

INHALTVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV)	2
2.1.1 Taxonomie	2
2.1.2 Morphologie und Genom	2
2.1.3 Strukturproteine	3
2.1.4 Genotypen	4
2.2 Die Infektiöse Bronchitis des Huhns (IB)	6
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 Antiggennachweis	12
2.2.5.1.3 Genomnachweis	12
2.2.5.2 Antikörpernachweis	17
2.2.6 Bekämpfung	18
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Material	20
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
3.2 Beschreibung der angewandten Methoden	31
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, Zellkulturmateriel, 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 Hämagglytinationstest (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
3.3 Tierversuch	46
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
4. DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE	48
4.1 Untersuchungen zum molekularen Nachweis und Differenzierung des Infektiösen Bronchitis Virus (IBV)	48
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
4.2 Epidemiologische Untersuchungen zum Nachweis von IBV	79
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
4.3 IBV QX Infektionsversuche	87
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
5. DISKUSSION	98
6. ZUSAMMENFASSUNG	112
7. SUMMARY	114
8. LITERATURVERZEICHNIS	116
9. ANHANG	135