

**INHALTVERZEICHNIS**

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

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

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

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