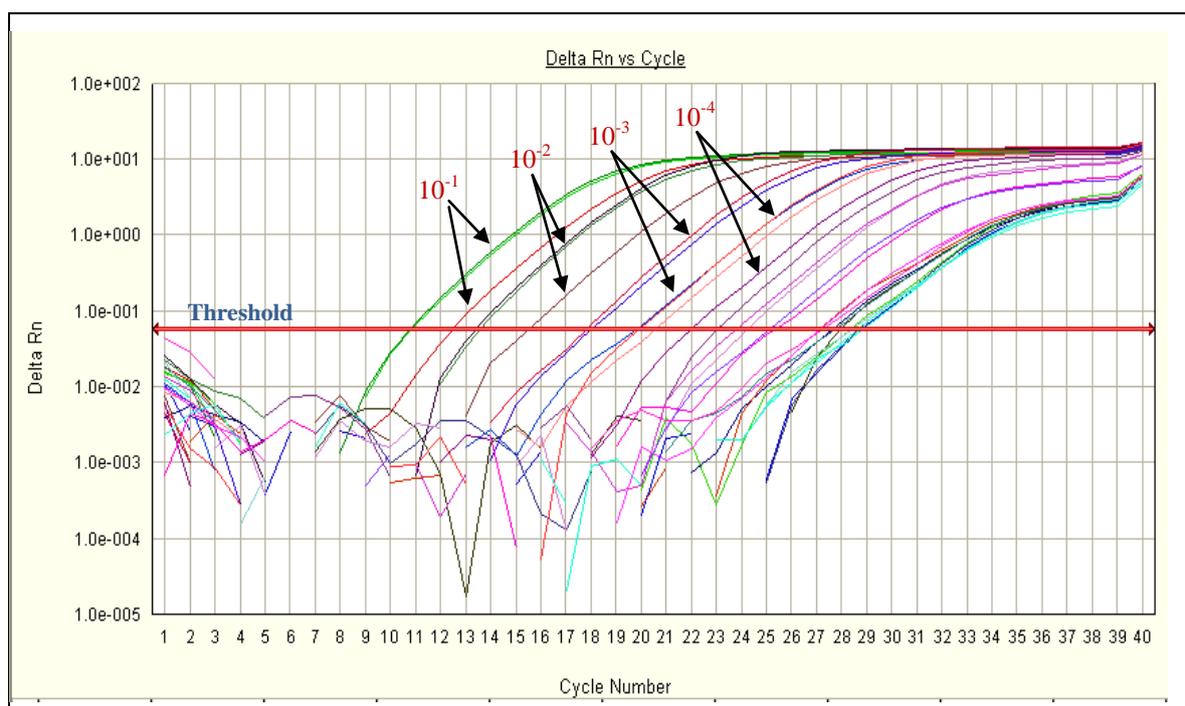
**Abbildung 8:** Amplifikate mit einer erwarteten Größe (453 bp) des N-Gens der untersuchten Feldisolate.

M = DNA Ladder 1 = 8838/84/9; 2 = 291/85/6; 3 = 684/80; 4 = 390/1/84; 5 = 225/81; 6 = 502/80; 7 = 1051/80; 8 = 603/79; 9 = Positivkontrolle TAD IB vac H52; 10 = Negativkontrolle

#### 4.4.2 Nachweis des IBV mittels „one step“ Real Time RT-PCR

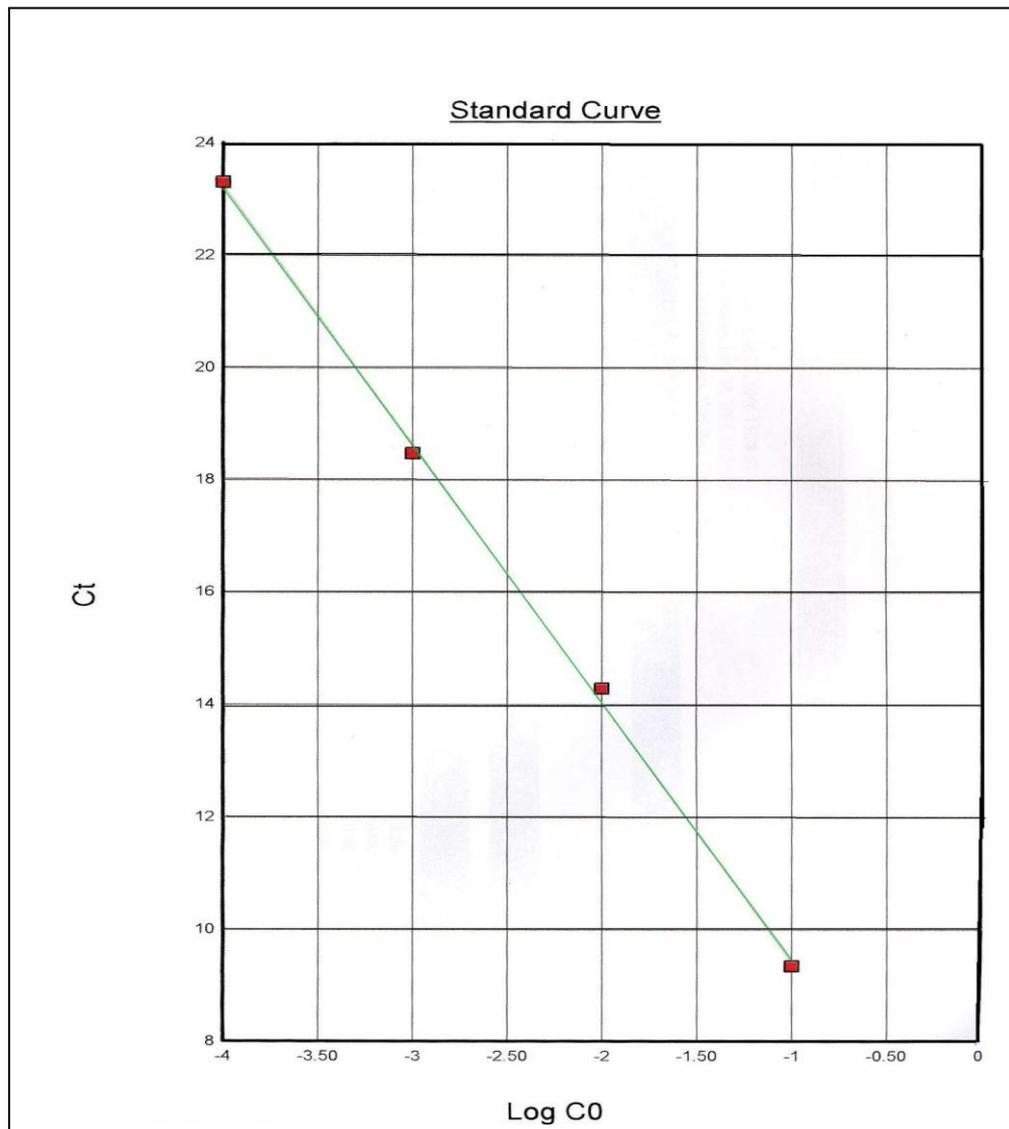
Alle in der Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführten 82 Feldisolate konnten mittels „one step“ Real Time RT-PCR als IBV-positiv bewertet werden. Eine Übersicht über diese Ergebnisse befindet sich außerdem in den Anhängen 2 und 3.

Abbildung 9 zeigt die Amplifikationssignale des Real-Time PCR-Verfahrens unter Berücksichtigung des Ziel-Gens „N“ (Nukleokapsid) zum Nachweis des IBV. Im Falle einer positiven Reaktion ergab sich in der Real Time RT-PCR eine deutlich gestufte, vom Virusisolat-abhängige Reaktion (Ct-Werte).



**Abbildung 9:** Darstellung des Amplifikationsplots der Real Time RT-PCR unter Berücksichtigung des Zielgens „N“ zum Nachweis des IBV (doppelter Einsatz von dekadischen Verdünnungsreihen des Feldisolats „IB526“ (Verdünnungsreihen  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ) sowie ein Einsatz des Referenzstamms H120 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ )).

Abbildung 10 zeigt die Standardkurve der Verdünnungsreihe beispielhaft für den Referenzstamm H120. Die Standardkurve gibt die logarithmische Konzentration der isolierten DNA bzw. RNA des IBV in den jeweiligen Verdünnungsstufen an. Die Steigung der Geraden beträgt -4,6 und der Korrelationskoeffizient liegt bei  $> 0,99$ . Damit erwies sich die Verdünnungsreihe für den Nachweis des IBV als geeignet.



**Abbildung 10:** Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des Referenzstammes H120 (Verdünnungsstufen  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$ ).

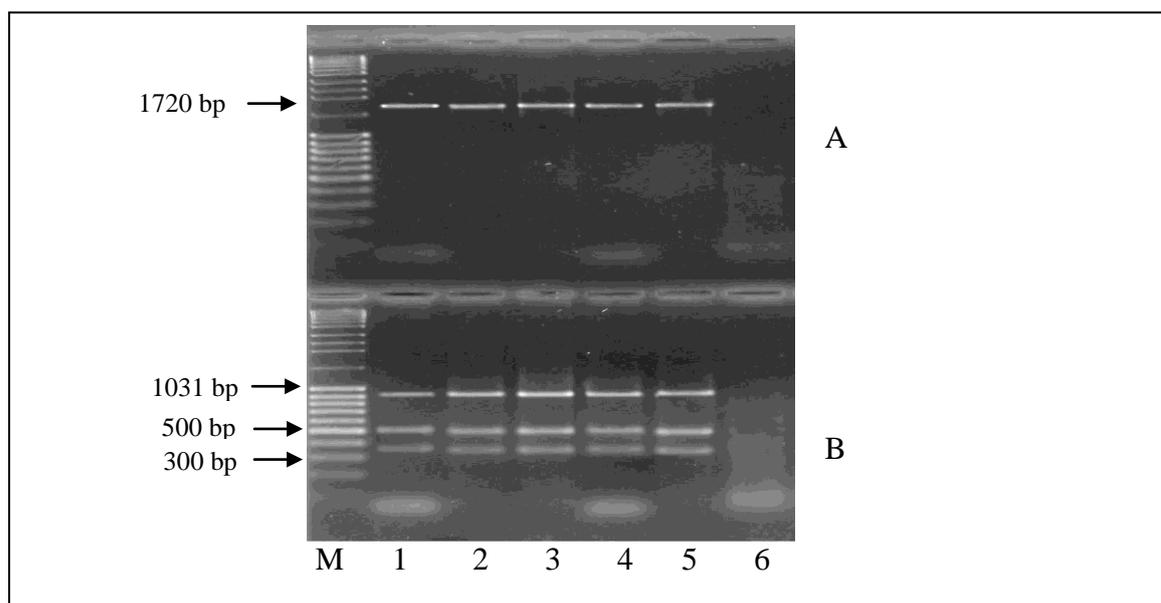
Alle ( $n = 82$ ) durch konventionelle N-Gen RT-PCR und Real Time RT-PCR als positiv detektierten Isolate wurden bei den weiteren Untersuchungen zur Genotypisierung verwendet.

## 4.5 Genotypisierung des IBV

### 4.5.1 Amplifizierung des gesamten S1-Gens des IBV und Restriktionsenzymanalyse

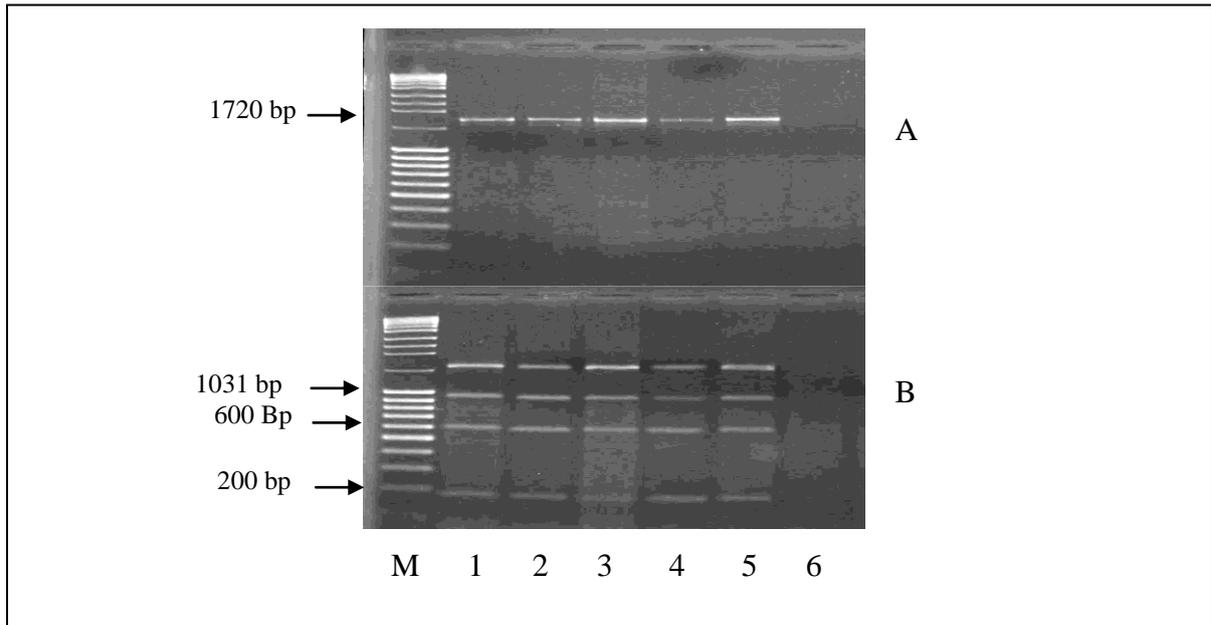
Hier wurden alle Isolate (n = 24), die in der konventionellen N-Gen-RT-PCR positiv waren, für die Amplifizierung des gesamten S1-Gens verwendet. Neun von 24 untersuchten Isolaten ergaben mit der in 3.2.7.3.1.1 beschriebenen Methode in der S1-Gen-RT-PCR nach gelelektrophoretischer Auswertung ein Amplifikat mit der erwarteten einheitlichen Größe von 1.720 Basenpaaren. Bei 15 Isolaten wurde keine Amplifizierung erreicht.

Die bei der S1-Gen RT-PCR positiv reagierenden Isolate (n = 9) wurden mit der unter 3.2.7.3.1.2 beschriebenen Methode mit den Restriktionsenzymen *HaeIII*, *XcmI* und *BstYI* verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Den Ergebnissen zufolge weisen alle neun Isolate (8838/84/9, 189/83-2, 684/80, 1051/80, 55/80; 630/80, 465/80, 816/80-1 und 345/81) das typische Restriktionsmuster des IB-Referenzstamms Massachusetts auf. Die Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen typische Fragmentmuster des Referenzstamms Massachusetts und von vier weiteren Feldisolaten nach deren Verdauung mit den Restriktionsenzymen *HaeIII*, *XcmI* und *BstYI*.



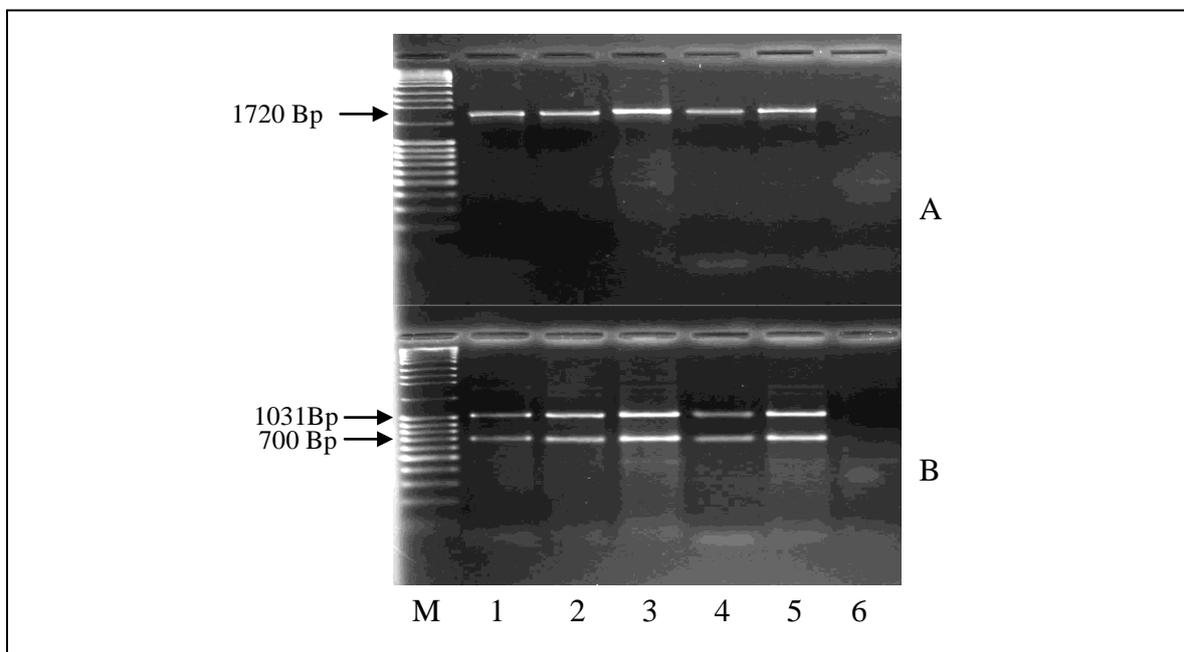
**Abbildung 11:** Amplifikate des S1-Gens in erwarteter Größe (1.720 bp) auf Elektrophoresegel A und deren Verdauung mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* auf Elektrophoresegel B.

M = 100 bp DNA Ladder 1 = 8838/84/9; 2 = 684/80; 3 = 55/80; 4 = 465/80;  
5 = Positivkontrolle M41; 6 = Negativkontrolle



**Abbildung 12:** Amplifikate des S1-Gens in erwarteter Größe (1.720 bp) auf Elektrophoresegel A und deren Verdauung mit dem Restriktionsenzym *XcmI* auf Elektrophoresegel B.

M = 100 bp DNA Ladder 1 = 8838/84/9; 2 = 684/80; 3 = 55/80; 4 = 465/80; 5 = Positivkontrolle M41; 6 = Negativkontrolle



**Abbildung 13:** Amplifikate des S1-Gens in erwarteter Größe (1.720 bp.) auf Elektrophoresegel A und deren Verdauung mit dem Restriktionsenzym *BstYI* auf Elektrophoresegel B.

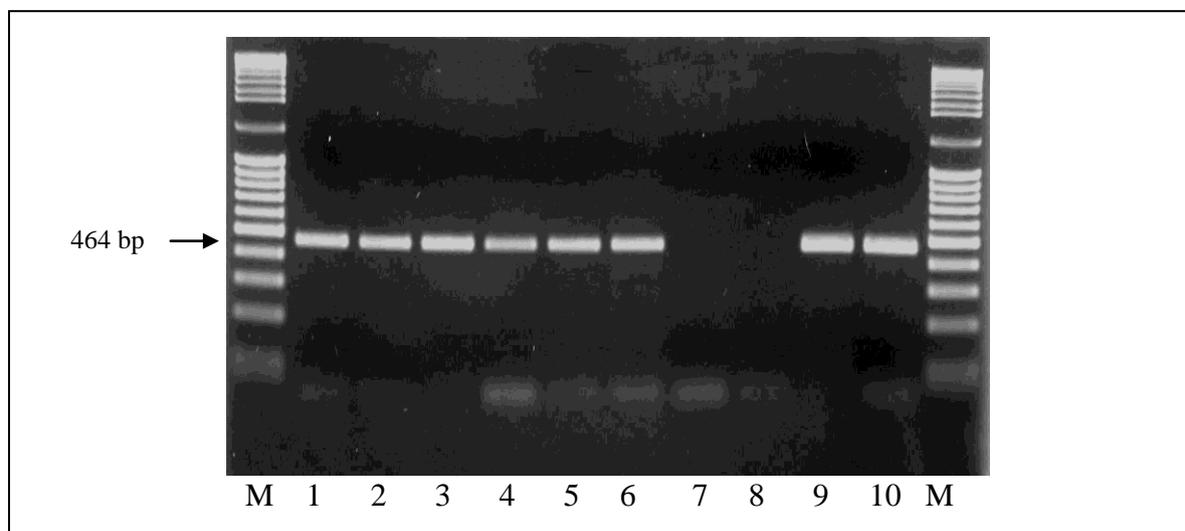
M = 100 bp DNA Ladder 1 = 8838/84/9; 2 = 684/80; 3 = 55/80; 4 = 465/80; 5 = Positivkontrolle M41; 6 = Negativkontrolle

## 4.5.2 Genotypspezifische RT- und Nested-Multiplex-PCR

### 4.5.2.1 Genotypspezifische RT- und Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen

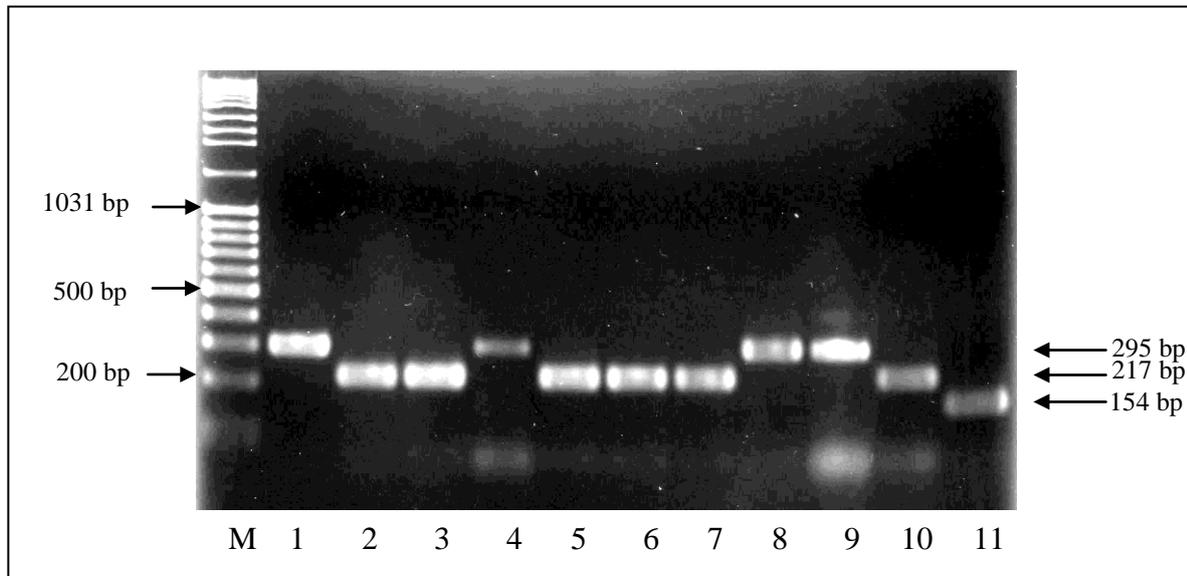
#### Nachweis von Massachusetts, D274 und 793B

Hier wurden alle Isolate (n = 24), die zuvor mittels konventioneller N-Gen-RT-PCR als IBV-positiv nachgewiesen wurden, mit der genotypspezifischen RT-PCR genotypisiert. Als erstes wurde hier eine RT-PCR mit Hilfe der Primer XCE2 (-) und XCE1 (+), die für alle drei Genotypen Massachusetts, D274 und 793B gemeinsam sind, durchgeführt. Das dadurch erhaltene Amplifikat war für alle drei genannten Genotypen 464 Basenpaare groß (Abbildung 14). Es wurde als Ausgangsmaterial für die Nested-Multiplex-PCR, die eine weitere Genotypisierung ermöglicht, weiterverwendet. Die erwarteten Amplifikatgrößen für die jeweiligen Genotypen aus der Nested-Multiplex-PCR waren für den Genotyp 793B 154 bp, für den Genotyp D274 217 bp und für den Genotyp Massachusetts 295 bp (Abbildung 15). Von 24 untersuchten Isolaten wurden sechs Isolate als Genotyp Massachusetts und 13 Isolate als Genotyp D274 identifiziert. Drei Isolate erwiesen sich als Massachusetts-D274 Mischkulturen. Der Genotyp 793B konnte gar nicht festgestellt werden (Abbildung 18, Anhang 1).



**Abbildung 14:** Amplifikate in erwarteter Größe (464 bp) für Genotypen Massachusetts, D274 und 793B.

M = 100 bp DNA Ladder; 1 = TAD IB vac I H120; 2 = Nobilis IB H120; 3 = TAD IB vac II H52; 4 = Nobilis IB H52; 5 = Nobilis MA5; 6 = Nobilis IB D274; 7 = Nobilis IB D1466; 8 = Negativkontrolle; 9 = Nobilis IB 4/91; 10 = Gallivac IB-88



**Abbildung 15:** Amplifikate in der Nested-Multiplex-PCR in erwarteten Größen für die Genotypen Massachusetts, D274 und 793B.

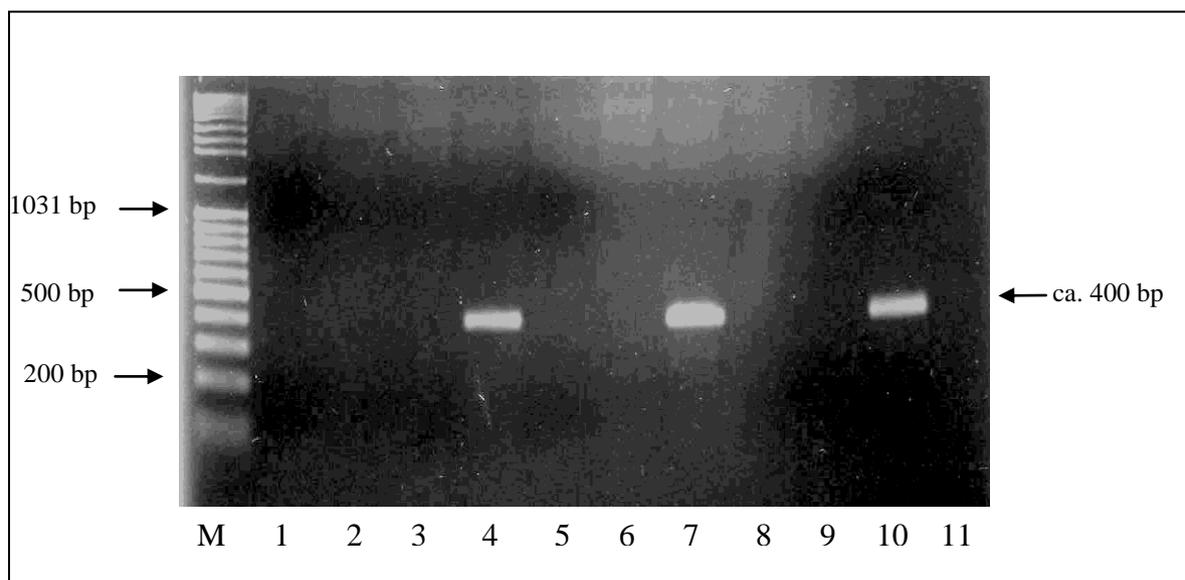
M = 100 bp 1 = 684/80; 2 = 313/78; 3 = U83-3; 4 = 1051/80; 5 = 185/88-1; 6 = 653/80; 7 = 390/1/84; 8 = 55/80; 9 = Positivkontrolle, Massachusetts; 10 = Positivkontrolle D274; 11 = Positivkontrolle 793B\*

\*793B ist identisch mit Gallivac IB-88 und Nobilis IB 4/91.

Von den in der Tabelle 5 aufgeführten IBV-Impfvirusstämmen erwiesen sich TAD IB vac I H120, Nobilis IB H120, TAD IB vac II H52, Nobilis IB H52 und Nobilis MA5 erwartungsgemäß als Genotyp Massachusetts, Nobilis IB D274 als Genotyp D274, Nobilis IB 4/91 und Gallivac IB-88 als Genotyp 793B.

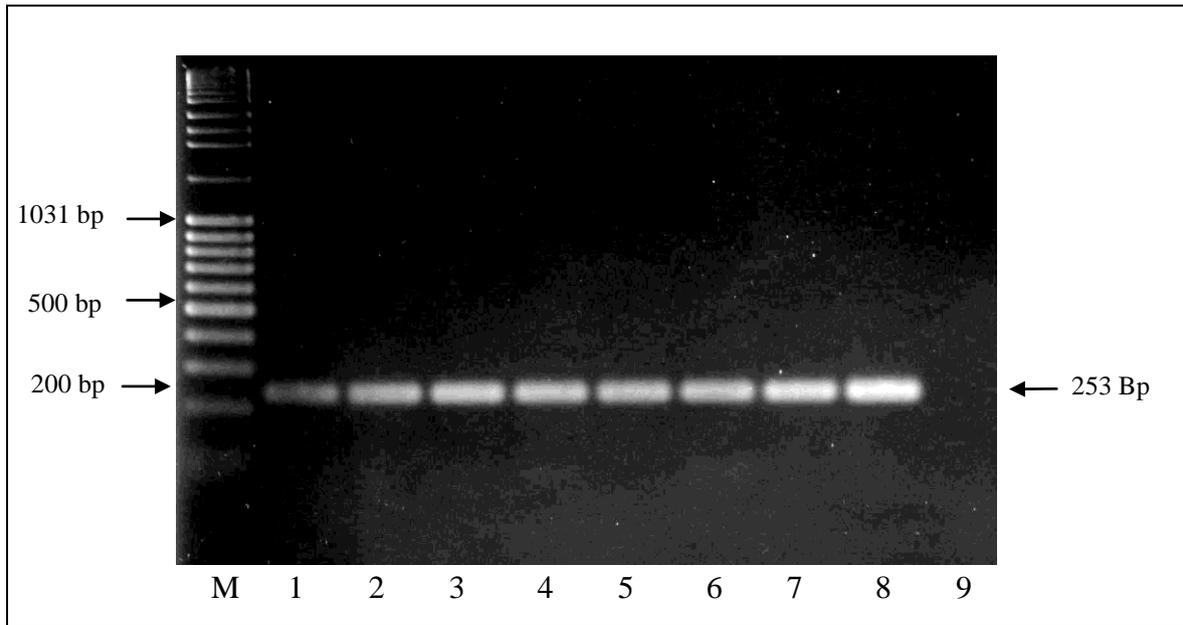
#### 4.5.2.2 Genotypspezifische Äußere-RT-PCR und Innere-RT-PCR zum Nachweis vom Genotyp D1466

Um den Genotyp D1466 nachzuweisen, wurden hier alle Isolate (n = 24), die mittels konventioneller N-Gen-RT-PCR als positiv ermittelt worden waren, in zwei Schritten untersucht. Als erstes wurde hier mit den Primern D2 (-) und D1 (+) eine Äußere-RT-PCR durchgeführt (Abbildung 16). Die durch diese RT-PCR erhaltenen Amplifikate wurden mit den Primern D4 (-) und D3 (+) weiter für die Innere-RT-PCR zum Nachweis des Genotyps D1466, verwendet (Abbildung 17). Von 24 untersuchten Isolaten wurden lediglich zwei Isolate als Genotyp D1466 identifiziert (Abbildung 18).

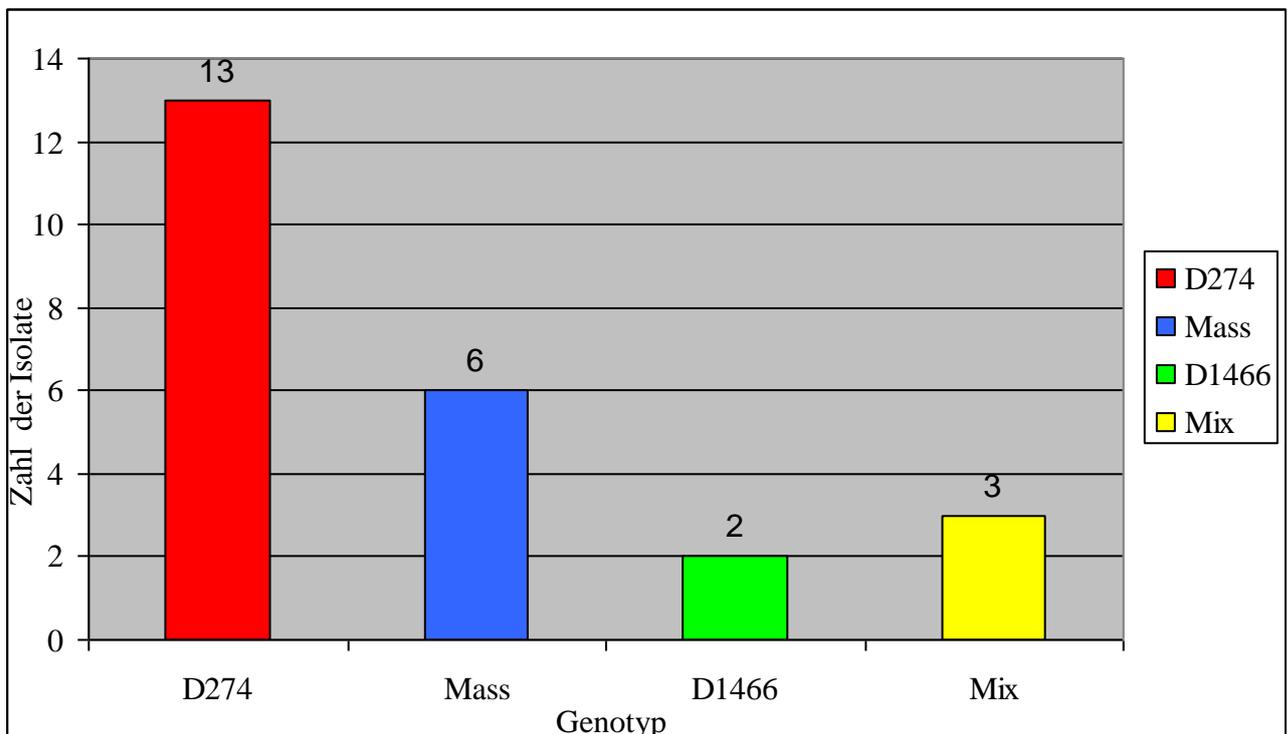


**Abbildung 16:** Erwartete Amplifikate der Äußeren-RT-PCR zum Nachweis des Genotyps D1466.

M = 100 bp DNA Ladder; 1 = 684/80; 2 = 313/78; 3 = Nobilis IB D274; 4 = 6112/83; 5 = 630/80; 6 = 185/88-1; 7 = 291/85/6; 8 = 293/80; 9 = 603/79; 10 = Positivkontrolle Nobilis IB D1466; 11 = Negativkontrolle



**Abbildung 17:** Erwartete Amplifikate der Inneren-RT-PCR zum Nachweis des Genotyps D1466.  
 M = 100 bp 1 = 291/85/6; 2 = 291/85/6; 3 = 6112/3; 4 = 6112/3 5 = D212; 6 = D212 7 = Nobilis IB D1466; 8 = Nobilis IB D1466; 9 = Negativkontrolle  
 D212 ist identisch mit D1466



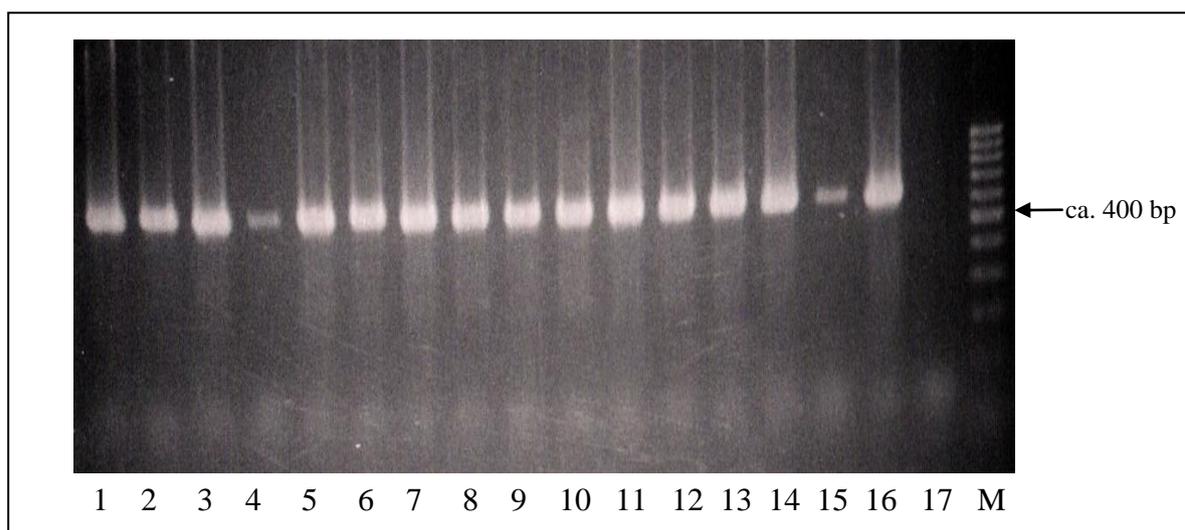
**Abbildung 18:** Gesamtüberblick über die Genotypen, die mit der konventionellen N-Gen-RT-PCR und Real Time RT-PCR als IBV-positiv festgestellt werden konnten (Lfd. Num. 1-24, Tabelle 5).

Bei Mix-Isolaten handelte es sich um drei Massachusetts/D274 Mischkulturen.

#### 4.5.2.3 Genotypspezifische Äußere-RT-PCR und Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274, D1466, 793B und Italy 02

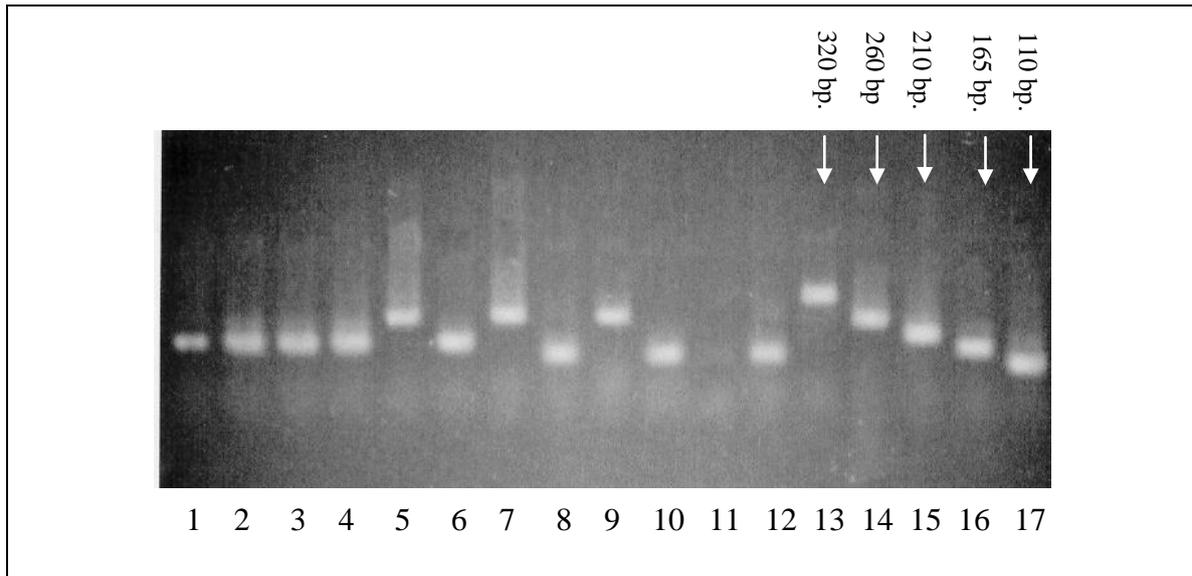
Zu diesem Nachweis wurden alle Isolate (n = 82), die in der N-Gen Real Time RT-PCR als IBV-positiv identifiziert worden waren, in der genotypspezifischen Äußeren-RT-PCR und Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274, D1466, 793B und Italy 02 untersucht. Zu Beginn wurde eine Äußere-RT-PCR mit Hilfe der Primer X3 (-) und X1 (1), die für die genannten Genotypen gemeinsam ist, durchgeführt (Abbildung 19). Die erhaltenen Amplifikate wurden als Ausgangsmaterial in der Nested-Multiplex-PCR, die eine weitere Genotypisierung ermöglicht, verwendet (Abbildung 20).

Die erwarteten Bandengrößen waren für Italy 02 320 bp, für Massachusetts 260 bp, für D1466 212 bp, für D274 165 bp und für 793B 120 bp. 76 von 82 untersuchten Isolaten konnten wie folgt genotypisiert werden: 24 Isolate wurden als Massachusetts, 25 Isolate als D274, 14 Isolate als 793B sechs als D1466 und ein Isolat als Italy 02 identifiziert. Sechs Isolate erwiesen sich als Mischkulturen (Abbildung 21). Bei weiteren sechs Isolaten konnte keine Amplifizierung erreicht werden. Dadurch war eine Differenzierung durch die genotypspezifische Nested-Multiplex-PCR nicht möglich. Diese Isolate wurden in dem Abschnitt 4.6 genannten Primern amplifiziert und anschließend sequenziert. Eine detaillierte Übersicht der Ergebnisse befindet sich in den Anhängen 2 und 3.



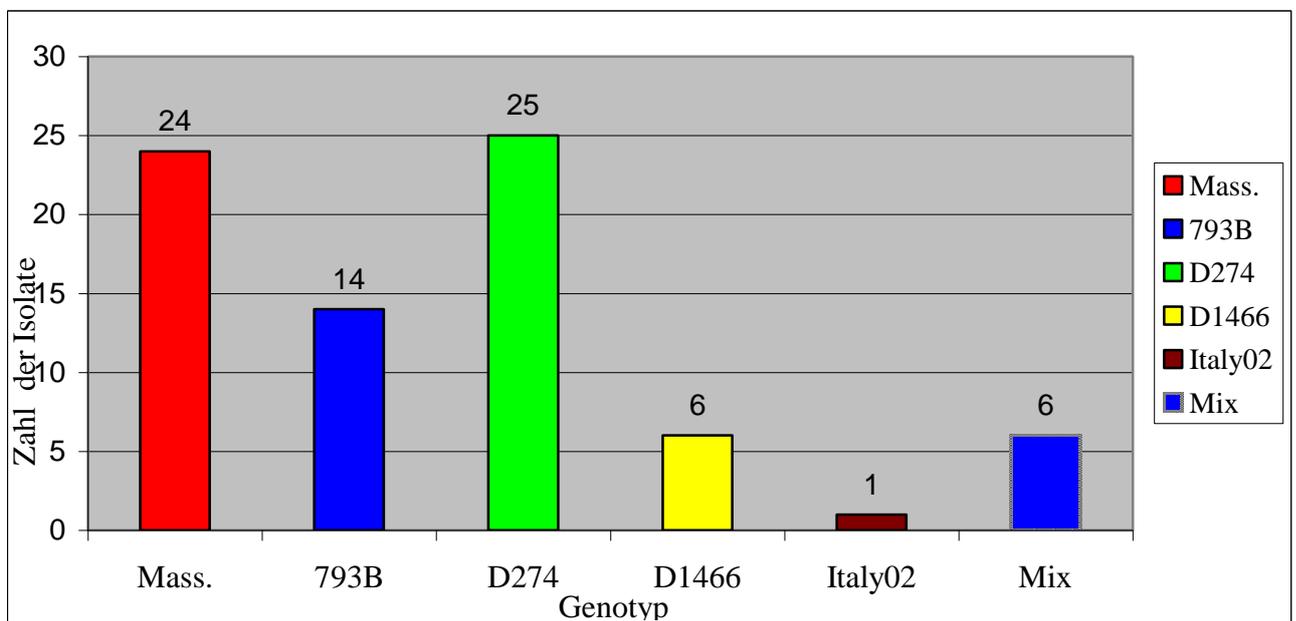
**Abbildung 19:** Erwartete Amplifikate der Äußeren-RT-PCR.

1 = IB279; 2 = IB281; 3 = 283; 4 = IB289; 5 = 291; 6 = IB297; 7 = IB298; 8 = IB303; 9 = IB312; 10 = IB320; 11 = IB326; 12 = IB327; 13 = IB331 14 = IB358; 15 = IB364; 16 = Positivkontrolle, Massachusetts; 17 = Negativkontrolle; M = 100 bp DNA Ladder



**Abbildung 20:** Amplifikate für Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Italy 02, Massachusetts, D1466, D274 und 793B.

1 = IB303; 2 = IB312; 3 = IB320 4 = IB326; 5 = IB327; 6 = IB331; 7 = IB358; 8 = IB364; 9 = IB386; 10 = IB 404; 11 = IB444; 12 = 544; 13 = Positivkontrolle, Italy 02; 14 = Positivkontrolle, Massachusetts; 15 = Positivkontrolle, D1466; 16 = Positivkontrolle D274; 17 = Positivkontrolle, 793B



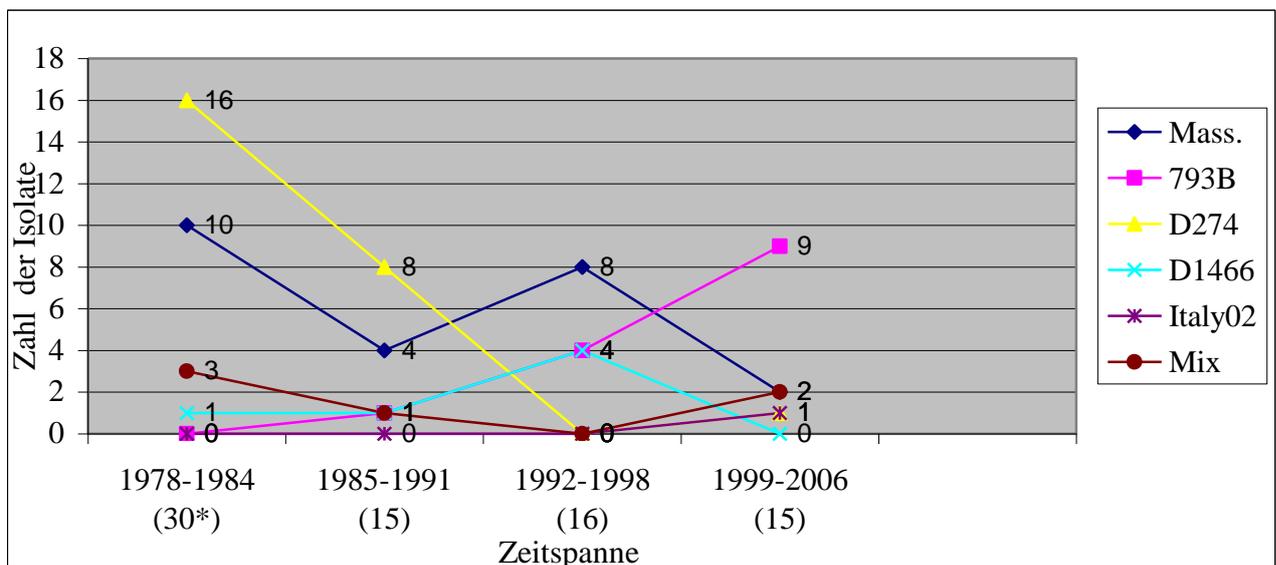
**Abbildung 21:** Verteilung der nachgewiesenen IBV-Genotypen nach Nested-Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis bzw. zur Differenzierung Italy 02, Massachusetts, D1466, D274 und 793B.

Bei 6 Mix-Isolaten handelte es sich um vier Isolate Massachusetts/D274, ein Isolat aus Massachusetts/793B und ein Isolat aus Italy 02/793B Mischkulturen.

Die Abbildung 22 zeigt das Vorkommen der in dieser Arbeit durch genotypspezifische Nested-Multiplex-PCR identifizierten IBV-Genotypen in der Zeit von 1978 bis 2006. Es wurden zwischen 1978 und 1984 30 Isolate isoliert. Von 30 untersuchten Isolaten konnten 16 Isolate als D274, zehn Isolate als Massachusetts, ein Isolat als D1466 und drei Isolate als Mischkultur identifiziert werden. Zu dieser Zeit konnte kein Isolat als 793B bzw. Italy 02 differenziert werden. Von 15 Isolaten, die zwischen 1985 und 1991 isoliert worden sind, konnten acht Isolate als D274, vier Isolate Massachusetts, ein Isolat D1466, ein Isolat 793B bzw. 4/91 und ein Isolat als Mischkultur identifiziert werden.

Von 16 zur Zeit zwischen 1992-1998 gehörenden Isolaten konnten acht Isolate als Massachusetts, vier Isolate als 793B bzw. 4/91 und vier Isolate als D1466 identifiziert werden. Zu der Zeit konnte kein Isolat als D274 bzw. als Italy 02 differenziert werden.

Zur Zeit zwischen 1999-2006 wurden von 15 Isolaten neun Isolate als 793B bzw. 4/91, zwei Isolate als Massachusetts, zwei Isolate als Mischkultur, ein Isolat als D274 und ein Isolat als Italy 02 identifiziert werden.



**Abbildung 22:** Vorkommen von durch Nested-Multiplex-PCR identifizierte 76 IBV-Genotypen in der Zeit von 1978 bis 2006.

\* = Anzahl der Isolate

## 4.6 Sequenzierung

Die Isolate IB291, IB764, IB787 wurden mit dem Primerpaar S1uni (-) und XCE1 (+) und die Isolate IB444, IB719 und EK313/06 wurden mit dem Primerpaar XCE3 (-) und XCE1 (+) mit der im Abschnitt 3.2.7.3.4 beschriebenen Methode amplifiziert. Anschließend wurden die Isolate mit Hilfe des Kits „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers gereinigt und zur Sequenzierung zur Firma MWG-Biotech AG in München gesendet. Nach Erhalt der Gensequenzen wurden sie in der Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) mit Gensequenzen anderer Isolate verglichen und mit dem Sequenzvergleichsprogramm „MegAlign 5.0, DNASTar Inc.“ untersucht.

### **IB291** aus dem Jahr 1983

Das Isolat IB291 besaß die höchste Homologie (91 %) mit dem nephropathogenem Stamm IS/885 mit Accessionsnummer AY279533.1 (Abbildung 23).

### **IB764** aus dem Jahr 2004

Das Isolat IB764 zeigte 100 % Homologie mit folgenden Isolaten: FR/L-1450L/05 (QX-IBV) unter Accessionsnummer EF079117.1 (Abbildung 24), FR/L-1450T/05 unter Accessionsnummer EF079118.1, NL/L-1449T/04 unter Accessionsnummer EF079116.1 und L-1148 unter Accessionsnummer DQ431119.1. Alle genannten Isolate gelten als QX-IBV.

### **IB787** aus dem Jahr 2004

Das Isolat IB787 zeigte mit den folgenden Isolaten 100 % Homologie: AZ-40/05 unter Accessionsnummer EF186233.1 (Abbildung 25), FR/L-1450L/05 unter Accessionsnummer EF079117.1, FR/L-1450T/05 mit Accessionsnummer EF079118.1, NL/L-1449T/04 unter Accessionsnummer EF079116.1, NL/L-1449K/04 unter Accessionsnummer EF079115.1, QX(D388) unter Accessionsnummer DQ674739.1, L-1148 unter Accessionsnummer DQ431119. Auch diese genannten Isolate gelten als QX-IBV.

### **IB444** aus dem Jahr 1996

Dieses Isolat hatte die höchste Homologie mit dem nephropathogenen Stamm Belgian B1648 mit Accessionsnummer X87238.1, sie betrug 97 % (Abbildung 26).

**IB719** aus dem Jahr 2002

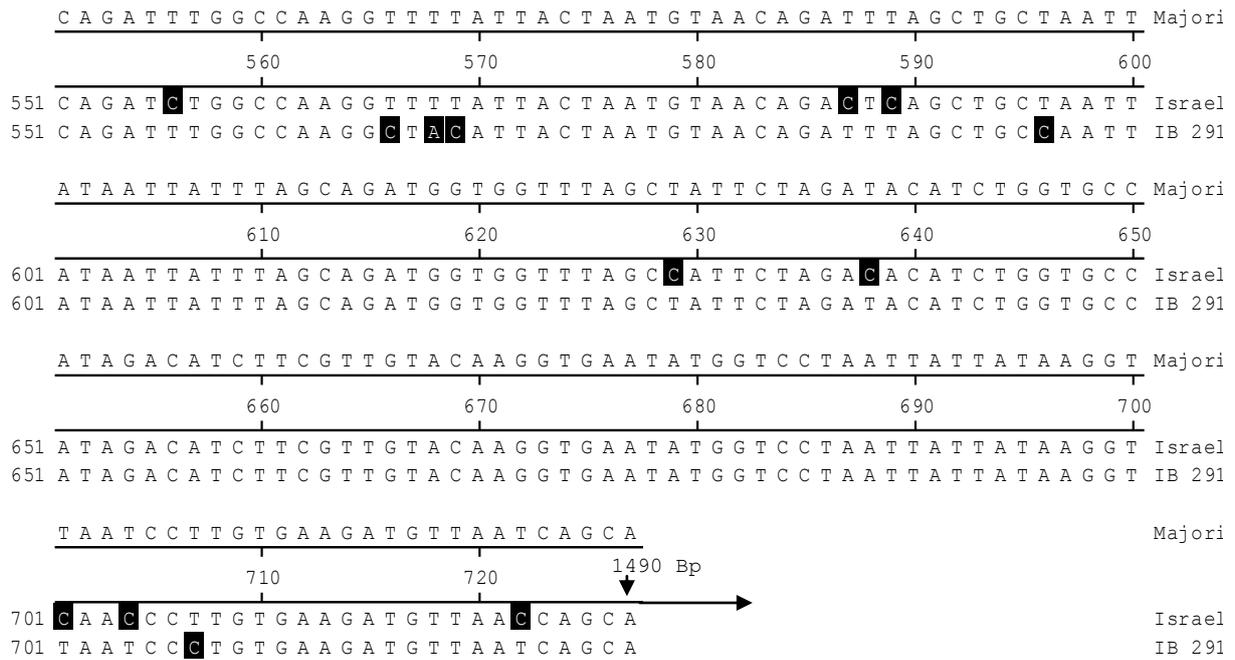
Das IB719 zeigte die höchste Homologie mit dem Isolat FR-94047-94 (Serotyp 793B) unter Accessionsnummer AJ618987 mit 99 % (Abbildung 27).

**EK313/06** aus dem Jahr 2006

Dieses Isolat wies die höchste Homologie innerhalb des S1-Gens mit dem IBV-Isolat PA/1220/98 (Accessionsnummer AY789942) auf. Der maximale Similaritätswert betrug 83 % (Abbildung 28).

**IB291 aus dem Jahr 1983**

	T T G T T G T T T A T C G T G A A A G T A G T T T T A A T A C T A C T T T G G T T T T A A C T A A T	Majori
	10 20 30 40 50	
1	T T G T T G T G T A T A T C G T G A A A A T A G T T T T A A T A C T A C C C T G G T T T T A A A T A A T	Israel
1	T T A T T G T T T A T C G T G A A A G T A G T G T T A A C A C T A C T T T G G A G T T A A C T A A T	IB 291
	T T C A C T T T T T C T A A T G T A A G T A A T G C T C C T C C T A A T G T T G G T G G T G T T C A	Majori
	60 70 80 90 100	
51	T T C A C G T T T T A T A A T G A A A G T A A T G C C C T C C T A A T G T T G G T G G T G T T A A	Israel
51	T T C A C T T T T T C T A A T G T A A G T A A T G C T A C C C T A A C A C A G G G G G T G T C C A	IB 291
	G A C T A T T C A T T T T T A T C A A A C A C A T A C A G C T C A G A G T G G T T A T T A T A A T T	Majori
	110 120 130 140 150	
101	C A C T A T T A A T C T T T A T C A A A C A C A T A C A G C T C A G A G T G G T T A T T A T A A T T	Israel
101	G A C C A T A C A A T T A T A T C A A A C A C A C A C A G C T C A G A G T G G T T A T T A T A A T T	IB 291
	A T A A T T T A T C A T T C C T G A G T G G T T T T G T G T A T A A A G C T T C T G A T T T T A T G	Majori
	160 170 180 190 200	
151	A T A A T T T A T C A T T C C T G A G T G G T T T T G T G T A T A A A G C T T C T G A T T T T A T G	Israel
151	A T A A T T T A T C A T T C C T G A G T A G T T T T G T G T A T A A A G A G T C T A A T T T T A T G	IB 291
	T A T G G A T C T T A T C A C C C A A A G T G T G G T T T T A G A C C G G A A A C T C T T A A T A A	Majori
	210 220 230 240 250	
201	T A T G G A T C T T A T C A C C C A A A G T G T G A T T T T A G A C C G G A A A C T A T T A A T A A	Israel
201	T A T G G A T C T T A T C A C C C A A A A T G T A G T T T T A G A C C G G A A A C T C T T A A T A A	IB 291
	T G G T T T G T G G T T T A A T T C T T T A T C T G T T T C T C T A G C T T A T G G G C C G C T A C	Majori
	260 270 280 290 300	
251	T G G T T T G T G G T T T A A T T C T C T A T C T G T T T C A C T A G C C T A T G G G C C G C T A C	Israel
251	T G G C T T G T G G T T T A A C T C C T T A T C T G T C T C T C T A G C T T A C G G G C C G C T A C	IB 291
	C A G G T G G T T G T A A G C A G T C T G T C T T T A G T A A T A G G G C A A C G T G T T G T T A T	Majori
	310 320 330 340 350	
301	C A G G T G G T T G T A A G C A G T C T G T C T T T A A T A A T A G G G C A A C G T G T T G T T A T	Israel
301	A A G G T G G T T G T A A G C A G T C T G T C T T T A G T A A T A G G G C A A C G T G T T G T T A T	IB 291
	G C T T A T T C A T A C A A T G G T C C C C G T T T G T G T A A A G G T G T T T A T G C T G G T G A	Majori
	360 370 380 390 400	
351	G C T T A T T C A T A C A A T G G T C C C C G T T T G T G T A A A G G T G T T T A T A C T G G T G A	Israel
351	G C T T A T T C A T A C A A T G G T C C C C A T T T T G T G T A A A G G T G T T T A T G C T G G T G A	IB 291
	A T T A C A A C A A T A T T T T G A A T G T G G A T T G C T G G T T T A T G T A A C T A A G A G T G	Majori
	410 420 430 440 450	
401	A T T A C A A C A A T A T T T T G A A T G T G G A T T G C T G G T T T A T G T A A C T A A G A G T G	Israel
401	A T T A C A A C A A T A T T T T G A A T G T G G A T T G C T G G T T T A T G T A A C T A A G A G T G	IB 291
	A T G G C T C T C G T A T A C A A A C C A G G A A T G A A C C A C T T G T G T T A A C T C A T C A C	Majori
	460 470 480 490 500	
451	A T G G C T C T C G T A T A C A A A C C A G G A A T G A A C C A C T T G T G T T A A C T C A T C A C	Israel
451	A T G G C T C T C G T A T A C A A A C C A G G A A T G A A C C A C T T G T G T T A A C T C A G C A C	IB 291



**Abbildung 23:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats IB291 mit dem avian infectious bronchitis virus Isolat IS/885, Accessionsnummer AY279533.1. Sequenzvergleichsprogramm MegAlign 5.0, DNASTar Inc..

**IB764 aus dem Jahr 2004**

```

      T C G T C T A T C G C G A A A G T A G T G T T A A T A C T A C T C T G G C G T T A A C T A A T T T C Majori
764 Bp 10      20      30      40      50
← 1 T C G T C T A T C G C G A A A G T A G T G T T A A T A C T A C T C T G G C G T T A A C T A A T T T C OX x
  1 T C G T C T A T C G C G A A A G T A G T G T T A A T A C T A C T C T G G C G T T A A C T A A T T T C IB 764

      A C T T T T A C T A A T G T A A G T A A T G C A C A G C C T A A T A G T G G T G G T G T T A A T A C Majori
      60      70      80      90      100
51 A C T T T T A C T A A T G T A A G T A A T G C A C A G C C T A A T A G T G G T G G T G T T A A T A C OX x
51 A C T T T T A C T A A T G T A A G T A A T G C A C A G C C T A A T A G T G G T G G T G T T A A T A C IB 764

      T T T T C A T T T A T A C C A A A C A C A A A C A G C T C A G A G T G G T T A T T A T A A T T T T A Majori
      110     120     130     140     150
101 T T T T C A T T T A T A C C A A A C A C A A A C A G C T C A G A G T G G T T A T T A T A A T T T T A OX x
101 T T T T C A T T T A T A C C A A A C A C A A A C A G C T C A G A G T G G T T A T T A T A A T T T T A IB 764

      A T T T G T C A T T T C T G A G T C A G T T T G T G T A T A A G G C A A G T G A T T T T A T G T A T Majori
      160     170     180     190     200
151 A T T T G T C A T T T C T G A G T C A G T T T G T G T A T A A G G C A A G T G A T T T T A T G T A T OX x
151 A T T T G T C A T T T C T G A G T C A G T T T G T G T A T A A G G C A A G T G A T T T T A T G T A T IB 764

      G G G T C C T A C C A C C C T A G T T G T T C T T T T A G A C C A G A A A C C A T T A A T A G T G G Majori
      210     220     230     240     250
201 G G G T C C T A C C A C C C T A G T T G T T C T T T T A G A C C A G A A A C C A T T A A T A G T G G OX x
201 G G G T C C T A C C A C C C T A G T T G T T C T T T T A G A C C A G A A A C C A T T A A T A G T G G IB 764

      T T T A T G G T T T A A T T C C T T G T C A G T T T C T C T T A C T T A T G G A C C C C T A C A G G Majori
      260     270     280     290     300
251 T T T A T G G T T T A A T T C C T T G T C A G T T T C T C T T A C T T A T G G A C C C C T A C A G G OX x
251 T T T A T G G T T T A A T T C C T T G T C A G T T T C T C T T A C T T A T G G A C C C C T A C A G G IB 764

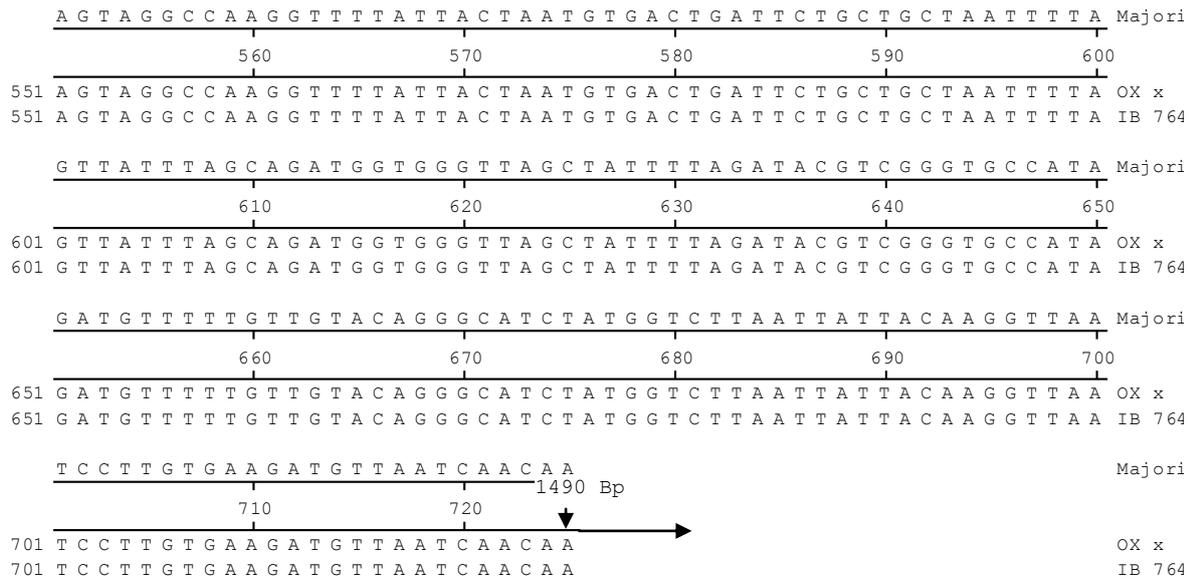
      G A G G G T G T A A G C A A T C T G T T T T T A G T G G T A A G G C A A C G T G T T G T T A C G C C Majori
      310     320     330     340     350
301 G A G G G T G T A A G C A A T C T G T T T T T A G T G G T A A G G C A A C G T G T T G T T A C G C C OX x
301 G A G G G T G T A A G C A A T C T G T T T T T A G T G G T A A G G C A A C G T G T T G T T A C G C C IB 764

      T A C T C T T A T A A A G G C C C A A T G G C A T G T A A A G G T G T T T A T T C A G G T G A A T T Majori
      360     370     380     390     400
351 T A C T C T T A T A A A G G C C C A A T G G C A T G T A A A G G T G T T T A T T C A G G T G A A T T OX x
351 T A C T C T T A T A A A G G C C C A A T G G C A T G T A A A G G T G T T T A T T C A G G T G A A T T IB 764

      A A G C A C G A A T T T T G A A T G T G G A T T G C T G G T T T A T G T T A C T A A G A G T G A T G Majori
      410     420     430     440     450
401 A A G C A C G A A T T T T G A A T G T G G A T T G C T G G T T T A T G T T A C T A A G A G T G A T G OX x
401 A A G C A C G A A T T T T G A A T G T G G A T T G C T G G T T T A T G T T A C T A A G A G T G A T G IB 764

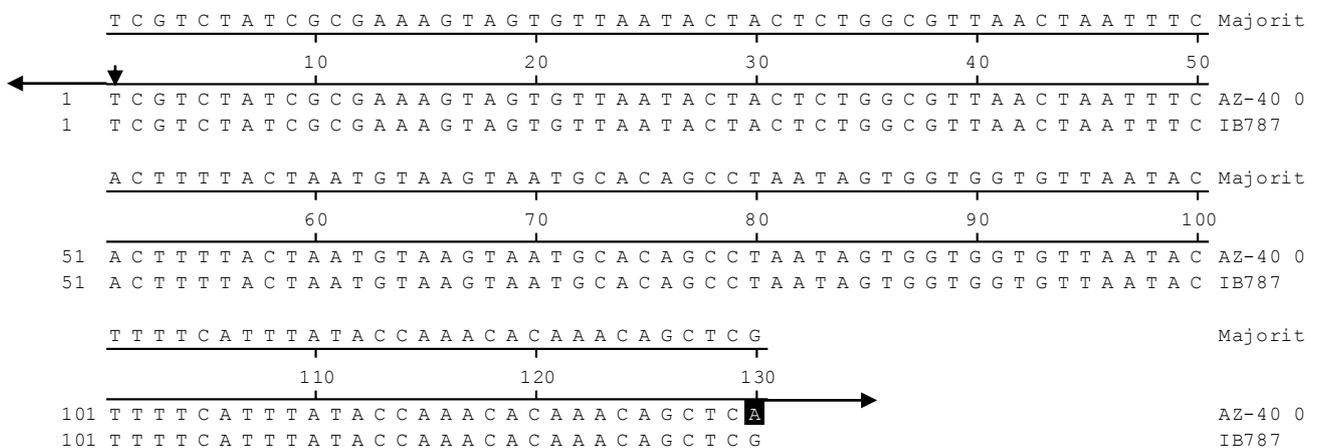
      G C T C T C G T A T A C A G A C T A G A A C A G A G C C C T T A G T A T T A A C G C A A T A C A A T Majori
      460     470     480     490     500
451 G C T C T C G T A T A C A G A C T A G A A C A G A G C C C T T A G T A T T A A C G C A A T A C A A T OX x
451 G C T C T C G T A T A C A G A C T A G A A C A G A G C C C T T A G T A T T A A C G C A A T A C A A T IB 764

      T A T A A T A A T A T T A C T T T A G A T A A G T G T G T T G C C T A T A A T A T A T A T G G C A G Majori
      510     520     530     540     550
501 T A T A A T A A T A T T A C T T T A G A T A A G T G T G T T G C C T A T A A T A T A T A T G G C A G OX x
501 T A T A A T A A T A T T A C T T T A G A T A A G T G T G T T G C C T A T A A T A T A T A T G G C A G IB 764
    
```



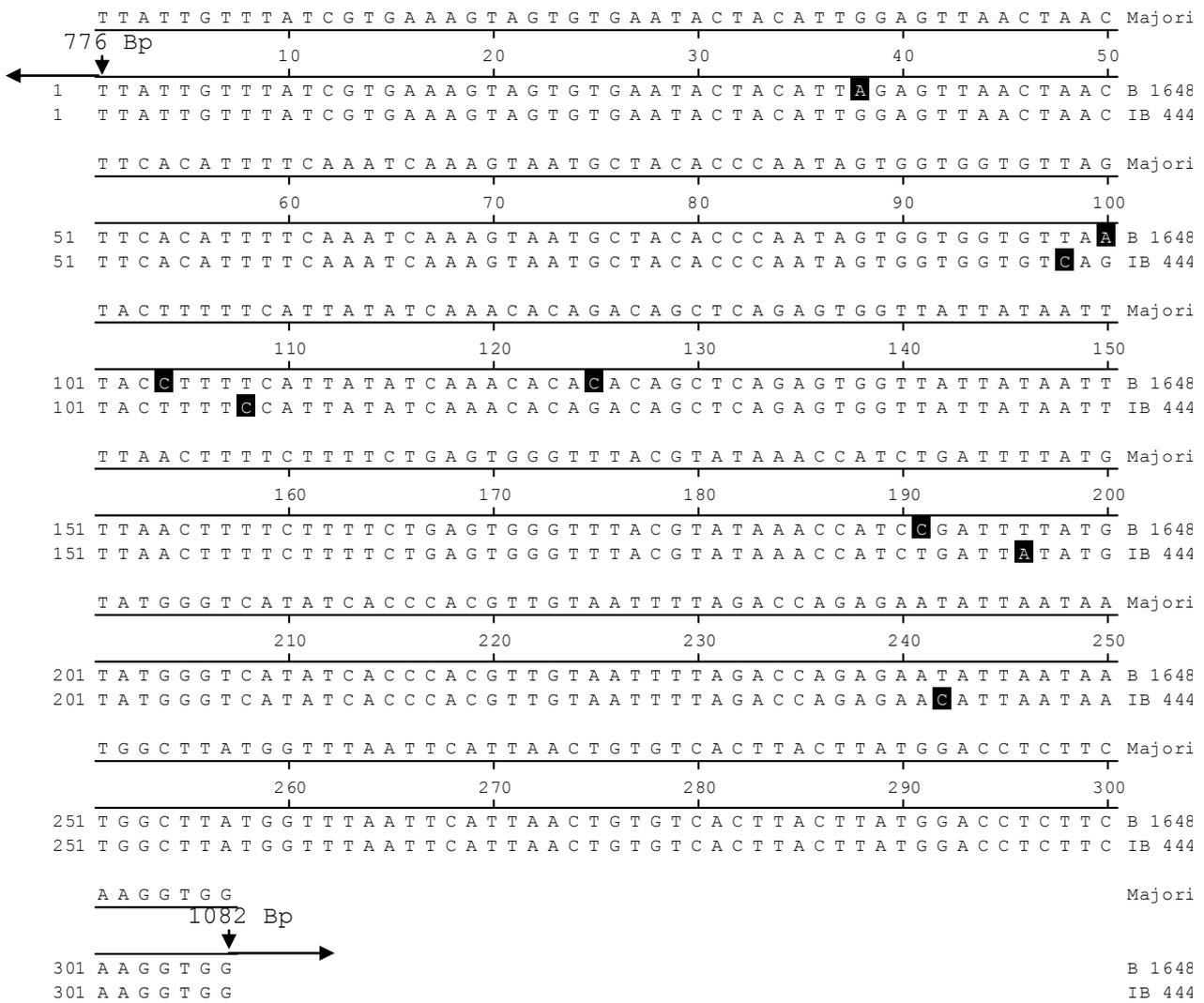
**Abbildung 24:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats IB764 mit dem Isolat FR/L-1450L/05 (QX IBV), Accessionsnummer EF079117. Sequenzvergleichsprogramm MegAlign 5.0, DNASTar Inc..

**IB787 aus dem Jahr 2004**



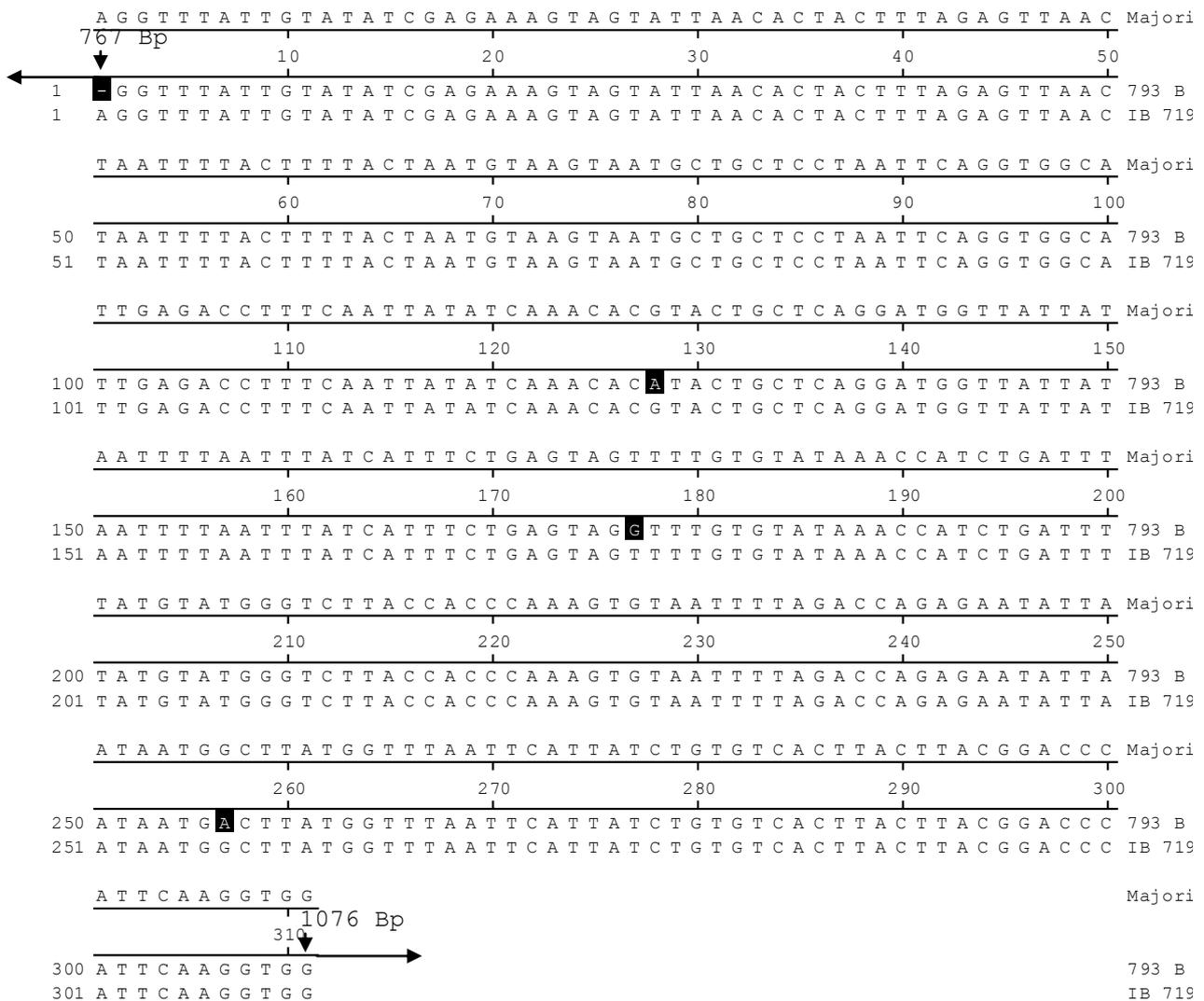
**Abbildung 25:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolates IB787 mit dem AZ-40/05, Accessionsnummer EF186233. Sequenzvergleichsprogramm MegAlign 5.0, DNASTar Inc..

**IB444 aus dem Jahr 1996**



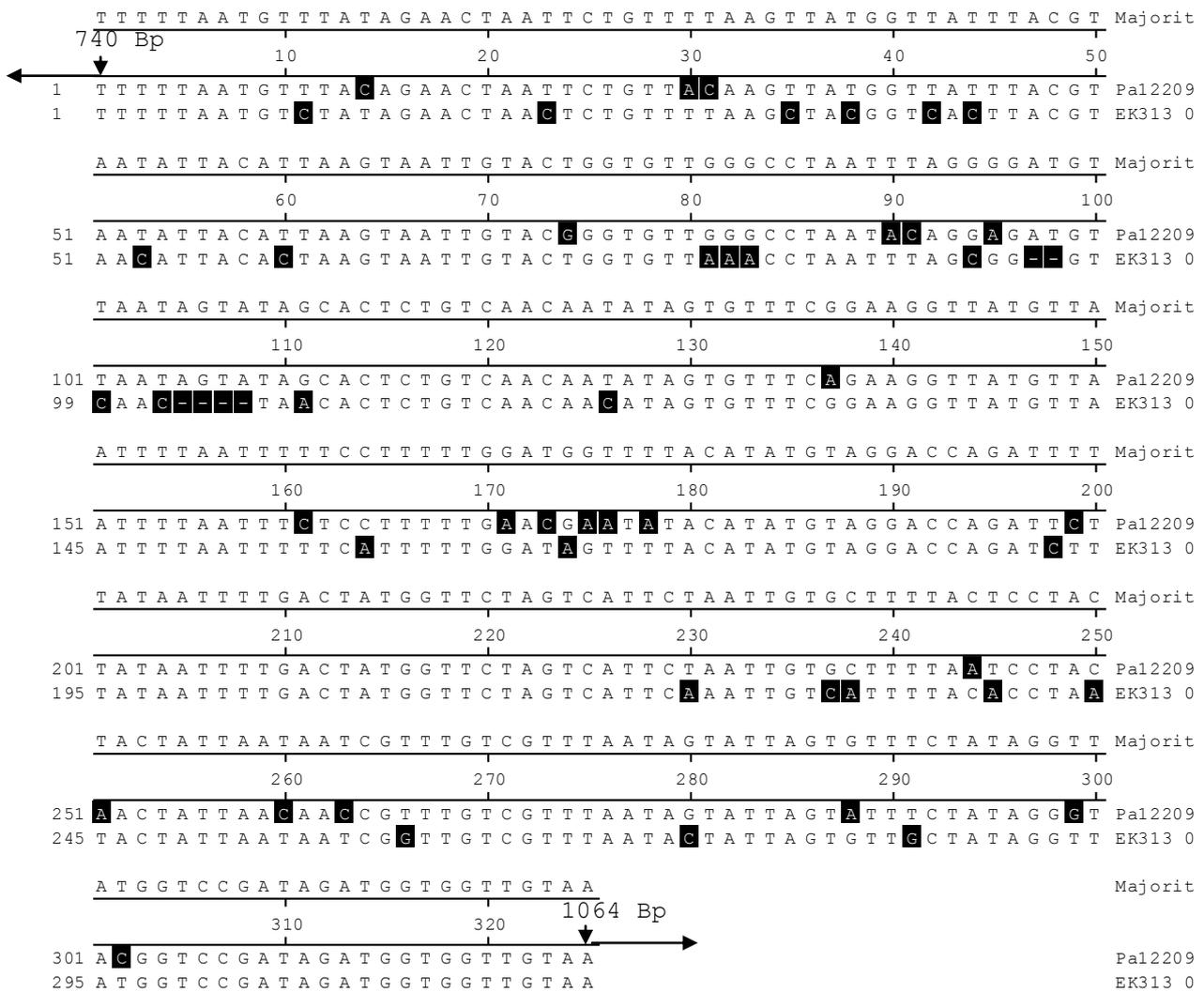
**Abbildung 26:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats IB444 mit dem avian infectious bronchitis Isolat Belgian B1648, Accessionsnummer X87238.1. Sequenzvergleichsprogramm MegAlign 5,0, DNASTar Inc..

**IB719 aus dem Jahr 2002**



**Abbildung 27:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats IB719 mit dem FR-94047-94, Accessionsnummer AJ618987. Sequenzvergleichsprogramm MegAlign 5,0, DNASTar Inc..

**EK313/06 aus dem Jahr 2006**



**Abbildung 28:** Sequenzvergleich des amplifizierten Bereichs des Isolats EK313/06 mit dem aviären IBV-Isolat Pa/1220/98, Accessionsnummer AY789942. Sequenzvergleichs-programm MegAlign 5.0, DNASTar Inc..

## 5 DISKUSSION

Das Virus der Infektiösen Bronchitis (IBV), der Typspezies in der Gruppe 3 der Familie Coronaviridae, ist ein behülltes, einsträngiges RNA-Virus mit einer Genomgröße von ca. 27,6 Kilobasen. Das Virion enthält vier Strukturproteine; S- (Oberflächenprotein), M- (Membranprotein), N- (Nukleokapsidprotein) und E-Proteine. S-Proteine bestehen aus zwei Untereinheiten, den S1- und S2-Proteinen (SPAAN et al., 2005). Das S1-Protein induziert virusneutralisierende und hämagglutinationshemmende serotypspezifische Antikörper.

Das IBV ist der Erreger einer sehr ansteckenden Krankheit der Hühner. Das Virus befällt den Respirations- und Urogenitaltrakt, aber auch andere Organe einschließlich den Darm. Das IBV verursacht weltweit seit etwa 1930 hohe wirtschaftliche Verluste bei Hybridhühnern des Lege- und Masttyps (Broiler) sowie bei diversen Rassehühnern.

Trotz intensiver Anwendung von Lebend- und Inaktivat-Impfstoffen gab es bis in die Gegenwart einen Anstieg von IBV-Infektionen mit bakteriell bedingten Sekundärinfektionen, insbesondere bei Legehennen, Broilern und deren Elterntieren. Durch Isolierung und Serotypisierung des Erregers wird die Diagnose einer IBV-Infektion festgestellt. Für Serotypisierung wird meist der Virusneutralisationstest (VNT) und Hämagglutinationshemmungstest (HAH) verwendet (GELB, 1989). Allerdings sind beide Methoden kostspielig und zeitaufwendig. Eine nachgewiesene Serokonversion der genesenen Hühner reicht nicht zur genaueren Identifikation bzw. zur Serotypisierung neuer IBV-Isolate, da die Hühner im Falle einer multiplen IBV-Infektion (Mischinfektion) kreuzreagierende Antikörper produzieren (GELB und KILLIAN, 1987). Im Gegensatz zu den seit langem gebräuchlichen serologischen Methoden wurden in den letzten Jahren monoklonale Antikörper (KARACA et al., 1992) und zunehmend RT-PCR (ANDREASEN et al., 1991), RT-PCR und anschließende RFLP (KWON et al., 1993b; LIN et al., 1991, SONG et al., 1998) sowie serotypspezifische bzw. genotypspezifische RT-PCR (KEELER et al., 1998; CAPUA et al., 1999; CAVANAGH, 1999) zur Identifizierung von IBV-Isolaten entwickelt und in die Diagnostik eingeführt. Die Ergebnisse dieser relativ schnellen, hoch sensitiven und spezifischen Nachweis- und Differenzierungsmethoden sind für Bekämpfungsmaßnahmen sehr wichtig. Die meisten Laboratorien verwenden zum Nachweis und zur Serotypisierung bzw. Genotypisierung des IBV seit Anfang der 1990er Jahre die RT-PCR (LIN et al., 1991; ZWAAGSTRA et al., 1992; ADZHAR et al., 1996; HANDBERG et al., 1998; CAPUA et al., 1999; CHEN und WANG, 2010).

Der Nachweis und die Typisierung der zahlreichen IBV-Isolate dient nicht nur zur Charakterisierung der IBV sondern ist auch für effektive Modifikationen von Impfprogrammen sehr wichtig. Auf dem S1-Gen basierende molekularbiologische Untersuchungen sind zur Typisierung des IBV am effektivsten (IGNJATOVIC und SAPATS, 2000) und haben sich bei den immunologischen Fragestellungen im Vergleich zur Serotypisierung durch Neutralisationstest als wertvoller erwiesen (LADMAN et al., 2006).

In dieser Arbeit wurden zum Nachweis des IBV eine konventionelle RT-PCR und eine Real Time RT-PCR durchgeführt. Zur Differenzierung der einzelnen IBV wurden S1-RT-PCR mit einschließender RFLP und zwei verschiedene genotypspezifische Nested-Multiplex-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurden einige Isolate zur genauen Differenzierung sequenziert.

### **5.1 Vermehrung des IBV in Hühnerembryonen**

Nach einer Inokulation in die Allantoishöhle replizieren sich die meisten IBV-Isolate in 10-11 Tage alten embryonierten Hühnereiern sehr gut. Die Virusvermehrung erfolgt hauptsächlich in den endodermalen Epithelzellen der Amnion- und Allantoishöhle. Dadurch kommt es zur Virusanreicherung in den Allantois- und Amnionflüssigkeiten (BEAUDETTE und HUDSON, 1937). Der maximale Virustiter wird ein bis zwei Tage p.i. erreicht (HITCHNER und WHITE, 1955; PURCHASE et al., 1966; DARBYSHIRE et al., 1975). Nicht-eiadaptierte Feldisolate benötigen drei oder mehr Passagen, um hohe Titer in der Allantoisflüssigkeit zu erreichen. CLARKE et al. (1972) haben gezeigt, dass 24 von 70 Feldisolaten nach drei Eipassagen immer noch keine pathologischen Embryoveränderungen verursachten. Durch zahlreiche Embryopassagen erhöht sich die Virulenz der Viren für Hühnerembryonen, während sich die Virulenz für Küken verringert (BEAUDETTE und HUDSON, 1937). Diese Feststellung bildete bereits in den 1940er und 1950er Jahren die fachliche Basis für die relativ mühelose Entwicklung, Produktion und Anwendung attenuierter Lebendimpfstoffe.

In embryonierten Hühnereiern inokulierte IBV-Referenzvirusstämme (n=3) M41, D274, D1466 und Feldvirusisolate (n=4) 8838/84/9, 291/85/6, 684/80 und 390/1/84 verursachten Embryoveränderungen, die typisch für das IBV sind (LUKERT, 1980). Die im Abschnitt 4.1 beschriebenen pathologischen Veränderungen bzw. der embryonale Tod traten schon nach relativ niedriger Passagenzahl auf, da die genannten IBVs ursprünglich bereits in unbekannter Zahl in embryonierten Hühnereiern passagiert und damit bereits als embryoadaptiert gelten können. Mit ansteigender Passagenzahl stieg die Pathogenität und Letalität bei

Hühnerembryonen übereinstimmend mit Beschreibungen von LOOMIS et al. (1950) und CLARKE et al. (1972).

Weil die erwähnten Embryoveränderungen auch durch Adenoviren, Viren der Aviären Enzephalomyelitis, durch lentogene Virusstämme der Newcastle-Krankheit und durch Viren der Entenhepatitis Typ 1 hervorgerufen werden können, muss die Anwesenheit des IBV durch experimentelle Infektionen von Hühnerküken, VNT, RT-PCR oder mit immunologischen Nachweisverfahren bestätigt werden. In dieser Arbeit wurde das IBV mittels RT-PCR bestätigt.

## **5.2 Vermehrung des IBV in HKNZ**

Das IBV kann in verschiedenen Zellkulturen angezüchtet werden. Allerdings ist bei Verwendung von Hühnerembryonen der erzielte Virustiter stets höher, als das bei der Vermehrung in Zellkulturen der Fall ist (VON BÜLOW, 1964). Hühnerküken-Nierenzellkulturen sind zur Vermehrung des IBV im direkten Vergleich zu anderen Zellkulturen am besten geeignet (LUKERT, 1965 und 1966; OTSUKI et al., 1979). Allerdings tritt erst nach mehreren vorausgegangenen Eipassagen ein mikroskopisch erkennbarer ZPE in diesen Zellkulturen auf. Der ZPE zeigt sich zunächst durch Synzytienbildung. Dann kommt es zur Lysis dieser Zellen. Manche Feldvirusstämme ohne Pathogenität für Hühnerembryonen rufen auch nach wiederholten Zellkulturpassagen keine offensichtlichen Veränderungen der Zellen hervor (VON BÜLOW, 1964; GILLETTE, 1973). Aufgrund der geringeren Sensitivität gegenüber nicht embryoadaptierten Viren sind Zellkulturen zur Erstisolierung von IB-Feldviren nicht geeignet.

Zur Adaptation des IBV wurden in dieser Arbeit nach mehreren Eipassagen drei IBV-Referenzvirusstämme (M41, D274, D1466) und vier Feldvirusisolate (8838/84/9, 291/85/6, 684/80 und 390/1/84) an HKNZ verwendet. Alle untersuchten IBV-Referenzvirusstämme bzw. die Feldvirusisolate konnten nach mehreren Passagen auf Hühnerembryonierzellen einen ZPE hervorrufen. Der durch Synzytienbildung, Aggregation und Schrumpfung der Zellen charakterisierte ZPE trat je nach Isolat bzw. Referenzvirusstamm nach unterschiedlicher Passagenzahl auf. Die als ZPE bezeichneten Veränderungen stimmen mit den von CHOMIAK et al. (1958) und GILLETTE (1973) beschriebenen Veränderungen vollständig überein. Mit ansteigender Passagenzahl auf HKNZ war der ZPE deutlicher zu beobachten. Dies wurde durch eine Färbung der infizierten Zellen mit Kristallviolett bestätigt. Die fehlende Synzytienbildung bei der mit D274 infizierten Zellkultur (Abbildung 6, C) ist

darauf zurückzuführen, dass das Zellkulturmedium vor der Färbung mit Kristalviolett vollständig entfernt und anschließend die Zellkulturplatte mit Wasser abgespült wurde, so dass alle Synzyten und geschädigte Zellen mitentfernt wurden. Nach mehreren Zellkulturpassagen konnte ein Virustiter zwischen  $10^{4,5}$  KID<sub>50</sub>/ml (684/80 und 291/85/6) und  $10^{5,6}$  KID<sub>50</sub>/ml (M41) erzielt werden.

### 5.3 Hämagglutinationstest

IB-Viren haben in der Regel keine hämagglutinierenden Eigenschaften. Nach CORBO und CUNNINGHAM (1959) kann jedoch eine hämagglutinierende Aktivität von IBV-Stämmen erst nach Trypsinbehandlung auftreten. Auch die Behandlung der IB-Viren mit dem Enzym Phospholipase C lässt sich bei einigen IBV-Isolaten (Holte, M41, H120, Connecticut, D274, D1466) eine spezifische, durch Antiseren hemmbare Hämagglutination hervorrufen (BINGHAM et al., 1975; ALEXANDER et al., 1976; LASHGARI und NEWMAN, 1982). Der Hämagglutinationstest wurde für die in der Tabelle 7 aufgeführten Referenzvirusstämme und alle in der Tabelle 5 aufgelisteten Isolate (Ifd. Nr. 1-24) durchgeführt, um mögliche Kontaminationen der Isolate mit Paramyxovirus, besonders der Typen 1, 2 und 3, auszuschließen. Für alle untersuchten 24 Isolate und Referenzvirusstämme wurde eine HA-Einheit von  $\log_2 \leq 2$  festgestellt. Deshalb konnte eine Kontamination der Isolate mit den genannten Viren mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

### 5.4 RT-PCR-vermittelte Untersuchungen

Wie bei vielen anderen Virusinfektionen basiert die Diagnose des IBV heutzutage fast vollständig auf molekularen Methoden. Eine PCR-vermittelte Identifizierung eines Virus ist durch molekulare Analysen bestimmter Regionen des viralen Genoms zuverlässig möglich geworden. Die Entwicklung molekulargenetischer Techniken, wie die *in-vitro*-Amplifikation von Nukleinsäurefragmenten sowie deren Sequenzierung ermöglicht heute eine Identifizierung und Charakterisierung der Viren auf molekularer Ebene.

Dieses *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäurebereichen definierter Länge weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf und ist sowohl zum allgemeinen Nachweis des IBV, als auch zur Genotypisierung neuer Isolate geeignet. Mittels PCR bzw. RT-PCR sind auch nicht mehr vermehrungsfähige Erreger nachweisbar, da nur deren intakte Nukleinsäure benötigt wird. Durch die RT-PCR entfällt die zeitaufwändige Anzucht des Erregers in embryonierten Hühnereiern bzw. in Zellkulturen. Der hohe technische und finanzielle

Aufwand für Material und Laborausstattungen können in Bezug zu diesen Verfahren als Nachteil gesehen werden. Zudem sind PCR bzw. RT-PCR störanfallige Methoden. So dass bei jedem Ansatz mindestens eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitzuführen ist, um zu überprüfen, ob es mögliche Kontaminationen gibt (Negativ-Kontrolle) oder ob die Qualität des PCR-Ansatzes ausreichend ist (Positiv-Kontrolle). Die Spezifität und die Sensitivität der RT-PCR kann durch die Art des Probenmaterials (Niere, Trachea, Fäzes, Organpool etc.) beeinflusst werden. Diese Organe können nämlich unspezifische PCR-Inhibitoren beinhalten. Ein anderer kritischer Punkt ist die Auswahl der Primer, die für die Spezifität der RT-PCR von großer Bedeutung sind (ZWAAGSTRA et al., 1992). Für die gruppenspezifische RT-PCR müssen Primer ausgewählt werden, die komplementär zu sehr hoch konservierten Sequenzabschnitten vieler IBV-Genome sind (ANDREASEN et al., 1991). Ansonsten können falsch positive Ergebnisse auftreten (JACKWOOD et al., 1997; CAPUA et al., 1998). Aus diesem Grund werden zur Detektion des IBV Primer meistens aus sehr konserviert erhaltene N- (ADZHAR et al., 1996; FARSANG et al., 2002; ANDREASEN et al., 1991; HANDBERG et al., 1999), M- (ADZHAR et al., 1996; ANDREASEN et al., 1991) oder UTR-Gene (ADZHAR et al., 1996) des IBV-Genoms ausgewählt. Dies erlaubt eine Detektion nahezu aller bekannten IBV-Isolate.

#### **5.4.1 Nachweis des Virus der Infektiösen Bronchitis mittels RT-PCR**

Zum Nachweis des IBV wurden bereits viele auf RT-PCR basierende Methoden beschrieben. (CAVANAGH et al., 1997; FALCONE et al., 1997; JACKWOOD et al., 1992; Kwon et al., 1993a; Kwon et al., 1993b). Die Sensitivität und die Spezifität dieser Methoden sind wie erwähnt von den gewählten Primerpaaren abhängig. HANDBERG et al. (1999) haben Primer entworfen, die innerhalb des sehr konserviert erhaltenen N-Gens binden und damit einen optimalen Nachweis des IBV mittels RT-PCR ermöglichen. Diese Methodik wurde später von zahlreichen Autoren zur Detektion aller bekannten IBV-Stämme verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Nachweis des Virus der Infektiösen Bronchitis in den Isolaten der Nummern 1 bis 24 eine auf dem N-Gen basierte RT-PCR nach HANDBERG et al. (1999) durchgeführt. Für 24 untersuchte IBV-Isolate konnte ein Amplifikat mit einer Länge von 453 bp erhalten und damit bewiesen werden, dass es sich um IBV handelt. Die positiven 24 Proben wurden zur weiteren Genotypisierung verwendet.

Als eine weitere Methode zum Nachweis des IBV fand in dieser Arbeit eine Real-time RT-PCR mit „Sybr Green“ Verwendung. Die dafür verwendeten Primer binden sich ebenso innerhalb der hoch konservierten Region des N-Gens und ermöglichen eine Amplifikation

und eine Darstellung mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs „Sybr Green“. Ein vom Real Time-Gerät messbares Signal zeigt ein Isolat als IB-positiv an. Bei ausgebliebener Amplifikation kann eine schwache oder eine nicht auswertbare Fluoreszenz gemessen werden. In dieser Arbeit haben sich 82 Isolate in der Real-time RT-PCR als IBV-positiv erwiesen, und sie konnten zur Genotypisierung in einer genotypspezifischen RT-PCR verwendet werden.

Als Folgerung lässt sich feststellen, dass sich beide in dieser Arbeit verwendeten Methoden zum Nachweis der IBV-Isolate als einsetzbar erwiesen haben.

## **5.4.2 Genotypisierung des IBV**

### **5.4.2.1 S1-Gen-RT-PCR und RFLP**

Eine sehr häufig verwendete Methode zur Genotypisierung des IBV ist die Analyse mittels *restriction enzyme length polymorphism* (RFLP). Dafür wird zuerst eine bestimmte Sequenz amplifiziert; in diesem Fall das gesamte S1-Gen. Anschließend wird dieses mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Die erhaltenen Fragmente werden mit Fragmenten bekannter Genotypen verglichen und nach Fragmentgrößen bzw. Fragmentzahl klassifiziert (KWON et al., 1993b; SONG et al., 1998; ALVARADO et al., 2006; MARDANI et al., 2006). Die Restriktionsenzyme haben die Fähigkeit, spezifische Sequenzabschnitte der DNA zu erkennen und durch Hydrolyse der Phosphor-Esterbindung zu durchtrennen. Je nach erkannten Schnittstellen entstehen zwei oder mehrere Restriktionsfragmente. Diese Methodik zur Charakterisierung des IBV wurde von KWON et al. (1993) und LIN et al. (1991) beschrieben. Dass mehrere Restriktionsenzyme und damit mehrere Restriktionsverdauungen benötigt werden, um ein Produkt bzw. einen Erreger genauer zu identifizieren, macht diese Methodik im Gegensatz zur genotypspezifischen Multiplex-PCR zeitaufwändiger und teurer. Die in dieser Arbeit durchgeführte S1-Gen-RT-PCR richtet sich nach der von KWON et al. (1993) entwickelten Methode. KWON et al. haben eine S1-Gen-RT-PCR und RFLP-Methode entwickelt, deren Ergebnisse mit denen der VNT vollkommen übereinstimmen. Die dafür verwendeten Primer wurden ursprünglich für den IBV-Stamm Beaudette (BINNS et al., 1985) entworfen und waren zu den S1-Gen-Sequenzen der meisten in den Vereinigten Staaten von Amerika isolierten IBV-Stämmen komplementär. In dieser Arbeit konnten mit dieser Methode für neun von 24 Isolaten, die schon mit Hilfe von N-Gen-RT-PCR als IBV-positiv identifiziert worden waren, die erwartete Basenlänge, nämlich 1.720 Bp erzielt werden. Anschließend wurden sie mit der unter 3.2.7.3.1.2 beschriebenen Methode mit den Restriktionsenzymen HaeIII, XcmI und BstYI verdaut.

Diesen Ergebnissen zufolge wiesen alle neun Isolate (8838/84/9, 189/83-2, 684/80, 1051/80, 55/80; 630/80, 465/80, 816/80-1 und 345/81) das typische Restriktionsmuster des IB-Referenvirusstamms Massachusetts auf. Für 15 Isolate konnte kein Amplifikat erhalten werden und damit wurden sie bei der RFLP nicht berücksichtigt. Dafür können verschiedene Gründe genannt werden. An erster Stelle können Mutationen an den Primerbindungsstellen genannt werden. Die Primer wurden auf der Basis des Beaudette-Stamms entworfen und dadurch dürfte die durchgeführte RT-PCR für Massachusetts-Stämme sensitiver sein. Um Amplifikate in dieser Länge zu erzielen, müssen die Isolate einen hohen Virusgehalt aufweisen. Da diese Isolate zwischen 1978 bis 1988 isoliert wurden, dürften sie in den vergangenen Jahren viel an Virusgehalt verloren haben, und dies kann bei der RNA-Isolation zu einer verminderten RNA-Ausbeute führen. Andererseits können nach LEE et al. (2003) einige Genotypen auf Grund der großen genetischen Variabilität der Coronaviren durch diese Methode nicht differenziert werden. Übereinstimmend konnten JIMENEZ et al. (2004) sowie BRATU et al. (2004) einige Feldisolate nach der Methode von KWON et al. (1993b) nicht differenzieren.

Nach HEIN et al. (1998) können IBV-Stämme mit den gleichen Restriktionsmustern zu unterschiedlichen Serotypen oder Protektotypen gehören. Obwohl die RT-PCR des gesamten S1-Gens und die anschließende Restriktionsenzymanalyse für ein schnelles Screening des IBV zuverlässig sind, können Sequenzierungen des S1-Gens verschiedener Isolate mit den gleichen Restriktionsmustern signifikante Unterschiede aufweisen. Schon geringe Unterschiede der Aminosäuren innerhalb des S1-Proteins resultieren in einen neuen Genotyp (CAVANAGH, 1995; WANG et al., 1993). Deshalb werden für Differenzierungen des IBV Sequenzierungen oder genotypspezifische RT-PCR, die auf dem S1-Gen basieren, empfohlen.

#### **5.4.2.2 Genotypisierung von Isolaten des Virus der Infektiösen Bronchitis mittels genotypspezifischer RT- und Nested-Multiplex-RT-PCR**

Um den Arbeitsaufwand beim routinemäßigen Nachweis der zahlreichen Genotypen des IBV zu reduzieren, wurden einige Multiplex-PCR bzw. Nested Multiplex-PCR entwickelt (KEELER et al., 1998; CAVANAGH, 1999; CAPUA et al., 1999), um möglichst viele Genotypen auf einmal zu erfassen und voneinander zu unterscheiden. Diese Methoden sind kostengünstig und zeitsparend im Vergleich zu den Single-RT-PCRs. Allerdings kann es aufgrund der Schwierigkeiten beim Erzielen von optimalen Reaktionsbedingungen für alle Primer vorkommen, dass einzelne Zielsequenzen bei der Amplifikation favorisiert oder benachteiligt werden, so dass das mittels einer Multiplex-PCR gewonnene Produkt prinzipiell

keiner aussagekräftigen, quantitativen Analyse unterzogen werden kann. Das ist jedoch in Bezug auf die in dieser Arbeit interessierende qualitative Fragestellung von untergeordneter Bedeutung. Auf der anderen Seite kann eine Mutation innerhalb der Bindungsstelle der typspezifischen Primer eine Amplifikation verhindert werden. Sequenzähnlichkeiten innerhalb der Primerbindungsstellen von zwei verschiedenen Genotypen können durch typspezifische PCRs fälschlicherweise als identisch erfasst werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden 24 Isolate, die zuvor durch N-Gen-RT-PCR als IBV-positiv nachgewiesen wurden, mit Hilfe einer genotypspezifischen RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen M41, D274 und 793B charakterisiert. Um den Genotyp D1466 zu erfassen, wurde eine separate RT-PCR durchgeführt. Alle 24 Isolate konnten folgerichtig mit dieser Methodik genotypisiert werden. Von den 24 untersuchten Isolaten wurden sechs Isolate als Genotyp Massachusetts und 13 Isolate als Genotyp D274 identifiziert. Drei Isolate erwiesen sich als Massachusetts-D274 Mischkulturen. Von 24 untersuchten Isolaten wurden lediglich zwei Isolate als Genotyp D1466 identifiziert. Der Genotyp 793B konnte gar nicht festgestellt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden 82 Isolate, die zuvor bei der Real Time RT-PCR als IBV-positiv erkannt wurden, mit Hilfe einer genotypspezifischen RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Italy 02, M41, D274, D1466 und 793B charakterisiert. 76 von 82 Isolaten konnten dadurch differenziert werden. 25 Isolate wurden als D274, 24 Isolate als Massachusetts, 14 Isolate als 793B sechs als D1466 und ein Isolat als Italy 02 identifiziert. Sechs Isolate erwiesen sich als Mischkultur. Bei den Mischkulturen handelte es sich um vier Isolate in Form von Massachusetts/D274, ein Isolat in Form von Massachusetts/793B und ein Isolat in Form von Italy 02/793B (Anhang 1, 2 und 3). Die Mischkulturen können aufgrund gleichzeitiger, intensiver Anwendung von verschiedenen Lebend-Impfstoffen entstanden und können folglich auch isoliert worden sein.

Die anderen sechs Isolate konnten durch die genotypspezifischen Nested-Multiplex-RT-PCR nicht genotypisiert werden. Deshalb wurden sie mit anderen Primerpaaren amplifiziert und anschließend sequenziert.

### **5.5 Sequenzierung einiger Isolate des Virus der Infektiösen Bronchitis**

Die Sequenzierung des S1-Gens ist die nützlichste Methode zur Genotypisierung von IBV-Isolaten. Sie wird deshalb von vielen Labors zu diesem Zweck verwendet. Vorteilhaft ist der Erhalt eines relativ großen Teils der Zielsequenz, der mit den Daten in der Genbank vorhandenen Sequenzen verglichen werden kann. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, die

bisher noch nicht erfassten Feldisolat oder Varianten zu bestimmen (KINGHAM et al., 2000; LEE et al., 2003; RAMNEEK et al., 2005). Andererseits scheint eine Sequenzierung des S1-Gens und dessen Vergleich mit anderen Stämmen für Immunitätsversuche nützlicher zu sein als eine Serotypisierung durch einen Neutralisationstest (LADMAN et al., 2006).

In dieser Arbeit konnten sechs von 82 zuvor IBV-positiv getesteten Isolaten durch genotypspezifische Nested-Multiplex RT-PCR nicht charakterisiert werden. Sie wurden mit Hilfe von Primerpaaren S1uni (-) und XCE1 (+) bzw. XCE3 (-) und XCE1 (+) amplifiziert und anschließend sequenziert.

Ein Isolat (IB291) aus dem Jahr 1983 hatte 91 % Sequenzhomologie mit dem nephropathogenen Stamm IS/885 (Abbildung 22). Dieser Stamm wurde in Israel aus 23 Geflügelherden mit heftiger renaler Symptomatik isoliert. Er hat weniger als 77 % Homologie zu anderen nephropathogenen Stämmen (MEIR et al., 2004).

Zwei von sechs sequenzierten Isolaten (IB764 und IB787) aus dem Jahr 2004 hatten die höchste Homologie (100 %) mit dem in China isolierten Stamm QX-IBV (Abbildung 23 und 24). Das QX-IBV ist in China der dominante Genotyp und verursacht neben typischen respiratorischen Symptomen, Depressionen und ödematisierte Augenlider mit Lakrimation oder auch Diarrhoe (PAN et al., 1998; WANG et al., 1998, SUN et al., 2011). LIU et al. (2006) berichten zudem von Proventrikulitis und renaler Symptomatik in den betroffenen Hühnerherden. In Europa wurde dieser Genotyp zum ersten Mal in Italien von BEATO et al. (2005) beschrieben.

Ein Isolat (IB444) aus dem Jahr 1996 hatte eine 97 % Homologie mit dem Stamm Belgian B1648 (Abbildung 25). Dieser Stamm wurde zum ersten Mal 1984 in Belgien von Hühnern mit Nephritis-Nephrosis-Symptomen isoliert (MEULEMANS et al., 1987).

Ein Isolat (IB719) aus dem Jahr 2002 zeigte die höchste Homologie mit dem Isolat FR-94047-94 (Abbildung 26).

Ein weiteres Isolat (EK313/06) aus dem Jahr 2006 besaß die höchste Sequenzhomologie mit dem Isolat PA/1220/98 mit nur 83 % (Abbildung 27). PA/1220/98 wurde 1998 in Pennsylvania/USA aus Legehennen mit respiratorischen Symptomen isoliert (GELB et al., 2005).

## **5.6 Vorkommen des Virus der Infektiösen Bronchitis**

Nachdem SHALK und HAWN (1931) das IBV zum ersten Mal isoliert hatten, wurde bis 1956 angenommen, dass das IBV nur aus einem Serotyp bestünde. Erstmals haben JUNGHERR et al.

(1956) zum ersten Mal durch Kreuzneutralisationstests in embryonierten Hühnereiern festgestellt, dass das IBV aus mehr als nur einem Serotyp besteht. Sie fanden zwischen den Isolaten Massachusetts und Connecticut serologische nachweisbare Unterschiede. HOFSTAD konnte 1958 in ähnlicher Weise serologische Unterschiede zwischen den Stämmen Iowa 97 und Iowa 609 zeigen.

In den nachfolgenden Jahren konnten serologische Unterschiede zwischen mehreren IBV-Isolaten durch eine Reihe von Untersuchungen dargestellt werden: Holte und Gray (WINTERFIELD und HITCHNER, 1962), Australian T-Stamm (CUMMING, 1963), JMK (WINTERFIELD et al., 1964), SE17 (HOPKINS, 1969), Clark 333 (COWEN et al., 1971), Florida (WINTERFIELD et al., 1971) und Arkansas 99 (FIELDS, 1973). Nachdem kommerziell erhältliche IBV-Impfstoffe Anwendung fanden, wurden weitere Serotypen und Varianten isoliert (COOK, 1984; GELB et al., 1991; JOHNSON et al., 1973; MARQUARDT et al., 1981; OTSUKI et al., 1987; WADY und FARAGHER, 1981).

Zwischen 1978 und 1982 wurden in den Niederlanden die so genannten Variantstämme isoliert, die sich antigenetisch von den Massachusetts-, Connecticut-, Florida-, Iowa 97-, Iowa 609- und JMK-Serotypen unterschieden (DAVELAAR et al., 1981; DAVELAAR et al., 1983; LÜTTICKEN et al., 1983). Diese niederländischen Variantstämme wurden als D207, D212, D3128 und D3896 bezeichnet und zeigten antigenetische Beziehungen zum Variantstamm D274. Nach Phospholipasebehandlung erfasst der Variantstamm D212 auch den Variantstamm D1466 (DAVELAAR et al., 1981; DAVELAAR et al., 1983; LÜTTICKEN und CORNELISSEN, 1984). Diese niederländischen Variantstämme waren Anfang der 1980er Jahre in den Niederlanden (DAVELAAR et al., 1984), in Großbritannien (COOK, 1983; COOK, 1984) und in Frankreich (PICAULT, 1984) sehr weit verbreitet. CEGLA (1986) konnte in 40 bis 50 % der untersuchten Seren Antikörper gegen diese Variantstämme im HAH-Test nachweisen. Alle diese Seren wurden in der Bundesrepublik Deutschland in den Jahren 1983 bis 1984 gesammelt.

Über den Nachweis von anderen, recht verschiedenen Typen (Sero- und Genotypen) des IBV wurde später kontinuierlich von mehreren Autoren berichtet. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass die aus Hühnern in Großbritannien, Frankreich, Holland, Deutschland und Spanien stammenden Tupferproben mehrere Genotypen enthielten. Es waren mit 34 % der Genotyp 793/B (4/91, CR88) und mit 24 % der Genotyp Massachusetts, gefolgt von den Genotypen Italy 02, QX-IBV, D274 und Arkansas (WORTHINGTON und JONES, 2006; WORTHINGTON et al., 2004). Die 2008 von MONNE et al. (2009) durchgeführte Studie zeigte, dass die meisten in Europa vorkommenden Genotypen 793B (39 %), gefolgt von

Massachusetts (22 %) und D274 (15 %) sind. An der vierten und fünften Stelle befanden sich QX-IBV (9 %) und Italy 02 (6 %). Außerhalb Deutschlands konnte QX-IBV in Frankreich, in den Niederlanden, in der Tschechischen Republik und Belgien sowie in Italien aus Broilern und Broiler-Elterntieren mit respiratorischen Symptomen (55 %), reduzierter Gewichtszunahme (22 %), Enteritis (11 %) und Nephritisssymptomen (11 %) isoliert werden. In Großbritannien konnte kein QX-IBV detektiert werden. Italy 02 konnte nur in Italien und in Griechenland detektiert werden. Im Nachbarland Dänemark wurde festgestellt, dass QX-IBV der am häufigsten zirkulierende Genotyp war (HANDBERG et al., 2009). Untersuchungen an nur aus Deutschland stammenden Proben zeigten, dass 2008 fast 70 % der positiven IBV-Proben dem Genotyp QX-IBV angehörten (LÜSCHOW et al., 2009).

Von BEATO et al. (2005) durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass in Italien sieben von 14 untersuchten Isolaten dem Italy 02, sechs dem 793/B und eines dem QX-IBV angehören.

In ähnlicher Weise in Ungarn durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass die am meisten vorkommenden Sero/Genotypen ebenso dem Massachusetts und dem 793/B (BRATU et al., 2004) angehörten. In Polen durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass 793B der dominante Genotyp war (MINTA et al., 1998; DOMANSKA-BLICHARZ et al., 2007).

Eine in Russland durchgeführte Studie zeigte, dass 42 % der untersuchten Isolate zum Massachusetts-Typ, 32 % der Isolate zu russischen Variant-Isolaten gehörten, gefolgt von 793B (11 %), D274 (10 %), QX-IBV (2 %) und B1648, 624I, Italy 02 (je 1 %) (BOCHKOV et al., 2006). Die in der Türkei durchgeführte Studie zeigte, dass elf von 20 untersuchten Isolaten dem Serotyp 793/B und die restlichen 9 Isolate dem Serotyp Massachusetts angehörten (AZAD et al., 2005).

Die Verteilung der IBV-Stämme auf verschiedene Ländern der Welt zeigt, dass einige IBV-Stämme weltweit verbreitet sind, während andere IBVs auf bestimmte Regionen begrenzt bleiben. Mit der molekularen Epidemiologie ist es heutzutage möglich, den neuen Stämmen rasch auf die Spur zu kommen und sie zu identifizieren.

Mittels der in dieser Arbeit durchgeführten genotypspezifischen RT-PCRs erzielten Ergebnisse erwies sich D274 (25 von 76) als dominanter Typ, gefolgt von Massachusetts (24 von 76), 793B (14 von 76) D1466 (6 von 76) und Italy 02 (1 von 76). Sechs Isolate bestanden aus Mischkulturen, d.h. sie enthielten mehr als einen Genotyp. Aus einem anderen Blickwinkel betrachtet war in den 1980er Jahren D274 der dominante Typ. Massachusetts wurde von 1978 bis 2006 regelmäßig isoliert. D1466 und Italy 02 wurden im genannten Zeitraum selten isoliert. Erst ab dem Jahr 1991 zirkulierte der Genotyp 793B in Deutschland.

## 5.7 Schlussfolgerungen

Der erstmals 1930 in den USA isolierte Stamm Massachusetts hatte über lange Zeiträume die größte geographische Verteilung in der Welt erlangt. Begünstigt durch die Verwendung dieses Stammes als attenuierter Impfstoff, wird Massachusetts-Virus in vielen Ländern von Nord- und Südamerika, Europa und Asien isoliert bzw. re-isoliert.

IGNJATOVIC et al. (2006) nannten drei wichtige Faktoren, die in der Evolution von IBV eine Rolle gespielt haben können: (i) inhärente hohe Mutationsfähigkeit des RNA-Genoms, (ii) durchgehend örtlich und zeitlich vielfache Einsätze von Lebendimpfstoffen und (iii) vorhandene Immunität der Hühner erlaubt, dass sich nur „escape-Mutanten“ vermehren können. Weil sich IBV in verschiedenen Organen repliziert, kann dies zur genetischen Vielfalt, besonders innerhalb des S1-Gens des IBV, beisteuern (CAVANAGH et al., 2005). Dies kann als vierter Faktor bei der Evolution des IBV betrachtet werden.

Die variable Region innerhalb des S1-Glykoproteins beinhaltet Epitope zur Anheftung des Virus an Wirtszellen und immunologischer Erkennung. Infolgedessen, um dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen, kann die positive Selektion in dieser Region durch Aminosäureänderungen geschehen. Dies gilt besonders für den Genotyp Massachusetts, der der zweithäufigste in dieser Arbeit identifizierte Genotyp ist. Dieser Stamm findet weltweit einschließlich in Deutschland seit mehreren Jahrzehnten als Impfstoff Verwendung. Um die genomischen Merkmale des weltweit am häufigsten verwendeten Impfstoffs H120 (Massachusetts) und dessen Rolle in der Epidemiologie zu verstehen, wurde das komplette Genom sequenziert und mit Sequenzen anderer IBV-Stämme durch phylogenetische Analyse verglichen (ZHANG et al., 2010). Es wurde beobachtet, dass der virulente Stamm ZJ971 aus Hühnern mit Proventrikulitis seinen Ursprung vom Impfstoff H120 haben könnte. Außerdem wurden mögliche Rekombinationen zwischen H120 und fünf IBV-Stämmen, einschließlich H52, KQ6, SAIBK, Ark DPI 11 und Ark DPI 101, gefunden. Diese Studie lässt auch vermuten, dass der Impfstoff H120 zur Entstehung neuer Varianten von IBV durch Rekombination beigetragen haben könnte.

Da die Lebendimpfviren durch Rekombinationen mit den Feldviren zur Entstehung neuen Varianten führen, muss man vermeiden, sie als Impfstoff zu verwenden. Zur Immunisierung der Hühner müssen die Inaktivimpfstoffe vorgezogen werden.

Der am häufigsten in dieser Arbeit identifizierte Genotyp ist der 1979 erstmals isolierte holländische Variantstamm D274. Dieser Stamm war im Nachbarland Belgien von 1989 bis 1995 der dominante Stamm (MEULEMANS et al., 2001).

Der zweithäufigste in dieser Arbeit identifizierte Genotyp ist wie oben erwähnt der Genotyp Massachusetts.

Das dritthäufigste in dieser Arbeit charakterisierte Isolat gehört dem Genotyp 793B (4/91) an. Der Stamm 793B wurde zum ersten Mal 1985 in Frankreich und später im Jahre 1990 auch in Großbritannien identifiziert. Er verbreitete sich in verschiedenen Ländern in Europa, Asien und Nordamerika. Die Stämme D274 und 793B finden in Deutschland ebenso als Lebendimpfstoffe Verwendung.

Der in dieser Arbeit durch Sequenzierung erfasste Stamm B1648 wurde zum ersten Mal 1984 in Belgien von Hühnern mit Nephritis-Nephrosis-Symptomen (MEULEMANS et al., 1987) und später in Italien von Hühnern mit ähnlichen Symptomen isoliert (CAPUA et al., 1999). Der Stamm Italy 02 wurde erstmalig 1999 in Italien aus Broilern isoliert (JONES et al., 2005; DOLZ et al., 2006).

Angesicht ihrer ersten Isolierungen in Ländern wie Frankreich, Italien, Großbritannien und Belgien kann man schlussfolgern, dass die in dieser Arbeit identifizierten Genotypen 793B, Italy 02 und Belgian B1648 vermutlich von den erwähnten Ländern nach Deutschland transportiert wurden.

Im Allgemeinen galt lange Zeit die Auffassung, dass das Wirtsspektrum des IBV nicht über die galliformen Vögel hinausgeht. Jedoch wurde das IBV in China aus verschiedenen Vögeln wie Enten (engl. Common teal, *Nettion crecca*), die im engen Kontakt mit Hühnern stehen, isoliert (LIU et al., 2005). Dass das IBV sich auch in nicht galliformen Vögeln wie Enten, die zur Ordnung Anseriformes gehören und zu der auch viele Mitglieder Zugvögel zählt, zu replizieren, ermöglicht folglich den Transport des IBV, wie QX-IBV, über lange Strecken bis nach Europa. Diese Hypothese wurde von CAVANAGH (2005) aufgestellt.

Die wesentliche Rolle spielen aber der Handel mit Hühnern, Hühnerfleisch, Eier und nicht ordnungsgemäß entsorgte Tierabfälle bei der Verbreitung und Einschleppung des IBV.

Es wurde in der vorliegenden Arbeit die Existenz von fünf Genotypen, die zur Zeit auch anderswo in Europa zirkulieren, durch die Resultate der genotypspezifischen RT-PCR bestätigt. Ferner lassen die Sequenzierungsergebnisse vermuten, dass der Genotyp QX-IBV seit der Jahrtausendwende auch in Deutschland präsent ist. Die relativ niedrige Sequenzhomologie von zwei Isolaten (IB291 und EK316/06) zu IS/885 bzw. PA/1220/98 weist eventuell auf Variantfeldviren hin.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Virus der Infektiösen Bronchitis (IBV) verursacht eine hoch ansteckende Krankheit der Hühner mit Beteiligung des Respirations- und manchmal des Urogenitaltrakts, die zum Abfall der Legeleistung mit verminderter Eiqualität führt. Einige Stämme dieses Virus zeigen einen renalen Tropismus und verursachen bis zu 30 % Sterblichkeit in den betroffenen Herden. Trotz des intensiven Einsatzes von Impfungen ist die infektiöse Bronchitis (IB) weltweit ein sehr bedeutendes Problem in der Geflügelindustrie und verursacht noch immer große wirtschaftliche Verluste in vielen Ländern, darunter auch in Deutschland.

Die Isolierung und genaue Typisierung von IBV-Feldisolaten sind nicht nur für die Evolution des Virus bedeutsam, sondern auch für wirksame Änderungen der bestehenden Impfprogramme. Traditionelle Methoden zur Identifizierung von IBV-Serotypen, wie Hämagglutinationshemmungstest und Virusneutralisationstest, sind arbeitsintensiv und zeitaufwändig. Seit Anfang der 1990er Jahre wurde die Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) für die schnelle Identifizierung von IBV-Genomen erfolgreich angewandt. Die genotypspezifische RT-PCR und / oder die Sequenzierung des S1-Gens mit Hilfe geeigneter Primer wurden für die rasche Differenzierung von IBV-Stämmen ebenso als sehr hilfreich erkannt.

In der vorliegenden Studie wurden 82 Isolate in Form von virushaltiger Allantoisflüssigkeit untersucht, die zwischen 1978 und 2006 in Deutschland isoliert, gesammelt und als IBV-verdächtige Isolate eingefroren wurden. Für den Nachweis von IBV in diesen Proben wurden sowohl konventionelle RT-PCR als auch Real Time RT-PCR mit Oligonukleotidpaaren, die innerhalb der sehr konserviert erhaltenen Region des N-Gens binden, durchgeführt.

Es wurden verschiedene Äußere-RT-PCR und Nested-Multiplex-PCRs durchgeführt, um fünf verschiedene Genotypen bzw. Typen von IBV: Massachusetts, D274, D1466, 793B (auch als 4/91 und CR88121 bekannt) und Italy 02 nachzuweisen und zu differenzieren.

Insgesamt wurden alle 82 Isolate durch Nachweis des N-Gens als IBV identifiziert. 76 von 82 Isolaten konnten durch auf dem S1-Gen basierenden genotypspezifischen Nested-Multiplex-PCR's differenziert werden. 25 Isolate gehören zum Genotyp D274, 24 zum Genotyp Massachusetts, 14 zum Genotyp 793B, sechs Isolate zum Genotyp D1466, sechs Isolate erwiesen sich als Mix-Isolate und lediglich ein Isolat als Genotyp Italy 02. Bei den Mix-Isolaten handelte es sich um vier Isolate Massachusetts/D274, ein Isolat aus Massachusetts/793B und ein Isolat aus Italy 02/793B Mischkulturen. Die sechs Isolate, die nicht mittels Nested-Multiplex-PCR differenziert werden konnten, wurden mit dem

Oligonukleotidpaar S1uni (-) und XCE1 (+) bzw. XCE3 (-) und XCE1 (+) amplifiziert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Sequenzen anderer Isolate in der Genbank verglichen. Zwei von sechs sequenzierten Isolaten zeigten eine vollständige Sequenzhomologie (100 %) mit dem chinesischen QX-IBV. Ein Isolat hatte 97 % Homologie mit dem belgischen B1648. Ein anderes Isolat hatte 91 % Homologie mit dem Isolat IS/885. Eine viel niedrigere Homologie (83 %) zeigte ein Isolat mit Isolat PA/1220/98. Bei einem anderen Isolat wurde eine 99 %ige Sequenzhomologie mit FR-94047-94 festgestellt.

Die meisten der differenzierten Isolate waren den Genotypen D274 und M41 zuzuordnen. Der dominierende Genotyp in den 1980er Jahren war der Genotyp D274. Der Genotyp M41 wurde regelmäßig während der gesamten Untersuchungszeit isoliert. Die Ergebnisse zeigen seit 1991 eine weite Verbreitung des Genotyps 793B in Deutschland. Der Genotyp Italy 02 tritt erst nach 2001 und eher selten auf. Die hohe Sequenzhomologie mit dem chinesischen Genotyp QX-IBV von zwei Isolaten, die aus dem Jahre 2004 stammen, lässt vermuten, dass QX-IBV erst seit Beginn dieses Jahrtausends in Deutschland präsent ist. Darüber hinaus zeigen die Sequenzierungsergebnisse die gleichzeitige Koexistenz von verschiedenen Varianten des IBV im erwähnten Zeitraum in Deutschland.

## 7 SUMMARY

### **Molecular studies on 82 field isolate and 9 reisolate of IB live vaccines of infectious bronchitis virus (Coronaviridae, species group 3) of domestic chicken (*Gallus gallus*)**

Infectious bronchitis virus (IBV) causes a highly contagious disease in chickens that affects the respiratory and sometimes urogenital tract. IBV infection leads to reduced egg production and eggshell quality in layer hens and some virus strains exhibit a renal tropism and produce up to 30 % mortality in affected flocks. In spite of intensive vaccination programmes, infectious bronchitis (IB) is still a major health problem in the poultry industry and causes economic losses in many countries, including Germany.

The isolation and typing of IBV field isolates are very important not only for the study of virus evolution, but also for effective modifications of vaccination programmes. Traditional methods for identification of IBV serotypes, haemagglutination-inhibition and virus neutralization tests, are both labour-intensive and time consuming. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) has been successfully applied for rapid identification of IBV genomes since the early 1990s. Type-specific RT-PCR and/or nucleotide sequencing of the S1 gene region using appropriate primers are recognized as useful and fast techniques for the differentiation of IBV field strains.

In this present study, 82 samples of IBV in allantoic fluid were investigated. The samples were collected in Germany between 1978 to 2006 and temporarily stored as IBV-like isolates. For the detection of IBV in these samples, both conventional RT-PCR as well as real time RT-PCR with oligonucleotide pairs binding within highly conserved region of the N gene, were used.

Different outer-RT-PCR's and Nested-Multiplex-PCR's were performed to detect and differentiate five genotypes of IBV: Italy 02, Massachusetts, D1466, D274 and 793B (also known as 4/91 and CR88121).

All of the 82 samples were identified as IBV by detecting the N gene. 76 of the 82 isolates could be differentiated by Nested-Multiplex-PCR based on the S1 gene: 25 isolates as D274, 24 isolates as Massachusetts, 14 isolates as 793B, six isolates as D1466, six isolates as mix-type and one isolate Italy 02. The six isolates which could not be differentiated by Nested-Multiplex-PCR, were amplified with oligonucleotide pair S1uni (-) and XCE1 (+) or XCE3 (-) and XCE1 (+) and subsequently sequenced. The obtained sequences were compared with

sequences of other isolates in the gene bank. Two of six sequenced isolates showed a high sequence homology (100 %) with the S1 amplified fragment of the IBV Chinese QX-IBV. One isolate had 97 % similarity to Belgian B1648, one isolate had 91 % to IS/885. A much lower (83 %) similarity was observed between one of the sequenced isolates with PA/1220/98. One isolate had 99 % similarity to FR-94047-94 strain.

The majority of the differentiated genotypes were D274 and M41. The dominant genotype in the 80`s was genotype D274. The genotype M41 was frequently isolated during the time period from 1978 to 2006. The results indicate an active circulation of the genotype 793B in Germany since 1991. The genotype Italy 02 occurred infrequently after 2001. The high sequence homology between the two isolates collected in 2004 might indicate the introduction of a novel IBV variant QX-IBV into Germany at the beginning of the millenium. Furthermore the sequence analysis revealed the co-existence of different variants of IBVs during the time of investigation in Germany.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

ADZHAR, A. B., SHAW, K., BRITTON, P. and CAVANAGH, D. (1996): Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathology* **25**, 817-836.

ALBASSAM, M. A., WINTFIELD, R. W. and THACKER, H. L. (1986): Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* **30**, 468-476.

ALEXANDER, D. J., BRACEWELL, C. D. and GOUGH, R. E. (1976): Preliminary evaluation of the haemagglutination and haemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* **5**, 125-134.

ALEXANDER, D. J. and GOUGH, R. E. (1977): Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. *Research in Veterinary Science* **23**, 344-347.

ALVARADO, I. R., VILLEGAS, P., EL-ATTRACHE, J. and JACKWOOD, M. W. (2006): Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. *Avian Diseases* **50**, 292-297.

ANDRADE, L. F., VILLEGAS, P. and FLETCHER, O. J. (1983): Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: Effect of vaccine strain and route of administration. *Avian Diseases* **27**, 178-187.

ANDREASEN, J. R., JACKWOOD, M. R. and HILT, D. A. (1991): Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* **35**, 216-220.

ASPLIN, F. D. (1948): Identification of infectious bronchitis in England. *The Veterinary Record* **60**, 485-486.

AZAD, G. A., MARANDI, M. V. and AMINAE H, K. (2005): Detection and molecular characterisation of infectious bronchitis viruses by RT-PCR/RFLP and sequencing. Proceedings of the 14th World Veterinary Poultry Congress, Istanbul, 22-26 August 2005, S. 259.

BARR, D. A., REECE, R. L., O'ROURKE, D., BUTTON, C. and FARAGHER, J. T. (1988): Isolation of infectious bronchitis virus from a flock of racing pigeons. *Australian Veterinary Journal* **65**, 228.

BEACH, J. R. and SCHALM, O. W. (1936): A filterable virus, distinct from that of laryngotracheitis, the cause of a respiratory disease of chicks. *Poultry Science* **15**, 199-206.

BEATO, M. S., DE BATTISTI, C., TERREGINO, C., DRAGO, A., CAPUA, I. and ORTALI, G. (2005): Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *The Veterinary Record* **156**, 720.

- BEAUDETTE, F. R., and HUDSON, C. B. (1937): Cultivation of the virus of infectious bronchitis virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **90**, 51-60.
- BECKER, W. B., MCINTOSH, K., DEES, J. H. and CHANOCK, R. M. (1967): Morphogenesis of avian infectious bronchitis virus and related human virus (Strain 229E). *Journal of Virology* **1**, 1019-1027.
- BEHR, K. P., PÖPPEL, M. und REETZ, G. (2003): Schutzimpfungen. In: *Jahrbuch für die Geflügelwirtschaft*, 2003, S. 150-156.
- BERRY, D. M., CRUICKSHANK, J. G., CHU, H. P. and WELLS, R. J. H. (1964): The structure of infectious bronchitis virus. *Virology* **23**, 403-407.
- 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.
- BINGHAM, R. W., MADGE, M. H. and TYRRELL, D. A. (1975): Haemagglutination by avian infectious bronchitis virus- a coronavirus. *Journal of General Virology* **28**, 381-390.
- BINNS, M. M., BOURSNEILL, M. E., CAVANAGH, D., PAPPIN, D. J. and BROWN, T. D. (1985): Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *Journal of General Virology* **66**, 719-7126.
- BINNS, M. M., BOURSNEILL, M. E., TOMLEY, F. M. and BROWN, D. K. (1986): Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. *Journal of General Virology* **67**, 2825-2831.
- BOCHKOV, Y. A., BATCHENKO, G. V., SHCHERBAKOVA, L. O., BORISOV, A. V. and DRYGIN V.V. (2006): Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathology* **35**, 379-393.
- BOOTS, A. M. H., BENAÏSSA-TROUW, B. J., HESSELINK, W., RIJKE, E., SCHRIER, C. and HENSEN, E. J. (1992): Induction of anti-viral immune responses by immunization with recombinant-DNA encoded avian coronavirus nucleocapsid protein. *Vaccine* **10**, 119-124.
- BOUROGÂA, H., MILED, K., GRIBÂA, L., EL BEHI, I. and GHRAM, A. (2009): Characterization of new variants of avian infectious bronchitis virus in Tunisia. *Avian Diseases* **53**, 426-33.
- BOX, P. G., HOLMES, H. C., FINNEY, P. M. and FROYMAN, R. (1988): Infectious bronchitis in laying hens: the relationship between haemagglutination inhibition antibody levels and resistance to experimental challenge. *Avian Pathology* **17**, 349-361.

- BRATU, H., MIKLO, C., MATO, T., BENYEDA, J., PENZES, Z. and PALYA, V. (2004): Epidemiology of avian infectious bronchitis virus in Hungary. Identification of a field recombinant IB. Proceeding of the IV. International Symposium on avian corona- and pneumovirus infections. Rauschholzhausen, Germany, 2004. S. 117-124.
- BROWN, T. P., GLISSON, J. R. ROSALES, G., VILLEGAS, P. and DAVIS, R. B. (1987): Studies of avian urolithiasis associated with an infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* **31**, 629-636.
- BROWN, A. J. and BRACEWELL, C. D. (1988): Effect of repeated infections of chickens with infectious bronchitis viruses on the specificity of their responses. *The Veterinary Record* **122**, 207-208.
- BUMSTEAD, N., HUGGINS, M. B. and COOK, J. K. A. (1989): Genetic differences in susceptibility to a mixture of avian infectious bronchitis virus and E. Coli. *British Poultry Science* **30**, 39-48.
- BUSHNELL, L. D. and BRANDLY, C. A. (1993): Laryngotracheitis in chicks. *Poultry Science* **12**, 55-60.
- von BÜLOW, V. (1964): Züchtung verschiedener Stämme des Hühnerbronchitisvirus vom Typ Massachusetts und Connecticut in Zellkulturen aus Hühnerembryonieren. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **77**, 283-286.
- von BÜLOW, V. (1966): Infektiöse Bronchitis der Hühner. I. Viruszüchtung in Zellkulturen aus Hühnerembryonieren. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, B* **13**, 345-363.
- von BÜLOW, V. (1967): Infektiöse Bronchitis der Hühner. IV. Charakterisierung eines neuen Feldstammes des IB-Virus (IBV 10). *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* **14**: 151-162.
- CAPUA, I., MAWDITT, K., CAVANAGH, D. and GOUGH, R. E. (1998): Serological and molecular characterisation of recent infectious bronchitis virus strains from Italy. Proceeding of the III. International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry, Rauschholzhausen, Germany, 15-18 June 1998. S. 210-214.
- CAPUA, I., MINTA, Z., KARPINSKA, E., MAWDITT, K., BRITTON, P., CAVANAGH, D. and GOUGH, R. E. (1999): Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathology* **28**, 587-592.
- CASAI, R., DOVE, B., CAVANAGH, D. and BRITTON, P. (2003): Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *Journal of Virology* **77**, 9084-9089.
- CAVANAGH, D. (1981): Structural polypeptides of coronavirus IBV. *Journal of General Virology* **53**, 93-103.

- CAVANAGH, D. (1983): Coronavirus IBV: structural characterization of the spike proteins. *Journal of General Virology* **64**, 2577-2583.
- CAVANAGH, D., DARBSHIRE, J. H., DAVIS, P. and PETERS, R. W. (1984): Induction of humoral neutralising and haemagglutination-inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* **13**, 573-583.
- CAVANAGH, D., DAVIS, J. P., DARBYSHIRE, J. H. and PETERS, R. W. (1986): Coronavirus IBV: Virus retaining spike glycopeptide S2 but no S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. *Journal of General Virology* **67**, 1435-1442.
- CAVANAGH, D. and DAVIS, J. P. (1986): Coronavirus IBV: Removal of spike glycopeptide S2 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells. *Journal of General Virology* **67**, 1443-1448.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. J. and MOCKETT, A. P. A. (1988): Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitops. *Virus Research* **11**, 141-150.
- CAVANAGH, D. and DAVIS, P. J. (1988): Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes. *Journal of General Virology* **69**, 621-629.
- CAVANAGH, D. and DAVIS, P. J. (1992): Sequence analyses of strains of avian infectious bronchitis coronavirus isolated during the 1960s in the U.K. *Archives of Virology* **130**, 471-476.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. J. and COOK, J. K. A. (1992a): Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. *Avian Pathology* **21**, 401-408.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. J., COOK, J. K. A., LI, D., KANT, A. and KOCH, G. (1992): Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* **21**, 33-43.
- CAVANAGH, D., BRIAN, D. A., BRINTON, M. A., ENJUANES, L., HOLMES, K. V., HORZINEK, M. C., LAI, M. M. C., LAUDE, H., PLAGEMANN, P. G. W., SIDDELL, S. G., SPAAN, W. J. M., TAGUCHI, F. and TALBOT, P. J. (1995): Coronaviridae. In: 6<sup>th</sup> Report on the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: MURPHY, F. A., FOUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., GHABRIAL, S. A., JARVIS, A. W., MARTELLI, G. P. and SUMMERS, M. D. (eds.). Springer Verlag, Wien-New York, S. 407-411.
- CAVANAGH, D. (1995): The coronavirus surface glycoprotein. *The Coronaviridae*. In: SIDDELL, S. G. (Ed.). Plenum Press. New York. USA, S. 90-93.
- CAVANAGH, D. (1997): Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Archives of Virology* **142**, 629-633.

CAVANAGH, D. and NAQI, S. (1997): Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W., BARNES, H. J., BEARD, C. W., MCDOUGALD, L. R. and SAIF, Y.M. (eds.). Diseases of Poultry. 10<sup>th</sup> Ed. Iowa State University Press: Ames, IA, S. 511-526.

CAVANAGH, D., ELLIS, M. M. und COOK, J. K. A. (1997a): Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection *in vivo*. Avian Pathology **26**, 63-74.

CAVANAGH, D., MAWDITT, K., SHAW, K., BRITTON, P., NAYLOR, C. (1997b): Towards the routine application of nucleic acid technology for avian disease diagnosis. Acta Veterinaria Hungarica **45**, 281-298.

CAVANAGH, D. (1998): Discussion of issues raised during the 1998 international symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infections in poultry. International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry, Rauischholzhausen, Germany, 15-18 June 1998, S. 373-380.

CAVANAGH, D., MAWDITT, K., BRITTON, P. and NAYLOR, C. J. (1999): Longitudinal studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reaction. Avian Pathology **28**, 593-605.

CAVANAGH, D., MAWDITT, K., SHARMA, M., DRURY, S. E., AINSWORTH, H. L., BRITTON, P. and GOUGH, R. E. (2001): Detection of a coronavirus from turkey poult in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. Avian Pathology **30**, 365-368.

CAVANAGH, D., MAWDITT, K., WELCHMAN, D., BRITTON, P. and GOUGH, R. E. (2002): Coronaviruses from pheasant (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. Avian Pathology **31**, 81-93.

CAVANAGH, D. and NAQI, S. A. (2003): Infectious Bronchitis. In: SAIF, M., BARNES, H. J., GLISSON, J. R., FADLY, A. M., MCDOUGALD, L. R., and SWAYNE, D. E. (eds.). Diseases of Poultry, 11<sup>th</sup> Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, S. 101-119.

CAVANAGH, D. (2005): Coronaviruses in poultry and other birds Avian Pathology **34**, 439-448.

CAVANAGH, D., PICAULT, J. P., GOUGH, R., HESS, M., MAWDITT, K. and BRITTON, P. (2005): Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. Avian Pathology **34**, 20-25.

CAVANAGH, D. and J. JR GELB (2008): Infectious Bronchitis. In: SAIF, M., FADLY, A. M., GLISSON, J. R., MCDOUGALD, L. R., NOLAN, L. K. and SWAYNE, D. E. (eds.). Diseases of Poultry, 12<sup>th</sup> Ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, S. 117-135.

- CEGLA, C. (1986): Untersuchungen zur Epizootiologie und Pathogenität der sogenannten Variantstämme des Virus der infektiösen Bronchitis des Huhnes sowie zur Immunität nach Einsatz eines Formalin-inaktivierten Ölemulsionsimpfstoffs mit den IB Virus Stämmen M41, D274, D1466. Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades bei dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität zu Gießen, Gießen.
- CHEN, H. W., HUANG, Y. P., and WANG, C. H. (2009): Identification of Taiwan and China-like recombinant avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Virus Research* **140**, 121- 129.
- CHEN, H. W. and WANG, C. H. (2010): A multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the genotyping of infectious bronchitis viruses. *Avian Diseases* **54**, 104-108.
- CHOMIAK, T. W., LUGINBUHL, R. E. and JUNGHER, E. L. (1958): The propagation and cytopathogenic effect of an egg-adapted strain of infectious bronchitis virus in tissue culture. *Avian Diseases* **2**, 456-465.
- CLARKE, K. J., MCFERRAN, J. B. and GAY, F. W (1972): Use of allantoic cells for the detection of avian infectious bronchitis virus. *Archives of Virology* **36**, 62-70.
- CLEWLEY, J. P., MORSER, J., AVERY, J.R. and LOMNICZI, B. (1981): Oligonucleotide fingerprinting of ribonucleic acids of infectious bronchitis virus strains. *Infection and Immunity* **32**, 1227-1233.
- COOK, J. K. A., DARBYSHIRE, J. H. and PETERS, R. W. (1976): The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Archives of Virology* **50**, 109-118.
- COOK, J. K. A. (1983): Isolation of a new serotype of IB-like virus from chickens in England. *The Veterinary Record* **112**, 104-105.
- COOK, J. K. A. (1984): The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian Pathology* **13**, 733-741.
- COOK, J. K. A. and HUGGINS, M. B. (1986): Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus: Their role in disease. *Avian Pathology* **15**, 129-138.
- COOK, J. K. A., BROWN, A. J. and BRACEWELL, C. D. (1987): Comparison of the hemagglutination inhibition test and the serum neutralization test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. *Avian Pathology* **16**, 505-511.
- COOK, J. K. A., OTSUKI, K., DA SILVA MARTINS, N. R., ELLIS, M. M. and HUGGINS, M. B. (1992): The secretary antibody response on inbred lines of chickens to avian infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathology* **21**, 681-692.
- COOK, J. K. A., HUGGINS, M. B., ORBELL, S. J., MAWDITT, K. and CAVANAGH, D. (2001): Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. *Avian Pathology* **30**, 233-242.

- CORBO, L. J. and CUNNINGHAM, C. H. (1959): Haemagglutination by trypsin modified infectious bronchitis virus. *American Journal of Veterinary Research* **20**, 876-883.
- CORIA, M. F. and RITCHIE, A. E. (1973): Serial passage of 3 strains of avian infectious bronchitis virus in African green monkey kidney cells (VERO). *Avian Diseases* **17**, 697-704.
- COWEN, B. S., HITCHNER, S. B. and LUCIO, B. (1971): Characterization of a new infectious bronchitis isolate. I. Serological and pathogenicity studies of Clark 333. *Avian Diseases* **15**, 518-526.
- COWEN, B. S. and HITCHNER, S. B. (1975): pH stability studies with avian infectious bronchitis virus (Coronavirus) strains. *Journal of Virology* **15**, 430-432.
- COWEN, B. S., WIDEMAN, R. F., ROTHENBACHER, H. and BRAUNE, M. O. (1987): An outbreak of avian urolithiasis on a large commercial egg farm. *Avian Diseases* **31**, 392-397.
- CRINION, R. A. P. and HOFSTAD, M. S. (1972): Pathogenicity of four serotypes of avian bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Diseases* **16**, 351-363.
- CRINION, R. A. P. (1972): Egg quality and production following infectious bronchitis virus exposure at one day old. *Poultry Science* **51**, 582-585.
- CUMMING, R. B. (1963): Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Australian Veterinary Journal* **39**, 145-147.
- CUMMING, R. B. (1969): The control of avian infectious bronchitis/nephrosis in Australia. *Australian Veterinary Journal* **45**, 200-203.
- CUMMING, R. B. and CHUBB, R. C. (1988): The pathogenesis of nephritis evoked by Australian IB viruses. *Proceedings of the I. International Symposium on Infectious Bronchitis, Rauischholzhausen, Germany, 1988*. S. 129-132.
- CUNNINGHAM, C. H. and STUART, H. O. (1946): The effect of certain chemical agents on the virus of infectious bronchitis of chicks. *American Journal of Veterinary Research* **7**, 466-469.
- CUNNINGHAM, C. H. (1957): Symposium on immunization against infectious bronchitis virus. I. Some basic properties of infectious bronchitis virus. *American Journal of Veterinary Research* **18**, 648-654.
- CUNNINGHAM, C. H. (1966): Newer information on the properties of infectious bronchitis virus. *13<sup>th</sup> World Poultry Congress, Kiev 1966*, S. 416-418.
- DARBYSHIRE J. H., COOK J. K. A. and PETERS R. W. (1975): Comparative growth kinetic studies on avian infectious bronchitis virus in different systems. *Journal of Comparative Pathology* **85**, 623-630.

- DARBYSHIRE J. H., COOK J. K. A. and PETERS, R. W. (1978): Growth comparisons of avian infectious bronchitis virus strains in organ cultures of chicken tissues. *Archives of Virology* **56**, 317-325.
- DARBSHIRE, J. H., ROWELL, J. G., COOK, J. K. A. and PETERS, R. W. (1979): Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. *Archives Virology* **61**, 227-238.
- DARBYSHIRE, J. H. and PETERS, R. W. (1985): Humoral antibody response and assessment of protection following primary vaccination of chicks with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. *Research in Veterinary Science* **38**, 14-21.
- DAVELAAR, F. G., KOUVENHOVEN, F. G. and BURGER, A. G. (1981): Investigations into the significance of IBV variant strains in broiler and egg production. *Proceedings of World Veterinary Poultry Association, Oslo, 1981*, S. 44.
- DAVELAAR, F. G., KOUVENHOVEN, F. G. and BURGER, A. G. (1984): Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in eggs and broiler productions in The Netherlands. *Veterinary Quarterly* **6**, 114-120.
- DAVELAAR, F. G., KOUWENHOVEN, B. and BURGER, A. G. (1983): Experience with vaccination against infectious bronchitis in broilers and significance of and vaccination against infectious bronchitis variant viruses in breeders and layers in the Netherlands. *La Clinica Veterinaria* **109**, 7-11.
- DELAPLANE, J. P. and STUART, H. O. (1939): Studies of infectious bronchitis. *Rhode Island Agricultural Experiment Station, RI. Bulletin* **273**.
- DELAPLANE, J. P. (1947): Technique for isolation of infectious bronchitis or Newcastle virus including observation on the use of streptomycin in overcoming bacterial contaminant. *Veterinary Bulletin* **21**.
- DE VRIES, A. A., HORZINEK, M. C., ROTTIER, P. J. and DE GROOT, R. J. (1997): The genome organisation of the Nidovirales: Similarities and differences between arteri- toro- and coronaviruses. *Seminars in Virology* **8**, 33-47.
- DE WIT, J. J., KOCH, G., KANT, A. and VAN ROOZELAAR, D. J. (1995): Detection by immunofluorescent assay of serotyp-specific and group-specific antigens of infectious bronchitis virus in tracheas of broilers with respiratory problems. *Avian Pathology* **24**, 465-474.
- DE WIT, J. J., MEKKES, D. R., KOUWENHOVEN, B. and VERHEIJDEN, J. H. M. (1997): Sensitivity and specificity of serological tests for the detection of infectious bronchitis virus induced antibodies in broilers. *Avian Pathology* **26**, 105-118.
- DE WIT, J. J. (1998): Detection of IgM by ELISA after IBV vaccination. *Proceedings of Internatonal Symposium on IB and Pneumovirus infections in poultry, Rauschholzhausen, Germany, 15-18 June, 1998*. S. 361-365.
- DE WIT, J. J. (2000): Detection of infectious bronchitis. *Avian Pathology* **29**, 71-93.

- DIMOPOULUS, G. T. and CUNNINGHAM, C. H. (1956): Electrophoretic and serum neutralisation studies of infectious bronchitis of chickens. *American Journal of Veterinary Research* **17**, 755-761.
- DOLZ, R., PUJOLS, J., ORDONEZ, G., PORTA, R. and MAJO, N. (2006): Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathology* **35**, 77-85.
- DOMAŃSKA-BLICHAZ, K., ŚMIETANKA, K. and MINTA, Z. (2007): Molecular studies on infectious bronchitis virus isolated in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **51**, 449-452.
- DUCATEZ, M. F., MARTIN, A. M., OWOADE, A. A., OLATOYE, I. O., ALKALI, B. R., MAIKANO, I., SNOECK, C. J., SAUSY, A., CORDIOLI, P., and MULLER, C. P. (2009): Characterization of a new genotype and serotype of infectious bronchitis virus in Western Africa. *Journal of General Virology* **90**, 2679-2685.
- EISENGARTEN, H.-J. (1964): Untersuchungen mit Hilfe der Präzipitationsreaktion im Agar-Gel über das Vorkommen und Verbreitung der infektiösen Bronchitis der Hühner im Bezirk Gera (Ostthüringen). *Monatshefte für Veterinärmedizin* **19**, 771-773.
- EL HOUADFI, M., EL BOUZIDI, H., NAJAT OUALIT, JONES, R. C., JORDAN, F. T. W. and COOK, J. K. A. (1991): Enterotropic infectious bronchitis (strain G) in Layers. *Proceedings of the II. International Symposium on Infectious Bronchitis, Rauschholzhausen, Germany, June 3-6, 1991*, S. 127-136.
- ENJUANES, L., BRIAN, D., CAVANAGH, D., HOLMES, K. V., LAI, M. M., LAUDE, H., MASTERS, P. S., ROTTIER, P. J., SIDDEL, S. G., SPAAN, W., TAGUCHI, F. and TALBOT, P. J. (2000): Coronaviridae. In: VAN REGENMORTEL, M. H., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H., CARSTEN, E. B., ESTES, M. K., LEMON, MCGEOCH, D. J., MANILOFF, J., MAYO, M., PRINGLE, C. R. and WICKNER, R. B. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Academic Press, New York, S. 835-849.
- ESTOLA, T. (1966): Studies on the infectious bronchitis virus of chickens isolated in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica* **18**, 1-111.
- FABRICANT, J. (1998): The early history of infectious bronchitis. *Avian Diseases* **42**, 648-650.
- FAHEY, J. E. and CRAWLEY, J. F. (1956): Propagation of infectious bronchitis virus in tissue culture. *Canadian Journal of Microbiology* **2**, 503-510.
- FALCONE, E., D'AMORE, E., DI TRANI, L., SILI, A. and TOLLIS, M. (1997): Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* **64**, 125-130.
- FARSANG A., ROS, C., RENSTROM L. H., BAULE, C., SOOS, T. and BELAK, S. (2002): Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain. *Avian Pathology* **31**, 229-236.

- FIELDS, D. B. (1973): Arkansas 99, a new infectious bronchitis serotype. *Avian Diseases* **17**, 659-661.
- GANAPATHY, K. und BRADBURY, J. M. (1999): Pathogenicity of *Mycoplasma imitans* in mixed infection with infectious bronchitis virus in chickens. *Avian Pathology* **28**, 229-237.
- GELB, J. JR., PERKINS, B. E., ROSENBERGER, J. K. and ALLEN, P. H. (1981): Serologic and cross-protection studies with several infectious bronchitis virus isolates from Delmarva-reared broiler chickens. *Avian Diseases* **25**, 655-666.
- GELB, J. and KILLIAN, S.L. (1987): Serum antibody responses of chickens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Diseases* **31**, 513-522.
- GELB, J. JR. (1989): Infectious Bronchitis. In: PURCHASE, H .G., ARP, L. H., DOMERMUTH, C. H. and PEARSON, J. E. (eds.). *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. American Association of Avian Pathologists, 3rd edn, pp. 124-127.
- GELB, J. JR., WOLF, J. B. and MORAN, C. A. (1991): Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Diseases* **35**, 82-87.
- GELB, J. JR., WEISMAN, Y., LADMAN, B. S. and 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 Pathology*. **34**, 194-203.
- GILETTE, K. G. (1973): Plaque formation by infectious bronchitis virus in chicken embryo kidney cell cultures. *Avian Diseases* **17**, 369-378.
- GILETTE, K. G. (1974): Avian infectious bronchitis: demonstration of serum IgG and IgM neutralising antibody by sucrose density-gradient centrifugation and mercapto-ethanol reduction. *Avian Diseases* **18**, 515-525.
- GILETTE, K. G. (1981): Local antibody response in avian infectious bronchitis: virus neutralization antibody in tracheobronchial secretions. *Avian Diseases* **25**, 431-443.
- GONZALES, J. M., GOMEZ-PUERTAS, P., CAVANAGH, D., GORBALENYA, A. E. and ENJUANES, L. (2003): A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Archives of Virology* **148**, 2207-2235.
- GOUGH, R. E., RANDALL, C. J., DAGLESS, M. ALEXANDER, D. J., COX, W. J. and PEARSON, D. (1992): A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *The Veterinary Record* **130**, 493-494.
- GOUGH, R. E., COX, W. J., WINKLER, C. F., SHARP, M. W. and SPACKMAN, D. (1996): Isolation and identification of infectious bronchitis virus from pheasant. *The Veterinary Record* **138**, 208-209.

- GOUGH, R., CULVER, F., BRITTON, P. and CAVANAGH, D. (2006): Isolation of a coronavirus from a green-cheeked amazon parrot (*Amazona viridigenalis cassin*) with suspected proventricular dilatation disease (PDD). Proceedings of the V. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Germany, 14-16 May, 2006, S. 203-211.
- GUY, J. S. (2000a): Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses. *Avian Pathology* **29**, 206-212.
- GUY J. S., SMITH, L. G., BRESLIN, J. J., VAILLANCOURT, J. P. and BARNES, H. J. (2000b): High mortality and growth depression experimentally produced in young turkeys by dual infection with enteropathogenic *Escherichia coli* and turkey coronavirus. *Avian Diseases* **44**, 105-113.
- GUY, J. S. (2003): Turkey coronavirus enteritis. In: SAIF, M., BARNES, H. J., GLISSON, J. R., FADLY, A. M., MCDOUGALD, L. R., and SWAYNE, D. E. (eds.). *Diseases of Poultry*, 11<sup>th</sup> Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, S. 300-307.
- HANDBERG, K. J., NIELSEN, O. L., PEDERSEN, M. W. and JORGENSEN, P. H. (1999): Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissue from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. *Avian Pathology* **28**, 327-335.
- HANDBERG, K. J., KABELL, S., OLESEN, L. and JØRGENSEN, P. H. (2009): Sequence analysis of IBV from outbreaks in Denmark 2006-2009. Proceeding of VI. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses, Rauschholzhausen, Germany, 14-17 June, 2009, S. 7-12.
- HEIN, R. G., SLACUM, G. and LYNCH, P. (1998): *In-vivo* characterization of recent infectious bronchitis virus (IBV) variants isolated from broilers in the USA. Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus infections in Poultry, Rauschholzhausen, Germany, 15-18 June, 1998, S. 220-225.
- DE HERDT, P., DUCATELLE, R., UYTTEBROEK, E., HERMANS, J., SNEEP, A. and TORBEYNS, R. (1998): Infectious bronchitis serology in broilers and broiler parents: Correlations between antibody titres and performance in vaccinated flocks. Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus infections in poultry, Rauschholzhausen, Germany, 15-18 June 1998, S. 352-360.
- HESS, M. und MONREAL, G. (2005): Coronaviridae. In: SIEGMANN, O. und NEUMANN, U. *Kompodium der Geflügelkrankheiten*, 6. Auflage, S. 152-156.
- HESS, M. und MONREAL, G. (2005): Adenoviridae. In: SIEGMANN, O. und NEUMANN, U. *Kompodium der Geflügelkrankheiten*, 6. Auflage, S. 168-178.

- HESELINK, W. G., SCHRIER, C., JAGT, E. and HOCKS, J. (1988): Detection of IBV antigen by enzyme immunoassay: application for diagnostic purposes. Proceedings of the I. International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauschholzhausen, Germany, 23-26 June, 1988. S. 54.
- HEWSON K. A., O'ROURKE, D. and NOORMOHAMMADI, A. H. (2010): Detection of avian nephritis virus in Australian chicken flocks. *Avian Diseases* **54**, 990-993.
- HINZ, K. H. (1993): Pasteurellaceae. In SIEGMANN, O.: Kompendium der Geflügelkrankheiten, 5. Auflage, S. 208-215.
- HITCHNER, S. B. and WHITE, P. G. (1955): Growth-curve studies of chick embryopropagated infectious bronchitis virus. *Poultry Science* **34**, 590-594.
- HOFSTAD, M. S. (1958): Antigenic differences among isolates of infectious bronchitis. *American Journal in Veterinary Research* **19**, 740-743.
- HOFSTAD, M. S. (1984): Avian infectious bronchitis. In: HOFSTAD, M. S., BARNES, H. J., CALNEK, B. W., REID, W. M. and YODER, H. W (eds.). *Diseases of Poultry*, 8<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press: Ames, IA, S. 429-443.
- HOPKINS, S. R. (1969): Serologic and immunologic properties of a recent isolate of infectious bronchitis. *Avian Diseases* **13**, 356-362.
- HOPKINS, S. R. and YODER, H. W.JR. (1986): Reversion to virulence of chicken passaged infectious bronchitis vaccine virus. *Avian Diseases* **30**, 221-223.
- IGNJATOVIC, J. and GALLI, L. (1995): Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* **24**, 313-332.
- IGNJATOVIC, J. and ASHTON, F. (1996): Detection und differentiation of avian infectious bronchitis viruses using a monoclonal antibody-based ELISA. *Avian Pathology* **25**, 721-736.
- IGNJATOVIC, J. and SAPATS, S. (2000): Avian infectious bronchitis virus. *Revue Scientifique et Technique* **19**, 493-508.
- IGNJATOVIC, J., GOULD, G. and SAPATS, S. (2006): Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Archives of Virology* **151**, 1567-1585.
- ITO, N. M. K., MIYAJI, J. I. and CAPELLARO, C. E. M. P. D. M. (1991): Studies on Broiler's IBV and IB-Like virus from guinea fowl. Proceedings of the II. International Symposium on Infectious Bronchitis, Rauschholzhausen, Germany, 3-6 June, 1991, S. 302-307.
- JACKWOOD, M. W., YOUSEF, N. M. H. and HILT, D. A. (1997): Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* **41**, 105-110.

JACKWOOD, M. W., KWON, H. M. and HILT, D. A. (1992): Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Diseases* **36**, 403-409.

JIA, W., KARACA, K., PARRISH, C. R. and NAQI, S. A. (1995): A novel variant of infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Archives of Virology* **140**, 259-271.

JIA, W., MONDAL, S. P., and NAQI, S. A. (2002): Genetic and antigenic diversity in avian infectious bronchitis virus isolates of the 1940s. *Avian Diseases* **46**, 437-441.

JIMENEZ, C., CORTES, R., RAMIREZ, M., PRENDAS, J., ARRIETA, E., LINDAHL, J., ZUNIGA, C., RODRÍGUEZ, J. and JIMÉNEZ, M. (2004): Diagnosis and epidemiology of ibv infections in Costa Rica. Proceeding of the IV International Symposium on avian corona- and pneumovirus infections., Rauscholzhausen, Germany, 20-23 June, 2004. S. 39-49.

JOHNSON, R. B., MARQUARDT, W. W. and NEWMANN, J. A. (1973): A new serotype of infectious bronchitis virus responsible for respiratory disease in Arkansas broiler flocks. *Avian Diseases* **17**, 518-523.

JONASSEN, C. M., KOFSTAD, T., LARSEN, I. L., LØVLAND, A., HANDELAND, K., FOLLESTAD, A. and LILLEHAUG, A. (2005): A Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of General Virology* **86**, 1597-607.

JONES, R. C. and AMBALI, A. G. (1987): Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. *The Veterinary Record* **120**, 617-620.

JONES, R. C., WORTHINGTON, K. J. and GOUGH, R. E. (2005): Detection of the Italy 02 strain of infectious bronchitis virus in the UK. *The Veterinary Record* **156**, 260.

JUNGHERR, E. L., CHOMIAK, T. W. and LUGINBUHL, R. E. (1956): Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. Proceedings of the 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the US Livestock Sanitary Association, Chicago, S. 203-209.

KALETA, E. F. and CEGLA, C. (1986): Evaluation of vaccination experiments in broiler breeders and layers with live virus and formalin inactivated oil emulsion infectious bronchitis vaccines. In: McFERRAN, J. B. und McNULTY, S. (eds.). *Acute virus infections of Poultry*, S. 153-158.

KALETA, E. F. (1993): Herpesviridae. In: *Kompendium der Geflügelkrankheiten*, 5. Auflage. Herausgeber Siegmann, O. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 171-180.

KALETA, E. F. und WERNER, O. (2005): Newcastle-Krankheit (NK). In: SIEGMANN, O. und NEUMANN, U. (eds.). *Kompendium der Geflügel Krankheiten*, S. 143-148.

- KARACA, K., NAQI, S. and GELB, J. JR. (1992): Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Diseases* **36**, 903-915.
- KARACA, K. and NAQI, S. (1993): A monoclonal antibody-based ELISA to detect serotype-specific infectious bronchitis virus antibodies. *Veterinary Microbiology* **34**, 249-257.
- KEELER, C. L., REED, K. L. JR., NIX, W. A. and GELB, J. JR. (1998): Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S1) gene. *Avian Diseases* **42**, 275-284.
- KINGHAM, B. F., KEELER, C. L., NIX, W. A., LADMAN, B. S. and GELB, J. (2000): Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S1 Gene. *Avian Diseases* **44**, 325-335.
- KLIEVE, A. V. and CUMMING, R. B. (1988): Immunity and cross-protection to nephritis produced by Australian infectious bronchitis viruses used as vaccine. *Avian Pathology* **17**, 829-839.
- KLINGLER, K. (1964): Virusbedingte Respiationskrankheiten in industriellen Betrieben der schweizerischen Geflügelwirtschaft. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **106**, 201.
- KOCH, G., HARTOG, L., KANT, A., VAN ROOZELAAR, D. and DE BOER, G. F. (1986): Antigenic differentiation of avian bronchitis virus variant strains employing monoclonal antibodies. *Israel Journal of Veterinary Medicine* **42**, 89-97.
- KOCH, G., KANT, A., COOK, J. K. A. and CAVANAGH, D. (1991a): Epitopes of neutralizing antibodies are localized within three regions of the S1 spike protein of infectious bronchitis virus. *Proceedings of the II. International Symposium on Infectious Bronchitis, Rauschholzhausen, Germany, 3-6 June, 1991*, S. 154-161.
- KOCH, G., KANT, A., VOS, J. G. and DE BOER, G. F. (1991b): Rapid detection of infectious bronchitis virus by nucleoprotein specific antigen capture assay. *Proceedings of the II. International Symposium on Infectious Bronchitis, Rauschholzhausen, Germany, 3-6 June, 1991*, S. 168-172.
- KÖHLER, H. und BURTSCHER, H. (1959): Zum Vorkommen der chronischen Atmungskrankheit und der infektiösen Bronchitis der Hühner in Österreich. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **46**, 159-171.
- KRIJNSE-LOCKER, J., ERICSSON, M., ROTTIER, P. J. and GRIFFITHS, G. (1994): Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *Journal of Cell Biology* **124**, 55-70.
- KUSTERS, J. G., NIESTERS, H. G. M., BLEUMINK-PLUYM, N. M. C., DAVELAAR, F. G., HORZINEK, M. C. and VAN DER ZEIJST, B. A. M. (1987): Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. *Journal of General Virology* **68**, 343-352.

- KWON, H. M., JACKWOOD, M. W., BROWN, P. B. and GELB, J. (1993a): Polymerase chain reaction a biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. *Avian Diseases* **37**, 149-156.
- KWON, H. M., JACKWOOD, M. W. and GELB, J. (1993b): Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction enzyme length polymorphism analysis. *Avian Diseases* **37**, 194-202.
- LADMAN, B. S., LOUPOS, A. B. and GELB, J. (2006): Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathology* **35**, 127-133.
- LAI, M. M. and CAVANAGH, D. (1997): The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research* **48**, 1-100.
- LASHGARI M. S. and NEWMAN J. A. (1982): Preparing Hemagglutinating Antigen from Isolates of Infectious Bronchitis Virus. *Avian Diseases* **26**, 508-519.
- LEE, C. W. and JACKWOOD, M. W. (2001): Spike gene analysis of the DE072 strain of infectious bronchitis virus: origin and evolution. *Virus Genes* **22**, 85-91.
- LEE, C. W., HILT, D. A. and JACKWOOD, M. W. (2003): Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **15**, 344-348.
- LIN, Z., KUDOU, Y. and UEDA, S. (1991): A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme length polymorphism. *Archives of Virology* **116**, 19-31.
- LISTER, S. A., BEER, J. V., GOUGH, R. G., HOLMES, R. G., JONES, J. M. W. and ORTON, R. G. (1985): Outbreaks of nephritis in pheasant (*Phasianus colchicus*) with possible coronavirus aetiology. *The Veterinary Record* **117**, 612-613.
- LIU, D. X. and INGLIS, S. C., (1991): Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* **185**, 911-917.
- LIU, D. X. and INGLIS, S. C. (1992a): Internal entry of ribosomes on a tricistronic mRNA encoded by infectious bronchitis virus. *Journal of Virology* **66**, 6143-6154.
- LIU, S., CHEN, J., CHEN, J., KONG, X., SHAO, Y., HAN, Z., FENG, L., CAI, X., GU, S. and LIU, M. (2005): Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). *Journal of General Virology* **86**, 719-725.
- 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. and TONG, G. Z. (2006): Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Archives of Virology* **151**, 1133-48.
- LOHR, J. E. (1981): Diagnosis of Infectious bronchitis (IB) by examination of tracheal mucus for IB-precipating antigens. *Avian Diseases* **25**, 1058-1064.

- LOOMIS, L. N., CUNNINGHAM, C. H., GRAY, M. L. and THORP, JR. F. (1950): Pathology of the chicken embryo infected with infectious bronchitis virus. *American Journal of Veterinary Research* **11**, 245-251.
- LUCIO, B. and HITCHNER, S. B. (1970): Differentiation of avian infectious bronchitis virus serotypes by immunofluorescence. *Avian Diseases* **14**, 9-24.
- LUCIO, B. and FABRICANT, J. (1990): Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* **34**, 865-870.
- LUKERT, P. D. (1965): Comparative Sensitivities of Embryonating Chicken's Eggs and Primary Chicken Embryo Kidney and Liver Cell Cultures to Infectious Bronchitis Virus. *Avian Diseases* **9**, 308-316.
- LUKERT, P. D. (1966): A Plaque-Reduction Method for the Detection of Neutralizing Antibodies for Infectious Bronchitis Virus. *Avian Diseases* **10**, 305-313.
- LUKERT, P. D. (1969): Differentiation and detection of infectious bronchitis virus subtypes by immunofluorescence. *Avian Diseases* **13**, 847-852.
- LUKERT, P. D. (1980): In: HITCHNER, S. B., DOMERMUTH, C. H. and WILLIAMS, J. E. (eds.). *Isolation und identification of avian pathogens*. 2<sup>nd</sup> Ed. American Association of Avian Pathologist, College station, Texas, USA, S. 70-72.
- LÜSCHOW, D., DE QUADROS, V. L. and HAFEZ, H. M. (2009): Molecular detection and typing of IBV. *Proceedings of the VI. International Symposium on avian corona- and pneumoviruses*, Rauschholzhausen, Germany, 14-17 June, 2009. S. 114-117.
- LÜTTICKEN, D., DAVELAAR, F. G., KOUVENHOVEN, F. G. and BURGER, A. G. (1983): Significance of variant IB serotypes in the Netherlands. *Proceeding of the 32<sup>nd</sup> Western Poultry Conference*, University of California, Davis, USA, S. 18-20.
- LÜTTICKEN, D. and CORNELISSEN, D. R. W. (1984): Use of the haemagglutination inhibition test for antibodies to avian infectious bronchitis variant strains. *17<sup>th</sup> World's Poultry Congress*, Helsinki, Finland, 525-527.
- MALO VERGARA, A. (1987): Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Veränderungen am Respirations- und Genitaltrakt beim Huhn durch Infektion mit dem Erreger der Infektiösen Bronchitis. *Veterinärmedizinische Dissertation*, Hannover.
- MARDANI, K., NOORMOHAMMADI, A. H., IGNATOVIC, J. and 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 Pathology* **35**, 63-69.

- MARRA, M. A., JONES, S. J. M., ASTELL, C. R., HOLT, R. A., BROOKS-WILSON, A., BUTTERFIELD, Y. S. N., KHATTRA, J., ASANO, J. K.; BARBER, S. A., CHAN, S. Y., CLOUTIER, A., COUGHLIN, S. M., FREEMAN, D., GIRN, N., GRIFFITH, O. L., LEACH, S. R., MAYO, M., MCDONALD, H., MONTGOMERY, S. B., PANDOH, P. K., PETRESCU, A. S., ROBERTSON, A. G., SCHEIN, J. E., SIDDIQUI, A., SMAILUS, D. E., STOTT, J. M., YANG, G. S., PLUMMER, F., ANDONOV, A., ARTSOB, H., BASTIEN, N., BERNARD, K., BOOTH, T. F., BOWNESS, D., CZUB, M., DREBOT, M., FERNANDO, L., FLICK, R., GARBUTT, M., GRAY, M., GROLLA, A., JONES, S., FELDMANN, H., MEYERS, A., KABANI, A.; LI, Y., NORMAND, S., STROHER, U., TIPPLES, G. A., TYLER, S., VOGRIG, R., WARD, D., WATSON, BRUNHAM, B., KRAJDEN, R. C., PETRIC, M., SKOWRONSKI, D. M., UPTON, C. and ROPER, R. L. (2003): The Genome Sequence of the SARS Associated Coronavirus. *Science* **300**, 1399-1404.
- MARQUARDT, W. W., SNYDER, D. B. and SCHLOTTHOBER, B. A. (1981): Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immune sorbent assay. *Avian Diseases* **25**, 713-722.
- McINTOSH, K., DEES, J. H., BECKER, W. B., KAPIKIAN, A. Z. and CHANOCK, R. M. (1967): Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Science* **57**, 933-940.
- MASE, M., KAWANISHI, N., OOTANI, Y., MURAYAMA, K., KARINO, A., INOUE, T. and KAWAKAMI, J. (2009): A novel genotype of avian infectious bronchitis virus isolated in Japan in 2009. *Journal of Veterinary Medical Science* **72**, 1265-1268.
- MEIR, R. (2004): Genotyping of infectious bronchitis viruses in Israel (1995-2003) and protection studies. *Proceedings of the IV. International Symposium on Avian Corona- und Pneumovirus Infections, Rauschholzhausen, Germany, 20-23 June, 2004*, S. 61-67.
- MEIR, R., ROSENBLUT, E., PERL, S., KASS, N., AYALI, G., HEMSANI, E. and PERK, S. (2004): Identification of a novel Nephropathogenic Infectious Bronchitis Virus in Israel. *Avian Diseases* **48**, 635-641.
- MEULEMANS, G., CARLIER, M. C., GONZE, M., PETIT, P. and VANDENBROECK, M. (1987): Incidence, characterisation and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. *The Veterinary Record* **120**, 205-206.
- MEULEMANS, G., BOSCHMANS, M., DECAESSTECKER, M., VAN DEN BERG, T. P., DENIS, T. and CAVANAGH, D. (2001): Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathology* **30**, 411-421.
- MINTA, Z., BUGAJAK, P., KARPINSKA, E., GOUGH, R., CAVANAGH, D., MAWDITT, K., COX, W. J., BARTNICKA, B. and WIERCINSKI, J. (1998): Isolation of a new strains of IBV from broiler chickens in Poland. *Proceedings of the III. International Symposium on avian corona- and pneumovirus infections. Rauschholzhausen, Germany, 15-18 June, 1998.*, S. 180-185.

- MOCKETT, A. P. A. and DARBYSHIRE, J. H. (1981): Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* **10**, 1-10.
- MOCKETT, A. P., CAVANAGH, D. and BROWN, T.D. (1984): Monoclonal antibodies to the S1 spike and membran proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. *Journal of General Virology* **65**, 2281-2286.
- MOCKETT, A. P. A., COOK, J. K. A. and HUGGINS, M. B. (1987): Maternally-derived antibody to infectious bronchitis virus: 1st detection in chick trachea and serum and 1st role in protection. *Avian Pathology* **16**, 407-416.
- MODROW, S., FALKE, D. und TRUYEN, U. (2003): *Molekulare Virologie*. Spektrum Verlag, 2. Auflage, S. 176-185.
- MONDAL, S. P. and NAQI, S. A. (2001): Maternal antibody to infectious bronchitis and development of active immunity to vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **79**, 31-40.
- MONNE, I., DRAGO, A., FASOLATO, M., CAPUA, I. and CATTOLI, G. (2009): Molecular survey of IBV in Europe in 2008. Proceeding of the VI. Internatinal Symposium on avian corona- and pneumoviruses, Rauschholzhausen, Germany, 14-17 June, 2009, S. 34-37.
- MONREAL, G. (1993): Adenoviridae. In: *Kompendium der Geflügel Krankheiten*, 5. Auflage. Herausgeber Siegmann, O. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 165-171.
- MULLIS, K. B. and FALOONA, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.
- MÜHLHARDT, C. (2002): PCR. In: MÜHLHARDT, C. (Ed.). *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, S. 71-104.
- NAGANO, H., TSUCHIMOTO, M., HOHDATSU, T. YAMAGAMI, T., DIE, S., EIGUCHI, Y., TANAKA, Y. and YAMAGISHI, H. (1990): Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bronchitis virus (IBV) antigen with monoclonal antibody. *Japanese Journal of Veterinary Science* **52**, 657-659.
- NAQI, S. A. (1990): A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Diseases* **34**, 893-898.
- NAQI, S. A., KARACA, K. and BAUMAN, B. (1993): A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Pathology* **22**, 555-564.
- NEWTON, C. R. and GRAHAM, A. (1997): PCR. 2nd edition Bios Scientific Publishers. Oxford, Uk. S. 1-28.

- NEUMANN, U. und KALETA, E. F. (1975): Detection of Newcastle disease virus in chicken tracheal organ cultures by the fluorescent antibody technique and by the Embryonated egg method. *Avian Pathology* **4**, 227-232.
- 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. and VAN DER ZEIJST (1986): The peplomer protein sequence of the M41 strain of coronavirus IBV and its comparison with Beaudette strains. *Virus Research* **5**, 253-263.
- NIESTERS, H. G., BLEUMINK-PLUYM, N. M., OSTERHAUS, A. D., HORZINEK, M. C. and VAN DER ZEIJST, B. A. (1987): Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis virus strain M41 as defined by monoclonal antibodies. *Virology* **161**, 511-519.
- OTSUKI, K., NORO, K., YAMAMOTO, H. and TSUBOKURA, M. (1979): Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV) 2. Propagation of IBV in several cultured cells. *Archives of Virology* **60**, 115-122.
- OTSUKI, K., SAKAGAMI, Y. and TSUBOKURA, M. (1987): Serological relationship among ten strains of infectious bronchitis virus. *Acta Virologica* **31**, 138-145.
- OTSUKI, K., HUGGINS, M. B. and COOK, J. K. A. (1990): Comparison of susceptibility to avian infectious bronchitis virus infection of two inbred lines of white leghorn chickens. *Avian Pathology* **19**, 467-475.
- PAN, G. C., JIANG, Y. H., WANG, Y. L., WANG, Y. D., ZHANG, Z. C., DING, J., LIU, X. E., YANG, Y. L., OU, Y. X. and WEN, F. Y. (1998): Isolation and identification of glandular stomach pathogenic type infectious bronchitis in Beijing area. *Chinese Journal of Veterinary Science Technology* **28**, 21-22.
- PARSONS, D., ELLIS, M. M., CAVANAGH, D. and COOK, J. K. A. (1992): Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. *The Veterinary Record* **131**, 408-411
- PERSING, D. H. (1993): Target selection and optimization of amplification reaction. In: PERSING, D.V., SMITH, T.F., TENOVER, F.C. and WHITE, T.J. (eds). *Diagnostic molecular microbiology: Principles and application*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. USA. S. 88-104.
- PICAULT, J. P., BENNEJEAN, G., GUITTET, M., LE JEUNE, M., LE COQ, H. and LE BACHELIER, A. (1984): Enquete serologique concernant les virus variants de la bronchite infectieuse aviaire (BI) en France. *Proceedings of the World Poultry Science Association, Helsinki*, S. 527-529.
- POWELL, J. R., AITKEN, I. D. and SURVASHE, B. D. (1979): The response of harderian gland of the fowl to antigen given by the ocular route. II. Antibody production. *Avian Pathology* **8**, 363-373.
- PURCELL, D. A. and McFERRAN, J. B. (1972): The histopathology of infectious bronchitis in the domestic fowl. *Research in Veterinary Science* **13**, 116-122.

- PURCHASE, H. G., CUNNINGHAM, C. H. and BURMESTER, B. R. (1966): Genetic differences among chicken embryos in response to inoculation with an isolate of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases* **10**, 162-172.
- QIAN, D. H., ZHU, G.J., WU, L. Z. and HUA, GX. (2006): Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. *American Journal of Veterinary Research* **67**, 1575-9.
- RAMNEEK; MITCHELL, N. L. and MCFARLANE, R. G. (2005): Rapid detection and characterisation of infectious bronchitis virus (IBV) from New Zealand using RT-PCR and sequence analysis. *New Zealand Veterinary Journal* **53**, 457-461.
- RATANASETHAKUL, C. and CUMMING, R. B. (1993): The effect of route of infection and strain of virus on the pathology of Australian infectious bronchitis. *Australian Veterinary Journal* **60**, 209-213.
- REISCHL, U. and WOLF, H. (1998): The use of molecular methods in infectious diseases. *Biotest Bulletin* **6**, 3-20.
- RICHTER, J. (1956): Infectieuze Bronchitis. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschrift* **25**, 133-143.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. and ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of  $\beta$ -globulin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. H., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. and ERLICH, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- SATO, T., SUGIMORI, T., ISHII, S. and MATUMOTO, M. (1955): Infectious bronchitis of chickens in Japan. II. Identification of the causative agent as the virus of infectious bronchitis of chickens. *Japanese Journal of Experimental Medicine* **25**, 143-150.
- SCHALK, A. F. and HAWN, M.C. (1931): An apparently new respiratory disease of chicks. *Journal of American Veterinary Medical Association* **78**, 413-422.
- SCHULTZE, B., CAVANAGH, D. and HERRLER, G., (1992): Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis virus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. *Virology* **189**, 792-794.
- SEVOIAN, M. and LEVINE, P. P. (1957): Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production and quality of laying chickens. *Avian Diseases* **1**, 135-164.
- SIDELL, S. G., ANDERSON, R., CAVANAGH, D., FUJIWARA; KLENK, H. D., MACNAUGHTON, M. R., PENSART, M., STOHLMAN, S. A., STURMAN, L. and VAN DER ZEIJST, B. A. (1983): Coronaviridae. *Intervirology* **20**, 181-189.

- SIDDEL, S. G. (1995): The small-membrane protein. In: SIDDEL, S. G. The Coronaviridae. Plenum Press, New York, S. 181-189.
- SILLER, W.G. (1981): Renal pathology of the fowl: A review. *Avian Pathology* **10**, 187-262.
- SNIJDER, E. J. and MEULENBERG, J. J. (1998): The molecular biology of arteriviruses. *Journal of General Virology* **79**, 961-979
- SNIJDER, E. J., BREDENBEEK, P. J., DOBBE, J. C., THIEL, V., ZIEBUHR, J., POON, L. L., GUAN, Y., ROZANOV, M., SPAAN, W. J. and GORBALENYA, A. E. (2003): Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early splitt-off from the coronavirus group 2 lineage. *Journal of Molecular Biology* **331**, 991-1004.
- SONG, C. S., LEE, Y. J., KIM, J. H., SUNG, H. W., LEE, C. W., IZUMIYA, Y., MIYAZAWA, T., JANG, H. K. and MIKAMI, T. (1998): Epidemiological classification of infectious bronchitis virus isolated in Korea between 1986-1997. *Avian Pathology* **27**, 409-416.
- STERN, D. F., BURGESS, L. and SEFTON, B. M. (1982): Structural analysis of virion proteins of the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Journal of Virology* **42**, 209-218.
- STERN, D. F. and SEFTON, B. M. (1982a): Coronavirus proteins: Biogenesis of avian infectious bronchitis virus proteins. *Journal of Virology* **44**, 794-803.
- STERN, D. F. and SEFTON, B. M. (1982b): Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. *Journal of Virology* **44**, 804-812.
- SUN, L., ZHANG, G. H., JIANG, J. W., FU, J. D., REN, T., CAO, W.S., XIN, C.A., LIAO, M. and LIU, W. J. (2007): A Massachusetts prototype like coronavirus isolated from wild peafowls is pathogenic to chickens. *Virus Research* **130**, 121-128.
- SUN, C., HAN, z., MA, H., ZHANG, Q., YAN, B., SHAO, Y., XU, J., KONG, X. and LIU, S. (2011): Phylogenetic analysis of infectious bronchitis coronaviruses newly isolated in China, and pathogenity and evaluation of protection induced by Massachusetts seotype H120 vaccine against QX-like strains. *Avian Pathology*, **40**: 43-54
- SUTOU, S., SATO, S., OKABE, T., NAKAI, M. and SASAKI, N. (1988): Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of avian infectious bronchitis virus. *Virology* **165**, 589-595.
- TYRELL, D. A., ALMEIDA, J. D., CUNNINGHAM, C. H., DOWDLE, W. R., HOFSTAD, M. S., McINTOSH, K., TAJIMA, M., ZAKSTELSKAYA, L. Y., EASTERDAY, B. C., KAPIKIAN, A. and BINGHAM, R. W. (1975): Coronaviridae. *Intervirology* **5**, 76-82.

- TORO, H., GODOY, V., LARENAS, J., REYES, E. and KALETA, E. F. (1996): Avian infectious bronchitis viral persistence in the Harderian gland and histological changes after eye drop vaccination. *Avian Diseases* **40**, 114-120.
- TOTTORI, J., YAMAGUCHI, R., MURAKAWA, Y., SATO, M., UCHIDA, K. and TATEYAMA, S. (1997): Experimental production of ascites in broiler chickens using infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *Avian Diseases* **41**, 214-220.
- UENAKA, T., KISHIMOTO, I., UEMURA, T., ITO, T., UMEMURA, T. and OTSUKI, K. (1998): Cloacal inoculation with the Connecticut strain of avian infectious bronchitis virus: an attempt to produce nephropathogenic virus by in vivo passage using cloacal inoculation. *Journal of Veterinary Medical Science* **60**, 495-502.
- VAN ROECKEL, H., BULLIS, K. L., FLINT, O. S. and CLARKE, M. K. (1942): Poultry disease control service. Massachusetts Agricultural Experiment Station, MA. Annual Report. Bulletin **388**, 99-103.
- VAN VLIET, A. L., SMITS, S. L., ROTTIER, P. J., and DE GROOT, R. J. (2002): Discontinuous and non-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus. *EMBO Journal* **21**, 6571-6580.
- VELLING, G. (1962): Experiences from Outbreaks of infectious bronchitis in Denmark. 7<sup>th</sup> World Veterinary Poultry Congress, 1962, S.331-334.
- VOSS, M., VIELITZ, E. und CONRAD, C. (1988): Untersuchungen über die IB-Immunität während der Legezeit unter Berücksichtigung verschiedener Impfprogramme und Testviren. *Lohmann Informationen*, S. 5-9.
- WADY, C. N. and FARAGHER, J. T. (1981): Australian infectious bronchitis viruses: identification of nine subtypes by a neutralization tests. *Research in Veterinary Science* **30**, 70-74.
- WAINRIGHT, P. O., VILLEGAS, P., BRUGH, M. and LUKERT, P. D. (1989): Characterization of infectious bronchitis virus using monoclonal antibodies. *Avian Diseases* **33**, 482-490.
- WANG, L., JUNKER, D. and COLLISON, E. W. (1993): Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology* **192**, 710-716.
- WANG, C. H., TSAI, C. T. and HUANG, Y. C. (1998): The relationship between serotypes and genotypes on hypervariable region in S1 gene of infectious bronchitis virus. Proceeding of the III. International Symposium on Infectious Bronchitis und Pneumovirus Infections in Poultry, Rauschholzhausen, Germany. 15-18 June, 1998, S. 243-251.
- WANG, C. H. and HUANG, Y. P. (2004): Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. Proceeding of the IV. International Symposium on Avian Corona- und Pneumovirus Infections, Rauschholzhausen, Germany, 20-23 June, 2004, S. 50-60.

- WANG, Y. D., WANG, Y. L., ZHANG, Z. C., FAN, G. C., JIANG, Y. H., LIU, X. E., DING, J. and WANG, S. S. (1998): Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chinese Journal of Animal Quarantine* **15**, 1-3.
- WANG, X., SCHNITZLEIN, W. M., TRIPATHY, D. N., GIRSCHICK, T. and 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 Diseases* **46**, 831-838.
- WILLIAMS, A. K., WANG, L., SNEED, L. W. and COLLISON, E. W. (1992): Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other corona viruses. *Virus Research* **25**, 213-222.
- WINTERFIELD, R. W. and HITCHNER, S. B. (1962): Etiology of an infectious nephritis nephrosis syndrome of chickens. *American Journal of Veterinary Research* **23**, 1273-1279.
- WINTERFIELD, R. W., HITCHNER, S. B. and APPLETON G. S. (1964): Immunological characteristic of a variant of IBV isolated from chickens. *Avian Diseases* **8**, 40-47.
- WINTERFIELD, R. W. (1968): Respiratory signs, immunity response, and interference from vaccination with monovalent and multivalent infectious bronchitis vaccines. *Avian Diseases* **12**, 577-585.
- WINTERFIELD, R. W., FADLY, A. M. and HANLEY, J. E. (1971): Characteristics of an isolate of infectious bronchitis virus from chickens in Florida. *Avian Diseases* **15**, 305-311.
- WOERNLE, H. (1961): Impfversuche mit adsorbat\_Vakzine bei der Infektiösen Bronchitis des Huhnes. *Monatshefte für Tierheilkunde* **13**, 136-142.
- WOERNLE, H. (1959): Diagnose der IB der Hühner mit Hilfe der Präzipitationsreaktion im festen Agarmedium. *Monatshefte für Tierheilkunde* **11**, 154-167.
- WOERNLE, H. (1963): Agar-Diffusionsverfahren und Virusinfektionen des Huhnes. XVII. Welttierärztekongress, Hannover, Kongressbericht, Volum **2**, S. 1423-1429. und Vol. **3**, S. 202-203.
- WOERNLE, H. und HAFEZ, H. M. (1992): Infektiöse Bronchitis. In: *Krankheiten der Wirtschaftsgeflügel. Ein Handbuch für Wissenschaft und Praxis*, Herausgeber: HEIDER, G. und MONREAL, G. unter Mitwirkung von MESZAROS, J., Band I: S. 787-815.
- WORTHINGTON, K. J., SAVAGE, C., NAYLOR, C. J., WIJMENGA, W. and JONES R. C. (2004): An RT-PCR survey of infectious bronchitis virus genotypes in the UK and selected European countries between 2002 and 2004 and the results from vaccine trial. *Proceedings of the IV International Symposium on avian corona- and pneumovirus infections*. Rauischholzhausen, Germany, 20-23 June, 2004, S. 125-133.

- WORTHINGTON, K. J. and JONES, R. C. (2006): An update on the European RT-PCR IBV survey and recent findings on a novel IBV genotype. Proceedings of the V. International Symposium on avian corona-and pneumoviruses and complicating pathogens. Rauschholzhausen, Germany, 14-16 May 2006, S. 176-188.
- YAGYU, K. and OHTA, S. (1987): Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of infectious bronchitis virus antigens. Japanese Journal of Veterinary Science **49**, 757-763,
- YAGYU, K. and OHTA, S. (1990): Detection of infectious bronchitis antigen from experimentally infected chickens by indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibody. Avian Diseases **34**, 246-252.
- ZANELLA, A. and MARTINO, P. A. (1998): Avian infectious bronchitis in Italy: Persistence of nephropathogenic strains related to serotyp AZ23/74. Proceedings of the III. International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry, Rauschholzhausen, Germany, 15-18 June, 1998, S. 189-197.
- ZHANG, Y., WANG, H. N., WANG, T., FAN, W. Q., ZHANG, A. Y., WEI, K., TIAN, G. B. and YANG, X. (2010): Complete genome sequence and recombination analysis of infectious bronchitis virus attenuated vaccine strain H120. Virus Genes **41**, 377-388.
- ZHOU, J., YU, L. and HONG, J. (1998): Isolation, identification and pathogenicity of virus causing proventricular-type infectious bronchitis. Chinese Journal of Animal and Poultry Infection Diseases **20**, 62-65.
- ZWAAGSTRA, K. A., VAN DER ZEIJST, B. A. M. and KUSTERS, J. G. (1992): Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. Journal of Clinical Microbiology **30**, 79-84.

## 9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Erhard F. Kaleta möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die wissenschaftlichen Betreuung sowie Bereitstellung der Literatur bedanken. Mein besonderer Dank gilt seiner stets gewährten Unterstützung, Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt bei der Korrektur des Manuskriptes.

Herrn Dr. Thomas Redmann und Frau Dr. Heffels-Redmann danke ich ganz herzlich für ihre freundliche Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, insbesondere bei Frau Dagmar Sommer und Herrn Dr. Ayhan Yilmaz für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Unseren Technischen Assistentinnen, Frau Sandra David-Holl, Frau Julia Schmalz und Frau Antoinette Huhn und dem technischen Assistenten Herrn Ralf Dörr danke ich für die jederzeit gewährte Hilfsbereitschaft bei den Untersuchungen und labortechnischen Arbeiten.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Dr. Ömer Akineden für seine Hilfsbereitschaft bei allen anfallenden Problemen bei der Entstehung dieser Arbeit.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. Hans-Christian Philipp und Herrn Dr. Matthias Voss, Veterinärlabor Lohmann Tierzucht GmbH, für freundliche wissenschaftliche Unterstützung und für die Bereitstellung ihrer Laborgerätschaften und nicht zuletzt für die gewährte Unterkunft in Cuxhaven.

Ferner möchte ich mich bei allen anderen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen unserer Klinik für ihre Hilfe und für das freundliche Arbeitsklima bedanken.

Zu guter Letzt danke ich ganz besonders meinen Eltern und meiner Tante Mediha für ihre Unterstützung.

## ANHANG

**Anhang 1:** Übersicht über den Nachweis und die Differenzierung der IBV-Isolate (Nr. 1-24) aus der KVRAF mittels N-Gen-RT-PCR und genotypspezifischer RT-PCR.

Laufende-Nummer	Isolate	A	B	C
1	8838/84/9	+	Massachusetts/D274	-
2	313/78	+	D274	-
3	291/85/6	+	-	D1466
4	189/83-2	+	Massachusetts/D274	-
5	684/80	+	Massachusetts	-
6	U83-3	+	D274	-
7	185/88-1	+	D274	-
8	653/80	+	D274	-
9	390/1/84	+	D274	-
10	390/2/84	+	D274	-
11	392/1/84	+	D274	-
12	1051/80	+	Massachusetts	-
13	55/80	+	Massachusetts	-
14	630/80	+	Massachusetts	-
15	502/80	+	D274	-
16	465/80	+	Massachusetts	-
17	226/81	+	D274	-
18	603/79	+	D274	-
19	6112/83	+	-	D1466
20	293/80	+	D274	-
21	225/81	+	D274	-
22	816/80-1	+	Massachusetts/D274	-
23	808/80-3	+	D274	-
24	345/81	+	Massachusetts	-

**A:** Amplifizierung vom N-Gen zum Nachweis des IBV mittels konventioneller RT-PCR.

**B:** Genotypspezifische RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis bzw. zur Differenzierung der Genotypen Massachusetts, D274 und 793B.

**C:** Genotypspezifische RT-PCR zum Nachweis des Genotyps D1466.

+: positiv.

-: negativ.

**Anhang 2:** Übersicht über die Ergebnisse zum Nachweis des IBV mittels „one step“ Real Time RT-PCR und genotypspezifischer RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274, D1466, 793B und Italy 02, Isolate aus der KVRAF.

Laufende Nummer	Isolate	A	B
1	8838/84/9	+	Massachusetts/D274
2	313/78	+	D274
3	291/85/6	+	D1466
4	189/83-2	+	Massachusetts/D274
5	684/80	+	Massachusetts
6	U83-3	+	D274
7	185/88-1	+	D274
8	653/80	+	D274
9	390/1/84	+	D274
10	390/2/84	+	D274
11	392/1/84	+	D274
12	1051/80	+	Massachusetts
13	55/80	+	Massachusetts
14	630/80	+	Massachusetts
15	502/80	+	D274
16	465/80	+	Massachusetts
17	226/81	+	D274
18	603/79	+	D274
19	6112/83	+	D1466
20	293/80	+	D274
21	225/81	+	D274
22	816/80-1	+	Massachusetts/D274
23	808/80-3	+	D274
24	345/81	+	Massachusetts

**A:** Amplifizierung vom N-Gen zum Nachweis des IBV mittels „one step“ Real Time RT-PCR.

**B:** genotypspezifischer RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274, D1466, 793B und Italy 02.

+ positiv.

- negativ.

**Anhang 3:** Übersicht über die Ergebnisse zum Nachweis des IBV mittels „one step RT-PCR und die genotypspezifische RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274, D1466, 793B und Italy 02, Isolate aus dem Veterinärlabor Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven).

Laufende Nummer	Isolate	A	B	C
25	IB279	+	D274	n.d.
26	IB281	+	D274	n.d.
27	IB283	+	D274	n.d.
28	IB289	+	Massachusetts	n.d.
29	IB290	+	Massachusetts	n.d.
30	IB291	+	-	Abbildung 23
31	IB297	+	D274	n.d.
32	IB298	+	Massachusetts	n.d.
33	IB299	+	Massachusetts	n.d.
34	IB303	+	D274	n.d.
35	IB304	+	D274	n.d.
36	IB311	+	Massachusetts	n.d.
37	IB312	+	D274	n.d.
38	IB320	+	D274	n.d.
39	IB326	+	D274	n.d.
40	IB327	+	Massachusetts	n.d.
41	IB331	+	D274	n.d.
42	IB354	+	Massachusetts/ D274	n.d.
43	IB358	+	Massachusetts	n.d.
44	IB361	+	D274	n.d.
45	IB364	+	793B	n.d.
46	IB367	+	Massachusetts	n.d.
47	IB385	+	D1466	n.d.
48	IB386	+	Massachusetts	n.d.
49	IB387	+	D1466	n.d.
50	IB398	+	D1466	n.d.
51	IB404	+	793B	n.d.
52	IB440	+	793B	n.d.
53	IB444	+	-	Abbildung 26
54	IB448	+	Massachusetts	n.d.
55	IB465	+	793B	n.d.
56	IB472	+	Massachusetts	n.d.

**A:** „One step“ Real Time RT-PCR zum Nachweis des IBV unter Berücksichtigung des Ziel Gens N (Nukleokapsid)

**B:** Genotypspezifische RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274, D1466, 793B und Italy 02

**C:** Sequenzierung des jeweiligen Isolats

**K-Nr.:** Kundennummer

**EK-Nr.:** Eikulturnummer

**n.d.:** nicht durchgeführt

+: positiv

-: negativ

## Fortsetzung der Anhang 3

Laufende Nummer	Isolate	A	B	C
57	IB480	+	D1466	n.d.
58	IB526	+	Massachusetts	n.d.
59	IB532	+	Massachusetts	n.d.
60	IB537	+	Massachusetts	n.d.
61	IB542	+	Massachusetts	n.d.
62	IB544	+	793B	n.d.
63	IB584	+	Massachusetts	n.d.
64	IB659	+	Massachusetts	n.d.
65	IB670	+	Massachusetts	n.d.
66	IB676	+	793/B	n.d.
67	IB716	+	Italy 02/793B	n.d.
68	IB719	+	-	Abbildung 27
69	IB721	+	Massachusetts/793B	n.d.
70	IB722	+	793B	n.d.
71	IB723	+	793B	n.d.
72	IB748	+	793B	n.d.
73	IB754	+	793B	n.d.
74	IB756	+	793B	n.d.
75	IB764	+	-	Abbildung 24
76	IB769	+	793B	n.d.
77	IB781	+	793B	n.d.
78	IB787	+	-	Abbildung 25
79	IB796	+	Italy 02	n.d.
80	EK-Nr: 285/06	+	D274	n.d.
81	EK-Nr: 313/06	+	-	Abbildung 28
82	K-Nr.: 717/06	+	793B	n.d.

**A:** „One step“ Real Time RT-PCR zum Nachweis des IBV unter Berücksichtigung des Ziel Gens N (Nukleokapsid).

**B:** Genotypspezifische RT-PCR zum gleichzeitigen Nachweis der Genotypen Massachusetts, D274, D1466, 793B und Italy 02.

**C:** Sequenzierung des jeweiligen Isolats.

**K-Nr.:** Kundennummer.

**EK-Nr.:** Eikulturnummer.

**n.d.:** nicht durchgeführt.

+: positiv.

-: negativ.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5800-5



9 783835 958005

Cover photos: © pressmaster + © mathom - Fotolia.com