

Inhaltsverzeichnis

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

2.2.16.5	Methoden zum Antikörpernachweis	33
2.2.17	Differenzialdiagnosen	33
2.2.18	Bekämpfung der IB	34
2.2.18.1	Management	35
2.2.18.2	Vakzination	35
2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.3.1	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	41
2.3.2	Real Time PCR.....	41
2.3.3	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	41
2.3.4	Nested-PCR	41
2.3.5	Multiplex-PCR	42
2.4	Fragestellung	43
3	Material und Methoden	44
3.1	Material	44
3.1.1	Zellkulturmiedien, 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 Verbrauchsmaterialen	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 Feldisolale in Hühnerküken-Nierenzell-Kulturen (HKNZ).....	59
3.2.4	Kristallviolettfärbung 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
4	Ergebnisse	79
4.1	Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274 und D1466 sowie einiger IBV-Feldisolale an Hühnerembryonen	79
4.2	Adaptation der IBV-Referenzstämme M41, D274 und D1466 sowie einiger Feldisolale 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
5	Diskussion.....	108
5.1	Vermehrung des IBV in Hühnerembryonen	109
5.2	Vermehrung des IBV in HKNZ	110
5.3	Hämaggultinationstest	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
6	Zusammenfassung	121
7	Summary	123
8	Literaturverzeichnis	125
9	Danksagung.....	149
	Anhang	150