

Aus dem Paul-Ehrlich-Institut  
Bundesamt für Sera und Impfstoffe in Langen

und dem Institut für Geflügelkrankheiten  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Vergleich verschiedener Untersuchungsmethoden  
zum Nachweis einer experimentellen Infektion mit dem  
Virus der Infektiösen Bronchitis der Hühner  
im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**GIULIA ALINE FRANGIPANI**

Gießen 2002

Aus dem Paul-Ehrlich-Institut  
Bundesamt für Sera und Impfstoffe in Langen

und dem Institut für Geflügelkrankheiten  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

**Vergleich verschiedener Untersuchungsmethoden  
zum Nachweis einer experimentellen Infektion mit dem  
Virus der Infektiösen Bronchitis der Hühner  
im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**GIULIA ALINE FRANGIPANI**  
Tierärztin aus Frankfurt a. M.

Gießen 2002

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. F. Kaleta

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 2002

## Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	=	Abbildung
bidest.	=	bidestilliert
bzw.	=	beziehungsweise
Ch.B.	=	Chargen-Bezeichnung
DAB	=	Deutsches Arzneibuch
DAB 10	=	Deutsches Arzneibuch, 10. Auflage
demin.	=	demineralisiert
Ds.	=	Dosis
DVG	=	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V.
EAB	=	Europäisches Arzneibuch
EAB 2	=	Europäisches Arzneibuch, 2. Auflage
EID <sub>50</sub>	=	Ei-infektiöse Dosis 50
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EG	=	Europäische Gemeinschaft
EWG	=	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
Fa.	=	Firma
IB	=	Infektiöse Bronchitis
IBV	=	Virus der Infektiösen Bronchitis
Nr.	=	Nummer
o. b. B.	=	ohne besonderen Befund
p. i.	=	post infectionem (nach der Infektion)
p. vac.	=	post vaccinationem (nach der Impfung)
PBS	=	Phosphate buffered saline
s.	=	siehe
S.	=	Seite
Tab.	=	Tabelle
Usg.	=	Untersuchung

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Das Virus der Infektiösen Bronchitis .....</i></b>	<b>4</b>
2.1.1	Taxonomische Einordnung .....	4
2.1.2	Struktur des Virus und Replikation .....	6
2.1.3	Tenazität.....	8
2.1.4	Erregervarianten .....	9
<b>2.2</b>	<b><i>Die Infektiöse Bronchitis der Hühner als Erkrankung .....</i></b>	<b>15</b>
2.2.1	Vorkommen und Bedeutung .....	15
2.2.2	Epizootiologie und Pathogenese .....	15
2.2.3	Klinische Erscheinungsformen und Pathologie .....	17
2.2.3.1	Respiratorische Form der IB .....	17
2.2.3.2	Nephritis-Nephrose-Form der IB.....	19
2.2.3.3	Erkrankung durch den Stamm 4/91 (bzw. 793B oder CR88121) .....	19
2.2.3.4	Erkrankung durch den enterotropen Stamm Morocco G .....	20
2.2.4	Wirtschaftliche Bedeutung .....	20
<b>2.3</b>	<b><i>Diagnose der Infektiösen Bronchitis .....</i></b>	<b>21</b>
2.3.1	Methoden zum Nachweis in vivo entstandener virusinduzierter Veränderungen .....	21
2.3.1.1	Klinische Untersuchung und Pathologie .....	21
2.3.1.2	Histopathologische Untersuchung .....	22
2.3.1.2.1	<i>Histologischer Aufbau des Atmungsapparates bei Hühnern.....</i>	<i>22</i>
2.3.1.2.2	<i>Histologischer Aufbau des Eileiters bei Hühnern.....</i>	<i>24</i>
2.3.1.2.3	<i>Histologischer Aufbau des Harnapparates bei Hühnern .....</i>	<i>25</i>
2.3.1.2.4	<i>Histologischer Aufbau des Hühnerdarms.....</i>	<i>27</i>

2.3.1.2.5	<i>IBV-bedingte histologische Veränderungen im Atmungsapparat</i>	28
2.3.1.2.6	<i>IBV-bedingte histologische Veränderungen im Eileiter</i>	30
2.3.1.2.7	<i>IBV-bedingte histologische Veränderungen im Harnapparat</i>	31
2.3.1.2.5	<i>IBV-bedingte histologische Veränderungen im Darm</i>	32
2.3.1.3	Ziliarreduktionstest	33
2.3.2	Methoden zum Nachweis in ovo / in vitro entstandener virusinduzierter Veränderungen	35
2.3.2.1	Virusanzüchtung im embryonierten Hühnerei	35
2.3.2.2	Virusanzüchtung in Gewebekulturen	36
2.3.2.3	Virusanzüchtung in Zellkulturen	37
2.3.2.3.1	<i>Virusvermehrung in Hühnerembryonierzellen</i>	38
2.3.2.3.2	<i>Virusvermehrung in Hühnerembryofibroblasten-Zellkulturen</i>	39
2.3.2.3.3	<i>Virusvermehrung in Verozellkulturen</i>	39
2.3.3	Immunologische Methoden zum Antigennachweis	40
2.3.3.1	Virusneutralisationstests	40
2.3.3.2	Agargelpräzipitation / Immundiffusionstest	42
2.3.3.3	Immunfluoreszenzfärbung	43
2.3.3.4	Immunperoxidasefärbung	45
2.3.3.5	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
2.3.4	Nachweis des Virusgenoms (Polymerase-Kettenreaktion -PCR)	47
2.3.5	Diagnose einer IBV-Infektion durch Antikörpernachweis	49
2.3.5.1	Antikörper-ELISA	49
2.3.5.2	Serumneutralisationstest	50
2.3.5.3	Hämagglutinationshemmtest (HAH)	51
2.3.5.4	Agargelpräzipitation / Immundiffusion	51
<b>2.4</b>	<b><i>Differentialdiagnosen</i></b>	<b>52</b>
<b>2.5</b>	<b><i>Bekämpfung der IB</i></b>	<b>53</b>
2.5.1	Lebendimpfstoffe	54
2.5.2	Inaktivimpfstoffe	60

<b>2.6</b>	<b><i>Prüfung von Impfstoffen gegen IB</i></b> .....	<b>61</b>
2.6.1	Rechtliche Grundlagen .....	61
2.6.2	Deutsches Arzneibuch (DAB) und Europäisches Arzneibuch (EAB) ...	62
2.6.2.1	Monographie 442 des EAB: Infektiöse-Bronchitis-Lebendimpfstoff für Geflügel (gefrieretrocknet).....	62
2.6.2.2	Wirksamkeitsprüfung laut Monographie 442 des EAB, 3. Auflage .....	66
2.6.3	Entwürfe zur Änderung der Monographie 442 im EAB .....	67
2.6.3.1	Erster Entwurf zur Änderung der Monographie vom April 1998 .....	67
2.6.3.2	Zweiter Entwurf zur Änderung der Monographie vom März 1999 .....	70
<b>3</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b> .....	<b>73</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Erbrüten und Haltung der Hühnerküken</i></b> .....	<b>73</b>
3.1.1	Erbrüten der Hühnerküken.....	73
3.1.2	Haltung der Hühnerküken .....	75
<b>3.2</b>	<b><i>Probennahme</i></b> .....	<b>75</b>
3.2.1	Blutentnahme zur Serumgewinnung .....	75
3.2.2	Gewinnung der Tracheen .....	76
<b>3.3</b>	<b><i>Methoden zum Nachweis der infektiösen Bronchitis</i></b> .....	<b>77</b>
3.3.1	IB-Virusisolierung im embryonierten Hühnerei .....	77
3.3.2	Ziliarreduktionstest .....	82
3.3.3	Histologische Untersuchung der Trachea .....	85
<b>3.4</b>	<b><i>IB-Antikörperbestimmung in Hühnerserum mit ELISA</i></b> .....	<b>91</b>
<b>3.5</b>	<b><i>Durchführung der Wirksamkeitsprüfung nach DAB 10 / EAB 3</i></b> .....	<b>93</b>
3.5.1	Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei .....	93
3.5.2	Impfung der Tiere .....	95
3.5.3	Infektionsversuch .....	96
3.5.4	Antikörpertiterbestimmung .....	98

<b>3.6</b>	<b><i>Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der experimentellen IBV-Infektion .....</i></b>	<b>98</b>
3.6.1	Zeitlicher Verlauf der experimentellen IBV-Infektion empfänglicher Hühnerküken .....	98
3.6.2	Zeitlicher Verlauf der experimentellen IBV-Infektion nach erfolgter Impfung mit Nobilis IB H120.....	99
<b>3.7</b>	<b><i>Untersuchung auf Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach der Impfung mit IB H120-Impfstoff.....</i></b>	<b>101</b>
3.7.1	Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach Impfung mit 10facher Impfstoffdosis .....	101
3.7.2	Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach Impfung mit der vom Hersteller angegebenen Mindestimpfstoffdosis .....	102
<b>3.8</b>	<b><i>Vergleich der IB-spezifischen Krankheitsanzeichen nach intratrachealer- und per eye-drop-Infektion .....</i></b>	<b>103</b>
<b>4</b>	<b><i>Ergebnisse .....</i></b>	<b>104</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Erste Wirksamkeitsprüfung nach DAB 10 / EAB 3 .....</i></b>	<b>104</b>
4.1.1	Ergebnis der Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei .....	105
4.1.2	Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches .....	106
4.1.3	Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial .....	108
4.1.4	Ziliarreduktionstest .....	113
4.1.5	Histologische Untersuchung .....	115
4.1.6	IBV-Antikörpertiterbestimmung .....	118
4.1.7	Vergleich der Ergebnisse aus der ersten Wirksamkeitsprüfung .....	119
<b>4.2</b>	<b><i>Zweite Wirksamkeitsprüfung nach DAB 10 / EAB .....</i></b>	<b>123</b>
4.2.1	Ergebnis der Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei .....	123
4.2.2	Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches .....	124
4.2.3	Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial .....	126



4.2.4	Ziliarreduktionstest .....	128
4.2.5	Histologische Untersuchung .....	130
4.2.6	IBV-Antikörpertiterbestimmung .....	133
4.2.7	Vergleich der Ergebnisse aus der zweiten Wirksamkeitsprüfung .....	135
<b>4.3</b>	<b><i>Dritte Wirksamkeitsprüfung nach DAB 10 / EAB</i></b> .....	<b>138</b>
4.3.1	Ergebnis der Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei .....	138
4.3.2	Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial .....	139
<b>4.4.</b>	<b><i>Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der experimentellen</i></b> <b><i>IBV-Infektion</i></b> .....	<b>144</b>
4.4.1	Zeitlicher Verlauf der experimentellen IBV-Infektion empfänglicher Hühner .....	144
4.4.1.1	Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches .....	144
4.4.1.2	Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial .....	146
4.4.1.3	Ziliarreduktionstest .....	148
4.4.1.4	Histologische Untersuchung .....	150
4.4.1.5	Vergleich der Ergebnisse aus der Verlaufsuntersuchung empfänglicher Tiere .....	152
4.4.2	Zeitlicher Verlauf der experimentellen IBV-Infektion nach erfolgter Impfung mit Nobilis IB H120 .....	155
4.4.2.1	Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches .....	156
4.4.2.2	Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial .....	159
4.4.2.3	Ziliarreduktionstest .....	159
4.4.2.4	Histologische Untersuchung .....	164
4.4.2.5	IBV-Antikörpertiterbestimmung .....	167
4.4.2.6	Vergleich der Ergebnisse aus der Untersuchung zum Krankheitsverlauf nach Impfung mit IB H120 .....	169

<b>4.5</b>	<b><i>Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach der Impfung mit IB H120-Impfstoff</i></b> .....	<b>173</b>
4.5.1	Ergebnis der Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei und verwendete Impfstoffdosis .....	174
4.5.2	Krankheitsanzeichen nach der Impfung mit zehnfacher Impfstoffdosis .....	175
4.5.3	Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial .....	177
4.5.4	Ziliarreduktionstest .....	177
4.5.5	Histologische Untersuchung .....	181
4.5.6	IBV-Antikörperbestimmung .....	181
4.5.7	Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung auf Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach der Impfung mit IB H120 .....	182
<b>4.6</b>	<b><i>Vergleich der IB-spezifischen Krankheitsanzeichen nach intratrachealer- und per eyedrop-Infektion</i></b> .....	<b>184</b>
4.6.1	Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches .....	184
4.6.2	Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial .....	185
4.6.3	Ziliarreduktionstest .....	185
4.6.4	Histologische Untersuchung .....	186
4.6.5	Vergleich der verschiedenen Testergebnisse nach intratrachealer- und per eyedrop-Infektion.....	188
<b>4.7</b>	<b><i>Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität der verwendeten Tests</i></b> .....	<b>189</b>
4.7.1	Vergleich der verschiedenen Untersuchungsmethoden im Hinblick auf ihre Sensitivität und Reproduzierbarkeit .....	189
4.7.2	Vergleich der verschiedenen Untersuchungsmethoden im Hinblick auf ihre Spezifität.....	192

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>195</b>
<b>5.1</b>	<b><i>Vergleich der verschiedenen Testmethoden in Bezug auf ihre Eignung zum Nachweis der experimentellen IBV-Infektion im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen .....</i></b>	<b>195</b>
5.1.1	Beobachtungen zu Sensitivität und Reproduzierbarkeit .....	195
5.1.2	Beobachtungen zur Spezifität .....	196
5.1.3	Beobachtungen zur Sicherheit (Beeinflußbarkeit der Tests durch impfstoffinduzierte Veränderungen) .....	197
<b>5.2</b>	<b><i>Vergleich der verschiedenen Testmethoden in Bezug auf ihren Personal-, Zeit- und Materialaufwand .....</i></b>	<b>197</b>
5.2.1	Klinische Untersuchung .....	197
5.2.2	Ziliarreduktionstest .....	198
5.2.3	Histologische Untersuchung .....	198
5.2.4	Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial .....	199
<b>5.3</b>	<b><i>Zusammenfassende Beurteilung der Untersuchungsmethoden .....</i></b>	<b>200</b>
<b>5.4</b>	<b><i>Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfungen .....</i></b>	<b>204</b>
5.4.1	Beurteilung der Ergebnisse von Ziliarreduktionstest / Histologie .....	204
5.4.2	Beurteilung der Ergebnisse der Virusisolierung im Hühnerembryo ....	205
<b>5.5</b>	<b><i>Betrachtungen zum optimalen Untersuchungszeitpunkt nach der Belastungsinfektion .....</i></b>	<b>207</b>
<b>5.6</b>	<b><i>Betrachtungen zum Zeitabstand zwischen Impfung und Belastungsinfektion .....</i></b>	<b>208</b>
<b>5.7</b>	<b><i>Beurteilung der Monographie über IB-Lebendimpfstoffe und der Entwürfe zu deren Änderung.....</i></b>	<b>210</b>
5.7.1	Anmerkungen zum DAB 10 / EAB 3.....	210
5.7.2	Anmerkungen zum ersten Entwurf für die Neufassung der Monographie vom April 1998 .....	211

5.7.3	Anmerkungen zum zweiten Entwurf für die Neufassung der Monographie vom März 1999 .....	213
5.8	<i>Eigener Vorschlag für eine Monographie zur Wirksamkeitsprüfung für Lebendimpfstoffe gegen die IB .....</i>	<i>214</i>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>217</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>220</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>221</b>

# 1 Einleitung

Die infektiöse Bronchitis der Hühner ist eine weltweit verbreitete Erkrankung. Die meisten IB-Virusstämme verursachen bei Küken Atemwegserkrankungen, die mit einer verringerten Futtermittelaufnahme und verzögerten Entwicklung einhergehen, sowie einen Rückgang der Legeleistung bei Legehennen und Gewichtsverluste bei Broilern. Die Infektion mit nephropathogenen IBV-Stämmen führt insbesondere bei Küken zur Entstehung von Nephritiden und Nephrosen mit hoher Mortalitätsrate. Infektionen mit dem IB-Virusstamm 4/91 können einen Anstieg der Mortalitätsrate, insbesondere bei weiblichen Hühnern, zur Folge haben und Erkrankungen mit Stauungserscheinungen am gesamten Körper oder einer Myopathie der Pektoralismuskulatur hervorrufen. Infektionen mit dem in Marokko isolierten Stamm G gehen mit Darmerkrankungen und Durchfall einher. Auch bei Infektionen mit den letzten beiden Stämmen kommt es bei Legehennen zu einem Rückgang der Legeleistung und zur Produktion minderwertiger Eier. Insgesamt verursachen IBV-Infektionen also hohe wirtschaftliche Verluste. Daher werden zur Bekämpfung der IB weltweit Impfprogramme durchgeführt.

Voraussetzung für die Herstellung und das in Verkehr bringen von Impfstoffen gegen die infektiöse Bronchitis der Hühner in Deutschland ist gemäß Tierseuchengesetz deren Zulassung durch das Bundesinstitut für Sera und Impfstoffe (Paul-Ehrlich-Institut).

Zu den Voraussetzungen für die Zulassung der Impfstoffe zählen u. a. Untersuchungen zu ihrer Qualität, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit. Die dem jeweiligen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse entsprechenden, anerkannten Untersuchungsmethoden sind in den Monographien des deutschen, bzw. europäischen Arzneibuches festgelegt.

Gemäß der 10. Auflage des deutschen Arzneibuches (DAB 10) aus dem Jahre 1991 sind für die Wirksamkeitsprüfung von IB-Lebendimpfstoffen geimpfte Hühnerküken und nicht geimpfte Kontrolltiere einer Belastungsinfektion mit einem homologen virulenten IB-Virusstamm auszusetzen und danach auf Krankheitsanzeichen zu untersuchen. Die entsprechende Monographie im DAB 10 sieht als einzige Methode zum Nachweis der experimentellen IBV-Infektion die Virusisolierung im embryonierten Hühnerei vor. Diese Untersuchungsmethode erfordert einen sehr hohen Zeit- und Arbeitsaufwand, sowie den Einsatz einer relativ großen Anzahl an embryonierten Hühnereiern.

### ***Fragestellung der eigenen Untersuchungen***

Aus den Monographien über Lebendimpfstoffe gegen die Infektiöse Bronchitis der Hühner in den zur Zeit gültigen Fassungen des DAB 10 und des EAB 3, im Zusammenhang mit den Einsichten und Erfahrungen während der Prüfung und Beurteilung der herstellerseitig eingereichten Unterlagen und den im Paul-Ehrlich-Institut erfolgten Untersuchungen ergaben sich die folgenden Fragestellungen, welche im Rahmen dieser Arbeit formuliert und experimentell bearbeitet wurden.

- 1) Erarbeiten von Methoden zum Nachweis einer stattgefundenen IBV-Infektion, bzw. des Schutzes vor einer solchen Infektion durch den zu prüfenden Impfstoff, die als Alternativen zur Virusisolierung im Hühnerembryo eingesetzt werden können.
- 2) Vergleich dieser Methoden untereinander und mit der Virusisolierung im Hühnerembryo, im Hinblick auf ihre Sensitivität und Spezifität sowie Beurteilung des erforderlichen personellen, zeitlichen und apparativen Aufwands.
- 3) Ermittlung des optimalen Zeitpunktes für die Tötung und Untersuchung der Hühner im Infektionsversuch.

- 4) Beobachtung von Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach der Impfung und Untersuchung, ob der Infektionsversuch durch diese Phänomene beeinträchtigt wird.
- 5) Beurteilung der in den verschiedenen Entwürfen zur Neufassung des EAB angegebenen Zeiträume zwischen Impfung und Infektionsversuch, im Hinblick auf eine Beeinträchtigung des Infektionsversuches durch die Impfung.
- 6) Wirksamkeitsvergleich zwischen der einfacheren per eyedrop-Applikation und der intratrachealen Applikation bei der Belastungsinfektion mit virulentem IBV.
- 7) Erarbeitung eines Entwurfes für die Neuformulierung der Monographie zur Wirksamkeitsprüfung für Lebendimpfstoffe gegen die Infektiöse Bronchitis der Hühner.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 *Das Virus der Infektiösen Bronchitis*

#### 2.1.1 Taxonomische Einordnung

Das Virus der Infektiösen Bronchitis der Hühner (IBV) wird innerhalb der Virusfamilie Coronaviridae dem Genus Coronavirus zugeordnet. Alle Viren der Familie Coronaviridae besitzen als Genom ein nicht segmentiertes einsträngiges RNA-Molekül von positiver Polarität. Das helikale Nukleokapsid ist von einer Lipidhülle umgeben, aus der Glykoproteine, sogenannte Peplomere oder Spikes, keulen- oder blattförmig hervorragen (CAVANAGH et al., 1995).

Innerhalb der Virusfamilie Coronaviridae unterscheidet man die beiden Genera Coronavirus und Torovirus. Während Viruspartikel des Genus Torovirus (lat.: torus = ringförmiger Säulenwulst) bei einem Durchmesser von 120-140 nm ein röhrenartig aufgerolltes Nukleokapsid in Stab-, Nieren- oder Ringform mit eng anliegender Lipidhülle besitzen, haben Partikel des Genus Coronavirus üblicherweise einen Durchmesser von 120-160 nm (CAVANAGH et al., 1995) und eine pleomorphe, meist annähernd runde Form. Dieser Form und den Peplomeren, welche das Virion wie ein Kranz (lat. corona) umgeben, verdanken Virusfamilie und Genus ihre Namen.

Neben dem IBV ist dem Genus Coronavirus als weiteres aviäres Virus das Puten(Turkey)-Corona-Virus (TCV), der Erreger der Infektiösen Enteritis der Puten, zuzuordnen (CAVANAGH et al., 1995).

Einen Überblick über verschiedene Coronaviren und die von ihnen verursachten Erkrankungen bei Geflügel, Säugetieren und Menschen zeigt Tabelle 1.



**Tabelle 1: Erkrankungen durch Coronaviren bei Säugetieren und Menschen** (nach WOERNLE und HAFEZ, 1992, modifiziert)

Natürlicher Wirt	Coronavirus	Im Vordergrund stehendes Krankheitsbild
<b><u>Geflügel:</u></b>		
- Hühner	Virus der Infektiösen Bronchitis (IBV)	Sinusitis, Tracheitis, Bronchitis, Nephritis, Gonaditis, Enteritis
- Puten	Puten-Corona-Virus (TCV)	Enteritis
<b><u>Säugetiere:</u></b>		
- Rind	Bovines Coronavirus (BCV)	Enteritis
- Schwein	Virus der Transmissiblen Gastroenteritis (TGEV)	Enteritis
	Hämagglutinierendes Enzephalomyelitis-Virus (HEV)	Erbrechen, Kümern, Enzephalomyelitis
	Porcines Epidemisches Diarrhoe-Virus (PEDV)	Enteritis, Epizootische Virusdiarrhoe (EVD)
- Hund	Canines Coronavirus	Enteritis
- Katze	Virus der Felinen Infektiösen Peritonitis (FIPV)	Peritonitis, granulomatöse Entzündung in vielen Organen
- Ratte	Rattencoronavirus (RCV)	Erkrank. d. oberen Atemwege
	Sialodakryoadenitis-Virus (SDAV)	Adenitis
- Maus	Murines Hepatitis-Virus (MHV)	Hepatitis, Enteritis, Enzephalomyelitis, Vaskulitis
<b><u>Mensch:</u></b>		
	Humane Coronaviren 229 E, OC 43 und andere Isolate	Erkrankung der oberen Atemwege
	Humanes enterales Coronavirus	Enteritis

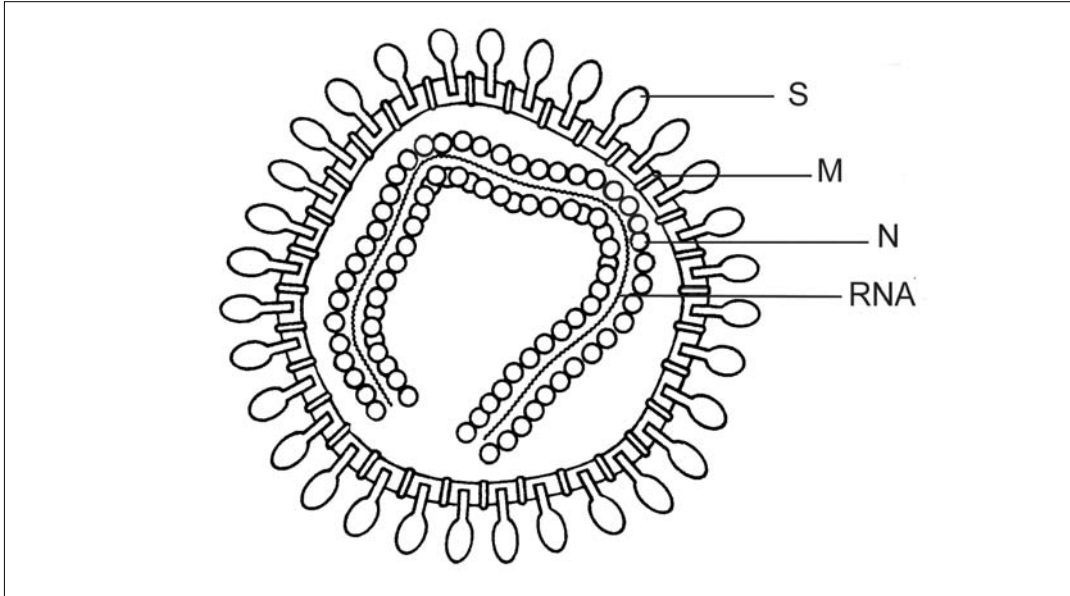
Dem Genus Torovirus werden die Spezies Breda-Virus und Berne-Virus zugeordnet. Breda Virus konnte aus Fäzes von Kälbern, Katzen und Menschen mit Diarrhöe isoliert werden, Berne Virus wurde bei Pferden und Rindern in der Schweiz nachgewiesen (FENNER et al., 1993).

### **2. 1. 2 Struktur des Virions und Replikation**

IB-Viruspartikel sind, wie alle Coronaviren, rund bis pleomorph geformt. Die Angaben zu ihrem Durchmesser reichen von 80 - 200 nm (BERRY et al., 1964; CUNNINGHAM, 1966; MCINTOSCH et al., 1967). Ihr einzelsträngiges RNA-Molekül ist mit einer Länge von mehr als 27 000 Basen die längste bisher bekannte unsegmentierte virale RNA. Sie bildet gemeinsam mit dem phosphorylierten Nukleokapsidprotein (N) das helikale Nukleokapsid im Inneren der Virushülle. Letztere besteht aus einer Lipiddoppelschicht in welche Membran- (M) und Spikeglykoproteine (S) eingelagert sind.

M-Glykoproteine ragen nur mit ihrem relativ kleinen hydrophilen Anteil aus der Lipidschicht hervor, während die 20 nm langen S-Glykoproteine keulen- oder kleblattförmig über die Virushülle hervorstehen. Sie bestehen aus den Untereinheiten S1 und S2, von denen die Untereinheit S2 fest in der Membran verankert ist, während S1 nur über die wenig starke Bindung an S2 Kontakt mit der Virushülle hat (Abb. 1).

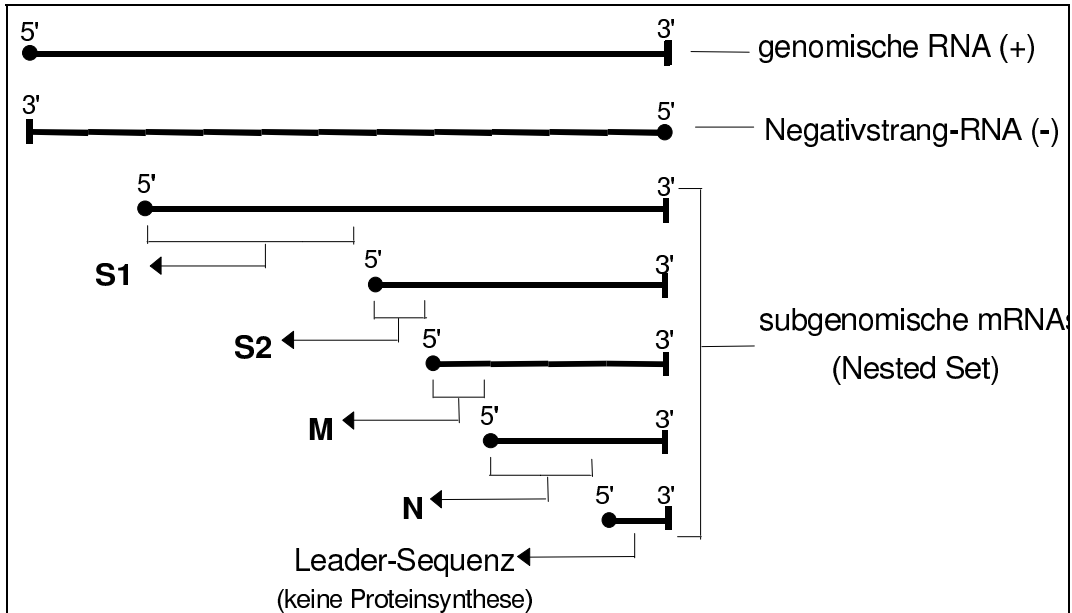
Das Glykoprotein S1 spielt für die Infektiosität des Virus eine wesentliche Rolle, da es die Fusion mit der Zellmembran der Wirtszelle ermöglicht, während es bei seinem Fehlen nur zu einer Anlagerung kommt. Zudem ist S1 für die Fähigkeit des Virus zur Hämagglutination verantwortlich und induziert die Bildung sowohl neutralisierender als auch hämagglutinationshemmender Antikörper (CAVANAGH et al., 1984).



**Abb. 1:** Schematischer Aufbau des IBV (modifiziert nach HORZINEK, 1985)

Der gesamte Replikationszyklus des IBV findet im Zytoplasma statt. Dabei wird von der viralen (m)RNA direkt nach ihrem Freiwerden eine RNA-abhängige RNA-Polymerase translatiert. Diese ist zunächst für die Transkription eines RNA-Negativstrangs in genomischer Länge verantwortlich. Dieser Negativstrang dient einerseits als Muster für neue genomische RNA-Moleküle, andererseits werden von ihm mehrere unterschiedlich lange subgenomische mRNAs mit gleichem 3'-Ende, ein sogenanntes Nested Set, transkribiert. Von diesen subgenomischen mRNAs dient nur jeweils der zum 5'-Ende hin gelegene Teil, welcher nicht in der nächst kürzeren mRNA enthalten ist, als Matrix für die Proteinsynthese (FENNER et al., 1993, s. Abb. 2).

Die Viruspartikel verlassen die Wirtszelle durch Exozytose, indem sich nach ihrer Reifung im Golgi-Apparat virusgefüllte Vesikel zur Zytoplasmamembran bewegen und mit dieser verschmelzen (FENNER et al., 1993).



**Abb. 2:** Vereinfachtes Schema der genomischen Organisation des IBV  
(modifiziert nach FENNER et al., 1993)

### 2. 1. 3 Tenazität

Als behülltes Virus besitzt das IBV eine geringe Tenazität. Detergentien und fettlösende organische Substanzen wie Äther oder Chloroform inaktivieren durch eine Zerstörung der Lipidschicht die Infektiosität des Virus. Auch gegenüber Formalin und Oxidationsmitteln besteht eine starke Empfindlichkeit. Säuren mit einem pH-Wert von 3 oder weniger inaktivieren die meisten IBV-Stämme innerhalb weniger Stunden (COWEN und HITCHNER, 1975 a), starke Basen (5 %ige Natronlauge) bewirken ebenfalls eine Inaktivierung (CUNNINGHAM und STUART, 1946).

Alle gängigen Stalldesinfektionsmittel die in der DVG-Liste unter der Rubrik „begrenzt viruzid, wirksam gegen Viren mit Hülle“ aufgeführt sind, eignen sich zur Inaktivierung des IBV.

Auch gegenüber höheren Temperaturen ist das IBV ausgesprochen empfindlich. So führt eine Temperaturerhöhung auf 45 °C bei den meisten Virusstämmen innerhalb von 90 Minuten zur Inaktivierung, bei 56 °C kommt es bereits innerhalb von 15 Minuten zur Inaktivierung (OTSUKI et al., 1979), nur wenige Stämme verlieren ihre Infektiosität bei 56 °C erst nach 160 Minuten (VON BÜLOW, 1967). Bei Umgebungstemperaturen von 4 °C bis 30 °C können IB-Viren mehr als ein Jahr überleben, allerdings muß im Freien durch die Einwirkung von ultravioletter Strahlung von kürzeren Überlebenszeiten ausgegangen werden. SATYLGANOV (1971) beobachtet einen Verlust der Infektiosität im Winter nach 56 Tagen, im Frühjahr sogar bereits nach 12 Tagen.

CUNNINGHAM (1970) erreicht eine optimale Stabilität des IBV in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,79. Der Zusatz von 50 % Glycerin zu infizierten Geweben bewirkt eine ausreichende Stabilisierung zum Versand.

Durch Einfrieren bei –30 °C konnte die Vermehrungsfähigkeit bis zu 24 Jahre lang erhalten werden, nach Lyophilisierung und Lagerung im Kühlschrank ließ sich eine Vermehrungsfähigkeit mindestens 30 Jahre lang nachweisen (HOFSTADT, 1984).

#### **2. 1. 4 Erregervarianten**

Das IBV zeigt sich in Form vieler verschiedene Variantstämme mit unterschiedlichen antigenen Eigenschaften und unterschiedlichen Organaffinitäten. Letztere äußern sich in verschiedenen klinischen Verlaufsformen der Erkrankung bei Hühnern (siehe Kap. 2.2).

IB-Viren besitzen sogenannte gruppenspezifische Antigene, die allen Stämmen der IB-Viren gemeinsam sind und typ- oder stammspezifische Antigene, die sich von Variantstamm zu Variantstamm unterscheiden.

Während die gruppenspezifischen Antigene in den Strukturproteinen (Nukleokapsid- und Membranproteine) lokalisiert sind (KOCH et al., 1986), sind die typspezifischen Antigene Bestandteil der Peplomerglycoproteine, besonders der S1-Glycoproteine (CAVANAGH et al., 1986; CAVANAGH und DAVIS, 1986). Somit unterscheiden sich bei den verschiedenen IBV-Stämmen gerade diejenigen Virusbestandteile, welche die Bildung neutralisierender Antikörper induzieren, eine Tatsache, durch die sowohl die natürliche Immunitätsbildung als auch die Durchführung von Impfprogrammen erheblich erschwert werden.

Der zuerst entdeckte und im Mai 1941 von Van Roekel isolierte Virusstamm (JUNGHERR et al., 1956), der weltweit am häufigsten zu finden ist, ist der hoch pathogene Stamm Massachusetts (auch als IB-M41 bezeichnet). Gegen diesen Serotyp sind auch die meisten der handelsüblichen Impfstoffe gerichtet. Im Laufe der Zeit traten immer wieder Krankheitsausbrüche auf, auch bei geimpften Herden, als deren Erreger neue IBV-Variantstämme ermittelt wurden (Tabelle.2).

Zur Untersuchung der antigenen Eigenschaften der Variantstämme finden verschiedene Testsysteme Anwendung. Hierzu zählen Virusneutralisationstests in embryonierten Hühnereiern, Trachealkulturen oder Zellkulturen, Hämagglutinationshemmungstests sowie in letzter Zeit auch zunehmend ELISA und Polymerasekettenreaktion (PCR).

Allerdings erweist sich der Versuch, mit diesen Tests eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Virusstämme zu bestimmten Serotypen vorzunehmen als schwierig, da je nach Art der verwendeten Tests unterschiedliche Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Variantstämmen bestehen.

Bis heute existiert noch keine allgemein akzeptierte Liste aller bekannten Serotypen. Auch wurde bisher kein einheitliches Test- und Bewertungssystem festgelegt. CAVANAGH (1998) schlägt vor, anstelle der Bezeichnung Serotyp den allgemeineren Begriff (Virus-)Typ zu verwenden, da eine Bestimmung des *Serotyps* streng genommen nur mit serologischen Methoden (Virusneutralisationstests) möglich ist. Bei der Verwendung von Testverfahren, die bestimmte Antigene nachweisen (z. B. bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern), müßte die richtige Bezeichnung *Immunotyp* lauten, während mit Hilfe der PCR eine Einteilung in *Genotypen* erfolgt. Wünschenswert wäre die Zuordnung von Virusstämmen zu *Protektotypen*, d.h. Gruppen von Virusstämmen, die am Tier eine Kreuzprotektion hervorrufen, es ist jedoch nicht praktikabel, jedes neue Virusisolat mit Hilfe von Tierversuchen zu charakterisieren (CAVANAGH, 1998).

Für weitere Verwirrung sorgt die Tatsache, daß teilweise unterschiedliche Namen für denselben Variantstamm verwendet werden (so wird z. B. wird der Typ 793/B auch als 4/91 und CR88 bezeichnet) und daß es bei Mischinfektionen zu einer Rekombination der RNA verschiedener IBV-Stämme kommen kann (CAVANAGH, 1998).

Eine Aufzählung der wichtigsten Serotypen, die in den letzten 50 Jahren weltweit beschrieben wurden, findet sich bei ZANELLA und MARTINO (1998) und wird im folgenden modifiziert wiedergegeben (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Aufzählung der wichtigsten Serotypen, über die weltweit in den letzten 50 Jahren berichtet wurde**

(modifiziert und ergänzt, nach ZANELLA und MARTINO, 1998)

Name des Stammes	Jahr (und ggf. Land) der Erstbeschreibung	Erkrankungsform
<b>USA:</b>		
Massachusetts 41	1941	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Connecticut 46	1956	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Iowa 97	1958	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Iowa 609	1958	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Holte	1962	Nephritis-Nephrose-Form
Gray	1962	Nephritis-Nephrose-Form
JMK	1964	Nephritis-Nephrose-Form <sup>3)</sup>
SE-17	1969	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Florida	1971 <sup>1)</sup>	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Clarke 333	1971	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Arkansas 99	1973	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Arkansas 155	1973	Respiratorische Form <sup>4)</sup>
California G	1975	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
California S	1975	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Maine 209	1976	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Maine 212	1976	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
Cal	1991	Nephritis-Nephrose-Form



Name des Stammes	Jahr (und ggf. Land) der Erstbeschreibung	Erkrankungsform
<b>Europa:</b>		
1731/65-PV	1966 (Italien)	Nephritis-Nephrose-Form
AZ-446/66	1966 (Italien)	Nephritis-Nephrose-Form
AZ-693/66	1966 (Italien)	Nephritis-Nephrose-Form
1663/66-PV	1966 (Italien)	Nephritis-Nephrose-Form
1677/66-PV	1966 (Italien)	Nephritis-Nephrose-Form
215/67-PV	1967 (Italien)	Nephritis-Nephrose-Form
AZ-529/67	1967 (Italien)	Nephritis-Nephrose-Form
Cuxhaven 10	1969 (BRD)	Respiratorische Form <sup>5)</sup>
K-4	1969 (BRD)	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
37/69-FO	1969 (Italien)	k. A.
269/69-PV	1969 (Italien)	k. A.
AZ-857/72	1972 (Italien)	Nephritis-Nephrose-Form
AZ 23/74	1974 (Italien)	Nephritis-Nephrose-Form
D-207	1981 (Niederlande)	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
D-212	1981 (Niederlande)	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
D-1466	1981 (Niederlande)	Respiratorische Form <sup>6)</sup>
AZ-156/81	1981 (Italien)	Respiratorische Form <sup>3)</sup>
HV-6/81	1982 (Großbritannien)	Respiratorische Form <sup>7)</sup>
3794/FO	1983 (Italien)	k. A.
NP 1648 <sup>1)</sup>	1985 (Belgien)	Nephritis-Nephrose-Form
AZ-266/86	1986 (Italien)	k. A.
PL-84084	1986 (Frankreich)	Respiratorische Form <sup>8)</sup>
CR-84221 <sup>1)</sup>	1987 (Frankreich)	Nephritis-Nephrose-Form
UK-4/91 <sup>2)</sup>	1991 (Großbritannien)	Spezielle Form, siehe 2.2.3.3
D-3128	1991 (Niederlande)	Respiratorische Form <sup>3)</sup>

Name des Stammes	Jahr (und ggf. Land) der Erstbeschreibung	Erkrankungsform
<b>Andere Erdteile:</b>		
Australia T	1962 (Australien)	Nephritis-Nephrose-Form
Massey	1967 Neuseeland)	Respiratorische Form / Nephritis-Nephrose-Form <sup>3)</sup>
Menendez (1716, 1859, 265) <sup>9)</sup>	1970 (Argentinien)	Respiratorische Form / Nephritis-Nephrose-Form <sup>9)</sup>
Kita 1	1981 (Japan)	Respiratorische Form <sup>10)</sup>
Morocco G	1986 (Marokko)	Spezielle Form, siehe 2.2.3.4
MA-87	1996 (Japan)	Nephritis-Nephrose-Form
ST	1996 (China)	Nephritis-Nephrose-Form

k. A.: keine Angabe zur Erkrankungsform, wahrscheinlich handelt es sich um die respiratorische Form

- 1) Die Stämme NP 1648 und CR84221 sind offensichtlich identisch.
- 2) Der Stamm 4/91 ist identisch mit den in Großbritannien und Frankreich isolierten Stämmen 793B und CR88121.
- 3) Ergänzende Information aus WOERNLE und HAFEZ, 1992.
- 4) Ergänzende Information aus JOHNSON und MARQUARDT, 1976.
- 5) Ergänzende Information aus VON BÜLOW, 1967.
- 6) Ergänzende Information aus DAVELAAR et al., 1986.
- 7) Ergänzende Information aus COOK, 1983.
- 8) Ergänzende Information aus PICAULT et al., 1986.
- 9) Ergänzende Information aus WOERNLE und HAFEZ, 1992: Die Stämme Nr. 1716, 1859, und 265 entsprechen den Stämmen Connecticut, Massachusetts und Holte.
- 10) Ergänzende Information aus YACHIDA et al., 1981.

## **2. 2 Die Infektiöse Bronchitis der Hühner als Erkrankung**

### **2. 2. 1 Vorkommen und Bedeutung**

Die Infektiöse Bronchitis der Hühner ist weltweit verbreitet. Nach erstmaliger Beschreibung der Erkrankung durch SCHALK UND HAWN im Jahre 1931 in den USA, North Dakota, und der ersten Anzucht von IBV im embryonierten Hühnerei durch BEAUDETTE UND HUDSON im Jahre 1937 wurde das IB-Virus 1948 erstmalig in Europa (England) nachgewiesen (ASPLIN, 1948). In der Folgezeit wurde auch in allen anderen Kontinenten über das Auftreten der Erkrankung berichtet.

Noch heute kommt es in den USA, Europa, Australien, Asien und Afrika zu immer neuen Ausbrüchen der Erkrankung und zur Isolation immer neuer Virusstämme, die aufgrund der hohen antigenen Variabilität auch geimpfte Herden betreffen können.

### **2. 2. 2 Epidemiologie und Pathogenese**

Die Aufnahme von IB-Viren erfolgt in der Regel über die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes. Bei infizierten Tieren findet eine Virusvermehrung in der Schleimhaut des Respirationstrakts statt. Im Rahmen der Erkrankung kommt es zu einer Desquamation der oberflächlichen, Viruspartikel enthaltenden Zellschicht, und das Niesen der Tiere führt zu einer raschen Virusverbreitung durch Tröpfcheninfektion. Nach einer experimentellen Infektion konnte noch nach bis zu 14 Tagen IBV aus der Trachealschleimhaut isoliert werden (PURCELL and CLARKE, 1972).

Weitere Infektionsquellen sind virushaltiger Kotstaub und kontaminiertes Trinkwasser. Infizierte Hühner können IB-Viruspartikel mit dem Kot über Monate kontinuierlich (ALEXANDER and GOUGH, 1977) oder intermittierend (WOERNLE, 1961, JONES and AMBALI, 1987) ausscheiden, so daß in einem natürlich

durchseuchten Bestand immer davon auszugehen ist, daß von einigen Tieren noch Viren ausgeschieden werden (WOERNLE, 1968). Eine mögliche Ursache für Infektionen ist daher das Zusammensetzen inapparent infizierter, oder rekonvaleszenter Tiere mit gesunden Hühnern.

Eine aerogene Übertragung zwischen Beständen durch virushaltige Luft oder Kotstaub ist ebenfalls möglich (CUMMING, 1970). Die Übertragung der Krankheit durch Menschen oder unbelebte Vektoren ist prinzipiell möglich, spielt bei ausreichenden Desinfektionsmaßnahmen jedoch aufgrund der geringen Tenazität des IBV eine untergeordnete Rolle (HOFSTAD, 1981). Auch die Untersuchungen von STUKE und KALETA (1970) ergaben, daß IBV im Getreideschimmelkäfer *Alphitobius diaperinus* nur eine Verweildauer von 4 Stunden besitzt, und der Käfer somit als Vektor für die Verbreitung der IB nicht von Bedeutung ist.

Die infektiöse Bronchitis der Hühner ist eine hoch kontagiöse Erkrankung. Die Infektion einiger Tiere eines empfänglichen Bestandes führt durch aerogene Verbreitung innerhalb weniger Tage zur Erkrankung des gesamten Bestandes. Die Inkubationszeit beträgt bei voll empfänglichen Küken 18 bis 36 Stunden (VAN ROEKEL et al., 1951). Bei nephropathogenen Virusstämmen wird die Inkubationszeit unter natürlichen Bedingungen mit 5 bis 6 Tagen angegeben (CUMMING, 1963) Nach Aufnahme und Vermehrung in den Schleimhäuten des oberen Respirationstraktes kommt es zu einer hämatogenen Verbreitung der Viren, besonders in den Respirationstrakt, die weiblichen Geschlechtsorgane, die Nieren, die Bursa Fabricii und den Magen-Darm-Trakt (HOFSTAD and YODER, 1966), wobei sich die bevorzugten Zielorgane je nach Virusstamm unterscheiden können.

## 2. 2. 3 Klinische Erscheinungsformen und Pathologie

### 2. 2. 3. 1 Respiratorische Form der IB

Die respiratorische Form ist die klassische, zuerst bei Hühnerküken beobachtete und beschriebene Form der IB. Sie wird durch die Mehrzahl der IB-Virusstämme hervorgerufen.

Die typische Erkrankung der Atemwege zeigt sich am häufigsten bei **Küken**. Diese zeigen Niesen, Schnabelatmung, rasselnde Atemgeräusche bis hin zu Atemnot. Nasenschleimhäute und Lidbindehäute sind katarrhalisch entzündet, die Tiere drängen zur Wärmequelle, Futter- und Wasseraufnahme sind vermindert und die Entwicklung der Tiere ist verzögert. Einzelne Todesfälle können auftreten, wenn die Küken aufgrund der starken Schleimansammlung in den Atemwegen ersticken, oder die Nahrungsaufnahme völlig einstellen.

Bei der Sektion erkennt man eine katarrhalische Entzündung des gesamten Respirationstraktes mit histologisch erkennbarem Verlust der Kinozilien in den oberen Atemwegen, katarrhalischer Pneumonie und Verdickung der Luftsackwände.

Beim Hinzukommen von Sekundärinfektionen durch Bakterien oder Mykoplasmen verstärken sich die Krankheitssymptome, und die Mortalitätsrate steigt deutlich an. Am seziierten Tier fällt dann die Ansammlung fibrinösen oder eitrigen Sekrets in den Atemwegen auf. Bei Ausbleiben von Sekundärinfektionen kommt es innerhalb von 1 bis 2 Wochen zu einer spontanen Genesung der Küken.

Eine Infektion während der ersten Lebenswochen geht häufig mit einer fibrinösen Entzündung des Infundibulums einher und führt bei einigen Küken zu einer späteren Unfruchtbarkeit (CRINION et al., 1971). Diesen unfruchtbaren Tieren fehlt oftmals der drüsenfreie Ring zwischen Isthmus und Magnum des Eileiters, gelegentlich kommt es zu einer vollständigen Verklebung des Eileiters (WOERNLE und HAFEZ, 1992). Die Hühner werden dann als „falsche Leger“ bezeichnet (BROADFOOT et al., 1956).

Infektionen im Junghuhnalter (älter als 6 Wochen) verlaufen meist klinisch inapparent, können jedoch ebenfalls „falsche Leger“ hervorbringen.

Auch die Infektion **erwachsener Legehennen** geht nur selten mit auffälligen respiratorischen Symptomen einher. Statt dessen kommt es zu einem Rückgang der Legeleistung um bis zu 55% (BISGAARD, 1976), es werden dünnchalige und mißgebildete Eier gelegt, normalerweise braun pigmentierte Eischalen bleiben weiß, das Eiklar ist wäßrig, ohne klare Trennung zwischen dünnem und festem Eiklar (HOFSTADT, 1984).

Bei der Sektion können auch bei älteren Tieren herdförmige Pneumonien in der Lunge und ödematisierte Luftsackwände vorgefunden werden (WOERNLE und HAFEZ, 1992). Im Ovar finden sich bluthaltige Eifollikel, im Legedarm sind mißgebildete Eier zu beobachten. Eine Abflachung der Epithelzellen mit Zilienverlust sowie eine zelluläre Infiltration und Ödembildung in der Lamina propria kann in allen Bereichen des Legedarms auftreten und dort zu Verengungen und Verklebungen führen (SEVOIAN and LEVINE, 1957).

In älteren Hühnerherden setzt die Mauser vorzeitig ein, jüngere Herden erreichen eine Eiproduktion, die derjenigen von gesunden Tieren entspricht, frühestens wieder nach 6 bis 8 Wochen. Teilweise, besonders bei Infektionen zu Beginn der Legeperiode, wird die Legetätigkeit überhaupt nicht mehr aufgenommen (BROADFOOT and SMITH 1954).

### 2. 2. 3. 2 Nephritis-Nephrose-Form der IB

Diese Form der IB wird durch nephropathogene Virusstämme hervorgerufen. Eine besonders hohe Virulenz besitzt der australische T-Stamm (CUMMING, 1962). Ebenfalls nephropathogen sind die Stämme Gray, Holte, Cal (USA), B(Belgien) 1648, CR-84221 (Frankreich), MA-87 (Japan), ST (China), verschiedene in Italien isolierte Virusstämme (Zanella und Martino 1998, siehe Abschnitt 2.1.4) sowie der Stamm Mass.-Holland 52 (MACDONALD and McMARTIN; 1976).

Besonders anfällig sind **Küken** im Alter von wenigen Wochen. Zunächst kommt es zu einer leichten Störung des Allgemeinbefindens mit milden respiratorischen Symptomen (beim australischen T-Stamm häufig fehlend). Später wird vermehrt wässriger Kot abgesetzt, die Futteraufnahme verringert sich, während die Wasseraufnahme erhöht ist (CUMMING, 1969).

Histologisch zeigt sich eine interstitielle Nephritis mit Ablagerung von Uratkristallen in Nieren, Harnleitern und gelegentlich im Peritoneum. Die erhöhte Elektrolytausscheidung und die Retention von Harnsäure führen häufig zum Tod. Die Mortalitätsrate kann bis zu 60 % betragen (CUMMING, 1969).

Die Infektion von **Legehennen** verläuft in der Regel wie bei der klassischen Form der IB (WOERNLE und HAFEZ, 1992), manchmal ist auch das einzige Anzeichen eine erhöhte Mortalität (BROWN et al., 1987).

### 2. 2. 3. 3 Erkrankung durch den Stamm 4/91 (bzw. 793 B oder CR88121)

Der Stamm 793B, auch als 4/91 bezeichnet, wurde 1991 erstmalig in Großbritannien aus einer gegen den Massachusetts-Typ geimpften Herde von Legehennen isoliert (GOUGH et al. 1992) und ist identisch mit dem in Frankreich isolierten Stamm CR88121 (PICAULT, 1995). Er verursacht einen deutlichen Anstieg der Mortalität, besonders bei weiblichen Tieren, und einen Abfall der Legeleistung um bis zu 30 %.

Bei den erkrankten Tieren fällt vor allem eine Myopathie der Pektoralismuskulatur auf, ebenso eine Zyanose der Kämme und Stauungserscheinungen am gesamten Körper.

In Broilerherden wurden Durchfälle und erhöhte Mortalitätsraten beobachtet (PARSONS et al., 1992).

#### **2. 2. 3. 4 Erkrankung durch den enterotropen Stamm Morocco G**

EL HOUADFI et al. beschrieben 1991 erstmals das Auftreten des enterotropen G-Stammes in Marokko. Dieser Stamm mit besonderer Affinität zum Magen-Darm-Trakt, der sich serologisch vom Massachusetts-Typ unterscheidet, verursacht – neben den typischen respiratorischen Symptomen bei Küken – bei Legehennen leichte respiratorische Symptome und wässrigen, gelblich-grünen Durchfall, der bis zu 2 Wochen anhält. Die Legeleistung sinkt um bis zu 40%, es werden mißgebildete und pigmentlose Eier gefunden.

#### **2. 2. 4 Wirtschaftliche Bedeutung**

Die hohen wirtschaftlichen Verluste stellen das Hauptproblem einer Infektion mit IB-Viren dar. In den betroffenen Beständen infizieren sich immer alle Tiere, und die hohe Variabilität des IBV ist dafür verantwortlich, daß es auch in geimpften Beständen immer wieder zu Krankheitsausbrüchen kommt.

Bei der Infektion von **Küken** in einem Alter von bis zu 6 Wochen kann die Mortalitätsrate 25 % und mehr betragen (WOERNLE und HAFEZ, 1992), für nephropathogene Stämme wird die Mortalitätsrate sogar mit bis zu 60 % angegeben (CUMMING, 1969). Sekundärinfektionen durch Bakterien und Mykoplasmen können zu einer weiteren Erhöhung der Mortalität sowie zu einer Verschlimmerung der Krankheitssymptome führen. Die Entzündung des Legedarms mit späterer Unfruchtbarkeit ist eine weitere Quelle für wirtschaftliche Einbußen.



Bei **Legehennen** werden die wirtschaftlichen Verluste durch den massiven Rückgang der Legeleistung um bis zu 55 % (BISGAARD, 1976) sowie durch die vermehrte Produktion minderwertiger Eier verursacht. Hierdurch kann es zu einem Ausfall an brutfähigen Eiern von bis zu 92 % kommen (BROADFOOT and SMITH, 1954). Bis zu einer Normalisierung der Legeleistung können 6 bis 8 Wochen vergehen, häufig bleibt die Legeleistung auf Dauer erniedrigt (CUNNINGHAM, 1970). Hat eine IB-Infektion im Küken- oder Junghennenalter stattgefunden, so bewirkt der höhere Anteil an unfruchtbaren Hennen in der erwachsenen Herde eine verminderte Legeleistung.

In **Broilerherden** führt die verringerte Futtermittelaufnahme zu einer Verzögerung des Wachstums und der Entwicklung der Masttiere (CAVANAGH and NAQUI, 1997).

## ***2. 3 Diagnose der Infektiösen Bronchitis***

### **2. 3. 1 Methoden zum Nachweis in vivo entstandener virusinduzierter Veränderungen**

#### **2. 3. 1. 1 Klinische Untersuchung und Pathologie**

Die durch IB-Viren hervorgerufenen klinischen und pathologischen Veränderungen wurden bereits im Kapitel 2.2.3 beschrieben. Diese Veränderungen sind nicht pathognomonisch. Es können ähnliche Veränderungen bei Infektionen mit anderen Erregern, wie lentogenen Virusstämmen der Newcastle-Krankheit oder Viren der Infektiösen Laryngotracheitis beobachtet werden. Daher eignet sich die Darstellung dieser Veränderungen zur Diagnosestellung nur unter Einbeziehung von Virusneutralisationstests, oder im Falle einer experimentellen Infektion. Gleiches gilt für die durch IB-Viren hervorgerufenen histologischen Veränderungen.

### 2.3.1.2 Histopathologische Untersuchung

#### 2.3.1.2.1 Histologischer Aufbau des Atmungsapparates bei Hühnern

Die **Trachea** besteht aus sich überlappenden Knorpelringen, denen außen quergestreifte Muskulatur und Bindegewebe aufliegt. Die Überlappung der Knorpelringe führt dazu, daß in Querschnitten der Eindruck zweier konzentrischer Knorpelringe entsteht (MATHEY, 1965). Lumenwärts schließt sich die schmale, zellarme Lamina submucosa an, welche zahlreiche, dicht vernetzte elastische Fasern enthält. Die Lamina propria mucosae besteht aus lockerem Bindegewebe mit eingelagerten Blutgefäßen und lymphatischen Zellen. In der Lamina propria befinden sich auch runde Schleimdrüsen, die sich zur Epitheloberfläche öffnen und mit becherförmigen Drüsenzellen besetzt sind, welche ein helles, schaumartig vakuolisiertes Zytoplasma besitzen. Den Abschluß zum Tracheallumen bildet das respiratorische Flimmerepithel, ein mehrreihiges Zylinderepithel, das an seiner Oberfläche dicht mit Kinozilien besetzt ist. Dieses Epithel ist in regelmäßigen Abständen ampullenförmig eingestülpt und besteht dort aus annähernd dreieckigen Schleimzellen (FRITZSCHE et al., 1969), deren Zytoplasma ein schaumiges Aussehen besitzt.

Die **Nasenhöhle** des Huhnes wird median durch das Septum nasi geteilt. Es sind drei Nasenmuscheln ausgebildet (Concha nasalis cranialis, media und caudalis), die hintereinander angeordnet sind. Zudem lassen sich drei Abschnitte unterscheiden. Der kranial gelegene Nasenvorhof (Regio vestibularis) besitzt eine drüsenlose Schleimhaut und wird durch die über dem Augapfel gelegene Nasendrüse (Glandula nasalis) befeuchtet. Nach kaudal schließt sich die Regio respiratoria an, welche mit einem mehrreihigen Flimmerepithel mit Becherzellen ausgekleidet ist. Die Regio olfactoria stellt sich als kleine, umgrenzte Zone auf der kaudalen Nasenmuschel und dem hinteren Septum nasi dar, die mit einem Riechepithel bedeckt ist (KÖNIG und LIEBICH, 2000). Dabei handelt es sich um ein mehrreihiges

Zylinderepithel, welches spezielle Riechzellen enthält, Nervenzellen mit hellen, kugeligen Zellkernen und deutlichen Nukleoli (MOSIMANN und KOHLER, 1990).

Anders als die **Lunge** der Säugetiere ist die Hühnerlunge nicht mit Pleura überzogen, sondern verbindet sich bindegewebig mit den Rippen und dem horizontalen Septum. Die Trachea verzweigt sich in die beiden Hauptbronchien, welche als einzige Bronchien Knorpelhalbringe enthalten und ringförmig von glatten Muskelzellen umschlossen werden. Aus den Hauptbronchien gehen zahlreiche Sekundärbronchien ab, welche wiederum in Parabronchien übergehen. Haupt- und Sekundärbronchien werden von einem respiratorischen Epithel ausgekleidet, das dem der Trachea entspricht. Unter diesem Epithel befinden sich seromuköse Drüsen und lymphoretikuläres Gewebe. Die untereinander anastomosierenden Parabronchien stellen die Funktionsträger der Vogellunge dar. Ihr zentrales Lumen ist mit einem einschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Aus diesem Lumen stülpen sich zahlreiche Hohlräume (Atrien) nach außen aus, die mit einem isoprismatischen Epithel ausgekleidet sind. Die Atrien wiederum buchten sich in mehrere radiär verlaufende Trichter (Infundibula) aus, welche die Luftkapillaren entlassen. Diese Luftkapillaren bilden ein dreidimensionales Netzwerk und sind mit einer dünnen Epithelschicht ausgekleidet, dessen Basalmembran mit derjenigen der umgebenden Blutkapillare verschmolzen ist (KÖNIG und LIEBICH, 2000).

Die **Luftsäcke** sind dünnwandig, plastisch verformbar und mit den angrenzenden Organen verwachsen. Ihre Wand enthält kollagene und elastische Fasern sowie glatte Muskelzellen (KÖNIG und LIEBICH, 2000).

### 2.3.1.2.2 *Histologischer Aufbau des Eileiters bei Hühnern*

Der Eileiter des Huhnes, auch als Oviductus oder Legedarm bezeichnet, läßt sich in die folgenden 5 Abschnitte unterteilen: Eileitertrichter (Infundibulum), Magnum, Eileiterenge (Isthmus), Gebärmutter (Uterus) und Scheide (Vagina). Im Normalfall ist nur der linke Eileiter angelegt. Den äußeren Überzug des Eileiters bildet die Lamina serosa, bestehend aus dem Serosaepithel und der darunterliegenden bindegewebigen Lamina propria serosae. Unter der Lamina serosa befindet sich die Tunica muscularis, eine Muskelschicht aus zirkulär und längs verlaufender glatter Muskulatur. Lumenwärts folgt die Tela submucosa und schließlich die Schleimhaut, welche wiederum in die bindegewebige Lamina propria mucosae und das Schleimhautepithel unterteilt werden kann. Die Schleimhaut der verschiedenen Eileiterabschnitte unterscheidet sich in ihrem Aussehen (KÖNIG und LIEBICH, 2000).

Der **Eileitertrichter** besitzt nur eine geringe Wanddicke und niedrige Falten, die in primäre und sekundäre Falten unterteilt werden können. Das Epithel ist zunächst einschichtig und flach, weiter kaudal ist es isoprismatisch. Im Anfangsbereich ist die Schleimhaut drüsenlos, weiter kaudal treten dann Schleimhautdrüsen in Form von Aussackungen des Epithels auf, die im weiteren Verlauf des Infundibulums an Größe und Anzahl zunehmen. Die Drüsen des Infundibulums produzieren Glykoproteine, welche der Dotterkugel außen angelagert werden und später im Ei die innerste Eiweißmembran und die Hagelschnüre (Chalazae) bilden.

Im **Magnum** bildet die Schleimhaut hohe Falten ohne Sekundärfalten, das Epithel ist einreihig und besteht aus hochprismatischen Zellen. In der Lamina propria findet sich eine große Anzahl geknäuelter, verzweigter tubulärer Drüsen, welche den Hauptanteil des Eiklars produzieren.

Die **Eileiterenge** besteht aus einem drüsenlosen Abschnitt mit dünner, faltenloser Schleimhaut und dem weiter kaudal gelegenen Anteil, der relativ niedrige Schleimhautfalten mit Sekundärfalten und Schlauchdrüsen aufweist. Das Sekret dieser Drüsen bildet die doppelschichtige Schalenhaut des Hühnereis.

Die Schleimhaut des **Uterus** besitzt ein hochprismatisches Epithel, welches das organische Sekret für den Aufbau der Kalkschale des Hühnereis liefert. Die Schleimhaut verläuft in Längsfalten, wodurch blattartige Lamellen entstehen. In der Lamina propria befinden sich tubulär verzweigte Drüsen, deren Sekret eine Wassereinlagerung und Aufquellung des vorhandenen Eiklars bewirkt.

Am Übergang zwischen Uterus und **Vagina** verbreitert sich die Quermuskulatur zum Muskelus sphinkter vaginae. Das Scheidenepithel ist einschichtig zylindrisch und mit Kinozilien bedeckt. Die Schleimhaut bildet dünne Falten, die mit Sekundärfalten besetzt sind. Zwischen den Schleimhautfalten befinden sich Drüsen, deren Sekret das Eioberrhäutchen (Cuticula) bildet. Die schlauchförmig verzweigten Uterovaginaldrüsen in der Lamina propria dienen als Sammelort für Spermien und können diese bis zu zwei Wochen lang speichern und ernähren (KÖNIG und LIEBICH, 2000).

#### *2.3.1.2.3 Histologischer Aufbau des Harnapparates bei Hühnern*

Bei der Niere des Huhnes kann, ebenso wie bei der Säugerniere, ein Rindenanteil und ein Markanteil unterschieden werden. Anders als beim Säugetier befinden sich sowohl im Rinden- als auch im Markbereich vollständige Nephrone, und die Glomerula sind im Vergleich zum Säugetier kleiner, aber zahlreicher (KÖNIG und LIEBICH, 2000). Die medullären Nephrone bestehen, ebenso wie beim Säugetier, aus einem Glomerulum mit Kapillarknäuel und Bowman-Kapsel, einem proximalen gewundenen Tubulus (Tubulus contortus proximalis), der haarnadelartig in den kegelförmigen Markbereich ziehenden Henle-Schleife und dem distalen gewundenen Tubulus (Tubulus contortus distalis), der dann in ein Sammelrohr

mündet, welches auch von weiteren Nephronen gespeist wird. In den wesentlich zahlreicher vorkommenden kortikalen Nephronen liegt anstelle der Henle-Schleife ein kurzes, gewundenes Zwischenstück vor, und die Glomerula sind kleiner als die der medullären Nephronen.

Die Sammelrohre vereinigen sich zu Ästen des Urethers, wobei jeweils der Einzugsbereich von Uretherästen 3. Ordnung als Nierenläppchen und der Einzugsbereich von Uretherästen 2. Ordnung als Nierenlappen zusammengefaßt wird.

Innerhalb des Nierenläppchens zweigen von der Läppchenarterie (A. intralobularis) die zuführenden Gefäße (Vasa afferentia) für die Glomerula ab. Die aus dem Gefäßknäuel der Glomerula hervorgehenden Vasa efferentia gehen in Kapillare über, die sich mit den Kapillaren des Pfortadersystems vereinigen und die Tubuli als peritubuläres Kapillarnetz umgeben.

Zwischen den Nierenläppchen verlaufen die Sammelrohre und die interlobulären Venen, während die zuführende A. intralobularis sowie die abführende Vene des Pfortadersystems (V. intralobularis) jeweils im Zentrum des Nierenläppchens zu finden sind.

Der Rindenanteil der Nierenläppchen wird demnach durch die kortikalen Nephronen, das peritubuläre Kapillarnetz und die zentralen Gefäße gebildet, während die zylinder- oder kegelförmige Markzone aus den Sammelrohren und Henle-Schleifen besteht.

#### 2.3.1.2.4 *Histologischer Aufbau des Hühnerdarms*

Am Hühnerdarm lassen sich Dünn- und Dickdarm unterscheiden, wobei der Dünndarm, ebenso wie bei Säuger, in Duodenum, Jejunum und Ileum unterteilt werden kann, während der Dickdarm aus den beiden Blinddärmen und dem Rektum besteht.

Die Darmwand besteht von außen nach innen aus folgenden Schichten: Ganz außen befindet sich die Lamina serosa. Diese liegt der Muskelschicht (Tunica muscularis) auf, welche sich in ein schwächeres Stratum longitudinale und ein stärkeres Stratum circulare unterteilen läßt. Zwischen diesen Schichten aus glatter Muskulatur befinden sich Gefäße und die vegetativen Nervenzellen des Auerbach'schen Plexus. Der Muskelschicht folgt lumenwärts die bindegewebige Tela submucosa. Diese enthält neben Blutgefäßen als weiteres vegetatives Nervengeflecht den Meißner-Plexus. Am Übergang der Tela submucosa zur Lamina propria der Darmschleimhaut befindet sich eine dünne Schicht glatter Muskulatur, die Lamina muscularis mucosae. In der Lamina propria der Darmschleimhaut befinden sich die Darmdrüsen, einige glatte Muskelzellen und lymphatisches Gewebe. Das Epithel der Darmschleimhaut ist durchgehend einschichtig hochprismatisch und enthält Hauptzellen, Becherzellen sowie einige endokrine Zellen. Die Schleimhaut bildet im gesamten Darm, also im Dünn- und Dickdarm Zotten, wobei diesen Zotten ein zentrales Lymphgefäß fehlt.

### 2.3.1.2.5 IBV-bedingte histologische Veränderungen im Atmungsapparat

PURCELL and MCFERRAN (1971) beschreiben die pathologischen und histologischen Veränderungen bei experimenteller Infektion von 12-Wochen alten SPF-Küken mit einem virulenten IB-Virusstamm vom Massachusetts-Typ. Makroskopisch kam es hierbei 48 Stunden nach der Infektion zu einer Verdickung und Ödematisierung der Schleimhaut von Trachea und großen Bronchen. Innerhalb von vier Tagen p. i. ging die Ödematisierung zurück, es blieb jedoch eine verstärkte Schleimbildung bis zum neunten Tag bestehen. Sämtliche Luftsäcke zeigten ab dem dritten Tag p. i. eine ödematöse Verdickung und Trübung mit bläschenförmigen, klaren Exsudatansammlungen. Nach ca. 3 Wochen zogen sich die Luftsackkläsionen zu sternförmigen Verdickungen zusammen, welche teilweise bis zum 41. Tag bestehen blieben.

Die histologischen Veränderungen der **Nasenhöhle** werden von PURCELL and MCFERRAN (1971) als äußerst variabel beschrieben. Die auffälligsten Veränderungen bestanden in einer Hypertrophie der Schleimdrüsen mit vermehrter Schleimabsonderung in die Nasenhöhle sowie einem fokalen Zilienverlust des Epithels.

Die deutlichsten histologischen Veränderungen fanden sich in der Schleimhaut von **Trachea** und größeren Bronchien. 18 Stunden nach der Infektion zeigten sich fokal erste Abrundungen der Flimmerepithelzellen. 24 Stunden p. i. kam es zu einer Desquamation von Epithelzellen sowie zu einem Verlust der Kinozilien in den Bereichen, in denen das Epithel noch intakt war. Die Anzahl der Schleimdrüsen war deutlich verringert, und in der Lamina submucosa lag ein entzündliches Ödem vor. Diese Phase wird von PURCELL and MCFERRAN (1971) als Stadium der akuten Desquamation bezeichnet. In dem darauf folgenden Stadium der Epithelhyperplasie (2 Tage p. i. ) war die Lamina propria mit bis zu 6 Schichten von Epithelzellen bedeckt. Schleimdrüsen waren nur vereinzelt zu beobachten und häufig erweitert.



Das Stadium der lymphocellulären Infiltration (3.-6. Tag p. i.) ist durch eine massive Infiltration der Lamina Propria mit Lymphozyten und anderen Entzündungszellen und durch eine deutliche Verdickung der Trachealschleimhaut gekennzeichnet. Am 7. Tag p. i. beginnt laut PURCELL and MCFERRAN (1971) das Stadium der Regeneration. Zu diesem Zeitpunkt waren die Epithelzellen kubisch bis zylindrisch und zumeist wieder mit Kinozilien besetzt. Die Anzahl der Schleimdrüsen war noch deutlich niedriger als vor der Infektion. Die ödematöse Schwellung der Submucosa war zurückgegangen, die zelluläre Infiltration in der gesamten Schleimhaut blieb jedoch als Ausdruck der immunologischen Reaktionsbereitschaft noch über längere Zeit bestehen.

JUNGHERR et al. (1956) unterteilen den Krankheitsverlauf in eine akute Phase mit Ödembildung und beginnender zellulärer Infiltration (Dauer etwa 2 – 3 Tage), eine reparative Phase mit massiver zellulärer Infiltration und Abflachung des Zylinderepithels (Dauer 6 – 9 Tage) und eine Immunphase in der die Regeneration des Gewebes stattfindet (Dauer 12 – 18 Tage).

ZADURA et al. (1977) Beschreiben nach experimenteller Infektion mit dem virulenten IBV-Stamm Moreau bei empfänglichen Küken vom 3. bis zum 15. Tag p. i. ein starkes Ödem der Trachealschleimhaut, eine deutliche zelluläre Infiltration der Lamina submucosa, eine Desquamation des Epithels und die Anwesenheit von entzündlichem Exsudat im Tracheallumen. Küken gleichen Alters, die drei Wochen zuvor mit  $10^3$  EID<sub>50</sub> des Impfvirusstammes H120 geimpft waren, zeigten vergleichbare Symptome, wenn auch etwas schwächer ausgeprägt. Bei Küken, die als Impfdosis  $10^5$  oder  $10^7$  EID<sub>50</sub> erhalten hatten, wurde in der Trachealschleimhaut nur eine minimale Ödematisierung, zelluläre Infiltration und nur gelegentlich eine Zilienatrophie beobachtet.

Die Veränderungen in den **Lungen** beschränken sich hauptsächlich auf die Primär- und Sekundärbronchien, gelegentlich sind auch die Tertiärbronchien betroffen (PURCELL and MCFERRAN, 1971). Die in den Primärbronchien zu beobachtenden Läsionen entsprechen denen der Trachea. Die Primär- und Sekundärbronchien enthielten zwischen dem 2. und 7. Tag p. i. gelegentlich ein eitriges Exsudat. In den Tertiärbronchien kam es zu einer lymphozytären Infiltration, wobei vom 8. Tag p. i. an umschriebene lymphozytäre Knötchen auftraten und zu einer Verengung des Lumens führten (PURCELL and MCFERRAN, 1971).

In den **Luftsäcken** zeigt sich histologisch zunächst eine generalisierte ödematöse Schwellung der Luftsackwände mit hauptsächlich lymphozytärer Infiltration. Durch die Bildung eines fibrinhaltigen Exsudates entstehen Pseudomembranen. Luftsackwände und Pseudomembranen werden dann in lockeres Bindegewebe umgewandelt, welches sich in den folgenden 10 Tagen allmählich zusammenzieht, wodurch kleine, stark verdickte bindegewebige Bereiche entstehen, welche dann über Wochen zunächst hyalinisiert und später abgebaut werden (PURCELL and MCFERRAN 1971).

#### *2.3.1.2.6 IBV-bedingte histologische Veränderungen im Eileiter*

Die Infektion empfänglicher erwachsener Legehennen mit virulentem IBV hatte zwischen dem 7. und 21. Tag p. i. eine Abflachung der Epithelzellen sowie eine Verringerung der Zilienzahl bis hin zum vollständigen Fehlen der Kinozilien zur Folge (SEVOIAN and LEVINE, 1957). Diese Veränderungen traten besonders im kaudalen Infundibulum, im mittleren Magnum sowie in den kaudalen Abschnitten von Isthmus und Uterus auf. Weiterhin waren im gesamten Legedarm erweiterte Drüsen zu beobachten, die mit einem homogenen, schwach eosinophilen Material gefüllt waren. Vom 6. bis zum 76. Tag p. i. kam es in der Lamina propria zu einer Infiltration durch mononukleäre Zellen mit fokalen Anhäufungen von Lymphozyten (SEVOIAN and LEVINE, 1957).

Die Infektion von Hühnerküken im Alter von einem bis zu 29 Tagen mit IBV Mass. 33 in der 7., bzw. 55. Embryopassage hatte ebenfalls eine Schädigung des Eileiters zur Folge. Das in seiner 7. Embryopassage vorliegende Virus rief bei Küken sämtlicher Altersklassen Veränderungen hervor, während das höher passagierte Virus nur nach einer Infektion im Alter von 2, bzw. 8 Tagen, nicht aber bei älteren Tieren zu einer Schädigung des Eileiters führte. Die histologischen Veränderungen bestanden zunächst in einer lymphozytären Infiltration und Ödematisierung der Eileiterwand. Kurz darauf kam es zu einer Degeneration von Epithelzellen und deren Abstoßung in das Eileiterlumen. Bei einigen Küken kam es zu einer Obturation des Eileiters mit anschließender Bildung einer Zyste kaudal dieses Verschlusses (CRINION and HOFSTAD, 1972).

#### *2.3.1.2.7 IBV-bedingte histologische Veränderungen im Harnapparat*

Nach einer Infektion 12 Wochen alter Hühner mit dem nephrotropen australischen T-Stamm beschreiben PURCELL et al. (1976) zunächst ein Stadium der akuten Tubulusdegeneration, welches am 4. Tag p. i. beginnt und seine deutlichste Ausprägung am 5. bis 7. Tag p. i. erreicht. Dieses Stadium besteht in einer zystischen Degeneration von Tubuli, sowohl in der Nierenrinde als auch im Markbereich. Die zystisch veränderten Tubuli sind dilatiert und enthalten neben Zelldetritus eine größere Anzahl an polymorphkernigen Granulozyten. In einzelnen Tubuli oder kleinen Gruppen von Tubuli kommt es zu einer Nekrose und Abstoßung des Epithels. Im umgebenden Bindegewebe finden sich vermehrt polymorphkernige Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen. Im sich anschließenden Stadium der Nierenregeneration, welches am 8. Tag p. i. beginnt, kommt es zu einem Abtransport der Zelltrümmer aus dem Tubuluslumen. Die Zelluläre Infiltration wird hauptsächlich durch Lymphozyten und Plasmazellen gebildet, bleibt noch bis zum 13. Tag p. i. bestehen und nimmt danach schnell ab.

Nach dem 13. Tag p. i. bilden sich im Interstitium Ansammlungen von lymphatischem Gewebe, insbesondere in der Umgebung der Blutgefäße in der Nierenrinde. Diese sind bis zum 28. Tag p. i. größtenteils wieder verschwunden. Vom 13. bis zum 35. Tag p. i. lassen sich abgegrenzte Gebiete erkennen, in denen Glomeruli und Tubuli in höherer Anzahl aber verminderter Größe vorliegen (PURCELL et al, 1976).

Ähnliche Veränderungen (interstitielle Nephritis, Nekrose des Tubulusepithels, interstitielles Ödem und zelluläre Infiltration) ließen sich auch nach der intravenösen Verabreichung des Impfvirusstammes H 52 an Küken im Alter von 3, bzw. 10 Wochen beobachten (MACDONALD et al., 1980).

#### *2.3.1.2.8 IBV-bedingte histologische Veränderungen im Darm*

Obwohl der enterotrope Stamm Morocco G (EL HOUADFI et al. 1991) aus sämtlichen Darmabschnitten infizierter Hühnerküken (Duodenum, Jejunum, Ileum, Blinddarmtonsillen und Rektum) isoliert und auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Ileum und Rektum dargestellt werden konnte, waren histologische Veränderungen der Darmschleimhaut ausschließlich im Rektum zu beobachten (AMBALI and JONES, 1990). Die Veränderungen traten vom 5. Tag p. i. an auf und verstärkten sich bis zum 10. Tag p. i. Sie bestanden in einer Abstoßung von Epithelzellen an den Zottenspitzen, die Blutgefäße waren gestaut, und es waren fokale Infiltrationen mit Lymphozyten, Makrophagen und gelegentlich heterophilen Granulozyten zu beobachten (AMBALI and JONES, 1990).

### 2. 3. 1. 3 Ziliarreduktionstest

Die Expertengruppe Nr. 15 V der Arzneibuchkommission des Europarates veröffentlichte im April 1998 sowie im März 1999 Entwürfe zur Neufassung der Monographie über Lebendimpfstoffe gegen die Infektiöse Bronchitis des Huhnes. In diesen Entwürfen ist im Abschnitt über die Wirksamkeitsprüfung eine Untersuchung der Zilienaktivität in der Hühnertrachea vorgesehen. Hierzu sollen Querschnitte aus dem oberen (drei), mittleren (vier) und unteren (drei) Abschnitt der Luftröhre angefertigt und ihre Zilienaktivität mikroskopisch bei geringer Vergrößerung beobachtet und dann beurteilt werden. Genauere Angaben zur Durchführung und Auswertung dieser Methode fehlen in diesen Entwürfen.

DARBYSHIRE (1980) beschreibt den Ziliarreduktionstest zum Nachweis eines durch Impfstoffe vermittelten Schutzes gegen eine experimentelle Infektion mit homologen und heterologen Virusstämmen. Hierzu werden unmittelbar nach der Tötung der Hühner die Tracheen vorsichtig entnommen. Es werden zehn 1,5 mm dicke Querschnitte angefertigt, wobei jeweils drei Querschnitte aus der kranialen und kaudalen Trachea und vier Querschnitte aus dem mittleren Teil der Trachea entnommen und sofort mikroskopisch auf ihre Zilienbeweglichkeit untersucht werden. Als durch den Impfstoff geschützt gelten Tiere, bei denen die Zilienbeweglichkeit nach der Belastungsinfektion noch zu mindestens 50 % erhalten ist. Bei den nicht geimpften Kontrollküken beobachtet DARBYSHIRE mit Ausnahme eines IBV-Stammes (Iowa 609) eine vollständige Ziliostase. Diejenigen Küken, die mit dem Stamm H120 geimpft worden waren, erwiesen sich als gegen den homologen Virusstamm geschützt. Auch gegen 4 der 7 heterologen Stämme bestand ein Impfschutz.

ANDRADE et al. (1982) lehnen sich in ihrer Vorgehensweise an DARBYSHIRE (1980) an, wobei jedoch fünf Querschnitte von ca. ½ mm Breite angefertigt und untersucht werden. Für die Beurteilung der Zilienbeweglichkeit wird eine

Bewertung von 0 (keine Zilienaktivität) bis 4 (100% Zilienaktivität) für jeden einzelnen Querschnitt vorgenommen. Anschließend wird der Mittelwert aus allen untersuchten Schnitten gebildet. Hier gilt ein Küken dann als gegen die Erkrankung geschützt, wenn bei mindestens 50% der Trachealringe eine Zilienbeweglichkeit zu erkennen ist. Bei den nicht geimpften Küken werden vor der Belastungsinfektion Mittelwertwerte für die Zilienbeweglichkeit von 1,93 bis 2,36 beobachtet, nach der Infektion liegt der Durchschnittswert bei 0. Die mit homologem Impfstoff vakzinierten Küken wiesen nach der Belastungsinfektion eine durchschnittliche Zilienbeweglichkeit auf, die mit 2,84 bis 2,85 bewertet wurde.

MARQUARDT et al. (1982) vergleichen bei immunisierten und nicht immunisierten Hühnerküken nach der Belastungsinfektion mit IBV die Zilienbeweglichkeit in den Tracheen mit der Anzüchtbarkeit von IBV in Trachealkulturen. Hierzu werden die Luftröhren den getöteten Küken möglichst aseptisch entnommen und in Leibowitz L-15 Medium aufbewahrt. Es werden Querschnitte angefertigt und auf ihre Zilienbeweglichkeit untersucht. Die Ergebnisse der Beurteilung der Zilienbeweglichkeit stimmen mit denen der Virusisolierung in Trachealkultur überein. Immunisierte Küken sind gegen die Belastungsinfektion geschützt, nicht immunisierte Tiere zeigen eine Ziliostase.

Ob die Beurteilung der Trachealringe jeweils an der Luft, oder in Medium erfolgt, wird bei den drei obengenannten Autoren nicht erwähnt, es ist daher anzunehmen, daß die Querschnitte ohne Medium beurteilt werden. NEUMANN und KALETA (1975) beschreiben die Anfertigung von „Open-air“-Hühnertrachealkulturen zur Beurteilung der Zilienaktivität nach Infektion mit dem Virus der Newcastle-Krankheit.

## **2. 3. 2 Methoden zum Nachweis in ovo / in vitro entstandener virusinduzierter Veränderungen**

### **2. 3. 2. 1 Virusanzüchtung im embryonierten Hühnerei**

Nach der Inokulation virushaltigen Organmaterials in die Allantoishöhle embryonierter Hühnereier am 8. - 12. Tag der Bebrütung kommt es zu einer Virusvermehrung, insbesondere in den Epithelzellen der Amnion- und Allantoishöhle, und zu einer Virusanreicherung in den Allantois- und Amnionflüssigkeiten (BEAUDETTE and HUDSON, 1937), wobei eine Inokulation des virushaltigen Materials am 9. – 11. Bebrütungstag am erfolgreichsten ist (DELAPLANE, 1947).

Bei der ersten Beimpfung mit Feldvirus enthaltenden Gewebemomogenisaten aus dem Respirationstrakt erkrankter Hühner zeigen nur etwa 10 % der Embryonen morphologische Veränderungen oder sterben ab, während ca. 90 % überleben (CAVANAGH and NAQI, 1997). Erst nach mehreren Passagen, wobei jeweils Allantois- oder Amnionflüssigkeit infizierter Embryonen geerntet und in die Allantoishöhle anderer embryonierter Hühnereier verimpft wird, erhöht sich die Virulenz der Viren für den Hühnerembryo. Nach zahlreichen Embryopassagen verringert sich die Virulenz für Küken, und die Immunogenität nimmt ab (BEAUDETTE and HUDSON, 1937).

Nach etwa 10 Passagen sterben die meisten Embryonen ab oder zeigen typische morphologische Veränderungen, wie Verzweigung (dwarfing) und Einrollen (curling), wobei sich die Füße unmittelbar neben dem Kopf befinden (CAVANAGH and NAQI, 1997). Das Amnion liegt dem Embryo dicht an und ist teilweise mit ihm verklebt, die Amnionflüssigkeit ist sehr zähflüssig und enthält oft Fibrinflocken (WOERNLE und HAFEZ, 1992). Histologisch zeigen solche Embryonen Pneumonien mit zellulärer Infiltration, seröser Exsudation und Hyperämie, Leberstauung und Lebernekrosen sowie interstitielle Nephritiden (LOOMIS et al., 1950).

Ähnliche Veränderungen bei Hühnerembryonen werden durch Adenoviren (YATES and FRY, 1957), lentogene Virusstämme der Newcastle-Krankheit (HOFSTAD, 1984), Viren der Aviären Enzephalomyelitis (MOORE and FLOWERS, 1959) und Viren der Entenhepatitis, Typ 1, hervorgerufen (HANSON, 1964). Die oben beschriebenen Embryopathien sind demnach nicht pathognomonisch für das IBV. Daher eignen sich auch die IBV-bedingten Veränderungen am Hühnerembryo zur Diagnose der IB nur nach experimenteller Infektion oder im Zusammenhang mit Virusneutralisationstests oder immunologischen Nachweisverfahren.

### 2. 3. 2. 2 Virusanzüchtung in Gewebekulturen

**Trachealkulturen** werden gewonnen, indem aus Tracheen von Hühnerküken oder Hühnerembryonen ringförmige Querschnitte angefertigt und in ein geeignetes Nährmedium verbracht werden. Da bei konventionellen Kükentracheen durch eine lokale Immunität der Trachealschleimhaut die Virusvermehrung gehemmt werden kann empfiehlt sich die Herstellung von Trachealkulturen aus bis zu einigen Wochen alten SPF-Küken oder 20 Tage alten Hühnerembryonen (COOK et al., 1976).

In diesen Kulturen entstehen bereits nach der ersten Beimpfung mit IBV-haltigem Organmaterial erkennbare morphologische Veränderungen in Form einer Abrundung der Epithelzellen und anschließender Ablösung des Epithels. DUTTA (1974) beobachtet nach der Infektion von Trachealkulturen aus 6-8 Wochen alten SPF-Küken mit  $10^{2,5}$  ID<sub>50</sub> des für Küken pathogenen Stammes M41 innerhalb von 48 Stunden eine Abrundung des Epithels mit Verlust des Zilienbesatzes. COLLWELL und LUKERT (1969) setzten Trachealkulturen aus vier Wochen alten, isoliert gehaltenen Küken ein und beobachteten nach der Infektion mit dem IBV-Stamm M41 eine Abrundung der Zellen innerhalb von 24 Stunden, einen vollständigen Zilienverlust jedoch erst nach 2-5 Tagen.



Trachealkulturen eignen sich besonders zur Erstisolierung des IBV, da sie dem natürlichen Angriffsort der meisten IBV-Stämme am besten entsprechen. Auch für die Durchführung von Virusneutralisationstests sind sie gut geeignet und können daher zur Diagnose und Serotypisierung neuer Virusstämme eingesetzt werden (DARBYSHIRE et al.,1979).

Eine erfolgreiche Vermehrung von IBV in **Kulturen anderer Organe** aus Hühnerküken wurde ebenfalls beschrieben, wobei jeweils embryoadaptierte IBV-Virusstämme leichter und mit besseren Ernten vermehrt werden konnten als Feldvirusstämme. Als besonders empfänglich für IBV erwiesen sich Nasenschleimhaut, Luftsackmembranen, Legedarm, Lunge und Bindehaut (DARBYSHIRE et al., 1978). Diese Organe, bzw. Organteile lassen sich unter Laborbedingungen unterschiedlich lange vital erhalten. Die morphologischen Veränderungen an diesen Organkulturen sind jedoch weniger leicht erkennbar und daher oft schwerer zu beurteilen, als die in Trachealkulturen hervorgerufenen Veränderungen.

### **2. 3. 2. 3 Virusanzüchtung in Zellkulturen**

IB-Viren können in Zellkulturen angezüchtet werden. Die erzielbaren Virustiter liegen jedoch deutlich niedriger als bei der Vermehrung im embryonierten Hühnerembryo (VON BÜHLOW, 1964). Ein zytopathogener Effekt (ZPE) tritt erst bei der Verwendung mehrfach im Hühnerembryo passagierter Viren auf. Dieser besteht zunächst im Zusammenschluß mehrerer Zellen zu Synzytien (AKERS and CUNNINGHAM, 1968). Später kommt es zur Lysis dieser Riesenzellen. Werden die Zellkulturen nach der Inokulation der Virussuspension und einer Zeit der Inkubation mit einem agarhaltigen Medium überschichtet, so bilden sich makroskopisch erkennbare Löcher im Zellrasen, sogenannte Plaques (GILETTE, 1972; OTSUKI and TSUBOKURA, 1981).

Aufgrund der geringen Empfindlichkeit gegenüber nicht embryoadaptierten Viren sind Zellkulturen zur Erstisolierung von IB-Feldvirus nicht geeignet. Kommt es nach mehrfacher Passagierung unbekannter Virusstämme in Hühnerembryo und Zellkultur zur Ausbildung eines zytopathogenen Effekts, so können in diesen Zellkulturen Virusneutralisationstests zur Bestimmung des Serotyps durchgeführt werden (Le Gros, 1998).

#### *2. 3. 2. 3. 1 Virusanzüchtung in Hühnerembryonierenzellkulturen*

Hühnerembryonierenzell-(HEN)Kulturen sind zur Vermehrung von embryoadaptierten IB-Viren am besten geeignet. Bei hoch eiadaptierten Stämmen wird bereits nach der ersten Beimpfung einer HEN-Kultur nach 1-3 Tagen ein deutlicher zytopathogener Effekt beobachtet. Weniger stark eiadaptierte Stämme erzeugen erst nach weiteren Passagen in HEN-Zellkulturen einen erkennbaren ZPE, während einige Feldvirusstämme ohne Pathogenität für Hühnerembryonen auch nach wiederholten Zellkulturpassagen keine Veränderungen der Zellen hervorrufen. (VON BÜLOW; 1964; GILLETTE, 1973).

Die erzielbaren Virustiter im Zellkulturmedium sind nur wenig niedriger als diejenigen im embryonierten Hühnerei, allerdings sind die für die Infektion von Zellkulturen notwendigen Viruskonzentrationen um 3 bis 4 Zehnerpotenzen höher als die einfektösen Dosen (VON BÜLOW, 1964).

#### 2. 3. 2. 3. 2 *Virusanzüchtung in Hühnerembryofibroblasten-Zellkulturen*

In Kulturen aus Hühnerembryofibroblasten (HEF) wird ein mäßig ausgeprägter zytopathogener Effekt nur bei wenigen Virusstämmen, wie dem hoch embryoadaptierten Stamm Beaudette, und nur nach vorangegangener Passage in HEN-Kulturen beobachtet (CHOMIAK et al., 1958).

OTSUKI UND TSUBOKURA (1981) erreichten eine deutliche Plaquebildung durch Zusatz von 20 – 40 µg Trypsin pro ml Kulturmedium bei verschiedenen Virusstämmen, die jedoch alle zuvor in HEN-Kulturen passagiert wurden.

#### 2. 3. 2. 3. 3 *Virusanzüchtung in Verozellkulturen*

Eine Vermehrung von IB-Viren in Verozellkulturen ist nur dann erfolgreich, wenn zuvor eine Passagierung in embryonierten Hühnereiern und in Hühnerembryonierenzellkulturen stattgefunden hat (CORIA and RITCHIE, 1973), ein zytopathogener Effekt wurde in Verozellen nur durch hoch embryoadaptierte, oder mehrfach in Hühnerembryonierenzellkulturen passagierte IB-Virustypen hervorgerufen und erst nach drei zusätzlichen Passagen in Mäusegehirnen (CUNNINGHAM et al., 1972).

## **2. 3. 3 Immunologische Methoden zum Antigennachweis**

### **2. 3. 3. 1 Virusneutralisationstests**

Virusneutralisationstests werden zum Virusnachweis bei natürlich infizierten Tieren sowie zur Serotypisierung der Virusstämme verwendet. Sie lassen sich in allen Wirtssystemen durchführen, in denen IB-Viren vermehrbar sind und erkennbare Läsionen verursachen. Hierzu wird das Virus in dem entsprechenden Wirtssystem angezüchtet, und die Veränderungen werden begutachtet. In einem weiteren Ansatz wird dem infektiösen Material ein spezifisches Antiserum zugesetzt, welches die darin enthaltenen Viren neutralisiert, so daß bei der Beimpfung des Wirtssystems die typischen Läsionen ausbleiben.

Titrationen ermöglichen eine quantitative Bestimmung des Virusgehaltes. Hierzu wird ein homologes Antiserum mit bekanntem Antikörpergehalt in unterschiedlichen Verdünnungen mit der Virussuspension inkubiert und in ein Virusnachweissystem (embryoniertes Hühnerei, Gewebekultur, Zellkultur) inokuliert. Als Kontrollen dienen nicht infizierte Virusnachweissysteme und solche, die nur mit dem virushaltigen Material in unterschiedlichen Verdünnungen inokuliert werden (Virustitration). Nach einer festgelegten Zeit p. i. werden die Titer der Virusneutralisation und der Virustitration errechnet. Die Differenz zwischen diesen beiden Werten ergibt den Neutralisationsindex (NI).

Vorteil der Neutralisationstests ist, daß mit ihrer Hilfe eine eindeutige Identifizierung des Virus als Krankheitsauslöser sowie eine Serotypisierung des isolierten Variantstammes möglich ist. Die Tatsache, daß neutralisierende Antikörper serotypspezifisch ausgebildet werden, macht allerdings die Verfügbarkeit von spezifischen Antiseren gegen den jeweils vorliegenden Serotyp zur Vorbedingung für einen erfolgreichen Neutralisationstest, was in Anbetracht der großen antigenen Variabilität der IB-Viren problematisch und daher von Nachteil sein kann.

Serumneutralisationstests in verschiedenen Wirtssystemen werden heute regelmäßig zum Nachweis von IBV-Infektionen und zur Serotypbestimmung eingesetzt.

**Trachealkulturen** sind für den Einsatz im Neutralisationstest gut geeignet, da zumindest Virusstämme mit Affinität zum Respirationstrakt bereits bei der Erstisolierung deutliche Veränderungen, wie Epithelablösung und Ziliostase hervorrufen. Es kommt also, ohne die Notwendigkeit einer Adaptation an das System durch Passagierung, zur Virusvermehrung und zu morphologischen Veränderungen. Daher lassen sich auch Titrations- und Serotypisierungen in diesem System leicht durchführen (JOHNSON and MARQUARDT, 1975).

Im **embryonierten Hühnerei** sterben bei der Erstisolierung nur wenige Embryonen ab oder zeigen typische Läsionen, so daß zunächst mehrere Eipassagen erfolgen müssen, bevor ein aussagefähiger Neutralisationstest durchgeführt werden kann (WOERNLE und HAFEZ, 1992; CAVANAGH and NAQUI, 1997).

Gleiches gilt in verstärktem Maße für **Zellkulturen**, in denen viele Virusstämme erst nach mehreren Passagen - zunächst im embryonierten Hühnerei, anschließend in Zellkultur - erkennbare Veränderungen hervorrufen (COWEN and HITCHNER, 1975). Die mit der Anpassung an das Wirtssystem einher gehende Modifikation der Oberflächenantigene könnte allerdings zu falschen Ergebnissen im Neutralisationstest führen. Hühnerembryonienzellkulturen sind aufgrund ihrer hohen Empfänglichkeit für IB-Viren und wegen der Ausbildung eines zytopathogenen Effekts die für die Durchführung von Neutralisationstests am besten geeigneten Zellkulturen (CUNNINGHAM, 1970).

### **2. 3. 3. 2 Agargelpräzipitation (AGP) / Immundiffusionstest (IDT)**

Der Agargelpräzipitationstest eignet sich zum Nachweis von IBV sowohl in Trachealschleimproben infizierter Hühner (WOERNLE und HAFEZ, 1992) als auch in Chorioallantoismembranen (WOERNLE, 1959) oder Allantoisflüssigkeit (LOHR, 1980) embryonierter Hühnereier, welche zuvor mit IBV-haltigem Organmaterial beimpft wurden.

Für diesen Test wird eine Petrischale mit festem Agarmedium beschichtet, in das Löcher gestanzt werden, die dann mit Antigen- und Antikörperlösung befüllt werden können. Antigene und Antikörper diffundieren durch das Agarmedium aufeinander zu und bilden dort, wo sie aufeinandertreffen und miteinander reagieren, eine sichtbare, weißlich opaleszierende Präzipitatlinie.

WOERNLE (1959) beschreibt den IB-Virusnachweis aus Erstkulturen im embryonierten Hühnerei. Hierfür wird das zu testende Material in die Allantoishöhle embryonierter Hühnereier inokuliert. Nach 2-tägiger Bebrütung wird die Chorioallantoismembran entnommen, im Mörser zerrieben und im Immundiffusionstest eingesetzt. Das Antiserum wird von einer mehrfach mit IBV superinfizierten Henne gewonnen und - nach Entfettung mit Chloroform - im IDT eingesetzt. Proben, Kontrollantigen und Antiserum werden in benachbarte Vertiefungen gefüllt, 1 bis 3 Tage bei Zimmertemperatur inkubiert und auf Präzipitatlinien untersucht. IB-virushaltige Proben bilden mit dem Antiserum eine Präzipitatlinie, welche in die zwischen Antiserum und Kontrollantigen gebildete Linie übergeht.

Ein Vorteil dieses Tests ist, daß die hier eingesetzten präzipitierenden Antikörper gegen die gruppenspezifischen IBV-Antigene gerichtet sind, so daß der Nachweis von IB-Viren unabhängig vom Serotyp erfolgt. Eine Serotypisierung von IB-Viren ist aus dem selben Grund mit diesem Test nicht möglich. In der neueren Literatur wird die Durchführung dieses Tests noch gelegentlich beschrieben, wegen der

Notwendigkeit einer Serotypisierung, bzw. Genotypisierung kommt anderen Testmethoden, insbesondere den Neutralisationstests und der PCR jedoch eine größere Bedeutung zu.

### **2.3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung**

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung kann IBV-Antigen in Gefrierschnitten verschiedener Organe (SIMIC, 1972: Trachea, Lunge, Milz, Niere; DE WIT et al., 1995: Trachea), in Trachealschleimhautabstrichen infizierter Hühner (BRAUNE and GENTRY, 1965; WIZIGMANN et al., 1981), in Allantoiszellen infizierter Hühnerembryonen (CLARKE et al., 1972; ENDO-MUNOZ and FARAGHER, 1989) sowie in IBV-infizierten Zellkulturen (LUKERT, 1966; CORIA, 1969; MOHANTY et al., 1964; LUKERT, 1969) nachgewiesen werden.

Für die **direkte Immunfluoreszenzfärbung** werden spezifisch gegen IBV-Antigene gerichtete Immunglobuline mit dem Farbstoff Fluoreszeinisothiozyanat verbunden (konjugiert). Vorher ist eine aufwendige Reinigung und Konzentration der IBV-spezifischen Antikörper erforderlich. Dies geschieht z. B. durch mehrfaches Ausfällen der Immunglobuline mit Ammoniumsulfat und Resuspendieren in destilliertem Wasser. Anschließend muß das Sulfat durch Dialyse wieder entfernt werden (LUCIO and HITCHNER, 1969; CLARKE et al., 1972; WIZIGMANN et al., 1981).

Durch Bestrahlung mit energiereichem, kurzwelligem Licht läßt sich das Fluoreszein zu einer gelbgrünen Fluoreszenz anregen. Virushaltige Organschnitte, Abklatschpräparate oder Zellkulturen werden nach Fixierung in Azeton mit den fluoreszeinkonjugierten Antikörpern inkubiert. Hierbei binden die markierten Antikörper an vorhandenes IBV-Antigen. Durch gründliches Spülen wird überschüssiges Konjugat entfernt, so daß in dem Untersuchungsmaterial nur noch dort eine Fluoreszenz zu beobachten ist, wo das Konjugat an IBV-Antigen gebunden hat.

Bei der **indirekten Immunfluoreszenzfärbung** binden zunächst spezifische Antikörper einer anderen Tierart an die gesuchten Antigene. In einem zweiten Schritt werden fluoreszein-markierte Immunglobuline eingesetzt, welche gegen diejenige Spezies gerichtet sind, von der die spezifischen Antikörper stammen. Zunächst binden also die IBV-spezifischen Antikörper an das IBV-Antigen, danach werden diese Immunglobuline durch die markierten Anti-Spezies-Antikörper nachgewiesen (YAGYU and OHTA, 1990; DEWIT et al., 1995).

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung bietet mehr Quellen für unspezifische Färbereaktionen als die direkte, sie ist jedoch in der Regel einfacher durchzuführen, da konjugierte Anti-Spezies-Antikörper kommerziell erhältlich sind während IBV-spezifisches Konjugat meist selbst hergestellt und gereinigt werden muß. Die Unspezifitäten lassen sich durch die Verwendung monoklonaler Antikörper effektiv verringern (DEWIT et al., 1995, YAGYU and OHTA, 1990).

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine Methode zum spezifischen Virusnachweis und bietet gleichzeitig die Möglichkeit, die Lokalisation der Virusantigene im Gewebeschnitt zu bestimmen. Allerdings können Immunfluoreszenz und Gewebemorphologie nicht gleichzeitig beurteilt werden, da die für die Fluoreszenz benötigte Wellenlänge von ca. 400 nm zur morphologischen Beurteilung nicht geeignet ist. Der gefärbte Gewebeschnitt muß daher abwechselnd mit und ohne Lichtfilter betrachtet werden, um das Antigen im Gewebeschnitt lokalisieren zu können. Von Vorteil ist bei dieser Methode auch, daß sowohl gruppenspezifische als auch serotypspezifische Antigene gezielt nachgewiesen werden können (DE WIT et al., 1995).

Zur routinemäßigen Diagnostik der IB wird die Immunfluoreszenztechnik meist nur nach vorheriger Anzüchtung des Virus im Hühnerembryo verwendet. Das IBV-Antigen wird dann in der Chorio-Allantois-Membran der infizierten embryonierten Hühnereier nachgewiesen.



#### **2. 3. 3. 4 Immunperoxidasefärbung**

Ähnlich wie bei der Immunfluoreszenzfärbung wird auch bei der Immunperoxidasefärbung IBV-Antigen durch spezifische Antikörper nachgewiesen und mit Hilfe einer Farbreaktion sichtbar gemacht. In der Immunperoxidasetechnik werden die Antikörper jedoch nicht mit einem Farbstoff verbunden, sondern mit dem Enzym Peroxidase, welches ein danach zugegebenes Substrat in eine farbige Verbindung umwandelt.

NAQI (1990) setzt die Immunperoxidasefärbung zum Nachweis von IBV in Gefrierschnitten von Tracheen und Chorioallantoismembranen ein. Es handelt sich um eine indirekte Färbung, bei der monoklonale Antikörper zum Antigennachweis eingesetzt werden. Das Enzym Peroxidase wird an die Antikörper gebunden und wandelt das Substrat Amminoethylcarbazol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in einen roten Farbstoff um. Zuvor muß die im Gewebe enthaltene endogene Peroxidase zur Vermeidung einer unspezifischen Farbreaktion mit Periodsäure entfernt werden. Mit dieser Methode können ca. 96 Stunden nach der Infektion IB-Virusantigene in Gefrierschnitten der Trachea und des Lungengewebes sichtbar gemacht und gemeinsam mit der Gewebemorphologie beurteilt werden.

In der routinemäßigen IB-Diagnostik besitzt diese Methode zur Zeit keine große Bedeutung.

### 2. 3. 3. 5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

YAGYU und OHTA (1987) beschreiben den Nachweis von IBV aus Allantoisflüssigkeit und homogenisiertem Trachealgewebe mittels ELISA ab dem 3. Tag nach Inokulation bzw. Infektion.

Dazu werden die Reaktionsvertiefungen einer PVC-Mikrotiterplatte zunächst mit IBV-spezifischen Antikörpern beschichtet. Freie Proteinbindungsstellen werden mit bovinem Serumalbumin abgesättigt. Die zu testenden Proben werden in die beschichteten Reaktionsvertiefungen gegeben, so daß vorhandene IBV-Antigene an die Antikörper binden können. Nach gründlichem Spülen werden peroxidasekonjugierte IBV-Antikörper zugegeben, welche sich an die gebundenen Antigene heften. Überschüssiges Konjugat wird wiederum durch Spülen entfernt. Das Enzym Peroxidase bewirkt bei dem Substrat Phenylendiamin in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid eine Farbreaktion, die photometrisch ausgewertet werden kann.

Die zu untersuchenden Proben werden im ELISA titriert und mit Antigensuspensionen bekannter Konzentration verglichen, so daß der Antigengehalt der Virussuspensionen quantitativ bestimmt werden kann.

Insbesondere durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern können gezielt gruppenspezifische (KOCH et al., 1991; NAGANO et al., 1989) oder serotypspezifische Antigene (NAGANO et al., 1989) nachgewiesen werden, so daß mit diesem Test sowohl ein serotypunabhängiger IB-Nachweis erfolgen kann, als auch eine Bestimmung des Serotyps. Anders als der Antikörper-ELISA ist der hier beschriebene Antigen-ELISA bisher nicht standardisiert und kommerziell erhältlich, weshalb er in der Routinediagnostik der IB bisher kaum Verwendung findet.

### 2. 3. 4 Nachweis des Virusgenoms (Polymerasekettenreaktion – PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient dem Nachweis auch geringer Mengen einer DNA mit einer bestimmten Basensequenz, indem die gesuchte Sequenz vervielfältigt und so nachweisbar gemacht wird. Zum Nachweis des Erbmaterials von Coronaviren, welches ja in Form einer RNA vorliegt, muß zunächst die virale RNA in DNA umgewandelt werden. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), weshalb die zum IBV-Nachweis eingesetzte Form der PCR als **RT-PCR** bezeichnet wird.

JACKWOOD et al. (1991) weisen mit dieser Technik IB-Virus-RNA in Allantoisflüssigkeit nach, KWON et al. (1992) in Trachealabstrichen.

Zunächst wird die RNA aus den Proben extrahiert und gereinigt. Die virale RNA dient als Muster für eine DNA, welche mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase synthetisiert wird. Die eigentliche PCR besteht in einer Vervielfältigung der jeweils gesuchten DNA. Dazu werden spezifische Primer an die gesuchten DNA-Abschnitte angelagert und mit Hilfe der thermostabilen Taq Polymerase mehrfach repliziert.

Die PCR-Produkte können durch Agarosegel-Elektrophorese getrennt und durch Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Die dabei entstehenden Banden müssen in ihrer Position der Positivkontrolle entsprechen. Zur genaueren Identitätsbestimmung des PCR-Produktes wird getestet, ob eine Hybridisierung mit einem biotinylierten DNA-Strang durchführbar ist, der mit einem Teil der Sequenz der gesuchten DNA korrespondiert. Wird die biotinylierte DNA angelagert, so kann sie mit über Streptavidin, welches eine hohe Affinität zu Biotin besitzt, mit dem Enzym Alkalische Phosphatase verbunden und durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Mit Hilfe der RT-PCR können auch geringe Mengen viraler RNA mit hoher Spezifität nachgewiesen werden. Die von JACKWOOD et al. (1991) eingesetzten Primer binden offensichtlich an einen hoch konservierten Teil des Virusgenoms, so daß der IBV-Nachweis unabhängig vom Serotyp erfolgt.

HANDBERG und JØRGENSEN (1998) setzen zum einen gruppenspezifische Primer ein, die an eine hoch konservierte Region des N-Protein-kodierenden Gens binden und somit zu einem typunabhängigen IBV-Nachweis geeignet sind. Zum anderen finden aber auch Primer Verwendung, welche an die typspezifisch unterschiedlich ausgebildeten Genombereiche im Gen des S1-Proteins binden und somit gezielt bestimmte Genotypen nachweisen können.

Bei der RT-PCR handelt es sich also um eine Testmethode, die eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzt und die außerdem sowohl zum allgemeinen Nachweis des IBV, als auch zur Genotypisierung geeignet ist. Die ausgeprägte genetische Variabilität des IBV bereitet allerdings auch bei der Bestimmung des Genotyps über RT-PCR einige Schwierigkeiten, und der Genotyp eines Variantstammes stimmt teilweise nur begrenzt mit dessen antigenen Eigenschaften (Serotyp, Protectotyp) überein (CAVANNAGH, 1998).

### **2. 3. 5 Diagnose einer IBV-Infektion durch Antikörpernachweis**

Mit Hilfe der Serologie wird der Kontakt mit IB-Viren durch Bestimmung des Gehaltes an IBV-spezifischen Antikörpern im Hühnerserum nachgewiesen.

Eine Unterscheidung zwischen der Antikörperbildung nach einer Infektion mit Feldvirus und derjenigen nach einer Impfung ist jedoch nicht möglich, so daß die Serologie zum sicheren Nachweis einer stattgefundenen IBV-Infektion nur in ungeimpften Herden herangezogen werden kann. Allerdings können Titerverlaufskontrollen bei geimpften Herden im Verdachtsfalle Hinweise auf eine Infektion geben. Zudem besteht die Möglichkeit durch Antikörperbestimmung den Impferfolg zu überprüfen.

#### **2. 3. 5. 1 Antikörper-ELISA**

Eine PVC-Mikrotiterplatte wird mit gereinigtem IBV-Antigen beschichtet, die freien Bindungsstellen werden abgesättigt. Nach Inkubation mit den zu testenden Seren werden durch gründliches Spülen alle Immunglobuline entfernt, die nicht an IBV-Antigene gebunden haben. Als Positivkontrolle dient ein Serum mit bekanntem Antikörpergehalt, als Negativkontrolle wird verdünntes SPF-Hühnerserum verwendet.

Gegen Hühnerimmunglobuline gerichtete, peroxidase markierte Antikörper dienen dem Nachweis der gebundenen Antikörper. Dabei bewirkt das Enzym Peroxidase eine Farbreaktion des Substrates Phenylendiamin, welche photometrisch ausgewertet wird. Die Intensität der entstehenden Färbung verstärkt sich mit steigendem Antikörpergehalt im Testserum, so daß durch Vergleich mit der Positivkontrolle der Antikörpertiter der Probe errechnet werden kann.

Der Antikörper-ELISA ist ein hoch spezifischer und sensitiver Test. Er ist kommerziell erhältlich (Firma IDEXX GmbH, Wörrstadt) und in dieser Form schnell und einfach durchzuführen.

### 2. 3. 5. 2 Serumneutralisationstest

Ähnlich wie der Virusneutralisationstest kann auch der Serumneutralisationstest prinzipiell in allen Wirtssystemen durchgeführt werden, in denen IB-Viren erkennbare Veränderungen hervorrufen. In der Regel finden embryonierte Hühnereier oder Trachealkulturen Verwendung.

Am gebräuchlichsten ist die Alpha-Methode, bei der unterschiedliche Verdünnungsstufen einer Virussuspension mit dem fraglichen Serum in gleichbleibender Verdünnung reagieren und anschließend in das Wirtssystem verimpft werden. Es wird die niedrigste Verdünnungsstufe ermittelt, bei der die virusinduzierten Veränderungen noch durch das Serum neutralisiert werden. Die Beta-Methode, bei der eine Suspension mit bekannter Viruskonzentration mit Serum in verschiedenen Verdünnungsstufen inkubiert wird, erweist sich für IBV als schwierig, da der Virusgehalt aufgrund der hohen Labilität der IB-Viren schwierig konstant zu halten ist (WOERNLE und HAFEZ, 1992).

Als Plaquereduktionstest wird ein Serumneutralisationstest in (zumeist Hühnerembryonieren-) Zellkulturen bezeichnet, bei dem die virusinduzierte Plaquebildung durch Serumantikörper verhindert wird. Die Plaquebildung ist besonders bei Verwendung einer Vitalfärbung leicht zu erkennen, so daß sich dieser Test besonders zur Serotypbestimmung der antikörperinduzierenden Viren eignet (GILLETTE, 1973; HOPKINS, 1974).

Sowohl beim Serumneutralisationstest im embryonierten Hühnerei als auch beim Plaquereduktionstest können nur embryo- bzw. zellkulturadaptierte Virusstämme eingesetzt werden, die in diesen Systemen spezifische Läsionen hervorrufen. Die mit der Adaptation verbundene Modifikation der Oberflächenantigene kann zu Ungenauigkeiten beim Antikörpernachweis führen, da die durch Feldviren induzierten Antikörper möglicherweise nicht optimal an die modifizierten Antigene binden.

### **2. 3. 5. 3 Hämagglutinationshemmtest (HAH)**

Im Hämagglutinationshemmtest wird die hämagglutinierende Wirkung von Viren auf Hühnererythrozyten durch die Zugabe von antikörperhaltigem Serum unterdrückt. Ohne entsprechende Vorbehandlung sind die meisten IBV-Stämme nicht in der Lage, Erythrozyten zu hämagglutinieren. Nach einer Behandlung der Virussuspension mit Trypsin (CORBO and CUNNINGHAM, 1959) oder (besser) mit Phospholipase C Typ 1 aus *Clostridium perfringens* (BINGHAM et al., 1975) kommt es jedoch zu einer erkennbaren Hämagglutination.

Wie die neutralisierenden Antikörper sind auch die hämagglutinationshemmenden Antikörper serotypspezifisch. Aus diesem Grund ist der HAH weniger zur Diagnose einer Feldvirusinfektion mit unbekanntem Serotyp geeignet, sondern vielmehr zum Nachweis einer Antikörperbildung nach Impfung oder zur Bestimmung des Serotyps bei nachgewiesener IBV-Infektion. Hämagglutinierende Antikörper sind ab dem 9. Tag nach der Infektion nachweisbar (WOERNLE und HAFEZ, 1992).

### **2. 3. 5. 4 Agargelpräzipitation / Immundiffusion**

Die Durchführung des Agargelpräzipitationstests zum Antikörpernachweis entspricht der weiter oben beschriebenen zum Antigennachweis. Als Positivkontrolle wird ein deutlich präzipitierendes Serum gewählt, als Antigenlösung eignen sich Homogenisate von Chorioallantoismembranen infizierter embryonierter Hühnereier. Enthält ein getestetes Serum präzipitierende Antikörper, so entsteht zwischen Antigen und Testserum eine Präzipitatlinie, die in die Linie zwischen Antigen und Kontrollserum übergeht.

Auch beim Antikörpernachweis durch Immundiffusion gilt, daß die Reaktion serotypunabhängig erfolgt. Der Agargelpräzipitationstest ist somit geeignet, an Seren ungeimpfter Tiere eine IBV-Infektion zu erkennen (WOERNLE und HAFEZ, 1992).

## 2. 4 Differentialdiagnosen

Als Differentialdiagnosen zur IB kommen alle infektiösen Erkrankungen in Betracht, die respiratorische Symptome und/oder einen Rückgang der Legeleistung mit mißgebildeten Eiern hervorrufen. Hierzu zählen insbesondere die Newcastle-Krankheit der Hühner (ND), die infektiöse Laryngotracheitis (ILT), der ansteckende Hühnerschnupfen (*Coryza contagiosa gallinarum*) und das Egg-drop-Syndrom (EDS).

Die Newcastle-Krankheit wird durch Paramyxoviren des Serotyps PMV1 hervorgerufen. Die Erkrankung verläuft im allgemeinen schwerer als IB, mit Dyspnoe, Durchfällen und zentralnervösen Störungen, wie Torticollis, Opisthotonus und Bewegungsstörungen (SIEGMANN, 1993). Auch geht die Legeleistung stärker zurück, und die Mortalitätsrate ist meist höher.

Die Infektion mit dem (Herpes-)Virus der infektiösen Laryngotracheitis führt zu einer schweren respiratorischen Erkrankung bei der in der Trachea ein blutig-fibrinösem Sekret zu beobachten ist, und die oft mit deutlicher Dyspnoe einhergeht (KALETA, 1993). Die Ausbreitung der Erkrankung erfolgt langsamer als bei IB (CAVANAGH AND NAQUI, 1997).

Bei dem durch *Haemophilus paragallinarum* hervorgerufenen ansteckenden Hühnerschnupfen handelt es sich, ebenso wie bei IB, um eine hoch kontagiöse respiratorische Erkrankung, die mit einem Abfall der Legeleistung einhergeht. Es sind jedoch vermehrt Ödeme im Bereich des Infraorbitalsinus zu beobachten (HINZ, 1993), und der Rückgang der Legeleistung ist geringer, als bei IB.

Ebenso wie IB führt auch das durch ein Adenovirus hervorgerufene Egg-drop-Syndrom es zu einem Rückgang der Legeleistung um bis zu 50 % und zur Bildung nicht gefärbter, dünnchaliger, rauher oder schalenloser Eier (MONREAL, 1993). Anders als bei IB ist jedoch die innere Eiqualität nicht beeinträchtigt (VAN ECK, 1983).



## **2.5 Bekämpfung der IB**

Ziel bei der Bekämpfung der IB ist die weitest mögliche Eindämmung der durch die Erkrankung hervorgerufenen wirtschaftlichen Verluste.

Eine effektive, aber aufwendige Methode hierzu besteht in der Vermeidung einer Einschleppung des Erregers in den Bestand durch hygienische Maßnahmen. Um einen IB-freien Bestand zu erhalten, werden die gereinigten und desinfizierten Räumlichkeiten mit IBV-freien Eintagsküken bestückt. Anschließend ist eine strenge Isolation des Bestandes erforderlich, eine aerogene Einschleppung des Virus läßt sich durch die Belüftung mit gefilterter Luft im Überdruckverfahren vermeiden (DRURY et al., 1969).

Die Therapiemöglichkeiten nach Ausbruch der Erkrankung sind begrenzt, da eine kausale Behandlung der Virusinfektion nicht möglich ist. Zur Vermeidung von Sekundärinfektionen werden geeignete Chemotherapeutika oder Antibiotika eingesetzt. Die Verluste lassen sich außerdem eindämmen, indem Streßfaktoren, wie Kältestreß oder eine zu hohe Besatzdichte vermieden werden (CAVANAGH and NAQI, 1997).

Die weltweit größte Bedeutung bei der Bekämpfung der IB kommt der Immunprophylaxe zu. Durch die Immunisierung der Küken läßt sich im Falle einer Infektion eine Erkrankung vermeiden. Eine Infektion und Vermehrung des Virus wird durch die Impfung jedoch nicht verhindert. Auch bieten Impfstoffe keinen Schutz vor IB-Virusstämmen, die einem anderen Serotyp (Protectotyp) angehören, so daß es infolge der großen Variabilität des IBV auch in geimpften Beständen immer wieder zu Krankheitsbrüchen kommt.

### 2. 5. 1 Lebendimpfstoffe

Als Lebendimpfstoffe finden embryoadaptierte Virusstämme Verwendung. Mit zunehmender Anpassung der Viren an das embryonierte Hühnerei vermindert sich die Virulenz für Hühner und Küken. Gleichzeitig führt die mit der Adaptation einher gehende Modifikation der Oberflächenantigene zu einer verminderten Immunogenität (BEAUDETTE and HUDSON, 1937). Je häufiger also ein Virusstamm im embryonierten Hühnerei passagiert wird, desto besser ist seine Verträglichkeit für Küken, desto geringer ist aber auch der induzierte Impfschutz gegen pathogene Feldvirusstämme. So wird beispielsweise der IBV-Stamm H120 vom Massachusetts-Serotyp, der in seiner 120. Embryopassage vorliegt wegen seiner guten Verträglichkeit bei jungen Küken eingesetzt. Um einen besseren Impfschutz zu erreichen, wird die Folgeimpfung mit dem Stamm H52 durchgeführt. Es handelt sich dabei um den gleichen Virusstamm in seiner 52. Embryopassage, der eine erhöhte Restvirulenz, aber auch eine größere Immunogenität als der H120-Impfstoff besitzt.

Da Virusstämme vom Serotyp Massachusetts weltweit am häufigsten vorkommen, sind auch die meisten Impfstoffe gegen diesen Serotyp gerichtet. Mehrfach wiederholte Impfungen mit Impfstoffen vom Massachusetstyp führen häufig zu einer Kreuzimmunität gegen andere Serotypen.

Folgende Impfvirusstämme wurden in der Bundesrepublik Deutschland vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) geprüft und zugelassen (In Klammern jeweils Jahr der Zulassung durch das PEI).

**Massachusetts-Serotyp:**

- IB H120:
  - Nobilis IB H120, Firma Intervet (ca. 1980, Review: 22.07.1999)
  - Poulvac IB H120, Firma Fort Dodge (15.07.1997, kein Review)
  - Poulvac IB primer, Firma Fort Dodge (1995, Review 02.03.2000)
  - TAD IBvac I, Firma LAH (April 1979, Review 31.01.2001)
  - TAD IB/NDvac, Firma LAH (04.04.1979, Review 23.03.2001)
- IB H52
  - Nobilis IB H52, Firma Intervet (ca. 1980, Review 23.07.1999)
  - TAD IBvac II, Firma LAH (April 1979, Review 31.01.2001)
- Ma 5
  - Nobilis Ma 5, Firma Intervet (13.08.1996)
  - Nobilis Ma5 + Clone 30, Firma Intervet (04.04.1996)
- 1263
  - Poulvac IB MM, Firma Fort Dodge (07.08.2000)

**Variantstämme:**

- D 274
  - Nobilis, IB D274, Firma Intervet (19.02.1997)
  - Poulvac IB primer, Fa. Fort Dodge (04.01.1989, Rev. 02.03.2000)
- D 1466
  - Nobilis IB D1466, Firma Intervet (14.02.2000)
- 4/91
  - Nobilis IB 4-91, Firma Intervet (Europazulassung: 09.06.1998 )
- CR88121 (Stamm identisch mit 4/91)
  - Gallivac IB88, Firma Merial (14.06.1999)

Nach Empfehlung der Hersteller sind für die Erstimpfung in frühem Lebensalter die Virusstämme H120 (1. Lebenstag, bzw. 12.-14. Lebenstag), Ma 5 (1. Lebenstag), und 1263 (ab 4. Lebenstag) geeignet. Eine Boosterimpfung mit IB H52 wird ca. 10 Wochen nach der Erstimpfung empfohlen. Für den Stamm 1263 beinhaltet die Empfehlung 3 Impfungen in ca. 8-wöchigen Abständen.

Grundsätzlich wird empfohlen, die Impfung gegen Variantstämme nur zusätzlich zu einer Grundimmunisierung mit dem Massachusetts-Serotyp durchzuführen. Eine Impfung mit dem Stamm 4/91 kann ab dem 1. Lebenstag erfolgen, Wiederholungsimpfungen werden in 6-wöchigen Abständen empfohlen. Die Stämme D 1466 und D 274 können ab der 8. Lebenswoche eingesetzt werden. Für D 1466 soll eine Wiederholungsimpfung nach 2 Wochen erfolgen, während nach der Erstimpfung mit D274, eine Nachimpfung mit homologem Inaktivatimpfstoff nach 6 Wochen empfohlen wird.

Eine Zusammenfassung ausgewählter Herstellerangaben zu den einzelnen Lebendimpfstoffen findet sich in Tabelle 3.

**Tabelle 3: Übersicht ausgewählter Herstellerangaben zu den auf dem Markt befindlichen Lebendimpfstoffen gegen IB**

Impfstoff	Mindest-Impfdosis	Impfalter	Applikationsweg	Schutz-Dauer	Indikationen
Nobilis IB H 120	$10^3$ EID <sub>50</sub>	Ab 1. LT 12.-16. LT <sup>1)</sup> 3.-4. LW <sup>2)</sup>	Sprayapplikation, Trinkwasser, oculo-nasale Inst.	Nachimpf. mit IB H52	Vorimpfung vor IB H52 oder Inaktivatimpfst.
Nobilis IB H 52	$10^3$ EID <sub>50</sub>	13.-15. LW, bzw. 10-12. und 16. LW	Trinkwasser	keine Angaben	Wiederholungs- impfung
Nobilis Ma 5	$10^3$ EID <sub>50</sub>	ab 1. LT	Sprayapplikation, Trinkwasser, oculo-nasale Inst.	6 Wochen	Vorimpfung vor Inaktivatimpfst.
Nobilis D274	$10^3$ EID <sub>50</sub>	8.-14. LW	Sprayapplikation, Trinkwasser, oculo-nasale Inst.	2 Monate	Vorimpfung vor Inaktivatimpfst <sup>3)</sup>
Nobilis D1466	$10^3$ EID <sub>50</sub>	8.-10.LW	Sprayapplikation, oculo-nasale Inst.	2 Monate	Vorimpfung vor Inaktivatimpfst <sup>3)</sup>
Nobilis 4-91	$10^{3,6}$ EID <sub>50</sub>	ab 1. LT	Sprayapplikation, Trinkwasser, oculo-nasale Inst.	6 Wochen	Erstimpfung, Wiederholungs- impfungen <sup>4)</sup>
Poulvac IB Primer (H120 und 274)	jeweils $10^3$ EID <sub>50</sub>	ab 1. LT (bis 4. LW. ½ Dosis)	Sprayapplikation, Trinkwasser	keine Angaben	Keine Angaben
Poulvac IB MM (Stamm 1263)	$10^3$ EID <sub>50</sub>	ab 4. LT Erstimpfung am 4.-12. LT	Trinkwasser	ab 3. Impf: 3 Monate	Erstimpfung Wiederholungs- impfungen

**Fortsetzung Tabelle 3:**

Impfstoff	Mindest- Impfdosis	Impfalter	Applikationsweg	Schutz- Dauer	Indikationen
TAD IBvac I	10 <sup>3</sup> EID <sub>50</sub>	ab 1. LT (Spray)	Sprayapplikation, Trinkwasser	40 Tage	Erstimpfung
TAD IBvac II	10 <sup>3</sup> EID <sub>50</sub>	4 Wochen nach Erstimpfung	Trinkwasser	keine Angaben	Wiederholungs- impfung
Gallivac IB 88	10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>	14. LT	Sprayapplikation	5 Wochen	meist nur eine Impfung nötig

LW = Lebenswoche

LT = Lebenstag

Inst. = Instillation

<sup>1)</sup> bei Lege- und Elterntieren

<sup>2)</sup> bei Masttieren

<sup>3)</sup> Nicht bei legenden Tieren anwenden

<sup>4)</sup> Nicht bei zukünftigen Lege- oder Zuchttieren, bzw. legenden Tieren anwenden

Von Vorteil bei der Verwendung von Lebendimpfstoffen ist, daß lokale und zelluläre Immunabwehr ebenso angeregt werden wie die Bildung humoraler Antikörper. Die Applikation von Lebendimpfstoffen kann über das Trinkwasser, in Aerosolform oder als Augentropfen erfolgen. Da es zu einer Virusvermehrung im Gewebe von Trachea, Lungen, Milz und Nieren (SIMIC, 1972) kommt, reicht bereits die Aufnahme relativ geringer Virusmengen (minimal immunisierende Dosis meist 10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub>) aus (WOERNLE und HAFEZ, 1992), was dank der geringen Tenazität der IB-Viren besonders bei der Verabreichung über das Trinkwasser von Bedeutung ist.

Die teilweise lang anhaltende Virusausscheidung bewirkt einerseits eine bessere Verbreitung des Impfvirus, andererseits kann dieses auch in unerwünschter Weise auf empfängliche Tiere übertragen werden. Empfängliche ältere Hühner, besonders legende Hennen, müssen daher von kürzlich mit Lebendimpfstoff vakzinierten Tieren getrennt gehalten werden, da bei ihnen die Übertragung von Impfviren zu Krankheitserscheinungen und zu einem Rückgang der Legeleistung führen kann (siehe Herstellerhinweise zu verschiedenen IB-Lebendimpfstoffen). Auch kommt es wegen der Restvirulenz der Lebendimpfstoffe unmittelbar nach der Impfung häufig zum Auftreten milder Krankheitssymptome. Weiterhin berichten HOPKINS and YODER (1986), daß bei zwei verschiedenen IB-Vakzinestämmen nach mehrfacher Kükenpassage wieder eine Erhöhung der Virulenz auftrat.

Der Einsatz kombinierter Lebendvakzinen, aus IB-Virusstämmen verschiedener Serotypen oder die Kombination mit Lebendimpfstoffen gegen andere Hühnerkrankheiten erwies sich häufig als problematisch, da es zu einer gegenseitigen Hemmung der Virusvermehrung kam (WINTERFIELD and FALDY, 1975).

Für die in der Bundesrepublik zugelassenen Kombinationsimpfstoffe wurde im Rahmen der Zulassung nachgewiesen, daß keine gegenseitige Hemmung stattfindet. Zur Kombination mit Impfvirusstämmen gegen die Newcastle Krankheit wurden die Stämme H120 (TAD IB/NDvac, Firma LAH, mit ND La Sota) und Ma 5 (Nobilis Ma5 + Clone 30, Firma Intervet, mit ND Clone 30) eingesetzt. Der einzige zur Zeit in Deutschland erhältliche Kombinationslebendimpfstoff gegen mehrere IBV-Serotypen enthält die Stämme H120 und D 274 (Poulvac IB Primer, Firma Fort Dodge).

### 2. 5. 2 Inaktivimpfstoffe

Inaktivimpfstoffe müssen vor ihrer Inaktivierung einen deutlich höheren Virusgehalt aufweisen, als Lebendimpfstoffe. Hoch embryoadaptierte Virusstämme, die in embryonierten Hühnereiern in hohen Ausbeuten vermehrt werden können, sind jedoch aufgrund ihrer geringeren Immunogenität wenig geeignet. Es muß also Feldvirus mit niedriger Passagezahl in relativ hohen Konzentrationen (FENNER et al., 1993) gewonnen und inaktiviert werden, wodurch die Impfstoffproduktion erschwert wird (WOERNLE, 1961) und daher teurer ist als bei Lebendimpfstoffen. Die Applikation von Inaktivimpfstoffen muß parenteral erfolgen, was bei größeren Hühnerherden einen nicht unerheblichen Aufwand bedeutet. Inaktivierte Impfstoffe regen die Bildung humoraler Antikörper in hohem Maße an, während die lokale und zelluläre Immunität nicht stimuliert werden (WOERNLE und HAFEZ, 1992). Sie werden ausschließlich zur Boosterimpfung nach vorheriger Vakzination mit Lebendimpfstoff verwendet, wobei als Abstand zur letzten Lebendimpfung 6 Wochen empfohlen werden. Die Kombination verschiedener Serotypen ist bei inaktivierten Impfstoffen ohne weiteres möglich, da es zu keiner Vermehrung der Impfviren im Körper kommt und somit auch keine gegenseitige Hemmung auftreten kann.

Die meisten in Deutschland zugelassenen Inaktivimpfstoffe sind Kombinationen aus inaktivierten Impfviren gegen die Infektiöse Bronchitis und andere Erkrankungen der Hühner, wie Newcastle-Krankheit, Infektiöse Bursitis, Egg-drop Syndrom, Reovirusinfektion und infektiöse Rhinotracheitis. Hauptbestandteil aller IB-Inaktivimpfstoffe ist der Stamm M 41 (Serotyp Massachusetts). Zusätzlich enthalten einige Impfstoffe die Variantstämme D274 (Nobilis IB Multi, Firma Intervet) oder CR 88121 (Gallimune IB2, Firma Merial).



## **2. 6 Prüfung von Impfstoffen gegen IB**

### **2. 6. 1 Rechtliche Grundlagen**

Nach dem Tierseuchengesetz, in der Fassung vom 29. 01. 1993, ist die Herstellung von Impfstoffen an die Zulassung durch die zuständige Behörde gebunden. Zudem dürfen Impfstoffe nur dann abgegeben und angewendet werden, wenn jede einzelne Charge (d.h. die jeweils in einem einheitlichen Herstellungsgang erzeugte Menge eines Impfstoffes) durch die Zulassungsstelle geprüft und freigegeben wurde. §14 der Tierimpfstoff-Verordnung, in der Fassung vom 02. 01. 1978, bestimmt als Zulassungsstelle für Impfstoffe gegen einige besonders gefährliche Tierseuchen wie Maul- und Klauenseuche und Europäische Schweinepest die Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere. Einzige Zulassungsstelle für alle anderen Impfstoffe zur Anwendung an Tieren ist das Paul-Ehrlich-Institut. Die Entscheidung über die Zulassung erfolgt gemäß §16 der Tierimpfstoff-Verordnung aufgrund einer Prüfung der vom Hersteller eingereichten Unterlagen und anhand der Ergebnisse eigener Untersuchungen der Zulassungsstelle.

§15 der Tierimpfstoff-Verordnung verweist auf den Anhang Titel II der Richtlinie 81/852/EWG des Rates vom 28.09.1981, neu gefaßt durch die Richtlinie 92/18/EWG vom 20.03.92, in welchem die Anforderungen an die Unterlagen aufgeführt werden, die dem Antrag auf Zulassung durch den Impfstoffhersteller beizufügen sind.

Diese Unterlagen müssen unter anderem Angaben zur Qualität, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit des jeweiligen Impfstoffes enthalten. Die dazu notwendigen Untersuchungen müssen dem jeweiligen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse entsprechen, wobei die jeweils anerkannten Untersuchungsmethoden in den Monographien des deutschen, bzw. europäischen Arzneibuches schriftlich festgehalten sind.

## **2. 6. 2 Deutsches Arzneibuch (DAB 10) und Europäisches Arzneibuch (EAB)**

Zu Beginn dieser Arbeit (1997) galt die 10. Ausgabe des Deutschen Arzneibuches (DAB 10). Die entsprechende Monographie in der während dieser Arbeit gültigen 3. Auflage des Europäischen Arzneibuches entspricht derjenigen im DAB 10.

### **2. 6. 2. 1 Monographie 442 des EAB: Infektiöse-Bronchitis-Lebendimpfstoff für Geflügel (gefriergetrocknet)**

Die in der genannten Monographie beschriebenen Anforderungen an die Herstellung und Prüfung von Lebendimpfstoffen gegen die Infektiöse Bronchitis der Hühner wird im folgenden zusammengefaßt wiedergegeben.

#### **Herstellung:**

Gefriergetrockneter Lebendimpfstoff gegen IB wird in der Allantoishöhle von SPF-Hühnerembryonen oder in Zellkulturen (Geflügelzellkulturen ebenfalls aus SPF-Beständen) gezüchtet und anschließend gefriergetrocknet. Für den angegebenen Mindesttiter muß nachgewiesen sein, daß er einen ausreichenden Schutz verleiht.

#### **Prüfung auf Identität:**

Hierzu wird ein Virusneutralisationstest durchgeführt: Nach Mischung des Impfstoffes mit einem monospezifischen Antiserum dürfen die Impfviren nicht mehr in der Lage sein Hühnerembryonen oder empfängliche Zellkulturen zu infizieren.

**Prüfung auf Reinheit:**

Die Prüfung auf Reinheit beinhaltet folgende Untersuchungen:

*1) Prüfung auf Unschädlichkeit:*

Mindestens 10 SPF-Küken erhalten jeweils 10 Impfstoffdosen und werden 21 Tage lang beobachtet. In dieser Zeit darf keines der Küken schwere klinische Symptome aufweisen oder aus Gründen sterben, die auf den Impfstoff zurückzuführen sind.

*2) Prüfung auf fremde Agenzien unter Verwendung von Küken:*

Mindestens 10 SPF-Küken im Alter von 2 Wochen erhalten 100 Impfstoffdosen intramuskulär und 10 Dosen als Augentropfen. Nach 2 Wochen wird die Inokulation in gleicher Dosierung wiederholt. Vor der ersten Inokulation sowie nach einer Beobachtungszeit von 5 Wochen, in denen keine antimikrobielle Behandlung durchgeführt werden darf, wird von sämtlichen Küken Serum gewonnen und auf Antikörper gegen die folgenden Erreger, bzw. gegen die Erreger folgender Krankheiten untersucht: Infektiöse Bursitis, Marek'sche Erkrankung, Newcastle-Krankheit, infektiöse Laryngotracheitis, aviäre Enzephalomyelitis, *Salmonella pullorum*, Adenoviren, Reoviren, Leukoseviren und Influenza A-Viren. Die gewonnenen Seren dürfen keine solchen Antikörper enthalten.

*3) Prüfung auf Mykoplasmen*

Ein Medium, das sich nachweislich zur Anzucht der verschiedenen Mykoplasma-Spezies eignet, wird mit dem zu untersuchenden Impfstoff inokuliert und 21 Tage lang sowohl aerob als auch mikroaerophil bei 35 bis 38 °C bebrütet. Innerhalb der ersten 3 Tage und am 13. oder 14. Bebrütungstag sowie gegebenenfalls bei einem Farbumschlag des Indikators im Kulturmedium, werden Subkulturen angelegt, die wie die Primärkulturen bebrütet werden. Die Kulturen werden wöchentlich begutachtet, bei einer Kontamination mit Bakterien oder Pilzen muß der Test wiederholt werden.

Am Ende der Inkubationsperiode wird bei jeder Probe das Medium mikroskopisch auf die Anwesenheit von Mykoplasmen untersucht. Können Mykoplasmen nachgewiesen werden, so ist der Test mit doppeltem Probenvolumen zu wiederholen. Der geprüfte Impfstoff darf keine Mykoplasmen enthalten.

4) *Prüfung auf Verunreinigung durch Bakterien und Pilze (Sterilitätsprüfung)*

Es wird eine quantitative Sterilitätsprüfung durchgeführt. Der Impfstoff muß frei von pathogenen Mikroorganismen sein und darf höchstens einen saphrophytischen Mikroorganismus pro Impfstoffdosis enthalten. Parenteral zu verabreichende Impfstoffe sowie die beigegebenen Lösungsmittel dürfen nach einer Bebrütungsdauer von zwei Wochen keine Bakterien oder Pilze enthalten.

5) *Bestimmung des Virustiters*

Der Impfstoff wird in Zellkulturen oder in 9-11 Tage alten Hühnerembryonen titriert. Der Virustiter in einer Dosis muß mindestens dem angegebenen, schützenden Mindesttiter entsprechen.

6) *Prüfung auf aviäre Leukoseviren*

10 Dosen des zu prüfenden Impfstoffes werden mit einem monospezifischen Antiserum neutralisiert und anschließend auf Hühnerembryofibroblasten (HEF)-Zellkulturen aufgebracht. Die Kulturen werden im Abständen von 3-4 Tagen passagiert und so mindestens 9 Tage lang erhalten. Am Enden der letzten Passage werden die Zellen geerntet und mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion auf aviäre Leukoseviren untersucht. Der untersuchte Impfstoff darf keine Leukoseviren enthalten. Wurde eine Prüfung auf aviäre Leukoseviren an einer repräsentativen Charge des Impfstoffes mit befriedigendem Ergebnis durchgeführt, so kann sie für weitere Chargen aus dem gleichen Saatvirus entfallen.

### 7) *Prüfung auf Fremdviren in Zellkulturen*

10 Dosen des zu prüfenden Impfstoffes werden mit einem monospezifischen Antiserum neutralisiert und anschließend auf SPF-Hühnernieren- oder Hühnerembryoleberzellkulturen aufgebracht. Die Zellkulturen werden mindestens 5 Tage lang beobachtet und auf Anzeichen eines zytopathogenen Effekts untersucht. Über einen Zeitraum von mindestens 20 Tagen werden Zellen und Kulturflüssigkeit mehrfach weiterpassagiert, wobei jede Passage auch mindestens 5 Tage lang zu beobachten ist. Nach der letzten Passage werden die Kulturen zusätzlich auf die Anwesenheit von hämagglutinierenden Substanzen getestet. Der Impfstoff erfüllt die Anforderungen, wenn kein zytopathogener Effekt und keine Hämagglutination zu beobachten sind. Wurde eine Prüfung auf Fremdviren in Zellkulturen an ein einer repräsentativen Charge des Impfstoffes mit befriedigendem Ergebnis durchgeführt, so kann sie für weitere Chargen aus dem gleichen Saatvirus entfallen

### 8) *Prüfung auf Fremdviren in Bruteiern*

Der zu untersuchende Impfstoff wird mit einem monospezifischen Antiserum neutralisiert und so verdünnt, daß 0,2 ml 10 Impfstoffdosen enthalten. 9-11 Tage alte embryonierte Hühnereier werden mit je 0,2 ml dieser Mischung beimpft, wobei die Inokulation bei 10 Hühnerembryos in die Allantoishöhle erfolgt (CAV) und bei weiteren 10 Embryos auf die Chorio-Allantois-Membran (CAM). Die Eier werden 7 Tage lang täglich geschickt. Sämtliche Embryonen, die später absterben als innerhalb der ersten 24 Stunden sowie alle überlebenden Embryonen werden auf Veränderungen untersucht. Ebenso werden die Chorio-Allantois-Membranen beurteilt, und die Allantoisflüssigkeit wird auf hämagglutinierende Agenzien untersucht. Für eine weitere Passage wird Material aus abgestorbenen und überlebenden Embryonen getrennt gepoolt, und jeweils erneut nach der oben beschriebenen Methode inokuliert und untersucht. Durch den untersuchten Impfstoff dürfen keine Veränderungen hervorgerufen werden, oder Embryonen absterben.

Wurde eine Prüfung auf Fremdviiren in Bruteiern an ein einer repräsentativen Charge des Impfstoffes mit befriedigendem Ergebnis durchgeführt, so kann sie für weitere Chargen aus dem gleichen Saatvirus entfallen.

**Prüfung auf Wirksamkeit:**

Wegen der besonderen Bedeutung für diese Arbeit werden die im DAB/EAB unter 2.6.2.2 beschriebenen Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung im genauen Wortlaut wiedergegeben. Wurde eine Wirksamkeitsbestimmung an ein einer repräsentativen Charge des Impfstoffes mit befriedigendem Ergebnis durchgeführt, so kann sie für weitere Chargen aus dem gleichen Saatvirus entfallen.

**2. 6. 2. 2 Wirksamkeitsprüfung laut Monographie 442 des EAB, 3. Auflage:**

*Die Bestimmung der Wirksamkeit ist für jede der in der Beschriftung angegebenen Anwendungsarten und für jeden Virusstamm des Impfstoffs durchzuführen.*

*Empfängliche Küken aus demselben SPF-Bestand, die das Mindestalter für die Impfung haben, werden verwendet. Jedes von mindestens 20 dieser Küken enthält für die angegebene Anwendungsart ein Volumen des gelösten Impfstoffs, das die Virusmenge enthält, die dem Mindesttiter in der Beschriftung entspricht. Zehn Küken werden als Kontrolltiere gehalten.*

*Nach mindestens 21 Tagen wird jedes Küken intratracheal mit  $10^3$  EID<sub>50</sub> eines virulenten Stammes des aviären, infektiösen Bronchitis-Virus belastet, der denselben Serotyp hat wie der Stamm, für den die Prüfung auf Wirksamkeit durchgeführt wird.*

*Zwischen dem vierten und siebten Tag nach der Belastung werden die Küken getötet und die Mukosa der Trachea abgeschabt. Das abgeschabte Material wird jeweils in ein steriles Röhrchen mit 3 ml Tryptosenährmedium, das ein Antibiotikum enthält, überführt.*

*Von jedem Röhrchen werden 0,2 ml in die Allantoishöhle von je fünf 9 bis 11 Tage alten Bruteiern von Hühnern verimpft. Die in den ersten 24 h gestorbenen Embryonen werden als nicht spezifisch eliminiert. Mindestens 4 von 5 Embryonen müssen diesen Zeitraum überleben.*

*Nach 7 Tagen werden die verbleibenden Embryonen untersucht. Wenn ein Embryo aus einer Reihe abstirbt oder charakteristische Läsionen aufweist, muß das Inokulum als virushaltig betrachtet werden. Das Ergebnis der Prüfung ist nur dann endgültig negativ, wenn drei aufeinanderfolgende Passagen erfolgt sind.*

*Der Impfstoff entspricht der Prüfung, wenn das Belastungsvirus von höchstens 20 Prozent der geimpften Tiere reisoliert werden kann, jedoch in mindestens 80 Prozent der Kontrolltiere.*

### **2. 6. 3 Entwürfe zur Änderung der Monographie 442 im EAB**

Die Expertengruppe Nr. 15 V der Arzneibuchkommission des Europarates veröffentlichte im April 1998 und im März 1999 jeweils Entwürfe für die Neufassung der Monographie über Lebendimpfstoffe gegen die Infektiöse Bronchitis, welche sich im Hinblick auf die Wirksamkeitsprüfung deutlich von der bisherigen Fassung des EAB unterscheiden.

#### **2. 6. 3. 1 Erster Entwurf zur Änderung der Monographie vom April 1998**

Der Abschnitt über die Wirksamkeitsprüfung in diesem Entwurf lautet wie folgt: (Diejenigen Textabschnitte, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird, sind fett gedruckt):

*The test is carried out for each route (e.g. ocular, oral, intranasal) and method of administration (e.g. eye-drop, drinking water) to be recommended and in each category of chicken for which the vaccine is intended, using in each case chickens of the youngest age to be recommended for vaccination. For categories where*

*SPF chickens are not available the test may be carried out in chickens that do not have antibodies against avian infectious bronchitis virus.*

*The quantity of the vaccine virus administered to each bird is not greater than the minimum titre to be stated on the label and the virus is at the most attenuated passage level that will be present in a batch of the vaccine.*

### **1) Ciliary activity of tracheal explants**

*Use for the test not fewer than thirty chickens of the youngest age recommended for vaccination, of the same origin and from a flock free from specified pathogens. Administer by a recommended route **1 dose of the vaccine** to each of not fewer than twenty randomly chosen chickens. Maintain not fewer than ten chickens as controls. **Challenge each chicken after 14 days** by **eye-drop** with a sufficient quantity of virulent avian infectious bronchitis virus of the same type as the vaccine virus to be tested. Kill the chickens 6 days after challenge and prepare transverse sections from the upper part (3), the middle part (4) and the **longer** part (3) of the trachea of each chicken. Examine all explants by low power microscopy for ciliary activity.*

*The test is not valid if 6 days after challenge fewer than 80 per cent of the control chickens show cessation or **extreme loss of vigour of ciliary activity** and/or if during the period between the vaccination and challenge more than three vaccinated or control chickens show abnormal clinical signs of disease or die from causes not attributable to the vaccine.*

*The vaccine complies with the test if 6 days after challenge not fewer than 80 per cent of the vaccinated chickens show **normal ciliary activity**.*



2) *Virus recovery from tracheal swabs*

***For types of avian infectious bronchitis virus for which the potency test based on ciliary activity of tracheal explants cannot be used, the test for potency based on virus recovery from tracheal swabs may be used.***

*Use for the test not fewer than thirty chickens of the youngest age recommended for vaccination, of the same origin and from a flock free from specified pathogens. Administer by a recommended route **1 dose of the vaccine** to not fewer than twenty randomly chosen chickens. Maintain not fewer than ten chickens as controls. Challenge each chicken **after 14 days** by **eye-drop** with a sufficient quantity of virulent avian infectious bronchitis virus of the same type as the vaccine virus to be tested. Kill the chickens **6 days after challenge** and prepare a **suspension from the mucosa of the upper, middle and longer part of the trachea** of each chicken. Inoculate 0,2 ml of each suspension into the allantoic cavity of each of five embryonated hens' eggs, 9 to 11 days old, from a flock free from specified pathogens. Incubate the eggs for 7 days after inoculation. Eggs that after 1 day of incubation do not contain a live embryo are eliminated and considered as non-specific deaths. Record the other eggs containing a dead embryo and after 7 days' incubation examine each egg containing a live embryo for lesions characteristic of avian infectious bronchitis. Make successively three such passages. If **one embryo** of a series of eggs dies or shows characteristic lesions, the inoculum is considered to be a carrier of avian infectious bronchitis virus. The examination on a series of eggs is considered to be definitely negative if no inoculum concerned is a carrier.*

*The test is not valid if 6 days after challenge the challenge virus is re-isolated from fewer than 80 per cent of the control chickens and/or if during the period between vaccination and challenge more than 10 per cent of the vaccinated or control chickens show abnormal clinical signs of disease or die from causes not attributable to the vaccine.*

*The vaccine complies with the test if 6 days after challenge the challenge virus is re-isolated from not more than 20 per cent of the vaccinated chickens.*

### **2. 6. 3. 2 Zweiter Entwurf zur Änderung der Monographie vom März 1999**

Ein neuer Entwurf über Lebendimpfstoffe gegen die Infektiöse Bronchitis wurde von der Expertengruppe im März 1999 veröffentlicht. Er unterscheidet sich in wenigen, aber wichtigen Punkten, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird, vom ersten Entwurf (betreffende Textstellen sind fett gedruckt) und hat folgenden Wortlaut:

*Immunogenicity is demonstrated for each strain of virus to be included in the vaccine. A test is carried out for each route and method of administration to be recommended and in each category of chicken for which the vaccine is intended, using in each case chickens of the youngest age to be recommended for vaccination. For categories where SPF chickens are not available, use chickens that do not have antibodies against avian infectious bronchitis virus.*

*The quantity of the vaccine virus administered to each chicken is not greater than the minimum virus titre to be stated on the label and the virus is at the most attenuated passage level that will be present in a batch of the vaccine.*

#### *1) Ciliary activity of tracheal explants*

*Use not fewer than thirty chickens of the same origin and from a flock free from specified pathogens. Vaccinate by a recommended route not fewer than twenty chickens. Maintain not fewer than ten chickens as controls. Challenge each chicken after 14 days by eye-drop with a sufficient quantity of virulent avian infectious bronchitis virus of the same type as the vaccine virus to be tested.*

**Kill the chickens 3 to 6 days after challenge** and prepare transverse sections from the upper part (three), the middle part (four) and the **lower** part (three) of the trachea of each chicken. Examine all explants **2 h to 3 h after sampling** by low-power microscopy for ciliary activity.

The test is not valid if fewer than 80 per cent of the control chickens show cessation or extreme loss of vigour of ciliary activity and/or if during the period between the vaccination and challenge more than 10 per cent of vaccinated or control chickens show abnormal clinical signs or die from causes not attributable to the vaccine

The vaccine virus complies with the test if not fewer than 80 per cent of the vaccinated chickens show normal ciliary activity.

## 2) Virus recovery from tracheal swabs

For types of avian infectious bronchitis virus for which the potency test based on ciliary activity of tracheal explants cannot be used, the test for immunogenicity based on virus recovery from tracheal swabs is used.

Use not fewer than thirty chickens of the same origin and from a flock free from specified pathogens. Vaccinate by a recommended route not fewer than twenty chickens. Maintain not fewer than ten chickens as controls. Challenge each chicken after **21 days** by eye-drop with a sufficient quantity of virulent avian infectious bronchitis virus of the same type as the vaccine virus to be tested. Kill the chickens **3 to 6 days** after challenge and prepare **a suspension from swabs of the tracheal mucosa** of each chicken. Inoculate 0,2 ml of the suspension into the allantoic cavity of each of five embryonated hens' eggs, 9 to 11 days old, from a flock free from specified pathogens. Incubate the eggs for 7 days after inoculation. Eggs that after 1 day of incubation do not contain a live embryo are eliminated and considered as non-specific deaths.

*Record the other eggs containing a dead embryo and after 7 days' incubation examine each egg containing a live embryo for lesions characteristic of avian infectious bronchitis. Make successively three such passages. If one embryo of a series of eggs dies or shows characteristic lesions, the inoculum is considered to be a carrier of avian infectious bronchitis virus. The examination of a series of eggs is considered to be definitely negative if no inoculum concerned is a carrier.*

*The test is not valid if the challenge virus is re-isolated from fewer than 80 per cent of the control chickens and/or if during the period between vaccination and challenge more than 10 per cent of the vaccinated or control chickens show abnormal clinical signs or die from causes not attributable to the vaccine.*

*The vaccine virus complies with the test if the challenge virus is re-isolated from not more than 20 per cent of the vaccinated chickens.*

## 3 Material und Methoden

Sämtliche laborexperimentellen Untersuchungen wurden im Zeitraum von Januar 1997 bis September 1998 im Paul Ehrlich Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe, in Langen durchgeführt.

### 3.1 Erbrüten und Haltung der Hühnerküken

#### 3.1.1 Erbrüten der Hühnerküken

*Material:*

- SPF-Eier (Firma Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven)  
SPF = spezifiziert pathogenfrei, d.h. für alle Eier wird das Freisein von den in Tabelle 4 (S. 74) aufgeführten Erregern bzw. Antikörpern zertifiziert
- Brutschrank für Vor- und Schlupfbrut (Firma Grumbach, Aßlar)
- Schierlampe (Firma Blohm, Hamburg)

*Methode:*

SPF-Eier wurden mit 70%igem Äthanol sprühdesinfiziert und in einem vollautomatischen Brutschrank 18 Tage lang bei 37,8 bis 38°C und 55-60% relativer Luftfeuchtigkeit bebrütet und dabei alle 4 Stunden gewendet. Am 19. Tag wurden durch Schieren unbefruchtete Eier und solche mit abgestorbenen Embryonen aussortiert. Die übrigen Eier wurden bei 36,8-37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von über 80% bis zum Schlupf am 21. Tag weiter bebrütet.

**Tabelle 4 : SPF-Liste**

Erreger	Testmethode
Küken-Anämie-Virus (CAV)	ELISA
Aviäre Adenoviren: A) Serotyp 1-12 B) EDS 76-Infektion	AGP/SNT/ELISA HAH
Aviäres Encephalomyelitis-Virus (AEV)	ELISA
Aviäres Leukosevirus/RSV-Infektion	ELISA
Aviäres Nephritis-Virus	FAT
Aviäres Reovirus	ELISA
Hühnerpockenvirus	KU/PM
Infektiöse Bronchitis-Virus (IB)	ELISA
Infektiöse Bursitis-Virus (IBD)	AGP
Infektiöse Laryngotracheitis-Virus (ILT)	ELISA
Influenza Typ A-Virus	ELISA
Mareksche Krankheit, Virus der	AGP
Mykoplasmosen (M. gallisepticum und M. synoviae)	Aggl./HAH
Newcastle-Krankheit, Virus der	HAH
Reticuloendotheliose-Virus	ELISA
Salmonella pullorum	Aggl.
Andere Salmonellen	BU
Puten-Rhinotracheitis-Virus (TRT)	ELISA

HAH = Hämagglutination-Hemmungs-Test

AGP = Agar-Gel-Präzipitations-Test

Aggl. = Agglutinations-Test

FAT = Fluoreszenz-Antikörper-Test

SNT = Serum-Neutralisations-Test

BU = Bakteriologische Untersuchung

KU = Klinische Untersuchung

PM = post mortem

ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay

### **3. 1. 2 Haltung der Hühnerküken:**

Die Hühnerküken wurden aus SPF-Eiern, wie unter Punkt 3.1.1 beschrieben, erbrütet und dann in Käfigen mit Hobelspänen als Einstreu unter Rotlicht-Wärmelampen gehalten. Die Fütterung erfolgte bis zur 4. Woche mit Kükenstarterfutter ad libitum, anschließend mit Junghennenfutter, ebenfalls ad libitum. Das Raumklima wurde durch eine vollautomatische Zwangsbelüftungsanlage auf ca. 20 °C und ca. 60% relative Luftfeuchtigkeit geregelt, wobei der Luftdurchsatz auf mindestens 8-faches Raumvolumen pro Stunde eingestellt war. Die Beleuchtung erfolgte durch den natürlichen Einfall von Tageslicht. Die tägliche Wasserversorgung wurde durch Stülptränken sichergestellt.

Das maximal erreichte Lebensalter aller verwendeten Hühnerküken betrug 52 Tage.

### **3. 2 Probennahme:**

#### **3. 2. 1 Blutentnahme und Serumgewinnung:**

*Material:*

- 2-ml-Spritzen
- blaue Kanülen (0,6 x 30 mm)
- Äthanol 70 %
- Zentrifugenröhrchen
- Zentrifuge (1000 g)

*Methode:*

Die Blutentnahme erfolgt aus der Vena jugularis an der federfreien Stelle des Halses. Hierzu wird das Hühnerküken von einer Hilfsperson in Seitenlage gehalten. Der Kopf des Tieres wird mit 2 Fingern einer Hand fixiert, während der Daumen proximal am Hals das Blutgefäß staut. Bei jungen Hühnern wird zur besseren

Darstellbarkeit des Gefäßes der Thymus mit dem stauenden Daumen zur Seite geschoben. Nach Desinfektion der Entnahmestelle mit Alkohol wird das Gefäß unter Verwendung einer Kanüle mit aufgesetzter Spritze punktiert. Das entnommene Blutvolumen beträgt maximal 1% der Körpermasse, es werden jedoch nicht mehr als 3 ml benötigt.

Nach der Gerinnung (2-3 Stunden bei Raumtemperatur) werden die Blutproben aus den Spritzen in Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wird erneut 10 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Die so gewonnenen Seren können bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt werden.

### **3. 2. 2 Gewinnung der Tracheen**

#### *Material:*

- Becherglas (250 ml)
- Zellstoff
- Latexhandschuh
- Methoxyfluran (Metofane<sup>®</sup>, Firma Janssen-Cilag GmbH)
- Schere
- Chirurgische Pinzette
- Flächendesinfektionsmittel (z.B. Mikrocid<sup>®</sup> Liquid)
- Röhrchen mit je 3 ml Tryptosephosphatbouillon + 0,5% Gentamicin (s. 3.2.3)

#### *Methode:*

Um die Hühnerküken unter möglichst geringer Traumatisierung der Tracheen zu töten, werden die Tiere zunächst mit Methoxyfluran betäubt. Hierzu wird ein Becherglas mit Zellstoff ausgelegt welcher mit Methoxyfluran beträufelt ist. Das Becherglas wird durch Überstülpen eines Latexhandschuhs verschlossen. Kopf und Hals des Kükens werden durch ein Loch im Latexhandschuh in das Becherglas



gesteckt, bis der nachlassende Muskeltonus den Bewußtseinsverlust des Tieres anzeigt.

Mit einer Schere wird zunächst ein großzügiger Hautschnitt am dorsalen Hals in Kopfnähe durchgeführt um die Halswirbelsäule mit der ihr anliegenden Muskulatur freizulegen. Danach wird die Wirbelsäule im Bereich der ersten Halswirbel mit Scherenschlag durchtrennt.

Zur Darstellung der Trachea wird am ventralen Hals die Haut mit der Schere von unterhalb des Schnabels bis zum Thorax längs eröffnet. Die Trachea wird mit der chirurgischen Pinzette unterhalb des Kehlkopfes erfaßt und proximal davon durchtrennt. Die Luftröhre läßt sich nun durch leichten Zug bei gleichzeitigem entlang streichen mit der leicht geöffneten Schere aus dem umliegenden Bindegewebe entfernen und wird möglichst dicht am Brustkorb abgesetzt.

Bis zur weiteren Verwendung, aber nicht länger als 2 bis 3 Stunden, werden die Tracheen in Röhrchen mit je 3 ml Tryptosephosphatbouillon + 5% Gentamicin verbracht, wobei darauf zu achten ist, daß sie vollständig in die Flüssigkeit eintauchen, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Sämtliche Instrumente werden mechanisch gereinigt, mit Flächen-desinfektionsmittel desinfiziert und erst nach vollständiger Trocknung beim nächsten Tier eingesetzt.

### ***3. 3 Methoden zum Nachweis der infektiösen Bronchitis***

#### **3. 3. 1 IB-Virusisolierung im embryonierten Hühnerei**

Für die Virusisolierung von Impf- oder Challengevirus wird potentiell virushaltiges Material aus Kükentrateen in die Allantoishöhle embryonierter Hühnereier inokuliert. Die Eier werden 7 weitere Tage bebrütet und nach dieser Zeit auf IB-viruspezifische Läsionen untersucht. Von den überlebenden Embryonen, bei denen

keine eindeutigen Veränderungen erkennbar sind, wird Allantoamnionflüssigkeit zur Durchführung einer weiteren Embryopassage gewonnen.

Eine Probe gilt als frei von IB-Viren, wenn auch in der 3. Passage keine Embryonen IB-spezifische Veränderungen zeigen und in keiner Passage mehr als 1 Embryo abgestorben ist.

*Material:*

- SPF-Eier (Firma Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, s. Kap. 3.1.1)
- Brutschrank 37,8–38 °C, 55–60% relative Luftfeuchtigkeit (Firma Grumbach, Aßlar)
- Schierlampe
- Äthanol 70%
- Elektrischer Bohrer (Firma TAKO)
- Holzleim (Ponal)
- Laminar-Flow-Bank
- Gefrierschrank (-20 °C)
- Feine Pinzette
- Kleine spitze Schere
- Fire-Boy oder Bunsenbrenner
- Reagenzglasschüttler (Vortex)
- 1 ml-Spritzen und blaue Kanülen (0,6 x 30 mm)
- IB-Lebendimpfstoff Nobilis H120 (Firma Intervet) als Positivkontrolle
- Tryptosephosphatbouillon (29,5 g Tryptose-Phosphat ad 1000 ml Aqua bidest) mit 0,5% Gentamicin (Firma Sigma)

*Methode:*

Die Tracheen werden den zu untersuchenden Hühnerküken wie unter 3.2.2 beschrieben entnommen und einzeln in Reagenzgläser verbracht, die jeweils 3 ml Tryptosephosphatbouillon mit 0,5% Gentamicin enthalten. Unter der Laminar-

Flow-Bank wird jede Trachea mit einer feinen Pinzette ergriffen, mit einer spitzen Schere längs eröffnet und in ca. 2 mm lange Stücke geschnitten, welche zurück in das Reagenzglas gegeben werden. In dieser Form können die Proben ggf. bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren werden. Vor Bearbeitung der nächsten Probe sind Schere und Pinzette durch Abflammen zu desinfizieren.

Für jede Probe werden 5 Eier im Brutschrank bei  $37,8\text{-}38\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $55\text{-}60\%$  relativer Luftfeuchte 9–11 Tage vorbebrütet. Gleichzeitig werden je 5 Eier für Positiv- und Negativkontrollen sowie weitere  $10\%$  der benötigten Anzahl embryonierter Eier zum Ausgleich der unspezifischen Absterberate während der Vorbebrütungszeit in den Brutschrank eingelegt.

Vor der Beimpfung werden die vorbebrüteten Eier zunächst geschickt, wobei unbefruchtete Eier und solche mit abgestorbenen Embryonen aussortiert werden. Bei den übrigen Eiern wird die Luftblase und einige Millimeter unter der Luftblase eine gefäßfreie Stelle in der Nähe der Vena umbilicalis mit Bleistift angezeichnet. Die Eier werden mit  $70\%$ igem Äthanol sprühdesinfiziert. Mit einem elektrischen Bohrer wird zunächst eine Entlastungsbohrung in der Mitte der angezeichneten Luftblase vorgenommen, danach wird an der markierten Beimpfungsstelle die Eischale vorsichtig angebohrt, so daß die weiche innere Schalenhaut intakt bleibt.

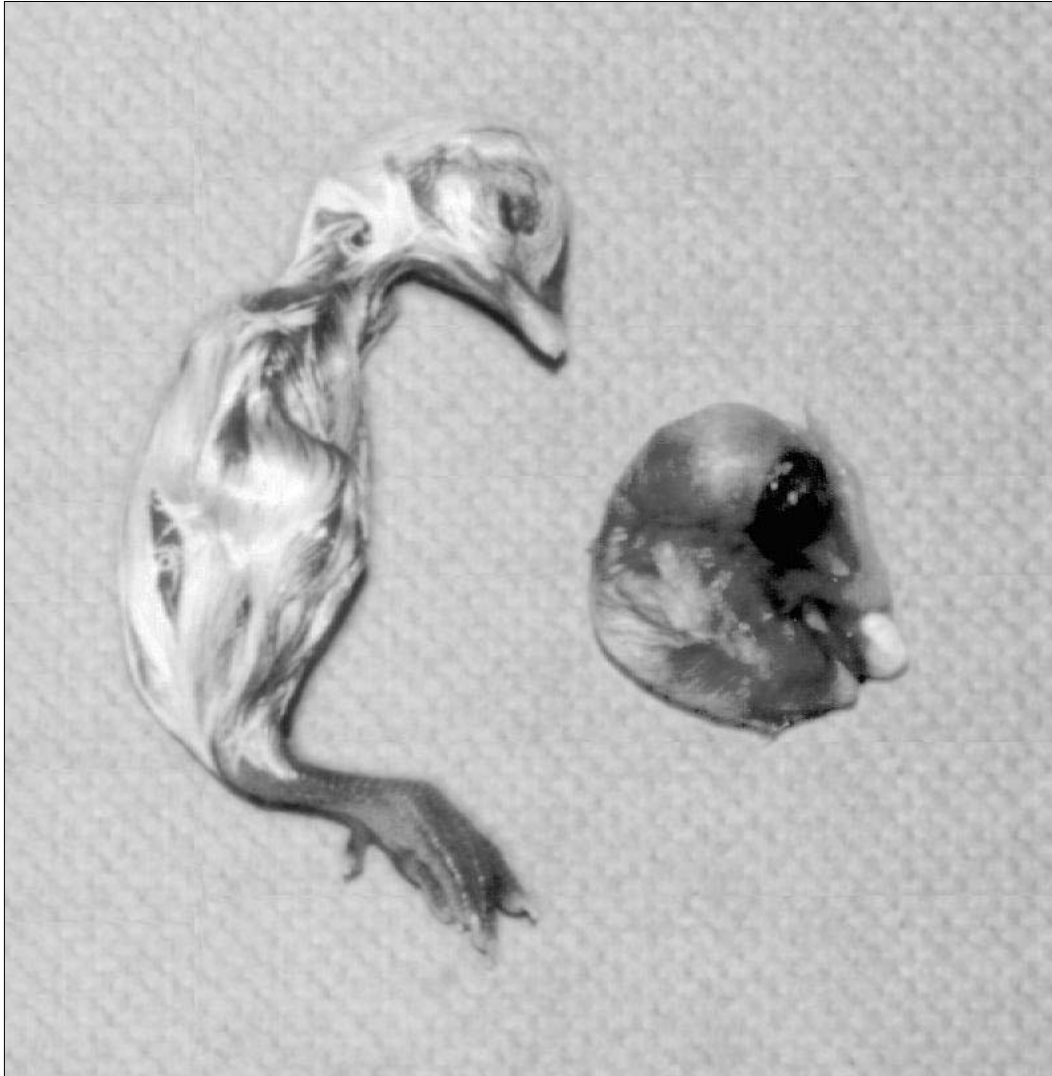
Die gegebenenfalls vorher aufgetauten Probenröhrchen werden auf einem Vortex-Schüttler gründlich gemischt. Mit einer 1 ml-Spritze mit aufgesetzter Kanüle werden für jede Probe 5 embryonierte Eier mit je  $0,2\text{ ml}$  der potentiell virushaltigen Tryptosephosphatbouillon in die Allantoishöhle beimpft. Dafür wird die Kanüle nach Durchstechen der inneren Schalenhaut um  $1\text{-}2\text{ mm}$  in Richtung Eimitte vorgeschoben. Für die weiteren Passagen wird die aus den überlebenden embryonierten Eiern gewonnene Allantoamnionflüssigkeit in gleicher Weise eingesetzt. Als Negativkontrolle werden 5 Embryonen mit gentamicinhaltiger Tryptose-phosphatbouillon beimpft. Für die Positivkontrolle wird der IB H120-

Impfstoff in Tryptosephosphatbouillon so verdünnt, daß 0,2 ml eine Impfstoffdosis (mindestens  $10^3$  EID<sub>50</sub>) enthalten und ebenfalls in 5 embryonierte Eier verimpft. Sämtliche Eier werden mit Holzleim verschlossen und für weitere 7 Tage bebrütet. Die embryonierten Eier werden nach 24 Stunden und nach 7 Tagen geschickt. Abgestorbene Embryonen werden aussortiert und im Protokoll vermerkt.

Nach 7 Tagen werden die überlebenden Embryonen durch 2-stündiges Abkühlen auf  $-20$  °C abgetötet. Unter der Laminar-Flow-Bank wird die Eischale nach Desinfektion mit Alkohol über der Luftblase eröffnet und entfernt. Die innere Eihaut und die Chorioallantoismembran werden mit einer desinfizierten Pinzette eröffnet. Zur Weiterpassagierung werden aus jedem embryonierten Ei 0,5 bis 1 ml der Allantoamnionflüssigkeit mit einer Eppendorfpipette mit steriler Spitze aufgenommen und in ein steriles Reagenzglas verbracht. Flüssigkeiten aus Eiern einer Probe werden gepoolt und mit 0,5% Gentamicin versetzt. Sie können direkt weiterverimpft oder bis zum weiteren Gebrauch bei  $-80$  °C aufbewahrt werden.

### *Beurteilung*

Die überlebenden Embryonen werden nach dem Ei entnommen und untersucht. Als IB-spezifische Läsionen anzusehen sind Verzweigung (Größe beträgt maximal die Hälfte der Größe gesunder Embryonen gleichen Alters), Krümmung und Verklebung mit den Eihäuten (Abb. 3). Bei Embryonen mit typischen Veränderungen fällt häufig auch eine Grünfärbung des Fruchtwassers auf, die bereits beim Schieren erkennbar ist. Diese Befunde gleichen sich, unabhängig davon, ob sie durch das Impfvirus H 120 oder durch das Challengevirus M 41 hervorgerufen wurden. Von den überlebenden Embryonen, bei denen diese Veränderungen nicht eindeutig vorhanden sind, oder die keine spezifischen Veränderungen aufweisen, wird Allantoamnionflüssigkeit zur Durchführung einer weiteren Embryopassage gewonnen. Embryonen mit spezifischen Veränderungen werden im Protokoll vermerkt.



**Abbildung 3:** Links: gesunder Hühnerembryo, daneben: Embryo gleichen Alters mit IBV-bedingten Veränderungen (Verzweigung und Curling).

*Bewertung:*

Embryonen, die bis zu 24 Stunden nach der Beimpfung absterben, werden als unspezifisch abgestorben betrachtet. Sterben mehr als 1 von 5 Embryonen innerhalb von 24 Stunden, so wird die Beimpfung mit 5 weiteren embryonierten Eiern wiederholt.

Wenn nach 7 Tagen mehr als 2 Embryonen pro Probe abgestorben sind, oder mindestens 1 Embryo spezifische Läsionen zeigt, wird die Probe als virushaltig betrachtet. Bei allen anderen Proben wird die gewonnene Amnio-Allantoamnionflüssigkeit in einer weiteren Passage eingesetzt. Proben, bei denen in der 3. Passage keine spezifisch veränderten Embryonen auftreten, und bei denen in keiner Passage mehr als 2 Embryonen abgestorben sind, werden als virusfrei bewertet.

### 3.3.2 Ziliarreduktionstest

Der Ziliarreduktionstest dient dem Nachweis der durch IB-Viren verursachten Zilienverluste des Luftröhrenepithels. Dazu werden den zu untersuchenden Hühnerküken die Luftröhren unmittelbar nach dem Töten entnommen. Es werden 10 dünne Querschnitte je Trachea angefertigt und mikroskopisch auf die Zilienbewegung ihres Epithels untersucht.

#### *Material:*

- 24-Wellplatten (Falcon, Firma Becton-Dickinson & Co Labware)
- PBS – Phosphate-Buffered-Saline ohne Mg und Ca:  
8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
ad 1000 mit Aqua bidest.. Einstellung der Lösung auf pH 7,2 mit NaOH
- Tracheen der zu untersuchenden Hühnerküken in Tryptosephosphatbouillon oder PBS, nicht später als 2 bis 3 Stunden nach dem Töten der Tiere
- Laminar-Flow-Bank
- Petrischale
- feine Pinzette
- kleine spitze Schere
- Skalpellklinge mit konvex geformter Schneidefläche
- Invertmikroskop (Axiovert 25, Firma Zeiss)
- 1-ml-Spritze mit feiner Kanüle, z.B. 0,6 mm Durchmesser

*Method:*

Für jede zu untersuchende Luftröhre (Gesamtlänge ca. 5 cm) werden in 10 Kavitäten einer 24 Wellplatte jeweils 1,5 ml PBS pipettiert. Die Trachea wird mit einer feinen Pinzette dem zur Aufbewahrung verwendeten Reagenzglas entnommen, wobei darauf zu achten ist, daß mit der Pinzette nur die äußersten Enden der Trachea gefaßt werden.

In einer Petrischale wird die Trachea mit einer kleinen spitzen Schere von anhaftendem Bindegewebe soweit wie möglich befreit. Mit einer konvex geformten Skalpellklinge werden von beiden Enden der Luftröhre jeweils 5 mm abgeschnitten und verworfen. Die Luftröhre wird mit der Pinzette vorsichtig in Position gehalten, wobei ein Zusammendrücken zu vermeiden ist. Mit dem Skalpell werden insgesamt 10 Ringe von etwa 0,5 mm Breite aus der Trachea geschnitten und einzeln in die Vertiefungen der 24-Well-Platte verbracht. Dabei werden jeweils 3 Ringe von den beiden Enden und 4 Ringe aus der Mitte der Luftröhre gewonnen.

Unmittelbar vor der mikroskopischen Untersuchung wird in einer 1-ml-Spritze mit aufgesetzter Nadel mehrfach etwas von dem umgebenden PBS aufgezogen und unter Druck durch das Lumen jedes einzelnen Luftröhrenringes gespritzt, um dem Epithel anhaftenden Schleim zu entfernen. An der Innenseite der Trachealringe wird die Flimmerbewegung der Kinozilien bei mittlerer Vergrößerung (60- bis 120-fach) mit dem Invertmikroskop beurteilt. Dabei müssen durch Betätigen des Feintriebels verschiedene Ebenen eingestellt werden, um die Zilienbewegung zu erkennen.

*Beurteilung:*

Für die Zilienaktivität jedes Trachealringes werden wie folgt Punkte vergeben:

- 0 Punkte = keine Zilienbewegung erkennbar
- 1 Punkt = ca. 25 % Zilienbewegung
- 2 Punkte = ca. 50 % Zilienbewegung
- 3 Punkte = ca. 75 % Zilienbewegung
- 4 Punkte = 100 % Zilienbewegung

*Bewertung:*

Die Addition der einzelnen Punktzahlen der Ringe ergibt für jede Trachea eine Gesamtpunktzahl zwischen 0 und 40 Punkten. Die Trachea gilt als durch das Virus geschädigt, wenn die Zilienbeweglichkeit auf die Hälfte oder weniger reduziert ist, das heißt wenn die Gesamtpunktzahl 20 oder weniger beträgt.

Etwa 4 Stunden nach dem Töten der Tiere verringert sich die Zilienbewegung auch gesunder Tracheen, so daß nach dieser Zeit eine sichere Beurteilung nicht mehr möglich ist.



### 3. 3. 3 Histologische Untersuchung der Trachea

Für die histologische Untersuchung wird ein Stück aus der Mitte der Trachea in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es werden mehrere Querschnitte von 3 µm Dicke angefertigt, mit Hämatoxilin und Eosin gefärbt und in Entellan eingebettet. Die gefärbten Luftröhrenschnitte werden mikroskopisch auf entzündliche Veränderungen und Epithelschädigungen untersucht und bewertet.

*Material:*

- Formalin, 4%
- Tissue-Tek-Kassetten
- Einbettmaschine (HMP 300, Firma Microm)
- Äthanol in den Konzentrationen 50%, 70%, 90%, 98%
- Xylol
- Paraffin
- Eingießstation (TBS 88, Firma Medite)
- Schlittenmikrotom HN 400 (Firma Microm)
- Wasserbad (45°C)
- Objektträger (SuperFrost Plus, Firma Menzel)
- Wärmeschränk (60 °C, Firma Heraeus)
- Färbelösungen (siehe Methode, S. 86)
- Schnelleindeckelmittel Entellan (Firma Merck)
- Deckgläser
- Skalpellklinge
- Mikroskop (Firma Zeiss)

*Method:*

Von den zu untersuchenden Tieren wird ein ca. 3 mm langes Stück aus der Mitte der Trachea entnommen und in 4 prozentigem Formalin fixiert. Die Gewebeproben werden einzeln in Tissue-Tek-Kassetten verbracht. In der Einbettmaschine wird über eine aufsteigende Äthanol-Xylol-Reihe (Formalin, Äthanol 50%, -70%, -90%, -98%, 3 x Xylol, 3 x Paraffin) Formalin gegen Paraffin ausgetauscht.

In der Eingießstation werden die Luftröhrenstücke senkrecht in Paraffinblöcke eingegossen, so daß anschließend Querschnitte der Tracheen angefertigt werden können. Mit dem Schlittenmikrotom werden aus der Mitte der Gewebeprobe 3-4 Schnitte von 3 µm Dicke angefertigt, im Wasserbad geglättet und auf einen Objektträger aufgezogen. Zur Entfernung überflüssigen Paraffins werden die Objektträger für einige Stunden in einem Wärmeschrank bei 60 °C aufbewahrt.

Die Färbung der Schnitte erfolgt nach dem folgenden Schema:

- Xylol-Ersatz, 2 x 5 Minuten
- Isopropanol 99 %, 2 x 5 Minuten
- Äthanol 96 %, 2 x 5 Minuten
- Äthanol 70 %, 2 x 5 Minuten
- Kardasewitschlösung (Ammoniaklösung 5 %, in 70 % Äthanol), 4 Minuten
- Aqua bidest., 2 x 5 Minuten
- Papanicolao-Lösung (Merck 9254), 4 Minuten
- HCl-Äthanol-Lösung (2,8 ml konz. HCl, 576 ml Äthanol, 524 ml Aqua bidest.), 1 Sekunde
- Wasserbad (langsam fließend), 5 Minuten
- Äthanol 96 %, 3 x 2 Minuten
- Xylol-Ersatz 2 x 2 Minuten
- Xylol, rein, 2 Minuten

Nach Durchlaufen der Färbereihe wird auf jeden Objektträger ein Tropfen Entellan aufgebracht und ein Deckglas möglichst blasenfrei aufgelegt. Nach 24 Stunden ist das Entellan ausgehärtet. Überschüssiges Entellan wird mit einer Skalpellklinge von Objektträger und Deckglas entfernt.

*Beurteilung:*

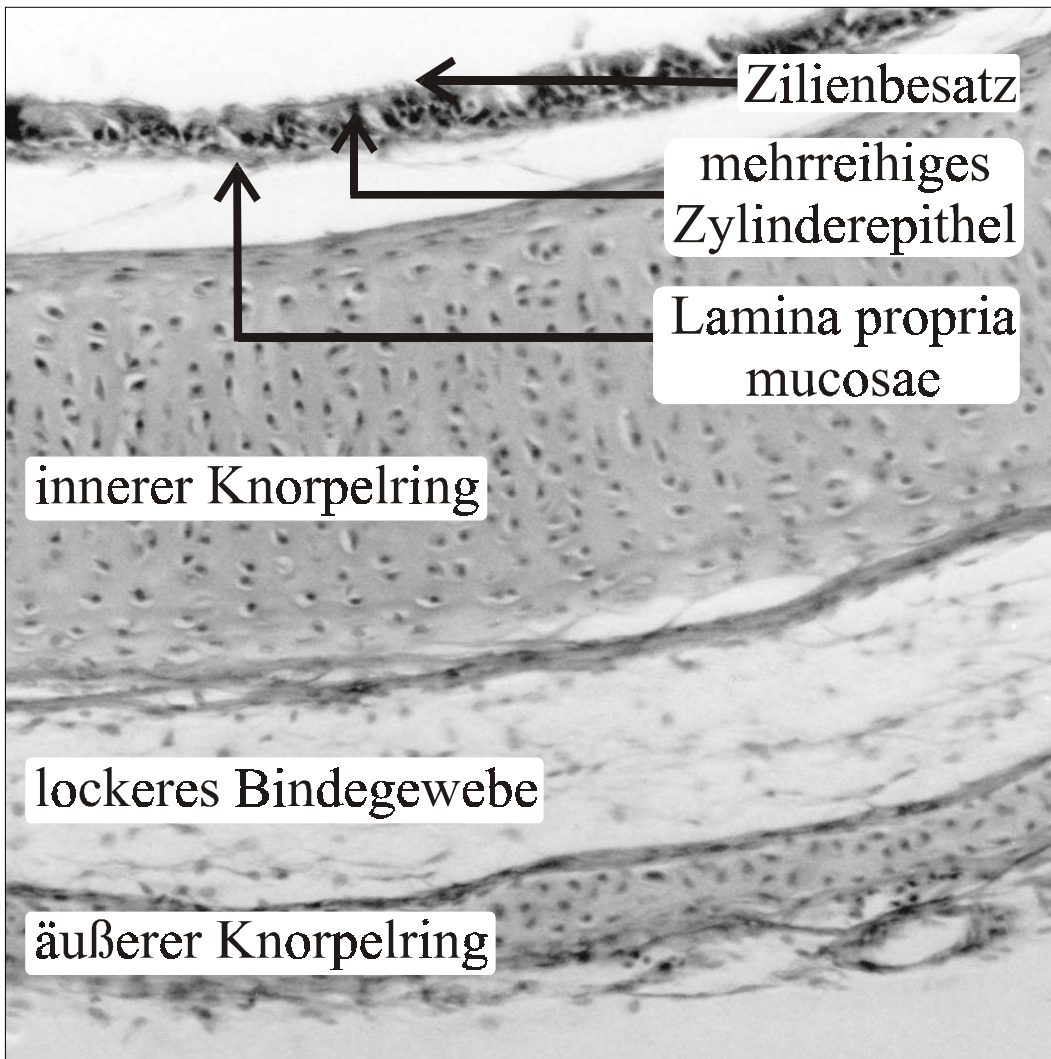
Die histologischen Präparate werden mikroskopisch bei 60- bis 120-facher Vergrößerung untersucht. Dabei werden Form und Zilienbesatz des Epithels, zelluläre Infiltration der Lamina submucosa und Ödematisierung der Lamina propria beurteilt.

*Bewertung:*

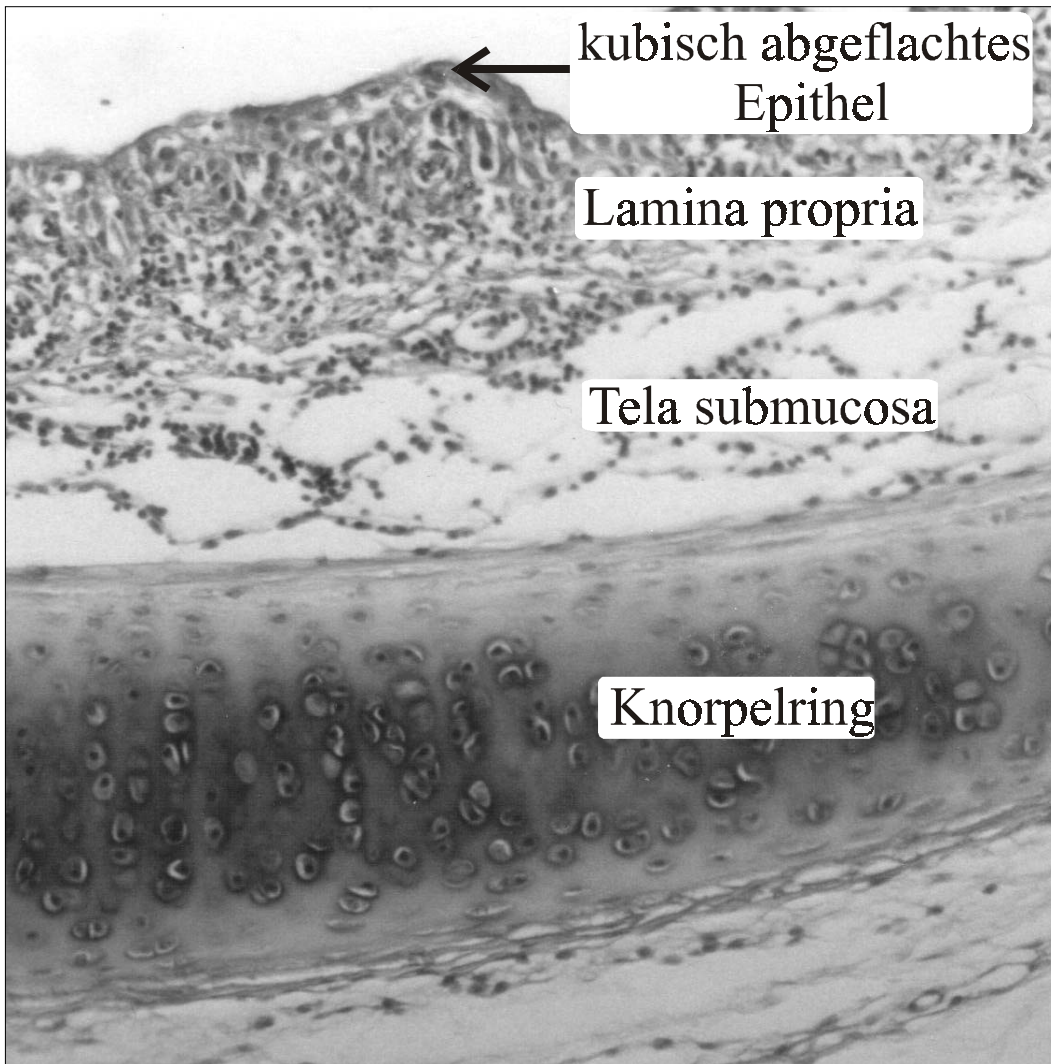
Als frei von virusbedingten Veränderungen (**IB-negativ**) werden Trachealschnitte beurteilt, bei denen keine Degeneration des Epithels erkennbar ist, selbst wenn eine leichte bis mäßige zelluläre Infiltration der Lamina propria mucosae bzw. ein geringgradiges submuköses Ödem ausgebildet ist. (Abb. 5)

Als durch IB-Viren geschädigt (**IB-positiv**) werden die Trachealschnitte angesehen, wenn eine deutliche Epitheldegeneration mit Zilienverlust zu beobachten ist, oder eine massive zelluläre Infiltration der Lamina Propria und ein deutliches Ödem der Submukosa mit verändertem Epithel und partiellem Zilienverlust zu erkennen sind. (Abb. 6 und 7)

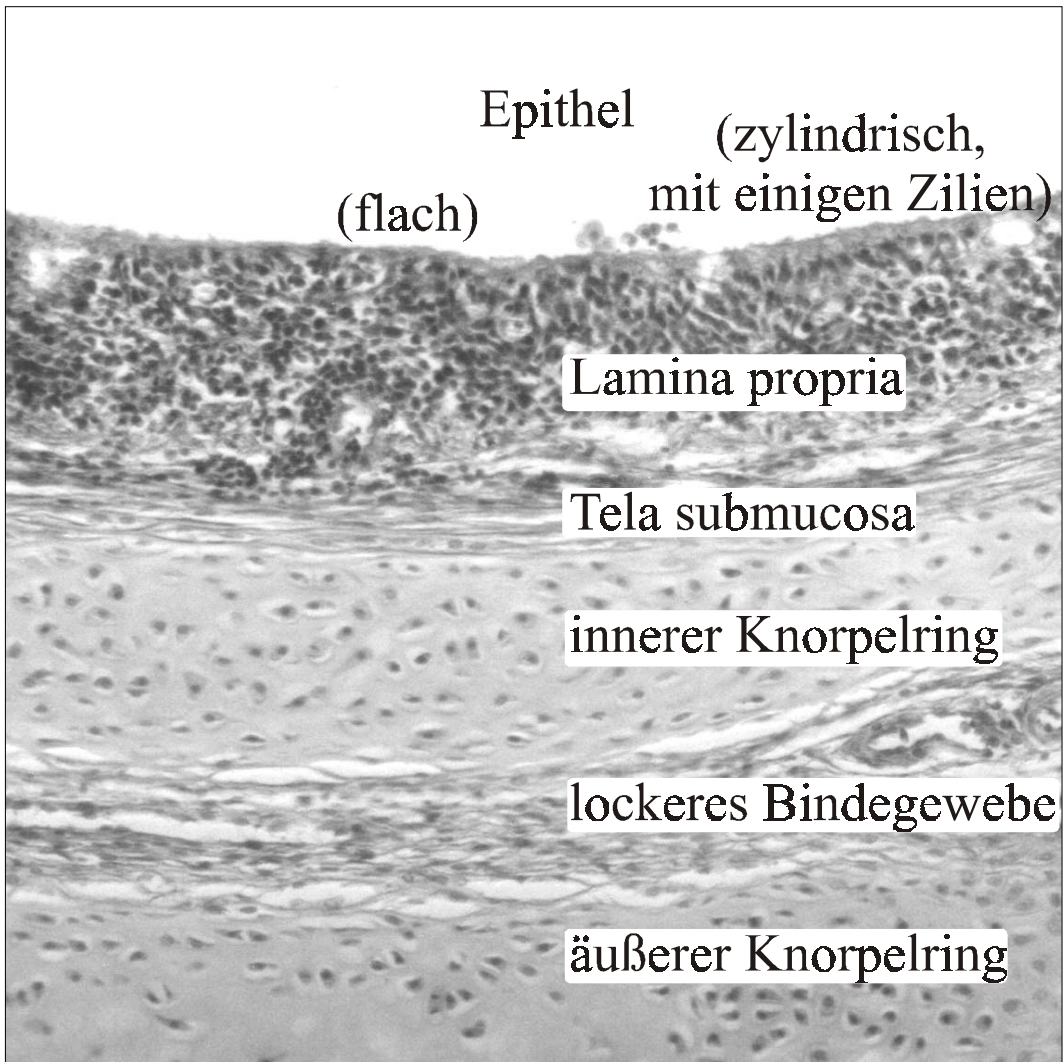
Tracheen mit leichteren Epitheldefekten und mäßiger bis starker zellulärer Infiltration der Lamina propria oder deutlichem submukösem Ödem werden als **fraglich** beurteilt.



**Abbildung 4:** Histologisches Bild der Trachea eines 43 Tage alten, nicht infizierten Hühnerküchens im Querschnitt. Man beachte die geringe Dicke des Epithels und dessen Zilienbesatz.



**Abbildung 5:** Akute Tracheitis mit Ödem der Tela submucosa, zellulärer Infiltration der Lamina propria, Abflachung des Epithels und Zilienverlust bei einem 39 Tage alten SPF-Küken, 2 Tage nach der Infektion mit dem IB-Challengevirus M-41.



**Abbildung 6:** Länger bestehende Tracheitis mit massiver lymphozytärer Infiltration und deutlicher Verdickung der Lamina propria sowie beginnender Regeneration des Epithels bei einem 43 Tage alten SPF-Küken, 6 Tage nach der Infektion mit dem IB-Challengevirus M-41.

### **3.4 IB-Antikörperbestimmung in Hühnerserum mit ELISA**

Für den Antikörper-ELISA werden die Vertiefungen einer 96-well-Platte mit IBV-Antigen beschichtet. Die gegebenenfalls im Hühnerserum vorhandenen IBV-spezifischen Antikörper binden an das Virusantigen und werden mit Hilfe peroxidasekonjugierter Anti-Speziesantikörper nachgewiesen. Das Enzym Peroxidase ruft bei dem Substrat Tetra-Methyl-Benzidine (TMB) eine Farbreaktion hervor, die photometrisch ausgewertet wird.

#### *Material:*

Zum Nachweis von Antikörpern gegen IB-Viren findet der Testkit der Firma IDEXX Verwendung.

#### *Methode :* (nach Herstellerangaben)

- Verdünnung der zu untersuchenden Seren 1:500 mit Probenverdünnungspuffer
- Pipettieren von jeweils 100 µl der Positiv- und Negativkontrollösung in je 2 Reaktionsvertiefungen der mit IBV-Antigen beschichteten 96-well-ELISA-Platte
- Pipettieren von jeweils 100 µl der verdünnten Seren pro Vertiefung als Doppelansatz (2 Vertiefungen pro Probe)
- Inkubation 30 Minuten bei Raumtemperatur
- 3 x waschen mit entmineralisiertem Wasser
- 100 µl (Ziegen) Anti-Huhn-Meerrettichperoxidase-Konjugat in jede Vertiefung gegeben
- Inkubation und Waschen wie oben beschrieben
- TMB-Verdünnungspuffer und TMB-Konzentrat zu gleichen Teilen mischen
- 100 µl der frisch angesetzten TMB-Substratlösung in jede Vertiefung geben
- Inkubation 15 Minuten bei Raumtemperatur
- 100 µl Stopplösung (0,12% Flußsäure) in jede Vertiefung pipettieren

*Auswertung:*

Die Messung der Farbreaktion erfolgt in einem SLT-Rainbow Reader mit der Software easyWIN fitting, indem die Extinktion bei 650 nm ohne Referenzfilter bestimmt wird.

Zur Bestimmung des korrigierten Extinktionsmittelwertes wird von allen Proben das arithmetische Mittel der Extinktionen beider Proben des Doppelansatzes gebildet und das arithmetische Mittel aus den Extinktionswerten der Negativkontrolle abgezogen. Werte mit negativem Vorzeichen werden gleich Null gesetzt.

Formel:

$$kE_{\text{Probe}} = \frac{E_{\text{Probe 1}} + E_{\text{Probe 2}}}{2} - \frac{E_{\text{Nk 1}} + E_{\text{Nk 2}}}{2}$$

kE = korr. Extinktionsmittelwert    E = Extinktion    Nk = Negativkontrolle

Durch Vergleich mit einem vom Hersteller mitgelieferten Hyperimmunserum von Hühnern, das als standardisierte Positivkontrolle (P) dient, ist eine Titerbestimmung im getesteten Serum möglich. Hierzu wird zunächst der Quotient aus den korrigierten Extinktionsmittelwerten von Testserum (S) und Positivkontrolle (S/P-Quotient) gebildet :

$$\text{S/P-Quotient} = kE_{\text{Probe}} / kE_{\text{Positivkontrolle}}$$

Die Titerberechnung erfolgt dann nach folgender Formel

$$\text{Log}_{10} \text{ Titer} = 1,09 (\text{Log}_{10} \text{ S/P-Quotient}) + 3,36$$

*Bewertung:*

In Abweichung zu den Anweisungen des Testkit-Herstellers werden bereits Seren mit S/P-Quotienten von 0,1 und höher zur Titerbestimmung herangezogen (Hersteller: S/P > 0,2). Proben mit niedrigeren S/P-Werten werden als negativ bewertet.



### **3.5 Durchführung der Wirksamkeitsprüfung nach DAB 10 /EAB 3**

#### **3.5.1 Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei**

Zur Durchführung der Wirksamkeitsprüfung wurden Impfstoffchargen verwendet, die bei der Impfstofftitration im Rahmen der Chargenprüfung durch das Paul-Ehrlich-Institut gleiche oder höhere Titrationsergebnisse aufwiesen als vom Hersteller angegeben. Zum Zeitpunkt der Impfung der Tiere für die Wirksamkeitsprüfung wurde eine erneute Titration der jeweiligen Impfstoffe durchgeführt, um einen lagerungsbedingten Wirksamkeitsverlust zum Zeitpunkt der Impfung auszuschließen.

##### *Material:*

- SPF-Eier (Firma Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, s. Kap. 3.1.1.)
- Brutschrank 37,8°–38 °C, 55–60% rel. Luftfeuchtigkeit (Fa.Grumbach, Aßlar)
- Tryptosephosphatbouillon (29,5 g Tryptose-Phosphat ad 1000 ml Aqua bidest)
- Impfstoff Nobilis IB H120 (Fa. Intervet GmbH), Ch.B.60766-1-4 u. 70464-1-4.
- Schierlampe (Firma Blohm, Hamburg)

##### *Methode:*

Zur Impfstofftitration werden SPF-Eier verwendet, die bei 37,8-38 °C und 55-60% relativer Luftfeuchte 9 Tage lang vorbebrütet wurden.

Der in gefriergetrockneter Form vorliegende Impfstoff wird in Tryptosephosphatbouillon aufgelöst, und es wird eine 1:10-Verdünnungsreihe hergestellt. Pro Verdünnungsstufe werden je 0,1 ml der Virussuspension wie unter 3.2.1 beschrieben in die Allantoishöhle von 8 embryonierten Eiern inokuliert. Als Negativkontrollen dienen 8 Embryonen, die mit Tryptosephosphatbouillon beimpft wurden.

Die Eier werden täglich durchleuchtet, abgestorbene Embryonen werden protokolliert. Eier, die innerhalb der ersten 24 Stunden absterben, werden als unspezifisch betrachtet. Nach 7 Tagen wird die Berechnung des 50%-Endpunktes nach der Methode von REED und MUENCH (1938) vorgenommen.

*Auswertung:*

Zur Berechnung des 50%-Endpunktes einer Virustitration gehen REED und MUENCH (1938) davon aus, daß innerhalb einer logarithmischen Verdünnungsreihe alle Tiere (Embryonen), die bei einer bestimmten Verdünnung überleben, auch eine höhere Verdünnung überleben würden und daher zu allen durchgeführten höheren Verdünnungsstufen hinzuaddiert werden können. Ebenso wird angenommen, daß alle Tiere, die bei einer bestimmten Verdünnung sterben, auch bei einer geringeren Verdünnung gestorben wären, und daher zu den durchgeführten niedrigeren Verdünnungsstufen hinzuaddiert werden können. Auf diese Weise wird die Anzahl der zur Titerbestimmung herangezogenen Tiere (Embryonen) rechnerisch erhöht, so daß auch mit relativ geringen Tierzahlen ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden kann.

Werden die auf diese Weise summierten Zahlen überlebender und abgestorbener Tiere (Embryonen) für die jeweiligen Verdünnungsstufen in einem logarithmischen Diagramm als zwei Kurven dargestellt, so entspricht der Schnittpunkt dieser beiden Kurven demjenigen Virustiter, bei dem 50 % der Tiere (Embryonen) absterben, also in diesem Fall der  $EID_{50}$ .

Für die hier durchgeführten Titrations wurde dieser Schnittpunkt ( $EID_{50}$ ) mit Hilfe eines Computerprogramms berechnet.

### 3. 5. 2 Impfung der Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 2 Wirksamkeitsprüfungen mit unterschiedlichen Chargen desselben Impfstoffes durchgeführt. Zum Vergleich wurde noch die Wirksamkeitsprüfung eines weiteren IB H120-Impfstoffes herangezogen, bei dem ausschließlich die Virusisolierung im embryonierten Hühnerei nach DAB durchgeführt wurde.

#### *Material:*

- SPF-Hühnerküken
- 1. Wirksamkeitsprüfung: Nobilis IB H120 Ch. B. 60766-1-4, 5000 Dosen /Abfüllung, Titrationsergebnis des Herstellers:  $10^{4,4}$  EID<sub>50</sub>/Dosis
- 2. Wirksamkeitsprüfung: Nobilis IB H120 Ch. B. 70464-1-4, 2500 Dosen /Abfüllung Titrationsergebnis des Herstellers:  $10^{4,9}$  EID<sub>50</sub>/Dosis
- 3. Wirksamkeitsprüfung:
- Jordanischer Impfstoff, Stamm IB H120, sowie Stamm IB H52, jeweils 2000 Dosen pro Abfüllung, Mindesttiter nach Angabe des Herstellers:  $10^3$  EID<sub>50</sub>
- Tryptosephosphatbouillon (29,5 g Tryptose-Phosphat ad 1000 ml Aqua bidest)
- 1 ml-Spritze

#### *Methode:*

Der Impfstoff wird in Tryptosephosphatbouillon aufgelöst und so verdünnt, daß 0,1 ml der Suspension den vom Hersteller angegebenen Mindestimpftiter von  $10^3$  EID<sub>50</sub> enthalten. Die Suspension wird in 1 ml-Spritzen aufgezogen und Hühnerküken in dem vom Hersteller für die Impfung vorgeschriebenen Mindestalter von 12-14 Tagen als Augentropfen in der Dosierung 0,1 ml /Tier verabreicht.

Für die dritte Wirksamkeitsprüfung wurden Hühnerküken im Alter von 7 Tagen mit  $10^3$  EID<sub>50</sub> per eyedrop geimpft.

### 3. 5. 3 Wirksamkeitsprüfungen in vivo

Für jede Wirksamkeitsprüfung werden gemäß DAB 10 und EAB 3 mindestens 20 geimpfte SPF-Hühnerküken und mindestens 10 ungeimpfte Kontrolltiere einer Belastungsinfektion unterzogen.

In der ersten Wirksamkeitsprüfung wurden insgesamt 20 Impflinge und 12 Kontrolltiere im Alter von 36–38 Tagen, 24 Tage nach der Impfung, mit dem Challengevirus intratracheal infiziert.

In der zweiten Wirksamkeitsprüfung wurden 24 Impflinge und 8 Kontrolltiere im Alter von 37-38 Tagen, 25 Tage nach der Impfung, intratracheal infiziert. Vier weitere Kontrolltiere wurden mit der gleichen Dosis Challengevirus per eyedrop infiziert.

In der dritten Wirksamkeitsprüfung wurden 20 Impflinge und 11 Kontrolltiere im Alter von 30 Tagen, 22 Tage nach der Impfung, intratracheal infiziert.

#### *Material:*

- Hühnerküken (erbrütet aus SPF-Eiern wie unter 3.1.1 beschrieben)
- Challengevirus:
  1. und 3. Wirksamkeitsprüfung:

IBV, Stamm M 41, gefriergetrocknet, Titrationsergebnis:  $10^{6,7}$  EID<sub>50</sub> /Flasche, empfohlene Infektionsdosis  $10^3$  EID<sub>50</sub> /Tier, freundlicherweise überlassen von der Firma Intervet International B.V. (früher Vemie Veterinär Chemie GmbH)
  2. Wirksamkeitsprüfung:

IBV, Stamm M 41, gefriergetrocknet, Titrationsergebnis:  $10^8$  EID<sub>50</sub> /Flasche, empfohlene Infektionsdosis  $10^3$  EID<sub>50</sub> /Tier, freundlicherweise überlassen von der Firma Intervet International B.V.
- PBS – Phosphate-Buffered-Saline ohne Mg und Ca (s. 3.3.2.)
- Multipette (Firma Eppendorf) mit Aufsatz Combitip 1,25 ml
- Gebogene Knopfkanüle

*Methode:*

Das gefriergetrocknete IB-Challengevirus wird unter sterilen Bedingungen in PBS resuspendiert und so verdünnt, daß in 25 µl der Virussuspension jeweils  $10^3$  EID<sub>50</sub> enthalten sind. Die Virussuspension wird in den Combitip einer Multipette aufgezogen. Um die sterile Knopfkanüle auf den Combitip aufsetzen zu können, muß dessen Spitze um einige Millimeter gekürzt werden. Die Multipette wird auf die Applikation von 25µl pro Dosierung eingestellt, die ersten 5 Infektionsdosen werden verworfen.

Zur intratrachealen Infektion werden die Hühnerküken von einer Hilfsperson in aufrechter Position vor einer guten Lichtquelle in Augenhöhe des Infizierenden gehalten. Dieser streckt mit einer Hand den Hals des Tieres und öffnet den Schnabel, während die zweite Hand die Knopfkanüle einige Millimeter in die Trachealöffnung vorschiebt, welche sich am Zungengrund beim Einatmen des Hühnerkükens hell darstellt. Nach der Applikation der Challengevirussuspension ist der Erfolg der intratrachealen Applikation am kurzen Husten oder Keuchen des Tieres zu erkennen.

Alle Küken werden täglich auf klinische Symptome der Infektiösen Bronchitis untersucht.

Die Tiere werden zwischen dem vierten und siebten Tag p. i. nach der unter 3.2.2 beschriebenen Methode getötet. Bevor es getötet wird, erfolgt bei jedem einzelnen Hühnerküken eine klinische Untersuchung. Die Tracheen werden im Ziliarreduktionstest und histologisch untersucht (Kap.3.3.2 und 3.3.3). Das übrige Luftröhrenmaterial wird zur Virusisolierung im embryonierten Hühnerei (Kap. 3.3.1.) verwendet.

In der 3. Wirksamkeitsprüfung wurde ausschließlich die Virusisolierung im Hühnerembryo durchgeführt.

### **3. 5. 4 Antikörpertiterbestimmung**

Eine erste Blutentnahme erfolgt bei einem Teil der Küken vor der Impfung. Sämtlichen Impfungen und einigen der Kontrolliere wird zu Beginn des Challenge unmittelbar vor der Infektion Blut entnommen (1. und 2. Infektionsversuch). Im 2. Infektionsversuch erfolgt bei allen Küken eine weitere Blutentnahme unmittelbar bevor sie getötet werden.

Die Aufbereitung der Blutproben wird, wie unter 2.1.1 beschrieben, durchgeführt. In den Seren wird der IB-Antikörpergehalt mittels ELISA, nach der in Kap. 3.4 angegebenen Methode, bestimmt.

## ***3. 6 Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der experimentellen IBV-Infektion:***

### **3. 6. 1 Zeitlicher Verlauf der experimentellen IBV-Infektion empfänglicher Hühnerküken**

Im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung eines IB-Impfstoffes wurden IBV-empfindliche Hühnerküken in einem Alter, das dem der verwendeten Kontrolliere entspricht, intratracheal mit IB-Challengevirus infiziert. Zwischen dem 2. und 14. Tag p. i. wurden die Küken mit verschiedenen Methoden (klinische Untersuchung, Ziliarreduktionstest, Histologie, Virusisolierung) vergleichend auf Anzeichen der infektiösen Bronchitis untersucht.

#### *Material:*

- Hühnerküken (erbrütet aus SPF-Eiern wie unter 3.1.1 beschrieben)
- Challengevirus:  
IBV, Stamm M 41, gefriergetrocknet, Titrationsergebnis:  $10^{6,7}$  EID<sub>50</sub> /Flasche, empfohlene Infektionsdosis  $10^3$  EID<sub>50</sub> /Tier, freundlicherweise überlassen von der Firma Intervet International B.V. (früher Vemie Veterinär Chemie GmbH)
- PBS – Phosphate-Buffered-Saline ohne Mg und Ca (s. 3.3.2.)

*Methoden:*

Insgesamt 24 Hühnerküken im Alter von 36–38 Tagen wurden mit Challengevirus vom Massachusettstyp, IBV M41, intratracheal infiziert, wie unter 3.5.3 beschrieben. Zwei gesunde Hühnerküken gleichen Alters dienten als Kontrollen. Die Küken wurden täglich auf klinische Symptome der Infektiösen Bronchitis kontrolliert.

Die Untersuchung der Tiere erfolgte an den Tagen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12 und 14 p. i., nach der unter 3.2.2 beschriebenen Methode. An den Tagen 5, 6 und 7 p. i. wurden jeweils 4 Tiere untersucht, welche gleichzeitig als Kontrolltiere für die Wirksamkeitsprüfung nach DAB/EAB dienten, an allen übrigen Tagen wurden jeweils 2 Tiere untersucht.

Vor der Tötung erfolgte bei jedem einzelnen Hühnerküken eine klinische Untersuchung. Die Tracheen wurden im Ziliarreduktionstest und histologisch untersucht (Kap.3.3.2 und 3.3.3.). Das übrige Luftröhrenmaterial wurde zur Virusisolierung im embryonierten Hühnerembryo (Kap. 3.3.1.) verwendet.

### **3. 6. 2 Zeitlicher Verlauf der experimentellen IBV-Infektion nach erfolgter Impfung mit Nobilis IB H120**

34 Hühnerküken, im vom Hersteller angegebenen Mindestimpfalter von 12 bis 14 Tagen, wurden mit Nobilis IB H120 geimpft. Nach 25 Tagen wurden diese Tiere sowie 12 ungeimpfte Kontrolltiere einer Belastungsinfektion mit virulentem IBV unterzogen.

Die Küken wurden zwischen dem 2. und 14. Tag p. i. getötet und mit verschiedenen Methoden (klinische Untersuchung, Ziliarreduktionstest, Histologie, Virusisolierung) vergleichend auf Anzeichen der Infektiösen Bronchitis untersucht.

*Material:*

- Hühnerküken (erbrütet aus SPF-Eiern wie unter 3.1.1 beschrieben)
- Impfstoff: Nobilis IB H120 Ch. B. 70464-1-4, 2500 Dosen /Abfüllung  
Titrationsergebnis des Herstellers:  $10^{4,9}$  EID<sub>50</sub>/Dosis
- Challengevirus: IBV Stamm M 41, gefrieretrocknet  
Titrationsergebnis:  $10^8$  EID<sub>50</sub> /Flasche,  
empfohlene Infektionsdosis  $10^3$  EID<sub>50</sub> /Tier (Firma Intervet International B.V.)

*Methode:*

34 Hühnerküken im Alter von 12-14 Tagen wurden mit je  $10^3$  EID<sub>50</sub> des Impfstoffes Nobilis IB H120 per eyedrop geimpft.

Nach 25 Tagen wurden die Impflinge sowie 12 ungeimpfte Kontrolltiere mit je  $10^3$  EID<sub>50</sub> Challengevirus intratracheal infiziert. Zuvor erfolgte bei sämtlichen Impflingen und einigen Kontrolltieren eine Blutentnahme für die IB-Antikörpertiterbestimmung.

Das Töten der Impflinge erfolgte an den Tagen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12 und 14 nach der Belastungsinfektion, wobei an den Tagen 4 und 6 jeweils 10 Tiere im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung getötet wurden, an den übrigen Tagen wurden jeweils 2 Impflinge getötet.

Die Kontrolltiere wurden an den Tagen 2, 4, 6, 7 und 10 p. i. getötet, davon jeweils 2 Küken an den Tagen 2, 7 und 10, an den Tagen 4 und 6 je 3 Küken.

Unmittelbar bevor sie getötet wurden, erfolgte bei allen Hühnerküken eine klinische Untersuchung sowie eine Blutentnahme zur IB-Antikörpertiterbestimmung.

Die Tracheen der Tiere wurden vergleichend in Ziliarreduktionstest, Histologie und Virusisolierung untersucht.



### **3.7 Untersuchung auf Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach der Impfung mit IB H120-Impfstoff**

#### **3.7.1 Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach Impfung mit 10facher Impfstoffdosis**

Im Rahmen einer Unschädlichkeitsprüfung wurden Küken mit je 10 Dosen eines Impfstoffes vom Stamm IB H120 geimpft. Die Tiere wurden 3 Wochen lang auf klinische Symptome der Infektiösen Bronchitis untersucht. Über einen Zeitraum von 5 Wochen nach der Impfung wurden wöchentlich je 2 Tiere getötet und auf IB-bedingte Veränderungen der Trachea sowie auf Virusausscheidung untersucht.

##### *Material:*

- Hühnerküken (erbrütet aus SPF-Eiern wie unter 3.1.1 beschrieben)
- Impfstoff: TAD IB-Vac 1 (Stamm IB H120), Ch.B.97538901, 5000 Ds. /Abfüllung (Firma Lohmann Animal Health, Cuxhaven)  
Titrationsergebnis des Herstellers:  $10^{4.3}$  EID<sub>50</sub> / Ds.
- PBS – Phosphate-Buffered-Saline ohne Mg und Ca (s. 3.3.2.)

##### *Methode:*

14 Küken im Alter von 2 Tagen wurden mit je 10 Dosen TAD IB-Vac I, aufgelöst in jeweils 0,1 ml PBS, per eyedrop geimpft. Die Tiere wurden 21 Tage lang beobachtet und Krankheitssymptome wurden protokolliert. An den Tagen 7, 14, 21, 28 und 35 nach der Impfung wurden je 2 Hühnerküken getötet. Die Tracheen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben entnommen und im Ziliarreduktionstest (s. 3.3.2.) sowie histologisch (s. 3.3.3.) untersucht. Mit dem verbleibenden Luftröhrenmaterial wurde eine Virusisolierung im embryonierten Hühneri (s. 3.3.1.) durchgeführt.

### 3. 7. 2 Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach Impfung mit der vom Hersteller angegebenen Mindestimpfstoffdosis

Es wurde untersucht, ob Krankheitsanzeichen oder Virusausscheidung bei einer Wirksamkeitsprüfung zum Untersuchungszeitpunkt allein durch das Impfvirus hervorgerufen werden können.

Hierzu wurden 2 Hühnerküken wie zu einer Wirksamkeitsprüfung geimpft und nach 26 Tagen getötet, was den Bestimmungen im DAB 10 bzw. EAB 3 entspricht. (Infektion frühestens 21 Tage nach Impfung, Untersuchung am 5. Tag nach der Belastungsinfektion). Vier weitere Hühnerküken wurden ebenso geimpft und nach 20 Tagen untersucht, was dem Untersuchungszeitpunkt im Vorschlag zur Änderung des EAB 3 entspricht. (Infektion frühestens 14 Tage nach Impfung, Untersuchung am 6. Tag nach der Belastungsinfektion)

#### *Material:*

- Hühnerküken (erbrütet aus SPF-Eiern wie unter 3.1.1 beschrieben)
- Impfstoff 1: Nobilis IB H120, Ch. B. 70464-1-4, 2500 Dosen /Abfüllung  
Titrationsergebnis des Herstellers:  $10^{4,9}$  EID<sub>50</sub>/Dosis (für 4 Hühnerküken)
- Impfstoff 2: Nobilis IB H120, Ch. B. 60766-1-4, 5000 Dosen /Abfüllung,  
Titrationsergebnis des Herstellers:  $10^{4,4}$  EID<sub>50</sub>/Dosis (für 2 Hühnerküken)

#### *Methode:*

6 Hühnerküken im Alter von 12-14 Tagen wurden wie zur Durchführung einer Wirksamkeitsprüfung mit der vom Hersteller angegebenen Mindestimpfstoffdosis von  $10^3$  EID<sub>50</sub> per eyedrop vakziniert. Vier Tiere (Impfstoff 1) wurden nach 20 Tagen, zwei Tiere (Impfstoff 2) nach 26 Tagen getötet, und die Tracheen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben entnommen und im Ziliarreduktionstest (s. 3.3.2.) sowie histologisch (s. 3.3.3.) untersucht. Mit dem verbleibenden Luftröhrenmaterial wurde eine Virusisolierung im embryonierten Hühnerei (s. 3.3.1.) durchgeführt.

### **3.8 Vergleich der IB-spezifischen Krankheitsanzeichen nach intratrachealer- und per eyedrop-Infektion**

*Material:*

- Hühnerküken (erbrütet aus SPF-Eiern wie unter 3.1.1 beschrieben)
- Challengevirus:  
IBV, Stamm M 41, gefriergetrocknet, Titrationsergebnis:  $10^{6,7}$  EID<sub>50</sub> /Flasche, empfohlene Infektionsdosis  $10^3$  EID<sub>50</sub> /Tier, freundlicherweise überlassen von der Firma Intervet International B.V. (früher Vemie Veterinär Chemie GmbH)
- PBS – Phosphate-Buffered-Saline ohne Mg und Ca (s. 3.3.2.)

*Methode:*

IBV-empfindliche Hühnerküken im Alter von 36-38 Tagen wurden mit virulentem IBV, Stamm M 41, infiziert, wobei 4 Tiere je  $10^3$  EID<sub>50</sub> als Augentropfen erhielten, während 6 Tiere mit der gleichen Dosis intratracheal infiziert wurden.

Nach 4, bzw. 6 Tagen wurden die Hühnerküken getötet und in Ziliarreduktionstest, Histologie und Virusisolierung auf Anzeichen der infektiösen Bronchitis untersucht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Erste Wirksamkeitsprüfung nach DAB 10 / EAB 3

Die erste Wirksamkeitsprüfung umfaßt folgende Schritte:

- 1) Impfstofftitration im Hühnerembryo zur Überprüfung des Ergebnisses der vom Hersteller durchgeführten Titration (4.1.1).
- 2) Impfung von 20 Hühnerküken im Alter von 12-14 Tagen mit Nobilis IB H120 (je  $10^3$  EID<sub>50</sub> per eyedrop).
- 3) Bestimmung des Antikörpertiters bei den geimpften Tieren vor Challengebeginn (4.1.6).
- 4) Belastungsinfektion der geimpften Hühnerküken sowie von 14 nicht geimpften Kontrolltieren gleichen Alters mit dem Challengevirus M41 (je  $10^3$  EID<sub>50</sub>, intratracheal), 24 Tage nach der Impfung.
- 5) Beurteilung der Krankheitsanzeichen bei Impflingen und Kontrolltieren während des Infektionsversuchs (4.1.2).
- 6) Beurteilung der Krankheitssymptome bei den einzelnen Hühnerküken unmittelbar vor ihrer Tötung zur weiteren Untersuchung (4.1.2).
- 7) Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial, in dieser ersten Wirksamkeitsprüfung wurde zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieser Untersuchungsmethode die Virusisolierung zweimal mit dem selben Probenmaterial durchgeführt (4.1.3).
- 8) Beurteilung der Tracheen im Ziliarreduktionstest (4.1.4).
- 9) Histologische Beurteilung der Tracheen (4.1.5).
- 10) Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Testergebnisse (4.1.7).

#### 4. 1. 1 Ergebnis der Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei

Für den lyophilisierten Impfstoff Nobilis IB H120, Ch.B. 60760-1-1 (Firma Intervet GmbH), 5000 Dosen pro Abfüllung, resuspendiert in 7,5 ml Tryptosephosphatbouillon, wurde folgendes Titrationsergebnis ermittelt:

<b>Verdünnungsstufe</b>	<b>Embryonen abgestorben</b>	<b>Embryonen mit IB-spezifischen Veränderungen</b>	<b>Gesamtmenge IBV-infizierter Embryonen</b>
$10^{-4}$	8 / 8	-	8 / 8
$10^{-5}$	7 / 8	1	8 / 8
$10^{-6}$	3 / 8	0	5 / 8
$10^{-7}$	1 / 8	0	1 / 8

Titrationsergebnis =  $10^{4,49}$  EID<sub>50</sub> pro Dosis

(gemäß Berechnung nach REED und MUENCH, 1938)

Titrationsergebnis des Herstellers =  $10^{4,4}$  EID<sub>50</sub> pro Dosis

Deklariertes Mindestvirusgehalt pro Dosis =  $10^3$  EID<sub>50</sub>

#### 4. 1. 2 Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches

Die während des Infektionsversuches bei den Impfungen und Kontrollküken auftretenden klinischen Symptome bestanden in häufigem Niesen, verschärften bis hin zu deutlich rasselnden Atemgeräuschen und leicht verminderter Futter- und Trinkwasseraufnahme. Es traten keine Todesfälle auf.

Insgesamt konnten bei den meisten Kontrolltieren ab dem 2. Tag p. i. Symptome einer infektiösen Bronchitis in unterschiedlicher Intensität beobachtet werden, während weniger als die Hälfte der geimpften Tiere Krankheitsanzeichen zeigte, welche auch zumeist milder ausgeprägt waren.

Am Versuchsende (4. bis 7. Tag p. i.) waren bei 6 der 20 Impflinge und bei 9 der 10 Kontrolltiere Krankheitsanzeichen feststellbar.

**Tabelle 5: Krankheitsanzeichen im Verlauf des Infektionsversuches**

Tage p. i.	Tiere gesamt		Tiere krank		Symptome
	I	K	I	K	
0	20	14	0	0	keine
1	20	14	0	0	keine
2	20	14	0	0	keine
3	20	14	0	7	K: Niesen, rasselnde Atemgeräusche
4	20	14	8	12	I: Niesen, K: rasselnde Atemgeräusche
5	20	12	6	11	I: Atmung verschärft, K: rasselnde Atemg.
6	20	8	6	7	I: Atmung verschärft, K: rasselnde Atemg.
7	0	4	-	4	Rasselnde Atemgeräusche

I = Impflinge (Impfung am 12.-14., Belastungsinfektion am 36.-38. Lebenstag)

K = Kontrolltiere (keine Impfung, Belastungsinfektion am 36.-38. Lebenstag)

**Tabelle 6: Krankheitssymptome der einzelnen Tiere am Versuchsende**

<b>Impfling Nr.</b>	<b>Tag p. i.</b>	<b>Symptome</b>	<b>Kontrolle Nr.</b>	<b>Tag p. i.</b>	<b>Symptome</b>
<b>I-1</b>	6	o. b. B.	<b>K-1</b>	4	rasselnde Atmung
<b>I-2</b>	6	o. b. B.	<b>K-2</b>	4	rasselnde Atmung
<b>I-3</b>	6	Atmung verschärft	<b>K-3</b>	5	rasselnde Atmung
<b>I-4</b>	6	o. b. B.	<b>K-4</b>	5	rasselnde Atmung
<b>I-5</b>	6	Atmung verschärft	<b>K-5</b>	5	rasselnde Atmung
<b>I-6</b>	6	Atmung verschärft	<b>K-6</b>	5	Atmung verschärft
<b>I-7</b>	6	o. b. B.	<b>K-7</b>	6	o. b. B.
<b>I-8</b>	6	Atmung verschärft	<b>K-8</b>	6	rasselnde Atmung
<b>I-9</b>	6	Atmung verschärft	<b>K-9</b>	6	Atmung verschärft
<b>I-10</b>	6	Atmung verschärft	<b>K-10</b>	6	Atmung verschärft
<b>I-11</b>	6	o. b. B.	<b>K-11</b>	7	rasselnde Atmung
<b>I-12</b>	6	o. b. B.	<b>K-12</b>	7	rasselnde Atmung
<b>I-13</b>	6	o. b. B.	<b>K-13</b>	7	Atmung verschärft
<b>I-14</b>	6	o. b. B.	<b>K-14</b>	7	rasselnde Atmung
<b>I-15</b>	6	o. b. B.			
<b>I-16</b>	6	o. b. B.			
<b>I-17</b>	6	o. b. B.			
<b>I-18</b>	6	o. b. B.			
<b>I-19</b>	6	o. b. B.			
<b>I-20</b>	6	o. b. B.			

o. b. B. : ohne besonderen Befund

#### **4. 1. 3 Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial**

Mit jeder der Tracheen wurden zwei Versuche zur Virusisolierung im Hühnerembryo durchgeführt. Die Ergebnisse der ersten Virusisolierung werden in Tabelle 7 wiedergegeben, die der zweiten Virusisolierung in Tabelle 8.

Es wurden nur die überlebenden Embryonen auf IB-spezifische Veränderungen untersucht, eine Weiterpassage erfolgte bei allen Proben, bei denen 2 oder weniger Embryonen abgestorben waren.

In beiden Versuchen waren sämtliche Kontrolltiere als IB-positiv zu bewerten (Virusanzüchtung erfolgreich).

Eine Virusanzüchtung gelang allerdings auch aus dem Probenmaterial der meisten Impflinge, wobei in den beiden Versuchen teilweise unterschiedliche Proben als virushaltig, bzw. nicht virushaltig beurteilt wurden. Nur bei 2 der 20 Impflinge (Nr. I-10 und I-16) konnte in beiden Versuchen übereinstimmend kein IBV isoliert werden (Tabellen 7 und 8).



**Tabelle 7: Erste Virusisolierung im Hühnerembryo (Teil 1: Impfinge)**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>I-1</b>	0 / 5	0	0 / 5	0	1 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-2</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>I-3</b>	3 / 4	0					<b>IB +</b>
<b>I-4</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>I-5</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>I-6</b>	4 / 5	0					<b>IB +</b>
<b>I-7</b>	5 / 5						<b>IB +</b>
<b>I-8</b>	3 / 5	0	5 / 5				<b>IB +</b>
<b>I-9</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>I-10</b>	2 / 5	0	1 / 5	0	2 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-11</b>	2 / 5	0	3 / 4	0			<b>IB +</b>
<b>I-12</b>	1 / 5	0	4 / 4				<b>IB +</b>
<b>I-13</b>	1 / 5	0	1 / 4	0	2 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-14</b>	1 / 4	0	1 / 4	0	1 / 4		<b>IB -</b>
<b>I-15</b>	1 / 5	1	2 / 4	0	3 / 4		<b>IB +</b>
<b>I-16</b>	2 / 4	0	0 / 5	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-17</b>	1 / 5	1	3 / 4	0			<b>IB +</b>
<b>I-18</b>	3 / 5	0					<b>IB +</b>
<b>I-19</b>	0 / 5	2					<b>IB +</b>
<b>I-20</b>	2 / 5	0	3 / 4	0			<b>IB +</b>

**Fortsetzung Tabelle 7: (Teil 2:Kontrolltiere)**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>K-1</b>	5 / 5						<b>IB +</b>
<b>K-2</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>K-3</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>K-4</b>	5 / 5						<b>IB +</b>
<b>K-5</b>	4 / 5	0					<b>IB +</b>
<b>K-6</b>	4 / 5	0					<b>IB +</b>
<b>K-7</b>	3 / 5	0	3 / 4	1			<b>IB +</b>
<b>K-8</b>	5 / 5						<b>IB +</b>
<b>K-9</b>	2 / 5	0	4 / 4				<b>IB +</b>
<b>K-10</b>	1 / 5	2	2 / 5	2	4 / 4		<b>IB +</b>
<b>K-11</b>	2 / 4	0	3 / 4	1			<b>IB +</b>
<b>K-12</b>	5 / 5						<b>IB +</b>
<b>K-13</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>K-14</b>	5 / 5						<b>IB +</b>

x / y: von y 24 Stunden nach der Beimpfung lebenden Embryonen sind x  
während der folgenden 6 Tage abgestorben

IB + : erfolgreicher Nachweis von IBV (siehe 3. 3. 1)

IB - : IB-Virusanzüchtung im Hühnerembryo negativ

**Tabelle 8: Zweite Virusisolierung im Hühnerembryo (Teil 1: Impflinge)**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
I-1	2 / 4	0	0 / 5	3			IB +
I-2	4 / 4						IB +
I-3	2 / 5	0	1 / 5	4			IB +
I-4	4 / 5	0					IB +
I-5	2 / 5	0	2 / 5	1			IB +
I-6	4 / 5	1					IB +
I-7	4 / 5	1					IB +
I-8	1 / 4	1					IB +
I-9	5 / 5						IB +
I-10	0 / 5	0	1 / 5	0	2 / 5	0	IB -
I-11	3 / 5	0					IB +
I-12	2 / 4	0	1 / 5	0	1 / 5	0	IB -
I-13	x / 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	?
I-14	2 / 5	0	4 / 4				IB +
I-15	2 / 5	0	4 / 5	0			IB +
I-16	1 / 4	0	1 / 5	0	2 / 5	0	IB -
I-17	3 / 5	0					IB +
I-18	0 / 5	0	4 / 5	0			IB +
I-19	2 / 4	0	3 / 5	1			IB +
I-20	3 / 4	0					IB +

**Fortsetzung Tabelle 8: (Teil 2: Kontrolltiere)**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>K-1</b>	5 / 5						<b>IB +</b>
<b>K-2</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>K-3</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>K-4</b>	5 / 5						<b>IB +</b>
<b>K-5</b>	4 / 4						<b>IB +</b>
<b>K-6</b>	2 / 6	0	2 / 6	0	1 / 6	4	<b>IB +</b>
<b>K-7</b>	2 / 4	0	3 / 6	1			<b>IB +</b>
<b>K-8</b>	3 / 4	0					<b>IB +</b>
<b>K-9</b>	1 / 5	1					<b>IB +</b>
<b>K-10</b>	1 / 4	1					<b>IB +</b>
<b>K-11</b>	1 / 6	5					<b>IB +</b>
<b>K-12</b>	5 / 5						<b>IB +</b>
<b>K-13</b>	4 / 5	0					<b>IB +</b>
<b>K-14</b>	4 / 4						<b>IB +</b>

**x / y:** von y 24 Stunden nach der Beimpfung lebenden Embryonen sind x  
während der folgenden 6 Tage abgestorben

**n. a.:** nicht auswertbar, da Probematerial für Wiederholung nicht ausreichend

**+** : erfolgreicher Nachweis von IBV (siehe 3. 3. 1)

**-** : Virusanzüchtung im Hühnerembryo negativ

#### 4. 1. 4 Ziliarreduktionstest

Im Ziliarreduktionstest wurde bei sämtlichen nicht geimpften, aber testinfizierten Kontrollküken ein vollständiges Sistieren der Zilienaktivität beobachtet.

11 der 20 geimpften Tiere wurden mit deutlich über 20 Bewertungspunkten als frei von IB-spezifischen Veränderungen eingestuft. Von den übrigen Impfungen wurde bei 7 Tieren ein vollständiges Sistieren der Zilienaktivität beobachtet, bei 2 Tieren war eine geringe Zilienbewegung zu erkennen.

**Tabelle 9: Auswertung des Ziliarreduktionstests am 4.-7. Tag p. i.\***

(Teil 1: Kontrolltiere)

Tier Nr.	Punkte Trachealring Nr.										Punkte gesamt	Beur- teilung
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
K-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
K-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+

\* Genauer Untersuchungstag p. i. für die einzelnen Tiere: siehe Tabelle 6

**Fortsetzung Tabelle 9: (Teil 2: Impflinge)**

Tier Nr.	Punkte Trachealring Nr.										Punkte gesamt	Beur- teilung
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
I-1	4	3	3	4	2	3	4	2	3	4	32	IB -
I-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-5	2	0	0	1	2	2	2	1	2	1	13	IB +
I-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-7	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	4	IB +
I-8	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	IB +
I-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-11	2	3	4	3	3	4	3	3	2	4	31	IB -
I-12	4	4	4	3	4	2	3	3	2	4	33	IB -
I-13	4	4	4	3	4	2	3	4	4	3	35	IB -
I-14	2	3	3	3	4	2	4	2	3	1	27	IB -
I-15	4	3	4	3	3	4	4	4	4	3	36	IB -
I-16	4	4	4	4	2	3	3	3	4	2	33	IB -
I-17	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	38	IB -
I-18	2	3	3	3	3	3	4	4	4	2	31	IB -
I-19	2	2	4	4	4	4	4	3	4	4	35	IB -
I-20	2	3	3	4	3	4	4	4	4	4	35	IB -

Bewertungspunkte: 0 = keine Zilienaktivität

1 = 25 % Zilienaktivität

3 = 75 % Zilienaktivität

2 = 50 % Ziliaraktivität

4 = 100 % Zilienaktivität

IB + = IBV-bedingtes Sistieren / Verringerung der Zilienaktivität

IB - = kein Hinweis auf Infektiöse Bronchitis

#### **4. 1. 5 Histologische Untersuchung**

Bei allen ungeimpften aber testinfizierten Kontrolltieren konnten in der histologischen Untersuchung IB-typische Veränderungen der Trachealschleimhaut, wie Zilien- oder Epithelverlust, Abflachung der Epithelzellen, zelluläre Infiltration der Lamina propria mucosae oder ein Ödem der Lamina submucosa nachgewiesen werden (Tabelle 10).

In der Gruppe der geimpften und testinfizierten Hühnerküken waren bei 10 der 20 Tiere histologisch nur leichte oder keine Entzündungsanzeichen in der Luftröhrenschleimhaut erkennbar. Die übrigen 10 Tiere zeigten deutliche Anzeichen einer infektiösen Bronchitis, die denen der Kontrolltiere entsprachen (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Auswertung der histologischen Untersuchung (Impflinge)**

<b>Tier Nr.</b>	<b>Submuk. Ödem</b>	<b>zelluläre Infiltr.</b>	<b>Epithel</b>	<b>Beurteilung</b>
<b>I-1</b>	+	+	Schleimzellen vakuolig, sonst o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>I-2</b>	+	+++	abgeflacht, Zilien nur vereinzelt	<b>IB +</b>
<b>I-3</b>	-	+++	Epithel nicht mehr erkennbar	<b>IB +</b>
<b>I-4</b>	-	++	Epithel nicht mehr erkennbar	<b>IB +</b>
<b>I-5</b>	-	+++	kubisch, Zilien nur vereinzelt	<b>IB +</b>
<b>I-6</b>	+	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>I-7</b>	++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>I-8</b>	+	++	Epithel nicht mehr erkennbar	<b>IB +</b>
<b>I-9</b>	+	+++	Epithel nicht mehr erkennbar	<b>IB +</b>
<b>I-10</b>	++	+++	Epithel nicht mehr erkennbar	<b>IB +</b>
<b>I-11</b>	+++	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>I-12</b>	-	++	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>I-13</b>	+	++	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>I-14</b>	-	+	kubisch, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
<b>I-15</b>	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>I-16</b>	-	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>I-17</b>	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>I-18</b>	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>I-19</b>	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>I-20</b>	-	++	o. b. B.	<b>IB -</b>



**Fortsetzung Tabelle 10: (Kontrolltiere)**

<b>Tier Nr.</b>	<b>Submuk. Ödem</b>	<b>zelluläre Infiltr.</b>	<b>Epithel</b>	<b>Beurteilung</b>
<b>K-1</b>	++	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-2</b>	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-3</b>	+	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-4</b>	-	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-5</b>	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-6</b>	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-7</b>	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-8</b>	-	+++	proliferiert, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-9</b>	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-10</b>	-	+++	Epithel nicht mehr erkennbar	<b>IB +</b>
<b>K-11</b>	-	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-12</b>	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-13</b>	-	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K-14</b>	+	+++	Epithel nicht mehr erkennbar	<b>IB +</b>

Legende:

**Submuk. Ödem** = Ödembildung in der Lamina submucosa

**Zelluläre Infiltr.** = Infiltration der Lamina propria mit Entzündungszellen

**o. b. B.**= ohne besonderen Befund

+++ = hochgradig ausgeprägt

++ = mittelgradig ausgeprägt

+ = geringgradig ausgeprägt

- = nicht vorhanden

**IB +** = die Trachea zeigt Anzeichen der Infektiösen Bronchitis

**IB -** = die Trachea zeigt keine Anzeichen der Infektiösen Bronchitis

#### 4. 1. 6 IBV-Antikörpertiterbestimmung

Von sämtlichen Impfungen wurden 23 Tage nach der Impfung, unmittelbar vor der Belastungsinfektion, Seren gewonnen und im ELISA auf IBV-Antikörper untersucht. Bei 12 der 20 Tiere konnten meßbare Antikörpertiter ermittelt werden (Tabelle 11).

Gleichzeitig wurden Seren von Tieren unmittelbar vor der Impfung sowie von nicht geimpften Kontrolltieren vor der Belastungsinfektion untersucht. In diesen Seren lag kein meßbarer Antikörpertiter vor.

**Tabelle 11:** IBV-Antikörpertiter der Impflinge vor dem Challenge

<b>Impfling Nr.</b>	<b>Antikörpertiter (Log 10)</b>	<b>Impfling Nr.</b>	<b>Antikörpertiter (Log 10)</b>
<b>I-1</b>	0	<b>I-11</b>	3,02
<b>I-2</b>	0	<b>I-12</b>	2,54
<b>I-3</b>	0	<b>I-13</b>	3,20
<b>I-4</b>	0	<b>I-14</b>	3,24
<b>I-5</b>	3,10	<b>I-15</b>	2,70
<b>I-6</b>	0	<b>I-16</b>	2,43
<b>I-7</b>	0	<b>I-17</b>	2,60
<b>I-8</b>	0	<b>I-18</b>	2,65
<b>I-9</b>	0	<b>I-19</b>	2,54
<b>I-10</b>	3,26	<b>I-20</b>	3,10

#### 4. 1. 7 Vergleich der Ergebnisse aus der ersten Wirksamkeitsprüfung

In den Tabellen 12 und 13 werden die Ergebnisse sämtlicher Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Infektiösen Bronchitis vergleichend dargestellt.

Bei den Kontrolltieren konnte in allen Tests das Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis nachgewiesen werden. Eines der 14 Hühnerküken zeigte allerdings keine klinischen Symptome der Erkrankung (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Vergleich der verschiedenen Testergebnisse bei den Kontrolltieren**

Tier Nr.	Klinische Symptome	1. Virus-Isolierung	2. Virus-Isolierung	ZRT	Histologie
K-1	+	+	+	+	+
K-2	+	+	+	+	+
K-3	+	+	+	+	+
K-4	+	+	+	+	+
K-5	+	+	+	+	+
K-6	+	+	+	+	+
K-7	-	+	+	+	+
K-8	+	+	+	+	+
K-9	+	+	+	+	+
K-10	+	+	+	+	+
K-11	+	+	+	+	+
K-12	+	+	+	+	+
K-13	+	+	+	+	+
K-14	+	+	+	+	+

+ = Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis

- = keine Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis

Die Übereinstimmung der verschiedenen Tests wurde mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten  $r$  beschrieben, welcher sich wie folgt berechnet:

$$r = \frac{\text{Covarianz (a, b)}}{\sqrt{\text{Varianz a} \cdot \text{Varianz b}}}$$

Bei den Impfungen besteht eine 100 prozentige Korrelation der Ergebnisse von histologischer Untersuchung und Ziliarreduktionstest ( $r = 1$ ). Alle Tiere, die klinische Symptome einer infektiösen Bronchitis zeigten, wurden auch in diesen beiden Tests als IB-positiv bewertet, allerdings zeigten 3 der in ZRT und Histologie als IB-positiv beurteilten Tiere keine erkennbaren klinischen Symptome.

Die beiden Versuche zur Virusisolierung im embryonierten Hühnerei ergaben einen Korrelationskoeffizienten von 0,90. Auffallend ist, daß bei fast allen Tieren IB-Virus isoliert werden konnte. Nur bei 2 Tieren konnte in beiden Versuchen kein IBV isoliert werden. Von diesen wurde eines in Histologie, ZRT und bei der klinischen Untersuchung IB-positiv, das andere IB-negativ bewertet.

Von den 12 Küken mit meßbarem IBV-Antikörpertiter wurden 10 Tiere in Histologie, ZRT und klinischer Untersuchung als IB-negativ beurteilt. Die übrigen beiden Küken sowie alle Tiere ohne meßbaren Antikörpertiter wurden in den oben genannten Untersuchungen als IB-positiv bewertet (Tabelle 13).

**Tabelle 13:** Vergleich der verschiedenen Testergebnisse bei den Impfungen

Tier Nr.	Klinische Symptome	1. Virus-Isolierung	2. Virus-Isolierung	ZRT	Histologie	Antikörpertiter
I-1	-	-	+	-	-	0
I-2	-	+	+	+	+	0
I-3	+	+	+	+	+	0
I-4	-	+	+	+	+	0
I-5	+	+	+	+	+	3,10
I-6	+	+	+	+	+	0
I-7	-	+	+	+	+	0
I-8	+	+	+	+	+	0
I-9	+	+	+	+	+	0
I-10	+	-	-	+	+	3,26
I-11	-	+	+	-	-	3,02
I-12	-	+	-	-	-	2,54
I-13	-	-	?	-	-	3,20
I-14	-	-	+	-	-	3,24
I-15	-	+	+	-	-	2,70
I-16	-	-	-	-	-	2,43
I-17	-	+	+	-	-	2,60
I-18	-	+	+	-	-	2,65
I-19	-	+	+	-	-	2,54
I-20	-	+	+	-	-	3,10

+ = Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis

- = keine Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis

**Da in allen Tests sämtliche Kontrolltiere Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis zeigten, wurde die Forderung des Arzneibuches, daß mindestens 80% der Kontrolltiere an IB erkranken müssen, erfüllt.**

Von den Impfungen konnte bei 75% (1. Virusisolierung), bzw. 85% der Küken (2. Virusisolierung) IBV isoliert werden. Klinische Symptome einer Infektiösen Bronchitis zeigten 30% der geimpften Tiere, 45% wurden in ZRT und Histologie als IB-positiv beurteilt.

**Demnach konnte in keiner der Untersuchungen die Anforderung des Arzneibuches erfüllt werden, daß höchstens 20% der geimpften Tiere an IB erkranken dürfen.**

## 4. 2 Zweite Wirksamkeitsprüfung nach DAB 10 / EAB 3

Die Vorgehensweise bei der zweiten Wirksamkeitsprüfung folgt weitgehend der unter 4.1 beschriebenen Systematik. Abweichend hiervon wurden in dieser Wirksamkeitsprüfung 22 Impflinge und 8 Kontrollküken verwendet. Es wurde nur eine Virusisolierung im Hühnerembryo durchgeführt, und es erfolgte eine weitere Blutentnahme zur Antikörpertiterbestimmung unmittelbar vor der Tötung der Tiere.

### 4. 2. 1 Ergebnis der Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei

Für den lyophilisierten Impfstoff Nobilis IB H120, Ch.B. 70464-1-4 (Firma Intervet GmbH), 2500 Dosen pro Abfüllung, resuspendiert in 3,75 ml Tryptosephosphatbouillon, wurde folgendes Titrationsergebnis ermittelt:

<b>Verdünnungsstufe</b>	<b>Embryonen abgestorben</b>	<b>Embryonen mit IB-spezifischen Veränderungen</b>	<b>Gesamtmenge IBV-infizierter Embryonen</b>
10 <sup>-4</sup>	8 / 8	-	8 / 8
10 <sup>-5</sup>	8 / 8	-	8 / 8
10 <sup>-6</sup>	7 / 8	0	7 / 8
10 <sup>-7</sup>	4 / 8	0	4 / 8

Titrationsergebnis = 10<sup>5,06</sup> EID<sub>50</sub> pro Dosis

(gemäß Berechnung nach REED und MUENCH, 1938)

Titrationsergebnis des Herstellers = 10<sup>4,9</sup> EID<sub>50</sub> pro Dosis

Deklariertes Mindestvirusgehalt pro Dosis = 10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub>

#### 4. 2. 2 Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches

Die während des Infektionsversuches bei den Küken auftretenden klinischen Symptome bestanden, ebenso wie bei der ersten Wirksamkeitsprüfung, in häufigem Niesen, verschärften bis hin zu deutlich rasselnden Atemgeräuschen und leicht verminderter Futter- und Trinkwasseraufnahme. Es traten keine Todesfälle auf.

Insgesamt konnten ab dem 2. Tag p. i. Symptome einer infektiösen Bronchitis beobachtet werden, wobei zunächst etwa die Hälfte der Kontrolltiere und einige Impflinge Krankheitsanzeichen zeigten. Vom 4. Tag p. i. an waren sämtliche Kontrollen erkrankt, während etwa 65% der geimpften Tiere Krankheitssymptome aufwiesen.

Am Versuchsende waren bei 10 der 22 Impflinge und bei 7 der 8 Kontrolltiere Krankheitsanzeichen erkennbar.

**Tabelle 14: Krankheitsanzeichen im Verlauf des Infektionsversuches**

Tage p. i.	Tiere gesamt		Tiere krank		Symptome
	I	K	I	K	
0	22	8	0	0	Keine
1	22	8	0	0	Keine
2	22	8	8	3	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
3	22	8	10	4	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
4	22	8	15	8	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
5	12	5	8	5	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
6	10	5	7	5	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
7	2	2	0	1	rasselnde Atemgeräusche

I = Impflinge (Impfung am 12.-14., Belastungsinfektion am 36.-38. Lebenstag)

K = Kontrolltiere (keine Impfung, Belastungsinfektion am 36.-38. Lebenstag)



**Tabelle 15: Krankheitssymptome der einzelnen Tiere am Versuchsende**

<b>Impfling Nr.</b>	<b>Tag p. i.</b>	<b>Symptome</b>	<b>Kontrolle Nr.</b>	<b>Tag p. i.</b>	<b>Symptome</b>
<b>I-1</b>	4	rasselnde Atmung	<b>K-1</b>	4	Atmung verschärft
<b>I-2</b>	4	Atmung verschärft	<b>K-2</b>	4	Atmung verschärft
<b>I-3</b>	4	Atmung verschärft	<b>K-3</b>	4	Atmung verschärft
<b>I-4</b>	4	o. b. B.	<b>K-4</b>	6	Atmung verschärft
<b>I-5</b>	4	rasselnde Atmung	<b>K-5</b>	6	Atmung verschärft
<b>I-6</b>	4	o. b. B.	<b>K-6</b>	6	rasselnde Atmung
<b>I-7</b>	4	Atmung verschärft	<b>K-7</b>	7	Atmung verschärft
<b>I-8</b>	4	rasselnde Atmung	<b>K-8</b>	7	o. b. B.
<b>I-9</b>	4	Atmung verschärft			
<b>I-10</b>	4	o. b. B.			
<b>I-11</b>	5	o. b. B.			
<b>I-12</b>	5	o. b. B.			
<b>I-13</b>	6	Atmung verschärft			
<b>I-14</b>	6	Atmung verschärft			
<b>I-15</b>	6	o. b. B.			
<b>I-16</b>	6	o. b. B.			
<b>I-17</b>	6	Atmung verschärft			
<b>I-18</b>	6	o. b. B.			
<b>I-19</b>	6	Atmung verschärft			
<b>I-20</b>	6	rasselnde Atmung			
<b>I-21</b>	7	o. b. B.			
<b>I-22</b>	7	o. b. B.			

o. b. B. = ohne besonderen Befund

#### 4. 2. 3 Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial

Im Luftröhrenmaterial sämtlicher Kontrolltiere konnten IB-Viren nachgewiesen werden.

Eine Virusanzüchtung gelang auch aus dem Probenmaterial fast aller Impflinge, nur in einem Fall wurde kein IBV nachgewiesen.

**Tabelle 16: Virusisolierung im Hühnerembryo (Teil 1: Kontrolltiere)**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>K-1</b>	3 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>K-2</b>	1 / 5	3	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>K-3</b>	1 / 4	3	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>K-4</b>	0 / 5	3	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>K-5</b>	2 / 5	3	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>K-6</b>	0 / 5	5	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>K-7</b>	2 / 5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>K-8</b>	1 / 4	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>

Legende:

x / y: von y 24 Stunden nach der Beimpfung lebenden Embryonen sind x  
während der folgenden 6 Tage abgestorben

IB + : erfolgreicher Nachweis von IBV (siehe 3. 3. 1)

IB - : kein IBV nachgewiesen

**Fortsetzung Tabelle 16: (Teil 2: Impflinge)**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>I-1</b>	2 / 4	0	4 / 5	0	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-2</b>	1 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-3</b>	2 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-4</b>	5 / 5	-	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-5</b>	1 / 5	3	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-6</b>	3 / 5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-7</b>	3 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-8</b>	2 / 5	3	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-9</b>	3 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-10</b>	3 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-11</b>	0 / 5	0	3 / 5	2	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-12</b>	0 / 5	0	4 / 5	1	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-13</b>	0 / 5	5	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-14</b>	2 / 5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-15</b>	2 / 5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-16</b>	2 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-17</b>	3 / 5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-18</b>	5 / 5	-	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-19</b>	2 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-20</b>	1 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-21</b>	0 / 5	0	4 / 5	0	-	-	<b>IB +</b>
<b>I-22</b>	0 / 5	0	4 / 5	1	-	-	<b>IB +</b>

Legende siehe vorige Seite.

#### 4. 2. 4 Ziliarreduktionstest

Im Ziliarreduktionstest wurde bei 7 von 8 nicht geimpften aber testinfizierten Kontrollküken ein vollständiges Sistieren der Zilienaktivität beobachtet. Bei einem Kontrolltier war die Flimmerbewegung des Epithels mit nur 12 Bewertungspunkten deutlich vermindert.

7 der 22 geimpften Tiere wurden mit deutlich über 20 Bewertungspunkten als frei von IB-spezifischen Veränderungen eingestuft. Von den übrigen Impfungen wurde bei 14 Tieren ein vollständiges Sistieren der Zilienaktivität beobachtet, bei einem Tier war eine geringe Zilienbewegung zu erkennen.

**Tabelle 17: Auswertung des Ziliarreduktionstests am 4.-7. Tag p. i.\***

(Teil 1: Kontrolltiere)

Tier Nr.	Punkte Trachealring Nr.										Punkte gesamt	Beur- teilung
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
<b>K - 1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>IB +</b>
<b>K - 2</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>IB +</b>
<b>K - 3</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>IB +</b>
<b>K - 4</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>IB +</b>
<b>K - 5</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>IB +</b>
<b>K - 6</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>IB +</b>
<b>K - 7</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>IB +</b>
<b>K - 8</b>	1	2	1	1	1	2	3	1	0	0	12	<b>IB +</b>

\* Genauer Untersuchungszeitpunkt der einzelnen Tiere: siehe Tabelle 15

Bewertungspunkte: 0 = keine Zilienaktivität

1 = 25 % Zilienaktivität      3 = 75 % Zilienaktivität

2 = 50 % Ziliaraktivität      4 = 100 % Zilienaktivität

IB + = IBV-bedingtes Sistieren / Verringerung der Zilienaktivität

IB - = kein Hinweis auf Infektiöse Bronchitis

**Fortsetzung Tabelle 17: (Teil 2: Impflinge)**

Tier Nr.	Punkte Trachealring Nr.										Punkte gesamt	Beur- teilung	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
I-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-6	4	3	2	2	3	3	3	4	2	3	29	IB -	
I-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-10	2	2	3	3	2	4	4	3	3	2	28	IB -	
I-11	0	0	0	1	2	1	2	0	1	1	8	IB +	
I-12	3	4	4	3	4	3	2	3	4	4	34	IB -	
I-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-15	3	3	4	4	3	4	3	3	2	3	32	IB -	
I-16	3	2	2	3	2	2	3	4	4	3	28	IB -	
I-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
I-21	4	3	3	4	3	4	3	3	4	2	33	IB -	
I-22	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40	IB -	

Legende siehe vorige Seite.

#### **4. 2. 5 Histologische Untersuchung**

Bei allen ungeimpften aber testinfizierten Kontrollküken konnten in der histologischen Untersuchung IB-typische Veränderungen der Trachealschleimhaut wie Zilien- oder Epithelverlust, Abflachung der Epithelzellen, zelluläre Infiltration der Lamina propria mucosae oder ein Ödem der Lamina submucosa nachgewiesen werden. Bei den beiden Tieren, die am 7. Tag p. i. untersucht wurden, waren als Zeichen einer beginnenden Regeneration des Epithels bereits wieder einzelne Kinozilien erkennbar.

In der Gruppe der geimpften Küken waren bei 7 der 22 Tiere histologisch nur leichte oder keine Entzündungsanzeichen in der Luftröhrenschleimhaut erkennbar. Die übrigen 15 Tiere zeigten deutliche Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis, die denen der Kontrolltiere entsprachen (Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Auswertung der histologischen Untersuchung  
(Teil 1: Impflinge)

Tier Nr.	Submuk. Ödem	zelluläre Infiltr.	Epithel	Beurteilung
I - 1	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 2	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 3	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 4	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 5	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 6	++	++	z.T. abgeflacht, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
I - 7	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 8	++	+	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 9	+	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 10	+	++	kubisch, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
I - 11	+	++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 12	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
I - 13	+++	+++	zum Teil abgeflacht, keine Zilien	<b>IB +</b>
I - 14	+++	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 15	++	+	kubisch, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
I - 16	+	++	kubisch, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
I - 17	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 18	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 19	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 20	++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
I - 21	+	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
I - 22	-	+	o. b. B.	<b>IB -</b>

**Fortsetzung Tabelle 18: (Teil 2: Kontrolltiere)**

<b>Tier Nr.</b>	<b>Submuk. Ödem</b>	<b>zelluläre Infiltr.</b>	<b>Epithel</b>	<b>Beurteilung</b>
<b>K - 1</b>	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
<b>K - 2</b>	+++	+	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
<b>K - 3</b>	+++	+++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
<b>K - 4</b>	+++	+++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
<b>K - 5</b>	+++	++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
<b>K - 6</b>	+++	+++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
<b>K - 7</b>	+	++	zum Teil kubisch, einige Zilien	<b>IB +</b>
<b>K - 8</b>	++	++	zum Teil kubisch, einige Zilien	<b>IB +</b>

Legende:

**Submuk. Ödem** = Ödembildung in der Lamina submucosa

**Zelluläre Infiltr.** = Infiltration der Lamina propria mit Entzündungszellen

**o. b. B.** = ohne besonderen Befund

+++ = hochgradig ausgeprägt                      ++ = mittelgradig ausgeprägt

+ = geringgradig ausgeprägt                      - = nicht vorhanden

**IB +** = die Trachea zeigt Anzeichen der Infektiösen Bronchitis

**IB -** = die Trachea zeigt keine Anzeichen der Infektiösen Bronchitis



#### **4. 2. 6 IB-Antikörpertiterbestimmung**

Von sämtlichen Impflingen wurden 24 Tage nach der Impfung, unmittelbar vor der Belastungsinfektion, Seren gewonnen und auf IBV-Antikörper untersucht. Eine zweite Blutentnahme zur Titerbestimmung wurde am Versuchsende durchgeführt.

Bei einer Untersuchung der Seren einzelner Hühnerküken vor der Impfung sowie einzelner nicht geimpfter Kontrolltiere vor der Belastungsinfektion lag kein meßbarer Antikörpertiter vor.

Bei 5 der 22 Hühnerküken konnten zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion meßbare IBV-Antikörpertiter ermittelt werden. Ein Titeranstieg während des Challenge war bei 4 Küken erkennbar, während bei einem Tier der Antikörpertiter bis zum Versuchsende fast unverändert blieb (Tab. 19).

Am Versuchsende war bei zwei nicht geimpften Kontrolltieren ein IBV-Antikörpertiter meßbar. Es handelte sich dabei um die am 7. Tag p. i. untersuchten Hühnerküken. Auch bei zwei Impflingen, die zu Challengebeginn keine meßbaren Antikörpertiter aufwiesen konnten am 6., bzw. 7. Tag p. i. IBV-Antikörper im Serum nachgewiesen werden.

**Tabelle 19: IBV-Antikörpertiter der Impflinge vor dem Challenge und bei Versuchsende**

<b>Impfling Nr.</b>	<b>Antikörper-Titer 1 (Log 10)</b>	<b>Antikörper-Titer 2 (Log 10)</b>	<b>Impfling Nr.</b>	<b>Antikörper-Titer 1 (Log 10)</b>	<b>Antikörper-Titer 2 (Log 10)</b>
<b>I - 1</b>	0	0	<b>I - 12</b>	3,72	4,07
<b>I - 2</b>	1,44	2,83	<b>I - 13</b>	0	0
<b>I - 3</b>	0	0	<b>I - 14</b>	0	0
<b>I - 4</b>	0	0	<b>I - 15</b>	0	1,62
<b>I - 5</b>	0	0	<b>I - 16</b>	0	0
<b>I - 6</b>	2,20	3,29	<b>I - 17</b>	0	0
<b>I - 7</b>	0	0	<b>I - 18</b>	0	0
<b>I - 8</b>	0	0	<b>I - 19</b>	0	0
<b>I - 9</b>	0	0	<b>I - 20</b>	0	0
<b>I - 10</b>	0	0	<b>I - 21</b>	1,44	3,78
<b>I - 11</b>	1,96	2,66	<b>I - 22</b>	0	3,25

- **Antikörpertiter 1:** Titer zu Challengebeginn
- **Antikörpertiter 2:** Titer am Versuchsende (Tag 4-7 p.i., siehe Tabelle 15)

#### 4. 2. 7 Vergleich der Ergebnisse aus der zweiten Wirksamkeitsprüfung

In den Tabellen 20 und 21 werden die Ergebnisse sämtlicher Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Infektiösen Bronchitis vergleichend dargestellt.

Bei den Kontrolltieren konnte in allen Tests das Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis nachgewiesen werden. Eines der 8 Hühnerküken zeigte allerdings keine klinischen Symptome der Erkrankung (Tabelle 20).

**Tabelle 20:** Vergleich der verschiedenen Testergebnisse bei den  
Kontrolltieren

Tier Nr.	Tage p.inf.	Klinische Symptome	Virus-Isolierung	ZRT	Histologie
K - 1	4	+	+	+	+
K - 2	4	+	+	+	+
K - 3	4	+	+	+	+
K - 4	6	+	+	+	+
K - 5	6	+	+	+	+
K - 6	6	+	+	+	+
K - 7	7	-	+	+	+
K - 8	7	+	+	+	+

#### Legende zu den Tabellen 20 und 21:

- + = Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis
- = keine Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis

Bei den Impfungen besteht auch in der zweiten Wirksamkeitsprüfung eine 100prozentige Übereinstimmung ( $r=1$ ) der Ergebnisse von histologischer Untersuchung und Ziliarreduktionstest. Alle Tiere, die klinische Symptome einer

infektiösen Bronchitis zeigten, wurden auch in diesen beiden Tests als IB-positiv bewertet, allerdings zeigten auch in dieser Wirksamkeitsprüfung 3 der in ZRT und Histologie als IB-positiv beurteilten Tiere keine erkennbaren klinischen Symptome.

Eine Virusisolierung gelang bei allen mit IB-Challengevirus infizierten Hühnerküken, unabhängig von ihrem Impfstatus.

Von den 5 Hühnerküken, die zu Challengebeginn einen meßbarem IBV-Antikörpertiter aufwiesen, wurden 3 Tiere in Histologie, ZRT und klinischer Untersuchung als IB-negativ beurteilt. Von den übrigen beiden Küken, wurde eines in allen oben genannten Untersuchungen als IB-positiv bewertet, das andere war in der klinischen Untersuchung unauffällig, histologisch und im ZRT jedoch IB-positiv.

Umgekehrt zeigten 4 Küken ohne meßbaren Antikörpertiter in ZRT, Histologie und klinischer Untersuchung keine Symptome einer Infektiösen Bronchitis, wobei ein Tier während des Challenge einen Antikörpertiter aufbaute (Tab.20).

**Da in allen Tests sämtliche Kontrolltiere Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis zeigten, wurde die Forderung des Arzneibuches, daß mindestens 80% der Kontrolltiere an IB erkranken müssen, auch in der zweiten Wirksamkeitsprüfung erfüllt.**

Von den Impfungen konnte bei 100% der Küken IBV isoliert werden. Klinische Symptome einer Infektiösen Bronchitis zeigten 54,4% der geimpften Tiere und 68% wurden in ZRT und Histologie als IB-positiv beurteilt.

**Demnach konnte auch bei der zweiten Wirksamkeitsprüfung in keiner der Untersuchungen die Anforderung des Arzneibuches erfüllt werden, daß höchstens 20% der geimpften Tiere an IB erkranken dürfen.**

**Tabelle 21:** Vergleich der verschiedenen Testergebnisse bei den Impfungen

<b>Tier Nr.</b>	<b>Tage p. i.</b>	<b>Klin. Sympt.</b>	<b>Virus- Isolierung</b>	<b>ZRT</b>	<b>Histo.</b>	<b>Antikörper- Titer 1</b>	<b>Antikörper- Titer 2</b>
I - 1	4	+	+	+	+	0	0
I - 2	4	+	+	+	+	1,44	2,83
I - 3	4	+	+	+	+	0	0
I - 4	4	-	+	+	+	0	0
I - 5	4	+	+	+	+	0	0
I - 6	4	-	+	-	-	2,20	3,29
I - 7	4	+	+	+	+	0	0
I - 8	4	+	+	+	+	0	0
I - 9	4	+	+	+	+	0	0
I-10	4	-	+	-	-	0	0
I-11	5	-	+	+	+	1,96	2,66
I-12	5	-	+	-	-	3,72	4,07
I-13	6	+	+	+	+	0	0
I-14	6	+	+	+	+	0	0
I-15	6	-	+	-	-	0	1,62
I-16	6	-	+	-	-	0	0
I-17	6	+	+	+	+	0	0
I-18	6	-	+	+	+	0	0
I-19	6	+	+	+	+	0	0
I-20	6	+	+	+	+	0	0
I-21	7	-	+	-	-	1,44	3,78
I-22	7	-	+	-	-	0	3,25

### 4.3 Dritte Wirksamkeitsprüfung nach DAB 10 / EAB 3

In dieser Wirksamkeitsprüfung wurden 2 Impfstoffe (IB H120 und IB H52) eines jordanischen Impfstoffherstellers getestet, wobei ausschließlich die Virusisolierung im Hühnerembryo zum Nachweis einer Erkrankung eingesetzt wurde.

#### 4.3.1 Ergebnis der Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei

Für den Jordanischen Impfstoff, Stamm **IB H120**, 2000 Dosen pro Abfüllung, aufgelöst in 10 ml PBS, wurde folgendes Titrationsergebnis ermittelt:

Verdünnungsstufe	Embryonen abgestorben	Embryonen mit IB-spezifischen Veränderungen	Gesamtmenge IBV-infizierter Embryonen
10 <sup>-3</sup>	7 / 7	-	7 / 7
10 <sup>-4</sup>	8 / 8	-	8 / 8
10 <sup>-5</sup>	9 / 9	-	9 / 9
10 <sup>-6</sup>	2 / 7	0	2 / 7
10 <sup>-7</sup>	3 / 10	0	3 / 10

Titrationsergebnis = 10<sup>4,4</sup> EID<sub>50</sub> pro Dosis

(gemäß Berechnung nach REED und MUENCH, 1938)

Deklariertes Mindestvirusgehalt pro Dosis = 10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub>

Für den zweiten Jordanischen Impfstoff, Stamm **IB H52**, 2000 Dosen pro Abfüllung, aufgelöst in 10 ml PBS, wurde folgendes Titrationsergebnis ermittelt:

<b>Verdünnungsstufe</b>	<b>Embryonen abgestorben</b>	<b>Embryonen mit IB-spezifischen Veränderungen</b>	<b>Gesamtmenge IBV-infizierter Embryonen</b>
10 <sup>-3</sup>	7 / 7	-	7 / 7
10 <sup>-4</sup>	8 / 8	-	8 / 8
10 <sup>-5</sup>	9 / 9	-	9 / 9
10 <sup>-6</sup>	2 / 7	0	7 / 11
10 <sup>-7</sup>	3 / 10	0	1 / 5

Titrationsergebnis = 10<sup>4,4</sup> EID<sub>50</sub> pro Dosis

(gemäß Berechnung nach REED und MUENCH, 1938)

Deklariertes Mindestvirusgehalt pro Dosis = 10<sup>3</sup> EID<sub>50</sub>

#### **4. 3. 2. Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial**

Im Luftröhrenmaterial sämtlicher Kontrolltiere konnten IBV-bedingte Veränderungen nachgewiesen werden.

Eine Virusanzüchtung gelang auch aus dem Probenmaterial von 12 der 20 mit IB H120- Impfstoff geimpften Tiere. Bei einem weiteren Tier war das Ergebnis der Virusisolierung nicht auswertbar.

Von den 20 mit IB H52-Impfstoff geimpften Hühnerküken gelang bei 14 Tieren die Virusisolierung, 2 Proben waren nicht auswertbar.

**Tabelle 22: Virusisolierung im Hühnerembryo (Teil 1: Impfinge IB H120)**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>I-1</b>	2 / 5	2					<b>IB +</b>
<b>I-2</b>	0 / 5	0	3 / 5	0			<b>IB +</b>
<b>I-3</b>	0 / 4	2					<b>IB +</b>
<b>I-4</b>	2 / 5	0	1 / 4	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-5</b>	3 / 5	2					<b>IB +</b>
<b>I-6</b>	1 / 5	0	1 / 5	2			<b>IB +</b>
<b>I-7</b>	0 / 5	0	3 / 4	1			<b>IB +</b>
<b>I-8</b>	0 / 5	0	1 / 5	3			<b>IB +</b>
<b>I-9</b>	1 / 5	0	0 / 4	0	1 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-10</b>	0 / 5	0	2 / 5	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-11</b>	0 / 5	4					<b>IB +</b>
<b>I-12</b>	0 / 5	0	1 / 4	0	1 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-13</b>	0 / 5	1					<b>IB +</b>
<b>I-14</b>	0 / 5	3					<b>IB +</b>
<b>I-15</b>	0 / 5	4					<b>IB +</b>
<b>I-16</b>	1 / 5	0	0 / 3	0			<b>n.a.</b>
<b>I-17</b>	0 / 5	0	0 / 5	1			<b>IB +</b>
<b>I-18</b>	1 / 5	0	0 / 5	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-19</b>	1 / 5	0	0 / 5	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-20</b>	1 / 4	0	0 / 5	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>



**Fortsetzung Tabelle 22: (Teil 2: Impflinge IB H52)**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>I-1</b>	1 / 5	0					<b>IB +</b>
<b>I-2</b>	0 / 5	0	1 / 3	0			<b>n. a.</b>
<b>I-3</b>	0 / 1	1					<b>IB +</b>
<b>I-4</b>	0 / 4	1					<b>IB +</b>
<b>I-5</b>	1 / 4	1					<b>IB +</b>
<b>I-6</b>	0 / 5	0	0 / 5	0	1 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-7</b>	0 / 5	0	1 / 3	0			<b>n. a.</b>
<b>I-8</b>	0 / 4	0	0 / 5	1			<b>IB +</b>
<b>I-9</b>	1 / 5	0	0 / 5	1			<b>IB +</b>
<b>I-10</b>	0 / 5	1					<b>IB +</b>
<b>I-11</b>	1 / 4	1					<b>IB +</b>
<b>I-12</b>	0 / 4	0	1 / 5	1			<b>IB +</b>
<b>I-13</b>	0 / 5	2					<b>IB +</b>
<b>I-14</b>	0 / 5	0	0 / 5	2			<b>IB +</b>
<b>I-15</b>	0 / 5	0	0 / 5	0	1 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-16</b>	0 / 5	0	2 / 4	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-17</b>	0 / 5	0	0 / 5	2			<b>IB +</b>
<b>I-18</b>	1 / 5	0	0 / 5	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>I-19</b>	0 / 5	0	0 / 4	2			<b>IB +</b>
<b>I-20</b>	1 / 5	0	0 / 4	0	1 / 5	1	<b>IB +</b>

**Fortsetzung Tabelle 22: (Teil 3: Kontrolltiere)**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>K-1</b>	3 / 5	2					<b>IB +</b>
<b>K-2</b>	2 / 5	3					<b>IB +</b>
<b>K-3</b>	4 / 5	1					<b>IB +</b>
<b>K-4</b>	1 / 5	4					<b>IB +</b>
<b>K-5</b>	3 / 5	2					<b>IB +</b>
<b>K-6</b>	0 / 5	5					<b>IB +</b>
<b>K-7</b>	1 / 5	4					<b>IB +</b>
<b>K-8</b>	3 / 5	2					<b>IB +</b>
<b>K-9</b>	5 / 5						<b>IB +</b>
<b>K-10</b>	3 / 5	1					<b>IB +</b>

Legende:

**x / y:** von y 24 Stunden nach der Beimpfung lebenden Embryonen sind x  
während der folgenden 6 Tage abgestorben

**IB + :** erfolgreicher Nachweis von IBV

**IB - :** kein IBV nachgewiesen

**n.a.:** nicht auswertbar, da mehr als 1 Embryo innerhalb der ersten 24 Stunden  
abgestorben ist

**Auch in der dritten Wirksamkeitsprüfung zeigten sämtliche Kontrolltiere Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis, so daß auch hier die Forderung des Arzneibuches, das mindestens 80% der Kontrolltiere an IB erkranken müssen, erfüllt wurde.**

Von den mit dem Stamm IB H120 geimpften Hühnerküken konnte bei 60% der Tiere IBV isoliert werden, nach Impfung mit dem Stamm IB H52 gelang eine Virusisolierung bei 70% der Tiere.

**Es konnte also auch bei der dritten Wirksamkeitsprüfung für keinen der getesteten Impfstoffe die Anforderung des Arzneibuches erfüllt werden, das höchstens 20% der geimpften Tiere an IB erkranken dürfen.**

## **4. 4 Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der experimentellen IBV-Infektion**

### **4. 4. 1 Zeitlicher Verlauf der experimentellen IBV-Infektion empfänglicher Hühnerküken**

Die Untersuchung zum zeitlichen Verlauf der IB-Infektion bei empfänglichen Hühnerküken umfaßt folgende Schritte:

- 11) Belastungsinfektion von 24 nicht geimpften SPF-Hühnerküken im Alter von 36-38 Tagen mit dem Challengevirus M41 (je  $10^3$  EID<sub>50</sub>, intratracheal).
- 12) Beurteilung der Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuchs (4.4.1.1).
- 13) Beurteilung der Krankheitssymptome bei den einzelnen Hühnerküken unmittelbar vor ihrer Tötung zur weiteren Untersuchung (4.4.1.1).
- 14) Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial (4.4.1.2).
- 15) Beurteilung der Tracheen im Ziliarreduktionstest (4.4.1.3).
- 16) Histologische Beurteilung der Tracheen (4.4.1.4).
- 17) Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Testergebnisse (4.4.1.5).

#### **4. 4. 1. 1 Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches**

Die während des Infektionsversuches bei den Küken auftretenden klinischen Symptome bestanden in häufigem Niesen, verschärften bis hin zu deutlich rasselnden Atemgeräuschen und leicht verminderter Futter- und Trinkwasseraufnahme. Es traten keine Todesfälle auf.

Insgesamt konnten ab dem 3. Tag p.i. Symptome einer infektiösen Bronchitis beobachtet werden, wobei zunächst etwa die Hälfte der Tiere Krankheitsanzeichen zeigten. Vom vierten bis zum siebten Tag p. i. zeigten sämtliche Küken Krankheitsanzeichen, danach nahm die Anzahl der erkrankten Hühnerküken ab. Am 14. Tag konnten Krankheitssymptome bei keinem Küken mehr beobachtet werden.

**Tabelle 23: Krankheitsanzeichen im Verlauf des Infektionsversuches**

<b>Tage p. i.</b>	<b>Tiere gesamt</b>	<b>Tiere krank</b>	<b>Symptome</b>
0	24	0	keine
1	24	0	keine
2	24	0	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
3	22	11	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
4	20	20	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
5	18	18	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
6	14	14	Niesen, rasselnde Atemgeräusche
7	10	7	verschärfte Atmung bis Rasseln
10	6	4	Atmung leicht bis deutl. verschärft
12	4	2	Atmung leicht verschärft
14	2	0	keine

Vom 3. bis zum 12.Tag p. i. waren bei 18 der 20 Hühnerküken unmittelbar vor ihrer Tötung zur weiteren Untersuchung Krankheitsanzeichen erkennbar, am 2. und 14. Tag p. i. waren bei keinem Tier Symptome zu beobachten.

**Tabelle 24: Krankheitssymptome der einzelnen Tiere unmittelbar vor ihrer Tötung zur weiteren Untersuchung**

Tier Nr.	Tag p. i.	Symptome	Tier Nr.	Tag p. i.	Symptome
1	2	o. b. B.	13	6	Atmung verschärft
2	2	o. b. B.	14	6	Atmung verschärft
3	3	Atmung verschärft	15	7	rasselnde Atmung
4	3	rasselnde Atmung	16	7	rasselnde Atmung
5	4	rasselnde Atmung	17	7	Atmung verschärft
6	4	rasselnde Atmung	18	7	rasselnde Atmung
7	5	rasselnde Atmung	19	10	Atmung verschärft
8	5	rasselnde Atmung	20	10	leichtes Atemger.
9	5	rasselnde Atmung	21	12	Atmung verschärft
10	5	Atmung verschärft	22	12	o. b. B.
11	6	o. b. B.	23	14	o. b. B.
12	6	rasselnde Atmung	24	14	o. b. B.

#### 4. 4. 1. 2 Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial

Vom 2. bis zum 7. Tag p. i. konnten im Luftröhrenmaterial sämtlicher infizierter Hühnerküken IB-Viren nachgewiesen werden. Am 10. und 12. Tag p. i. war jeweils bei einem der beiden untersuchten Tiere IBV nachweisbar, am 14. Tag konnte kein IBV mehr angezüchtet werden (Tabelle 25).

**Tabelle 25: Virusisolierung im Hühnerembryo**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
1	4 / 4	-	-	-	-	-	IB +
2	3 / 4	1	-	-	-	-	IB +
3	4 / 4	-	-	-	-	-	IB +
4	4 / 4	-	-	-	-	-	IB +
5	5 / 5	-	-	-	-	-	IB +
6	4 / 4	-	-	-	-	-	IB +
7	4 / 4	-	-	-	-	-	IB +
8	5 / 5	-	-	-	-	-	IB +
9	4 / 5	0	-	-	-	-	IB +
10	4 / 5	0	-	-	-	-	IB +
11	3 / 5	0	3 / 4	1	-	-	IB +
12	5 / 5	-	-	-	-	-	IB +
13	2 / 5	0	4 / 4	-	-	-	IB +
14	1 / 5	2	2 / 5	2	4 / 4	-	IB +
15	2 / 4	0	3 / 4	1	-	-	IB +
16	5 / 5	-	-	-	-	-	IB +
17	4 / 4	-	-	-	-	-	IB +
18	5 / 5	-	-	-	-	-	IB +
19	1 / 5	0	1 / 5	0	2 / 5	0	IB -
20	1 / 5	0	3 / 5	0	2 / 5	1	IB +
21	0 / 5	0	1 / 4	0	4 / 5	0	IB +
22	0 / 5	0	0 / 4	0	1 / 4	0	IB -
23	0 / 5	0	0 / 5	0	1 / 5	0	IB -
24	1 / 4	0	0 / 4	0	2 / 5	0	IB -

**Legende zu Tabelle 25:**

x / y: von y 24 Stunden nach der Beimpfung lebenden Embryonen sind x  
während der folgenden 6 Tage abgestorben

IB + : erfolgreicher Nachweis von IBV (siehe 3. 3. 1)

IB - : kein IBV nachgewiesen

**4. 4. 1. 3 Ziliarreduktionstest**

Im Ziliarreduktionstest wurde vom 2. bis zum 7. Tag p. i. bei sämtlichen Hühnerküken ein vollständiges Sistieren der Zilienaktivität beobachtet. Ab dem 10. Tag p. i. war eine vollständige Regeneration des Epithels erkennbar (Tabelle 26).

**Legende zu Tabelle 26:**

Bewertungspunkte: 0 = keine Zilienaktivität

1 = 25 % Zilienaktivität

2 = 50 % Ziliaraktivität

3 = 75 % Zilienaktivität

4 = 100 % Zilienaktivität

IB + = IBV-bedingtes Sistieren / Verringerung der Zilienaktivität

IB - = kein Hinweis auf Infektiöse Bronchitis





#### 4. 4. 1. 4 Histologische Untersuchung

Vom 2. bis zum 7. Tag p. i. konnten bei allen Hühnerküken in der histologischen Untersuchung IB-typische Veränderungen der Trachealschleimhaut wie Zilien- oder Epithelverlust, Abflachung der Epithelzellen, zelluläre Infiltration der Lamina propria mucosae oder ein Ödem der Lamina submucosa nachgewiesen werden. Ab dem 10. Tag p. i. war als Zeichen der Epithelregeneration wieder ein durchgehender Kinozilienbesatz zu beobachten. Eine mindestens geringgradige zelluläre Infiltration war bis zum Ende des Versuchs erkennbar (Tabelle 27).

#### Legende zu Tabelle 27:

**Submuk. Ödem** = Ödembildung in der Lamina submucosa

**Zelluläre Infiltr.** = Infiltration der Lamina propria mit Entzündungszellen

**o. b. B.** = ohne pathologischen Befund

**+++** = hochgradig ausgeprägt

**++** = mittelgradig ausgeprägt

**+** = geringgradig ausgeprägt

**-** = nicht vorhanden

**IB +** = die Trachea zeigt Anzeichen der Infektiösen Bronchitis

**IB -** = die Trachea zeigt keine Anzeichen der Infektiösen Bronchitis

**Tabelle 27:** Auswertung der histologischen Untersuchung

<b>Tier Nr.</b>	<b>Tage p. i.</b>	<b>Submuk. Ödem</b>	<b>Zelluläre Infiltr.</b>	<b>Epithel</b>	<b>Gesamt -urteil</b>
1	2	++	++	abgeflacht, keine Zilien	<b>IB +</b>
2	2	+++	+	abgeflacht, keine Zilien	<b>IB +</b>
3	3	+++	+++	abgeflacht, keine Zilien	<b>IB +</b>
4	3	+++	+	abgeflacht, keine Zilien	<b>IB +</b>
5	4	++	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
6	4	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
7	5	+	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
8	5	-	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
9	5	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
10	5	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
11	6	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
12	6	-	+++	proliferiert, Zilien nicht vorh.	<b>IB +</b>
13	6	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
14	6	-	+++	Epithel nicht mehr erkennbar	<b>IB +</b>
15	7	-	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
16	7	-	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
17	7	-	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
18	7	+	+++	Epithel nicht mehr erkennbar	<b>IB +</b>
19	10	-	++	o. b. B.	<b>IB -</b>
20	10	-	++	o. b. B.	<b>IB -</b>
21	12	-	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
22	12	-	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
23	14	-	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
24	14	-	+	o. b. B.	<b>IB -</b>

#### **4. 4. 1. 5 Vergleich der Ergebnisse aus der Verlaufsuntersuchung empfänglicher Tiere**

In Tabelle 28 und Abb. 7 werden die Ergebnisse sämtlicher Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Infektiösen Bronchitis vergleichend dargestellt.

In ZRT, Virusisolierung und histologischer Untersuchung kann vom 2. bis zum 7. Tag p. i. übereinstimmend das Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis nachgewiesen werden. In der klinischen Untersuchung sind am 2. Tag p. i. bei keinem Tier Symptome erkennbar, danach zeigt bis zum 10. Tag nur ein Küken unmittelbar vor der Tötung zur weiteren Untersuchung keine Krankheitsanzeichen.

Ab dem 10. Tag p. i. ist in ZRT und Histologie kein IB-Nachweis mehr möglich. Am 10. und 12. Tag kann bei der Hälfte der Tiere noch IBV im Hühnerembryo isoliert werden, klinische Symptome sind noch bis zum 12. Tag zu beobachten. Ab dem 14. Tag p. i. sind alle Untersuchungsmethoden IB-negativ.

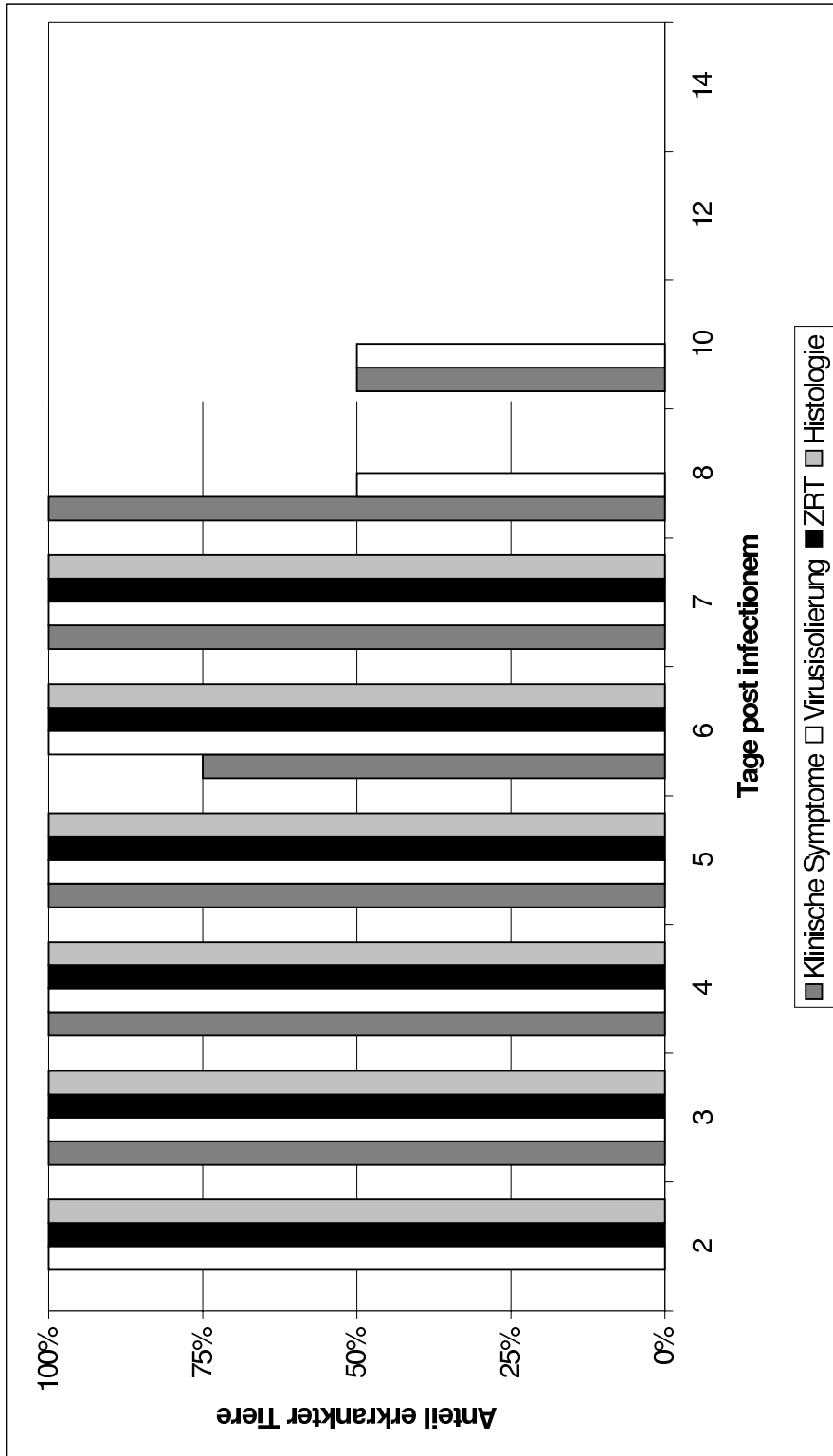
#### **Legende zu Tabelle 28:**

+ = Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis

- = keine Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis

**Tabelle 28:** Vergleich der verschiedenen Testergebnisse

<b>Tier Nr.</b>	<b>Tage p. i.</b>	<b>Klinische Symptome</b>	<b>Virus-Isolierung</b>	<b>ZRT</b>	<b>Histologie</b>
1	2	-	+	+	+
2	2	-	+	+	+
3	3	+	+	+	+
4	3	+	+	+	+
5	4	+	+	+	+
6	4	+	+	+	+
7	5	+	+	+	+
8	5	+	+	+	+
9	5	+	+	+	+
10	5	+	+	+	+
11	6	-	+	+	+
12	6	+	+	+	+
13	6	+	+	+	+
14	6	+	+	+	+
15	7	+	+	+	+
16	7	+	+	+	+
17	7	+	+	+	+
18	7	+	+	+	+
19	10	+	-	-	-
20	10	+	+	-	-
21	12	+	+	-	-
22	12	-	-	-	-
23	14	-	-	-	-
24	14	-	-	-	-



**Abbildung 7:** Vergleich verschiedener Testergebnisse zum Krankheitsverlauf empfänglicher Hühner

#### 4. 4. 2 Zeitlicher Verlauf der experimentellen IBV-Infektion nach erfolgter Impfung mit Nobilis IB H120

Die Untersuchung zum zeitlichen Verlauf der IB-Infektion bei geimpften Hühnerküken umfaßt folgende Schritte:

- 1) Impfung von 34 Hühnerküken im Alter von 12-14 Tagen mit Nobilis IB H120 (je  $10^3$  EID<sub>50</sub> per eyedrop).\*
- 2) Belastungsinfektion der geimpften Hühnerküken sowie von 12 nicht geimpften Kontrolltieren gleichen Alters mit dem Challengevirus M41 (je  $10_3$  EID<sub>50</sub>, intratracheal), 24 Tage nach der Impfung.\*
- 3) Beurteilung der Krankheitsanzeichen bei Impflingen und Kontrolltieren während des Infektionsversuchs (4.4.2.1).
- 4) Untersuchung der geimpften Tiere: Es wurden je 2 Küken an den Tagen 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12 und 14 p.i. untersucht, 10 Küken am Tag 4 p.i. und 8 Küken am Tag 6 p. i.
- 5) Untersuchung der nicht geimpften Kontrolltiere: Es wurden an den Tagen 2, 7 und 10 p. i. je 2 Küken untersucht und an den Tagen 4 und 6 p. i. je 3 Küken.
- 6) Beurteilung der Krankheitssymptome bei den einzelnen Hühnerküken unmittelbar vor ihrer Tötung zur weiteren Untersuchung (4.4.2.1).
- 7) Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial (4.4.2.2).
- 8) Beurteilung der Tracheen im Ziliarreduktionstest (4.4.2.3).
- 9) Histologische Beurteilung der Tracheen (4.4.2.4).
- 10) Bestimmung des Antikörpertiters bei den geimpften Tieren vor Challengebeginn und vor ihrer Tötung zur weiteren Untersuchung (4.4.2.5).
- 11) Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Testergebnisse (4.4.2.6).

\* Für die Untersuchungen an den Tagen 4-7 werden die Impflinge und Kontrolltiere aus der 2. Wirksamkeitsprüfung (Kap. 4.2) verwendet.

#### **4. 4. 2. 1 Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches**

Die während des Infektionsversuches bei den geimpften Hühnerküken auftretenden klinischen Symptome bestanden in häufigem Niesen, verschärften bis hin zu deutlich rasselnden Atemgeräuschen und leicht verminderter Futter- und Trinkwasseraufnahme. Es traten keine Todesfälle auf.

Die Krankheitsanzeichen konnten ab dem 2. Tag p. i. sowohl bei den Impfungen als auch bei den nicht geimpften aber infizierten Kontrolltieren beobachtet werden, wobei vom 4. bis zum 6. Tag p. i. sämtliche Kontrolltiere Symptome zeigten, während von den Impfungen etwa 70% der Küken Erkrankungsanzeichen aufwiesen.

Vom 7. Tag an nahm die Anzahl erkrankter Tiere bei Impfungen und Kontrollküken ab, und am 10. Tag p. i. waren sowohl bei den Impfungen als auch bei den Kontrolltieren keine Krankheitssymptome mehr erkennbar (Tabelle 29).

Vom 2. bis zum 6. Tag p. i. waren bei sämtlichen Kontrollküken unmittelbar vor ihrer Tötung zur weiteren Untersuchung Krankheitsanzeichen erkennbar, am 7. Tag p. i. zeigte eines der beiden untersuchten Hühnerküken Krankheitssymptome, danach waren bei keinem Tier mehr Symptome zu beobachten.

Von den geimpften Küken waren vom 3. bis zum 6. Tag p. i. bei 16 der 24 Tiere Krankheitssymptome erkennbar. Davor und danach waren alle Küken in der klinischen Untersuchung unauffällig (Tabelle 30).



**Tabelle 29: Krankheitsanzeichen im Verlauf des Infektionsversuches**

Tage p. i.	Tiere gesamt		Tiere krank		Symptome
	I	K	I	K	
0	34	12	0	0	keine
1	34	12	0	0	keine
2	34	12	11	4	Niesen, verschärftes bis rasselndes Atemg.
3	32	10	15	7	Niesen, verschärftes bis rasselndes Atemg.
4	30	10	21	10	Niesen, verschärftes bis rasselndes Atemg.
5	20	7	14	7	Niesen, verschärftes bis rasselndes Atemg.
6	18	7	12	7	verschärftes bis rasselndes Atemgeräusch
7	10	4	2	1	verschärftes Atemgeräusch
8	8	2	1	0	verschärftes Atemgeräusch
10	6	2	0	0	verschärftes Atemgeräusch
12	4	0	0	-	keine
14	2	0	0	-	keine

**Tabelle 30: Krankheitssymptome der einzelnen Tiere unmittelbar vor ihrer Tötung zur weiteren Untersuchung (Teil 1: Kontrolltiere)**

Tier Nr.	Tag p. i.	Symptome	Tier Nr.	Tag p. i.	Symptome
K 1	2	rasselnde Atmung	K 7	6	Atmung verschärft
K 2	2	Atmung verschärft	K 8	6	rasselnde Atmung
K 3	4	Atmung verschärft	K 9	7	Atmung verschärft
K 4	4	Atmung verschärft	K 10	7	o. b. B.
K 5	4	Atmung verschärft	K 11	10	o. b. B.
K 6	6	Atmung verschärft	K 12	10	o. b. B.

**Fortsetzung Tabelle 30: (Teil 2: Impflinge)**

<b>Tier Nr.</b>	<b>Tag p. i.</b>	<b>Symptome</b>	<b>Tier Nr.</b>	<b>Tag p. i.</b>	<b>Symptome</b>
<b>1</b>	2	o. b. B.	<b>18</b>	6	Atmung verschärft
<b>2</b>	2	o. b. B.	<b>19</b>	6	o. b. B.
<b>3</b>	3	Atmung verschärft	<b>20</b>	6	Atmung verschärft
<b>4</b>	3	o. b. B.	<b>21</b>	6	o. b. B.
<b>5</b>	4	rasselnde Atmung	<b>22</b>	6	o. b. B.
<b>6</b>	4	Atmung verschärft	<b>23</b>	6	Atmung verschärft
<b>7</b>	4	Atmung verschärft	<b>24</b>	6	rasselnde Atmung
<b>8</b>	4	o. b. B.	<b>25</b>	7	o. b. B.
<b>9</b>	4	rasselnde Atmung	<b>26</b>	7	o. b. B.
<b>10</b>	4	o. b. B.	<b>27</b>	8	o. b. B.
<b>11</b>	4	Atmung verschärft	<b>28</b>	8	o. b. B.
<b>12</b>	4	rasselnde Atmung	<b>29</b>	10	o. b. B.
<b>13</b>	4	o. b. B.	<b>30</b>	10	o. b. B.
<b>14</b>	4	Atmung verschärft	<b>31</b>	12	o. p. B.
<b>15</b>	5	Atmung verschärft	<b>32</b>	12	o. b. B.
<b>16</b>	5	o. b. B.	<b>33</b>	14	o. b. B.
<b>17</b>	6	Atmung verschärft	<b>34</b>	14	o. b. B.

#### 4. 4. 2. 2 Virusisolierung im Hühnerembryo

Vom 2. bis zum 7. Tag p. i. konnten im Luftröhrenmaterial sämtlicher Impflinge IB-Viren nachgewiesen werden. Am 10. und 12. Tag p. i. war jeweils bei einem der beiden Tiere IBV nachweisbar, am 14. Tag konnte kein IBV mehr angezüchtet werden.

Bei sämtlichen Kontrollküken konnte IBV im Luftröhrenmaterial nachgewiesen werden, wobei die letzten Tiere am 10. Tag p. i. untersucht wurden (Tabelle 31).

#### 4. 4. 2. 3 Ziliarreduktionstest

Im Ziliarreduktionstest wurde vom 2. bis zum 7. Tag p. i. bei sämtlichen Kontrollküken ein vollständiges Sistieren der Zilienaktivität beobachtet. Ab dem 10. Tag p. i. war eine Regeneration des Epithels mit kaum noch eingeschränkter Zilienaktivität erkennbar.

Vom 2. bis zum 6. Tag p. i. wurde bei 18 der 24 Impflinge ein Sistieren der Zilienbeweglichkeit beobachtet. Am 7. Tag p. i. war bei allen geimpften Küken die Zilienaktivität wieder weitgehend erhalten (Tabelle 32).

#### Legende zu Tabelle 31:

x / y = von y 24 Stunden nach der Beimpfung lebenden Embryonen sind x während der folgenden 6 Tage abgestorben

IB + = erfolgreicher Nachweis von IBV (siehe 3. 3. 1)

IB - = kein IBV nachgewiesen

**Tabelle 31: Virusisolierung im Hühnerembryo**

	<b>1. Beimpfung:</b>		<b>2. Beimpfung:</b>		<b>3. Beimpfung:</b>		
<b>Tier Nr.</b>	Embr. abgestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. abgestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. abgestorben	Embr. mit Läsionen	<b>Beurteilung</b>
<b>Impflinge</b>							
<b>1</b>	2/4	0	4/5	1	-	-	<b>IB +</b>
<b>2</b>	5/5	-	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>3</b>	2/5	0	5/5	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>4</b>	5/5	-	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>5</b>	2/4	0	4/5	0	-	-	<b>IB +</b>
<b>6</b>	1/5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>7</b>	2/5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>8</b>	5/5	-	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>9</b>	1/5	3	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>10</b>	3/5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>11</b>	3/5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>12</b>	2/5	3	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>13</b>	3/5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>14</b>	3/5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>15</b>	0/5	0	3/5	2	-	-	<b>IB +</b>
<b>16</b>	0/5	0	4/5	1	-	-	<b>IB +</b>
<b>17</b>	0/5	5	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>18</b>	2/5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>19</b>	2/5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>20</b>	2/5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>21</b>	3/5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>22</b>	5/5	-	-	-	-	-	<b>IB +</b>
<b>23</b>	2/5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>

**Fortsetzung Tabelle 31: Virusisolierung im Hühnerembryo**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beurteilung
	Embr. abgestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. abgestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. abgestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>Impflinge Fortsetzung</b>							
24	1/5	2	-	-	-	-	IB +
25	0/5	0	4/5	0	-	-	IB +
26	0/5	0	4/5	1	-	-	IB +
27	0/4	0	3/5	2	-	-	IB +
28	0/5	0	0/5	0	4/5	1	IB +
29	0/5	0	4/5	0	-	-	IB +
30	0/5	0	0/5	0	0/5	0	IB -
31	0/5	0	0/5	0	1/5	0	IB -
32	0/5	2	-	-	-	-	IB +
33	0/5	0	0/5	0	1/5	0	IB -
34	0/5	0	2/5	0	2/4	0	IB -
<b>Kontrolltiere</b>							
K 1	1/5	3	-	-	-	-	IB +
K 2	1/5	2	-	-	-	-	IB +
K 3	3/5	2	-	-	-	-	IB +
K 4	1/5	3	-	-	-	-	IB +
K 5	1/4	3	-	-	-	-	IB +
K 6	0/5	3	-	-	-	-	IB +
K 7	2/5	3	-	-	-	-	IB +
K 8	0/5	5	-	-	-	-	IB +
K 9	2/5	1	-	-	-	-	IB +
K 10	1/4	1	-	-	-	-	IB +
K 11	0/5	1	-	-	-	-	IB +
K 12	0/5	2	-	-	-	-	IB +



**Fortsetzung Tabelle 32: Auswertung des Ziliarreduktionstests**

Tier Nr.	Tage p. i.	Punkte Trachealring Nr.										Punkte gesamt	Beur- teilung
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
<b>Impflinge</b>													
25	7	4	3	3	4	3	4	3	3	4	2	33	IB -
26	7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40	IB -
27	8	4	3	4	4	3	3	2	4	3	3	33	IB -
28	8	4	2	4	4	4	4	3	4	4	4	37	IB -
29	10	3	4	4	3	2	4	3	3	2	2	30	IB -
30	10	4	4	3	3	3	4	4	4	4	4	37	IB -
31	12	3	3	3	4	4	4	3	3	4	3	34	IB -
32	12	4	4	3	4	4	4	3	4	4	3	37	IB -
33	14	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	39	IB -
34	14	4	4	4	4	3	3	3	4	3	4	36	IB -
<b>Kontrolltiere</b>													
K 1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
K 2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
K 3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
K 4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
K 5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
K 6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
K 7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
K 8	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
K 9	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	IB +
K 10	7	1	2	1	1	1	2	3	1	0	0	12	IB +
K 11	10	4	3	1	2	3	3	3	4	4	4	31	IB -
K 12	10	2	1	3	3	3	3	3	4	2	3	27	IB -

**Legende zu Tabelle 32:**

Bewertungspunkte: 0 = keine Zilienaktivität

1 = 25 % Zilienaktivität      3 = 75 % Zilienaktivität

2 = 50 % Ziliaraktivität      4 = 100 % Zilienaktivität

**IB +** = IBV-bedingtes Sistieren / Verringerung der Zilienaktivität**IB -** = kein Hinweis auf Infektiöse Bronchitis**4. 4. 2. 4. Histologische Untersuchung**

Ebenso wie im Ziliarreduktionstest konnten auch in der histologischen Untersuchung bei allen Kontrollküken vom 2. bis zum 7. Tag p. i. IB-typische Veränderungen der Trachealschleimhaut wie Zilien- oder Epithelverlust, Abflachung der Epithelzellen, zelluläre Infiltration der Lamina propria mucosae oder ein Ödem der Lamina submucosa nachgewiesen werden. Am 10. Tag p. i. war als Zeichen der Epithelregeneration wieder ein durchgehender Kinozilienbesatz zu beobachten..

Vom 2. bis zum 6. Tag p. i. wurden bei 18 der 24 Tiere histologische Veränderungen der Luftröhrenschleimhaut beobachtet. Ab dem 7. Tag p. i. war bei allen Hühnerküken eine deutliche Regeneration des Epithels erkennbar (Tabelle 33).

**Legende zu Tabelle 33:****Submuk. Ödem** = Ödembildung in der Lamina submucosa**Zelluläre Infiltr.** = Infiltration der Lamina propria mit Entzündungszellen**o. b. B.** = ohne besonderen Befund

+++ = hochgradig ausgeprägt      + = geringgradig ausgeprägt

++ = mittelgradig ausgeprägt      - = nicht vorhanden

**IB +** = die Trachea zeigt Anzeichen der Infektiösen Bronchitis**IB -** = die Trachea zeigt keine Anzeichen der Infektiösen Bronchitis



**Tabelle 33: Auswertung der histologischen Untersuchung**

Tier Nr.	Tage p. i.	Submuk. Ödem	Zelluläre Infiltr.	Epithel	Gesamt -urteil
<b>Impflinge</b>					
1	2	+	+	vermehrt Schleimzellen, Zil. o.B.	<b>IB -</b>
2	2	+++	++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
3	3	+++	+++	zum Teil kubisch, einige Zilien	<b>IB +</b>
4	3	+++	+++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
5	4	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
6	4	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
7	4	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
8	4	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
9	4	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
10	4	++	++	z.T. abgeflacht, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
11	4	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
12	4	++	+	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
13	4	+	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
14	4	+	++	kubisch, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
15	5	+	++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
16	5	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
17	6	+++	+++	zum Teil abgeflacht, keine Zilien	<b>IB +</b>
18	6	+++	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
19	6	++	+	kubisch, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
20	6	+	++	kubisch, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
21	6	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
22	6	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
23	6	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
24	6	++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>

**Fortsetzung Tabelle 33: Auswertung der histologischen Untersuchung**

Tier Nr.	Tage p. i.	Submuk. Ödem	Zelluläre Infiltr.	Epithel	Gesamt -urteil
<b>Impflinge</b>					
25	7	+	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
26	7	-	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
27	8	+	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
28	8	+	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
29	10	+	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
30	10	+	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
31	12	-	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
32	12	+	+	o. b. B.	<b>IB -</b>
33	14	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
34	14	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>Kontrolltiere</b>					
K 1	2	+++	++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
K 2	2	+++	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
K 3	4	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
K 4	4	+++	+	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
K 5	4	+++	+++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
K 6	6	+++	+++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
K 7	6	+++	++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
K 8	6	+++	+++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
K 9	7	+	++	zum Teil kubisch, einige Zilien	<b>IB +</b>
K 10	7	++	++	zum Teil kubisch, einige Zilien	<b>IB +</b>
K 11	10	+	++	o. b. B.	<b>IB -</b>
K 12	10	-	+	o. b. B.	<b>IB -</b>

#### 4. 4. 2. 5. IBV-Antikörpertiterbestimmung

Von sämtlichen Impfungen wurde 24 Tage nach der Impfung, unmittelbar vor der Belastungsinfektion, Serum gewonnen und auf IBV-Antikörper untersucht. Eine zweite Blutentnahme zur Titerbestimmung wurde vor dem Töten der Tiere durchgeführt.

Bei der Untersuchung von Seren einzelner Hühnerküken vor der Impfung sowie einzelner nicht geimpfter Kontrolltiere vor der Belastungsinfektion lag kein meßbarer Antikörpertiter vor.

Bei 13 der 34 geimpften Küken konnten zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion meßbare IBV-Antikörpertiter ermittelt werden. Ein Titeranstieg während des Challenge war bei 11 Küken erkennbar, während bei zwei Tieren der Antikörpertiter bei der 2. Bestimmung praktisch unverändert war oder leicht abfiel. Vom 7. Tag p. i. an konnten bei sämtlichen Impfungen und Kontrolltieren deutliche IBV-Antikörpertiter gemessen werden (Tabelle 34).

**Tabelle 34: IBV-Antikörpertiter vor dem Challenge und vor zum Zeitpunkt der Untersuchung.(Teil 1: Kontrolltiere)**

Tier Nr.	Antikörper-Titer 1 (Log 10)	Antikörper-Titer 2 (Log 10)	Tier Nr.	Antikörper-Titer 1 (Log 10)	Antikörper-Titer 2 (Log 10)
K 1	0	0	K 7	-	0
K 2	0	0	K 8	-	0
K 3	-*	0	K 9	-	3,28
K 4	-	0	K 10	-	3,66
K 5	-	0	K 11	0	4,90
K 6	-	0	K 12	0	3,82

\* Titerbestimmung ungeimpfter Kontrolltiere vor dem Challenge nur bei einzelnen Tieren, da Küken aus SPF-Eiern

**Fortsetzung Tabelle 34: (Teil 2: Impflinge)**

<b>Impf- Nr.</b>	<b>Antikörper- Titer 1 (Log 10)</b>	<b>Antikörper- Titer 2 (Log 10)</b>	<b>Impf- Nr.</b>	<b>Antikörper- Titer 1 (Log 10)</b>	<b>Antikörper- Titer 2 (Log 10)</b>
<b>1</b>	3,49	3,14	<b>18</b>	0	0
<b>2</b>	3,00	3,64	<b>19</b>	0	1,62
<b>3</b>	2,91	2,94	<b>20</b>	0	0
<b>4</b>	2,20	2,34	<b>21</b>	0	0
<b>5</b>	0	0	<b>22</b>	0	0
<b>6</b>	1,44	2,83	<b>23</b>	0	0
<b>7</b>	0	0	<b>24</b>	0	0
<b>8</b>	0	0	<b>25</b>	1,44	3,78
<b>9</b>	0	0	<b>26</b>	0	3,25
<b>10</b>	2,20	3,29	<b>27</b>	3,53	3,84
<b>11</b>	0	0	<b>28</b>	2,60	4,49
<b>12</b>	0	0	<b>29</b>	2,04	2,49
<b>13</b>	0	0	<b>30</b>	2,29	4,62
<b>14</b>	0	0	<b>31</b>	0	4,30
<b>15</b>	1,96	2,66	<b>32</b>	0	4,28
<b>16</b>	3,72	4,07	<b>33</b>	0	3,68
<b>17</b>	0	0	<b>34</b>	0	4,23

- **Antikörpertiter 1:** Titer zu Challengebeginn

- **Antikörpertiter 2:** Titer unmittelbar vor der Tötung der Tiere zur weiteren  
Untersuchung

#### **4. 4. 2. 6 Vergleich der Ergebnisse aus der Untersuchung zum Krankheitsverlauf nach Impfung mit IB H120**

In Tabelle 35 und Abb. 8 werden die Ergebnisse sämtlicher Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Infektiösen Bronchitis vergleichend dargestellt.

Bei sämtlichen Impfungen und Kontrolltieren besteht eine hundertprozentige Übereinstimmung der Ergebnisse von ZRT und histologischer Untersuchung.

Bei den ungeimpften Kontrolltieren kann in ZRT, Virusisolierung, klinischer und histologischer Untersuchung vom 2. bis zum 7. Tag p. i. übereinstimmend eine Infektiöse Bronchitis nachgewiesen werden, wobei am 7. Tag nur eines der beiden untersuchten Tiere klinische Symptome zeigt. Am 10. Tag p. i. sind in ZRT, Histologie und klinischer Untersuchung keine Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis mehr erkennbar, eine Virusisolierung ist jedoch weiterhin erfolgreich.

Von den geimpften Küken zeigt am 2. Tag p. i. eines der beiden untersuchten Tiere in ZRT und histologischer Untersuchung Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis. Vom 3. Bis zum 6. Tag p. i. werden bei 17 der 22 Hühnerküken in diesen Tests IB-typische Veränderungen beobachtet. Ab dem 7. Tag p. i. sind in ZRT und Histologie keine Anzeichen für IB mehr erkennbar.

Sämtliche Impflinge, die in ZRT und histologischer Untersuchung keine IB-typischen Veränderungen aufwiesen, waren auch frei von klinischen Symptomen. Allerdings waren bei 5 Küken, die in ZRT und Histologie als IB-positiv bewertet wurden, in der klinischen Untersuchung keine Krankheitsanzeichen zu beobachten.

Eine Virusisolierung war bis zum 8. Tag p. i. bei sämtlichen Impfungen erfolgreich. An den Tagen 10 und 12 p. i. wurde jeweils bei einem der beiden untersuchten Tiere IBV isoliert, am 14. Tag konnte kein IBV mehr isoliert werden.

**Tabelle 35: Vergleich der verschiedenen Testergebnisse**

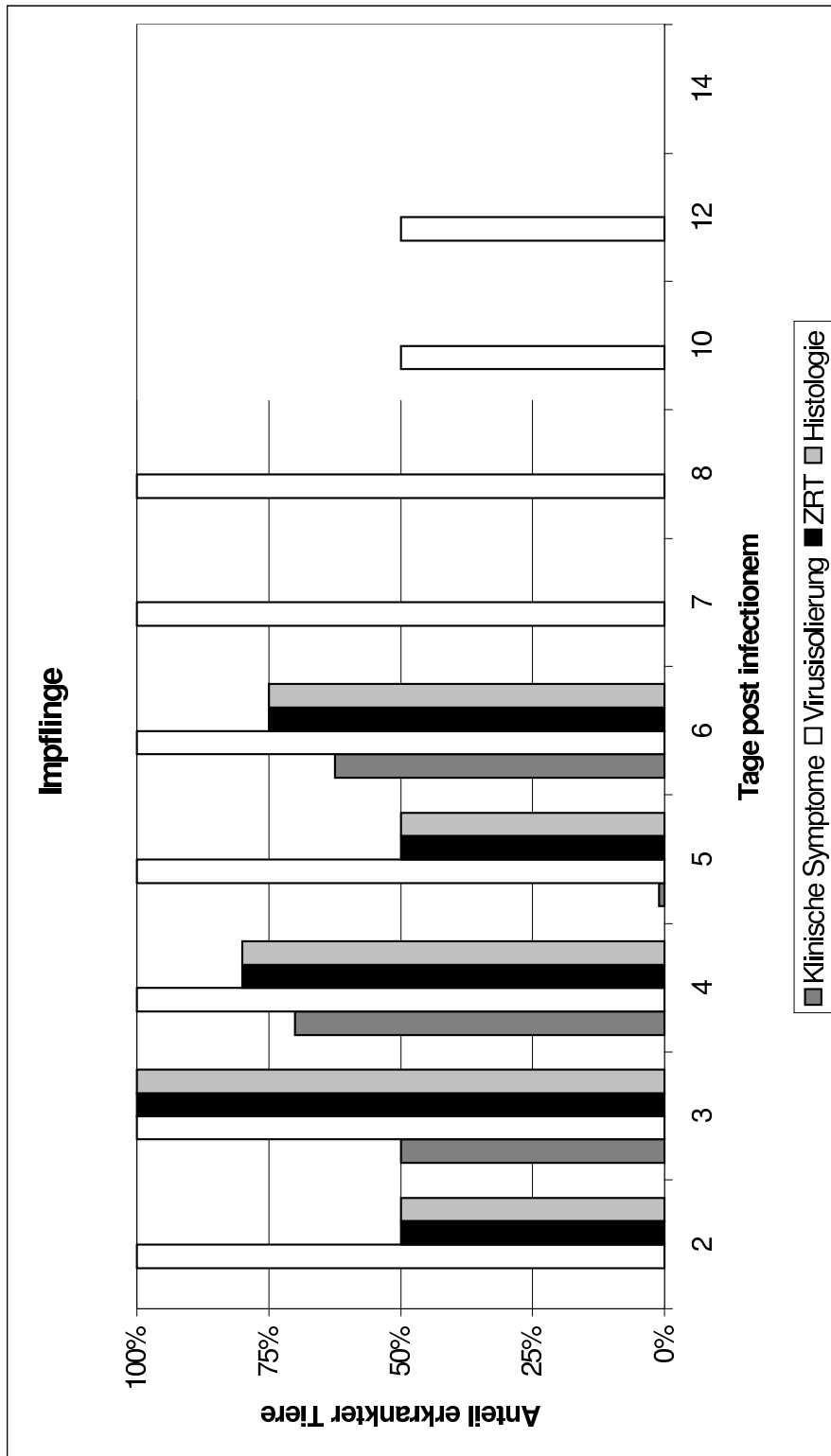
Tier Nr.	Tage p. i.	Klin. Sympt.	Virus- Isolierung	ZRT	Histo.	Antikörper- Titer 1	Antikörper- Titer 2
<b>Impflinge</b>							
1	2	-	+	-	-	3,49	3,14
2	2	-	+	+	+	3,00	3,64
3	3	+	+	+	+	2,91	2,94
4	3	-	+	+	+	2,20	2,34
5	4	+	+	+	+	0	0
6	4	+	+	+	+	1,44	2,83
7	4	+	+	+	+	0	0
8	4	-	+	+	+	0	0
9	4	+	+	+	+	0	0
10	4	-	+	-	-	2,20	3,29
11	4	+	+	+	+	0	0
12	4	+	+	+	+	0	0
13	4	+	+	+	+	0	0
14	4	-	+	-	-	0	0
15	5	-	+	+	+	1,96	2,66
16	5	-	+	-	-	3,72	4,07
17	6	+	+	+	+	0	0
18	6	+	+	+	+	0	0
19	6	-	+	-	-	0	1,62
20	6	-	+	-	-	0	0
21	6	+	+	+	+	0	0
22	6	-	+	+	+	0	0
23	6	+	+	+	+	0	0
24	6	+	+	+	+	0	0

**Fortsetzung Tabelle 35: Vergleich der verschiedenen Testergebnisse**

Tier Nr.	Tage p. i.	Klin. Sympt.	Virus- Isolierung	ZRT	Histo.	Antikörper-Titer 1	Antikörper-Titer 2
<b>Impflinge</b>							
25	7	-	+	-	-	1,44	3,78
26	7	-	+	-	-	0	3,25
27	8	-	+	-	-	3,53	3,84
28	8	-	+	-	-	2,60	4,49
29	10	-	+	-	-	2,04	2,49
30	10	-	-	-	-	2,29	4,62
31	12	-	-	-	-	0	4,30
32	12	-	+	-	-	0	4,28
33	14	-	-	-	-	0	3,68
34	14	-	-	-	-	0	4,23
<b>Kontrolltiere</b>							
K 1	2	+	+	+	+	0	0
K 2	2	+	+	+	+	0	0
K 3	4	+	+	+	+	-	0
K 4	4	+	+	+	+	-	0
K 5	4	+	+	+	+	-	0
K 6	6	+	+	+	+	-	0
K 7	6	+	+	+	+	-	0
K 8	6	+	+	+	+	-	0
K 9	7	+	+	+	+	-	3,28
K 10	7	-	+	+	+	-	3,66
K 11	10	-	+	-	-	0	4,90
K 12	10	-	+	-	-	0	3,82

+ = Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis

- = keine Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis



**Abbildung 8:** Vergleich der verschiedenen Testergebnisse zum Krankheitsverlauf nach Impfung mit IB H120



#### **4.5 Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach der Impfung mit IB H120-Impfstoff**

Die Untersuchung auf Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach der Impfung umfaßt folgende Schritte:

- 1) Titration der verwendeten Impfstoffe im Hühnerembryo zur Überprüfung der Ergebnisse der vom Hersteller durchgeführten Titrationsen (4.5.1).
- 2) Im Rahmen einer Unschädlichkeitsprüfung (s. Kap.2.6.2.1) werden 15 Hühnerküken am 2. Lebenstag mit je 10 Dosen Nobilis IB H120 per eyedrop geimpft und 21 Tage lang auf das Auftreten von Krankheitssymptomen beobachtet (Tabelle 37). Von diesen Tieren werden je 2 Küken an den Tagen 7, 14 und 21 p. vac. getötet und wie weiter unten beschrieben untersucht. 4 Küken werden über das Versuchsende hinaus behalten und an den Tagen 28 und 35 p. vac. (je 2 Tiere) zur weiteren Untersuchung getötet.
- 3) Impfung von 6 Hühnerküken am 12.-14. Lebenstag mit der Deklarierten Mindestdosis Nobilis IB H120 (je  $10^3$  EID<sub>50</sub>, per eyedrop). Vier dieser Küken werden am Tag 20 p. vac. zur weiteren Untersuchung getötet, die beiden übrigen am Tag 26 p. vac.
- 4) Beurteilung der Krankheitssymptome bei den einzelnen Hühnerküken unmittelbar vor ihrer Tötung zur weiteren Untersuchung (4.5.2, Tabelle 36).
- 5) Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial (4.5.3).
- 6) Beurteilung der Tracheen im Ziliarreduktionstest (4.5.4).
- 7) Histologische Beurteilung der Tracheen (4.5.5).
- 8) Blutentnahme und IBV-Antikörpertiterbestimmung am Tag 20, bzw. 24 p. vac. (4.5.6).
- 9) Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Testergebnisse (4.5.7).

#### **4. 5. 1 Ergebnis der Impfstofftitration im embryonierten Hühnerei und verwendete Impfstoffdosis**

Für den lyophilisierten Impfstoff TAD IBVac I, Ch.B. 97538901 (Firma LAH), 5000 Dosen pro Abfüllung, deklariertes Mindestvirusgehalt  $10^3$  EID<sub>50</sub> pro Dosis, wird vom Hersteller folgendes Titrationsergebnis angegeben:  $10^{4,3}$  EID<sub>50</sub> pro Dosis. Es wurden jeweils 10 Impfstoffdosen in 0,1 ml PBS resuspendiert und per eyedrop an 15 Küken im Alter von 2 Tagen verimpft.

Für den lyophilisierten Impfstoff Nobilis IB H120, Ch.B. 70464-1-4 (Firma Intervet GmbH), 2500 Dosen pro Abfüllung, deklariertes Mindestvirusgehalt  $10^3$  EID<sub>50</sub> pro Dosis, Titrationsergebnis des Herstellers  $10^{4,9}$  EID<sub>50</sub> pro Dosis, wurde folgendes Titrationsergebnis ermittelt:  $10^{5,06}$  EID<sub>50</sub> pro Dosis (siehe Kap. 4.2.1). Es wurden jeweils die Mindestimpfdosis von  $10^3$  EID<sub>50</sub> in 0,1 ml PBS resuspendiert und per eyedrop an 4 Küken im Alter von 12-14 Tagen verimpft (Tiere Nr. 20 A-D).

Für den lyophilisierten Impfstoff Nobilis IB H120, Ch.B. 60760-1-1 (Firma Intervet GmbH), 5000 Dosen pro Abfüllung, deklariertes Mindestvirusgehalt  $10^3$  EID<sub>50</sub> pro Dosis, Titrationsergebnis des Herstellers  $10^{4,4}$  EID<sub>50</sub> pro Dosis, wurde folgendes Titrationsergebnis ermittelt:  $10^{4,49}$  EID<sub>50</sub> pro Dosis (siehe Kap. 4.2.1). Es wurden jeweils die Mindestimpfdosis von  $10^3$  EID<sub>50</sub> in 0,1 ml PBS resuspendiert und per eyedrop an 2 Küken im Alter von 12-14 Tagen verimpft (Tiere Nr. 26 A+B).

#### 4. 5. 2 Krankheitsanzeichen nach der Impfung mit zehnfacher Impfstoffdosis, bzw. Mindestimpfstoffdosis

Die während des Versuches bei den Hühnerküken auftretenden klinischen Symptome bestanden sowohl nach der Impfung mit der Mindestimpfstoffdosis als auch nach der Impfung mit der zehnfachen Dosis in gelegentlichem Niesen, und leicht verschärften Atemgeräuschen. Sie konnten vom 5. Tage p. vac. an bis zum Ende der 3. Woche p. vac. bei einigen Tieren beobachtet werden (Tab. 36, 37).

**Tabelle 36: Krankheitssymptome der einzelnen Tiere vor ihrer Tötung zur  
weiteren Untersuchung**

Tier Nr.	Tag p. vac.	Impfstoffdosis	Symptome
07 A	7	10 Dosen	Niesen, Atmung verschärft
07 B	7	10 Dosen	Niesen, Atmung verschärft
14 A	14	10 Dosen	o. b. B.
14 B	14	10 Dosen	o. b. B.
21 A	21	10 Dosen	o. b. B.
21 B	21	10 Dosen	o. b. B.
28 A	28	10 Dosen	o. b. B.
28 B	28	10 Dosen	o. b. B.
35 A	35	10 Dosen	o. b. B.
35 B	35	10 Dosen	o. b. B.
20 A	20	Minstdosis	o. b. B.
20 B	20	Minstdosis	o. b. B.
20 C	20	Minstdosis	o. b. B.
20 D	20	Minstdosis	o. b. B.
26 A	26	Minstdosis	o. b. B.
26 B	26	Minstdosis	o. b. B.

o. b. B. : ohne besonderen Befund

**Tabelle 37: Krankheitsanzeichen nach der Impfung  
mit 10-facher Impfstoffdosis**

<b>Tage p. vac.</b>	<b>Tiere gesamt</b>	<b>Tiere krank</b>	<b>Tiere gestorben</b>	<b>Symptome</b>
<b>1</b>	15	0		keine
<b>2</b>	15	0		keine
<b>3</b>	14	0	1	unspezifisch gestorben
<b>4</b>	14	0		keine
<b>5</b>	14	4		Niesen, leichtes Atemgeräusch
<b>6</b>	14	4		Niesen, leichtes Atemgeräusch
<b>7</b>	14	4	2 getötet	Niesen
<b>8</b>	12	5		Niesen
<b>9</b>	12	9		Niesen
<b>10</b>	12	5		Niesen
<b>11</b>	12	4		Niesen
<b>12</b>	12	4		Niesen
<b>13</b>	12	4		Niesen
<b>14</b>	12	3	2 getötet	Niesen
<b>15</b>	10	3		Niesen
<b>16</b>	10	0		Niesen
<b>17</b>	10	0		Niesen
<b>18</b>	10	3		Niesen
<b>19</b>	10	1		Niesen
<b>20</b>	10	0		keine
<b>21</b>	10	1	6 getötet	Niesen
<b>28</b>	4	0	2 getötet	keine
<b>35</b>	2	0		keine

### **4. 5. 3 Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial**

Von den Hühnerküken, welche eine 10-fache Impfstoffdosis erhielten konnte bei sämtlichen Tieren am 7. und 14. Tag p. vac. IBV aus dem Luftröhrenmaterial angezüchtet werden. Am 21. und 28. Tag p. vac. war jeweils bei einem der beiden untersuchten Tiere eine Virusisolierung erfolgreich, während am 35. Tag bei beiden untersuchten Küken kein IBV mehr isoliert werden konnte (Tabelle 38).

Nach der Impfung mit der vom Hersteller angegebenen Mindestimpfstoffdosis war eine Virusisolierung 20 Tage nach der Impfung bei allen untersuchten Hühnerküken erfolgreich, am 26. Tag p. vac. konnte bei beiden untersuchten Tieren kein IBV mehr isoliert werden (Tabelle 38).

### **4. 5. 4 Ziliarreduktionstest**

Im Ziliarreduktionstest fiel bei den mit der 10-fachen Impfstoffdosis vakzinierten Hühnerküken am 7. Tag nach der Impfung eine deutlich verringerte der Zilienaktivität auf. Danach war keine deutliche Einschränkung der Zilienbeweglichkeit mehr feststellbar.

Nach Impfung mit der Mindestimpfstoffdosis konnte bei einem Tier nach 20 Tagen ein vollständiges Sistieren der Zilienaktivität beobachtet werden. Alle anderen Küken zeigten eine ungestörte Zilienbeweglichkeit (Tabelle 39).

**Tabelle 38: Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
<b>Impfung mit zehnfacher Impfstoffdosis</b>							
07 A	1 / 4	1	1 / 4	1	4 / 4	-	<b>IB +</b>
07 B	3 / 5	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
14 A	4 / 5	1	-	-	-	-	<b>IB +</b>
14 B	1 / 5	0	2 / 4	0	3 / 4	0	<b>IB +</b>
21 A	0 / 5	0	2 / 5	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>
21 B	0 / 4	0	5 / 5	-	-	-	<b>IB +</b>
28 A	2 / 5	0	0 / 4	0	0 / 4	0	<b>IB -</b>
28 B	0 / 5	0	2 / 5	0	3 / 5	0	<b>IB +</b>
35 A	0 / 5	0	0 / 5	0	2 / 5	0	<b>IB -</b>
35 B	0 / 5	0	0 / 4	0	1 / 5	0	<b>IB -</b>
<b>Impfung mit deklariertem Mindestimpfstoffdosis</b>							
20 A	0 / 5	0	4 / 5	0	-	-	<b>IB +</b>
20 B	0 / 5	0	4 / 5	0	-	-	<b>IB +</b>
20 C	1 / 4	2	-	-	-	-	<b>IB +</b>
20 D	1 / 4	0	5 / 5	-	-	-	<b>IB +</b>
26 A	1 / 5	0	2 / 5	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>
26 B	0 / 5	0	0 / 4	0	0 / 5	0	<b>IB -</b>

x / y: von y 24 Stunden nach der Beimpfung lebenden Embryonen sind x  
während der folgenden 6 Tage abgestorben

**IB +** : erfolgreicher Nachweis von IBV (siehe 3. 3. 1)

**IB -** : kein IBV nachgewiesen

**Tabelle 39: Auswertung des Ziliarreduktionstests**

Tier Nr.	Punkte Trachealring Nr.										Punkte gesamt	Beur- teilung
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
<b>Impfung mit zehnfacher Impfstoffdosis</b>												
<b>07 A</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	<b>IB +</b>
<b>07 B</b>	0	0	0	0	0	1	1	3	4	3	12	<b>IB +</b>
<b>14 A</b>	4	3	4	3	4	4	4	4	1	4	35	<b>IB -</b>
<b>14 B</b>	3	3	4	0	2	3	3	2	4	3	27	<b>IB -</b>
<b>21 A</b>	4	4	3	4	3	4	4	4	3	3	36	<b>IB -</b>
<b>21 B</b>	4	4	4	4	4	4	3	4	3	4	38	<b>IB -</b>
<b>28 A</b>	4	3	4	3	4	4	4	3	4	4	37	<b>IB -</b>
<b>28 B</b>	4	4	4	4	4	3	4	2	4	3	36	<b>IB -</b>
<b>35 A</b>	3	3	4	4	4	4	3	4	3	4	36	<b>IB -</b>
<b>35 B</b>	3	4	4	4	4	4	4	4	4	3	38	<b>IB -</b>
<b>Impfung mit deklarierter Mindestimpfstoffdosis</b>												
<b>20 A</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40	<b>IB -</b>
<b>20 B</b>	4	4	4	3	4	4	4	4	3	4	38	<b>IB -</b>
<b>20 C</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>IB +</b>
<b>20 D</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40	<b>IB -</b>
<b>26 A</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40	<b>IB -</b>
<b>26 B</b>	0	3	4	4	4	4	3	3	4	4	33	<b>IB -</b>

Bewertungspunkte: 0 = keine Zilienaktivität

1 = 25 % Zilienaktivität

2 = 50 % Ziliaraktivität

3 = 75 % Zilienaktivität

4 = 100 % Zilienaktivität

IB + = IBV-bedingtes Sistieren / Verringerung der Zilienaktivität

IB - = kein Hinweis auf Infektiöse Bronchitis

**Tabelle 40:** Auswertung der histologischen Untersuchung

Tier Nr.	Submuk. Ödem	zelluläre Infiltr.	Epithel	Gesamturteil
<b>Impfung mit zehnfacher Impfstoffdosis</b>				
07 A	++	+	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
07 B	+	+	z. T. abgeflacht, Zilien nicht vorh.	<b>IB +</b>
14 A	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
14 B	++	-	kubisch, Zilien vorhanden	<b>IB -</b>
21 A	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
21 B	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
28 A	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
28 B	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
35 A	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
35 B	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
<b>Impfung mit deklarerter Mindestimpfstoffdosis</b>				
20 A	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
20 B	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
20 C	++	++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
20 D	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
26 A	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>
26 B	-	-	o. b. B.	<b>IB -</b>

**Submuk. Ödem** = Ödembildung in der Lamina submucosa

**Zelluläre Infiltr.** = Infiltration der Lamina propria mit Entzündungszellen

**o. b. B.** = ohne besonderen Befund

+++ = hochgradig ausgeprägt                      ++ = mittelgradig ausgeprägt

+ = geringgradig ausgeprägt                      - = nicht vorhanden

**IB +** = die Trachea zeigt Anzeichen der Infektiösen Bronchitis

**IB -** = die Trachea zeigt keine Anzeichen der Infektiösen Bronchitis



#### 4. 5. 5 Histologische Untersuchung

Analog zu den Ergebnissen des Ziliarreduktionstests waren auch in der histologischen Untersuchung nach Impfung mit 10-facher Impfdosis nur am 7. Tag p. vac. IB-typische Veränderungen der Trachealschleimhaut, wie Zilien- oder Epithelverlust, Abflachung der Epithelzellen, zelluläre Infiltration der Lamina propria mucosae oder ein Ödem der Lamina submucosa erkennbar (Tabelle 40).

In der Gruppe der mit der Mindestimpfdosis geimpften Hühnerküken konnten bei einem der am 20. Tag p. vac. untersuchten Tiere typische Veränderungen der Luftröhrenschleimhaut beobachtet werden (Tabelle 40).

#### 4. 5. 6 IBV-Antikörpertiterbestimmung

Es wurde nur bei den mit der Mindestimpfstoffdosis geimpften Tieren eine Antikörpertiterbestimmung durchgeführt. Die Serumgewinnung erfolgte am 20., bzw. 24. Tag nach der Impfung. Bei einem der 6 Tiere konnte ein meßbarer Antikörpertiter ermittelt werden.

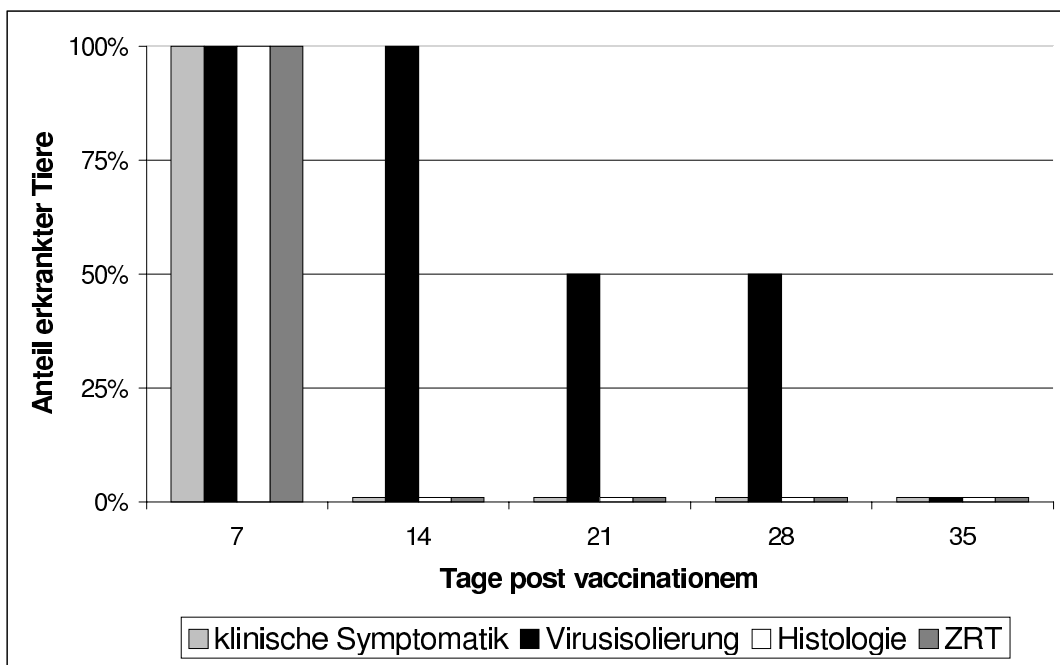
**Tabelle 41:** IBV-Antikörpertiter 23, bzw. 24 Tage nach der Impfung

Tier Nr.	Antikörpertiter (Log 10)	Tier Nr.	Antikörpertiter (Log 10)
20 A	0	26 A	0
20 B	0	26 B	0
20 C	2,03		
20 D	0		

#### 4. 5. 7 Ergebnisvergleich der Untersuchung auf Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach der Impfung mit IB H120

7 Tage nach der Impfung mit der 10-fachen Impfstoffdosis waren in klinischer Untersuchung, ZRT und histologischer Untersuchung übereinstimmend milde Symptome einer infektiösen Bronchitis erkennbar. Danach waren alle Tiere in diesen Untersuchungen unauffällig, während eine Virusisolierung noch bis zum 28. Tag p. vac. möglich war.

Nach Impfung mit der Mindestimpfstoffdosis zeigte nach 20 Tagen eines von vier Küken in ZRT und Histologie Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis, ohne daß auffallenden klinische Symptome vorhanden waren. Bei diesem Tier konnte auch ein deutlicher IBV-Antikörpertiter im Blut gemessen werden. Am Tag 20 p. vac. konnte bei allen untersuchten Hühnerküken IBV isoliert werden, nicht jedoch am Tag 26. (Tabelle 42 und Abbildung 9).



**Abb. 9:** Krankheitsanzeichen und Virusausscheidung nach Impfung mit 10-facher Impfstoffdosis

**Tabelle 42: Vergleich der Testergebnisse**

Tier Nr.	Tage p. vac.	Impfstoffdosis	Klinische Symptome	Virusisolierung	ZRT	Histo.	Antik.-titer
<b>Impfung mit zehnfacher Impfstoffdosis</b>							
07 A	7	10 Dosen	+	+	+	+	n. b.
07 B	7	10 Dosen	+	+	+	+	n. b.
14 A	14	10 Dosen	-	+	-	-	n. b.
14 B	14	10 Dosen	-	+	-	-	n. b.
21 A	21	10 Dosen	-	-	-	-	n. b.
21 B	21	10 Dosen	-	+	-	-	n. b.
28 A	28	10 Dosen	-	-	-	-	n. b.
28 B	28	10 Dosen	-	+	-	-	n. b.
35 A	35	10 Dosen	-	-	-	-	n. b.
35 B	35	10 Dosen	-	-	-	-	n. b.
<b>Impfung mit Mindestimpfstoffdosis (<math>10^3</math> EID<sub>50</sub>)</b>							
20 A	20	Minstdos.	-	+	-	-	0
20 B	20	Minstdos.	-	+	-	-	0
20 C	20	Minstdos.	-	+	+	+	2,03
20 D	20	Minstdos.	-	+	-	-	0
26 A	26	Minstdos.	-	-	-	-	0
26 B	26	Minstdos.	-	-	-	-	0

+ = Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis

- = keine Anzeichen einer Infektiösen Bronchitis

n. b. = es wurde keine Bestimmung durchgeführt

Histo. = histologische Untersuchung

Antik. = Antikörper

## 4. 6 Vergleich der IB-spezifischen Krankheitsanzeichen nach intratrachealer- und per eyedrop-Infektion

Für diese Untersuchung werden ungeimpfte SPF-Hühnerküken im Alter von 36-38 Tagen mit dem IBV-Stamm M 41 infiziert, wobei 4 Tiere je  $10^3$  EID<sub>50</sub> als Augentropfen und 6 Küken die gleiche Dosis intratracheal erhalten (Kontrolltiere aus 4.4.2.1). Nach 4, bzw. 6 Tagen werden die Küken klinisch untersucht (4.6.1), getötet und mit Hilfe von Virusisolierung (4.6.2) Ziliarreduktionstest (4.6.3) und Histologie (4.6.4) auf Anzeichen der Infektiösen Bronchitis untersucht.

### 4. 6. 1 Krankheitsanzeichen während des Infektionsversuches

Sowohl bei den intratracheal- als auch bei den per eyedrop infizierten Tieren sind am Tag der Infektion und einen Tag später noch keine Krankheitsanzeichen erkennbar. Am 2. und 3. Tag p. i. zeigt ein zunehmender Anteil der Tiere Symptome einer Infektiösen Bronchitis, während vom 4. bis zum 6. Tag alle Küken unabhängig vom Infektionsweg erkrankt sind (Tabelle 43).

**Tabelle 43: Krankheitsanzeichen im Verlauf des Infektionsversuches**

Tage p. i.	Tiere gesamt		Tiere krank		Symptome
	p. e.	K	p. e.	K	
0	4	12	0	0	keine
1	4	12	0	0	keine
2	4	12	1	4	keine
3	4	10	3	7	Niesen, rasselndes Atemgeräusch
4	4	10	4	10	I: Niesen, K: rasselndes Atemgeräusch
5	2	7	4	7	Atmung verschärft, K: rasselndes Atemger.
6	2	7	4	7	Atmung verschärft, K: rasselndes Atemger.

p. e. = per eyedrop infizierte Tiere

K = intratracheal infizierte Kontrolltiere (= Kontrolltiere aus 4.4.2.1)

Am Versuchsende sind bei sämtlichen Hühnerküken, unabhängig von der Applikationsart des Challengevirus, klinische Symptome einer infektiösen Bronchitis erkennbar (Tabelle 44).

**Tabelle 44: Krankheitssymptome der einzelnen Tiere bei Versuchsende**

Tier Nr.	Tag p. i.	Symptome	Tier Nr.	Tag p. i.	Symptome
p.e. 1	4	Atmung verschärft	K 1	4	Atmung verschärft
p.e. 2	4	Atmung verschärft	K 2	4	Atmung verschärft
			K 3	4	Atmung verschärft
p.e. 3	6	Atmung verschärft	K 4	6	Atmung verschärft
p.e. 4	6	Atmung verschärft	K 5	6	rasselnde Atmung
			K 6	6	Atmung verschärft

#### 4. 6. 2 Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial

Es konnte bei allen untersuchten Tieren IBV isoliert werden (Tabelle 45).

#### 4. 6. 3 Ziliarreduktionstest

In den Tracheen sämtlicher untersuchter Küken wurde ein vollständiges Sistieren der Zilienaktivität beobachtet. Auf eine Darstellung in Tabellenform wird daher verzichtet.

**Tabelle 45: Virusisolierung im Hühnerembryo aus Luftröhrenmaterial**

Tier Nr.	1. Beimpfung:		2. Beimpfung:		3. Beimpfung:		Beur- teilung
	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	Embr. ab- gestorben	Embr. mit Läsionen	
p.e.1	1 / 5	4	-	-	-	-	IB +
p.e.2	0 / 5	2	-	-	-	-	IB +
p.e.3	2 / 5	3	-	-	-	-	IB +
p.e.4	1 / 5	2	-	-	-	-	IB +
K 1	3 / 5	2	-	-	-	-	IB +
K 2	1 / 5	3	-	-	-	-	IB +
K 3	1 / 4	3	-	-	-	-	IB +
K 4	0 / 5	3	-	-	-	-	IB +
K 5	2 / 5	3	-	-	-	-	IB +
K 6	0 / 5	5	-	-	-	-	IB +

**Legende zu Tabelle 45:**

x / y: von y 24 Stunden nach der Beimpfung lebenden Embryonen sind x  
während der folgenden 6 Tage abgestorben

IB + : erfolgreicher Nachweis von IBV (siehe 3. 3. 1)

IB - : kein IBV nachgewiesen

**4. 6. 4 Histologische Untersuchung**

Bei allen untersuchten Tieren konnten in der histologischen Untersuchung IB-typische Veränderungen der Trachealschleimhaut wie Zilien- oder Epithelverlust, Abflachung der Epithelzellen, zelluläre Infiltration der Lamina propria mucosae oder ein Ödem der Lamina submucosa nachgewiesen werden (Tabelle 46).

**Tabelle 46: Auswertung der histologischen Untersuchung**

Tier Nr.	Submuk. Ödem	Zelluläre Infiltr.	Epithel	Gesamturteil
p.e. 1	+++	++	kubisch bis flach, keine Zilien	<b>IB +</b>
p.e. 2	+++	+	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
p.e. 3	++	++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
p.e. 4	+++	++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
K-1	+++	+++	abgeflacht, keine Zilien	<b>IB +</b>
K-2	+++	+	abgeflacht, keine Zilien	<b>IB +</b>
K-3	++	+++	kubisch, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
K-4	+++	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
K-5	+	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>
K-6	-	+++	abgeflacht, Zilien nicht vorhanden	<b>IB +</b>

**Submuk. Ödem** = Ödembildung in der Lamina submucosa

**Zelluläre Infiltr.** = Infiltration der Lamina propria mit Entzündungszellen

+++ = hochgradig ausgeprägt      ++ = mittelgradig ausgeprägt

+ = geringgradig ausgeprägt      - = nicht vorhanden

**IB +** = die Trachea zeigt Anzeichen der Infektiösen Bronchitis

**IB -** = die Trachea zeigt keine Anzeichen der Infektiösen Bronchitis

#### 4. 6. 5 Vergleich der verschiedenen Testergebnisse nach intratrachealer- und per eyedrop-Infektion

Sämtliche Untersuchungsmethoden liefern vergleichbare Ergebnisse nach intratrachealer- und per eyedrop-Infektion. Alle Testergebnisse sind positiv (Tabelle 47).

**Tabelle 47: Vergleich der verschiedenen Testergebnisse**

Tier Nr.	Tage p.inf.	Klinische Symptome	Virus-Isolierung	ZRT	Histologie
<b><u>.e. 1</u></b>	4	+	+	+	+
<b>p.e. 2</b>	4	+	+	+	+
<b>p.e. 3</b>	6	+	+	+	+
<b>p.e. 4</b>	6	+	+	+	+
<b><u>-1</u></b>	4	+	+	+	+
<b>K-2</b>	4	+	+	+	+
<b>K-3</b>	4	+	+	+	+
<b>K-4</b>	6	+	+	+	+
<b>K-5</b>	6	+	+	+	+
<b>K-6</b>	6	+	+	+	+



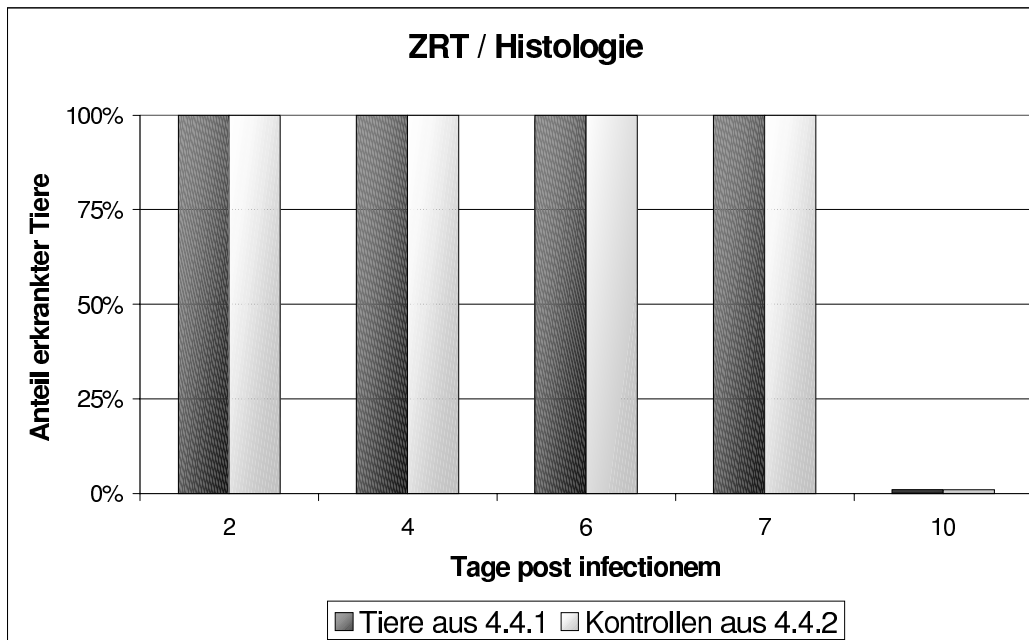
## **4.7 Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität der verwendeten Tests**

### **4.7.1 Vergleich der verschiedenen Untersuchungsmethoden im Hinblick auf ihre Sensitivität und Reproduzierbarkeit**

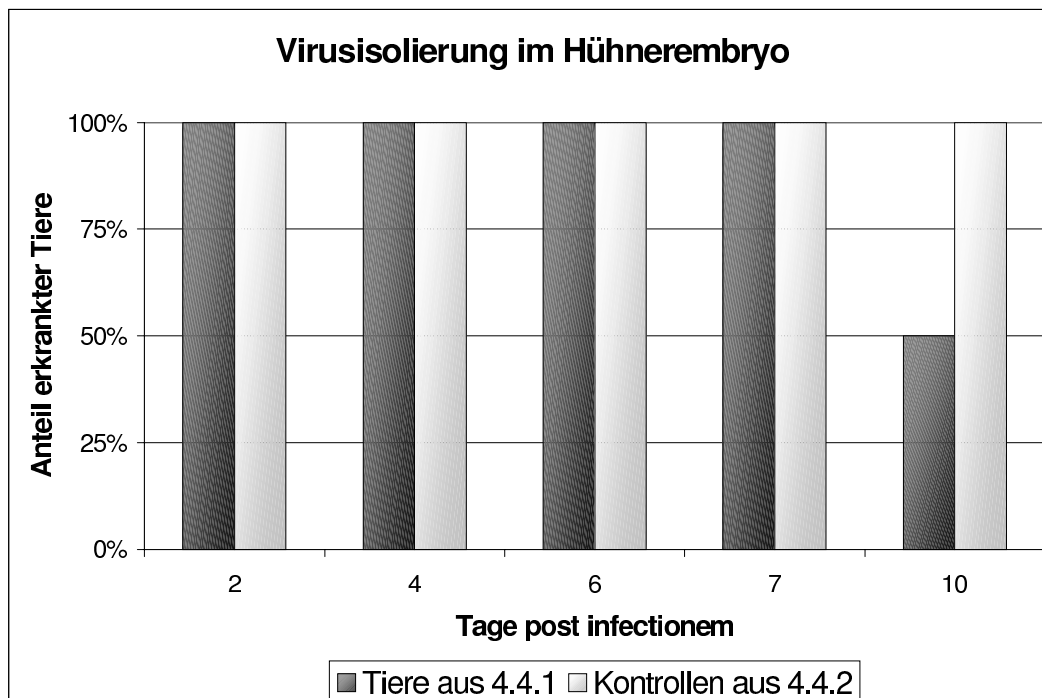
Zur Beurteilung der Sensitivität und Reproduzierbarkeit der eingesetzten Untersuchungsmethoden werden die unter 4.4.1 beschriebenen Resultate der Untersuchungen zum Krankheitsverlauf empfänglicher Tiere mit den Ergebnissen der ebenfalls empfänglichen Kontrolltiere aus dem Versuch 4.4.2 verglichen (Abb. 10, 11 und 12).

Sowohl im ZRT als auch in der histologischen Untersuchung konnte eine genaue Übereinstimmung und somit hundertprozentige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermittelt werden. Krankheitsanzeichen wurden jeweils vom 2. bis zum 7. Tag p. i. bei allen infizierten Hühnern beobachtet, am 10. Tag waren alle Tiere wieder frei von Symptomen. Da sich die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungsmethoden gleichen, werden sie in einer gemeinsamen Grafik dargestellt (Abb. 10).

Mit Hilfe der Virusisolierung konnte bis zum 7. Tag p. i. übereinstimmend bei allen Tieren IBV isoliert werden, am 10. Tag konnte im ersten Versuch (4.4.1) nur aus der Trachea eines der beiden Küken Virus angezüchtet werden, im zweiten Versuch (4.4.2) war bei beiden untersuchten Tieren IBV nachweisbar (Abb. 11).

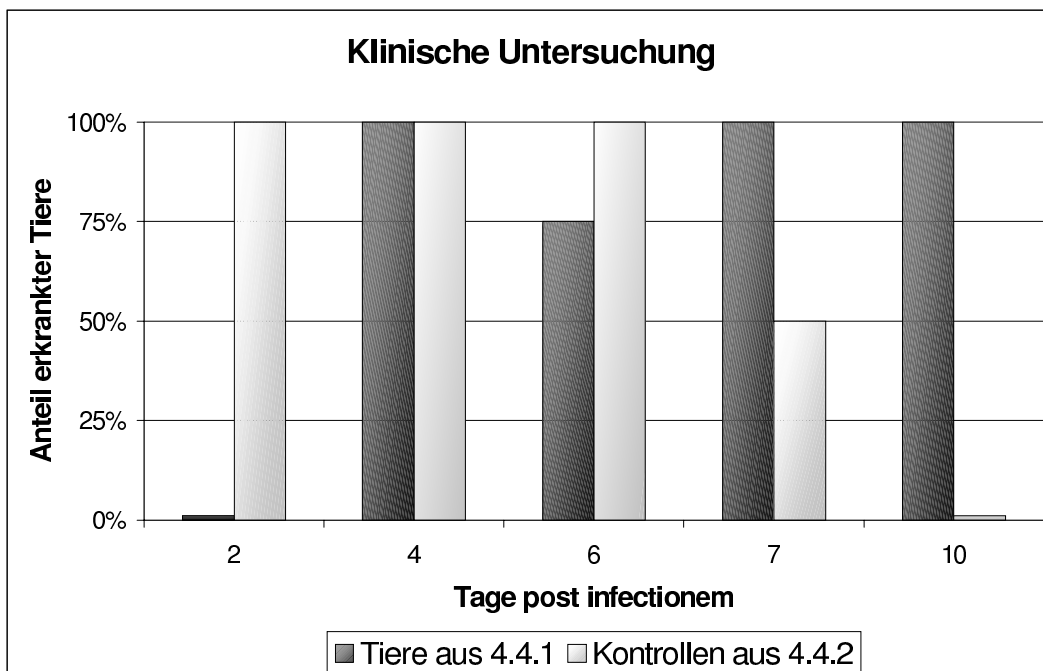


**Abb. 10:** Vergleich der Tiere aus 4.4.1 (Tab. 28) mit den Kontrolltieren aus 4.4.2 (Tab. 35): Ergebnisse von ZRT und Histologie



**Abb. 11:** Vergleich der Tiere aus 4.4.1 (Tab. 28) mit den Kontrolltieren aus 4.4.2 (Tab. 35): Ergebnisse der Virusisolierung im Hühnerembryo

In der klinischen Untersuchung bestehen deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Versuche. Im ersten Versuch (4.4.1) wurden an den Tagen 4 bis 10 p. i. 75 bis 100% der Tiere als krank eingestuft, am Tag 2 wies kein Huhn Krankheitssymptome auf. Im zweiten Versuch (4.4.2) hingegen wurden an den Tagen 2 bis 7 p. i. 50 bis 100% der Tiere als krank beurteilt, während am 10. Tag keine Symptome mehr beobachtet wurden (Abb. 12).



**Abb. 12:** Vergleich der Tiere aus 4.4.1 (Tab. 28) mit den Kontrolltieren aus 4.4.2 (Tab. 35): Ergebnisse der klinischen Untersuchung

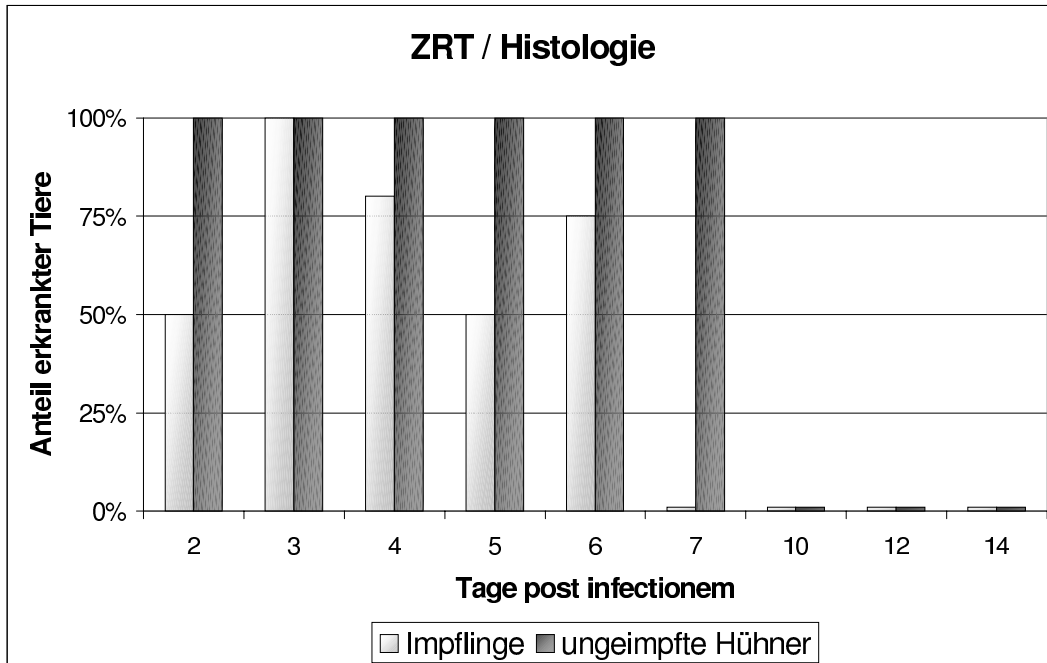
#### **4. 7. 2 Vergleich der Verschiedenen Testergebnisse im Hinblick auf ihre Spezifität**

Zur Beurteilung der Spezifität wird zunächst der Krankheitsverlauf der empfänglichen Hühner aus 4.4.1 mit dem der geimpften Tieren aus 4.4.2 verglichen (Abb. 13, 14 und 15). Danach werden die durchgeführten Virus-isolierungen im Hühnerembryo auf ihr Vermögen zur Unterscheidung zwischen geimpften und empfänglichen Tieren beurteilt und vergleichend dargestellt (Abb. 16).

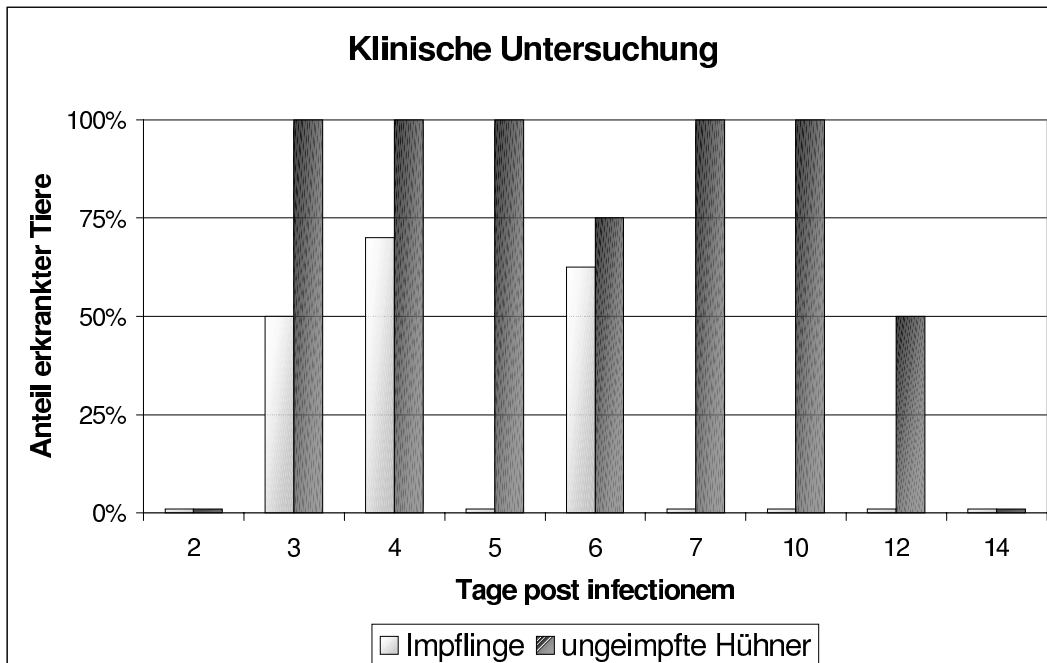
Die Anzahl untersuchter Impflinge beträgt 10 am 4. Tag p. i. und 8 am 6. Tag p. i.. An allen anderen Tagen wurden jeweils 2 Tiere untersucht. Die Anzahl untersuchter Kontrolltiere beträgt an den Tagen 5 bis 7 jeweils 4, an allen anderen Tagen wurden je 2 Küken untersucht.

In ZRT und Histologie (Abb. 13) sowie bei der klinischen Untersuchung (Abb. 14), ist zu erkennen, daß die geimpften Küken in geringerer Anzahl erkranken, als die empfänglichen Tiere und daß die Krankheitsdauer bei den geimpften Hühnern kürzer ist.

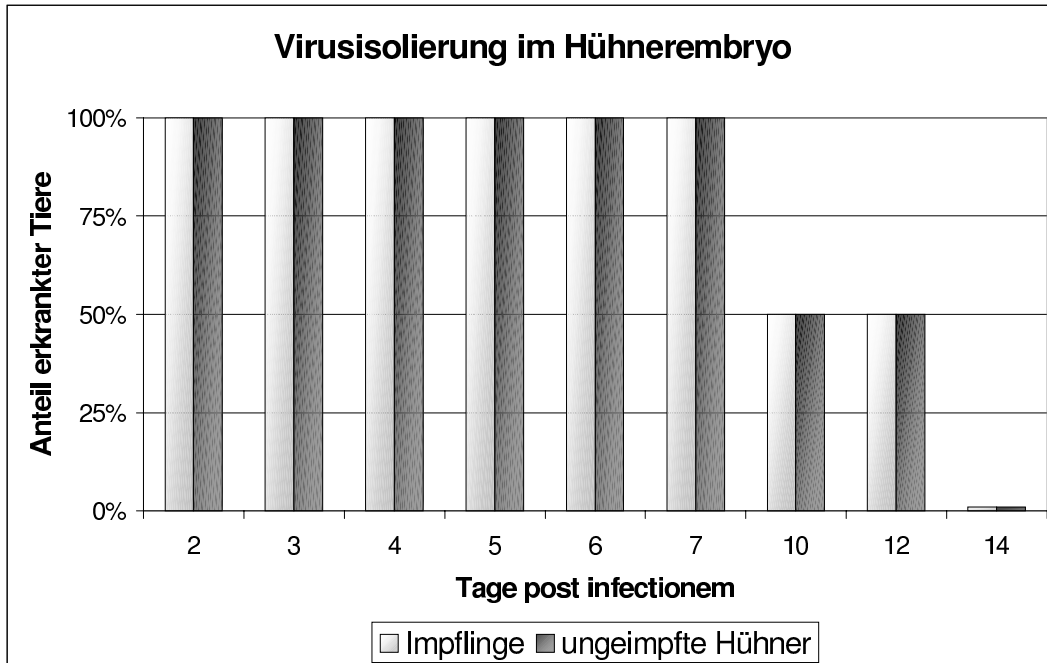
Die Virusisolierung im Hühnerembryo ließ in dem Versuch zum Krankheitsverlauf (Abb. 15) sowie in der zweiten durchgeführten Wirksamkeitsprüfung (Kap. 4.2 und Abb. 16) keine Unterscheidung zwischen geimpften und empfänglichen Küken zu, in der 1. und 3. durchgeführten Wirksamkeitsprüfung war jedoch eine Unterscheidung zwischen Impflingen und nicht geimpften Kontrolltieren möglich.



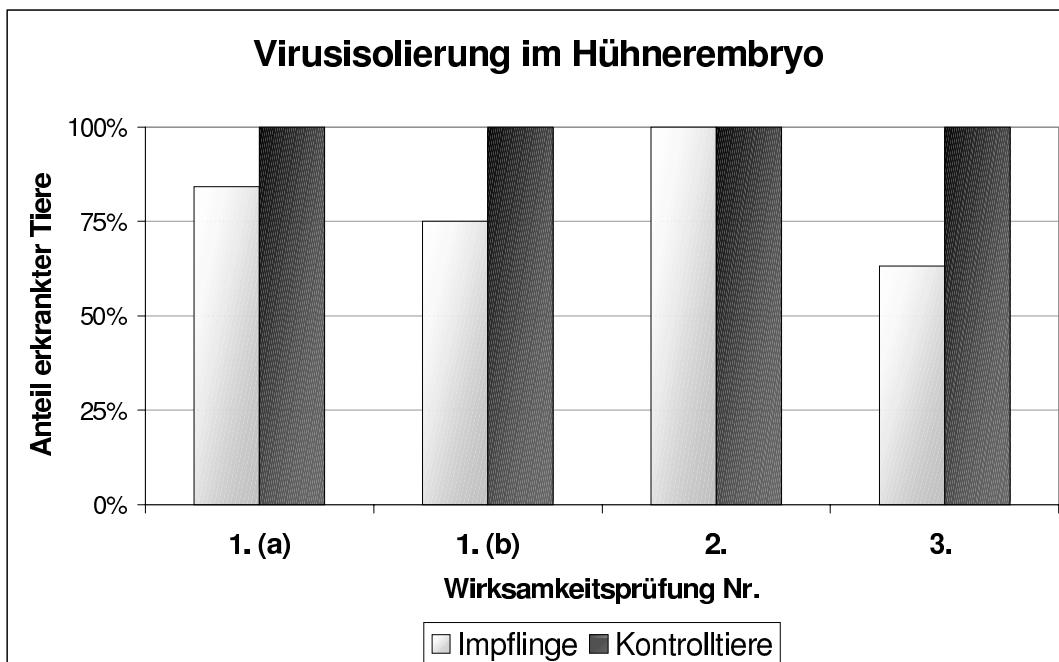
**Abb. 13:** Krankheitsverlauf bei geimpften und ungeimpften Hühnern (Ergebnisse von ZRT und histologischer Untersuchung)



**Abb. 14:** Krankheitsverlauf bei geimpften und ungeimpften Hühnern (Ergebnisse der klinischen Untersuchung)



**Abb. 15:** Krankheitsverlauf bei geimpften und ungeimpften Hühnern  
(Ergebnisse der Virusisolierung im Hühnerembryo)



**Abb. 16:** Unterscheidung geimpfter und empfänglicher Tiere mit Hilfe der  
Virusisolierung im Hühnerembryo

## **5 Diskussion**

### ***5.1 Vergleich der verschiedenen Testmethoden im Hinblick auf ihre Eignung zum Nachweis der experimentellen IBV-Infektion im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen***

Im Rahmen dieser Studie sollten keine Methoden zur Primärisolierung von IBV aus Organmaterial erarbeitet werden. Ziel ist vielmehr der Nachweis einer Erkrankung nach der experimentellen Infektion mit einem bekannten Challengevirus, bzw. des Schutzes vor einer solchen Erkrankung durch den zu untersuchenden Impfstoff.

#### **5.1.1 Beobachtungen zu Sensitivität und Reproduzierbarkeit**

Als Sensitivität wird die Fähigkeit der eingesetzten Tests bezeichnet, erkrankte Tiere als solche zu erkennen. Sie lässt sich errechnen, indem die Anzahl der testpositiven Kranken durch die Gesamtzahl der Kranken geteilt wird (KRAFT, 1997). Je geringer die Sensitivität eines Tests ist, desto höher ist der Anteil falsch negativer Testergebnisse. Aus dem unter 4.7.1 beschriebenen Vergleich der Testergebnisse empfänglicher Tiere aus zwei verschiedenen Versuchen (4.4.1 und 4.4.2) lassen sich folgende Rückschlüsse ziehen:

Die Virusisolierung im embryonierten Hühnerei weist die höchste Sensitivität und eine gute Reproduzierbarkeit auf, da die experimentelle IBV-Infektion in beiden Versuchen vom 2. bis zum 10. Tag p. i. nachgewiesen werden konnte (Abb. 11). Die Tatsache, daß sich am Tag 10 p. i. die Ergebnisse der beiden Versuche unterschieden, könnte dadurch erklärt werden, daß zu diesem Zeitpunkt nur noch bei einem Teil der Tiere eine Virusausscheidung stattfand. Auch die unter 4.1.7 beschriebenen Ergebnisse der beiden mit identischen Proben durchgeführten

Virusisolierungen (s. Tabellen 12 und 13) zeigen eine gute Reproduzierbarkeit (Korrelationskoeffizient = 0,9).

ZRT und Histologie besitzen eine sehr gute Sensitivität bis zum 7. Tag p. i. (positives Testergebnis bei allen infizierten Hühnern). Danach kommt es zu einer Regeneration der Trachealschleimhaut, so daß am 10. Tag p. i. keine Veränderungen mehr erkennbar sind. Die Ergebnisse waren zu 100% reproduzierbar.

Bei der klinischen Untersuchung lag eine geringere Reproduzierbarkeit vor (Korrelationskoeffizient = 0,62 für die Tage 2 bis 10, K = 0,86 für die Tage 4 bis 7). Die Sensitivität liegt zwischen dem 4. und 7. Tag bei 50 bis 100%.

### **5. 1. 2 Beobachtungen zur Spezifität**

Die Spezifität beschreibt, mit welcher Sicherheit ein Test in der Lage ist, das Nichtvorhandensein einer Krankheit richtig auszuschließen und läßt sich errechnen, indem die Anzahl der testnegativen Nichtkranken durch die Gesamtzahl der Nichtkranken geteilt wird (KRAFT, 1997). Sie erlaubt somit Rückschlüsse auf die Eignung eines Tests, kranke Tiere von gesunden zu unterscheiden. Je geringer die Spezifität eines Tests ist, desto höher ist der Anteil falsch positiver Testergebnisse.

Aus dem unter 4.7.2 beschriebenen Vergleich des Krankheitsverlaufes bei geimpften und empfänglichen Hühnerküken läßt sich erkennen, daß sowohl die klinische Untersuchung (Abb. 14) als auch ZRT und Histologie (Abb. 13) eine ausreichende Spezifität aufweisen, um kranke Hühner von solchen zu unterscheiden, die durch die Impfung geschützt sind. Die Aussagen der Virusisolierung erscheinen eher unsicher (Abb. 15 und 16).



### **5. 1. 3 Beobachtungen zur Sicherheit (Beeinflußbarkeit der Tests durch impfvirusinduzierte Veränderungen)**

Aus den unter 4.5 beschriebenen Ergebnissen läßt sich ersehen, daß in klinischer Untersuchung, ZRT und Histologie 7 Tage nach der Impfung mit 10facher Impfstoffdosis milde Krankheitssymptome erkennbar sind. Vom 14. Tag p. vac. an sind jedoch keine impfstoffinduzierten Veränderungen mehr erkennbar.

Eine Virusisolierung ist noch bis zum 28. Tag nach der Impfung bei einem Teil der untersuchten Tiere möglich, so daß zum Zeitpunkt der Untersuchung (25 – 32 Tage nach der Impfung) eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den Nachweis von Impfvirus nicht ausgeschlossen werden kann.

## ***5. 2 Vergleich der verschiedenen Testmethoden in Bezug auf ihren Personal-, Zeit- und Materialaufwand***

### **5. 2. 1 Klinische Untersuchung**

Die Untersuchung der klinischen Symptome ist sicherlich die am wenigsten aufwendige Methode. Die Tatsache, daß weder spezielle Geräte noch Verbrauchsmaterial benötigt werden, reduziert den finanziellen Aufwand auf ein Minimum. Auch der benötigte Zeitaufwand ist als gering einzustufen.

Alle anderen Untersuchungsmethoden haben zunächst die möglichst gewebeschonende Entnahme der Tracheen als Voraussetzung, welche einige Zeit in Anspruch nimmt.

### **5. 2. 2 Ziliarreduktionstest**

Der Ziliarreduktionstest erfordert einen vergleichsweise geringen Aufwand an Geräten und Verbrauchsmaterial. Eine Laminar-Flow-Bank dürfte in jedem Labor, in dem Infektionsversuche durchgeführt werden können, vorhanden sein. Zusätzlich wird ein Auflichtmikroskop benötigt, das Verbrauchsmaterial besteht in 15 24-Wellplatten und einer frischen Skalpellklinge.

Auch der Zeitaufwand ist nicht allzu hoch. Der geübte Untersucher benötigt etwa 10 Minuten für die Beurteilung einer Luftröhre, so daß für 30 Tiere 5 bis 6 Stunden reine Untersuchungsdauer eingeplant werden müssen. Da aber der Ziliarreduktionstest innerhalb von 3 bis 4 Stunden nach dem Töten der Hühner ausgewertet sein muß (danach sistiert die Zilienbewegung), besteht ein Personalbedarf von mindestens 3 bis 4 Personen. Die Zeit, welche für die Entnahme der Trachea und das Ausschleusen der Proben benötigt wird, verkürzt die für die Untersuchung zur Verfügung stehende Zeit entsprechend.

Die Testergebnisse sind noch am Tag der Untersuchung verfügbar.

### **5. 2. 3 Histologische Untersuchung**

Die histologische Untersuchung erfordert einen relativ hohen Aufwand an Geräten und Verbrauchsmaterial. Es werden neben Mikrotom, Einbettmaschine, Eingießstation, Wärmeschrank, Abzug und Wasserbad diverse Verbrauchsmaterialien benötigt, wie Paraffin, verschiedene Lösungsmittel (Formalin, Alkohol, Xylol) und die Färbelösungen. Einige der verwendeten Chemikalien müssen als Sondermüll entsorgt werden und erfordern aufgrund ihrer Giftigkeit besondere Sorgfalt im Umgang.

Der benötigte Zeitaufwand ist höher als für den ZRT, kann allerdings über mehrere Tage verteilt werden, wodurch die gesamte Untersuchung leicht von einer einzelnen Person übernommen werden kann.

Die Untersuchungsergebnisse sind bei zügigem Arbeitsablauf innerhalb von vier Tagen verfügbar. Die histologischen Präparate ermöglichen eine dauerhafte Dokumentation der Ergebnisse.

#### **5. 2. 4 Virusisolierung im Hühnerembryo**

Die Virusisolierung im embryonierten Hühnerei erfordert einen mittleren apparativen Aufwand (Laminar-Flow-Bank, Brutschrank, elektrischer Bohrer, Gefrierschrank, Schierlampe). Allerdings ist der Bedarf an Hühnereiern immens. Für die 30 zu untersuchenden Tiere werden pro Passage 150 Hühnerembryonen infiziert, zusätzlich werden je 5 Embryonen als Positiv- und Negativkontrolle mit IB-Impfstoff bzw. PBS beimpft. Im ungünstigsten Fall müssen drei Passagen durchgeführt werden, wofür insgesamt bis zu 480 embryonierte Hühnereier benötigt würden. Die Anzahl der dafür eingesetzten SPF-Eier muß nochmals um 10 % erhöht werden, um den Anteil an nicht befruchteten Eiern und unspezifisch absterbenden Embryonen auszugleichen. Der Bedarf an SPF-Eiern beträgt also bis zu 530 Stück pro Wirksamkeitsprüfung.

Die Virusisolierung im Hühnerembryo erfordert von allen Untersuchungsmethoden den höchsten Zeitaufwand. Die Passage sämtlicher Proben am selben Tag erfordert einen Personalaufwand von 2 bis 3 Arbeitskräften, und es werden drei solche Passagen durchgeführt.

Ein Ergebnis der Untersuchung ist frühestens 3 Wochen nach Beendigung des Infektionsversuches verfügbar.

### 5.3 Zusammenfassende Beurteilung der Untersuchungsmethoden

In Tabelle 48 werden sämtliche Betrachtungen zu Sensitivität, Spezifität, Reproduzierbarkeit und Sicherheit der eingesetzten Tests zusammengefaßt.

Während die klinische Untersuchung eine ausreichende Spezifität und Sicherheit gewährleistet, sind ihre Sensitivität und Reproduzierbarkeit unzureichend, so daß mit falsch negativen Ergebnissen gerechnet werden muß.

Die Virusisolierung im Hühnerembryo weist trotz sehr guter Sensitivität eine fragliche Spezifität und Reproduzierbarkeit sowie eine unzureichende Sicherheit auf, wodurch insbesondere nach vorausgehender Impfung falsch positive Resultate erzielt werden können.

Ziliarreduktionstest und histologische Untersuchung sind aufgrund ihrer guten Sensitivität, Spezifität, Reproduzierbarkeit und Sicherheit zum Nachweis der experimentellen IBV-Infektion geimpfter Hühner am besten geeignet und weisen eine sehr gute Übereinstimmung ihrer Ergebnisse auf.

**Tabelle 48: Vergleich von Sensitivität, Spezifität und Sicherheit der verschiedenen Untersuchungsmethoden**

	<b>Klinische Symptomatik</b>	<b>Virus-isolierung</b>	<b>Ziliar-reduktionstest</b>	<b>Histologie</b>
<b>Sensitivität</b>	-	+	+	+
<b>Spezifität</b>	+	+/-	+	+
<b>Reproduzierbarkeit</b>	-	+/-	+	+
<b>Sicherheit</b>	+	-	+	+

+ = Testeigenschaft ausgeprägt      - = Testeigenschaft unzureichend

+/- = Testeigenschaft fraglich

In Tabelle 49 werden sämtliche Betrachtungen zu Aufwand und Eignung der verschiedenen Testmethoden zusammengefaßt.

Die klinische Untersuchung zeichnet sich durch ihre besonders einfache und schnelle Durchführbarkeit aus, ist jedoch in ihrer Aussage zu ungenau und daher für die Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen nicht geeignet.

Der Ziliarreduktionstest ist einer der am besten geeigneten Tests für die Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen. Er liefert eine sichere Aussage über die Erkrankung der Hühner und ist unempfindlich gegenüber einer Verfälschung durch Impfviren. Mit etwas Übung und handwerklichem Geschick ist er ohne größeren apparativen Aufwand durchführbar, und sein Ergebnis ist noch am Untersuchungstag verfügbar. Von Nachteil ist der durch die zeitliche Begrenzung der Durchführbarkeit bedingte erhöhte Personalaufwand sowie die Tatsache, daß er nur zur Untersuchung von Virusstämmen geeignet ist, welche eine Verminderung der Zilienbeweglichkeit hervorrufen.

Die **histologische Untersuchung** ist in ihrer Aussage dem ZRT vergleichbar. Sie bietet den zusätzlichen Vorteil einer dauerhaften Dokumentation. Anders als der ZRT ist die histologische Untersuchung nicht nur zum Nachweis der respiratorischen Erkrankungsform der IB geeignet. So kann eine Infektion mit nephropathogenen Stämmen, welche nur geringe Veränderungen im Respirationstrakt hervorrufen, wie z. B. der Stamm Australia T (CUMMING, 1962), anhand der histologischen Veränderungen in den Nieren nachgewiesen werden (PURCELL et al, 1976). Der Nachweis einer Infektion mit dem Stamm 4/91 könnte möglicherweise anhand histologischer Veränderungen in der Pektoralismuskulatur oder im Legedarm der erkrankten Hennen (GOUGH et al., 1992) geführt werden. Der enterotrope Stamm Morocco G ruft bei Küken deutliche respiratorische Symptome hervor (EL HOUADFI et al. 1991), während die histologischen Veränderungen im Darm nur wenig ausgeprägt sind (AMBALI and JONES, 1990).

Ein Nachweis kann daher in gleicher Weise erfolgen, wie bei Virusstämmen mit Affinität zum Respirationstrakt (histologische Untersuchung der Trachea, ZRT).

Die histologische Untersuchung wird in vielen Labors routinemäßig durchgeführt, so daß die benötigten Geräte häufig bereits vorhanden sind. Von Nachteil ist der notwendige Einsatz giftiger Chemikalien.

Die Virusisolierung im Hühnerembryo ist von allen hier durchgeführten Untersuchungsmethoden diejenige mit dem höchsten Zeit- und Personalaufwand. Ein Ergebnis ist frühestens 3 Wochen nach Ende des Infektionsversuches verfügbar, und durch den hohen Bedarf an embryonierten SPF-Hühnereiern ist der Materialaufwand beträchtlich. Zudem ist die Aussagekraft dieses Tests derjenigen aus ZRT und histologischer Untersuchung unterlegen. Die Testergebnisse sind durch die Ausscheidung von Impfvirus beeinflussbar. Es kommt auch bei durch Impfung geschützten Hühnern nach einer Belastungsinfektion zu einer Virusausscheidung, da auch nach einer erfolgreichen Impfung nicht mit einer sterilen Immunität zu rechnen ist (s. auch Kap. 5.4.2).

Die unter 4.2.7 beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß eine Bestimmung der Serumantikörper zum Nachweis eines belastbaren Impfschutzes nicht geeignet ist, da nicht nur Hühner mit IBV-spezifischen Serumantikörpern an IB erkranken, sondern auch solche Tiere, die keinen meßbaren Antikörpertiter aufweisen, vor einer Erkrankung geschützt sein können. Es liegt also keine ausreichende Korrelation zwischen der Antikörperbildung nach der Impfung und der Schutzrate vor. Die Infektion mit virulentem Virus führt bei sämtlichen Hühnern innerhalb von 7 Tagen zur Ausbildung spezifischer Serumantikörper.

**Tabelle 49: Zusammenfassender Vergleich der verschiedenen Untersuchungsmethoden**

<b>Methode</b>	<b>Klinische Usg.</b>	<b>Virusisolierung</b>	<b>Ziliarrduktionstest</b>	<b>Histologie</b>
<b>Zeitaufwand</b>	ca. 30 Minuten	Ca. 27 Stunden	5 – 6 Stunden	Ca. 12 Stunden
<b>Personalaufwand</b>	1	1-3	3-4	1
<b>Apparativer Aufwand</b>	-	Brutschrank, Bohrer, Schierlampe	Auflichtmikroskop	Einbettmaschine, Abzug, Eingießstation, Mikrotom, Wasserbad, Wärmeschrank
<b>Verbrauchsmaterial</b>	-	ca. 500 SPF-Eier	vernachlässigbar	Lösungsmittel, Färbelösungen, Paraffin
<b>Ergebnisse verfügbar</b>	sofort	nach 3 Wochen	am Untersuchungstag	nach 4 Tagen
<b>Eignung zum Nachweis der experimentellen IBV-Infektion</b>	Sensitivität zu gering	Verfälschung durch Impfvirusausscheidung, sterile Immunität ist trotz Impfschutz nicht zu erwarten	gut (nur bei Virusstämmen mit Tropismus für Respirationstrakt)	gut (ggf. auch für Virusstämme mit Tropismus für andere Organe)
<b>sonstiges</b>		Tierschutzaspekt		gute Dokumentation,
<b>Gesamtbeurteilung</b>	einfach aber zu ungenau	ungenau, späte Verfügbarkeit der Ergebnisse, hoher Arbeitsaufwand Materialaufwand (SPF-Eier)	gut geeignet, leicht durchführbar, Ergebnisse schnell verfügbar, aber Personalaufwand	gut geeignet, besonders wenn benötigte Geräte vorhanden sind, wenig Personalaufwand, aber Entsorgungsproblematik

## **5. 4 Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfungen**

### **5. 4. 1 Beurteilung der Ergebnisse von Ziliarreduktionstest und Histologie**

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von Ziliarreduktionstest und histologischer Untersuchung fällt in den ersten beiden Wirksamkeitsprüfungen auf, daß jeweils nur 55%, bzw. 32% der Tiere durch den Impfstoff geschützt sind. Dies stellt eine Diskrepanz zu der Forderung des Arzneibuches dar, daß mindestens 80% der geimpften Hühner gegen eine Infektion mit virulentem Virus geschützt sein müssen.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß der hoch passagierte **Impfvirusstamm IB H120**, der sich durch eine gute Verträglichkeit bei jungen Küken auszeichnet, nur über eine relativ **geringe Immunogenität** verfügt (BEAUDETTE and HUDSON, 1937). H120-Impfstoffe werden im Rahmen eines Impfschemas für die Erstimpfung eingesetzt. Es folgen weitere Impfungen mit dem für junge Küken weniger gut verträglichen, aber stärker immunogenen Impfstoff IB H52.

Die höhere Erkrankungsrate im Infektionsversuch der 2. Wirksamkeitsprüfung läßt sich möglicherweise durch eine **höhere Virulenz des eingesetzten Challengevirus** erklären (andere Abfüllung desselben Virusstammes, als in den Wirksamkeitsprüfungen 1 und 3).

Die hier beobachteten niedrigen Schutzraten frühzeitig geimpfter Küken stimmen mit den Untersuchungen von NAQI et al. (1998) überein, in welchen am ersten Lebenstag geimpfte Küken im homologen Infektionsversuch nur zu 26% vor einer Erkrankung geschützt waren. Um aussagekräftigere Ergebnisse über die Eignung des eingesetzten Impfstoffes zu erhalten, wäre eine **Wirksamkeitsprüfung nach der Durchführung des gesamten Impfprogrammes** notwendig.



Die rechtliche Grundlage hierfür bietet Teil 8, Abschnitt C, Nr.5 der Richtlinie 81/852/EWG, welche es dem Hersteller ermöglicht, für Impfstoffe, die Bestandteil eines Impfschemas sind, deren Beitrag zum gesamten Impfschema nachzuweisen.

#### **5. 4. 2 Beurteilung der Ergebnisse der Virusisolierung im Hühnerembryo**

Mit Hilfe der Virusisolierung im Hühnerembryo konnte in der ersten Wirksamkeitsprüfung bei 75% (erste Virusisolierung), bzw. 85% (zweite Virusisolierung) der Hühner IBV isoliert werden, in der zweiten Wirksamkeitsprüfung wurde bei 100% der Tiere IBV nachgewiesen und in der dritten Wirksamkeitsprüfung betrug der Anteil der IBV-ausscheidenden Hühner 63% nach Impfung mit dem Stamm IB-H120 und 78% nach Impfung mit IB-H52.

Bei Einsatz dieser Untersuchungsmethode werden somit die Arzneibuchanforderungen von höchstens 20% Virusausscheidern unter den Impfungen deutlicher als in allen anderen Tests überschritten.

Bei den isolierten Viren könnte es sich um Impfvirus oder um Challengevirus handeln.

Eine Erklärung für die Ausscheidung von Challengevirus ist zum einen die oben angesprochene relativ **schwach ausgeprägte Immunogenität des H120-Impfstoffes** (NAQUI et al., 1998). Möglicherweise könnte eine **Erhöhung der Impfstoffdosis** einen besseren Impfschutz bewirken. ZADURA et al. (1977) beobachteten nach der Immunisierung mit  $10^5$ , bzw.  $10^7$  EID<sub>50</sub> des Stammes IB H120 einen deutlich besseren Impfschutz als nach der Impfung mit  $10^3$  EID<sub>50</sub>.

Ziel einer Impfung ist im optimalen Fall das Ausbleiben einer Erkrankung nach der Infektion mit virulentem Virus, zumindest aber eine Milderung der Krankheitssymptome und Abnahme der Erkrankungsrate. Die Ausscheidung von virulentem Virus kann häufig verringert werden, **mit einer sterilen Immunität ist jedoch normalerweise nicht zu rechnen**. Daher muß auch bei solchen Impfstoffen, die sicher vor einer Erkrankung schützen, damit gerechnet werden, daß dennoch eine Ausscheidung von Feldvirus stattfindet. Da die Virusisolierung nur eine qualitative Aussage über die Virusausscheidung liefern kann, ist eine Unterscheidung zwischen erkrankten Tieren mit starker Virusausscheidung und geschützten Tieren ohne Krankheitssymptome, bei denen dennoch eine geringe Virusausscheidung stattfindet, nicht möglich.

In der zweiten Wirksamkeitsprüfung, in welcher der Unterschied zur ersten Wirksamkeitsprüfung nur in der Verwendung einer anderen Abfüllung des Challengevirus bestand, wurde mit sämtlichen angewandten Untersuchungstechniken eine höhere Erkrankungsrate nachgewiesen, die Virusisolierung lag sogar bei 100%. Hier war offensichtlich der Impfschutz nicht ausreichend, um bei **der höheren Virulenz des eingesetzten Challengevirus** eine Virusausscheidung zu verhindern, obwohl laut ZRT und Histologie durchaus weniger Tiere erkrankten als in der ungeimpften Kontrollgruppe.

Die in Kapitel 4.5 beschriebenen Ergebnisse zur Virusausscheidung nach einer Impfung mit der zehnfachen Impfstoffdosis zeigen, daß noch am Tag 28 p. vac. 50% der untersuchten Hühner IB-Viren ausscheiden. Auch nach der Impfung mit einfacher Dosis ist zum Zeitpunkt der Untersuchung (26 Tage p. vac.) mit einer **Ausscheidung von Impfvirus** zu rechnen. NAQI et al. (1998) gelang eine Virusisolierung aus dem Trachealsekret von am ersten Lebenstag geimpften Küken bis zu 10 Wochen nach der Impfung. Wahrscheinlich gelingt die Anzüchtung von Impfvirus sogar leichter und bereits bei geringeren Viruskonzentrationen als die

Anzüchtung von virulentem IBV, da die für die Impfung eingesetzten Virusstämme bereits an den Hühnerembryo adaptiert sind.

Die 3. Wirksamkeitsprüfung wurde für einen IB-H120- sowie für einen IB-H52-Impfstoff durchgeführt. Nach Impfung mit IB-H52 konnte bei mehr Hühnern IBV isoliert werden als nach der Impfung mit IB-H120. Diese Tatsache scheint zunächst erstaunlich, da IB-H52 eine stärkere Immunogenität besitzt, als IB-H120. Allerdings besitzt IB-H52 eine höhere Restvirulenz (WOERNLE und HAFEZ, 1992), die sich besonders bei der Impfung sehr junger Tiere auswirkt. Es ist daher anzunehmen, daß eine stärkere Ausscheidung von Impfvirus stattfindet, als nach der Impfung mit dem für junge Küken besser verträglichen Stamm IB-H120. Es wäre demnach durchaus denkbar, daß die höhere Anzahl IBV ausscheidender Hühner **nach der Impfung mit IB-H52** nicht einem schlechteren Impfschutz, sondern einer **vermehrten Ausscheidung von Impfvirus** zuzuschreiben ist.

### ***5.5 Betrachtungen zum optimalen Untersuchungszeitpunkt nach der Belastungsinfektion***

Die im Kapitel 4.4 beschriebenen Ergebnisse über den Krankheitsverlauf bei empfänglichen Hühnern zeigten vom 3. bis zum 7. Tag nach der Belastungsinfektion für sämtliche Untersuchungsmethoden positive Ergebnisse bei allen Tieren. Am 2. Tag p. i. waren alle Testmethoden außer der klinischen Untersuchung positiv.

Somit ergaben alle für die Wirksamkeitsprüfung relevanten Tests gleichbleibend gute Ergebnisse vom 2. bis zum 7. Tag nach der Infektion. Wird zusätzlich noch eine Sicherheitsspanne von je einem Tag eingeplant, so kann eine Untersuchung zwischen dem 3. und 6. Tag p. i. empfohlen werden. Für den Ziliarreduktionstest deckt sich diese Empfehlung mit den Angaben von DARBYSHIRE (1980), der beste Ergebnisse am 3., bzw. 6. Tag p. i. erhielt.

## **5.6 Betrachtungen zum Zeitabstand zwischen Impfung und Belastungsinfektion**

Die folgenden Beobachtungen ergeben sich aus den in Kapitel 4.5 beschriebenen Untersuchungsergebnissen.

Eine Woche nach der Impfung mit zehnfacher Dosis des IB-H120-Impfstoffes zeigten alle untersuchten Hühner in ZRT und histologischer Untersuchung Anzeichen einer Impferkrankung. 14 Tage nach der Impfung waren in diesen beiden Tests keine Krankheitsanzeichen mehr erkennbar. Die Untersuchungsergebnisse blieben bis zum Abschluß der Untersuchung am 35. Tag nach der Impfung negativ.

Nach einer Impfung mit der vom Hersteller empfohlenen Mindestdosis war am 20. Tag nach der Impfung (entsprechend 14 Tage zwischen Impfung und Belastungsinfektion, Untersuchung am 6. Challengetag) das Testergebnis von ZRT und Histologie noch bei einem von vier Tieren positiv.

26 Tage nach der Impfung (entsprechend 21 Tage zwischen Impfung und Belastungsinfektion, Untersuchung am 5. Challengetag) waren beide untersuchte Tiere in den ZRT und Histologie negativ.

Es ist denkbar, daß das einzige Tier, welches am 20. Tag nach der Impfung Krankheitsanzeichen zeigte, sich kurz zuvor mit Impfvirus reinfiziert hat. Für diese Annahme spricht die Tatsache, daß dieses Tier auch als einziges einen meßbaren Antikörpertiter entwickelte, ebenso wie die negativen Testergebnisse der mit zehnfacher Dosis geimpften Tiere vom 14. Tag an. ALEXANDER and GOUGH (1977) konnten noch mehr als 20 Wochen nach der Impfung eine Ausscheidung von Impfvirus über den Kot nachweisen.

Die Virusisolierung zeigt eine Ausscheidung von Impfvirus bei allen untersuchten Tieren bis zum 14. Tag nach der Impfung mit zehnfacher Dosis. An den Tagen 21 und 28 p. vac. ist die Virusisolierung noch bei jeweils einem der beiden untersuchten Tiere positiv.

Nach der Impfung mit der vom Hersteller angegebenen Mindestdosis ist am 20. Tag bei allen untersuchten Hühnern eine Virusausscheidung nachweisbar. Bei den beiden am 26. Tag untersuchten Tieren gelingt hier keine Virusanzüchtung. Allerdings beschrieben NAQI et al. (1998) eine Ausscheidung von Impfvirus noch bis zu 10 Wochen nach der Impfung.

Nach den Beobachtungen dieser Arbeit erscheint ein Zeitabstand von mindestens 21 Tagen zwischen Impfung und Belastungsinfektion bei Verwendung von ZRT oder Histologie als Untersuchungsmethode angemessen, da nach dieser Zeit nicht mehr mit einer Beeinflussung der Untersuchung durch Anzeichen einer Impferkrankung zu rechnen ist. Für den Ziliarreduktionstest stimmt diese Empfehlung mit der von DARBYSHIRE (1980) überein.

Auch wenn man davon ausgeht, daß die Erkrankung des einen Tieres am 20. Tag nach der Impfung durch eine Reinfektion mit Impfvirus verursacht wurde, erscheint ein Zeitabstand von 14 Tagen zwischen Impfung und Challengebeginn zu kurz, da zu diesem Zeitpunkt noch mit einer vermehrten Ausscheidung von Impfvirus zu rechnen ist und somit die Wahrscheinlichkeit einer Impferkrankung nach Reinfektion mit Impfvirus noch relativ hoch ist.

Wird die Virusisolierung im Hühnerembryo als Untersuchungsmethode gewählt, so sollte die Belastungsinfektion keinesfalls früher als 21 Tage nach der Impfung durchgeführt werden. Es muß aber auch beim Einhalten dieses Zeitabstandes mit einer Beeinflussung der Testergebnisse durch die Ausscheidung von Impfvirus gerechnet werden. NAQUI et al. (1998) konnten am 18. Tag nach der Impfung von Eintagsküken bei 4 von 10 Tieren Impfvirus in der Trachea nachweisen.

## ***5. 7 Beurteilung der Monographie über IB-Lebend-impfstoffe und der Entwürfe zu deren Änderung***

### **5. 7. 1 Anmerkungen zum DAB 10 / EAB 3**

Die Angaben zur Bestimmung der Wirksamkeit in der Monographie über Infektiöse-Bronchitis-Lebend-Impfstoff für Geflügel (gefriergetrocknet) beinhalten keine Alternative zur Virusisolierung im Hühnerembryo, obwohl andere Untersuchungsmethoden (Ziliarreduktionstest, histologische Untersuchung) eine bessere Aussagekraft besitzen und dabei einfacher durchzuführen sind.

Bei den Durchführungsvorschriften zur Virusisolierung erweist sich das Abschaben der Trachealschleimhaut als schwierig. Einfacher und ebenso erfolgreich ist das Zerschneiden der längs eröffneten Luftröhre in 2 mm lange Stücke, und Lösen des virushaltigen Sekretes durch gründliches Schütteln in Tryptosephosphatbouillon.

Die Forderung, ein Inokulat bereits dann als virushaltig zu betrachten, wenn ein einzelner Embryo nach dem 2. Tag abstirbt, erscheint zu streng. Nach eigenen Beobachtung kommt es über die gesamte Brutperiode hinweg zum unspezifischen Absterben einzelner Embryonen. Sinnvoller ist eine positive Beurteilung erst beim Absterben von 2 oder mehr Embryonen. Das Auftreten virusspezifischer Veränderungen bedeutet jedoch wie in der Monographie gefordert vom ersten Embryo an ein positives Testergebnis.

Die in Kapitel 4.6 beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß die Eyedrop-Applikation zur Infektion der Hühner mit Challengevirus ebenso geeignet ist, wie die intratracheale Infektion. Sie ist leichter durchzuführen und weniger belastend für die Tiere und sollte daher zumindest als Alternative in die Monographie aufgenommen werden.

Es sollte in der Monographie darauf hingewiesen werden, daß die Anforderungen an die Wirksamkeit gegebenenfalls nicht für jeden einzelnen Impfstoff, sondern für das gesamte Impfschema gelten, was auch den Angaben der Richtlinie 81/852/EWG (Teil 8, Abschnitt B, Nr. 5) entspricht.

### **5. 7. 2 Anmerkungen zum ersten Entwurf für die Neufassung der Monographie vom April 1998 (siehe 2.6.3.1)**

Im ersten Entwurf zur Neufassung der Monographie über Lebendimpfstoffe gegen die Infektiöse Bronchitis wird für die Wirksamkeitsprüfung zunächst die Impfung der Hühner mit dem vom Hersteller angegebenen Mindesttiter gefordert. Später ist von der Verabreichung einer Impfstoffdosis die Rede, welche in der Regel mehr als den angegebenen Mindesttiter enthält.

Der Entwurf sieht einen Zeitabstand von 14 Tagen zwischen Impfung und Belastungsinfektion sowie eine Untersuchung der Tiere am 6. Tag nach der Infektion vor. Dies entspricht einer Untersuchung der Hühner am 20. Tag nach der Impfung. Dieser Zeitraum erscheint aus den in Kapitel 5.5 dargelegten Gründen zu kurz. Es ist vielmehr empfehlenswert, eine Belastungsinfektion, wie im DAB 10 / EAB 3 gefordert, frühestens nach 21 Tagen durchzuführen.

Die Aufnahme einer Untersuchung der Zilienaktivität als Alternative zur Virusisolierung im Hühnerembryo sollte um den Hinweis ergänzt werden, daß die Untersuchung innerhalb von 3 bis 4 Stunden nach dem Töten der Tiere abgeschlossen sein muß. Sinnvoll ist die vorgeschriebene Applikation des Challengevirus als Augentropfen, da diese Applikationsform bei gleicher Wirksamkeit einfacher durchzuführen ist als die im EAB 3 geforderte intratracheale Infektion (s. Kap. 4.6).

Bei den Worten „longer part of the trachea“ dürfte es sich um einen Druckfehler handeln. Gemeint ist offensichtlich „lower part“, wie auch im zweiten Entwurf vom März 1999 geschrieben.

Bei der Auswertung des Ziliarreduktionstests werden solche Tiere als nicht durch den Impfstoff geschützt betrachtet, die „eine extreme Verringerung der Zilienaktivität aufweisen“, während gesunde Tiere eine „normale Zilienaktivität“ zeigen sollen. Diese Angaben sind zu ungenau. Besser ist die Bewertung der einzelnen Querschnitte nach einem Punktesystem wie es im Kapitel 3.3.2 beschrieben ist. Für gesunde Tiere ist eine Zilienaktivität von mehr als 50% zu fordern.

Die Virusisolierung aus Trachealabstrichen wird für Fälle vorgeschlagen, in denen ein Ziliarreduktionstest nicht durchführbar ist. Dies gilt aber gerade für diejenigen Formen der IB, bei denen die Trachea nicht der Hauptangriffspunkt des Virusstammes ist. Gerade bei diesen IBV-Stämmen erscheint es sinnvoller, eine Virusisolierung aus den hauptsächlich betroffenen Organen (z. B. Nieren) durchzuführen, als aus Trachealabstrichen. Als Alternative besser geeignet wäre hier die histologische Untersuchung der hauptsächlich betroffenen Organe.

Die Aufteilung der Trachea in einen oberen, mittleren und unteren Abschnitt ist für die Virusisolierung inakzeptabel, da sie eine Verdreifachung des Untersuchungsaufwandes bedeutet, ohne dabei zusätzliche Erkenntnisse zu vermitteln. Besser ist die Verwendung der gesamten Luftröhre. Im Falle einer histologischen Untersuchung wäre allerdings eine Untersuchung von drei verschiedenen Abschnitten der Trachea überlegenswert, da hier durchaus mit zusätzlichen Erkenntnissen zu rechnen ist. Andererseits konnten in den hier durchgeführten Untersuchungen mit einer einzelnen Probe aus der Mitte der Luftröhre gute Ergebnisse erzielt werden. Zudem deuten die Ergebnisse des Ziliarreduktionstests darauf hin, daß beim Vorliegen einer Infektiösen Bronchitis im allgemeinen die gesamte Luftröhre betroffen ist.



### **5. 7. 3 Anmerkungen zum zweiten Entwurf für die Neufassung der Monographie vom März 1999 (siehe 2.6.3.1)**

Im zweiten Entwurf zur Neufassung der Monographie über IB-Lebendimpfstoff besteht keine widersprüchliche Formulierung bezüglich der Dosierung des Impfstoffes.

Der Zeitabstand zwischen Impfung und Belastungsinfektion ist für den Ziliarreduktionstest mit 14 Tagen noch immer zu kurz, während er für die Virusisolierung auf 21 Tage festgelegt wurde.

Das Töten der Tiere nach 3 bis 6 Tagen deckt sich mit den aus dieser Arbeit abgeleiteten Empfehlungen.

Der Hinweis auf die Notwendigkeit der Untersuchung auf Zilienaktivität innerhalb von 2 bis 3 Stunden nach der Gewinnung der Proben ist hilfreich.

Ansonsten gelten die bei der Besprechung der aktuellen Monographie und des Entwurfes von 1998 beschriebenen Anmerkungen entsprechend.

## **5. 8 Eigener Vorschlag einer Monographie zur Wirksamkeitsprüfung für Lebendimpfstoffe gegen die IB**

In dem unten beschriebenen eigenen Monographievorschlag sind die aus dem DAB 10 wörtlich übernommenen Anteile kursiv gedruckt.

*Die Bestimmung der Wirksamkeit ist für jede der in der Beschriftung angegebenen Anwendungsarten und für jeden Virusstamm des Impfstoffs durchzuführen. Ist ein Impfstoff Bestandteil eines vom Hersteller empfohlenen Impfschemas, so genügt der Nachweis der Wirksamkeit des gesamten Impfschemas.*

*Empfängliche Küken aus demselben SPF-Bestand, die das Mindestalter für die Impfung haben, werden verwendet.*

*Jedes von mindestens 20 dieser Küken enthält für die angegebene Anwendungsart ein Volumen des gelösten Impfstoffs, das die Virusmenge enthält, die dem Mindesttiter in der Beschriftung entspricht. 10 Küken werden als Kontrolltiere gehalten.*

*Nach mindestens 21 Tagen (und spätestens vor Ablauf der vom Hersteller angegebenen Mindestwirkdauer des Impfstoffes) wird jedes Küken intratracheal oder per eyedrop mit  $10^3$  EID<sub>50</sub> eines virulenten Stammes des aviären, infektiösen Bronchitis-Virus belastet, der denselben Serotyp hat wie der Stamm, für den die Prüfung auf Wirksamkeit durchgeführt wird.*

### 1) Histologische Untersuchung

*Zwischen dem dritten und sechsten Tag nach der Belastung werden die Küken getötet und die Trachea wird entnommen.*

Es werden histologische Querschnitte jeweils aus dem oberen, mittleren und unteren Teil der Luftröhren angefertigt, welche auf Entzündungsanzeichen des Trachealepithels und seinen Besatz mit Kinozilien untersucht werden.

Hühner, in deren Tracheen eine Epitheldegeneration mit Zilienverlust zu beobachten ist, gelten als an IB erkrankt.

Bei Virusstämmen, die bevorzugt Veränderungen in anderen Organen als dem Respirationstrakt hervorrufen, kann der Erkrankungsnachweis durch die histologische Untersuchung der hauptsächlich betroffenen Organe erfolgen.

## 2) Ziliarreduktionstest:

Als alternative Untersuchungsmethode kann eine Untersuchung der Zilienbeweglichkeit (Ziliarreduktionstest) durchgeführt werden.

Hierzu werden aus der Trachea 10 dünne Querschnitte angefertigt (3 aus dem oberen, 4 aus dem mittleren und 3 aus dem unteren Teil der Luftröhre) und mikroskopisch auf die Zilienbewegung ihres Epithels untersucht. Die Untersuchung muß innerhalb der ersten 2 bis 3 Stunden nach dem Töten der Tiere erfolgen.

Für die Zilienaktivität jedes Trachealringes werden wie folgt Punkte vergeben:

- 0 Punkte = keine Zilienbewegung erkennbar
- 1 Punkt = ca. 25 % Zilienbewegung
- 2 Punkte = ca. 50 % Zilienbewegung
- 3 Punkte = ca. 75 % Zilienbewegung
- 4 Punkte = 100 % Zilienbewegung

Die Addition der einzelnen Punktzahlen der Ringe ergibt für jede Trachea eine Gesamtpunktzahl zwischen 0 und 40 Punkten. Ein Tier gilt als an IB erkrankt, wenn die Zilienbeweglichkeit in der Trachea weniger als 50% beträgt, das heißt bei einer Gesamtpunktzahl von weniger als 20.

### 3) Virusisolierung im Hühnerembryo

Wenn weder Ziliarreduktionstest noch histologische Untersuchung eingesetzt werden können, wird eine Virusisolierung im embryonierten Hühnerei durchgeführt.

Die Tracheen werden längs eröffnet und in ca. 2 mm breite Stücke geschnitten. Diese werden *jeweils in ein steriles Röhrchen mit 3 ml Tryptosenährmedium, das ein Antibiotikum enthält, überführt* und gründlich geschüttelt.

*Von jedem Röhrchen werden 0,2 ml in die Allantoishöhle von je fünf 9 bis 11 Tage alten Bruteiern von Hühnern verimpft. Die in den ersten 24 h gestorbenen Embryonen werden als nicht spezifisch eliminiert. Mindestens 4 von 5 Embryonen müssen diesen Zeitraum überleben, sonst sind 5 neue embryonierete Eier zu beimpfen.*

*Nach 7 Tagen werden die verbleibenden Embryonen untersucht. Wenn zwei oder mehr Embryonen aus einer Reihe absterben oder mindestens ein Embryo charakteristische Läsionen aufweist, muß das Inokulum als virushaltig betrachtet werden. Das Ergebnis der Prüfung ist nur dann endgültig negativ, wenn drei aufeinanderfolgende Passagen erfolgt sind.*

*Der Impfstoff oder das Impfprogramm entspricht der Prüfung, wenn höchstens 20 Prozent der geimpften Tiere im Test als IB positiv beurteilt werden, jedoch mindestens 80 Prozent der Kontrolltiere.*

## 6 Zusammenfassung

Für die Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen gegen die infektiöse Bronchitis der Hühner wurden Untersuchungsmethoden zum Nachweis einer experimentellen Infektion erarbeitet. Diese Verfahren sollen als Alternative zu der im DAB 10, bzw. EAB 3 vorgeschriebenen Virusisolierung im Hühnerembryo eingesetzt werden. Folgende Testmethoden wurden im Hinblick auf ihre Eignung zum Nachweis eines Impfschutzes sowie hinsichtlich des für ihre Durchführung benötigten Zeit- und Materialaufwandes mit der Virusisolierung im Hühnerembryo verglichen: Ziliarreduktionstest, histologische Untersuchung der Trachea, klinische Untersuchung und Antikörperbestimmung.

Als besonders geeignet zur Unterscheidung zwischen erkrankten und durch Impfstoff geschützten Hühnerküken erwiesen sich der Ziliarreduktionstest und die histologische Untersuchung der Trachea. Beide Untersuchungen sind einfacher durchzuführen als die Virusisolierung, und ihre Ergebnisse sind schneller verfügbar. In Spezifität und Reproduzierbarkeit sind sie der Virusisolierung sogar überlegen. Zudem sind ihre Ergebnisse, anders als die der Virusisolierung, unempfindlich gegenüber einer Verfälschung durch die Ausscheidung von Impfvirus. Die klinische Untersuchung erscheint aufgrund ihrer unzureichenden Sensitivität für einen sicheren Nachweis einer IBV-Infektion nicht geeignet. Die Ausbildung von Serumantikörpern nach der Impfung erwies sich als unregelmäßig. Zudem waren nicht alle Tiere, bei denen IBV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten, vor einer Belastungsinfektion geschützt.

In dieser Arbeit wird eine Neufassung des Abschnittes über die Wirksamkeitsprüfung in der Monographie für Lebendimpfstoffe gegen die Infektiöse Bronchitis der Hühner vorgeschlagen (s. Kap. 5.8). Die in der Monographie beschriebenen Angaben zum Untersuchungszeitpunkt nach der Belastungsinfektion, zur erforderlichen Wartezeit zwischen Impfung und

Belastungsinfektion und zur Applikationsform des Challengevirus wurden auf ihre Eignung überprüft.

Alle oben aufgeführten Testmethoden erzielten optimale Untersuchungsergebnisse zwischen dem zweiten und dem siebten Tag nach der Infektion. Unter Einbeziehung einer Sicherheitsspanne wird daher eine Untersuchung der Küken zwischen dem dritten und sechsten Tag p. i. empfohlen.

Eine Beeinflussung der Testergebnisse durch impfvirusinduzierte Krankheitssymptome konnte 20 Tage nach der Impfung vereinzelt im Ziliarreduktionstest und in der histologischen Untersuchung beobachtet werden. Bei der Virusisolierung trat diese Beeinflussung sogar regelmäßig auf. Am 26. Tag nach der Impfung waren in keiner der angewandten Untersuchungsmethoden impfvirusbedingte Veränderungen erkennbar. Die im DAB 10 geforderte Wartezeit von 3 Wochen zwischen Impfung und Belastungsinfektion sollte daher nicht unterschritten werden.

Die Applikation des Belastungsvirus als Augentropfen erwies sich zur Infektion der Hühner als ebenso geeignet wie die intratracheale Applikation und kann daher alternativ eingesetzt werden.

Die Impfung mit dem Stamm IB H120 konnte in sämtlichen durchgeführten Untersuchungen nur eine Schutzrate von maximal 55 % erzielen. Daher wird empfohlen, die Forderung des DAB 10, bzw. EAB 3 nach einer Schutzrate von 80 % nicht auf die Wirksamkeitsprüfung einzelner Impfstoffe, sondern auf die Prüfung des gesamten Impfprogramms zu beziehen, wie es auch die Richtlinie 81/852/EWG vorsieht.

## 7 Summary

### **Comparison of several methods of demonstrating an experimental infection with infectious bronchitis virus in vaccine immunogenicity testing.**

The purpose of this study is the development of tests for the detection of an experimental infection with avian infectious bronchitis virus in the immunogenicity testing of vaccines. These tests are supposed to be used as an alternative to the virus isolation in embryonated chicken eggs, which is the only method described in the European Pharmacopoeia. The following tests were compared with virus isolation in embryonated chicken eggs, as to their ability of demonstrating protection against infectious bronchitis and concerning the expense of time and material they require: ciliar reduction test, histological investigation of the trachea, clinical examination and testing for antibodies against IBV.

The examination of the ciliar activity of tracheal explants (ciliar reduction test, CRT) and the histological investigation of the trachea proved to be the most reliable method for the differentiation between infected and none-infected chickens. Both techniques are easier to perform than virus isolation, and their results are earlier available. Their specificity and reproducibility are even superior to virus isolation. In contrast to virus isolation the results of CRT and histology are not influenced by the shedding of vaccine virus. Due to its insufficient sensitivity, the clinical examination is not a reliable method for the proof of an IBV-Infection. Antibody production after immunisation was irregular, and not all of the chickens which produced antibodies were protected against the challenge virus.

This study recommends a revision of the instructions on immunogenicity testing in the monography on avian infectious bronchitis. In order to find optimal conditions for the performance of the immunogenicity testing, studies were carried out to find out the best moment for the examination of the chickens after challenge infection,

the time required between vaccination and challenge infection and a suitable way of administering the challenge virus.

All methods performed in this study had very good results between the second and the seventh day after challenge infection. To further enhance reliability, the testing period is restrained to the days three to six after infection.

Twenty days after vaccination, some chickens showed symptoms of disease in CRT and histological examination, and IBV could be isolated from all of the examined tracheas. However after twenty-six days no changes caused by the vaccine virus could be found. Thus the time interval between immunisation and challenge infection should not be less than twenty-one days, just as required in the European Pharmacopoeia.

The eyedrop application of challenge virus was as effective as the intratracheal infection and can therefore be used as an alternative.

In this study the rate of protection after vaccination with strain IB H120 never exceeded 55 %, although the required rate of protection in the European Pharmacopoeia is 80 %. Thus it is recommended to apply the demand of an 80 % protection rate not to the individual vaccine but to the complete vaccination program, as assigned in the EU directive 81/852.



## 8 Literaturverzeichnis

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.

AKERS, T.G. and CUNNINGHAM, C.H. (1968):

Replication and cytopathogenicity of avian infectious bronchitis virus in chicken embryo kidney cells.

Archiv für die gesamte Virusforschung **25**, 30-37.

AMBALI, A.G. and JONES, R.C. (1990):

Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus.

Avian Diseases **34**, 809-817

ANDRADE, L.F., VILLEGAS, P., FLETCHER, O.J. and LAUDENCIA, R. (1982):

Evaluation of ciliary movement in tracheal rings to assess immunity against infectious bronchitis virus.

Avian Diseases **26**, 805-815.

ASPLIN, F.D. (1948):

Identification of infectious bronchitis in England.

The Veterinary Record **60**, 485-486.

BEAUDETTE, F.R. and HUDSON, C.B. (1937):

Cultivation of the virus of infectious bronchitis.

Journal of the American Veterinary Medical Association **90**, 51-60.

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.

BINGHAM, R.W., MADGE, M.H. and TYRELL, G.A.J. (1975):

Haemagglutination by avian infectious bronchitis virus – a coronavirus.

Journal of General Virology **28**, 381-390.

BISGAARD, M. (1976):

Influence of infectious bronchitis virus on egg production, fertility, hatchability and mortality rate in chickens.

Nordisk Veterinaermedicin **28**, 368-376.

BRAUNE, M.O. and GENTRY, R.F. (1965):

Standardization of the fluorescent antibody technique for the detection of avian respiratory viruses.

Avian Diseases **9**, 535-545.

BROADFOOT, D.I. and SMITH, W.M., Jr. (1954):

Effects of infectious bronchitis in laying hens on egg production, per cent unsetting eggs and hatchability.

Poultry Science **33**, 653-655.

BROADFOOT, D.I., POMMEROY, B.S. and SMITH JR., W.M. (1956):

Effects of infectious bronchitis in baby chicks.

Poultry Science **35**, 757-762.

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.

BÜLOW, V. VON (1964):

Züchtung verschiedener Stämme des Hühnerbronchitisvirus vom Typ Massachusetts und Connecticut in Zellkulturen aus Hühnerembryonieren. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **77**, 283-286.

BÜLOW, V. VON (1967):

Infektiöse Bronchitis der Hühner. IV. Charakterisierung eines neuen Feldstammes des IB-Virus (IBV 10). Zentralblatt für Veterinärmedizin B **14**, 151-162.

CAVANAGH, D. (1998):

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

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. Herausgeber Murphy, F.A., Fouquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Summers, M.D. Springer Verlag, Wien – New York, S. 407-411.

CAVANAGH, C., DARBYSHIRE, J.H., DAVIS, P. UND 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 glycopolyptide S2 but not 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 glycopolyptide S2 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells.

Journal of General Virology **67**, 1443-1448.

CAVANAGH, D. and NAQI, S.A. (1997):

Infectious bronchitis. In: Diseases of Poultry, 10. Auflage. Herausgeber Calnek, B.W. with Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R. and Saif, Y.M.

Iowa State University Press, Ames, Iowa. S. 511-526.

CHOMIAK, T.W., LUGINBUHL, R.E., JUNGHERR, 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, J.K., 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.

COLWELL, W.M. and LUKERT, P.B. (1969):

Effects of avian infectious bronchitis virus (IBV) on tracheal organ cultures.

Avian Diseases **13**, 888-894.

COOK, J.K.A. (1983):

Isolation of a new serotype of an infectious bronchitis-like virus from chickens in England.

The Veterinary Record **112**, 104-105.

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.

CORBO, L.J., CUNNINGHAM, C.H. (1959):

Haemagglutination by trypsin-modified infectious bronchitis virus.

American Journal of Veterinary Research **20**, 876-883.

CORIA, M.F. (1969):

Intracellular avian infectious bronchitis virus detection by fluorescent antibody techniques in non-avian kidney cell cultures.

Avian Diseases **13**, 540-547.

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. and HITCHNER, S.B. (1975a):

pH stability studies with avian infectious bronchitis virus (Coronavirus) strains.

Journal of Virology **15**, 430-432.

COWEN, B.S. and HITCHNER, S.B. (1975b):

Serotyping of avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralisation test.

Avian Diseases **19**, 583-595.

CRINION, R.A.P., BALL, R.A. and HOFSTAD, M.S. (1971):

Abnormalities in laying chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old.

Avian Diseases **15**, 42-48.

CRINION, R.A.P. AND HOFSTAD, M.S. (1972):

Pathogenicity of two embryo-passage levels of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages.

Avian Diseases **16**, 967-972.

CUMMING, R.B. (1962):

The etiology of uraemia of chickens.

Australian Veterinary Journal **38**, 554.

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. (1970):

Studies on Australian infectious bronchitis virus IV. Apparent farm-to-farm airborne transmission of infectious bronchitis virus.

Avian Diseases **14**, 191-195.

CUNNINGHAM, C.H. (1966):

Newer information on the properties of infectious bronchitis virus.

13<sup>th</sup> World's Poultry Congress, Kiev 1966, S. 416-418.

CUNNINGHAM, C.H. (1970):

Avian infectious bronchitis.

Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine **14**, 105-148.

CUNNINGHAM, C.H., SPRING, M.P. and NAZERIAN, K. (1972):

Replication of avian infectious bronchitis virus in African green monkey kidney cell line (VERO).

Journal of General Virology **16**, 423-427

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.

DARBYSHIRE, J.H. (1980):

Assessment of cross-immunity in chickens to strains of avian infectious bronchitis virus using tracheal organ cultures.

Avian Pathology **9**, 179-184

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.

DARBYSHIRE, 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 of Virology **61**, 227-238.

DAVELAAR, F.G., KOUWENHOVEN, B. and BURGER, A.G. (1984):

Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in the Netherlands.

Veterinary Quarterly **6**, 114-120.

DELAPLANE, J.P.(1951):

Technique for the isolation of infectious bronchitis or Newcastle virus including observations on the use of streptomycin in overcoming bacterial contaminants. Proc. 19<sup>th</sup> Ann. Northeast. Conf. Lab. Work. Pull. Dis. Control, North Carolina State Coll., Raleigh 1947.

Veterinary Bulletin **21**, Ref. No. 390.

DE WIT, J.J., KOCH, G., KANT, A. and VAN ROOZELAAR, D.J. (1995):

Detection by immunofluorescent assay of serotype-specific and group-specific antigens of infectious bronchitis virus in tracheas of broilers with respiratory problems.

Avian Pathology **24**, 465-474.

DUTTA, S.K. (1975):

Morphological changes of chicken tracheas and tracheal organ cultures infected with avian infectious bronchitis virus studied in scanning electron microscope.

Avian Diseases **19**, 429-436.



DRURY, L.N., PATTERSON, W.C. and BEARD, C.W. (1969):

Ventilating poultry houses with filtered air under positive pressure to prevent airborne diseases.

Poultry Science **48**, 1640-1646.

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.

II. International Symposium on Infectious Bronchitis, Rauischholzhausen, Germany, June 3-6, 1991, S. 127-136.

ENDO-MUNOZ, L.B. and FARAGHER, J.T. (1989):

A fluorescence test in allantoic cells for the detection of infectious bronchitis virus.

Australian Veterinary Journal **66**, 338-340.

FENNER, F.J., GIBBS, E.P.J, MURPHY, F.A., ROTT, R., STUDDERT, M.J. und WHITE, D.O. (1993):

Coronaviridae. In: Veterinary Virology, 2. Auflage

Academic Press. Inc., San Diego, California, S. 785-822.

FRITZSCHE, K., STUMPEL, M., TOUCAS, L. und BILLON, I. (1969):

Vergleichende Untersuchungen über die Pathogenität, die Histopathogenese und das Immunisierungsvermögen von zwei attenuierten Virusstämmen der Infektiösen Bronchitis der Hühner.

Zentralblatt für Veterinärmedizin B **16**, 193-212.

GILLETTE, K.G. (1973):

Plaque formation by infectious bronchitis virus in chicken embryo kidney cultures.

Avian Diseases **17**, 369-378.

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**, 408-411.

HANDBERG, K.J. and JØRGENSEN, P.H. (1998):

Detection of IBV nucleocapside gene and spike glycoprotein genes in tracheal tissues from experimentally infected chickens by RT-PCR.

II. International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry, Rauischholzhausen, Germany, 15-18 June 1998, S. 343-351.

HANSON, L. E. (1964):

Properties of chicken hepatitis virus.

Avian Diseases **8**, 196-202

HINZ, K.H. (1993):

Pasteurellaceae. In: Kompendium der Geflügelkrankheiten, 5. Auflage.

Herausgeber Siegmann, O.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. S. 208-215.

HOFSTAD, M.S. (1984):

Avian infectious bronchitis. In: Diseases of Poultry, 8. Auflage.

Herausgeber Hofstad et al.

Iowa State University Press, Ames, Iowa. S. 429-443.

HOFSTAD, M.S. and YODER, H.W. (1966):

Avian infectious bronchitis virus: Distribution in tissues of chicks.

Avian Diseases **10**, 230-240.

HOPKINS, S.R. (1974):

Serological comparison of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolates.

Avian Diseases **18**, 231-239.

HOPKINS, S.R. and YODER, H.W. (1986):

Reversion to virulence of chicken-passaged infectious bronchitis vaccine virus.

Avian Diseases **30**, 221-223.

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.

JOHNSON, R.B. and MARQUARDT, W.W. (1975):

The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant virus variable serum method in chicken tracheal cultures.

Avian Diseases **19**, 82-90.

JOHNSON, R.B. and MARQUARDT, W.W. (1976):

Strains of infectious bronchitis virus on the Delmarva peninsula and in Arkansas.

Avian Diseases **20**, 382-386.

JUNGHERR, E.L., CHOMIAK, T.W. and LUGINBUHL, R.E. (1956):

Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus.

60<sup>th</sup> Annual Meeting of the US Livestock Sanitary Association, Chicago (Proceedings), S. 203-209.

KALETA, E.F. (1993):

Herpesviridae. In: Kompendium der Geflügelkrankheiten, 5. Auflage.  
Herausgeber Siegmann, O.  
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. S. 171-180.

KOCH, G., KANT, A., VOS, J.G. and DE BOER, G.F. (1998):

Rapid detection of infectious bronchitis virus by nucleoprotein specific antigen capture assay.  
II. International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry, Rauischholzhausen, Germany, 15-18 June 1998, S. 168-172.

KÖNIG, H.E. und LIEBICH, H.G. (2000):

Anatomie und Propädeutik des Geflügels. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis.  
Schattauer-Verlag, Stuttgart.

KRAFT, W. (1997):

Bewertung von Laborbefunden in der tierärztlichen Praxis. In: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 4. Auflage, Herausgeber Kraft, W. und Dürr, U.M.  
Schattauer-Verlag, Stuttgart, S. 34-36.

KWON, H.M., JACKWOOD, M.W., BROWN, T.P. and HILT, D.A. (1993):

Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens.  
*Avian Diseases* **37**, 149-156.

LE GROS, F.X. (1998):

Serotyping studies on recent IBV isolates from France and various regions in the world.

II. International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry, Rauischholzhausen, Germany, 15-18 June 1998, S. 205-209.

LOHR, J.E. (1980):

Infectious bronchitis agar-gel precipitin test. Use of infected allantoic fluid as antigen.

Avian Diseases **24**, 463-467.

LOOMIS, L.N., CUNNINGHAM, C.H., GRAY, M.L. and THORPE, F.J. (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 and detection of infectious bronchitis virus subtypes by immunofluorescence.

Avian Diseases **14**, 9-24.

LUKERT, P.D. (1966):

Immunofluorescence of avian infectious bronchitis virus in primary chicken embryo kidney, liver, lung and fibroblast cell cultures.

Archiv für die gesamte Virusforschung **19**, 265-272.

LUKERT, P.D. (1969):

Differentiation of avian infectious bronchitis virus serotypes by immunofluorescence.

Avian Diseases **13**, 847-852.

MACDONALD, J.W. and MCMARTIN (1976):

Observations on the effects of the H52 and H120 vaccine strains of the infectious bronchitis virus in the domestic fowl.

*Avian Pathology* **5**, 157-173.

MACDONALD, J.W., RANDALL, C.J. and MCMARTIN, D.A. (1980):

An inverse age resistance of chicken kidneys to infectious bronchitis virus.

*Avian Pathology* **9**, 245-259.

MARQUARDT, W.W., KADAVIL, S.K. and SNYDER, D.B. (1982):

Comparison of ciliary activity and virus recovery from tracheas of chickens and humoral immunity after inoculation serotypes of avian infectious bronchitis virus.

*Avian Diseases* **26**, 828-834.

MATHEY, W.J. (1965):

Avian tracheal rings.

*Poultry Science* **44**, 1465-1467.

MOHANTY, S.B., DEVOLT, H.M. and FABER, J.E. (1964):

A fluorescent antibody study of infectious bronchitis virus.

*Poultry Science* **43**, 179-182.

MONREAL, G.(1993):

Adenoviridae. In: Kompendium der Geflügelkrankheiten, 5. Auflage.

Herausgeber Siegmann, O.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg. S. 165-171.

MOORE, R.W. and FLOWERS, A.L. (1959):

The development of chicken embryo lethal strain of avian encephalomyelitis virus.

Avian Diseases **3**, 239-244.

MOSIMANN, W. und KOHLER, T. (1990):

Regio olfactoria. In: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 146-148.

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., GAY, K., PATALA, P.S. and WANG, C. (1998):

Age-related mucosal immunity to IBV in chickens.

II. International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus

Infections in Poultry, Rauschholzhausen, Germany, 15-18 June 1998,

S. 327-331.

NAGANO, H., TSUCHIMOTO, M., HOHDATSU, T., YAMAGAMI, T., IDE, 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.

NEUMANN, U. and 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.

OTSUKI, L., YAMAMOTO, H. and TSUBOKURA, M. (1979):

Studies on avian infectious bronchitis virus: I. Resistance of IBV to chemical and physical treatments.

Archives of Virology **60**, 25-32.

OTSUKI, K. and TSUBOKURA, M. (1981):

Plaque formation of avian infectious bronchitis virus in primary chick embryo fibroblast cells in the presence of trypsin.

Archives of Virology **70**, 315-320.

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.

PICAULT, J.P., DROUIN, P., GUITTET, M., BENNEJEAN, G., PROTAIS, J.,

L'HOSPITALIER, R., GILLET, J.P., LEMANDE, J. and LE BACHELIER, A. (1986):

Isolation, characterization and preliminary cross-protection studies with a new pathogenic avian infectious bronchitis virus (strain PL-84084).

Avian Pathology **15**, 367-383.

PICAULT, J.P. (1995):

L'épizootie récente de Bronchite Infectieuse aviaire en France: importance, évolution et étiologie. Journées de la recherche avicole, Centre de Congrès, D'Anger, S. 177-178.

PURCELL, D.A. and CLARKE, J.K. (1972):

The replication of infectious bronchitis virus in fowl trachea.

Archiv für die gesamte Virusforschung **39**, 248-256.



PURCELL, D.A. and MCFERRAN, J.B. (1972):

The histopathology of infectious bronchitis in the domestic fowl.  
Research in Veterinary Science **13**, 116-122.

PURCELL, D.A., THAM, V.L. and SURMAN, P.G. (1976):

The histopathology of infectious bronchitis in fowls infected with a nephrotropic „T“ strain of virus.  
Australian Veterinary Journal **52**, 85-91.

SATYLGANOV, T.T. (1971):

Trudy vsesoyuznogo Institut Veterinario Sanitarii **38**, 27-34,  
zitiert nach WOERNLE und HAFEZ (1992).

SCHALK, A. F., and HAWN, M.C. (1931):

An apparently new respiratory disease of baby chicks.  
Journal of the American Veterinary Medical Association **78**, 413-422.

SEVOIAN, M. and LEVINE, P.P. (1957):

Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production and egg quality of laying chickens.  
Avian Diseases **1**, 136-146.

SIMIC, V. (1972):

Investigation of the distribution and localization of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus in the organism of artificially infected fowls by the use of immunofluorescence.  
Acta Veterinaria, Beograd **22**, 201-208.

STUKE, P. und KALETA, E.F. (1970):

Untersuchungen über die Bedeutung des Getreideschimmelkäfers  
*Alphitobius diaperinus* für die Verbreitung der Infektiösen Bronchitis der  
Hühner.

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **77**, 38-41.

VAN ROEKEL, H., CLARKE, M.K., BULLIS, K.L., OLESIUk, O.M. and SPERLING,  
F.G. (1951):

Infectious bronchitis.

American Journal of Veterinary Research **12**, 140-146.

WIZIGMANN, G., WESSLING, E., und DORN, P. (1981):

Zur Diagnose der Infektiösen Bronchitis des Huhnes mit Hilfe der  
Immunfluoreszenz.

Deutsche tierärztliche Wochenschrift **88**, 514-516.

WOERNLE, H. (1959):

Diagnose der Infektiösen Bronchitis der Hühner mit Hilfe der  
Präzipitationsreaktion im festen Agarmedium.

Monatshefte der Tierheilkunde **11**, 154-167.

WOERNLE, H. (1961):

Impfversuche mit Adsorbat-Vakzine bei der Infektiösen Bronchitis des  
Huhnes.

Monatshefte Tierheilkunde **13**, 136-142.

WOERNLE, H. (1968):

Probleme der Impfung gegen die Infektiöse Bronchitis (IB) des Huhnes.

Tierärztliche Umschau **23**, 58-63.

WOERNLE, H. und HAFEZ, H.M. (1992):

Infektiöse Bronchitis. In: Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels: Ein Handbuch für Wissenschaft und Praxis, Band I. Herausgeber Heider, G. und Monreal, G. unter Mitwirkung von Mészáros, J. Gustav-Fischer-Verlag, Jena – Stuttgart. S. 787-815.

Yachida, S., Aoyama, S., Takahashi, N., Iritani, Y. and Katagiri, K. (1981):

Influence of temperature of incubation on chicken embryo tracheal organ cultures and chick embryos infected with strains of avian infectious bronchitis virus.  
Research in Veterinary Science **31**, 14-18.

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 virus antigen from experimentally infected chickens by indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibody.  
Avian Diseases **34**, 246-52.

YATES, V.J. and FRAY, D.E. (1957):

Observations on a chicken embryo lethal orphan (CELO) virus.  
American Journal of Veterinary Research **18**, 657-660.

ZANELLA, A. and MARTINO, P.A. (1998):

Avian infectious bronchitis in Italy: Persistence of nephropathogenic strains related to serotype AZ23/74.

II. International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry, Rauischholzhausen, Germany, 15-18 June 1998, S. 189-197.

ZADURA, J., ROSZKOWSKI, J. and KARPINSKA, E. (1977):

Histological investigations of the trachea of chickens vaccinated against infectious bronchitis.

Bulletin of the Veterinary Institute in Palawy **21** 82-84.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. C. Jungbäck, Abteilung Virusimpfstoffe I, Paul-Ehrlich-Institut - Bundesamt für Sera und Impfstoffe, für die Bereitstellung des Themas und des damit verbundenen Arbeitsplatzes, für die vielen Anregungen und Gespräche sowie für ihre Geduld in der Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. E. F. Kaleta für die Vertretung der Arbeit an der Justus-Liebig-Universität Gießen und für seine besonders freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Literatursuche und bei der Fertigstellung dieses Werkes.

Bei Frau Dr. B. Küchler möchte ich mich für die Überlassung der Fotovorlage für Abb. 3 bedanken sowie für ihre Unterstützung in Rat und Tat, insbesondere auch bei der Zusammenstellung der rechtlichen Grundlagen.

Frau I. Schildger danke ich für die freundliche Einweisung und die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Den Kolleginnen des Fachbereiches Anja Langhardt, Viola Klimek, Angela Heer, Eva Schirk und ganz besonders Laura Frank danke ich für die praktische Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft.

Dank auch an die Mitarbeiter der Zentralen Tierhaltung für die Versorgung und Betreuung der Küken.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen beiden Praxishelferlein Nina Bätzel und Janina Holthöwer für das Abnehmen der vielen kleinen Dinge, um mich ungestört weiter an dieser Arbeit schreiben zu lassen.

Meinem Gegenstück Sven Niedner danke ich für den anspornenden Wettbewerb bei der Fertigstellung dieses Werkes, meinem Vater Theo Frangipani danke ich für die stete Ermutigung und meiner Mutter Heidemarie Frangipani für ihre vertrauensvolle Unterstützung.