

# Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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