

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>HÜHNERPOCKEN .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Geschichte .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Das Hühnerpockenvirus .....</b>	<b>3</b>
2.1.2.1	Taxonomische Einordnung .....	3
2.1.2.2	Morphologie .....	5
2.1.2.3	Genom .....	5
2.1.2.4	Replikation .....	6
<b>2.1.3</b>	<b>Vorkommen .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Übertragung .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Pathogenese .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.6</b>	<b>Klinisches und pathologisches Bild .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.7</b>	<b>Diagnose durch direkten Nachweis und Isolierung .....</b>	<b>12</b>
2.1.7.1	Direkter Nachweis.....	12
2.1.7.2	Isolierung .....	12
<b>2.1.8</b>	<b>Immunreaktion und Nachweis von Antikörpern .....</b>	<b>13</b>
2.1.8.1	Humorale Immunantwort und Nachweis von Antikörpern.....	14
2.1.8.1.1	Nachweis neutralisierender Antikörper .....	14
2.1.8.1.2	Nachweis präzipitierender Antikörper .....	14
2.1.8.1.3	Nachweis von Antikörpern im ELISA .....	15
2.1.8.1.4	Nachweis von Antikörpern mit weiteren Methoden .....	16
2.1.8.2	Aktivierung des Komplement-Systems .....	16
2.1.8.3	Zelluläre Immunantwort .....	17
2.1.8.4	Beeinflussung des Immunsystems durch eine Infektion mit FPV .....	18
<b>2.1.9</b>	<b>Prophylaxe .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.10</b>	<b>Rechtliche Regelungen .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>RETIKULOENDOTHELIOSE .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Geschichte .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Das Retikuloendotheliose-Virus .....</b>	<b>21</b>
2.2.2.1	Taxonomische Einordnung .....	21
2.2.2.2	Morphologie .....	22
2.2.2.3	Genom .....	22
2.2.2.4	Replikation .....	24
<b>2.2.3</b>	<b>Vorkommen .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Übertragung .....</b>	<b>25</b>

<b>2.2.5</b>	<b>Pathogenese und klinische und pathologische Symptome .....</b>	<b>26</b>
2.2.5.1	Kümmerwachstum .....	26
2.2.5.2	Chronische Lymphome .....	27
2.2.5.3	Akute Neoplasien .....	27
2.2.5.4	Immunsuppression .....	28
<b>2.2.6</b>	<b>Diagnose .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Prophylaxe und Bekämpfung .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3</b>	<b>DIE INTEGRATION EINES RETIKULOENDOTHELIOSE-PROVIRUS IN DAS GENOM DES HÜHNERPOCKENVIRUS .....</b>	<b>31</b>
2.3.1	Nachweis der Integration .....	31
2.3.2	Verbreitung von FPV-Stämmen mit integriertem REV-Provirus .....	31
2.3.3	Unterschiede in der Länge der LTR-Überreste und Heterogenität der FPV-Stämme .....	32
2.3.4	Verlust des fvRP .....	34
2.3.5	Tierversuche mit FPV-Stämmen mit einem integriertem fvRP .....	34
2.3.6	Die Folgen der Integration .....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>37</b>
3.1	MATERIAL .....	37
3.1.1	Herkunft der verwendeten Materialien .....	37
3.1.1.1	Verbrauchsmaterial und Geräte .....	37
3.1.1.2	Inhalt der verwendeten Kits .....	42
3.1.1.3	Zelllinie LMH .....	43
3.1.1.4	Virusstämme, Bakterienstämme .....	43
3.1.1.5	Seren .....	43
3.1.1.6	Software .....	44
3.1.2	Verwendete Medien und Puffer .....	44
3.2	BESCHREIBUNG DER ANGEWANDTEN METHODEN .....	48
3.2.1	Molekularbiologische Untersuchungen .....	48
3.2.1.1	DNA-Präparation .....	48
3.2.1.1.1	Aufbereitung und Lagerung der Proben zur DNA-Extraktion .....	48
3.2.1.1.2	DNA-Präparation aus Tupfern, Vakzinen, Zellkulturmaterial und PBMC .....	48
3.2.1.1.3	DNA-Präparation aus Gewebeproben .....	48
3.2.1.1.4	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	49
3.2.1.2	Design von Primern und Sonden für PCR und qPCR .....	49
3.2.1.3	Durchführung von PCR, Multiplex-PCR und Long-Distance-PCR .....	49
3.2.1.3.1	PCR mittels Ready-To-Go™ PCR Beads-Kit .....	49
3.2.1.3.2	Multiplex-PCR mittels Qiagen Multiplex PCR Kit .....	49
3.2.1.3.3	Long-Distance-PCR .....	50

3.2.1.3.4	Produktanalyse nach PCR, Multiplex-PCR oder Long-Distance-PCR mittels Agarosegelelektrophorese.....	50
3.2.1.4	Qualitätssicherung bei der Durchführung von DNA-Präparation und PCR.....	51
3.2.1.5	Restriktionsenzymanalyse .....	55
3.2.1.6	Quantitative PCR (qPCR) .....	55
3.2.1.6.1	Ansatz .....	55
3.2.1.6.2	Auswertung .....	56
3.2.1.7	Gelreinigung von PCR-Produkten.....	57
3.2.1.8	Dot-Blot .....	58
3.2.1.8.1	DNA-Sondenherstellung .....	58
3.2.1.8.2	Auftragen der DNA auf die Membran.....	58
3.2.1.8.3	Prähybridisierung und Hybridisierung .....	58
3.2.1.8.4	Chemilumineszenz der Membran und Entwicklung des Filmes.....	59
3.2.1.9	Klonierung von Amplifikaten in Plasmidvektoren .....	59
3.2.1.9.1	Herstellung von Platten für Bakterienkulturen.....	59
3.2.1.9.2	Ligation von Amplifikaten in Plasmidvektoren.....	59
3.2.1.9.3	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	60
3.2.1.9.4	Beurteilung des Klonierungserfolges .....	60
3.2.1.10	Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation).....	60
3.2.1.11	Bestätigung der Insert-Aufnahme nach Präparation der Plasmid-DNA .....	61
3.2.1.12	Präparation von Plasmid-DNA mit dem QIAfilter™ Plasmid Midi Kit .....	61
3.2.1.13	Sequenzierung.....	62
<b>3.2.2</b>	<b>Vermehrung von Virus in der Zellkultur .....</b>	<b>62</b>
3.2.2.1	Ansatz der HEF-Zellkulturen .....	62
3.2.2.2	Passagierung von LMH-Zellen.....	63
3.2.2.3	Aufbereitung von Gewebeproben zur Infektion der Zellkultur.....	63
3.2.2.4	Infektion des Zellrasens .....	63
3.2.2.5	Gewinnung von Zellkulturmaterial.....	63
3.2.2.6	Bestimmung des Virustiters .....	63
<b>3.2.3</b>	<b>Serologische Untersuchungen.....</b>	<b>64</b>
3.2.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von Antikörpern gegen Pocken .. .....	64
3.2.3.2	ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV (Pocken-ELISA).....	65
3.2.3.2.1	Beschichtung der ELISA-Platten .....	65
3.2.3.2.2	Durchführung des ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV..	65
3.2.3.3	AGP .....	66
3.2.3.4	ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen REV .....	66
3.2.3.5	Hämagglutinationstest zum Nachweis von Antikörpern gegen Schafserythrozyten .....	67
<b>3.2.4</b>	<b>Durchführung der Infektionsversuche .....</b>	<b>68</b>
3.2.4.1	Tiere.....	68

3.2.4.2	Haltung .....	68
3.2.4.3	Infektion .....	68
3.2.4.4	Probennahme .....	68
3.2.4.5	Präparation der PBMC.....	68
<b>4</b>	<b>VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>69</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Fortführung der epidemiologischen Untersuchung.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Etablierung einer Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis von Pocken- und REV-spezifischen Sequenzen .....</b>	<b>70</b>
4.1.2.1	Überprüfung der Spezifität der Primerpaare zum Nachweis des gag- bzw. des pol-Genes.....	70
4.1.2.2	Austestung verschiedener Primermengen.....	72
4.1.2.3	Optimierung der Anlagerungstemperatur.....	73
4.1.2.4	Überprüfung der Spezifität der Multiplex-PCR .....	74
4.1.2.5	Vergleich der Sensitivität der einzelnen Primerpaare in der Multiplex-PCR75	
<b>4.1.3</b>	<b>Etablierung einer chimären PCR zum Nachweis der Integration von REV-spezifischen Nukleotidsequenzen in FPV-DNA .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Untersuchung von FPV-DNA aus Feldausbrüchen auf das Vorliegen REV-spezifischer Nukleotidsequenzen .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Nachweis des fvRP mittels Long-Distance-PCR und REA.....</b>	<b>81</b>
4.1.5.1	Untersuchungen zum Nachweis des fvRP mit den Primern R 1 und R 2.....	81
4.1.5.2	Versuch des Nachweises verschiedener chimärer PCR-Produkte.....	82
4.1.5.3	Nachweis des fvRP aus FPV-DNA mit den Primern L 1 und L 5.....	83
4.1.5.4	Versuch des Nachweises des fvRP aus CSV-DNA mit den Primern L 1 und L 5 .....	86
<b>4.1.6</b>	<b>REV-Provirus und Vergleich mit veröffentlichten Sequenzen.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1.7</b>	<b>Quantitative Untersuchungen über das Mengen-Verhältnis zwischen FPV-spezifischer DNA und REV-provirus-spezifischer DNA .....</b>	<b>91</b>
4.1.7.1	Bestimmung der Effizienzen der qPCR's.....	91
4.1.7.2	Einschätzung der Genauigkeit der angewandten Methode .....	93
4.1.7.3	Quantitative Untersuchung von Feldisolaten mittels qPCR .....	94
4.1.7.4	Quantitative Untersuchung verschiedener Passagen des Stammes 869/02 auf LMH .....	95
<b>4.2</b>	<b>SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>97</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Pocken</b>	<b>97</b>
4.2.1.1	Untersuchung von negativen und positiven Plasma- und Serumproben als Grundlage der Festlegung eines Schwellenwertes.....	97
4.2.1.2	Berechnung von Sensitivität und Spezifität für mögliche Schwellenwerte...99	
4.2.1.3	Untersuchung heterologer Seren.....	101
4.2.1.4	Wiederholbarkeit der Ergebnisse im Pocken-ELISA.....	102

---

4.2.1.4.1	Intraassay-Vergleich .....	102
4.2.1.4.2	Interassay-Vergleich .....	103
4.2.1.4.3	Untersuchung möglicher Ursachen für das Ergebnis des Interassay-Vergleichs .....	104
4.2.1.5	Vergleich der im Pocken-ELISA erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen im IIFT.....	107
4.2.1.6	Vergleich der im Pocken-ELISA erzielten Ergebnisse mit Ergebnissen im AGP .....	108
<b>4.2.2</b>	<b>Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Antikörpern gegen FPV und REV in Seren aus Wirtschaftsgeflügelbeständen.....</b>	<b>109</b>
<b>4.3</b>	<b>INFEKTIONSVERSUCHE .....</b>	<b>114</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Vergleich der humoralen Immunantwort nach Infektion mit einem attenuierten und einem pathogenen FPV-Stamm.....</b>	<b>114</b>
4.3.1.1	Klinische Erscheinungen und Sektionen.....	114
4.3.1.2	Antikörperbildung gegen FPV .....	115
4.3.1.3	Antikörperbildung gegen REV.....	116
4.3.1.4	Untersuchung von Gewebeproben mittels PCR .....	118
4.3.1.5	Untersuchung von PBMC mittels PCR .....	118
4.3.1.6	Zusammenhang zwischen Antikörperbildung gegen REV und Nachweis von REV-Provirus-spezifischer DNA in PBMC .....	120
<b>4.3.2</b>	<b>Vergleich der humoralen Immunantwort nach Infektion mit unterschiedlich hoch passagiertem Feldvirus .....</b>	<b>121</b>
4.3.2.1	Klinische Erscheinungen und Sektionen.....	122
4.3.2.2	Antikörperbildung gegen FPV .....	122
4.3.2.3	Antikörperbildung gegen REV.....	123
4.3.2.4	Antikörperbildung gegen Schafserythrozyten .....	124
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>147</b>