

Inhaltsverzeichnis

1	Literatur	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Geschichte der Vogelpocken	1
	1.2.1 Überblick über Untersuchungen des Erregers	1
	1.2.2 Auftreten von Geflügelpocken	2
1.3	Ätiologie der Avipockenvirusinfektionen	3
	1.3.1 Klassifikation der aviären Pockenviren	3
	1.3.2 Morphologie der aviären Pockenviren	4
	1.3.2.1 Viruspartikel	4
	1.3.2.2 Genom	5
	1.3.3 Replikation der aviären Pockenviren	7
1.4	Natürliche Avipockenvirusinfektionen	9
	1.4.1 Epizootiologie und Übertragung	9
	1.4.2 Verlauf	10
	1.4.3 Immunantwort	11
1.5	Klinische Bilder der Avipockenvirusinfektionen	12
	1.5.1 Klinische Bilder beim Wirtschaftsgeflügel	12
	1.5.1.1 Hautform	12
	1.5.1.2 Schleimhautform	13
	1.5.1.3 Mischform	14
	1.5.2 Klinische Bilder bei Zier-, Wild- und Greifvögeln	14
	1.5.3 Mortalität	15
1.6	Diagnose der Avipockenvirusinfektionen	15
	1.6.1 Klinisches Bild	15
	1.6.2 Pathologisch-anatomische Untersuchung	15
	1.6.3 Labordiagnose	16
	1.6.3.1 Histopathologische Untersuchung	16
	1.6.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung	16
	1.6.3.3 Nachweis von Virus-Antigen und Virus-DNA	16
	1.6.3.4 Antikörper-Nachweis	18
	1.6.3.5 Virusisolierung	19
1.7	Differenzierung der Avipockenviruspezies	19
	1.7.1 Differenzierung anhand der Wirtsspezifität	22
	1.7.2 Differenzierung anhand Strukturanalyse	22
	1.7.3 Differenzierung durch Pockeneffloreszenzen	22
	1.7.4 Differenzierung anhand zytopathischer Veränderungen	22
	1.7.5 Differenzierung anhand chem.-physik. Analysen, Thermoresistenzprüfung und biochem. Eigenschaften	23
	1.7.6 Differenzierung mittels immunologischer Verfahren	23
	1.7.7 Differenzierung durch Restriktionszymanalyse	24
1.8	Differentialdiagnose	24

1.9	Bekämpfungsmaßnahmen und Kontrolle	24
1.9.1	Management und Hygiene	24
1.9.2	Therapie	25
1.9.3	Gesetzliche Bestimmungen	25
1.9.4	Prophylaxe	25
1.10	Geflügelpockenviren als Vakzinenvektor	28
2	Ziel der Arbeit	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Materialnachweis	30
3.2	Puffer, Kits, Zusätze und Medien	33
3.3	Virologische Methoden	37
3.3.1	Virusisolierung und Vermehrung	37
3.3.2	Agargelpräzipitationstest (AGP)	38
3.3.3	Elektronenmikroskopische Untersuchung (EM)	38
3.4	Etablierung einer PCR zum Nachweis von Geflügelpocken	39
3.4.1	Verwendete Virusstämme und Isolate	39
3.4.2	Untersuchungsablauf	40
	<i>Durchführung der PCR</i>	
3.4.3	Aufbereitung	40
3.4.4	DNA-Extraktion	41
3.4.4.1	DNA-Extraktion bei Impfstoffen, Virussuspensionen und Homogenaten	41
3.4.4.2	DNA-Extraktion bei Gewebeproben	41
3.4.5	Bestimmung der DNA-Konzentration	42
3.4.6	PCR mit Ready-To-Go PCR Beads-Kit	42
3.4.6.1	FP 1/FP 2-PCR	44
3.4.6.2	XL 1/XL 2-PCR	44
3.4.6.3	A 1/A 2-PCR	45
3.4.7	PCR ohne Ready-To-Go PCR Beads-Kit	45
3.4.8	Qualitätssicherung der PCR	46
3.4.9	PCR-Produktanalyse	46
	<i>Überprüfung der Spezifität</i>	
3.4.10	REA der PCR-Produkte	47
3.4.11	Klonierung von Amplifikaten	47
3.4.11.1	Aufreinigung von PCR-Produkten	48
3.4.11.1 a)	mittels Invisorb Spin DANN Extraction Kit	48
3.4.11.1 b)	mittels Millipore Ultrafree-Kit	48
3.4.11.2	DNA-Konzentrationsermittlung	49
3.4.11.3	Platten für Bakterienkulturen	49
3.4.11.4	Ligation von Amplifikaten in Plasmidvektoren	50
3.4.11.5	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	50
3.4.11.6	Beurteilung des Klonierungserfolges	51

3.4.12	Präparation von Plasmid-DNA	51
3.4.12.1	Mini-Präparation	51
3.4.12.2	Präparation mit QIAfilter Plasmid Midi Kit	52
3.4.12.3	Bestätigung der Insert-Aufnahme	53
3.4.13	Sequenzierung	53
3.4.14	Untersuchung anderer aviärer Viren	53
	<i>Bestimmung der Sensitivität</i>	
3.4.15	Virusreinigung und DNA-Extraktion zum Erstellen einer Verdünnungsreihe	54
3.4.16	Hühnerpockenvirus-DNA-Verdünnungsreihe	55
3.4.17	Dot Blot-Verfahren	55
3.4.17.1	Herstellung der Sonde	56
3.4.17.2	Durchführung des Dot Blot-Verfahrens	56
3.5	Untersuchungen zur Epidemiologie von Geflügelpocken	58
3.5.1	Herkunft des Probenmaterials	58
3.5.2	Untersuchungsablauf	58
3.6	Nachweis und Differenzierung von Avipockenviruspezies	59
3.6.1	Virusmaterial	59
3.6.2	Untersuchungsablauf	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Etablierung einer PCR zum Nachweis von Geflügelpocken	62
4.1.1	Überprüfung der Spezifität	62
4.1.2	Bestimmung der Sensitivität	65
4.1.3	Vergleich der FP1/FP2-PCR mit konventionellen Diagnostikverfahren	66
4.1.3.1	Elektronenmikroskopische Untersuchung (EM)	68
4.1.3.2	Virusisolierung auf der CAM	68
4.1.3.3	Agargelpräzipitationstest (AGP)	69
4.2	Untersuchungen zur Epidemiologie von Geflügelpocken	71
4.2.1	FP1/FP2-PCR im Rahmen der Diagnostik	71
4.2.2	Häufigkeiten der Verlaufsformen	72
4.2.3	Nutzungsrichtungen des untersuchten Wirtschaftsgeflügels	73
4.2.4	Herkunftsregionen des Untersuchungsmaterials	73
4.2.5	Häufigkeit des Auftretens der Pockeninfektionen pro Betrieb	75
4.2.6	Legehennenhaltungsformen bei nachgewiesenen Geflügelpockeninfektionen	75
4.2.7	Alter der Tiere mit nachgewiesenen Geflügelpockeninfektionen	76
4.2.8	Impfstatus der Tiere	77
4.2.9	Jährliches Auftreten von Geflügelpocken und jahreszeitliche Verteilung	78
4.2.10	Untersuchungen zur Übertragbarkeit von Geflügelpocken durch Milben	80

4.3	Nachweis und Differenzierung von Avipockenviruspezies	81
4.3.1	Untersuchung weiterer Avipockenviruspezies mittels FP1/FP2-PCR	81
4.3.2	REA zur Differenzierung weiterer Avipockenviruspezies	82
4.3.2.1	<i>EcoRV</i> -Spaltung	82
4.3.2.2	<i>NlaIII</i> -Spaltung	83
4.3.2.3	<i>MseI</i> -Spaltung	85
4.3.2.4	<i>DpnII</i> -Spaltung	85
4.3.3	Sequenzanalyse verschiedener Avipockenviren	88
4.3.3.1	Sequenzierungen	88
4.3.3.2	Berechnung der REA-Fragmente	93
4.3.3.3	Homologien der Avipockenvirus-Sequenzen auf Nukleotidebene	96
4.3.3.3.1	Homologien der Avipockenvirus-Sequenzen zur FWPV-Sequenz	96
4.3.3.3.2	Homologien der Avipockenvirus-Sequenzen untereinander	96
4.3.3.4	Homologien der Avipockenvirus-Sequenzen auf Aminosäureebene	97
4.3.4	Phylogenetische Analyse	101
5	Diskussion	103
6	Zusammenfassung	118
7	Summary	120
8	Literaturverzeichnis	122