

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Reovirusinfektion bei Broilern:
Charakterisierung und *in vivo* Bestimmung der
Pathogenität neuer Isolate aus Masthähnchenbeständen
mit Malabsorptions-Syndrom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Olivia Gooß
Tierärztin aus Cuxhaven

Berlin 2008
Journal-Nr.: 3240

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. K. Osterrieder
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Fries

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

poultry diseases, enteritis, avian reovirus, strains, malabsorption, runting, weight reduction, laboratory diagnosis, isolation, identification, characterization, virus neutralization, neutralization tests, ELISA, experimental infection, pathology, histopathology, immunohistochemistry, electrophoresis, antibodies

Tag der Promotion: 17.10.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-499-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Aviäres Reovirus	3
2.1.1	Geschichte	3
2.1.2	Taxonomie	4
2.1.3	Aviäre Reoviren im Vergleich zu Mammalier-Reoviren.....	5
2.1.4	Morphologie	5
2.1.5	Genom	6
2.1.6	Proteine.....	8
2.1.7	Replikation	9
2.1.8	Virus-Zell-Interaktionen	11
2.1.9	Physikochemische Eigenschaften	12
2.2	Reovirusinfektionen des Wirtschaftsgeflügels.....	13
2.2.1	Reovirusinfektionen.....	13
2.2.2	Enteric reovirus strains (ERS)	15
2.3	Malabsorptions-Syndrom (MAS).....	16
2.3.1	Einleitung	16
2.3.2	Ätiologie	16
2.3.3	Wirtschaftliche Bedeutung des MAS	17
2.3.4	Übertragung	17
2.3.5	Empfänglichkeit.....	18
2.3.6	Klinisches und pathologisches Bild.....	19
2.3.7	Pathogenese und histopathologisches Bild	20
2.3.8	Reproduzierbarkeit des MAS.....	22
2.3.9	Geflügelfleischhygienerecht in Bezug auf das MAS.....	23
2.3.10	Differentialdiagnosen.....	24
2.4	Labordiagnose	25
2.4.1	Virusisolierung.....	26
2.4.1.1	Virusisolierung in Zellkulturen	26
2.4.1.2	Virusisolierung im embryonierten Hühnerei	26
2.4.2	Virusnachweis und -identifizierung	27
2.4.2.1	Elektronenmikroskopie (EM)	27
2.4.2.2	Immunologische Methoden.....	27

Inhaltsverzeichnis

2.4.2.2.1	Agargelpräzipitationstest (AGPT).....	27
2.4.2.2.2	Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	27
2.4.2.2.3	Immunhistochemie.....	28
2.4.2.2.4	Dot blot.....	28
2.4.2.2.5	Western blot	29
2.4.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.4.2.3.1	Northern blot.....	29
2.4.2.3.2	RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (RNA-PAGE)	29
2.4.2.3.3	RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	29
2.4.3	Virustypisierung.....	30
2.4.3.1	Serotypisierung im Neutralisationstest im Mikrotiterverfahren (NT) und im Plaquereduktionstest (PRT).....	30
2.4.3.2	Genotypisierung	31
2.4.3.2.1	RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (RNA-PAGE)	31
2.4.3.2.2	RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR), Southern blot, Restriktionsenzymanalyse (REA), Sequenzanalyse.....	32
2.4.4	Antikörper-Nachweis	33
2.4.4.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	33
2.4.4.2	Weitere Methoden zum Antikörper-Nachweis	33
2.5	Prophylaxe und Bekämpfung	34
3	Material und Methoden	36
3.1	Material	36
3.1.1	Virusisolate	36
3.1.1.1	Reovirus-Prototyp-Stamm S1133	36
3.1.1.2	ERS-Vergleichsstamm 238/98.....	36
3.1.1.3	Untersuchungsmaterial.....	36
3.1.2	Permanente Zelllinie chicken embryo rough (CER).....	37
3.1.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	38
3.1.4	Reagenzien und Kits	40
3.1.5	Lösungen und Medien.....	42
3.1.5.1	Lösungen und Medien für virologische und serologische Methoden	42
3.1.5.2	Lösungen und Medien für molekularbiologische Methoden.....	44
3.1.5.3	Lösungen und Medien für histologische und immunhistochemische Methoden	45
3.1.6	Antiseren.....	47
3.1.6.1	Antiseren gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133.....	47

Inhaltsverzeichnis

3.1.6.2	Antiseren gegen Rota- und Adenovirus-Isolate.....	47
3.1.6.3	FITC (Fluorescein Isothiocyanate)-markierter anti-Huhn Antikörper.....	47
3.1.6.4	Ziegen-Normalserum.....	47
3.1.6.5	HRP (Horseradish Peroxidase)-markierter anti-Huhn Antikörper.....	47
3.1.7	Software.....	47
3.2	Methoden.....	48
3.2.1	Virologische Methoden.....	48
3.2.1.1	Herstellung primärer Zellkulturen.....	48
3.2.1.1.1	Hühnerembryoleber-Zellen (HEL-Zellen).....	48
3.2.1.1.2	Hühnerembryofibroblasten-Zellen (HEF-Zellen).....	48
3.2.1.2	Subkultivierung der permanenten Zelllinie chicken embryo rough (CER).....	49
3.2.1.3	Probenaufbereitung.....	49
3.2.1.4	Beimpfung der Zellkulturen.....	50
3.2.1.5	Virusvermehrung.....	50
3.2.1.6	Virustitration und Plaquereinigung.....	51
3.2.1.6.1	Virustitration im Plaquetest.....	51
3.2.1.6.2	Plaquereinigung.....	51
3.2.1.6.3	Beurteilung der Plaquemorphologie und -größe.....	52
3.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	52
3.2.3	Serologische Methoden.....	53
3.2.3.1	Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT).....	53
3.2.3.1.1	IIFT zum Nachweis von Antigen in Zellkulturen mit polyklonalen Antikörpern.....	53
3.2.3.1.2	IIFT zum Nachweis von Antigen mit monoklonalen Antikörpern (mAk).....	54
3.2.3.1.3	IIFT zum Nachweis polyklonaler Antikörper in Serum.....	54
3.2.3.2	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	54
3.2.3.3	Virusneutralisation.....	55
3.2.3.3.1	Neutralisationstest im Mikrotiterverfahren (NT).....	55
3.2.3.3.2	Neutralisationstest im Plaquereduktionstest (PRT).....	56
3.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	57
3.2.4.1	RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (RNA-PAGE).....	57
3.2.5	Prüfung der Pathogenität <i>in vivo</i>	58
3.2.5.1	Versuchstiere.....	58
3.2.5.2	Haltung.....	58
3.2.5.3	Infektion.....	58
3.2.5.4	Klinische Erscheinungen.....	59
3.2.5.5	Bestimmung des Gewichtsverlaufes.....	59

Inhaltsverzeichnis

3.2.5.6	Pathologisch-anatomische Untersuchungen	59
3.2.5.7	Histologische Untersuchungen	60
3.2.5.7.1	Probenaufbereitung	60
3.2.5.7.2	Histopathologische Untersuchungen	61
3.2.5.7.3	Immunhistochemische Untersuchungen	61
3.2.5.8	Virusreisolierung	62
3.2.5.8.1	Virusreisolierung aus Kloakentupfern.....	62
3.2.5.8.2	Virusreisolierung aus Organproben	62
3.2.5.9	Entnahme von Blutproben zur Bestimmung der Antikörper-Titer.....	63
4	Ergebnisse.....	64
4.1	Virusnachweis mittels Elektronenmikroskopie (EM).....	64
4.2	Virusisolierung und -identifizierung.....	65
4.2.1	Virusisolierung in Zellkulturen.....	65
4.2.2	Vergleich der Eignung zweier verschiedener primärer Zellkulturen sowie unterschiedlichen Probenmaterials für die Virusisolierung.....	68
4.2.3	Virusidentifizierung mittels EM und im Indirekten Immunfluoreszenztest.....	70
4.3	Viruscharakterisierung.....	72
4.3.1	Ausprägung der cpE in unterschiedlichen Zellkulturen	72
4.3.2	Plaquemorphologie	75
4.4	Virustypisierung.....	77
4.4.1	Serotypisierung	77
4.4.1.1	Neutralisationstest im Mikrotiterverfahren (NT)	77
4.4.1.2	Neutralisationstest im Plaquereduktionstest (PRT)	80
4.4.2	Typisierung mit monoklonalen Antikörpern (mAk) im IIFT.....	82
4.4.3	Genotypisierung.....	84
4.4.3.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	84
4.5	Prüfung der Pathogenität <i>in vivo</i>	86
4.5.1	Klinische Erscheinungen und Mortalität.....	86
4.5.2	Gewichtsentwicklung.....	87
4.5.3	Virusreisolierung aus Kloakentupfern	89
4.5.4	Pathologisch-anatomische Befunde	90
4.5.5	Histopathologische Befunde.....	92
4.5.6	Immunhistochemische Befunde.....	95
4.5.7	Virusreisolierung aus Organproben	98
4.5.8	Antikörperentwicklung	99

Inhaltsverzeichnis

5	Diskussion	101
5.1	Virusnachweis, -isolierung, -identifizierung, -charakterisierung und -typisierung...	101
5.2	Prüfung der Pathogenität <i>in vivo</i>	109
5.3	Schlussfolgerungen.....	117
6	Zusammenfassung	118
7	Summary	120
8	Literatur	122
8.1	Webseiten	122
8.2	Rechtsvorschriften	122
8.3	Publikationen.....	122
9	Anhang	138
9.1	Virusisolierung.....	138
9.2	Viruscharakterisierung.....	139
9.3	Virustypisierung.....	140
9.4	Prüfung der Pathogenität <i>in vitro</i>	141

Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AB	Antibiotikum
AGPT	Agargelpräzipitationstest
Ak	Antikörper
AM	Ausgangsmaterial
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (Destilliertes Wasser)
Aqua dest.	Aqua destillata (Doppelt detilliertes Wasser)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CER	Chicken Embryo Rough (Name einer permanenten Zelllinie)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
cpE	zytopathischer Effekt
CsCl	Cäsiumchlorid
ds	double-stranded (doppelsträngig)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskopie
ERS	enteric reovirus strain(s)
et al.	et altera (und andere)
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
g/cm ³	Gramm pro Kubikmeter
G	Gumboro-Krankheit, Infektious bursal disease
ggf.	gegebenenfalls
GFIHG	Geflügelfleischhygienegesetz
GFIHVO	Geflügelfleischhygiene-Verordnung
h	Stunde
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEF	Hühnerembryofibroblasten

Verzeichnis der Abkürzungen

HEL	Hühnerembryolebern
I.E.	Internationale Einheiten
IB	Infektiöse Bronchitis
IBD (Virus)	Infektiös bursale Krankheit (Virus), Gumboro-Krankheit (Virus)
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenz-Test
kDa	Kilo Dalton
kHz	kilo Hertz
kV	kilo Volt
IgG	Immunglobulin G
log	Logarithmus
LMH	Leghorn, male, hepatocellular carcinoma (Name einer permanenten Leberzelllinie)
LW	Lebenswoche
M	molar
mAk	Monoklonale Antikörper
MAS	Malabsorptions-Syndrom
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger RNA
n.d.	nicht durchgeführt
nm	Nanometer
ND	Newcastle disease
OD	Optische Dichte
ODD	Differenz der optischen Dichten
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
p.i.	post infectionem (nach der Infektion)
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPLO	pleuropneumonia-like organisms (alte Bezeichnung für Mykoplasmen)
REA	Restriktionsenzymanalyse

Verzeichnis der Abkürzungen

RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SPF	spezifiziert pathogen frei
ss	single-stranded (einzelsträngig)
TBE	Tris-Borat-Elektrophoresepuffer
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose 50 (Zellkultur-infektiöse Dosen 50)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
US	Untersuchung
USA	United States of America
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Seit Ende 2002 ist in Deutschland bei Mastkücken ab dem sechsten Lebenstag in verschiedenen Herden vermehrt ein Krankheitsgeschehen zu beobachten, das durch Durchfall und anschließende Wachstumsdepression gekennzeichnet ist. Die Broiler zeigten ein erhöhtes Wärmebedürfnis und sprachen nicht auf eine antimikrobielle Therapie an, weshalb eine virale Ätiologie vermutet wurde. Vergleichbare Krankheitsbilder bei Mastkücken wurden in der Literatur u.a. unter den Begriffen „Malabsorptionssyndrom (MAS)“ oder „Runting-Stunting Syndrom“ zusammengefasst. Neben den üblichen allgemeinen Symptomen des MAS, wie massivem wässrigem Durchfall, Wachstumsdepression und Federbildungsstörungen wurden auch später auftretende Tenosynovitiden beobachtet. Die Blinddärme waren mit wässrigem Inhalt gefüllt, und das Pankreas wies eine glasig-weißliche Verfärbung auf. Die beobachteten Fälle gingen nicht immer mit deutlicher, akuter Klinik einher. Die Mortalitätsrate in den Beständen sowie die Zahl der bei Schlachtung als untauglich beurteilten und verworfener Tiere infolge der Uniformitätsminderung stieg jedoch kontinuierlich an, was zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führte.

Die bisher durchgeführten diagnostischen Untersuchungen ergaben keinen hinreichenden Aufschluss über die Ursachen des beschriebenen Krankheitskomplexes. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden aus den Herden neben Rota-, Calici- und Adenoviren überwiegend Reoviren isoliert.

Daher sind die Ziele dieser Arbeit:

- Die Virusisolierung aus Organproben von Broilern mit MAS-Problematik auf unterschiedlichen Zellkulturen
- Die Typisierung und Charakterisierung der Isolate mit Hilfe virologischer und serologischer Methoden
- Die Charakterisierung der Isolate mit Hilfe molekularbiologischer Methoden
- Die Erlangung von Kenntnissen über die Pathogenität der isolierten Viren in einem Infektionsversuch, besonders hinsichtlich der Reproduzierbarkeit des Krankheitsbildes MAS
- Die Erlangung von Kenntnissen über die Pathogenese der Virusisolate durch histopathologische Untersuchungen der Tiere aus dem Infektionsversuch und Etablierung einer immunhistochemischen Methode
- Prüfung anhand der gesammelten klinischen, (histo-) pathologischen und immunhistochemischen Daten aus dem Infektionsversuch, ob die *in vitro* erhaltenen

Einleitung

Befunde relevant für das Krankheitsbild sind und ob sich ein Zusammenhang zwischen den virologischen und den molekularbiologischen Unterschieden und der Pathogenität der Erreger, auch hinsichtlich der Zugehörigkeit zu den so genannten enteric reovirus strains (ERS), herstellen lässt

2 Literaturübersicht

2.1 Aviäres Reovirus

2.1.1 Geschichte

Die erste Isolierung von Reoviren erfolgte 1951 aus der Stuhlprobe eines unterernährten Kindes mit Bronchopneumonie, Konjunktivitis und Alopezie (Stanley et al., 1953). Stanley et al. schlugen den Namen „hepato-encephalomyelitis virus“ für das neue Virusisolat vor. Im Jahre 1953 wurden Reoviren aus dem Stuhl gesunder Kinder in Cincinnati und Mexiko City isoliert (Ramos-Alvarez und Sabin, 1954; Committee on the echo viruses, 1955). Zunächst wurden diese Isolate als ECHO (Enteric Cytopathogenic Human Orphan)-Typ-10-Viren bezeichnet und damit den Enteroviren, einem Genus der Picornaviren, zugeordnet. Später wurde ein Isolat zum Prototyp der Reoviren des Serotyp 1 (Sabin, 1959). Zwei weitere Isolate wurden von Kindern mit Durchfall isoliert (Ramos-Alvarez, 1957) und später zu Prototypen der Reoviren der Serotypen 2 bzw. 3 erklärt.

Der Name „Reovirus“ (**R**espiratory **E**nteric **O**rphan- Virus) wurde erst 1959 von Sabin für eine Gruppe von Viren gewählt, die aus dem Respirations- und Digestionstrakt nachgewiesen wurden und mit keiner bekannten Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden konnten (Sabin, 1957; Sabin, 1959).

Die erste Beschreibung von aviären Reoviren erfolgte 1954. Fahey und Crawley (1954) nahmen zunächst an, aus dem Respirationstrakt von Hühnern mit chronischen Atemwegssymptomen so genannte PPLO (pleuropneumonia-like organisms) isoliert zu haben (Wiesner und Ribbeck, 2000). Nach Inokulation von Hühnern mit diesen zeigten die Tiere eine Erkrankung der Atemwege, Lebernekrosen und eine Entzündung der Sehnen und Synovialmembranen (Fahey und Crawley, 1954). Erst 1967 wurde dieses so genannte Fahey-Crawley Virus (Subramanyam und Pomeroy, 1960) bzw. Crawley Agens von Petek et al. der Familie der Reoviren zugeordnet (Petek et al., 1967b). Im Rahmen ihrer Studien über *Mycoplasma synoviae* isolierten Olsen et al. 1957 einen Erreger aus Broilern, der eine Synovitis hervorrief und nicht auf Chlortetrazyklin und Furazolidon (Olsen et al., 1957) sowie auf Streptomycin (Olsen, 1959) ansprach. Serologisch konnte keine Verwandtschaft zu *M. synoviae* und *M. gallisepticum* festgestellt werden (Olsen et al., 1957). Ungewöhnlich für *M. synoviae* war außerdem, dass die durch das Agens verursachte Erkrankung nur bei Küken zu beobachten war (Kerr und Olson, 1964). Der Erreger wurde 1966 als „viral arthritis agent“ bezeichnet (Olsen und Kerr, 1966). Die eigentliche Identifizierung als Reovirus erfolgte erst 1972 mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen (Walker et al., 1972). Dalton und

Henry bezeichneten beobachtete Veränderungen an Sehnen und Sehnenscheiden als „Tenosynovitis“, um einen Unterschied zu den durch *M. synoviae* verursachten Veränderungen deutlich zu machen (Dalton und Henry, 1967). Der Beweis des Unterschiedes wurde von Olson und Solomon erbracht, als sie Tenosynovitiden in *M. synoviae*-freien Broilern fanden (Olson und Solomon, 1968). Ein Isolat aus diesen Tieren zeigte die gleichen Eigenschaften wie das „viral arthritis agent“ und wies eine antigenetische Ähnlichkeit zum Fahey-Crawley Virus auf (Olson und Weiss, 1972).

Schon früh wurden Reoviren nicht nur bei Tieren mit Arthritis/Tenosynovitis festgestellt, sondern auch im Zusammenhang mit Darmerkrankungen (Krauss und Ueberschär, 1966) und blue comb disease (Wooley und Gratzek, 1969) gefunden. Nach experimenteller Infektion konnten Myokarditis und Hepatitis bei infizierten Hühnern diagnostiziert werden (Van der Heide, 1973). Seit den ersten Fällen von Arthritis/Tenosynovitis in den USA und England wurde in vielen anderen Ländern über die Isolierung von Reoviren aus Hühnern mit dieser Symptomatik berichtet (Krasselt und Voute, 1969; Rossi et al., 1969). Die später als Malabsorptions-Syndrom bezeichnete Erkrankung von Broilern wurde das erste Mal in den späten 70er Jahren beobachtet. Da aus den klinisch erkrankten Tieren Reoviren isoliert worden waren, wurde zunächst von einer durch Reoviren verursachten monokausalen Erkrankung ausgegangen (Van der Heide et al., 1981).

2.1.2 Taxonomie

Die Familie *Reoviridae* wird in die 12 Genera Cypovirus, Fijivirus, Orbivirus, Orthoreovirus, Oryzavirus, ein vorgeschlagenes neues Genus von Insekten-Reoviren, Aquareovirus, Rotavirus, Coltivirus, Phytoreovirus, Seadornavirus und Mycoreovirus eingeteilt. Das Genus Orthoreovirus umfasst vier Virus-Spezies, die in drei verschiedene Subgruppen unterteilt werden: Subgruppe I bilden die Mammalier-Orthoreoviren. Subgruppe II schließt die aviären Reoviren und das Nelson Bay Virus ein und Subgruppe III wird repräsentiert von dem Baboon Virus (Mertens, 2004).

2.1.3 Aviäre Reoviren im Vergleich zu Mammalier-Reoviren

Aviäre und Mammalier-Reoviren sind die Hauptvertreter des Genus Orthoreovirus. Obwohl sie viele morphologische und physikochemische Eigenschaften teilen, unterscheiden sie sich durch ihr Wirtsspektrum, ihre Pathogenität sowie viele biologische und serologische Eigenschaften (Spandidos und Graham, 1976a; Schnitzer, 1985; Rosenberger et al., 1989; Duncan und Sullivan, 1998; Bodelon et al., 2001). Darüber hinaus lassen sich aviäre Reoviren von Mammalier-Reoviren durch das Fehlen von Hämagglutininen und die Fähigkeit, in empfänglichen Zellkulturen große, später lysierende Synzytien zu bilden, unterscheiden (Petek et al., 1967b; Deshmukh und Pomeroy, 1969a). Als Ausnahme eines aviären Reovirus mit hämagglutinierenden Eigenschaften fanden Dutta und Pomeroy (1967b) den Stamm 1394, der Hühnererythrozyten agglutinierte. Gershowitz und Wooley (1973) entdeckten zwei Putenisolate, die Erythrozyten vom Huhn agglutinierten.

2.1.4 Morphologie

Aviäre Reoviren und Mammalier-Reoviren zeigen morphologisch keine Unterschiede. Sie sind unbehüllt und haben einen Durchmesser von 75 nm (56-82 nm) (McNulty et al., 1984; Robertson und Wilcox, 1986). Das virale Genom ist von einem doppelschaligen, ca. 15 nm dicken Kapsid, bestehend aus äußerem Kapsid und Core, mit ikosaedrischer Symmetrie umgeben (Nibert und Schiff, 2001). Das äußere Kapsid besteht aus Kapsomeren, deren Anzahl und Struktur in der Literatur unterschiedlich beschrieben ist (Vasquez und Tournier, 1964; Kawamura et al., 1965; Krauss und Ueberschär, 1966; Ahne et al., 1974). Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung des aviären Reovirus und die Lokalisation der Strukturproteine. Das Protein λ A bildet das Gerüst des inneren Core, das die zehn Gen-Segmente, die virale RNA-Polymerase λ B sowie ihren Kofaktor μ A beinhaltet (Martinez-Costas et al., 1997; Touris-Otero et al., 2004). Das innere Core wird durch das Protein σ A stabilisiert, welches dem λ A aufsitzt und eine Verbindung zwischen dem Inneren Core und dem äußeren Kapsid darstellt. Pentamere des Proteins λ C bilden die 12 Kuppeln, die sich ausgehend vom inneren Core bis über das äußere Kapsid hinaus erstrecken (Zhang et al., 2005). Aus den Außenseiten der Kuppeln ragen Trimere des Zell Attachment-Proteins σ C heraus. Vervollständigt wird das Reovirion durch das äußere Kapsid, welches von den Proteinen μ B (Martinez-Costas et al., 1997) und σ B (Martinez-Costas et al., 1995) gebildet wird.

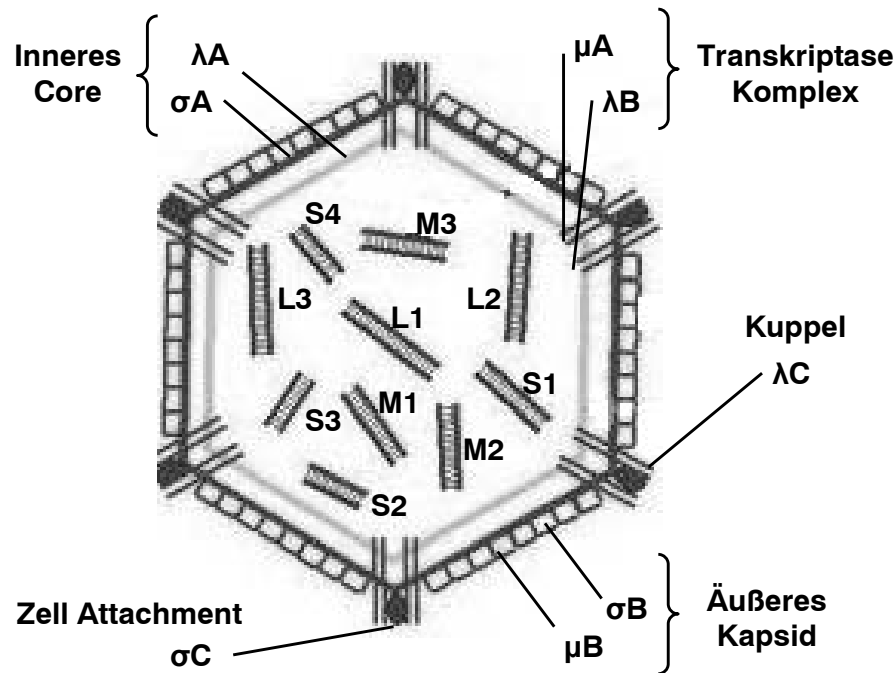


Abbildung 1: Schematische Darstellung des aviären Reovirus, modifiziert nach <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/RNA-HO.htm>

2.1.5 Genom

Der vom Kapsid umgebene hexagonale Innenkörper beinhaltet das Genom der Reoviren, welches aus zehn Segmenten doppelsträngiger Ribonukleinsäure (ds-RNA) besteht (Koide, 1970). Mittels Succrose-Dichte-Gradienten lässt sich die segmentierte ds-RNA in die drei Größenklassen S (small), M (medium) und L (large) einteilen. Durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine weitere Unterteilung der drei Größenklassen aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität in zehn Segmente ds-RNA möglich, nämlich in L (large) mit drei Segmenten, M (medium) mit drei Segmenten und S (small) mit vier Segmenten. Das Molekulargewicht der Segmente L1, L2 und L3 des Reovirus-Prototyp-Stammes S1133 liegt zwischen 2300 -2700 kDa und das der Segmente M1, M2 und M3 zwischen 1300-1700 kDa. Das Molekulargewicht der Segmente S1, S2, S3 und S4 beträgt 640-1200 kDa. Sie haben ein Gesamtgewicht von 14060 kDa (Shatkin et al., 1968; Sekiguchi und Koide, 1974; Spandidos und Graham, 1976a; Gouvea und Schnitzer, 1982a).

Mit Ausnahme des Gen-Segementes L2 wurden die Nukleotidsequenzen aller Genom-Segmente des aviären Reovirus-Prototyp-Stammes S1133 ermittelt. Die Längen (bp) der Segmente sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Literaturübersicht

Gereinigte Hühnerreoviren enthalten 18,7% RNA und 81,3% Proteine (Sekiguchi et al., 1968; Robertson und Wilcox, 1986). Neben ds-RNA kann bei gereinigten aviären Reoviren zusätzlich einsträngige RNA (ss-RNA) isoliert werden, die ca. 30% der gesamten RNA ausmacht. Ihre Funktion ist nicht näher bekannt (Koide et al., 1968; Robertson und Wilcox, 1986). Man geht davon aus, dass sie nicht zur Infektion erforderlich sind (Nibert und Schiff, 2001).

Bei aviären Reoviren liegt das Gen-Segment S1 in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) näher an M3 als an S2, daher könnte es den Genen der M-Klasse zugeordnet werden. Mit der Bezeichnung S1 wird die Ähnlichkeit mit Mammalier-Reoviren betont, die ebenfalls drei M- und vier S-Segmente besitzen. Auch bei ihnen wird das Zell Attachment Protein σ C von S1 kodiert (Nick et al., 1975; Martinez-Costas et al., 1995).

Der Positivstrang jedes Gen-Segments besitzt eine Cap-Struktur vom Typ 1 an seinem 5'-Ende, wohingegen der Negativstrang am 5'-Ende eine Pyrophosphatgruppe aufweist (Martinez-Costas et al., 1995). Kurze Bereiche von sieben bzw. fünf Nukleotiden am 5'- bzw. 3'-Ende sind in allen bislang sequenzierten Positivsträngen aviärer Reoviren konserviert, was darauf hindeutet, dass diese Sequenzen als Zielsignal für die Transkription, Replikation und/oder den Einschluss der viralen Transkripte in die subviralen Partikel dienen (Benavente und Martinez-Costas, 2007).

Tabelle 1: Längen (bp) der Genom-Segmente des Reovirus-Prototyp-Stammes S1133

Genom-Segment	Länge (bp)	Referenz
L1	3959	Touris-Otero et al. (2004)
L3	3907	Cortez-San Martin et al. (2005)
	3858	Liu et al. (2004a)
M1	2283	Su et al. (2006)
M2	2158	Su et al. (2006)
M3	1996	Touris-Otero et al. (2004), Su et al. (2006)
S1	1643	Bodelon et al. (2001)
	1636	Shapouri et al. (1995)
S2	1251	Liu und Huang (2001)
	1325	Yin et al. (2000)
S3	1196	Yin et al. (1997)
S4	1185	Chiu und Lee (1997)

bp: Basenpaare

2.1.6 Proteine

Bei aviären Reoviren werden zehn Strukturproteine unterschieden, die in die Virionen-Nachkommen eingebaut werden. Acht von ihnen (λA , λB , λC , μA , μB , σA , σB , σC) sind primäre Translationsprodukte ihrer kodierten messenger RNA (mRNA). Die anderen beiden (μBN , μBC) gehen aus der posttranslationalen Spaltung des μB hervor. Den Strukturproteinen wurden in umgekehrter Reihenfolge zu ihrem Molekulargewicht alphabetische Bezeichnungen zugeteilt (z.B. λA , λB , λC usw.), um sie von denen der Mammalier-Reoviren zu unterscheiden, welche mit numerischen Anhängen versehen wurden (z.B. $\lambda 1$, $\lambda 2$ usw.). Zusätzlich exprimieren aviäre Reoviren die Nichtstrukturproteine σNS , μNS , p10 und p17, die in infizierten Zellen exprimiert, aber in reifen Reovirionen nicht gefunden werden (Schnitzer et al., 1982; Varela und Benavente, 1994; Varela et al., 1996; Martinez-Costas et al., 1997). Analog zu den Genomsegmenten von Reoviren, werden die kodierten Proteine in folgende Größenklassen unterteilt: λ (large), μ (medium) und σ (small). Die Größen der Gen-Segmente korrelieren mit den Größen ihrer kodierten Proteine, wobei S1 eine Ausnahme bildet (Varela und Benavente, 1994). Das liegt darin begründet, dass das Gen-Segment S1, im Gegensatz zu den anderen Gen-Segmenten, nicht nur für ein Translationsprodukt, sondern für das Strukturprotein σC sowie für die beiden Nichtstrukturproteine p10 und p17 kodiert (Bodelon et al., 2001). Unter allen Proteinen verschiedenster aviärer Reovirusisolate zeigte das vom Gen-Segment S1 kodierte Strukturprotein σC bei der elektrophoretischen Darstellung den größten Polymorphismus (Schnitzer et al., 1982).

Die Proteine σC , σB und λB sind verantwortlich für die Neutralisierungsaktivität aviärer Reoviren, wobei dem vom Gen-Segment S1 kodierten Protein σC , insbesondere in Bezug auf die Diagnostik und Differenzierung aviärer Reoviren, eine besondere Bedeutung zukommt. Im Gegensatz zu σB und λB , die die Bildung gruppenspezifischer Antikörper induzieren, werden gegen das Protein σC typspezifische Antikörper gebildet (Takehara et al., 1987; Wickramasinghe et al., 1993).

Die Genom-Segmente mit den jeweils kodierten Proteinen sowie deren Lage und Funktion im Virus sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Reovirusgenomsegmente, kodierte Proteine sowie deren Lage im Virus und Funktion; modifiziert nach Benavente und Martinez-Costas (2007)

Genom-Segment	Protein	Lokalisation	Funktion des Proteins
L1	λ A	Inneres Core	Gerüst des inneren Core
L2	λ B	Inneres Core	dsRNA-abhängigen RNA-Polymerase (gruppenspezifisches Neutralisationsantigen)
L3	λ C	Kuppel	Capping Enzym
M1	μ A	Inneres Core	Mutmaßlicher Kofaktor der dsRNA-abhängigen RNA-Polymerase
M2	μ B μ BN μ BC	Äußeres Kapsid	Penetration der Wirtszelle
M3	μ NS μ NSC μ NSN	Nichtstrukturprotein	Bildung der Viroplasma und Verstärkung von Proteinen
S1	σ C	Äußeres Kapsid	Zell Attachment (typspezifisches Neutralisationsantigen)
	p10	Nichtstrukturprotein	Erhöhung der Membranpermeabilität, Synzytienbildung
	p17	Nichtstrukturprotein	Unbekannt
S2	σ A	Inneres Core	ds-RNA Bindung, Anti-Interferon-Aktivität
S3	σ B	Äußeres Kapsid	Unbekannt (gruppenspezifisches Neutralisationsantigen)
S4	σ NS	Nichtstrukturprotein	ss-RNA Bindung

2.1.7 Replikation

Die Virusreplikation aviärer Reoviren findet im Zytoplasma der Wirtszelle statt. Das Zell Attachment Protein σ C aviärer Reovirionen heftet sich an Rezeptoren der Zelloberfläche (Adsorption) (Shapouri et al., 1996; Grande und Benavente, 2000). Die Tatsache, dass aviäre Reoviren zum Attachment und zur Replikation sowohl in aviären als auch in Mammalier-Zellen fähig sind, deutet darauf hin, dass der Rezeptor ein ubiquitäres Zellmembran-Protein ist (Robertson und Wilcox, 1986). Dem widerspricht, dass Mammalier-Reoviren sich nicht an Hühnerembryofibroblasten (HEF) anheften können, was darauf hinweist, dass aviäre und Mammalier-Reoviren an verschiedene Zellwand-Rezeptoren binden (Barton et al., 2001). Das Eindringen (Penetration) in die Wirtszelle geschieht durch rezeptorvermittelte Endozytose in Endosomen. Nach ihrer Verbindung mit Lysosomen erfolgt in diesen durch Proteolyse die (Teil-) Auflösung des äußeren Kapsids (Uncoating), wodurch die subviralen Partikel befähigt werden, die endosomale Membran zu überwinden und ins Zytosol zu gelangen (Carrasco, 1994; Labrada et al., 2002).

Literaturübersicht

Die Genexpression beginnt mit der Transkription, wobei die Negativstränge der Gen-Segmente als Templates für die Bildung der zehn viralen Positivstränge (mRNA) dienen. Ihre Synthese wird katalysiert von der viruseigenen dsRNA-abhängigen RNA-Polymerase (Spandidos und Graham, 1976b; Martinez-Costas et al., 1995) und findet innerhalb des Inneren Core statt. Ihre Cap-Strukturen erhalten die mRNA beim Verlassen des inneren Core durch die Tunnel der hohlen Kuppeln, die durch die Pentamere des Capping Enzyms λ C gebildet werden (Zhang et al., 2005). Die mRNA-Stränge haben zwei Funktionen. Zum einen werden aus ihnen an den Ribosomen die viralen Proteine translatiert (Translation). Zum anderen fungieren sie als Templates für die Synthese viraler Negativstränge zur Bildung neuer Gen-Segmente (Genom-Replikation) (Nibert und Schiff, 2001).

Der Zusammenbau der neuen Virionen (Assembly) erfolgt im Zytoplasma der Wirtszelle in phasendichten Ansammlungen, den so genannten Einschlusskörperchen oder Viroplasma. Diese Strukturen, denen Membranen und zelluläre Organellen fehlen, beinhalten die Struktur- und Nichtstrukturproteine sowie teilweise zusammengesetzte und vollständige Viruspartikel, die z.T. kristallin angeordnet sind (Rhim et al., 1962; Silverstein und Schur, 1970). Die unregelmäßig großen Viroplasma liegen perinukleär und sind von einer fibrillären und filamentösen Matrix sowie Polyribosomen umgeben. Immunfluoreszenzmikroskopisch ist ihre runde Form erkennbar (Krauss, 1967; Petek et al., 1967b). In den ersten 30 Minuten nach der Synthese der Protein-Komponenten wird das innere Core zusammengesetzt. Die Vervollständigung des Virions durch das äußere Kapsid erfolgt innerhalb weiterer 30 Minuten (Touris-Otero et al., 2004). In Anlehnung an Untersuchungen anderer Vertreter der Familie *Reoviridae*, v.a. von Mammalier-Reoviren, wird vermutet, dass eine Kopie jeder mRNA in die zusammengesetzten subviralen Partikel eingeschlossen wird (Nibert und Schiff, 2001). Bei Koinfektionen von Zellen mit zwei Reoviren können Nachkommenviren produziert werden, die Genom-Segmente beider Ausgangsviren enthalten. Dieses Phänomen wird als Reassortment bezeichnet (Benavente und Martinez-Costas, 2007). Weder der Mechanismus des Assembly noch der der Freisetzung aus der Wirtszelle sind genau bekannt. Wahrscheinlich ist aber, dass das vom Gen-Segment S1 kodierte nichtstrukturelle Protein p10 aufgrund seiner permeabilitätserhöhenden und zellfusionierenden Aktivität eine Schlüsselrolle beim Verlassen der Zelle und beim Übertreten auf Nachbarzellen spielt (Shmulevitz und Duncan, 2000; Bodelon et al., 2002).

2.1.8 Virus-Zell-Interaktionen

Aviäre Reoviren, das Nelson Bay Reovirus, das Baboon Reovirus, Reptilien Reoviren und Aquareoviren sind die einzigen bekannten unbehüllten Viren, die zur Induktion einer Synzytienbildung (siehe 2.4.1.1) fähig sind (Lupiani et al., 1995; Duncan et al., 2004). Obwohl die Synzytienbildung kein essentieller Prozess für die Replikation aviärer Reoviren in angezüchteten Zellen ist (Duncan et al., 1996), stellt sie einen Vorteil für die Reovirus-Replikation und die schnelle Ausbreitung des Virus im Organismus dar, da der Übergang auf nicht infizierte Nachbarzellen unter Ausschluss der Immunabwehr des infizierten Tieres stattfindet (Benavente und Martinez-Costas, 2007). Anders als bei behüllten Viren wird die Bildung von Synzytien durch aviäre Reoviren aus dem Inneren infizierter Zellen eingeleitet. Das deutet darauf hin, dass die Zellfusion nicht mit der viralen Penetration der Wirtszelle verbunden ist und durch neu gebildete Viren ausgelöst wird (Duncan et al., 1996). Verantwortlich für die Bildung von Synzytien ist das vom Gen-Segment S1 kodierte Nichtstrukturprotein p10 (Shmulevitz und Duncan, 2000; Bodelon et al., 2001). Der Bildung verschieden großer Synzytien folgen die Apoptose und eine Membranstabilität, die zum Zerreißen der Synzytien führt, wodurch Nachkommenviren freigesetzt werden und die Infektion sich ausbreiten kann (Salsman et al., 2005). Untersuchungen von Bodelon et al. (2002) zeigen, dass die Erhöhung der Plasmapermeabilität der Wirtszelle zu einem späten Zeitpunkt der Infektion nach der Synthese viraler Proteine stattfindet.

Das intrazelluläre Apoptose-Programm in infizierten Zellen wird auch in einem frühen Stadium der Virusreplikation durch ursprüngliche aviäre Reoviruspartikel ausgelöst. Nach Labrada et al. (2002) setzt der Zelltod nach dem Uncoating und vor der Virustranskription ein. Shih et al. (2004) konnten zeigen, dass die Expression des aviären Reovirus-Proteins σC die Aktivierung des Apoptose-Programmes bewirkt, was darauf hindeutet, dass die Apoptose in infizierten Zellen durch verschiedene Mechanismen vor, aber auch nach der viralen Genexpression geschieht.

2.1.9 Physikochemische Eigenschaften

Die Dichte intakter aviärer Reoviren wird mit Werten zwischen $1,34 \text{ g/cm}^3$ und $1,38 \text{ g/cm}^3$ angegeben (Krauss, 1968; Nick et al., 1975). Aviäre Reoviren sind resistent gegen Äther und partiell sensitiv oder resistent gegen Chloroform (Glass et al., 1973; Carboni et al., 1975; Van der Heide und Kalbac, 1975). Bei pH-Werten von 3,0 bis 9,0 sind sie relativ stabil (Petek et al., 1967b; Glass et al., 1973). Aviäre Reoviren verlieren in salzfreiem pH-neutralem oder saurem Puffer und nach mehrerem Frieren und Tauen sehr schnell ihre Infektiosität. In einem pH-neutralen Salzpuffer bei 4°C hingegen sind sie über mehrere Monate stabil (Grande und Benavente, 2000). Interessanterweise verlieren aviäre Reoviren bei einer Temperatur von 40°C die Proteine des äußeren Kapsids (Grande und Benavente, 2000). Somit könnte die Körpertemperatur von Vögeln von über $39,5^\circ\text{C}$ den Verlust der Proteine des äußeren Kapsids zur Folge haben. Die Penetration des Virus in die intestinalen Zellen und/oder das intraendosomale Uncoating könnten möglicherweise erleichtert werden (Benavente und Martinez-Costas, 2007). Bei einer Temperatur von 50°C sind aviäre Reoviren allerdings über eine Stunde stabil (Deshmukh und Pomeroy, 1969b). Untersuchungen der Stabilität bei höheren Temperaturen zeigen unterschiedliche Ergebnisse (Petek, 1967a; Dutta und Pomeroy, 1967b; Glass et al., 1973; Mustaffa-Babjee et al., 1973; Van der Heide und Kalbac, 1975; Spandidos und Graham, 1976a; Hieronymus et al., 1983). Bei niedrigen Temperaturen sind aviäre Reoviren stabil und behalten ihre Infektiosität über mehrere Monate (Olson und Kerr, 1966; Dutta und Pomeroy, 1967b). Die Inaktivierungszeit durch UV-Licht ist mit 120 bis 720 Sekunden auffallend variabel (Deshmukh und Pomeroy, 1969a).

2.2 Reovirusinfektionen des Wirtschaftsgeflügels

2.2.1 Reovirusinfektionen

Es gibt zahlreiche Reovirusinfektionen des Wirtschaftsgeflügels, die ohne Symptome oder unter Ausprägung verschiedenster Krankheitsbilder auftreten bzw. nicht mit klar definierten Krankheitsbildern in Verbindung zu bringen sind (Heffels-Redmann et al., 1992; Jones, 2003; Rosenberger und Jones, 2003). Dazu zählen bei Huhn und Pute z.B. Darmerkrankungen mit verklebten Kloaken und erhöhter Mortalität (Dutta und Pomeroy, 1967b), ulzerative Enteritis (Krauss und Ueberschär, 1966), respiratorische Erkrankungen (Fahey und Crawley, 1954), erhöhte Mortalität und Hydroperikard in Broilern (Bains et al., 1974) sowie plötzlicher Tod mit Läsionen in Herz, Nieren und Leber (Bagust und Westbury, 1975).

Als definierte, durch Reoviren verursachte Krankheitsbilder werden die Arthritis/Tenosynovitis bei Huhn und Pute, die Infektiöse Myokarditis der Gösse und die Reovirusinfektion der Flugenten beschrieben (McFerran et al., 1976; Van der Heide, 1977; Robertson und Wilcox, 1986; Heffels-Redmann et al., 1992; Jones, 2003).

Die Arthritis/Tenosynovitis ist eine bedeutsame Erkrankung, die durch entzündliche Veränderungen hauptsächlich am Tarsometatarsalgelenk, ggf. unter Einbeziehung von Sehnen und Sehnenscheiden, eine akute Lahmheit hervorruft (Van der Heide, 1977; Rosenberger und Jones, 2003). Die Erkrankung kommt selten bei weniger als vier bis fünf Wochen alten Tieren vor (Kibenge et al., 1982; Rosenberger und Jones, 2003). Die Morbidität ist variabel, liegt aber unter 10%. Die Mortalität ist gering. Die betroffenen Gelenke sind geschwollen und entzündet. Bei einem schweren Krankheitsverlauf können eine Ruptur der Gastroknemiussehne und ein Defekt der Gelenkknorpel hinzukommen. Sind beide Gelenke betroffen, ist das Tier bewegungsunfähig. Die Ruptur der Gastroknemiussehne geht mit Blutungen einher, die zu einer grünlichen Verfärbung der Haut über den Gelenken führen (Kibenge et al., 1982; Rosenberger und Jones, 2003). Es kommt zum Minderwuchs und verminderter Futtermittelverwertung, vor allem durch die Unfähigkeit lahmer Tiere, Futter zu erreichen sowie vermehrt zu kranken, zu Tode getrapelten Tieren. Im Schlachthof sind die Verwürfe erhöht, was insbesondere auf das Aussehen der betroffenen Gelenke zurückzuführen ist (Kibenge et al., 1982; Rosenberger und Jones, 2003).

Die infektiöse Myokarditis der Gösse ist eine seuchenartig verlaufende Erkrankung junger Gänseküken in einem Alter bis zu drei Wochen (Heffels-Redmann et al., 1992).

Literaturübersicht

Betroffene Gössele fallen durch Mattigkeit, verminderte Futteraufnahme und einen mukös-wässrigen, grün-weißlichen Durchfall auf, was zu deutlichen Gewichtsverlusten führt. Auffällig ist das Kopfschütteln der Tiere, welches mit dem Auslaufen wässrig-schleimiger Flüssigkeit aus dem Schnabel einhergeht. Zusammen mit Nasenausfluss und vereinzelt Augenausfluss führt dies zu stark forcierter Atmung und Apathie (Csontos und Miklovich-Kis, 1967). Die Überschwemmung des Körpers mit dem Erreger sowie die Beteiligung nahezu aller lebenswichtigen Organe führen bei fast allen erkrankten Tieren innerhalb weniger Tage, manchmal auch innerhalb weniger Stunden, zum Tode (Mandelli et al., 1971). Die Morbidität liegt zwischen 20 und 60%, wobei nahezu alle erkrankten Tiere verenden (Heffels-Redmann et al., 1992). Überleben einige erkrankte Gänseküken, sind es meist ältere, die anschließend in ihrer Entwicklung zurückbleiben. Gössele, die älter als drei Wochen sind, erkranken aufgrund der sich ausbildenden Altersresistenz nicht mehr. (Mandelli et al., 1971). Die Erkrankung führt in betroffenen Gänsezucht- und -brutbetrieben zu hohen Verlusten mit entsprechenden wirtschaftlichen Schäden (Heffels-Redmann et al., 1992).

Die Reovirusinfektion der Flugenten ist eine bedeutsame Jungtiererkrankung, die unter wenig charakteristischen klinischen Symptomen zu Todesfällen und bei überlebenden Tieren zu Wachstumsdepressionen führt (Heffels-Redmann et al., 1992). Die Morbidität liegt bei 30 bis 100%, während sich die Mortalität zwischen 10 und 50% bewegt. Erkrankte Tiere zeigen Appetitlosigkeit bei gleichzeitig starkem oder fehlendem Durst, Diarrhoe sowie Bewegungsunlust bzw. Bewegungsschwierigkeiten, außerdem treten Nekrosen in Leber, Milz und Nieren auf (Malkinson et al., 1981). Erkrankte Tiere, die nicht sterben sondern sich erholen, zeigen einen deutlichen Wachstumsrückstand. Die Erkrankung wurde v.a. aus Ländern mit intensiver Flugentehaltung beschrieben, wo sie eine bedeutsame Rolle in Aufzucht und Mast spielt. So wurde beispielsweise in Frankreich bei 38% der in den Jahren 1981-1983 untersuchten 1800 Entenbeständen eine Reovirusinfektion festgestellt (Heffels-Redmann et al., 1992).

2.2.2 Enteric reovirus strains (ERS)

Van Loon et al. beschrieben 2001 die Isolierung eines neuen enteropathogenen Typs von Reoviren, der als enteric reovirus strain (ERS) bezeichnet wurde. Isoliert wurde das Reovirus aus aus Polen stammenden Broilern mit einer Mortalität von bis zu 100% (Minta et al., 2001), obwohl die Broiler Elterntierherden entstammten, die gegen Reoviren geimpft waren. Die Tiere zeigten ein Hydroperikard sowie eine vergrößerte Leber und Milz (Minta et al., 2001; Van de Zande, 2004). Untersuchungen zur Pathogenität und Ausbreitung in SPF-Hühnern zeigen, dass der ERS-Stamm eine hohe Mortalität, MAS und Tenosynovitis hervorrufen kann. An Eintagsbroilerküken bzw. sieben Tage alten Broilern mit maternalen Antikörpern kann eine Wachstumsverzögerung von 35% bzw. 25% im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren konstatiert werden (Van Loon et al., 2001). Der ERS-Stamm wird als ein neuer Serotyp der Reoviren beschrieben, da er im Plaquereduktionstest nicht von Antiseren bekannter Reoviren neutralisiert wird. Des Weiteren zeigt er im Vergleich zu Reovirus-Prototyp-Stämmen wie S1133 und 1733 sowie verschiedenen bekannten Reovirusisolaten ein anderes Muster bei der Charakterisierung mit monoklonalen Antikörpern im Indirekten Immunfluoreszenztest (Van Loon et al., 2001). Aus einem weiteren Feldausbruch in Polen 1999 wurde ein zweiter ERS-Stamm isoliert, der in SPF-Hühnern ZNS-Symptome hervorrief (Van de Zande und Kuhn, 2007). In den USA traten 2003 erstmalig ERS-Varianten auf, die neben MAS und Arthritis/Tenosynovitis auch ZNS-Symptome wie Tremor mit Kopfschütteln und Tortikollis hervorrufen (Hein et al., 2003).

In vielen Ländern wie den Niederlanden, Belgien, Irland, England, Spanien, Deutschland, Italien, den USA, Argentinien, den Vereinigten Arabischen Emiraten, Südafrika, den Philippinen und Indonesien konnten Reoviren isoliert werden, die aufgrund ihrer Reaktion mit monoklonalen Antikörpern dem ERS-Typ zugeordnet werden konnten. Diese Isolate stammen überwiegend aus Broilern mit MAS (Van Loon et al., 2001; Van de Zande und Lin, 2005).

2.3 Malabsorptions-Syndrom (MAS)

2.3.1 Einleitung

Das Malabsorptionssyndrom (MAS) ist als Krankheitsbild weltweit verbreitet. Aufgrund der unterschiedlichen klinischen und pathologischen Ausprägung werden viele verschiedene Synonyme verwendet, wie z.B.: Runting and stunting syndrome, infectious runting, infectious stunting (Kouwenhoven et al., 1978b; Vertommen et al., 1980; Bracewell und Wyeth, 1981; Reece et al., 1984), helicopter disease (Kouwenhoven et al., 1978b; Ruff, 1982), brittle bone disease, femoral head necrosis (Van der Heide et al., 1981), Einschlusskörperchenhepatitis (Ahne et al., 1974), enteric disease complex, Infektiöses Kümmerwuchs-Syndrom (Reece und Frazier, 1991; Bergmann, 2001) usw.

2.3.2 Ätiologie

Aus dem Darmtrakt MAS-kranker Tiere wurden viele verschiedene virale Erreger wie Reoviren, Adenoviren, Coronaviren, Caliciviren, Enteroviren, Rotaviren, Parvoviren und Togaviren isoliert (Wyeth et al., 1981; Kisary et al., 1984; McNulty et al., 1984; Decaesstecker et al., 1986; Mazurkiewicz et al., 1993; Yu et al., 2000). Ursprünglich wurden Reoviren als ursächliches Agens des MAS angenommen, und es wurden diverse Reovirusisolate identifiziert. Vielen Autoren war es jedoch nicht möglich, das MAS mit einem Virus allein zu reproduzieren (Shirai et al., 1990; Montgomery et al., 1997; Songserm et al., 2002; Songserm et al., 2003). Als weitere Faktoren für das MAS werden die Beteiligung von Bakterien (Montgomery et al., 1997) und nicht infektiöse Ursachen wie ein schlechtes Stallklima und hohe Besatzdichten diskutiert (Farmer, 1985). Es konnte kein einzelnes kausales Agens für das MAS gefunden werden, weshalb das MAS als eine multifaktorielle Erkrankung unter Einbeziehung verschiedener Pathogene angesehen wird (Van der Heide, 2000). Neuere Untersuchungen beschreiben einen Kausalzusammenhang zwischen MAS und den sog. enteric reovirus strains (Van Loon et al., 2001; Hein et al., 2003; Van de Zande et al., 2003; Van de Zande und Kuhn, 2007).

2.3.3 Wirtschaftliche Bedeutung des MAS

Das MAS wird für bedeutende wirtschaftliche Verluste in der Geflügelindustrie verantwortlich gemacht. Die Gründe liegen in den erhöhten Mortalitätsraten, der verminderten Futtermittelverwertung, den niedrigeren und ungleichmäßigen Gewichtszunahmen, dem erhöhten Medikamenteneinsatz, der häufigeren Merzung von Tieren in den Mast- und Elterntierbeständen, der verminderten Eier-Produktion in den Elterntierbeständen sowie den hohen Verwurfraten im Schlachthof (Vielitz et al., 1989; Dobson und Glisson, 1992; Rosenberger und Jones, 2003). In der Regel ist nicht nur ein Mastdurchgang betroffen, sondern meist werden auch nachfolgende Herden infiziert (Heffels-Redmann et al., 1992). Im Vordergrund steht weniger die Mortalität mit 2%, sondern die Morbidität mit nahezu 100% (Murphy et al., 1999).

Dobson und Glisson (1992) stellten eine Verlustrechnung bezüglich an Reoviren erkrankten Broiler-Elterntieren und deren Nachkommen vom Schlupf bis zur Schlachtung auf. Die Tiere zeigten Kümmerwuchs, ungleichmäßige Befiederung und Schwellungen der Beine inklusive der Gelenke. Es wurde ein Auseinanderwachsen der Herde und eine erhöhte Mortalität beobachtet. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die durch die Reovirus-Infektion zustande gekommenen Kosten in einer Herde von 8750 Broilern \$48000 betragen. Der größte Anteil der Verluste in der Broiler-Elterntier-Herde und den Broilern fiel auf die niedriger eingestuftes sowie verworfenen Tiere im Schlachthof und den stark gesenkten Preis der Eier, die nicht als Bruteier verkauft werden konnten, sondern der Pasteurisierung zugeführt werden mussten. Auch Vielitz et al. (1989) stellten in untersuchten Broiler-Beständen fest, dass der wirtschaftliche Schaden hauptsächlich durch den Kümmerwuchs hervorgerufen wurde. Bis zu 4,5% aller Schlachtkörper waren nicht verwertbar.

2.3.4 Übertragung

Aviäre Reoviren können horizontal und vertikal übertragen werden. Der erste Beweis für die Übertragung von Reoviren über das Brutei wurde von Deshmukh und Pomeroy (1969c) erbracht. Glass et al. (1973) berichten ebenfalls über die Übertragungsmöglichkeit auf diesem Wege. Nach experimenteller Infektion wurde die vertikale Übertragung bestätigt (Van der Heide und Kalbac, 1975; Menendez et al., 1975a). Kongenital infizierte Hühner spielen eine große Rolle für die fäkal-orale Infektion des Restschlupfes (Jones und Onunkwo, 1978), aber auch für die Übertragung über den Respirationstrakt. Untersuchungen von Menendez et al. (1975a) zeigen, dass die Eiübertragungsraten zwar gering, aber mit einer relativ langen Persistenz des Virus im Respirationstrakt einzelner Tiere verbunden ist. Als Übertragungsweg dominiert der horizontale, wobei der Erreger über den Digestions-, und Respirationstrakt ausgeschieden und oral bzw. nasal aufgenommen wird (Van der Heide et

al., 1976; Jones und Onunkwo, 1978; Herbst, 1983). Vielitz et al. (1989) beschreiben die horizontale Ausbreitung nach vertikaler Übertragung von Reoviren. In den untersuchten Mastbetrieben erfolgte die horizontale Übertragung des Erregers auf Küken, die von Reovirus freien Elterntierherden stammten. Zusätzlich gibt es Hinweise für eine Infektion mit Reoviren über beschädigte Haut der Tiere (Al Afaleq und Jones, 1990). Eine Möglichkeit der Reovirusübertragung über einen Stapelwirt beschrieben Lee et al. (1973) durch den Virusnachweis in Eiern von *Ascaridia galli*.

2.3.5 Empfänglichkeit

Das MAS ist eine Erkrankung, die besonders bei schnell wachsenden Broilern eine große Rolle spielt. In Feld- und experimentellen Untersuchungen waren Legehennen und ursprüngliche, langsam wachsende Broiler weniger anfällig als neuere, schnell wachsende Broilerzüchtungen (Shapiro et al., 1998; Zekarias, 2003). Auch zwischen verschiedenen schnell wachsenden Broiler-Linien (Cornish und White Plymouth/Rock) konnten Unterschiede in der Empfänglichkeit für das MAS festgestellt werden (Zekarias et al., 2002a). Eine rasche Wachstumsrate wird generell mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Erkrankungen in Verbindung gebracht (Smith et al., 1990; Qureshi und Havenstein, 1994; Julian, 1998). Die Mechanismen für die negative Korrelation des schnellen Wachstums und der Erkrankungsresistenz sind nicht geklärt. Einen Aspekt stellt die ungenügende Entwicklung des T-Zell-vermittelten Immunsystems dar (Bayyari et al., 1997; Li et al., 2000). Zekarias et al. (2002b) nehmen an, dass die Anzahl der CD4+ und CD8+ T-Zellen in der Darmmukosa eine Rolle spielt. Daher liegt nahe, dass der angeborene Immunstatus einen entscheidenden Faktor für die Empfänglichkeit gegenüber dem MAS darstellt (Bar-Shira et al., 2003).

85-90% der aviären Reoviren werden als apathogen eingestuft (Van der Heide, 1996). Wie für Reoviren allgemein beschrieben, hängt auch der Infektionsverlauf beim MAS stark vom Alter der Tiere zum Infektionszeitpunkt ab, so dass Küken insbesondere in den ersten Lebenstagen stärker an einer Reovirusinfektion erkranken als ältere Tiere (Jones und Georgiou, 1984; Montgomery et al., 1986). Am Empfänglichsten für letale Effekte einer Reovirus-Infektion sind direkt nach dem Schlupf infizierte Küken. Danach kommt es schnell zu einer Altersresistenz, von der vermutet wird, dass sie aus dem zunehmenden Auftreten einer IgA-Immunantwort an der Darmschleimhaut resultiert (Jones, 2000).

Weitere wichtige Faktoren für die Empfänglichkeit für das MAS spielen der Status maternaler Antikörper gegen Reoviren und die Vitalität der Küken (Zekarias, 2003).

Untersuchungen von Montgomery et al. (1986) zeigten keine Unterschiede in der Mortalität infizierter männlicher und weiblicher Tiere.

2.3.6 Klinisches und pathologisches Bild

Das MAS ist eine infektiöse Darmerkrankung von Broilern, die mit Wachstumsdepression, massiven Durchfällen und verminderter Futteraufnahme in den ersten zwei Lebenswochen einhergeht (Bracewell und Randall, 1984; Reece et al., 1984; Vielitz et al., 1989; Reece und Frazier, 1990). Die verminderte Gewichtsentwicklung ist ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung des MAS. In Bezug auf das Kümmerwachstum werden die sog. „stunted chickens“ von den „runted chickens“ unterschieden. Während die im Wachstum zurückgebliebenen „stunts“ nach ein bis zwei Wochen Kümmerwuchs wieder wachsen und bei der Schlachtung ca. 50-75% des Normalgewichts aufweisen, bleiben die „runts“ für drei bis vier Wochen im Wachstum zurück. Ihr Gewicht kann bis auf ein Drittel des normalen Schlachtgewichtes gesunken sein. Die Prävalenz der „stunted chickens“ in der Herde wird auf 0,5-50% geschätzt, während die Prävalenz der „runted birds“ 2% nicht überschreitet (Farmer, 1986; Reece und Frazier, 1990; Kouwenhoven, 1996). Schon in den ersten Beschreibungen des MAS wird vom Auseinanderwachen einwöchiger Broiler berichtet, gefolgt von schlechter Befiederung und Lahmheit in der zweiten Lebenswoche. (Kouwenhoven et al., 1978b). Betroffene Tiere zeigen eine katarrhalische Enteritis, Drüsenmagenentzündung und Pankreatitis (Kouwenhoven et al., 1978a; Bracewell und Randall, 1984; Sinclair et al., 1984). Die Dünndärme sind aufgebläht, blass und mit mukösem, unvollständig verdaulichem Futterbrei gefüllt (Bracewell und Wyeth, 1981; Songserm et al., 2000; Zekarias et al., 2005). Randall et al. (1981) berichten von ausgeprägten Pankreasveränderungen, gekennzeichnet durch eine Atrophie bis zum vollständigen Ersatz des Pankreasgewebes durch Bindegewebe. Ähnliche Veränderungen fanden Pass et al. (1982). Die Autoren beobachteten aufgegaste mit schaumiger unverdaulich gefüllte Blinddärme, Federanomalien und eine Atrophie des Thymus und der Bursa Fabricii (Pass et al., 1982). Auch andere Autoren beobachteten eine Atrophie der Bursa Fabricii sowie eine Ausdehnung der Gallenblase (Bracewell und Wyeth, 1981). Shirai et al. berichten lediglich über eine milde Darminfektion nach Infektion von SPF-Hühnern (Shirai et al., 1990). Zusätzlich zum verminderten Gewicht, dem erhöhten Futterverbrauch und den aufgegastrten Därmen wurden Federanomalien sowie Pigmentierungsstörungen an den Unterschenkeln beschrieben (Page et al., 1982). Befiederungsstörungen und durch Tenosynovitis bedingte Bewegungsstörungen sind gemeinhin sekundäre Veränderungen in infizierten Tieren (Salyi und Glavits, 1999). Eine von Van der Heide et al. (1981) diagnostizierte Lahmheit bei Broilern konnte auf Frakturen der Femurköpfe und/oder Osteoporose sowie Tenosynovitiden zurückgeführt werden.

2.3.7 Pathogenese und histopathologisches Bild

Nach oraler Aufnahme aviärer Reoviren sind das Dünndarmepithel und das Epithel der Bursa Fabricii die primären Eintrittspforten in den Körper und Hauptorte für die Virusreplikation, von wo aus sich das Virus innerhalb von 24 bis 48 Stunden in andere Organe verteilt (Kibenge et al., 1985; Tang und Fletcher, 1987a; Jones et al., 1989).

Hühner mit MAS bilden eine hochgradige Enteritis mit zystischer Deformation der Lieberkühnschen Krypten und einer Atrophie der Darmvilli aus (Songserm et al., 2000). Zekarias et al. (2005) fanden eine vakuoläre Degeneration und Apoptose des Villiepithels sowie die Infiltration der Lamina propria mit heterophilen Granulozyten. Vor allem Kryptenveränderungen beschrieben Goodwin et al. (1993) und Montgomery et al. (1997). Die Pathogenese der Mukosaveränderungen ist jedoch nicht klar. Frazier und Reece (1990) machen virale und bakterielle Infektionen für Nekrosen in den Krypten verantwortlich. Zekarias et al. (2005) diskutieren nach experimenteller Infektion von Hühnern mit Darminhalt aus an MAS verendeten Tieren eine akute Zerstörung des Epithelzellverbandes und eine entzündliche Leukozyten-vermittelte Schädigung der intestinalen Mukosa als Faktoren in der Pathogenese des MAS. Songserm et al. (2003) stellten fest, dass der Schweregrad des Kümmerwuchses mit dem Schweregrad der Läsionen im vorderen Dünndarm korreliert. Einige Autoren halten eine Störung des exokrinen Pankreas und infolgedessen eine gestörte enzymatische Verdauung für den Primärfaktor der Pathogenese des MAS (Sinclair et al., 1984; Szabo et al., 1989). So wurden chronische Pankreasveränderungen beschrieben, die sich überwiegend auf das exokrine Pankreas beschränkten. Histologisch waren Degeneration, Atrophie und Fibroplasie erkennbar (Randall et al., 1981; Bracewell und Randall, 1984). Mazurkiewicz et al. (1993) stellten in an MAS erkrankten Hühnern erniedrigte Aktivitäten der Glutamyltransferase, Amylase, Trypsin, Chymotrypsin, Lipase und anderer Verdauungsenzyme fest. Auch ein Anstieg des Plasmaspiegels der Alkalischen Phosphatase (AP) wurde als klinisch-pathologisches Kriterium im Zusammenhang mit MAS diskutiert (Vertommen et al., 1980; Kouwenhoven, 1988). Die Werte der Enzymaktivitäten und ihre Plasmakonzentrationen sind jedoch nicht übereinstimmend beschrieben (Sinclair et al., 1984; Shapiro et al., 1997). Zekarias (2003) fand heraus, dass die Werte für die AP zwischen verschiedenen Broilerlinien auch ohne Infektion variieren. Sowohl in experimentellen als auch in Feldinfektionen wurden in den letzten Jahren nur selten Pankreasveränderungen festgestellt. Die Veränderungen der Verdauungsenzymaktivitäten stellen eher einen sekundären Effekt auf die Darmläsionen dar. Möglicherweise jedoch variiert die Pathogenese des MAS in Abhängigkeit vom infektiösen Agens (Zekarias, 2003).

Sobald die Darmschranke überwunden ist, kommt es zu einer rapiden Ausbreitung in multiple Organe (Jones et al., 1989; Ni und Kemp, 1995). Die Wichtigkeit der Virämie in der

Pathogenese des MAS bestätigten Kibenge et al. (1985). Nach oraler Infektion junger Hühner konnte innerhalb von 30 Minuten p.i. im Plasma, in den Erythrozyten und in der monozytären Zellfraktion des Blutes Virus nachgewiesen werden. Nach drei bis fünf Tagen war das Virus im gesamten Körper verteilt. (Kibenge et al., 1985).

Abhängig vom Virusstamm treten unterschiedlich schwere Veränderungen in verschiedenen Organen auf. In Folge experimenteller Infektion mit Reoviren konnten Veränderungen in Gelenken und Sehnenscheiden, Leber, Herz, Bauchspeicheldrüse, Niere und Darm nachgewiesen werden. Diese waren in den Frühstadien zum Teil durch Nekrosen, danach durch Infiltrate von Heterophilen und mononukleären Zellen charakterisiert (Glavits et al., 1984; Rosenberger et al., 1989; Jones, 2000). Page et al. (1982) konnten histopathologisch eine Drüsenmagenentzündung, Myokarditis, katarrhalische Enteritis sowie eine Atrophie der Bursa Fabricii und des Pankreas erkennen. Ein Haupt-Zielorgan von Reoviren ist die Leber, wie Jones und Guneratne (1984) in experimentell mit hohen Virusdosen infizierten Hühnern zeigten, die nach zehn Tagen in Folge einer Hepatitis verendeten. Einige Autoren nehmen an, dass die meisten Reoviren eine Affinität zu den Sprunggelenken aufweisen (Sahu und Olson, 1975; Jones und Guneratne, 1984). Nach experimenteller nasaler, trachealer oder oesophagealer Infektion adulter SPF Hennen zeigte sich eine Verbreitung der Reoviren in den Respirations-, Darm- und Reproduktionstrakt sowie in die Sprunggelenke (Menendez et al., 1975b). Untersuchungen von Schweikl et al. (2007) zeigen, dass Reoviren innerhalb eines Bestandes persistieren können. Außerdem kann es zu einer aufsteigenden Infektion vom Darm in die parenchymatösen Organe kommen. In mehreren Studien wurden die Untersuchungen auf Gelenke, große Parenchyme oder nur auf den Darm beschränkt, so daß nicht immer eindeutig geklärt werden konnte, wie die Verteilung der Veränderungen im Gesamtorganismus ist.

Ni et al. (1995; 1996) untersuchten die genetischen Faktoren der Pathogenese aviärer Reoviren. Sie stellten fest, dass für den Gewebetropismus und die pathologischen Veränderungen in den Broilern das Gen-Segment S1 der Reoviren mit weiteren Kofaktoren verantwortlich zu sein scheint. Meanger et al. (1999) erklärten, dass die virulenten Stämme durch Mutationen im S1 Segment des Genoms charakterisiert waren. Bei den virulenten Stämmen wurde eine schnellere Replikation und Ausbreitung im Wirt beobachtet. Es konnte ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem Nachweis des Reovirus-Antigens im Gewebe und Gewebsveränderungen hergestellt werden (Ni und Kemp, 1995).

2.3.8 Reproduzierbarkeit des MAS

Die gängigste und effektivste Methode, das MAS zu reproduzieren, ist die Inokulation von Eintagsküken mit Darmhomogenat aus Tieren mit MAS (Shapiro et al., 1998; Songserm et al., 2002; Zekarias, 2003). Montgomery et al. (1986) stellten fest, dass weder die orale Infektion, noch die Infektion via Aerosol so effektiv wie die subkutane Infektion mit Reovirus-Isolaten war.

Kouwenhoven et al. (1978b) zeigten durch die Verwendung filtrierten Darmhomogenats ohne Bakterien und Mykoplasmen, dass Viren die Hauptverursacher der Erkrankung sein mussten. Die Reproduktion der Erkrankung nur mit isolierten Reoviren war nicht eindeutig möglich, auch wenn diese im Darmtrakt der betroffenen Tiere vorrangig nachzuweisen waren (Decaesstecker et al., 1986; Tang et al., 1987b; Kouwenhoven, 1988; Shirai et al., 1990; Rekik und Silim, 1992; Van Loon et al., 2001). Diese Befunde wurden so interpretiert, daß das MAS durch eine Mischinfektion von Reoviren mit weiteren Erregern ausgelöst wird. Neben Reoviren wurden aus Tieren mit MAS auch andere Erreger wie Adenoviren, Coronaviren, Caliciviren, Enteroviren, Rotaviren, Parvoviren und Togaviren isoliert (Wyeth et al., 1981; Kisary et al., 1984; McNulty et al., 1984; Decaesstecker et al., 1986; Mazurkiewicz et al., 1993; Yu et al., 2000). Von anderen Autoren werden Reoviren als Wegbereiter für die Ansiedlung von Sekundärerregern im Darmtrakt angesehen (Prusas und Hafez, 2002; Songserm et al., 2003). Das Unvermögen, das MAS mit nur einem Agens zu reproduzieren, wurde in anderen Veröffentlichungen auf die unterschiedliche Virulenz einzelner Reovirus-Stämme zurückgeführt (Ni und Kemp, 1995; Jones, 2000).

Veränderungen in Pankreas und Drüsenmagen sind in Feldausbrüchen beschrieben worden, konnten aber selten in experimentell infizierten Tieren reproduziert werden (Reece et al., 1984; Songserm et al., 2002).

Im Gegensatz zu den meisten Autoren gelang es einer Arbeitsgruppe, die durch Reoviren, die dem ERS-Typ zugeordnet worden waren, verursachten klinischen Erscheinungen wie MAS, Arthritis/Tenosynovitis und ZNS-Symptome in SPF-Hühnern zu reproduzieren (Hein et al., 2003; Van de Zande et al., 2003; Van de Zande und Kuhn, 2007).

2.3.9 Geflügelfleischhygienerecht in Bezug auf das MAS

Im Jahre 1992 wurde die Richtlinie 92/116/EWG des Rates vom 17.12.1992 zur Änderung und Aktualisierung der Richtlinie 71/118/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim Handelsverkehr mit frischem Geflügelfleisch verkündet, die mit dem Geflügelfleischhygienegesetz (GFIHG) und der Geflügelfleischhygiene-Verordnung (GFIHVO) in deutsches Recht umgesetzt worden ist. Im Geflügelfleischhygienegesetz und in der Geflügelfleischhygiene-Verordnung finden sich u.a. die Grundlagen für die Beurteilung des geschlachteten Geflügels.

Das Geflügelfleischhygienegesetz und die Geflügelfleischhygiene-Verordnung wurden am 01.09.2005 durch Artikel 7, Nummer 8 des Gesetzes zur Neuordnung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts aufgehoben. An ihre Stelle trat die am 01.01.2006 in Kraft getretene Verordnung (EG) Nr. 854/2004 vom 29.04.2004, in der besondere Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von Erzeugnissen tierischen Ursprungs festgelegt sind (Kapitel I, Artikel 1 (1)). Nach Kapitel 1, Artikel 2, (2a, d) gelten, soweit zutreffend, die Begriffsbestimmungen der Verordnungen (EG) Nr. 178/2002 und Nr. 853/2004. Nach Anhang I „Begriffsbestimmungen“ Nummer 1.1 der Verordnung (EG) 853/2004 bezeichnet der Ausdruck „Fleisch“ alle genießbaren Teile der in den Nummern 1.2 bis 1.8 genannten Tiere, einschließlich Blut. „Geflügel“ ist nach Nummer 1.3 Farmgeflügel, einschließlich Tiere, die zwar nicht als Haustiere gelten, jedoch wie Haustiere aufgezogen werden, mit Ausnahme von Laufvögeln. Als „Schlaktkörper“ wird der Körper eines Tieres nach dem Schlachten und Zurichten („dressing“) bezeichnet (Nummer 1.9), als „frisches Fleisch“ Fleisch, das zur Haltbarmachung ausschließlich gekühlt, gefroren oder schnellgefroren wurde, (...). Nach Nummer 1.11 bezeichnen „Nebenprodukte der Schlachtung“ anderes frisches Fleisch als frisches Schlaktkörperfleisch, einschließlich Eingeweide und Blut, wobei „Eingeweide“ Organe der Brust-, Bauch- und Beckenhöhle sowie die Luft- und Speiseröhre und -bei Geflügel- der Kropf sind (Nummer 1.12).

In Anhang I „Frischfleisch“, Abschnitt II „Maßnahmen im Anschluss an die Kontrollen“ der Verordnung (EG) Nr. 854/2004 sind in Kapitel V die „Entscheidungen bezüglich Fleisch“ festgelegt. Nach Nummer 1 ist Fleisch unter den Voraussetzungen 1a bis 1u als genussuntauglich zu erklären. Kümmerer bzw. Tiere mit Malabsorptions-Syndrom könnten unter „abgemagerte“ Tiere (1q) eingruppiert werden. Es existiert jedoch keine spezielle Liste mehr für Geflügel.

Aus diesem Grund wird derzeit national noch häufig auf die nicht mehr gültigen Vorschriften der Geflügelfleischhygiene-Verordnung zurückgegriffen. Anlage 1, Kapitel VI der Geflügelfleischhygiene-Verordnung bestimmt die Bedingungen für die Beurteilung des Geflügelfleisches. Nach Punkt 3.3.13 sind der Tierkörper und die Nebenprodukte der

Schlachtung als untauglich zu beurteilen, wenn eine hochgradige Abmagerung oder erhebliche Wachstumsstörungen (Kümmerwachstum) festgestellt worden ist. Eine präzise Angabe von Gewichts-Untergrenzen war jedoch in den Rechtsvorschriften nicht fixiert (Bergmann, 2001).

Neben den oben genannten Merkmalen zur Bestimmung der Untauglichkeit gelten mehrere Umstände, die als notwendige Voraussetzung für eine Genussuntauglichkeit zu gelten haben. Nach Anhang I „Frischfleisch“, Abschnitt II „Maßnahmen im Anschluss an die Kontrollen“, Kapitel II „Entscheidungen bezüglich der Informationen zur Lebensmittelkette“, Nummer 1 der Verordnung (EG) Nr. 854/2004 hat der amtliche Tierarzt sich zu vergewissern, dass die Tiere nur geschlachtet werden, wenn dem Schlachthofbetreiber die einschlägigen Informationen zur Lebensmittelkette vorliegen und er diese geprüft hat. Ergibt sich aus den begleitenden Aufzeichnungen, Unterlagen oder anderen Informationen, dass a) Tiere aus einem Betrieb oder einem Gebiet kommen, die zum Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier einer Verbringungsperre oder einer anderen Einschränkung unterliegen, b) die Vorschriften über die Verwendung von Tierarzneimitteln nicht eingehalten wurden oder c) andere Umstände vorliegen, die die Gesundheit von Mensch und Tier beeinträchtigen könnten, so dürfen diese Tiere nicht zur Schlachtung angenommen werden, (...) (Nummer 4). Nach Kapitel III „Entscheidungen bezüglich lebender Tiere“, Nummer 4 des selben Abschnittes dürfen Tiere, die eine Krankheit oder einen Zustand aufweisen, der durch den Kontakt oder Verzehr von Fleisch auf den Menschen oder andere Tiere übertragen werden kann, und allgemein Tiere, die klinische Anzeichen einer systemischen Erkrankung oder von Auszehrung (Kachexie) aufweisen, nicht für den menschlichen Verzehr geschlachtet werden. Diese Tiere müssen getrennt getötet werden, und zwar so, dass andere Tiere oder Schlachtkörper nicht kontaminiert werden können. Sie sind für genussuntauglich zu erklären.

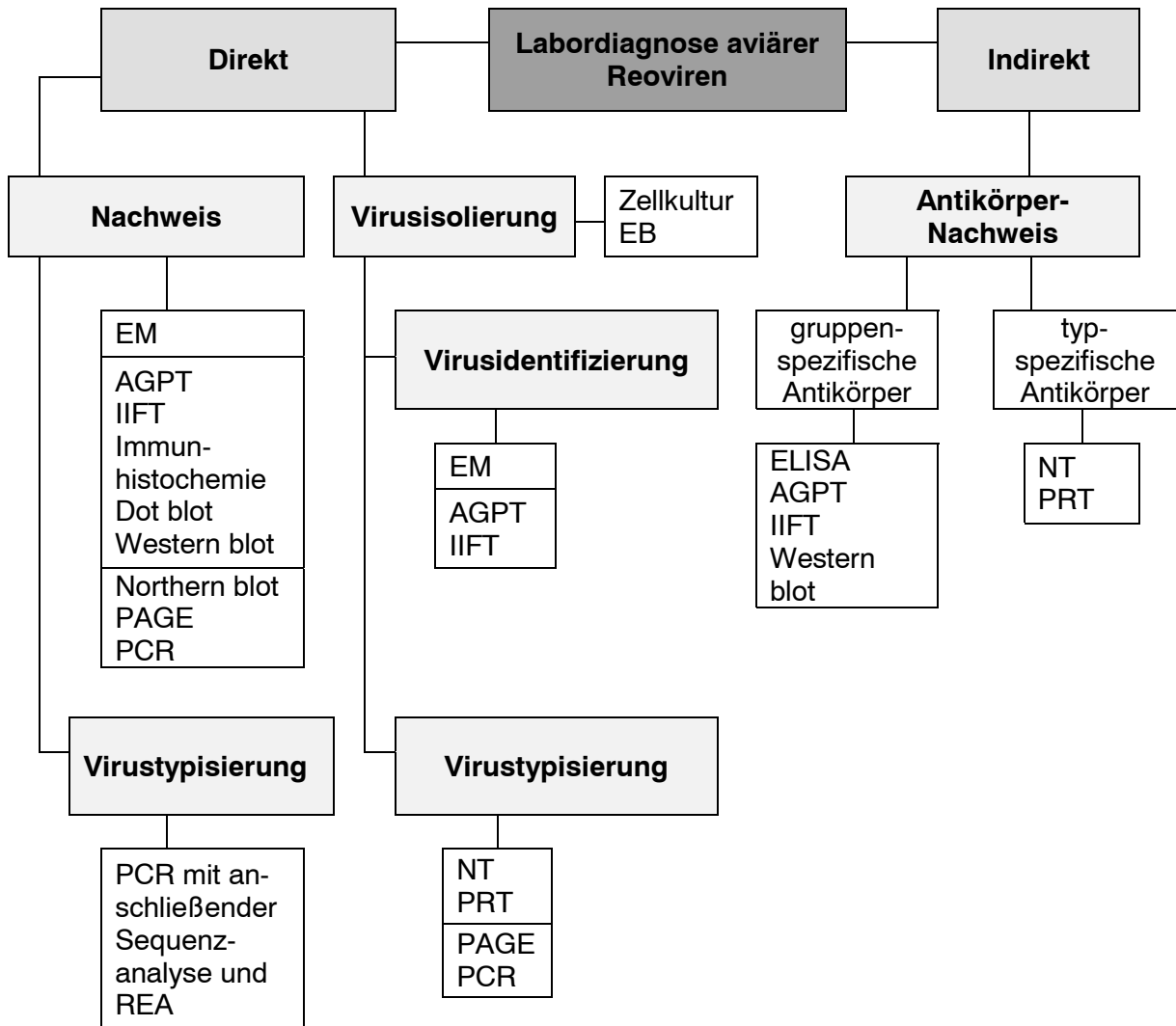
2.3.10 Differentialdiagnosen

Da die klinischen und pathologischen Veränderungen des MAS nicht pathognomonisch sind, müssen differentialdiagnostisch verschiedene infektiöse Erkrankungen des Verdauungsapparates und Mangelerscheinungen abgegrenzt werden. Ausgeschlossen werden müssen bakterielle Infektionen, Kokzidiose, Vitamin E-, D- oder A-Mangel, Selen- und Mineralstoffmangel. Die Ursache für eine Erkrankung ab der zweiten Lebenswoche kann in dem Vorliegen von Infektiöser Bursitis, Infektiöser Anämie der Küken oder auch Retikuloendotheliose begründet sein (Monreal, 1992).

2.4 Labordiagnose

Da die klinischen Erscheinungen sowie die pathologisch-anatomischen Befunde nicht pathognomonisch sind, sollte die Diagnose zusätzlich durch den Erregernachweis und/oder mit Hilfe serologischer Untersuchungen abgesichert werden.

Abbildung 2 fasst die in den Kapiteln 2.4.1 bis 2.4.4.2 beschriebenen Möglichkeiten der Labordiagnose aviärer Reoviren, gruppiert nach direktem und indirektem Nachweis, in einem Schema zusammen.



EM: Elektronenmikroskopie

PAGE: Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

REA: Restriktionsenzymanalyse

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

AGPT: Agargelpräzipitationstest

NT: Neutralisationstest

PRT: Plaquereduktionstest

EB: Embryoniertes Brutei

IIFT: Indirekter Immunfluoreszenztest

Abbildung 2: Möglichkeiten der Labordiagnose aviärer Reoviren

2.4.1 Virusisolierung

2.4.1.1 Virusisolierung in Zellkulturen

Die Anzüchtung aviärer Reoviren ist in Primärzellkulturen von Hühnerembryolebern, -fibroblasten, -lungen, -hoden sowie von Hühnerkükeniern möglich. Dabei erwiesen sich Hühnerembryoleber (HEL)- und Hühnerembryonieren-Zellen als am Sensibelsten und Hühnerembryofibroblasten-Zellen als am Wenigsten geeignet. Am Sensitivsten für die Isolierung aus klinischem Material haben sich Hühnerembryoleber-Zellen gezeigt (Petek et al., 1967b; McFerran et al., 1976; Guneratne et al., 1982).

Bei der Anzüchtung von Reoviren in Zellkulturen tritt ein cpE (zytopathischer Effekt) auf. Die ersten Merkmale sind die Vakuolisierung des Zytoplasma und die Zellfusion unter Bildung synzytialer Riesenzellen. Abhängig von der Inokulationsdosis und der Zellkulturart tritt der cpE frühestens 12 Stunden post infectionem (p.i.) auf. Später bilden sich Herde degenerierter Zellhaufen, die sich aus dem Zellverband lösen und im Zellrasen kleine, später größere Löcher zurücklassen (Von Bülow, 1979; Guneratne et al., 1982). Die Art der Zellkultur kann einen Einfluss auf die Titerhöhe haben, so lassen sich die höchsten Titer in kürzester Zeit in HEL-Zellen erreichen (Guneratne et al., 1982; Herbst, 1983).

Eine Bedeutung für die Anzüchtbarkeit hat die Herkunft der verwendeten Zellen, so können aviäre Reoviren in von Mammaliern und anderen Säugetieren abstammenden Zellen angezüchtet werden. Zum Teil ist eine Adaptierung über mehrere Blindpassagen nötig, bevor ein cpE sichtbar wird, so dass sie für die Isolierung aviärer Reoviren nicht geeignet erscheinen (Sahu und Olson, 1975; Barta et al., 1984; Nwajei et al., 1988).

Nach der Virusanzüchtung können aviäre Reoviren auch auf permanenten Zelllinien, wie der CER (chicken embryo rough)-Zelllinie, vermehrt werden (Sievers-Kruse, 1992; Huppert, 1996; Huther, 1996). Auch die Vermehrung auf der permanenten Zelllinie LMH (leghorn male hepatocytes) wird beschrieben (Heggen-Peay et al., 2002).

2.4.1.2 Virusisolierung im embryonierten Hühnerei

Die Dottersackbeimpfung embryonierter SPF-Hühnereier mit aviären Reoviren führt meist, abhängig von der Viruspathogenität und der Inokulationsdosis, innerhalb von zwei bis zehn Tagen zum Embryotod. Pathologisch sind Hämorrhagien, Ödeme, Lebernekrosen und z.T. Verzweigung erkennbar. Die Eihäute weisen herdförmige Trübungen auf (Fahey und Crawley, 1954; Glass et al., 1973; Ahne et al., 1974). Die Inokulation der Allantoishöhle führt nicht bei allen Embryonen zum Tod. Es werden bei den abgestorbenen Embryonen Leber- und Milzschwellungen, Nekrosen in Herz und Leber sowie teilweise Ödematisierung und Verzweigung festgestellt (Glass et al., 1973; Rinaldi et al., 1973). Nach Beimpfung der

Chorioallantoismembran weist diese gräuliche, pockenähnliche Bezirke auf und ist ödematisiert. Am Embryo werden ähnliche Veränderungen wie bei der Inokulation der Allantoismembran beobachtet (Dutta und Pomeroy, 1967a).

Weder die Veränderungen in der Zellkultur noch die im Hühnerembryo sind pathognomonisch (Heffels-Redmann et al., 1992).

2.4.2 Virusnachweis und -identifizierung

2.4.2.1 Elektronenmikroskopie (EM)

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie können aviäre Reoviren anhand ihrer morphologischen Eigenschaften (siehe 2.1.4) direkt nachgewiesen werden. Die Untersuchung kann aus verschiedenen Materialien vor der Virusanzüchtung (z.B. aus Organhomogenaten oder Darminhalt) und nach der Virusanzüchtung (z.B. aus Zellsuspensionen) in der Negativkontrastierung durchgeführt werden. Auch Ultradünnschnitte von verändertem Gewebe infizierter Tiere können für die Untersuchungen herangezogen werden (Walker et al., 1972; Van der Heide et al., 1981; Lozano et al., 1992; Montgomery et al., 1997; Yu et al., 2000).

2.4.2.2 Immunologische Methoden

2.4.2.2.1 *Agargelpräzipitationstest (AGPT)*

Der Virusnachweis mittels AGPT erfolgt auf der Grundlage gruppenspezifischer Antikörper gegen aviäre Reoviren. Mit dieser Methode können aviäre Reoviren mit bekannten Antiseren direkt in Organhomogenaten oder nach der Virusanzüchtung nachgewiesen werden. Um eine sichtbare Präzipitatbildung zu erwirken, sind hohe Antigen- und Antikörperkonzentrationen nötig (Van der Heide et al., 1974; Woernle et al., 1974).

2.4.2.2.2 *Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)*

Bei Verwendung polyklonaler Antiseren ist der IIFT eine gruppenspezifische Nachweismethode aviärer Reoviren. Der Test wird häufig angewendet, um virales Antigen im Zytoplasma infizierter Zellen nachzuweisen. Er stellt eine sensitivere Methode dar als der AGPT. Bei positiver Reaktion im Zytoplasma infizierter Zellen sind immunfluoreszenzmikroskopisch die in Anzahl und Größe variierenden, runden Viroplasma erkennbar (Walker et al., 1972; Von Bülow, 1979). Neben den normalerweise verwendeten Deckgläschen können für die Untersuchungen auch Zellkultur-Testplatten eingesetzt werden

(Ide, 1982). Mit dem IIFT konnte schon früh die hohe Kreuzreaktivität verschiedener Hühner-Reovirusisolate festgestellt werden (Kawamura und Tsubahara, 1966).

Van Loon et al. (2001) nutzten den IIFT zur Charakterisierung aviärer Reoviren mit monoklonalen Antikörpern, von denen die Antikörper 13-6 sowie 15-1 gegen das vom Gen-Segment S1 kodierte Protein σ C und 14-11 gegen ein μ -Protein, wahrscheinlich das Protein μ B (persönliche Mitteilung Dr. S. van de Zande, Intervet International, Boxmeer), gerichtet sind. Die Autoren fanden heraus, dass die sog. enteric reovirus strains (ERS) (siehe 2.2.2) ein anderes Muster der Reaktion mit monoklonalen Antikörpern im Vergleich zu vielen in der Literatur beschriebenen aviären Reoviren aufwiesen (Van Loon et al., 2001) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zuordnung von Reoviren zu ERS und „nicht-ERS“ auf der Grundlage ihrer Reaktionen mit monoklonalen Antikörpern im IIFT; Nach van Loon et al. (2001)

Vergleichstamm	Rabbit 68 A	Monoklonale Antikörper			Ergebnis
		14-11	13-6	15-1	
Reovirus-Prototyp-Stamm S1133	+	+	+	+	Reo (Reovirus)
238/98	+	-	-	-	ERS (enteric reovirus strain)

2.4.2.2.3 Immunhistochemie

Mittels der Immunhistochemie können mit bekannten Antisera Proteine aviärer Reoviren direkt nachgewiesen werden. Die Methode ist kosten- und zeitintensiv, erwies sich jedoch als sehr sensitiv. Neben dem Nachweis aviärer Reoviren ist auch die Lokalisation der Reoviren innerhalb des untersuchten Organs im Schnittpräparat möglich. Tang und Fletcher (1987a) nutzten als Immunperoxidase-Technik zum Proteinnachweis die Avidin-Biotin-Methode. Auch der Einsatz monoklonaler Antikörper für den Nachweis aviärer Reoviren ist beschrieben. So wurden diese gegen einen auf dem Gen-Segment S1 lokalisierten cDNA Klon in formalin-fixiertem Gewebe genutzt (Liu und Giambrone, 1997c).

2.4.2.2.4 Dot blot

Beim Dot blot werden Reovirusproteine auf einen Membranträger aufgebracht und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Li et al. (1996) nutzten in ihren Untersuchungen monoklonale Antikörper für den Reovirus-Nachweis. Analog zum Proteinnachweis können mit dieser Methode auch DNA oder RNA spezifisch durch Hybridisierung mit Nukleinsäuresonden detektiert werden (Liu und Giambrone, 1997b; Yin und Lee, 1998).

2.4.2.2.5 *Western blot*

Der Western blot stellt eine Methode zum Nachweis aviärer Reoviren dar, indem mit spezifischen Antikörpern Reovirusproteine nachgewiesen werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Reovirusproteine werden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, woraufhin die Antikörper an sie gebunden werden können. Nach erfolgter Immunreaktion werden die gebildeten Komplexe sichtbar. Der Western blot ist empfindlicher und sensibler als der IIFT (Von Bülow, 1979; Adair et al., 1987).

2.4.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.4.2.3.1 *Northern blot*

Der Northern blot ist eine Methode zum Nachweis viraler RNA, die nach elektrophoretischer Auftrennung auf einen Membranträger transferiert und mit DNA- oder RNA-Sonden detektiert wird. So konnten verschiedene Autoren mit cDNA-Sonden verschiedene Gen-Segmente der Reoviren detektieren (Chiu und Lee, 1997; Liu und Giambrone, 1997b).

2.4.2.3.2 *RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (RNA-PAGE)*

Siehe 2.4.3.2.

2.4.2.3.3 *RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)*

Siehe 2.4.3.2.

2.4.3 Virustypisierung

2.4.3.1 Serotypisierung im Neutralisationstest im Mikrotiterverfahren (NT) und im Plaquereduktionstest (PRT)

Der Neutralisationstest ist eine serotypspezifische Nachweismethode, die im Mikrotiterverfahren (NT) (Heffels, 1980) oder im Plaquereduktionstest (PRT) unter Agar-Overlay durchgeführt wird (Van der Heide, 1977; Wood et al., 1980).

Mit Hilfe von Kreuzneutralisations- und -Plaquereduktionstesten wurde versucht, eine Einteilung aviärer Reoviren in Serotypen vorzunehmen. So teilen verschiedene Autoren bei ihren Untersuchungen mit Hilfe von Kreuz-NT 77 Isolate in 5 Serotypen (Kawamura et al., 1965), mittels des Kreuz-PRT 9 Isolate in 4 Serotypen (Sahu und Olson, 1975), mit Hilfe des Kreuz-PRT 15 Isolate in 11 Serotypen (Wood et al., 1980) und mittels des Kreuz-NT 5 Isolate in 3 Serotypen (Hieronymus et al., 1983) ein. Trotz der hohen Sensitivität der Methode ergeben sich Schwierigkeiten für die Serotypisierung durch die große Heterogenität aviärer Reoviren. Zum einen kreuzreagieren einige Isolate mit verschiedenen Serotypen, zum anderen zeigen Isolate eines Serotyps starke antigenetische Unterschiede, weshalb häufig die Einteilung der Reovirusisolate in Subtypen empfohlen wird (Hieronymus et al., 1983; Robertson und Wilcox, 1984). Eine Ursache für die Problematik stellt die Möglichkeit der genetischen Rekombination bei Mischinfektionen mit antigenetisch verschiedenen Reoviren dar (Heffels-Redmann et al., 1992; Benavente und Martinez-Costas, 2007). Darüber hinaus sind von drei verschiedenen Neutralisationsantigenen zwei als gruppenspezifisch (σB und λB) und nur eins als typspezifisch (σC) beschrieben (Takehara et al., 1987; Wickramasinghe et al., 1993). Außerdem ist die Typspezifität neutralisierender Antikörper bei mit inaktiviertem Reovirus immunisierten Hühnern geringer als bei jenen nach natürlicher Infektion. Das hat bei der Herstellung von Immunseren zur Verwendung im NT eine große Bedeutung. Die Immunisierung mit inaktiviertem Antigen in Öl-Adjuvantien bewirkt eine stärkere Bildung gruppenspezifischer Antikörper. Eine Verstärkung des Effekts wird durch die Boosterung erreicht (Meanger et al., 1995). Die Autoren konnten auch mit monoklonalen Antikörpern keine eindeutigen Resultate im Kreuzneutralisationstest erzielen. Die Typspezifität des Proteins σC scheint nicht absolut zu sein, so dass vermutet wird, dass auf dem Protein gruppen- sowie typspezifische Domänen vorliegen (Meanger et al., 1995).

2.4.3.2 Genotypisierung

2.4.3.2.1 *RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (RNA-PAGE)*

Die zehn Segmente ds-RNA von Reoviren können in einem Polyacrylamid-Gel nach ihrem Molekulargewicht gelelektrophoretisch in Banden aufgetrennt werden (L1-3, M1-3, S1-4). Lozano et al. (1992) und Alfieri et al. (1989) sehen in der PAGE ein gutes Diagnostikum, um aviäre Reoviren von den anderen Genera der *Reoviridae* zu unterscheiden. Viele Autoren nutzten die PAGE zur Charakterisierung aviärer Reoviren und versuchten eine Einteilung in Genotypen bzw. Elektropherotypen (Rekik et al., 1990). So konnten Nick et al. (1975) die untersuchten Isolate einem Serotyp zuordnen, sie zeigten aber unterschiedliche Wanderungsmuster in der PAGE. Ein Zusammenhang zwischen Serotyp und Genotyp konnte nicht hergestellt werden. Auch Gouvea und Schnitzer (1982a; 1982b) stellten einen ausgeprägten Polymorphismus von Wanderungsmustern der Gen-Segmente zwischen Isolaten des selben Serotyps wie auch zwischen verschiedenen Serotypen fest. Die Autoren konnten aber eine gewisse Relation zwischen dem Genotyp und der geographischen Herkunft der Isolate feststellen. Bis auf eine Ausnahme zeigten die Wanderungsmuster von Isolaten aus einer Region, die über einen Zeitraum von einigen Jahren isoliert worden waren, eine große Ähnlichkeit. Isolate aus geographisch entfernten Gebieten zeigten hingegen einen großen Polymorphismus im RNA-Wanderungsmuster. Auch andere Autoren stellten einen nur geringen Polymorphismus zwischen Reoviren aus einem geographischen Gebiet fest (Clark et al., 1990). Große Unterschiede im Wanderungsmuster wurden zwischen isolierten Reoviren aus entfernten Gebieten und aus verschiedenen Spezies erkannt (Hrdy et al., 1979; Robertson und Wilcox, 1986). Rekik et al. (1990) stellten hingegen fest, dass zwei Reoviren aus verschiedenen Regionen das gleiche Migrationsmuster aufwiesen. Reoviren aus einer geographischen Region zeigten hingegen sehr unterschiedliche Wanderungsmuster, was die Autoren auf die gleichzeitige Verbreitung mehrerer aviärer Reoviren zurückführten (Rekik und Silim, 1992).

Einige Autoren stellten eine hohe Mutationsrate bzw. das häufige Auftreten genetischer Reassortanten durch Mischinfektionen fest. Bei drei von zehn untersuchten Isolaten konnten in der PAGE zusätzliche Gen-Banden bei M2, S1, S2 und S4 gefunden werden (Rekik et al., 1990). Auch Ni und Kemp (1990; 1992) stellten fest, dass durch Mischinfektionen mit zwei Reovirusisolaten Reassortanten entstehen können und dass es durch sie zu einer erhöhten Infektiosität kommen kann .

2.4.3.2.2 RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR), Southern blot, Restriktionsenzymanalyse (REA), Sequenzanalyse

Die RT-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) ist eine schnelle, empfindliche und spezifische Möglichkeit der Amplifikation von Gensequenzen und somit für den Nachweis viraler RNA auf Molekularebene. Oft wird die PCR in Kombination mit der Restriktionsenzymanalyse (REA) und Sequenzanalyse für die Charakterisierung aviärer Reoviren genutzt, wobei vor allem das Gen-Segment S1 untersucht wurde. Um die Genauigkeit der RT-PCR Amplifikation ihrer entwickelten Reovirus PCRs zu überprüfen, führten verschiedene Autoren den Southern blot oder den Dot blot durch. In Tabelle 4 sind die bislang veröffentlichten PCRs zur Detektion aviärer Reoviren samt weiterführenden Untersuchungen zur Differenzierung und Charakterisierung aufgelistet.

Tabelle 4: Veröffentlichte PCRs für aviäre Reoviren und weiterführende Untersuchungen

Genom-Segment	Amplifizierter Bereich	Weiterführende Untersuchungen	Referenz
S1	σ C kodierender Abschnitt (1022 bp)	REA	Liu et al. (2004b)
	ORF des σ C kodierenden Bereiches (1088 bp)	Sequenzanalyse	Kant et al. (2003)
	σ C kodierender Abschnitt (1023 bp)	Southern blot REA	Liu et al. (1999)
	532 bp langes Fragment	Southern blot	Xie et al. (1997)
	738 bp und 342 bp lange Fragmente des σ C kodierenden Abschnitts (nested PCR)	Southern blot Dot blot Sequenzanalyse	Liu et al. (1997)
	Vier überlappende Fragmente des σ C kodierenden Abschnitts (738bp und 342 bp sowie 720 bp und 500 bp) (nested PCR)	Southern blot REA Sequenzanalyse	Liu und Giambrone (1997a)
S2	399 bp langes Fragment	REA Sequenzanalyse	Bruhn et al. (2005)
S3	672 bp langes Fragment	Southern blot REA	Lee et al. (1998)
S4	437 bp langes Fragment	REA Sequenzanalyse	Bruhn et al. (2005)
	σ NS kodierender Abschnitt (1152 bp)	REA	Liu et al. (2004b)

REA: Restriktionsenzymanalyse

2.4.4 Antikörper-Nachweis

2.4.4.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit dem ELISA werden gruppenspezifische Antikörper aviärer Reoviren nachgewiesen. Die Methode ist wesentlich sensitiver, kostengünstiger sowie einfacher und schneller durchführbar als der Antikörper-Nachweis mit anderen Methoden, wie dem AGPT oder dem IIFT. Allerdings ist er aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit auch störanfälliger (Slaght et al., 1978; Schwarzmaier, 1983; Adair et al., 1987; Islam und Jones, 1988). Mittlerweile werden ELISA-Kits zum Nachweis von Antikörpern gegen Reoviren kommerziell hergestellt und in der Praxis routinemäßig für den Antikörper-Nachweis genutzt.

2.4.4.2 Weitere Methoden zum Antikörper-Nachweis

Neben ihrer Eignung zum Antigen-Nachweis können der AGPT (Olson und Weiss, 1972), der IIFT (Kawamura und Tsubahara, 1966) und der Western blot (Endo-Munoz, 1990) auch für den Antikörper-Nachweis verwendet werden, wobei der IIFT dem AGPT hinsichtlich der Sensitivität deutlich überlegen, dem ELISA und dem Western blot hingegen unterlegen ist (Von Bülow, 1979; Adair et al., 1987).

Der Neutralisationstest im Mikrotiterverfahren oder als Plaquereduktionstest kann neben dem Einsatz als Methode zur Bestimmung von Serotypen zur Bestimmung serotypspezifischer Antikörper eingesetzt werden (Heffels, 1980; Wood et al., 1980).

2.5 Prophylaxe und Bekämpfung

Aufgrund der Tatsache, dass Infektionen mit aviären Reoviren weltweit verbreitet sind und das Virus außerhalb des Wirtes relativ resistent ist und vertikal übertragen werden kann, ist die Freiheit kommerzieller Broilerbestände von Infektionen mit aviären Reoviren nicht zu erreichen (Jones, 2000). Weil Küken am Empfänglichsten für Infektionen mit aviären Reoviren sind (Jones und Georgiou, 1984; Montgomery et al., 1986), wurden Vakzinierungsprogramme entworfen, um die Tiere in den ersten Lebensstagen vor einer Infektion zu schützen. Die verwendeten Impfstoffe beinhalteten meistens die aus Tieren mit Arthritis/Tenosynovitis isolierten Reovirus-Stämme UConn S1133 (Rossi et al., 1969; Van der Heide et al., 1976), 2408, 1733 oder CO₈ (Hieronymus et al., 1983; Rosenberger et al., 1989).

Der bisher überwiegend verwendete S1133- inaktivierte bzw. Lebendimpfstoff, der bei Broiler-Elterntieren eingesetzt wird, um den Küken einen maternalen Schutz zu gewähren, bietet keinen ausreichenden Impfschutz gegenüber allen Reovirusisolaten (Vielitz et al., 1989; Van der Heide, 2000; Hein et al., 2003). Ein wichtiger Punkt für die Unwirksamkeit von Vakzinen ist die Tatsache, dass die Möglichkeit des Reassortment bei Reoviren aufgrund ihres segmentierten Genoms besonders hoch ist. Bei Mischinfektionen mit verschiedenen Reoviren können neue Isolate mit veränderten antigenetischen Eigenschaften bzw. veränderter Pathogenität entstehen (Heffels-Redmann et al., 1992; Benavente und Martinez-Costas, 2007).

Derzeit sind in Deutschland zur Impfung von Hühnern gegen Reoviren die Lebendimpfstoffe „AviPro REO“ der Firma Lohmann Animal Health, Cuxhaven, „Nobilis REO 1133“ der Firma Intervet Deutschland, Unterschleißheim und „Poulvac-Chick V.A.“ der Firma Fort Dodge, Würselen, zugelassen. Sie enthalten den hoch attenuierten Reovirus-Stamm UConn S1133 und sind zur aktiven Immunisierung von Geflügel zur Prävention gegen die virale Arthritis und Tenosynovitis zugelassen. Als Inaktivatimpfstoffe kann auf die Vakzinen „Nobilis Reo inak“ und „Nobilis Reo+IB+G+ND“ (Reovirus-Infektion, Infektiöse Bronchitis, Infektiöse Bursitis, Newcastle disease) der Firma Intervet Deutschland, Unterschleißheim zurückgegriffen werden. Diese Impfstoffe enthalten die Reovirus-Stämme 1733 und 2408 zur aktiven Immunisierung von Elterntieren gegen Reovirus-Infektionen nach Grundimmunisierung mit Reovirus-Lebendimpfstoffen sowie zur passiven Immunisierung der Nachkommen gegen die virale Arthritis und Tenosynovitis durch Übertragung maternalen Antikörper.

(http://www.pei.de/cIn_048/nn_161774/DE/arzneimittel/vet-mittel/gefluegel/gefluegel-node.html?__nnn=true, Gebrauchsinformationen für Impfstoffe der Firmen Lohmann Animal Health, Intervet Deutschland und Fort Dodge).

Die Vakzinierung der Broiler-Elterntiere in Deutschland gegen Reoviren im Zusammenhang mit MAS erfolgt auf Grundlage dieser Impfstoffe. Ein Beispiel für ein Impfschema stammt von Dr. U. Löhren, Brüterei Weser-Ems (persönliche Mitteilung). Demnach werden die Broiler-Elterntiere am 4. Lebenstag subkutan mit einem der Lebendimpfstoffe „AviPro REO“ oder „Nobilis REO 1133“ vakziniert. Zwei weitere Impfungen erfolgen in der 16. sowie 20. Lebenswoche mit einer stallspezifischen inaktivierten Ölemulsionsvakzine, die intramuskulär verabreicht werden. Die stallspezifischen Inaktivatvakzinen bestehen aus drei bis fünf verschiedenen Reovirusisolaten, die aus an MAS erkrankten Mastbeständen isoliert wurden und werden laufend mit aktuellen Isolaten optimiert. Dieses Impfkonzepkt dient sowohl der Vorbeugung einer vertikalen Infektion als auch über hohe maternale Antikörpertiter dem Schutz vor einer horizontalen Frühinfektion der Küken. Seit der Anwendung dieses Impfmodells haben die Erkrankungsprävalenz sowie der Schweregrad des MAS in den Mastbeständen abgenommen.

Hingegen zeigen Untersuchungen von Schweikl et al. (2007), dass in 12 von 13 untersuchten an MAS erkrankten Herden Reoviren nachweisbar waren, obwohl die Elterntiere mit kommerziellen und stallspezifischen Reovirusvakzinen geimpft waren. Die Impfung verhinderte nicht die Infektion, sondern nur die klinischen Erscheinungen und den Verlauf der Erkrankung.

Da sich die klassischen inaktivierten sowie die Lebendimpfstoffe gegen Reoviren als nicht geeignet erwiesen haben, Feldinfektionen durch Reoviren vom ERS-Typ zu verhindern, wurde von der Firma Intervet International, Boxmeer, The Netherlands, der Inaktivatimpfstoff „Nobilis ERS inak“ entwickelt, der ERS-Isolate enthält. Bei experimentellen und Feldversuchen mit dem Impfstoff wurden bei den Broilern keine klinischen Symptome beobachtet, und ihr Gewicht war, verglichen mit dem von Broilern, die von ungeimpften Elterntieren stammten, signifikant weniger verringert (Van de Zande und Lin, 2005).

Neben der Vakzinierung von Geflügel sind weitere wichtige Punkte im Kampf gegen das MAS optimale Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen vor der EInstallung, eine gutes Stall-Management, und eine gezielte antibiotische Therapie zur Bekämpfung von Sekundärinfektionen. In vielen Fällen haben sich mehrfache Gaben von Vitamin A, D und E über das Trinkwasser günstig auf den Krankheitsverlauf ausgewirkt (Miltenburg et al., 1981; Monreal, 1992; Jones, 2000).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Virusisolate

3.1.1.1 Reovirus-Prototyp-Stamm S1133

Für die Untersuchungen wurde der in Connecticut, USA von Hühnern isolierte Reovirus Stamm UConn S1133 verwendet. Das durch ihn verursachte Krankheitsbild einer akuten nicht eitrigen Tenosynovitis, Arthritis und einer chronischen Fibrose der Sehnenscheiden wurde von van der Heide und Kalbac (1975) beschrieben. Der Stamm wird im Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin als Reovirus-Prototyp-Stamm in Hühnerembryoleber- (HEL-) Zellen vermehrt und aufbewahrt.

3.1.1.2 ERS-Vergleichsstamm 238/98

Als Vergleichsstamm für Reoviren vom ERS-Typ diente das Reovirusisolat 238/98, welches aus Lebern in HEL-Zellen isoliert wurde. Das Untersuchungsmaterial wurden dem Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin 1998 freundlicherweise von Dr. Minta, National Veterinary Research Institute, Pulawy, Polen übersendet. Die Organe stammten von in einem Alter von 5-7 Tage alten verendeten Broilern einer Herde in der akuten Phase einer Erkrankung mit einer Mortalität von 7 bis zu 50%. Die Tiere zeigten Apathie, Schwäche, fortschreitende Ataxie und Tortikollis, später schlechte Kondition und Kümmerwachstum, was zum Auseinanderwachsen der Herde führte. In der Sektion zeigten die Broiler geschwollene Lebern mit Nekrosen, vergrößerte Milzen mit Nekrosen und Hämorrhagien, Hydroperikarditiden und Nephritiden. Histopathologisch waren Lebernekrosen, massive Milznekrosen, Peri- und Myokarditiden sowie Nephritiden zu erkennen. Die Verluste bei der Schlachtung wurden mit 33-83 % angegeben (Minta et al., 2001). Die Differenzierung als ERS erfolgte durch die Intervet International, Boxmeer, The Netherlands (siehe 3.2.3.1.2).

3.1.1.3 Untersuchungsmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von Mastküken aus Beständen mit aktueller Malabsorptionssyndrom-Problematik unterschiedliche Organe oder Organ-Pools (Darm, Leber, Niere, Milz, Bursa, Pankreas, Synovialflüssigkeit) untersucht. Insgesamt standen 68 Proben zur Verfügung (siehe Tabelle 12, Ergebnisse).

3.1.2 Permanente Zelllinie chicken embryo rough (CER)

Die Zelllinie chicken embryo rough (CER) entstand bei der zufälligen Vermischung von Hühnerembryozellen und Hamsterzellen. Eine Ähnlichkeit von CER- und Babyhamsternierenzellen wurde mittels des Immunfluoreszenztests (IFT) festgestellt (Smith et al., 1977). Die für die eigenen Untersuchungen verwendete CER-Zelllinie stammt als 40. Passage aus der Zellbank des Friedrich-Löffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems, und wird im Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin vermehrt und aufbewahrt.

3.1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät, Verbrauchsmaterial	Hersteller
Adhäsiv-Objekträger (Star Frost)	Engelbrecht, Edermünde
Biopur-Zentrifugen-Gefäße (0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Broiler Mastfutter	Geflügelhof Möckern, Königs-Wusterhausen
Broiler Starterfutter	Geflügelhof Möckern, Königs-Wusterhausen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Cover-Plates®	Thermo, Dreieich
Deckgläschen	Engelbrecht, Edermühle
Edelstahldruckfiltrationsgerät	Sartorius, Göttingen
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips®	Biozym, Oldendorf
Elektrophoresekammer, Mini-Protean®	BioRad, München
ELISA-Reader MRX	Dynex Technologies, Denkendorf
Feindosierungsspritze, 1 ml	Braun, Melsungen
Filtereinheit, 0,45 µl / 0,2 µl	Schleicher & Schuell, Dassel
Fixvolumen-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Flügelmarken und Markiergerät Swiftack	Heartland Animal Health INC, Fair Play, USA
Fixvolumen-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenz-Mikroskop Aristoplan	Leica, Wetzlar
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Glas-Objekträger	Engelbrecht, Edermühle
Isolatoren	Montair Andersen bv, Sevenum, The Netherlands
Kanülen, Sterican 0,9 x 40 mm, 20G x ½	Braun, Melsungen
Bakteriette, steril	EM-TE-Vertrieb, Hamburg
Infusionskanüle mit Knopf, gerade (1,2 x 60 mm)	Heiland, Hamburg
Kryo-Röhrchen	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Lamina Hera Safe	Heraeus, Hanau
Magnetrührer, Ikamag Reo	Ika Labortechnik, Staufen
Minifuge GL	Heraeus, Hanau
Pipettierhilfen (Pipetboy acu)	Integra Bioscience, Fernwald
Power Pac High-Current Power Supply	BioRad, München

Material und Methoden

Gerät, Verbrauchsmaterial	Hersteller
Programm Revelation V. 3.04	Dynex Technologies, Denkendorf
Safe Lock Tubes, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Schlittenmikrotom	Jung, Heidelberg
Schüttelbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Sequenza™	Thermo, Dreieich
SPF-Broiler-Bruteier	Intervet International, Boxmeer, The Netherlands
SPF-Hühner-Bruteier, Valo	Lohmann, Cuxhaven
Spritze, Omnifix, 2 ml	Braun, Melsungen
Thermoblöcke (Thermomixer comfort, Thermostat 5320)	Eppendorf, Hamburg
Ultra Turrax	Ika Labortechnik, Staufen
Ultrazentrifuge, Optima™ LE-80K, Rotor SW 28	Beckman, California, USA
Ultraschallgerät, Converter	Branson, Danbury Conn., USA
UV-Transilluminator Typ UVT 2053 (302 nm, mittelwellig)	Herolab, Wiesloh
Videodokumentationssystem Bioprint DS und Software BioCapt Vers. 97.05	LTF Labortechnik, Wasserburg
Vortex-Genie™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage, Kern 444-33	Sartorius, Göttingen
Waage, Sartorius Universal	Sartorius, Göttingen
Zellkultur-Flaschen, 25 cm ² / 75 cm ²	Biochrom, Berlin
Zellkultur-Schalen, 60 x 15 mm	Biochrom, Berlin
Zellkultur-Testplatten, 6-, 24- und 96-Loch	Biochrom, Berlin
Zellulose-Acetat Filter, Porenweite 0,8µm	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen (Typ 5415C und 5417R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen-Röhrchen, 50 ml	Biochrom, Berlin
Zentrifugenröhrchen, Polyallomer, 25 x 89 mm (SW 28)	Beckman, California, USA

3.1.4 Reagenzien und Kits

Reagenz, Kit	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma, Missouri, USA
3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB Chromogen)	DakoCytomation, Hamburg
30% Acrylamide/Bis Solution, 37,5:1	BioRad, München
30% H ₂ O ₂	VWR International, Berlin
Agar	Lifetechnologies™ Gibco Brl, Galthersburg, USA
Aluminiumkaliumsulfat Dodecanhydrat (Kalialaun)	VWR International, Berlin
Ammoniumperoxidsulfat	Roth, Karlsruhe
Benzyl-Penicillin	Biochrom, Berlin
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	VWR International, Berlin
Chloroform	VWR International, Berlin
Columbia-Blutagar mit Schafblut	Oxoid, Wesel
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	VWR International, Berlin
Diethyl Pyrocarbonate	Sigma, Missouri, USA
ELISA Kit Flockcheck®-Avian Reovirus: Mit REO-Virusantigen (Huhn) beschichtete Testplatten (inaktiviert), REO-Positivkontrolle, Negativkontrolle, (Ziegen) Anti-Huhn: Meerrettichperoxidase-Konjugat, Probenverdünnungspuffer, TMB Substrat, Stopplösung	IDEXX Laboratories, Wörrstedt
Eosin (gelblich)	VWR International, Berlin
Ethanol reinst., 99,8 %	VWR International, Berlin
Ethidiumbromid, 1%	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Formalin	VWR International, Berlin
Glycerin	VWR International, Berlin
Guanidinthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Hämatoxilin (Monohydrat)	VWR International, Berlin
Harnstoff, 8M	Roth, Karlsruhe
Hyper-Mount-Eindeckmedium	Thermo Dreieich
Isoamylalkohol	VWR International, Berlin

Material und Methoden

Reagenz, Kit	Hersteller
Isopropanol	VWR International, Berlin
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR International, Berlin
KCl	VWR International, Berlin
Konjugat, FITC-markiertes anti-chicken IgG von der Ziege	Serotec, Düsseldorf
Kristallviolett	VWR International, Berlin
Medium 199	Biochrom, Berlin
MetaPhor® Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Methanol	VWR International, Berlin
N-Lauroyl-Sarcosine, 35%	Serva, Heidelberg
N,N-Dimethylformamide	Sigma, Missouri, USA
NaCl	VWR International, Berlin
Natriumacetat	VWR International, Berlin
Natriumcitrat	VWR International, Berlin
Natriumiodat	VWR International, Berlin
Neutralrot 0,3%	Biochrom, Berlin
Paraffin	Engelbrecht, Edermünde
Phenol	Roth, Karlsruhe
Primer	Roth, Karlsruhe
RNAse freies H ₂ O für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
Streptomycin-Sulfat	Biochrom, Berlin
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Titriplex III	VWR International, Berlin
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trypsin, 1:250	Becton Dickinson, Heidelberg
Tryptosephosphatbouillon	Becton Dickinson, Heidelberg
Xylene Cyanole FF	Sigma, Missouri, USA
Xylol, 100%	VWR International, Berlin
Zitronensäure-Monohydrat	VWR International, Berlin

3.1.5 Lösungen und Medien

3.1.5.1 Lösungen und Medien für virologische und serologische Methoden

Antibiotika-Gebrauchslösung

0,5 ml	Antibiotika-Stammlösung in
100 ml	Medium 199

Antibiotika-Stammlösung

100 ml	PBS
4000000 I.E./ml	Benzyl-Penicillin
4,0 g	Streptomycin

Anzuchtmedium

	Medium 199
10 %	Tryptosephosphatbouillon
10 %	Fetales Kälberserum
200 I.E./ml	Benzyl-Penicillin
0,2 mg/ml	Streptomycin-Sulfat

Erhaltungsmedium

wie Anzuchtmedium, aber nur
2% Fetales Kälberserum

Färbelösung zur Zellzählung

4,9 ml	PBS
5,0 ml	Kristallviolett-Lösung

Glycerin-PBS

PBS und
Glycerin im Verhältnis 1:9 mischen

Kristallviolett-Lösung

250 ml	Aqua bidest.
5,26 g	Zitronensäure
0,25 g	Kristallviolett

Material und Methoden

Neutralrot-Lösung

Neutralrot und
PBS
im Verhältnis 1:4 mischen

Overlay-Medium

Anzuchtmedium und
Agarose-PBS-Lösung 1%ig, verflüssigt
im Verhältnis 1:2 mischen

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, phosphate buffered saline), pH 7,4

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,15 g	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
0,2 g	Kaliumdihydrogenphosphat
ad 1000 ml	Aqua dest.

Trypsin-Gebrauchslösung (PBS-T)

1 ml	Trypsin-Stammlösung
100 ml	PBS

Trypsin-Stammlösung

4 g	NaCl
0,2 g	KCl
25 g	Trypsin, 1:250
ad 475 ml	Aqua dest.

Trypsin-Versen-Lösung

2 ml	Versen-Lösung
1 ml	Trypsin-Stammlösung
100 ml	PBS

Versen-Lösung

1 g	Titriplex III
100 ml	PBS

3.1.5.2 Lösungen und Medien für molekularbiologische Methoden

DEPC H₂O, 0,1%

10 μ l Diethyl Pyrocarbonate
ad 100 ml Aqua dest.
12 h bei RT inkubieren, autoklavieren

Elektrophorese-Laufpuffer (TBE, 1x)

100 ml TBE, 10x
ad 1000 ml Aqua dest.

Ethidiumbromid-Lösung

5 μ l Ethidiumbromid, 1%
ad 100 ml DEPC H₂O

Formamide Loading Buffer

95 % N,N-Dimethylformamide
20 mmol Titriplex III, pH 8,4
0,5 % Xylene Cyanole FF
0,5 % Bromphenolblau

Guanidinthiocyanat-Lösung

47,26 g Guanidinthiocyanat
in 80 ml Aqua bidest. lösen
1430 μ l N-Lauroyl-Sarcosine, 35%
128 μ l 2-Mercaptoethanol
0,73 g Natriumcitrat
ad 100 ml DEPC H₂O

TBE (Tris-Borat-Elektrophoresepuffer), 10x, pH 7,5-7,8

108 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan
55 g Borsäure
9,3 g Titriplex III
ad 1000 ml Millipore H₂O

Material und Methoden

Trenngel

2,2 ml	DEPC H ₂ O
3 ml	Harnstoff, 8M
3,3 ml	30% Acrylamide/Bis Solution, 37,5:1
1,5 ml	TBE, 10x
50 µl	Ammoniumperoxidsulfat 0,1g in 1 ml Aqua bidest. lösen
10 µl	TEMED

3.1.5.3 Lösungen und Medien für histologische und immunhistochemische Methoden

3% H₂O₂ in Methanol

5 ml	30% H ₂ O ₂
45 ml	Methanol

Citratpuffer, 0,01M, pH 6,0

9 ml	Stammlösung A
41 ml	Stammlösung B
ad 500 ml	Aqua dest.

Lösung 4 min bei 600 W in der Mikrowelle erwärmen

DAB (3,3-diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)-Substrat-Lösung

10 mg	DAB (3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)
10 ml	TBS
75 ml	3% H ₂ O ₂

Mayers Häkalaun

8 g	NaCl
1 g	Hämatoxin
0,2 g	Natriumiodat
50 g	Aluminiumkaliumsulfat
1 g	Zitronensäure
ad 1000 ml	H ₂ O

Material und Methoden

Stammlösung A

21,01	g	Zitronensäure (0,1M)
ad 1000	ml	Aqua dest.

Stammlösung B

29,41	g	Natriumcitrat (0,1M)
ad 1000	ml	Aqua dest.

TBS (Trisgepufferte Kochsalzlösung, tris buffered saline), pH 7,6

60,57	g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
80	g	NaCl
ad 1000	ml	Aqua dest.

3.1.6 Antiseren

3.1.6.1 Antiseren gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133

Es wurden ein im Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin in SPF-Hühnern hergestelltes Antiserum gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 (Von Bülow, 1979) sowie das Referenzserum „Avian Reovirus S1133“ der Firma Animal Health Center, Deventer, The Netherlands, verwendet.

3.1.6.2 Antiseren gegen Rota- und Adenovirus-Isolate

Es wurden ein Rotavirus-Antiserum und das Adenovirus-Antiserum „anti-Celo (Phelps)“ des Institutes für Geflügelkrankheiten verwendet:

3.1.6.3 FITC (Fluorescein Isothiocyanate)-markierter anti-Huhn Antikörper

Es wurde das Goat anti chicken IgG: FITC der Firma Serotec, Düsseldorf verwendet.

3.1.6.4 Ziegen-Normalserum

Es wurde das Ziegen-Normalserum der Firma DakoCytomation, Glostrup, Denmark, verwendet.

3.1.6.5 HRP (Horseradish Peroxidase)-markierter anti-Huhn Antikörper

Es wurde das Goat anti chicken IgG: HRP der Firma Serotec, Düsseldorf, verwendet.

3.1.7 Software

Die Sammlung und Auswertung der Daten sowie die Erstellung von Graphiken erfolgte mit den Programmen Microsoft Office Excel 2003 und SPSS für Windows 12.01.

Die Erstellung der schriftlichen Fassung erfolgte mit Hilfe des Programms Microsoft Office Word 2003.

3.2 Methoden

3.2.1 Virologische Methoden

3.2.1.1 Herstellung primärer Zellkulturen

3.2.1.1.1 Hühnerembryoleber-Zellen (HEL-Zellen)

Zur Herstellung von Hühnerembryoleber-Zellen (HEL-Zellen) wurden Embryonen am 11. Bebrütungstag unter sterilen Bedingungen aus SPF-Bruteiern entnommen, dekapitiert und eviszeriert. Die gewonnenen Lebern wurden zerkleinert und mehrfach mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin-Gebrauchslösung zugegeben und die Suspension auf einem Magnetrührer gerührt, um die Zellen aus dem Gewebeverband zu lösen. Nach 20 min wurde die Trypsinierung unterbrochen, der zellhaltige Überstand abgegossen und die verbliebenen Leberstückchen erneut mit Trypsin-Gebrauchslösung versetzt. Der Trypsinierungsvorgang wurde bis zur vollständigen Trypsinierung der Leberstückchen wiederholt und die gesammelten zellhaltigen Überstände 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in Anzuchtmedium resuspendiert. Um größere Bestandteile abzutrennen, wurden sie anschließend durch eine sterile Baumwollgaze gegossen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Zellsediment in einer definierten Menge Anzuchtmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die vitalen Zellen wurden mit Kristallviolett angefärbt, mit Hilfe eines Hämozytometers (Fuchs-Rosenthal) gezählt, die Zellsuspension mit Anzuchtmedium auf 800.000 Zellen/ml verdünnt und in die entsprechenden Kulturgefäße eingesät.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre hatte sich ein einschichtiger Zellrasen gebildet.

3.2.1.1.2 Hühnerembryofibroblasten-Zellen (HEF-Zellen)

Zur Herstellung von Hühnerembryofibroblasten-Zellen (HEF-Zellen) wurden Embryonen am 11. Bebrütungstag unter sterilen Bedingungen aus SPF-Bruteiern entnommen, dekapitiert und eviszeriert. Nach Abtrennen von Kopf, Flügeln und Unterschenkeln wurde der verbleibende Torso zerkleinert und mehrfach mit PBS gewaschen. Die Trypsinierung der Zellen erfolgte in gleicher Weise wie für HEL-Zellen (3.2.1.1.1) beschrieben. Die Zellen wurden zur Einsaat auf 400000 Zellen/ml eingestellt.

3.2.1.2 Subkultivierung der permanenten Zelllinie chicken embryo rough (CER)

Zur Herstellung einer Subkultur im Verhältnis 1:4 wurde von der chicken embryo rough (CER)-Zellkultur zunächst das Erhaltungsmedium abgegossen. Nach dem Waschen mit Trypsin-Versen-Lösung wurden erneut 5 ml bzw. 10 ml (bei 25 bzw. 75 cm³-Zellkulturflaschen) der Lösung auf den Zellrasen gegeben und nach 2-5 min bis auf ca. 0,5 bzw. 1 ml (bei 25 bzw. 75 cm³-Zellkulturflaschen), wieder entfernt. Die CER-Zellkultur wurde mit dem verbleibenden Rest der Trypsin-Versen-Lösung bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach vollständiger Ablösung des Rasens, die in 5-minütigen Abständen kontrolliert wurde, erfolgte die Resuspension der Zellen in Anzuchtmedium und das Einsäen in Kulturgefäße.

Nach 24 Stunden bei 37°C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre waren die Zellen zu einem vollständigen Monolayer ausgewachsen.

3.2.1.3 Probenaufbereitung

Aus Beständen mit aktueller Malabsorptions-Syndrom-Problematik wurden unterschiedliche Proben (Darm, Leber, Niere, Milz, Bursa, Pankreas, Gelenkflüssigkeit) von Mastküken mit Verdacht auf eine Reovirus-Infektion in das Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin eingesandt. Zur Herstellung einer 20%igen Suspension wurden die teilweise aus mehreren Organen gepoolten Proben mit PBS, welchem zur Unterdrückung der bakteriellen Begleitflora eine 10-fache Konzentration von Antibiotika-Gebrauchslösung zugegeben wurde, versetzt. Das Gemisch wurde mit Hilfe des Ultra Turrax homogenisiert und 30 min bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach 3-maligem Frieren bei -20°C und Tauen bei Zimmertemperatur wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 min bei 3000 U/min abgetrennt. Ein Teil des Überstandes wurde zur Prüfung der Sterilität auf Columbia-Blutagar ausgestrichen und 24 h bei 37°C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Bei Auftreten von Keimwachstum wurde der Überstand vor dem Verimpfen auf Zellkulturen steril filtriert (0,45 µl und anschließend 0,2 µl).

3.2.1.4 Beimpfung der Zellkulturen

Monolayer von HEL-, HEF- und CER-Zellen wurden in entsprechenden Kulturgefäßen nach Entfernung des Mediums mit dem Homogenat der jeweiligen Probe oder einem Reovirusisolat beimpft. Um die Zellen zu schonen, wurde das Virusmaterial vorsichtig tropfend auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Anschließend wurde die Zellkultur 1 Stunde bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach dieser Absorptionszeit wurde das Erhaltungsmedium vorsichtig entlang des unbewachsenen Rand des Gefäßes auf den Zellrasen gegeben.

Für die Versuche auf HEL-Zellen Rotaviren zu isolieren, wurde dem Medium 5µg/ml Trypsin zugesetzt.

In Tabelle 5 sind die Inokulations- und Mediummengen für die jeweiligen Kulturgefäße aufgelistet. Für weitere Untersuchungen wurden die Reovirusisolate an die CER-Zelllinie adaptiert.

Tabelle 5: Inokulations- und Mediummengen pro Kulturgefäß

Kulturgefäß	Inokulationsmenge	Menge des jeweiligen Mediums
Zellkultur-Testplatten 6-Loch	0,1 ml/ Kavität	2 ml/ Kavität
Zellkultur-Testplatten 24-Loch	0,1 ml/ Kavität	1 ml/ Kavität
Zellkultur-Testplatten 96-Loch	0,01 ml/ Kavität	0,3 ml/ Kavität
Zellkultur-Schalen	0,1 ml	5 ml
25 cm ² -Zellkultur-Flaschen	0,5 ml	8 ml
75 cm ² -Zellkultur-Flaschen	1 ml	25 ml

3.2.1.5 Virusvermehrung

Nach der Infektion wurden die Zellkulturen täglich mikroskopisch bei 125-facher Vergrößerung auf einen zytopathischen Effekt (cpE) kontrolliert. Dabei waren die Ausbildung, die Ausprägung, der Zeitpunkt des Auftretens und die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Veränderungen von Bedeutung. Die Beurteilung erfolgte im Vergleich zu nicht infizierten Zellkulturen. Nach Zerstörung des Zellrasens oder nach maximal 7 Tagen erfolgte nach dreimaligem Frieren und Tauen die Ernte der Zellen mit dem Überstand. Um auszuschließen, dass Veränderungen der Zellen durch toxische Effekte der Inhaltsstoffe hervorgerufen waren bzw. um einen höheren Virustiter zu erhalten, erfolgte unabhängig von der Ausbildung eines cpE nach 3-maligem Frieren und Tauen eine Passagierung auf frischen Zellen. Nach der Kontrolle im Indirekten Immunfluoreszenztest wurden positive Isolate bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2.1.6 Virustitration und Plaquereinigung

3.2.1.6.1 *Virustitration im Plaquetest*

Das Virusmaterial wurde in \log_{10} -Schritten in PBS verdünnt. Der konfluente HEL- bzw. CER-Zellrasen jeder Kavität einer Zellkultur-Testplatte (6-Loch) wurde mit 1 ml PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 0,1 ml der Virus-Verdünnungsstufen im zweifachen Ansatz. Für die Zellkontrolle wurde PBS verwendet. Durch vorsichtiges Schwenken der Platten wurde eine gleichmäßige Verteilung des Inokulums erreicht. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre wurde der Zellrasen in jeder Vertiefung erneut mit 1 ml PBS gewaschen, mit 2 ml verflüssigtem und auf 37°C abgekühlten Overlay-Medium überschichtet und nach dessen Erstarren weiter bebrütet. Nach 5 Tagen im Brutschrank erfolgte eine Überschichtung des festen Overlay-Mediums mit 1 ml Neutralrot-Lösung pro Kavität. Nach 4 h wurde der gefärbte Zellrasen beurteilt. Da die durch Reoviren abgestorbenen Zellen durch das Neutralrot nicht angefärbt wurden, konnten die Plaque als helle Stellen im Zellrasen makroskopisch ausgezählt werden. Die Berechnung der Virustiter erfolgte mit der Methode nach Spearman-Kärber in Gewebe-infektiösen Dosen 50 (tissue culture infectious dosis, TCID₅₀) je ml (Mayr et al., 1974).

3.2.1.6.2 *Plaquereinigung*

Für die weitere Differenzierung mit serologischen und molekularbiologischen Methoden sowie für die Bestimmung der Pathogenität *in vivo* erfolgte bei ausgewählten Reovirusisolaten eine Plaquereinigung.

Für diesen Vorgang wurde die \log_{10} -Verdünnung der Virussuspension eingesetzt, bei der nach den Ergebnissen der Titration 1-10 Plaque zu erwarten waren. Nach Ausbildung eines HEL- bzw. CER-Monolayers in Zellkultur-Schalen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1 ml des jeweiligen Reovirusisolates beimpft und 2 h im Brutschrank belassen. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Überschichtung mit flüssigem Overlay-Medium. Die Zellkultur-Schalen wurden 5 Tage bei 37°C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre bebrütet. Unter dem Mikroskop wurden die ausgewählten Plaque mit Hilfe einer Pipette mit präparierter Spitze abgesaugt, einzeln in Anzuchtmedium überführt und resuspendiert. Anschließend erfolgte eine neue Verimpfung der einzelnen Plaque in Zellkultur-Monolayer nach dem gleichen Prinzip. Nach dreimaliger Plaquereinigung konnte man davon ausgehen, dass das gewonnene Virusmaterial aus einer infektiösen Viruseinheit hervorgegangen war (Mayr et al., 1974). Plaque gereinigte Isolate wurden erneut titriert.

3.2.1.6.3 Beurteilung der Plaquemorphologie und -größe

Für die Beurteilung der Plaquemorphologie und -größe im Plaquetest unter Agar-Overlay (siehe 3.2.1.6.1) wurde die \log_{10} -Verdünnung der Virussuspension der Titration herangezogen, bei der bis zu 20 Plaque erkennbar waren. Fünf Tage p.i. wurde die Größe jedes Plaque aus zwei Paralleluntersuchungen in mm gemessen, wobei halbe mm geschätzt wurden. Die Mittelwerte jeder Paralleluntersuchung sowie die Standardabweichungen wurden berechnet. Der Rand der Plaque wurde makroskopisch beurteilt.

3.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden im Landeslabor Brandenburg, Potsdam vorgenommen und die Proben freundlicherweise von Dr. Dirk Soike bearbeitet und untersucht.

Es wurden sowohl Organhomogenate des eingesandten Probenmaterials (Ausgangsmaterial) als auch die nach Virusanzüchtung daraus erhaltenen Isolate zur Untersuchung in das Landeslabor eingesandt.

Für das elektronenmikroskopische Negativkontrastverfahren im Landeslabor Potsdam wurden die Organhomogenate und die Zellkulturen ca. 1:5 in PBS suspendiert. Organhomogenate wurden zum Zellaufschluss einer Ultraschallbehandlung (40sec, 20 kHz) unterzogen. Nach Zentrifugation der Suspensionen für 15 min bei 3000 U/min wurden deren Überstände wie auch die Überstände von Zellkulturen parallel für die direkte Präparation und die Präparation nach Partikelanreicherung durch Ultrazentrifugation (Beckmann-Airfuge, Rotor A 110, on grid, 12 min bei 120000 U/min) verwendet.

Kohlebedampfte und hydrophilisierte Kupfer-grids wurden für 7 min auf einen Tropfen des Untersuchungsmaterials gebracht und abschließend mit Phosphorwolframsäure (pH 6,0) kontrastiert. Die Untersuchung an einem TEM JEOL 1010 erfolgte bei 40000-facher Vergrößerung und 80 kV.

3.2.3 Serologische Methoden

3.2.3.1 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

3.2.3.1.1 IIFT zum Nachweis von Antigen in Zellkulturen mit polyklonalen Antikörpern

Zum Nachweis von Reovirus-Antigen wurde der Indirekte Immunfluoreszenztest nach Virusanzucht und verschiedenen Passagen auf HEL-, HEF- bzw. CER-Zellen nach von Bülow (1979) durchgeführt.

Die Zellen für die Virusvermehrung wurden auf zwei Deckgläschen in einer Zellkultur-Schale kultiviert. Nach Ausbildung eines einschichtigen Zellrasens wurde das Medium entfernt und der Rasen auf den Deckgläschen mit je 0,1 ml des 1:100 mit FKS-freiem Erhaltungsmedium verdünnten fraglichen Virusmaterials beimpft. Nach 1 h bei 37 °C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre wurden pro Zellkultur-Schale 5 ml Erhaltungsmedium ohne FKS zugegeben. Als Positivkontrolle wurde der Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 und als Negativkontrolle PBS eingesetzt. Vor Ausbildung eines cpE, d.h. zwischen 12 und 24 h p.i., wurden die Deckgläschen mit dem infizierten Zellrasen entnommen, mit PBS gewaschen, nach dem Trocknen 8 min in Azeton fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für den Antigen-Nachweis wurden der Zellrasen mit PBS befeuchtet und mit je 0,1 ml 1:160 mit PBS verdünntem Antiserum gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 überschichtet. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Zellrasen 2 x 10 min in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Auftropfen von 0,1 ml 1:100 mit PBS verdünntem FITC-markiertem anti-chicken IgG sowie eine erneute Inkubationszeit bei Raumtemperatur und das zweimalige Waschen in PBS. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite auf Objektträger in 1 Tropfen Glycerin-PBS gebettet, woraufhin die Auswertung unter dem Immunfluoreszenzmikroskop erfolgen konnte.

Der Nachweis von Rota- bzw. Adenoviren erfolgte analog zum oben beschriebenen IIFT, wobei anstatt des Serums gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 die Antiseren Anti-Rota-H in der Verdünnung 1:60 bzw. Anti-Celo in der Verdünnung 1:50 Verwendung fanden. Für den Nachweis von Rotaviren wurde dem Medium zusätzlich Trypsin zugesetzt.

3.2.3.1.2 IIFT zum Nachweis von Antigen mit monoklonalen Antikörpern (mAk)

Von 26 ausgewählten Isolaten wurden je 0,5 ml des Homogenats oder der Virussuspension (1. oder 2. Viruspassage) zu Intervet International, Boxmeer, The Netherlands geschickt und freundlicherweise von Dr. van de Zande mit ERS- (enteric reovirus strain)-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Van Loon et al., 2001) im IIFT auf Zugehörigkeit zu den als ERS bezeichneten Reoviren geprüft. Zunächst erfolgte die Identifizierung von Reoviren mit dem polyklonalen Antikörper „Rabbit 68 A“. Anschließend wurde eine Untersuchung mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern durchgeführt. Die Reaktion mit drei dieser mAk war das entscheidende Kriterium für die Zuordnung zu ERS- und „nicht-ERS“-Reoviren. Alle Isolate, die mit den mAk 14-11, 13-6 und 15-1 keine Fluoreszenz zeigten, wurden dem ERS-Typ zugeordnet. Als Vergleichsstamm dienten der „nicht-ERS“ Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 und das ERS-Isolat 238/98.

3.2.3.1.3 IIFT zum Nachweis polyklonaler Antikörper in Serum

Zum Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene Reovirusisolate wurde der Indirekte Immunfluoreszenztest auf HEL-Zellen durchgeführt.

Die Vorbereitung der Deckgläschen bis zum Schritt des Einfrierens erfolgte analog zum Antigen-Nachweis im IIFT (3.2.3.1.1), wobei der Zellrasen mit dem Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 infiziert wurde. Für den Antikörper-Nachweis wurden die Deckgläschen mit PBS befeuchtet und mit 0,1 ml des 1:10, 1:50 und 1:100 mit PBS verdünnten fraglichen Serums betropft. Als Positivkontrolle wurde je 0,1 ml 1:160 mit PBS verdünntes Antiserum gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 verwendet. Als Negativkontrolle diente PBS. Der weitere Ablauf erfolgte wie unter Punkt 3.2.3.1.1 beschrieben.

3.2.3.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Als weiterer Test für den Reovirus AK-Nachweis wurde ein kommerziell hergestellter ELISA eingesetzt. Die Bestimmung des Antikörpertiters gegen Reoviren erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Die optische Dichte wurde bei 650 nm mittels des ELISA-Readers MRX und des Programms Revelation V. 3.04 gemessen und ausgewertet. Der S/P-ratio wurde nach folgender Formel berechnet:

$$S/P - \text{ratio} = \frac{OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{NC}}}{OD_{\text{PC}} - OD_{\text{NC}}}$$

OD_{Probe} = optische Dichte der Probe

OD_{NC} = optische Dichte der Negativkontrolle

OD_{PC} = optische Dichte der Positivkontrolle

Proben mit einem S/P-ratio von 0,2 und größer wurden als positiv, Proben unter 0,2 als negativ gewertet.

Zum Nachweis von Antikörpern gegen Infektiöse Bursitis Viren (IBD Viren) wurde ein kommerziell hergestellter ELISA Kit (IDEXX) und zum Nachweis von Antikörpern gegen Avi-Adenoviren ein laboreigener ELISA verwendet.

3.2.3.3 Virusneutralisation

3.2.3.3.1 *Neutralisationstest im Mikrotiterverfahren (NT)*

Der Neutralisationstest wurde mit der Serumverdünnungsmethode mit konstanter Virusmenge gegen steigende Serumverdünnungen in Zellkultur-Testplatten mit 96 Vertiefungen auf CER-Zellkulturen durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit dem im Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin hergestellten Antiserum „anti-Reo 1/75 v. 18.03.75“ gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 und dem Referenzserum „Avian Reovirus S1133“ in aufsteigenden Verdünnungen durchgeführt.

Das Virusmaterial in einer Konzentration von 100 TCID₅₀/ml wurde 1 + 1 mit in log₂-Stufen verdünntem Antiserum vermischt. Nach vorsichtigem Vermischen erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre, um eine Virusneutralisation zu ermöglichen. Dieses Neutralisationsgemisch wurde im zweifachen Ansatz in die Kavitäten der 96-Loch Platten gegeben und anschließend die entsprechende Menge Zellen zugesetzt. Zusätzlich wurden eine Zell- und eine Serumkontrolle mitgeführt. Die Überprüfung der 100 TCID₅₀/ml in der verwendeten Virussuspension erfolgte durch Rücktitration. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre. Der Zellrasen wurde zwei Mal täglich im Vergleich mit der entsprechenden Virus- und Serumkontrolle mikroskopisch auf die Ausbildung eines cpE kontrolliert. Das Ausbleiben eines cpE in den Virus-Serumgemischen gab einen Hinweis auf eine stattgefundenene Neutralisation des Isolates durch die spezifischen Antikörper. Als Neutralisationstiter sollte die Serumverdünnung gewählt werden, in der zum frühesten Zeitpunkt der Möglichkeit, den cpE in der Viruskontrolle zu beurteilen, noch kein cpE im Neutralisationsgemisch auftrat. Der Neutralisationstiter wurde in 20 Paralleluntersuchungen ermittelt.

3.2.3.3.2 Neutralisationstest im Plaquereduktionstest (PRT)

Die Durchführung des Plaquereduktionstests erfolgte in der in Punkt 3.2.3.3.1 beschriebenen Serumverdünnungsmethode in Zellkultur-Testplatten mit sechs Vertiefungen auf CER-Zellen (Nersessian et al., 1989).

Der konfluente CER-Zellrasen wurde mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,1 ml des Neutralisationsgemisches in zweifachem Ansatz. Für alle Versuche wurden eine Zell- und eine Serumkontrolle mitgeführt. Die Überprüfung der 100 TCID₅₀/ml in der verwendeten Virussuspension erfolgte durch Auszählen der Plaque in der Viruskontrolle. Durch vorsichtiges Schwenken der Platten wurde eine gleichmäßige Verteilung des Inokulums erreicht. Nach 2 h bei 37°C und einer 5%igen CO₂ Atmosphäre wurde das Inokulum entfernt, der Zellrasen erneut mit 1 ml PBS gewaschen und mit 2 ml verflüssigtem Overlay-Medium überschichtet.

Nach 5 Tagen im Brutschrank wurde das feste Overlay-Medium mit 1 ml Neutralrot-Lösung pro Kavität überschichtet. Die Anzahl der Plaque wurde 4 h später in jeder Serumverdünnungsstufe makroskopisch ausgezählt. Aus den Ergebnissen der vier Parallelversuche wurde der Mittelwert für jede Verdünnung gebildet. Die Plaquezahl des Virus-Serumgemisches wurde zu der Plaquezahl des Virus ohne Serum ins Verhältnis gesetzt. Die Serumverdünnung, bei der die Anzahl der Plaque im Vergleich zur Viruskontrolle um 80% reduziert war, wurde als Neutralisationstiter 80% festgelegt (Nersessian et al., 1989).

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (RNA-PAGE)

Zum Nachweis von Reovirus-RNA in Zellkulturen wurde eine RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (RNA-PAGE), modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (1987), durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurden die RNA-Segmente von Reoviren unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Für die Untersuchungen wurden ausgewählte, auf CER vermehrte Reovirusisolate verwendet. Das Zellkulturmaterial wurde in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach zweistündiger Zentrifugation bei 28000 U/min und 4°C wurde der zell- und virusfreie Überstand entfernt. Das Sediment wurde zur RNA-Extraktion in 800 µl Guanidinthiocyanat-Lösung lysiert. Nach dem Überführen in ein 2 ml Safe Lock Tube wurden 800 µl gekühltes Phenol, 160 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) und 80µl Natriumacetat zugefügt und der Ansatz gevortext. Es folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis sowie die Zentrifugation für 30 min bei 14000 U/min und 4°C. Aus der wässrigen Phase wurde die RNA mit 1 Volumenteil Isopropanol für 1 h bei -20°C präzipitiert und anschließend für 30 min bei 14000 U/min und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 800 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14000 U/min und 4°C wurde der Überstand erneut entfernt und das Pellet für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Aufgenommen in 30 µl RNase freiem H₂O wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung in Safe Lock Tubes bei -70°C aufbewahrt.

Bei dem verwendeten Trenngel handelte es sich um ein 10%iges Polyacrylamid-Gel ohne SDS. Für seine Herstellung wurden DEPC-H₂O, Harnstoff, 30% Acrylamide/Bis Solution und TBE zusammenpipettiert und anschließend TEMED und APS-Lösung hinzugefügt. Sofort nach Zugabe des Reaktionsstarters und vorsichtigem Vermischen wurde der Ansatz luftblasenfrei in die Glaskammer gefüllt und ein Kunststoffkamm für jeweils zehn Probenschlitze eingesetzt. Nach zweistündiger Polymerisationsdauer wurde die Glaskammer mit dem Gel in die Elektrophoresekammer verbracht. Die Kammer wurde mit Elektrophorese-Laufpuffer befüllt und der Kamm entfernt. Nach dem Anschließen an die Spannungsquelle erfolgte ein Vorlauf von 10 min bei 150 mA, um eventuell vorhandene RNAsen zu entfernen. Die zu untersuchende extrahierte RNA wurde mit Formamide Loading Buffer gleichen Volumens versetzt und in die Probenschlitze pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur über 4,5 h bei einer Stromstärke von 150 V.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 20 min in Ethidiumbromid-Lösung schüttelnd inkubiert. Anschließend konnten die RNA-Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.2.5 Prüfung der Pathogenität *in vivo*

3.2.5.1 Versuchstiere

Für den Versuch wurden Eintagsküken von SPF-Broiler-Elterntieren verwendet. Für die Bruteier wurde vom Hersteller ein SPF-Prüfzertifikat mitgeliefert.

Der Versuch wurde durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin, genehmigt (Genehmigungsnummer G0159/01).

3.2.5.2 Haltung

Die Aufstallung erfolgte einstreulos und gruppenweise getrennt in Isolatoren mit separater Luftführung innerhalb eines Raumes. Die Be- und Entlüftung sowie die Temperatur wurden automatisch gesteuert. Die Gabe von Futter und Wasser erfolgte ad libitum. In den ersten 12 Tagen erhielten die Tiere Broiler Starterfutter, anschließend Broiler Mastfutter.

3.2.5.3 Infektion

Für die Bestimmung der Pathogenität *in vivo* wurden die Eintagsküken per Zufallsprinzip in 6 Gruppen zu je 15 Tieren aufgeteilt (Tabelle 6) und mit Flügelmarken gekennzeichnet. Die Auswahl der Isolate für diesen Versuch erfolgt auf Grundlage der virologischen, serologischen und molekularbiologischen (PAGE) Ergebnisse sowie der Zuordnung der Isolate zum ERS-Typ. Alle Tiere wurden mittels Infusionskanülen mit Knopf oral mit 0,5 ml infiziert. Die Infektionsdosis für alle Reovirusisolate betrug $10^{7,5}$ TCID₅₀/ml. Die Gruppe 120/03-1 (AM) erhielt 0,5 ml filtriertes Darmhomogenat (1 g Darm in 10 ml PBS), die Negativkontrollgruppe Zellsuspension. Durch die Infektion der Gruppe 120/03-1 (AM) mit Darmhomogenat sollte untersucht werden, ob in dem Ausgangsmaterial zusätzliche, nicht angezüchtete Erreger, wie z.B. Rotaviren, enthalten waren und welchen Einfluss sie möglicherweise auf das Infektionsgeschehen ausüben würden.

Tabelle 6: Gruppenbildung für die Bestimmung der Pathogenität *in vivo*

Gruppe	Infektion mit
S1133	Reovirus-Prototyp-Stamm S1133
238/98	ERS-Vergleichsstamm aus Polen
120/03-1	Reovirusisolat aus Deutschland
259/03	Reovirusisolat aus Deutschland
120/03-1 (AM)	Ausgangsmaterial (Darmhomogenat) des Isolates 120/03-1
Negativkontrolle	CER-Zellsuspension

3.2.5.4 Klinische Erscheinungen

Die klinische Beurteilung der Tiere erfolgte täglich.

3.2.5.5 Bestimmung des Gewichtsverlaufes

Das Körpergewicht der Tiere wurde wöchentlich dokumentiert und mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse ausgewertet. Mit der Methode nach Dunnell-T wurden die Mittelwerte der Gewichte infizierter Gruppen mit dem Mittelwert der Gewichte der Negativkontrollgruppe verglichen. In den Tests wurde $P < 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt.

3.2.5.6 Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Bei verendeten bzw. am 33. Tag post infectionem (p.i.) getöteten Tieren wurden unter sterilen Kautelen pathologisch-anatomische Befunde erhoben und folgende Organproben für die Versuche der Virusreisolierung und die histologischen sowie immunhistologischen Untersuchungen entnommen: Leber, Milz, Bursa Fabricii, Herz, Niere, Drüsenmagen, Zwölffingerdarm, Leerdarm, Hüftdarm, Bauchspeicheldrüse, Blinddarm mit Blinddarmentonsillen und Gehirn.

3.2.5.7 Histologische Untersuchungen

3.2.5.7.1 *Probenaufbereitung*

Folgende Organe wurden nach ihrer Entnahme für 24 h in 4%igem Formalin immersionsfixiert: Leber, Milz, Bursa Fabricii, Herz, Niere, Drüsenmagen, Zwölffingerdarm, Bauchspeicheldrüse und Blinddarm mit Blinddarmtonsillen. Zunächst wurden die fixierten Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie in Xylol dehydriert und entfettet, um die Gewebe anschließend in Paraffin einbetten zu können (Tabelle 7).

Tabelle 7: Dehydratation und Entfettung

Lösemittel	Zeit	Wiederholungen
Formalin (4%)	24 h	0
Formalin (10%)	50 min	1
Leitungswasser	50 min	1
Ethanol (70%)	50 min	1
Ethanol (80%)	50 min	1
Ethanol (96%)	50 min	2
Ethanol (99,8%)	50 min	2
Xylol	50 min	2
Paraffin	50 min	4

Mit einem Schlittenmikrotom wurden 5-7 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Glas-Objektträger sowie für immunhistochemische Untersuchungen auf Adhäsiv-Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und über Nacht im Brutschrank bei 60°C nachgetrocknet. Die Entparaffinierung der getrockneten Präparate erfolgte in Xylol, die Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 8) mit anschließender Überführung in Aqua bidest.

Tabelle 8: Entparaffinierung und Rehydratation

Lösemittel	Zeit	Wiederholungen
Xylol	5 min	2
Ethanol (99,8%)	3 min	3
Ethanol (96%)	3 min	2
Ethanol (70%)	3 min	1
Leitungswasser	5 min	1

3.2.5.7.2 Histopathologische Untersuchungen

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die Organproben mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Mayer (Tabelle 9) (Romeis, 1989) gefärbt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 99,8%) sowie in Xylol jeweils für 4 min entwässert. Abschließend wurden die Schnitte mit Hyper-Mount-Eindeckmedium eingedeckt. Anschließend wurden die Präparate lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von x 20, x 40, x 200 und x 400 systematisch untersucht und beurteilt.

Tabelle 9: Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Substanz	Zeit
Mayers saures Hämalaun	3 min
Leitungswasser	10 min
Eosin	30 sec
Leitungswasser	5 sec

3.2.5.7.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Bei dieser Methode kann durch die Verwendung virusspezifischer (Primär-) und markierter (Sekundär-) Antikörper die Lokalisation der Reoviren innerhalb des untersuchten Organs im Schnittpräparat sichtbar gemacht werden.

Nach umfangreichen Vorversuchen zur Etablierung der optimalen Versuchsbedingungen erfolgten die Hauptversuche mittels der indirekten Immunhistochemie unter folgenden Bedingungen:

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden zur Unterdrückung endogener Peroxidasen zunächst bei Raumtemperatur für 30 min in 3% H₂O₂ in Methanol inkubiert und 3 x 5 min in tris buffered saline (TBS) gewaschen. Zur Wiederherstellung der Antigenität des Immunogens wurden die Schnitte in Citratpuffer (0,01M, pH 6,0) 3 x 5 min bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in TBS bei Raumtemperatur gespült, auf Cover-Plates® montiert und in die Färbestation Sequenza™ eingesetzt. Es folgten zwei weitere, fünfminütige Spülschritte mit TBS. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden je 100 µl 1:5 mit TBS verdünntes Ziegen-Normalserum auf die Schnitte aufgetragen und diese 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als unkonjugierter Primärantikörper fungierte das 1:160 mit TBS verdünnte, in SPF-Hühnern hergestellte Antiserum gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 (Von Bülow, 1979), von dem 100 µl auf jeden Schnitt gegeben wurden. Für die Negativkontrolle wurden statt des primären Antikörpers 100 µl TBS eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur erfolgte das dreimalige Waschen mit TBS für 5 min. Anschließend wurden

100 μ l des 1:200 mit TBS verdünnten Horseradish Peroxidase (HRP)-markierten anti-Huhn Antikörpers (Sekundärantikörper) auf jeden Schnitt gegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt mit TBS für 3 x 5 min wurden die Schnitte aus dem Sequenza™ entnommen, von den Cover-Plates® demontiert und für 5 min mit je 100 μ l DAB (3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)-Substrat-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer, fünfminütiger Spülschritt in TBS. Anschließend wurden die Schnitte in Mayers Hämalaun für 1 min gegengefärbt, in Leitungswasser gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 99,8%) sowie Xylol für jeweils 4 Minuten entwässert. Abschließend wurden die Schnitte mit Hyper-Mount-Eindeckmedium eingedeckt.

Die Farbreaktion in den immunhistologischen Präparaten ließ sich lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 20x, 40x, 200x und 400x darstellen und auswerten.

3.2.5.8 Virusreisolierung

3.2.5.8.1 *Virusreisolierung aus Kloakentupfern*

Von jedem Tier wurden wöchentlich mittels steriler Bakterietten Kloakentupfer für die Versuche der Virusreisolierung genommen.

Die Tupfer wurden daraufhin einzeln in 1 ml PBS suspendiert und nach dreimaligem Frieren und Tauen der Extrakt gewonnen. Aus diesem Extrakt wurde nach Sterilfiltration in 24-Loch Zellkultur-Testplatten eine Virusreisolierung auf HEL- und CER-Zellen im doppelten Ansatz versucht. Die Ausbildung eines cpE wurde täglich mikroskopisch bei 125-facher Vergrößerung über 7 Tage kontrolliert. Die Beurteilung erfolgte im Vergleich zu nicht infizierten Zellkulturen. Bei Nichtauftreten eines cpE erfolgte nach 3-maligem Frieren und Tauen eine Passagierung auf frischen Zellen.

3.2.5.8.2 *Virusreisolierung aus Organproben*

Gleiche Teile von je fünf Proben von Gehirn, Herz, Leber, Milz, Niere, Bursa Fabricii, Drüsenmagen, Zwölffingerdarm mit Bauchspeicheldrüse, Leerdarm, Hüftdarm und Blinddarm mit Blinddarmonsillen wurden gruppenweise zu drei Pools pro Organ zusammengefasst (Tabelle 10). Bei der Gruppe 238/98 wurde auf die Untersuchung von Drüsenmagen, Leerdarm und Hüftdarm verzichtet. Von der Negativkontrollgruppe wurden lediglich Leber, Zwölffingerdarm mit Bauchspeicheldrüse und Blinddarm mit Blinddarmonsillen untersucht.

Die Probenaufbereitung erfolgte wie unter Punkt 3.2.1.3 beschrieben. Daraufhin wurde nach Sterilfiltration jeder gepoolten Probe auf HEL- und CER-Zellen in 24-Loch Zellkultur-Testplatten eine Virusreisolierung im doppelten Ansatz versucht. Die Ausbildung eines cpE

wurde täglich mikroskopisch bei 125-facher Vergrößerung über 7 Tage kontrolliert. Die Beurteilung erfolgte im Vergleich zu nicht infizierten Zellkulturen. Bei Nichtauftreten eines cpE erfolgte nach dreimaligem Frieren und Tauen eine Passagierung auf frischen Zellen.

Tabelle 10: Organpools pro Versuchsgruppe

Gruppe infiziert mit	Organ	Tieranzahl pro gepooltem Organ pro Gruppe	Anzahl Pools pro Organ pro Gruppe
Reovirusisolat/ Darmhomogenat/ CER- Zellsuspension	Gehirn	5	3
	Herz	5	3
	Leber	5	3
	Milz	5	3
	Niere	5	3
	Bursa Fabricii	5	3
	Drüsenmagen	5	3
	Zwölffingerdarm mit Bauchspeicheldrüse	5	3
	Leerdarm	5	3
	Hüftdarm	5	3
	Blinddarm mit Blinddarmtonsillen	5	3
	Gesamtprobenzahl pro Gruppe		33

3.2.5.9 Entnahme von Blutproben zur Bestimmung der Antikörper-Titer

Den Tieren wurde wöchentlich eine Blutprobe mittels Feindosierungsspritze aus der Drosselvene entnommen.

Zur Serumgewinnung wurde das Blut nach Lösen des Blutkuchens von der Gefäßwand 24 Stunden bei 4-8°C im Kühlschrank schräg gelagert, dann 10 min bei 3000 U/min und 4 °C zentrifugiert und das Serum vorsichtig abpipettiert.

Alle Seren wurden im ELISA auf Reo-, IBD- und Adenovirus-Antikörper getestet (siehe 3.2.3.2).

4 Ergebnisse

4.1 Virusnachweis mittels Elektronenmikroskopie (EM)

Für die Untersuchungen der Ausgangsmaterialien vor der Virusanzüchtung wurden neun eingesendete Proben ausgewählt, in denen folgende Viren nachgewiesen wurden:

Rotaviren	in 4 Proben
Reoviren	in 1 Probe
Rota- und Reoviren	in 1 Probe
Calici- sowie einzelne Rota- und Reoviren	in 1 Probe
Paramyxovirus-ähnliche Partikel	in 1 Probe
Kein Virus	in 1 Probe

Diese Ergebnisse zeigen, dass in den Ausgangsmaterialien überwiegend Rotaviren in insgesamt sechs Proben, gefolgt von Reoviren in drei Proben nachgewiesen werden konnten. Lediglich in je einer untersuchten Probe konnten andere Viren, wie Caliciviren bzw. Paramyxovirus-ähnliche Partikel gefunden werden. In einer Probe konnte kein Virus festgestellt werden.

Die detaillierten Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Proben-Ausgangsmaterialien und der aus ihnen angezüchteten Isolate sind in Tabelle 14 gegenübergestellt.

4.2 Virusisolierung und -identifizierung

4.2.1 Virusisolierung in Zellkulturen

Die Versuche zur Virusisolierung erfolgten aus 68 verschiedenen Organproben von Broilern aus insgesamt 17 Beständen. Aus 56 Proben wurde in Zellkulturen Virus angezüchtet, was eine Nachweisrate der Virusanzüchtung von 82% bedeutet. Die größte Anzahl der Ausgangsmaterialien, aus denen Virus angezüchtet werden konnte, bestand aus Darmmaterial, gefolgt von Organpools. Die Virusanzüchtung von jeweils einer Probe bestehend aus Gelenkflüssigkeit, Bursa Fabricii, Niere oder Milz, verlief positiv, die aus Thymus und zwei Leberproben negativ (Tabelle 11).

Tabelle 11: Virusisolierung auf Zellkulturen

Proben	Virusisolierung	Nachweisrate in %
Darm	39 / 42 ²⁾	93
Organpool ¹⁾	13 / 19	68
Leber	0 / 2	
Gelenkflüssigkeit	1 / 1	
Bursa Fabricii	1 / 1	
Niere	1 / 1	
Milz	1 / 1	
Thymus	0 / 1	
Gesamtzahl	56 / 68	82

¹⁾ Unterschiedliche Organe, eingesandt als Pool

²⁾ Anzahl positiver / Anzahl untersuchter Proben

Die anamnestischen und epidemiologischen Angaben der 56 Reovirusisolate sind in Tabelle 12 dargestellt.

Eine ausführliche Auflistung der Virusisolierungsversuche in HEL- und HEF-Zellen befindet sich in Tabelle 29 im Anhang.

Ergebnisse

Tabelle 12: Anamnestische und epidemiologische Angaben der 56 Reovirusisolate aus Masthähnchen

Reovirus-isolat	Herkunft	Alter der Küken in Tagen	Klinische und pathologisch-anatomische Erscheinungen
1306/02-1	Niedersachsen	11	Auseinanderwachsen der Herde, erhöhtes Wärmebedürfnis, kein Ansprechen auf antimikrobielle Therapie
1333/02-2, 3	Niedersachsen	15	k.A.
1345/02	Niedersachsen	13	Auseinanderwachsen der Herde, massive Darmentzündung
1348/02-1	Niedersachsen	16	k.A.
1384/02-2	Sachsen-Anhalt	11	Auseinanderwachsen der Herde, Kümmerwachstum
120/03-1, 2	Sachsen	25	Auseinanderwachsen der Herde, Kümmerwachstum, Exsikkose, Rachitis, Nierenveränderungen, Harnleiterstau
259/03	Niedersachsen	10	Auseinanderwachsen der Herde, Kümmerwachstum, erhöhtes Wärmebedürfnis Knochenweiche, virusbedingte Darmentzündung mit wässrigem Durchfall
578/03-3	Baden-Württemberg	18	Abmagerung, Dottersackentzündung, Atmungsprobleme, Unterhautvereiterung, Bakteriämie, Virämie
708/03-2 bis 11, 13	Niedersachsen	k.A.	k.A.
741/03-1, 2	Niedersachsen	16	Auseinanderwachsen der Herde, Durchfall mit wässrigem Dünn- und Blinddarminhalt, Knochenweiche
807/03-1 bis 3	Niedersachsen	18	Auseinanderwachsen der Herde, Durchfall, Knochenweiche
821/03-1 bis 4	Niedersachsen	16-17	k.A.

Ergebnisse

Reovirus- isolat	Herkunft	Alter der Küken in Tagen	Klinische und pathologisch-anatomische Erscheinungen
981/03- 1, 2, 4, 5	Niedersachsen	k.A.	k.A.
981/03- 11 bis 15			
990/03	Niedersachsen	11	Auseinanderwachsen der Herde, Durchfall
994/03- 1 bis 11	Niedersachsen	k.A.	k.A.
1051/03- Darm, Gelenk	Thüringen	26	Auseinanderwachsen der Herde, Atmungsprobleme, Kümmerwachstum, Pathologie: Herzbeutelentzündung, Perikarditis, Serositis, Pneumonie, Luftsackentzündung, Ödeme, tiefe Dermatitis, Tibialdyschondroplasie, Gelenkentzündung
1172/03	Niedersachsen	14	Dottersackverhaltung, Auseinanderwachsen der Herde, Durchfall
24/04- 1, 2	Niedersachsen	10	k.A.

k.A. Keine Angaben

4.2.2 Vergleich der Eignung zweier verschiedener primärer Zellkulturen sowie unterschiedlichen Probenmaterials für die Virusisolierung

Die Ergebnisse zeigen, dass aus allen Proben, aus denen auf HEF-Zellen Virus angezüchtet werden konnte, auch auf HEL-Zellen die Virusisolierung gelang, wohingegen es keine Probe gab, aus der nur auf HEF- und nicht auf HEL-Zellen Virus isoliert werden konnte. Aus 25 parallel auf HEL- und HEF-Zellen untersuchten Darmproben konnte auf HEL- in 92% (23/25 Proben), auf HEF-Zellen nur in 60% (15/25) der Isolierungsversuche Virus angezüchtet werden. Ein ähnliches Ergebnis brachten die Isolierungsversuche aus 16 parallel untersuchten Organpools. Auf HEL-Zellen waren 75% (12/16) der Proben positiv, auf HEF-Zellen nur 50% (8/16) (Tabelle 13).

Der cpE (cytopathischer Effekt) trat auf HEL- früher und deutlicher auf als auf HEF-Zellen. Zur Virusisolierung mussten auf HEF-Zellen von jedem Ausgangsmaterial 2 bis 3 Blindpassagen durchgeführt werden, um einen cpE zu erkennen, wohingegen auf HEL-Zellen spätestens nach der ersten Passage Virus isoliert worden war. Der Zellrasen blieb auf HEF-Zellen trotz des Auftretens eines cpE im Gegensatz zu dem auf HEL-Zellen überwiegend intakt, und die Synzytien waren deutlich kleiner als auf HEL-Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich HEL- besser als HEF-Zellen für die Reovirusanzüchtung eignen.

Der Vergleich der Eignung von Darmproben gegenüber Organproben für die Virusisolierung macht deutlich, dass die Isolierungsrate von Reoviren aus Darmproben viel höher ist als die aus Organproben.

Ergebnisse

Tabelle 13: Reovirusisolierung auf HEL- und HEF-Zellkulturen

Probennummer	Probenart	Reovirusisolierung	
		auf HEL-Zellen	auf HEF-Zellen
1306/02-1,2	Dünndarm	1 / 2 ¹⁾	0 / 2
1333/ 02-1 bis 3	Dünndarm	2 / 3	0 / 3
1345/02	Darm	1 / 1	0 / 1
1384/02-2	Darm	1 / 1	1 / 1
120/03-1	Darm	1 / 1	0 / 1
259/03	Darm	1 / 1	1 / 1
990/03	Darm	1 / 1	1 / 1
994/03 -1 bis 11	Darminhalt	11 / 11	8 / 11
1051/03-Darm	Darm	1 / 1	1 / 1
1172/03	Darm	1 / 1	1 / 1
24/04-1	Darm	1 / 1	1 / 1
24/04-2	Darminhalt	1 / 1	1 / 1
Gesamtzahl	Darm (-inhalt)	23 / 25 (92%)	15 / 25 (60%)
1348/02-1 bis 3	Leber, Darm	1 / 3	0 / 3
120/03-2	Herz, Leber, Milz, Bursa Fabricii	1 / 1	0 / 1
821/03-1 bis 6	Zwölffingerdarm, Bauchspeicheldrüse	4 / 6	4 / 6
981/03-5	Zwölffingerdarm, Bauchspeicheldrüse	1 / 1	1 / 1
981/03-11 bis 15	Zwölffingerdarm, Bauchspeicheldrüse, Leber, Niere, Drüsenmagen	5 / 5	3 / 5
Gesamtzahl	Organpool	12 / 16 (75%)	8 / 16 (50%)

¹⁾ Anzahl positiver / Anzahl untersuchter Proben

4.2.3 Virusidentifizierung mittels EM und im Indirekten Immunfluoreszenztest

Entgegen der vorherigen Erwartungen wurden aus fast allen Proben Virus angezüchtet, und zwar ausschließlich Reoviren (Abbildung 3). Aus diesem Grund wurden die Virusisolate nach der Anzüchtung nochmals elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei wurden in den neun Isolaten, deren Ausgangsmaterial elektronenmikroskopisch untersucht worden war (siehe 4.1), ausschließlich Reoviren nachgewiesen. Dazu zählen auch die fünf Proben, in denen keine Reo-, sondern andere Viren vorhanden waren, und die Probe, in der kein Virus gefunden worden war. Das deutet darauf hin, dass im Ausgangsmaterial zwar Reoviren vorhanden waren, der Virusgehalt aber für einen elektronenmikroskopischen Nachweis zu gering war. Zusätzlich wurden vier weitere deutsche Feldisolate sowie der Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 und der Vergleichsstamm 238/98 elektronenmikroskopisch überprüft (Tabelle 14). Es konnten in sämtlichen Isolaten nach der Virusanzüchtung elektronenmikroskopisch keine anderen Viren außer Reoviren nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Ergebnisse der elektronenmikroskopisch untersuchten Ausgangsmaterialien und der daraus angezüchteten Isolate

Reovirusisolat	EM vom Ausgangsmaterial	EM von Zellpassagen
S1133	n.d.	Reoviren
238/98	n.d.	Reoviren
1306/02-1	Rotaviren	Reoviren
1333/02-2	Rotaviren	Reoviren
1345/02	Rotaviren	Reoviren
1348/02-1	n.d.	Reoviren
1384/02-2	Paramyxovirusverdächtige Partikel	Reoviren
120/03-1	Caliciviren, einzelne Reo- und Rotaviren	Reoviren
120/03-2	Reoviren	Reoviren
259/03	Rotaviren, Reoviren	Reoviren
578/03-3	n.d.	Reoviren
708/03-8	n.d.	Reoviren
708/03-11	n.d.	Reoviren
1051/03-Darm	Negativ	Reoviren
1172/03	Rotaviren	Reoviren

EM: Elektronenmikroskopie

n.d.: nicht durchgeführt

Ergebnisse

Alle Isolate, auch die elektronenmikroskopisch untersuchten, wurden im IIFT als Reoviren identifiziert. Aufgrund des Vorhandenseins von Rotaviren in sechs der untersuchten Ausgangsmaterialien wurden Versuche zur Isolierung von Rotaviren durchgeführt. Nach Virusanzüchtung unter Trypsinzusatz konnten mittels IIFT keine Rotaviren, sondern nur Reoviren nachgewiesen werden. Auch Adenoviren konnten nicht nachgewiesen werden.

Interessanterweise stammte sowohl das Ausgangsmaterial, in dem Calici- sowie einzelne Rota- und Reoviren (120/03-1) als auch die Probe, in der nur Reoviren (120/03-2) nachgewiesen worden waren, aus denselben Tieren, allerdings ein Mal aus einer Darmprobe und das andere Mal aus einem Organpool, bestehend aus Herz, Leber, Milz und Bursa Fabricii.

Alle 56 auf HEL- bzw. 25 auf HEF-Zellen angezüchteten Isolate wurden im IIFT als Reoviren identifiziert. Im Zytoplasma waren die Viroplasma deutlich in unterschiedlicher Anzahl und Größe erkennbar.

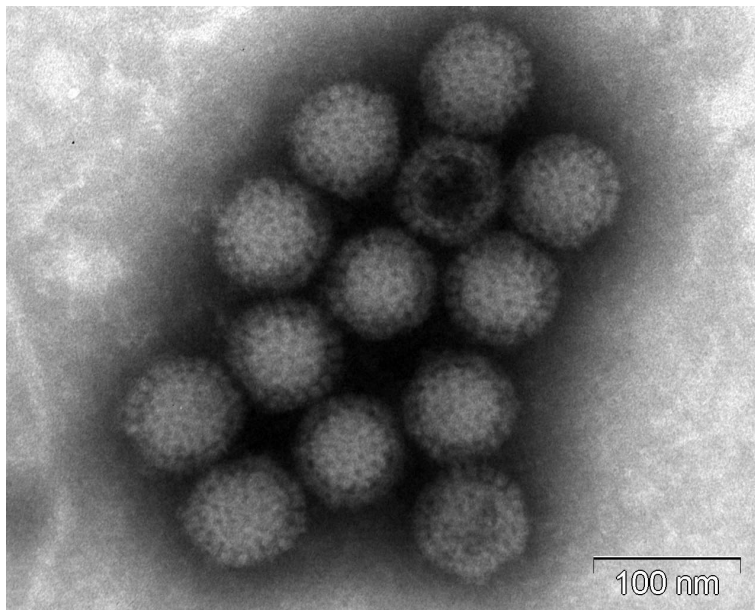


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Isolates 259/03 nach der Virusanzüchtung: Reoviren (Foto: Dr. Dirk Soike, Landeslabor Brandenburg, Laborbereich Potsdam)

4.3 Viruscharakterisierung

4.3.1 Ausprägung der cpE in unterschiedlichen Zellkulturen

Von verschiedenen Autoren wird die Synzytienbildung mit der verstärkten Ausbreitung in den Geweben und daher mit der Pathogenität von Reoviren in Zusammenhang gebracht. Deshalb sollte die Ausprägung der cpE untersucht werden. Die Beurteilung der Synzytien wurde im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Abbildung 4) durchgeführt.

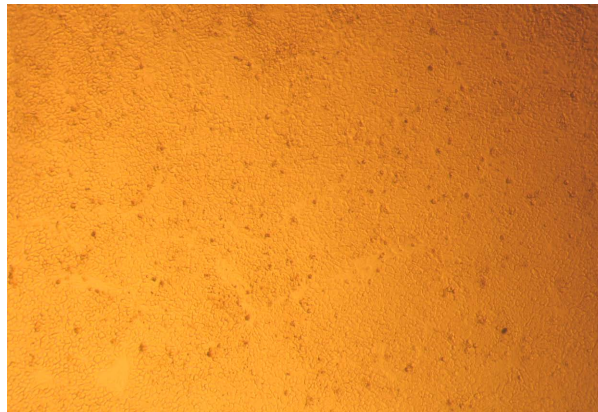


Abbildung 4: Unbeimpfte HEL-Zellkultur als Negativkontrolle zu infizierten Zellkulturen 48 h nach Herstellung; Zellrasen geschlossen; Vergrößerung x 200

Die infizierten Leberzellen bildeten im Zellrasen Synzytien aus, die sich nach unterschiedlichen Zeitspannen aus dem Zellverband lösten und im Medium schwammen. Dieser cpE wird als für Reoviren typisch beschrieben. Die untersuchten Isolate wiesen jedoch in den HEL-Zellkulturen erhebliche Unterschiede in der Ausbildung und dem zeitlichen Auftreten ihrer cpE auf (Tabelle 15, Abbildung 5).

Tabelle 15: Zeitliche Unterschiede in der Ausbildung der cpE im Vergleich zum Reovirus-Prototyp-Stamm S1133

Reovirusisolat	Zeit p.i. (h) bis	
	zum Auftreten des cpE	zur (weitgehend) vollständigen Zerstörung des Zellrasens
S1133	36	60
238/98	24	36
120/03-1	48	72
259/03	48	72

Ergebnisse

Die Inokulation der HEL-Zellkulturen mit dem Isolat 238/98 führte am Schnellsten von allen Isolaten innerhalb von nur 24 Stunden p.i. zur Ausbildung eines ausgeprägten cpE in Form von großflächigen Synzytien im Zellrasen und einzelnen aus dem Zellverband gelösten Synzytien. Nach dem Herauslösen großer synzytialer Zellverbände aus dem Zellrasen war dieser 36 h p.i. fast vollständig zerstört. Erst zu diesem Zeitpunkt, 36 h p.i., bildete der Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 in HEL-Zellen einen cpE in Form von großen, aus dem Zellverband gelösten Synzytien aus. Eine weitgehende Zerstörung des Zellrasens war 60 h p.i. erkennbar. Erst 12 h nach dem ersten Auftreten eines cpE durch den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 und 12 h nach der vollständigen Zerstörung des Zellrasens durch den Vergleichsstamm 238/98 verursachten die Isolate 120/03-1 und 259/03, 48 h p.i., einen sich ähnelnden cpE in Form von kleinen bzw. mittelgroßen, aus dem Zellverband gelösten Synzytien sowie aus dem Zellverband gelösten Zelltrümmern. Das Isolat 120/03-1 führte zusätzlich zu kleinen abgerundeten Leberzellen. Eine vollständige Zerstörung des Zellrasens wurde durch die beiden Isolate 72 h p.i. erreicht, also nach einer doppelt so langen Zeitspanne wie durch den Vergleichsstamm 238/98 und 12 h nach der Zerstörung des Zellrasens durch den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 (Abbildung 5).

Ausgewählte Isolate wurden nach der Virusanzüchtung und zwei weiteren Passagen auf HEL-Zellen auf die permanente Zelllinie chicken embryo rough (CER) übertragen, um die Möglichkeit des Ersatzes der HEL-Zellen durch CER-Zellen zu untersuchen.

Nach Verimpfung in CER-Zellkulturen bildeten alle Reovirusisolate einen cpE aus. Eine Adaptierung an die permanenten Zellen war nicht notwendig, da die angezüchteten Reoviren sich ohne weitere Passagen unter Ausbildung eines deutlichen cpE vermehrten. Die Unterschiede der Ausprägung der cpE auf der CER-Zelllinie stimmten mit denen auf HEL-Zellen überein, wobei sich die Zeit bis zum Sichtbarwerden der cpE um wenige Stunden verzögerte. In Titrationskontrollen (Ergebnisse nicht gezeigt) zeigten die Isolate schon in der ersten CER-Passage Titer, die mit denen auf HEL-Zellen vergleichbar waren. Diese Ergebnisse sprechen für eine gute Eignung der CER-Zelllinie hinsichtlich der Vermehrung von Reoviren.

Da permanente Zellkulturen als gleichmäßiges Vermehrungssubstrat eine bessere Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermöglichen und durch das unbegrenzte Wachstum sowie die einfachere Vermehrung die Arbeit erleichtern, wurden die CER-Zellen für alle nachfolgenden Untersuchungen verwendet, wodurch auch auf die Verwendung von Hühner-Embryonen verzichtet werden konnte.

Ergebnisse

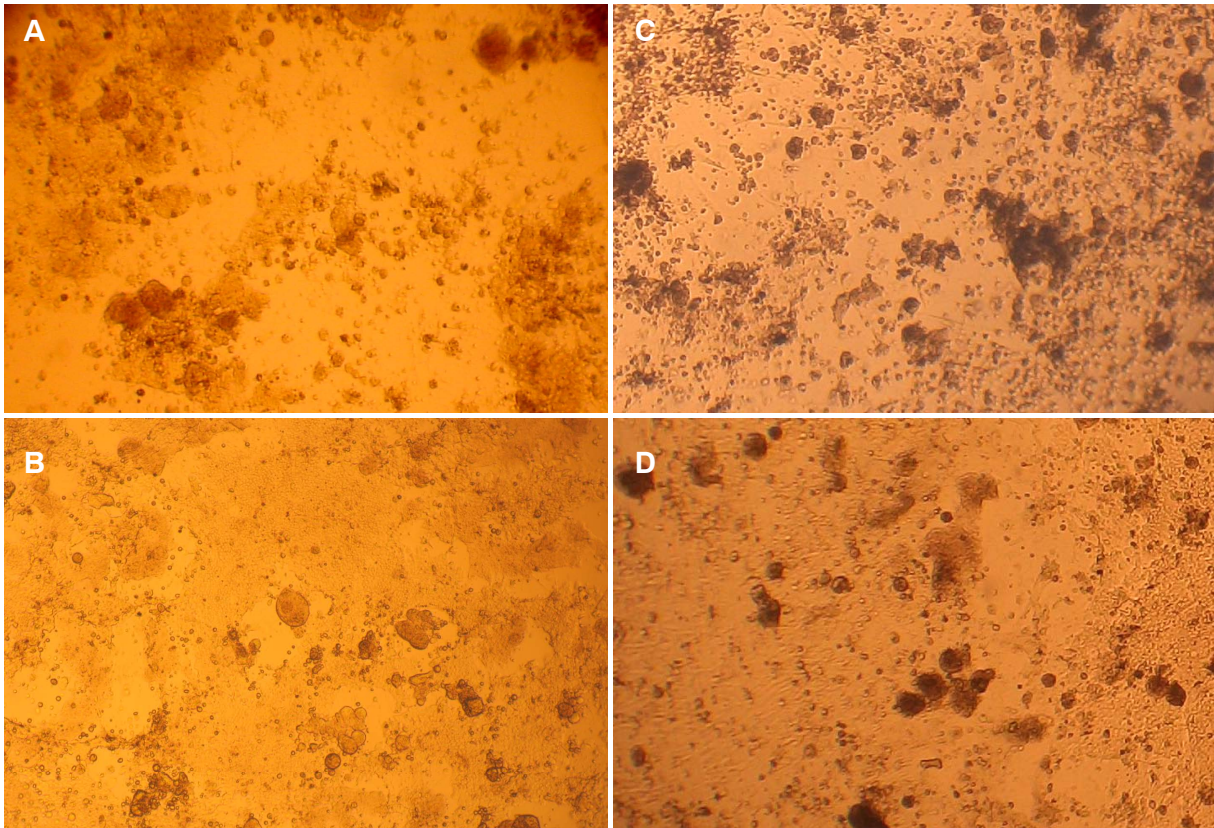


Abbildung 5: Infizierte HEL-Zellen mit A: Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 36 h p.i.; Große aus dem Zellverband gelöste Synzytien; B: Reovirusisolat 238/98 24 h p.i.; Großflächige Synzytienbildung im Zellrasen, einzelne aus dem Zellverband gelöste Synzytien; C: Reovirusisolat 120/03-1 48 h p.i.; Kleine abgerundete Zellen, kleine aus dem Zellverband gelöste Synzytien, aus dem Zellverband gelöste Zelltrümmer; D: Reovirusisolat 259/03 48 h p.i.; Mittelgroße, aus dem Zellverband gelöste Synzytien, mittelgroße aus dem Zellverband gelöste Zelltrümmer; Vergrößerung 200x

4.3.2 Plaquemorphologie

Andere Autoren beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Pathogenität von Reoviren und der Größe der von ihnen gebildeten Plaque in Zellkulturen. Daher sollten die Morphologie und die Größe der unter Agar-Overlay entstandenen Plaque beurteilt und zur weiteren Einschätzung der Pathogenität der Reovirusisolate herangezogen werden.

Alle untersuchten Isolate zeigten in CER-Zellkulturen runde Plaque mit scharfem Rand, allerdings wiesen sie variierende Größen auf. Eine Ausnahme bildete das Reovirusisolat 238/98, dessen runde Plaque auf CER-Zellen einen diffusen Rand mit Ausläufern aufwies (Abbildung 6).

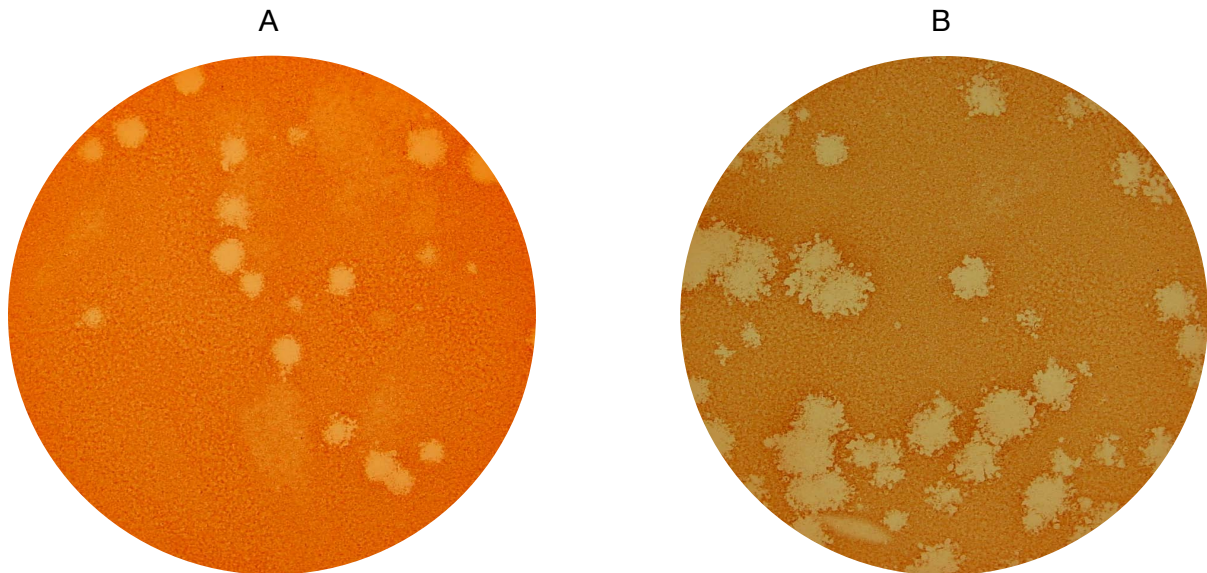


Abbildung 6: Bildung von Plaque auf CER-Zellen. A: Reovirus-Prototyp Stamm S1133; Große Plaque mit glattem Rand; B: Reovirusisolat 238/98; Große Plaque mit diffusem Rand

Die Größen und Mittelwerte der auf CER-Zellen in zwei Paralleluntersuchungen gebildeten Plaque 5 d p.i. sind in Tabelle 30 (Anhang) aufgeführt, die daraus errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 16 verzeichnet.

Mit einer mittleren Größe von 5,15 mm zeigte der Vergleichsstamm 238/98 die größten Plaque. Der Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 wies große Plaque von 3,95 mm im Mittel auf, während die Isolate 120/03-1 und 259/03 im Vergleich dazu mit einem Mittelwert von 1,17 mm mittelgroße bzw. von 0,54 mm kleine Plaque bildeten.

Die geringen Standardabweichungen bei den Werten der Feldisolate weisen auf das Auftreten der Plaque in überwiegend einheitlicher Größe hin. Anders verhält es sich mit dem

Ergebnisse

Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 und dem Vergleichsstamm 238/98, deren Werte sehr hohe Standardabweichungen und somit das Vorkommen von in der Größe stark variierender Plaque zeigen.

Die Einschätzung der Pathogenität anhand der Plaquegrößen ist mit der Beurteilung der durch die Isolate gebildeten Synzytien (siehe 4.3.1) vergleichbar. Die durch das Isolat 120/03-1 gebildeten Plaque waren im Mittel etwa doppelt so groß wie die durch das Isolat 259/03 gebildeten.

Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichungen auf CER-Zellen gebildeter Plaque fünf d p.i. aus zwei Paralleluntersuchungen

	Reovirus-Vergleichsstamm		Feldisolat	
	S1133	238/98	120/03-1	259/03
Mittelwert der Plaquegrößen beider Paralleluntersuchungen in mm	3,95	5,15	1,17	0,54
Standardabweichung	2,04	2,6	0,32	0,14

4.4 Virustypisierung

4.4.1 Serotypisierung

4.4.1.1 Neutralisationstest im Mikrotiterverfahren (NT)

Als erstes Verfahren zur Virustypisierung wurde für die ausgewählten Isolate der Neutralisationstest im Mikrotiterverfahren mit Antikörpern gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 durchgeführt. Von diesen Untersuchungen wurden Hinweise dahingehend erwartet, in welchem Maße die Isolate eine Verwandtschaft zu dem Prototyp-Stamm aufweisen. Das exakte Ablesen der Neutralisation bereitete dabei Schwierigkeiten. In allen Zellkulturen entwickelte sich 24 bis 48 h nach Inokulation mit dem Neutralisationsgemisch ein schnell fortschreitender cpE, auch z.T. in den wells mit einer hohen Serumkonzentration. Innerhalb kurzer Zeit war eine Neutralisation nicht mehr nachweisbar. Da diese Ergebnisse mit dem im Institut hergestellten Serum auch bei der Neutralisation des homologen Prototyp-Stammes auftraten, wurden die Untersuchungen mit dem kommerziell erhältlichen Referenzserum „Avian Reovirus S1133“ durchgeführt. Die genannten Probleme konnten auch mit diesem Serum nicht behoben werden. Da die Ergebnisse stark schwankten, wurden 20 Paralleluntersuchungen mit dem Referenzserum „Avian Reovirus S1133“ durchgeführt (Tabelle 31, Anhang) und der reziproke Neutralisationstiter als Mittelwert daraus berechnet (Tabelle 17). Die Untersuchungen mit dem im Institut hergestellten Serum sind in den Ergebnissen nicht aufgeführt, da nur wenige Paralleluntersuchungen durchgeführt wurden.

Die Neutralisationstiter des Serums waren für alle Stämme sehr niedrig, es konnten aber Unterschiede festgestellt werden. Die Gegenüberstellung der Mittelwerte ergab paradoxerweise für den homologen Stamm S1133 den geringsten Neutralisationstiter von 1:128. Mit einem Neutralisationstiter von 1:288 wurde Isolat 120/03-1 am Stärksten und das Isolat 238/98 mit einem Titer von 1:160 am Schwächsten neutralisiert. Der Neutralisationstiter des Isolates 259/03 von 1:208 lag zwischen diesen beiden Titern.

Diese Ergebnisse sind schwer zu erklären, und die niedrigen Titer bzw. geringen Titerunterschiede von nur einer Verdünnungsstufe erschweren eine Aussage zu serologischen Unterschieden der Isolate gegenüber dem Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 bzw. ihre Verwandtschaft zu ihm. Die Werte weisen darauf hin, dass es keine serologischen Unterschiede zwischen den Isolaten und den Vergleichsstämmen gibt.

Tabelle 17: Neutralisationstiter der Isolate mit dem Serum „Avian Reovirus S1133“

Reovirusisolat	Neutralisationstiter ¹⁾ mit dem Referenzserum „Avian Reovirus S1133“	Titer in %, bezogen auf den homologen Stamm S1133
S1133	1 : 128	100
238/98	1 : 160	125
120/03-1	1 : 288	225
259/03	1 : 208	163

¹⁾ Als Neutralisationstiter wurde der Mittelwert der höchsten Serumverdünnung bezeichnet, mit der unter den oben beschriebenen Bedingungen eine Neutralisation des entsprechenden Virusisolates ablesbar war

Um diese Probleme bei der Auswertung der Neutralisationsteste zu verdeutlichen, wurden die Ergebnisse für jedes Isolat als Prozentzahl der Neutralisation aus 20 Paralleluntersuchungen pro Verdünnungsstufe dargestellt (Tabelle 18). Es wäre zu erwarten gewesen, dass bei geringeren Serumverdünnungen eine stärkere Neutralisation zu beobachten ist. Anhand der Tabelle wird hingegen die große Streuung der Neutralisationsergebnisse in den verschiedenen Serumverdünnungen ersichtlich. So kann in nur 25-75% aller 20 Untersuchungen bei den Verdünnungsstufen $4 \log_2$ bis $8 \log_2$ eine Neutralisation des Prototyp-Stammes S1133 mit seinem homologen Serum beobachtet werden. Nicht einmal in der Verdünnung $4 \log_2$ wurde der Stamm in 100 % der Versuche neutralisiert. Ähnliche Ergebnisse wurden für die heterologen Isolate 120/03-1 und 259/03 bis zur Serumverdünnung $9 \log_2$ gefunden. Der ERS-Vergleichsstamm 238/98 wurde in 100% der Untersuchungen von der Serumverdünnung $6 \log_2$ neutralisiert. Dieses einzig eindeutige Ergebnis wird jedoch dadurch in Frage gestellt, dass das Auftreten einer Neutralisation in den niedrigeren Verdünnungsstufen $5 \log_2$ und $4 \log_2$ in nur jeweils 50% der Untersuchungen beobachtet werden konnte. In diesen Verdünnungsstufen wäre ebenfalls eine 100%ige Neutralisation erwartet worden.

Ergebnisse

Tabelle 18: Darstellung der Streuung der Neutralisationsergebnisse mit dem Referenzserum „Avian Reovirus S1133“

Reovirus- isolat	Bewertung der Neutralisation											VK
	4 ¹⁾	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
S1133	75 ²⁾	75	75	25	25	0 ³⁾	0	0	0	0	0	cpE
238/98	50	50	100	75	25	0	0	0	0	0	0	cpE
120/03-1	75	75	75	50	50	25	0	0	0	0	0	cpE
259/03	75	75	50	50	0	25	0	0	0	0	0	cpE

¹⁾ log₂ der Serumverdünnung im Neutralisationsgemisch

²⁾ Die Zahl drückt aus, bei wie viel % der 20 Paralleluntersuchungen in dieser Serumverdünnung eine Neutralisation nachweisbar war

³⁾ Die Zahl drückt aus, dass in keiner der 20 Paralleluntersuchungen eine Neutralisation stattgefunden hat

VK: Viruskontrolle

Ergebnisse

4.4.1.2 Neutralisationstest im Plaquereduktionstest (PRT)

Da nicht nur eine unvollständige Neutralisation, sondern auch die schnelle Ausbreitung der Viruspartikel über das Medium als Ursache für die Probleme bei der Auswertung der Neutralisationsteste im Mikrotiterverfahren vermutet wurde, wurden die weiteren Neutralisationsteste im Plaquereduktionstest unter Agar-Overlay durchgeführt. So konnte die Ausbreitung des Virus über das Kulturmedium verhindert werden. Nach 5 d Inkubationszeit konnten die gebildeten Plaques in den Zellen mit Virus-Serumgemischen sowie mit der Viruskontrolle quantitativ exakt ausgezählt werden. Auf diese Weise konnten auch geringere Neutralisationstiter nachgewiesen werden. Die Serumverdünnung, bei der die Anzahl der Plaques im Vergleich zur Viruskontrolle um $\geq 80\%$ reduziert war, wurde als Neutralisationstiter festgelegt. Die Anzahl der ausgezählten Plaques/Serumverdünnung sind in Tabelle 19 aufgelistet, die Neutralisationstiter, basierend auf einer 80%igen Plaquereduktion von Reoviren mit dem Referenzserum „Avian Reovirus S1133“, sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 19: Ergebnisse der Plaquereduktionsteste (Anzahl der Plaques/Serumverdünnung und well) mit dem Referenzserum „Avian Reovirus S1133“

Reovirus-isolat	Anzahl der Plaques/well											
	4 ¹⁾	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	VK
S1133	0	0	0	0	0	2	1	6	8	16	58	81
	0	0	0	0	1	1	5	8	12	18	46	88
	0	0	0	0	1	1	3	5	9	15	41	75
	0	0	0	0	0	1	1	3	7	14	39	69
238/98	0	0	0	0	2	3	5	9	15	35	59	60
	0	0	0	0	1	3	3	7	13	46	68	64
	0	0	0	0	1	2	6	7	14	48	60	75
	0	0	0	0	0	1	3	5	11	29	59	66
120/03-1	0	0	0	3	1	7	10	19	25	77	>100	99
	0	0	0	1	4	6	3	9	17	72	>100	96
	0	0	0	1	3	2	4	12	20	62	>100	105
	0	0	0	2	2	5	3	7	15	79	>100	91
259/03	20	44	99	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	110
	26	64	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	119
	18	52	86	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	125
	25	46	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	138

¹⁾ \log_2 der Serumverdünnung im Neutralisationsgemisch

VK: Viruskontrolle

Fett gedruckt und schattiert: Serumverdünnung, in der die Anzahl der Plaques einer $\geq 80\%$ igen Reduktion im Vergleich zur VK entspricht

Ergebnisse

Tabelle 20: Neutralisationstiter bei 80%iger Plaquereduktion mit dem Referenzserum Avian Reovirus S1133

Reovirusisolat	Neutralisationstiter bei 80%iger Reduktion mit dem Referenzserum Avian Reovirus S1133
S1133	1 : 8192
238/98	1 : 4096
120/03-1	1 : 4096
259/03	1 : 16

Mittels der Plaquereduktionsteste konnten eindeutige Neutralisationstiter bestimmt werden. Anders als im Neutralisationstest wird im PRT deutlich, dass der homologe Stamm am Stärksten neutralisiert wird. Der untersuchte ERS-Vergleichsstamm 238/98 und das Feldisolat 120/03-1 wiesen Neutralisationstiter von 1:4096 mit dem Serum gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 auf. Die Neutralisationstiter unterschieden sich nur gering (1 Titerstufe) von dem des Prototyp-Stammes S1133, der mit seinem homologen Serum einen Neutralisationstiter von 1:8192 aufwies. Die Ergebnisse des PRT sprechen dafür, dass die beiden Isolate 120/03-1 und 238/98 sich von dem Reovirus-Prototyp-Stamm serologisch nicht unterscheiden, wohingegen aber ein deutlicher Unterschied des Isolates 259/03 mit einem Neutralisationstiter von 1:16 zum Prototyp-Stamm S1133 und den beiden anderen untersuchten Isolaten besteht.

In den Zell- und Serumkontrollen waren keine Plaques erkennbar.

4.4.2 Typisierung mit monoklonalen Antikörpern (mAk) im IIFT

Es wurden 26 Reovirusisolate aus 16 Herden zur Untersuchung eingesandt. Der größere Teil der Isolate (16 aus 11 Herden) wurde den Reoviren vom ERS-Typ und nur 10 Isolate aus 6 Herden den „nicht-ERS“-Reoviren zugeordnet (Tabelle 21).

Da alle Isolate aus Herden mit ähnlichen klinischen Symptomen (siehe Tabelle 12) isoliert worden waren, lassen diese Ergebnisse auf eine große Heterogenität der kursierenden Reoviren schliessen.

Isolate, deren Ausgangsmaterialien innerhalb eines kurzen Zeitraumes und aus dem gleichen Bundesland eingesandt worden waren, zeigten keine übereinstimmende Zuordnung zu einem bestimmten Typ, wie anhand der Ergebnisse der Isolate 1306/02-1, 1333/02-2 und 1345/02, zu erkennen ist. Die Organmaterialien dieser Isolate stammen vom selben Einsender aus Niedersachsen. Es ist jedoch nicht bekannt, ob es sich um den selben Betrieb handelt. Die Proben erreichten das Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin innerhalb eines Monats.

Ähnlich verhält es sich mit den Isolaten 708/03-2, -5, -8, -11, 741/03-1, 807/03-1, 821/03-1, -2, 981//03-1, -2, -11, -12, 990/03 und 994/03-1, deren Ausgangsmaterialien innerhalb von drei Monaten aus Niedersachsen von drei verschiedenen Tierärzten eingesandt worden waren.

Selbst Isolate aus den selben Tieren einer Herde zeigten abweichende Ergebnisse der Untersuchungen mit mAk. So wurden die Isolate 120/03-1 bzw. 120/03-2 aus dem Darm bzw. einem Organpool aus Herz, Leber, Milz und Bursa Fabricii derselben Tiere isoliert, konnten aber nicht einem Reovirus-Typ zugeordnet werden, sondern das Isolat 120/03-1 dem ERS- und 120/03-2 dem „nicht-ERS“-Typ.

Ergebnisse

Tabelle 21: Untersuchungsergebnisse ausgewählter Reovirusisolate mit mAk

Herde	Reovirusisolat	Ergebnis mit Monoklonalen Antikörpern	
		Reo	ERS
1	1306/02-1		1 X
2	1333/02-2	1 X	
3	1345/02		1 X
4	1384/02-2	1 X	
5	120/03-1		1 X
	120/03-2	1 X	
6	259/03	1 X	
7	578/03-3		1 X
8	708/03-2, -5, -8, -11	4 X	
9	741/03-1		1 X
10	807/03-1		1 X
11	821/03-1, 2		2 X
12	981/03-1, -2, -11, -12		4 X
13	990/03		1 X
14	994/03-1, -4	2 X	
15	1051/03-Darm, Gelenk		2 X
16	1172/03		1 X
16	26	10	16

Reo = „nicht-ERS“-Reoviren

ERS = enteric reovirus strain

4.4.3 Genotypisierung

4.4.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zum Nachweis des segmentierten Genoms sowie zum Vergleich der Wanderungsmuster der viralen Genom-Segmente wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt.

Alle untersuchten Isolate wiesen zehn Genom-Segmente auf, die in drei Größenklassen (L1-3, M1-3, S1-4) eingeteilt werden konnten, und zeigten somit das typische Wanderungsmuster von Reoviren (Abbildung 7).

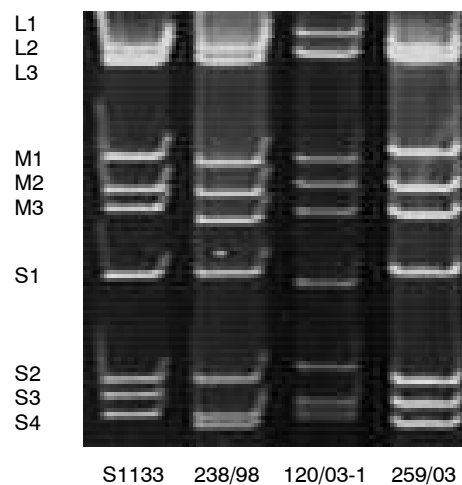


Abbildung 7: Wanderungsmuster ausgewählter Reovirusisolate in der PAGE

Trotz einiger Übereinstimmungen wurde ein erheblicher Polymorphismus in der elektrophoretischen Beweglichkeit der Genom-Segmente festgestellt (Tabelle 22). So wies das Isolat 238/98 mit S1133 fünf parallellaufende Segmente auf. Die Isolate 238/98 und 259/03 zeigten sechs und S1133 mit 259/03 sieben übereinstimmende Segmente. Nur ein übereinstimmendes Segment wies das Isolat 120/03-1 mit 238/98 sowie S1133 auf. Zwei parallellaufende Segmente zeigte 120/03-1 mit 259/03. Anhand des Wanderungsmusters der Genomsegmente scheinen sich die Isolate S1133, 238/98 und 259/03 am Ähnlichsten zu sein, was jedoch eine Einteilung in Elektropherotypen in dieser Untersuchung nicht erlaubt.

Die Anzahl parallellaufender Segmente lag je nach ihrer Größenklasse (L1-3, M1-3, S1-4) zwischen einem und drei Segmenten. Dabei wurden mit nur einem parallellaufenden Genom-Segment die größten Unterschiede bei den Gen-Segmenten S3, M2 und M3

Ergebnisse

beobachtet. Die häufigsten Übereinstimmungen zeigten die Gen-Segmente S1, S2, L1, L2 und L3 mit jeweils drei parallellaufenden Genom-Segmenten.

Tabelle 22: Auswertung der PAGE anhand parallellaufender Segmente im Vergleich zu einem Vergleichsisolat

Genom	Vergleichs-Genoms	Parallellaufende Segmente										Anzahl parallellaufender Segmente
		L1	L2	L3	M1	M2	M3	S1	S2	S3	S4	
S1133	238/98	1	1	1				1	1		S3	5
	120/03-1										1	1
	259/03	1	1	1	1	1		1	1			7
238/98	120/03-1				1							1
	259/03	1	1	1				1	1		1	6
120/03-1	259/03						1			1		2
Anzahl parallellaufender Segmente je nach ihrer Größenklasse		3	3	3	2	1	1	3	3	1	2	

4.5 Prüfung der Pathogenität *in vivo*

Nach der Charakterisierung mit labordiagnostischen Methoden wurde die Pathogenität ausgewählter Isolate in SPF-Broiler geprüft. Durch die Verwendung von SPF-Broiler- und nicht SPF-Hühner-Küken wurden optimale Bedingungen für eine praxisnahe Prüfung der Pathogenität der Isolate *in vivo* geschaffen.

Zusätzlich zu den Vergleichsstämmen S1133 sowie 238/98 und den Feldisolaten 120/03-1 sowie 259/03 wurde das sterilfiltrierte Darmhomogenat 120/03-1 (AM) eingesetzt, um die darin elektronenmikroskopisch gefundenen und nicht angezüchteten Rota- und Caliciviren im Tiermodell zu berücksichtigen.

4.5.1 Klinische Erscheinungen und Mortalität

Die Negativkontrollgruppe zeigte keine klinischen Erscheinungen.

Auch die Tiere, die mit dem Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 infiziert worden waren, wiesen keine klinischen Erscheinungen auf. Entgegen der Erwartung einer erhöhten Pathogenität aufgrund der Einteilung in die Gruppe von enteric reovirus strains, zeigte keines der Tiere, die mit dem ERS-Isolat 120/03-1 infiziert wurden, klinische Erscheinungen. Auch die mit dem Ausgangsmaterial 120/03-1 (AM) des Isolates infizierten Broiler blieben klinisch unauffällig.

Im Gegensatz dazu zeigten zehn Tiere der Gruppe, die mit dem „nicht-ERS“-Isolat 259/03 infiziert worden waren, ab dem 31. d p.i. Gelenkschwellungen und Bewegungsstörungen in unterschiedlicher Ausprägung. Das Allgemeinbefinden war gestört. Am 33. d p.i. wurde bei 12 Tieren der Gruppe diese Symptomatik beobachtet.

Die gesamte Gruppe, die mit 238/98 infiziert worden war, zeigte ab dem dritten d p.i. ein gestörtes Allgemeinbefinden und Durchfall. Eines der Tiere, das mit dem Reovirusisolat 238/98 infiziert wurde, starb drei Tage p.i. Weitere 13 Tiere dieser Gruppe verendeten fünf Tage p.i. Das letzte Küken der Gruppe starb am sechsten Tag p.i.

Die klinischen Erscheinungen und die Mortalität der Versuchstiere sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Klinische Erscheinungen und Mortalität der Versuchstiere

Gruppe	Klinische Erscheinungen	Mortalität (%)
S1133	keine	0
238/98	gestörtes Allgemeinbefinden, Durchfall	100
120/03-1	keine	0
120/03-1 (AM)	keine	0
259/03	Gestörtes Allgemeinbefinden, Gelenkschwellungen, Bewegungsstörungen	0
Negativkontrolle	keine	0

4.5.2 Gewichtsentwicklung

Wie anhand von Abbildung 8 und Tabelle 24 erkennbar ist, lag die Entwicklung des Gewichts bei den meisten Gruppen eng beieinander. Bis zum siebten d p.i. waren kaum sichtbare Unterschiede erkennbar.

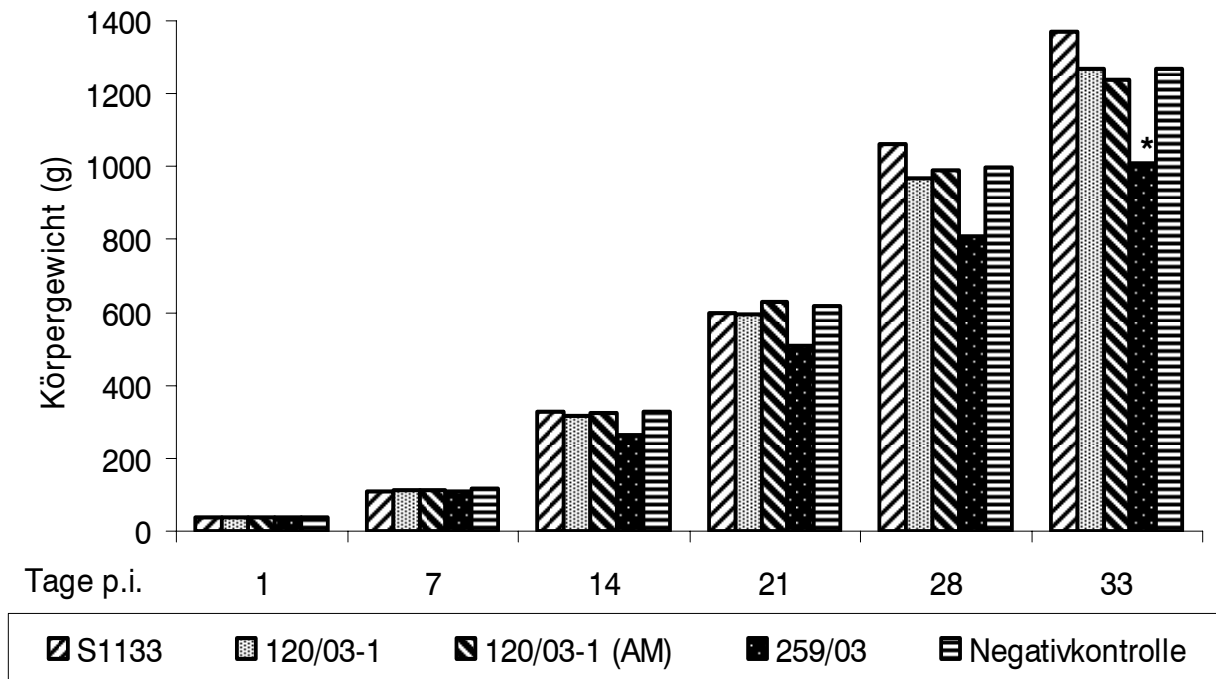


Abbildung 8: Entwicklung des Gewicht der Tiere vom Tag der Infektion bis zum 33. d p.i.

*: Signifikante Gewichtsabweichung im Vergleich zur Negativkontrollgruppe ($p < 0,05$)

Ergebnisse

Obwohl statistisch keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden, überschritt das mittlere Gewicht der Gruppe S1133 das der Negativkontrollgruppe deutlich ab dem 28. d p.i. Am 33. d p.i. wogen die Tiere im Mittel 1372 g, wohingegen die der Negativkontrollgruppe ein Durchschnittsgewicht von 1269 g aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei den Gewichten der Tiere eine Standardabweichung von 163 g beobachtet werden, die für ein Auseinanderwachsen der Gruppe spricht. Die Negativkontrollgruppe zeigte lediglich eine Standardabweichung von 119 g.

Das mittlere Gewicht der Gruppe 120/03-1 lag während der gesamten Versuchszeit mit dem der Negativkontrollgruppe gleich auf. Am 33 d p.i. zeigten beide Gruppen mit 1269 g das gleiche mittlere Gewicht. Die Standardabweichung des Gewichts dieser Gruppe am 33. d p.i. sprach, verglichen mit dem der Negativkontrollgruppe, zwar für eine Uniformitätsminderung innerhalb der Gruppe, war mit 150 g jedoch im Vergleich zu den Standardabweichungen der übrigen Gruppen geringer. Das Gewicht der Gruppe 120/03-1 (AM), die mit dem Ausgangsmaterial des Isolates 120/03-1 infiziert worden war, unterschritt am 33. Tag p.i. mit 1240 g im Mittel nur geringfügig das der Negativkontrollgruppe. Es konnte jedoch zu diesem Zeitpunkt in keiner anderen Gruppe eine so hohe Standardabweichung von 180 g beobachtet werden. Das starke Auseinanderwachsen der Gruppe war ab dem 14. d p.i. bis zum 33. d p.i. deutlich erkennbar. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Gruppe 120/03-1 nur geringe, die Gruppe, die mit dem Ausgangsmaterial infiziert wurde, hingegen starke Abweichungen im Vergleich zur Negativkontrollgruppe zeigt.

Die Gruppe 259/03 zeigte ab der zweiten Woche bis zum 33. d p.i. deutlich verminderte Gewichtszunahmen im Vergleich zur Negativkontrollgruppe. Mit einem mittleren Gewicht von 1009 g am 33. Tag wies diese Gruppe eine signifikante Gewichtsreduktion von 20% gegenüber der Negativkontrollgruppe mit 1269 g im Mittel auf. Die Standardabweichung von 154 g sprach für ein Auseinanderwachsen der Herde. Mit diesem Isolat konnte ein direkter Kausalzusammenhang von Reoviren und Kümmerwachstum bzw. dem Auseinanderwachsen der Herde, welches auch im Feld beobachtet wurde, hergestellt werden.

Tabelle 24: Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichts der Tiere am 33. d p.i.

Gruppe	Mittelwert des Gewichts der Tiere (g)	Standardabweichung (g)
S1133	1372	163
238/98	n.d.	n.d.
120/03-1	1269	150
120/03-1 (AM)	1240	180
259/03	1009 *	154
Negativkontrolle	1269	120

* Signifikante Abweichung im Vergleich zur Negativkontrollgruppe ($p < 0,05$)

n.d.: nicht durchgeführt, da alle Tiere bis zum 6. d p.i. starben

Das jeweilige Gewicht der Tiere sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gruppen S1133, 120/03-1, 120/03-1 (AM), 259/03 und der Negativkontrollgruppe vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i. sind in Tabelle 32 bis Tabelle 36 (Anhang) aufgeführt. Das Gewicht der Tiere der Gruppe 238/98 konnten in diesen Tabellen, wie auch in Abbildung 8 und Tabelle 24 nicht berücksichtigt werden, da die Küken vor der zweiten Gewichtskontrolle verendeten.

4.5.3 Virusreisolierung aus Kloakentupfern

Die Virusreisolierung aus Kloakentupfern wie auch aus Organproben (4.5.7) folgte zunächst jeweils im doppelten Ansatz auf HEL- und CER-Zellen. Da die Ergebnisse der Paralleluntersuchungen auf beiden Zellkulturen übereinstimmten, wurden die weiteren Versuche der Virusreisolierung auf CER-Zellen durchgeführt.

Trotz des zertifizierten SPF-Status wurden von je zwei SPF-Broilerküken aus jeder Gruppe vor ihrer Infektion mit den Reovirusisolaten Kloakentupfer entnommen und untersucht. Die Versuche der Virusanzüchtung aus diesen Tupfern verliefen negativ.

Eine Woche p.i. wurden die ersten Kloakentupfer zur Virusreisolierung entnommen. Zu diesem Zeitpunkt wurde von unterschiedlich vielen Broilern jeder Gruppe Virus ausgeschieden. Während nur 2 von 15 Kloakentupfern der Gruppe S1133 positiv waren, konnte aus allen Tupfern der Gruppen 259/03, 120/03-1 und 120/03-1 (AM) Virus reisoliert werden.

Alle Broiler der Gruppe S1133 erreichten in der zweiten Woche p.i. den Höhepunkt der Virusausscheidung. In der Gruppe 120/03-1 konnte nur noch aus sieben Broilern Virus

Ergebnisse

reisoliert werden, während noch von 14 Broilern aus der Gruppe, die mit dem Ausgangsmaterial des Isolates infiziert worden war, Virus ausgeschieden wurde. Die Tiere der Gruppe 259/03 hingegen schieden in der zweiten Woche p.i. kein Virus mehr aus.

In der dritten Woche p.i. wird deutlicher, dass in den Gruppen immer weniger Tiere Virus ausschieden. In der Gruppe S1133 waren es nur noch zwei Tiere. Während in der Gruppe 120/03-1 nur noch aus drei Tieren Virus reisoliert werden konnte, schieden immerhin noch sechs Tiere der Gruppe 120/03-1 (AM) Virus aus. Aus lediglich einem Tier der Gruppe 259/03 konnte zu diesem Zeitpunkt Virus isoliert werden.

In der vierten Woche p.i. konnte lediglich aus zwei Broilern der Gruppe S1133, aus einem Tier der Gruppe 120/03-1 und aus einem Tier der Gruppe 259/03 Virus reisoliert werden. Die Broiler der Gruppe 120/03-1 schieden zu diesem Zeitpunkt kein Virus mehr aus.

Aufgrund des frühen Verendens der mit dem Isolat 238/98 infizierten Broiler konnte die Virusausscheidung in dieser Gruppe nicht beurteilt werden.

Zu keinem Zeitpunkt des Versuches konnte aus den Kloakentupfern der Negativkontrollgruppe Virus reisoliert werden.

Die Ergebnisse der Virusreisolierung sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Ergebnisse der Virusreisolierung aus Kloakentupfern

Zeitpunkt der Virusreisolierung aus Kloakentupfern	Infektion mit Reovirusisolat					
	S1133	238/98	120/03-1	120/03-1 (AM)	259/03	Negativkontrolle
7 d p.i.	2 / 15 ¹⁾	²⁾	15 / 15	15 / 15	15 / 15	0 / 15
14 d p.i.	15 / 15	²⁾	7 / 15	14 / 15	0 / 15	0 / 15
21 d p.i.	2 / 15	²⁾	3 / 15	6 / 15	1 / 15	0 / 15
28 d p.i.	2 / 15	²⁾	1 / 15	0 / 15	1 / 15	0 / 15

¹⁾ Anzahl positiver / Anzahl untersuchter Kloakentupfer

²⁾ Keine Untersuchung möglich

4.5.4 Pathologisch-anatomische Befunde

Am 33. d p.i. zeigten 5 von 15 Tieren der Gruppe S1133 mittel- bis hochgradige Gelenkschwellungen (hauptsächlich Polyarthritits). Fünf Tiere dieser Gruppe sowie vier der mit dem Isolat 120/03-1 infizierten Tiere wiesen massive multifokale intra- und intermuskuläre Hämorrhagien (M. pectoralis, Mm. caudofemorales, laterale und mediale Beugemuskulatur der Unterschenkel, Mm. puboischiofemorales, Mm. ischiofemorales, Mm. femorotibiales, Mm. iliofibulares, Mm. iliotibiales) auf. Bei einem Tier der Gruppe 120/03-1

Ergebnisse

wurden Hämorrhagien in den Blinddarmsillen, in der Bauchspeicheldrüse, in den Nieren und im Drüsenmagen festgestellt. Zwei Tiere der Gruppe 120/03-1 bzw. ein Tier der Gruppe 120/03-1 (AM) zeigten ein mittel- bis hochgradiges Hydroperikard. Bei einem Tier der Gruppe 120/03-1 (AM) wurden Gelenkschwellungen festgestellt. Am 33. d p.i. zeigten zwölf Tiere der Gruppe 259/03 mittel- bis hochgradige Gelenkschwellungen (hauptsächlich Polyarthrit). Weiterhin wurden bei sechs Tieren der Gruppe Hämorrhagien in den Blinddarmsillen, in der Bauchspeicheldrüse, in den Nieren und im Drüsenmagen festgestellt. Drei Tiere zeigten ein mittel- bis hochgradiges Hydroperikard.

Nicht beschriebene Organe waren in den Tieren aller Gruppen makroskopisch unauffällig. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen der Tiere aller Gruppen, exklusive der Gruppe 238/98, sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Pathologisch-anatomische Veränderungen der Versuchstiere der Gruppen S1133, 120/03-1, 120/03-1 (AM), 259/03 und der Negativkontrollgruppe am 33. d p.i.

Gruppe (je 15 Tiere)	Gelenkschwellung (Polyarthrit)	Hydroperikard	intra- und intermuskuläre Hämorrhagien	Hämorrhagien in Blinddarmsillen, Bauchspeicheldrüse, Nieren, Drüsenmagen
S1133	5 ¹⁾	0	5	0
120/03-1	0	2	4	1
120/03-1 (AM)	1	1	0	0
259/03	12	3	0	6
Negativkontrolle	0	0	0	0

¹⁾ Anzahl der Tiere pro Gruppe, die die Symptomatik zeigen

Im Gegensatz zu allen anderen Gruppen zeigte die Gruppe 238/98 massive pathologisch-anatomische Veränderungen. Nahezu alle der dazu gehörigen 15 verendeten Tiere zeigten hochgradige multifokale bis konfluierende Nekrosen in Leber und Milz (Abbildung 9) sowie eine mittelgradige Omphalitis. Vereinzelt wiesen diese Tiere eine diffuse Schwellung des Drüsenmagens sowie eine mittelgradige Bursitis und ein mittelgradiges Hydroperikard auf. Diese Veränderungen sprechen für eine hohe Pathogenität des ERS-Stammes 238/98.

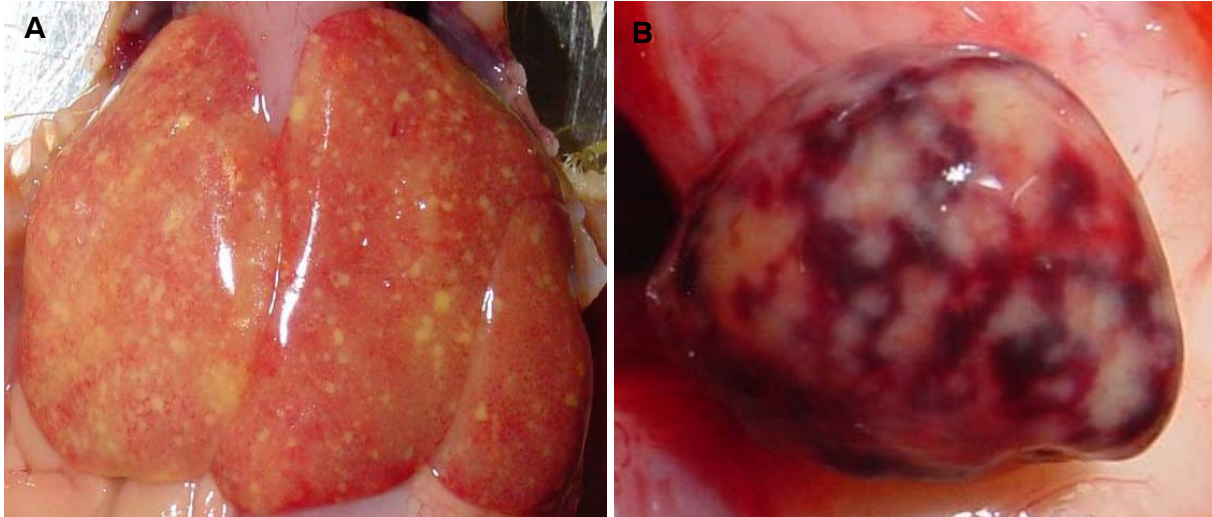


Abbildung 9: Hochgradige multifokale bis konfluierende Nekrosen in Leber (A) und Milz (B) eines mit dem Reovirus Isolat 238/98 infizierten 5 Tage alten SPF-Broilers

4.5.5 Histopathologische Befunde

Um die pathologisch-anatomischen Befunde zu untermauern und ggf. weitere makroskopisch nicht erkennbare Veränderungen feststellen zu können, wurden histopathologische Folgeuntersuchungen vorgenommen. Dabei konnten diverse Befunde erhoben werden, die in Abbildung 10 zusammengefasst sind.

Bei den Tieren, die mit dem Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 infiziert wurden, zeigten 3 von 15 Tieren eine mittel- bis hochgradige, multifokale, chronisch-fibrinöse, teilweise fibroblastische, nicht-purulente Myokarditis. Vier Tiere wiesen eine mittel- bis hochgradige multifokale, chronisch-fibrinöse, teilweise fibroblastische Epikarditis auf. Bei zwei bzw. vier Tieren, die mit dem Isolat 120/03-1 bzw. mit seinem Ausgangsmaterial 120/03-1 (AM) infiziert wurden, war eine mittelgradige multifokale, chronisch-fibrobrinöse, teilweise fibroblastische Epikarditis erkennbar. Jeweils zwei Tiere dieser beiden Gruppen zeigten eine mittelgradige, multifokale, chronische, nicht-purulente Myokarditis. Diese Befunde könnten das Auftreten des makroskopisch erkennbaren Hydroperikards in den Gruppen 120/03-1 und 120/03-1 (AM) erklären. Die mikroskopisch erhobenen Befunde deuten auf eine geringe Pathogenität des ERS-Isolates 120/03-1 hin. In der Gruppe 259/03 zeigten acht Tiere eine mittel- bis hochgradige multifokale, chronisch-fibrinöse, teilweise fibroblastische Epikarditis. Bei sieben Tieren, die mit dem Isolat 259/03 infiziert wurden, fanden sich großflächige Hämorrhagien in der Bauchspeicheldrüse, die auch makroskopisch erkennbar waren. Hämorrhagien in den Blinddarmtonsillen, den Nieren und dem Drüsenmagen konnten mikroskopisch nicht gefunden werden. Bei fünf Tieren lag eine mittelgradige, multifokale, chronische, lymphoplasmazelluläre Gastritis in der Umgebung des Drüsenmagens vor.

Ergebnisse

Zusätzlich zeigte sich bei zwei Tieren eine mittelgradige, multifokale, chronische, nicht-purulente Myokarditis.

Die Tiere der Negativkontrollgruppe zeigten keinen der genannten Befunde. Alle untersuchten Gewebe waren physiologisch entwickelt.

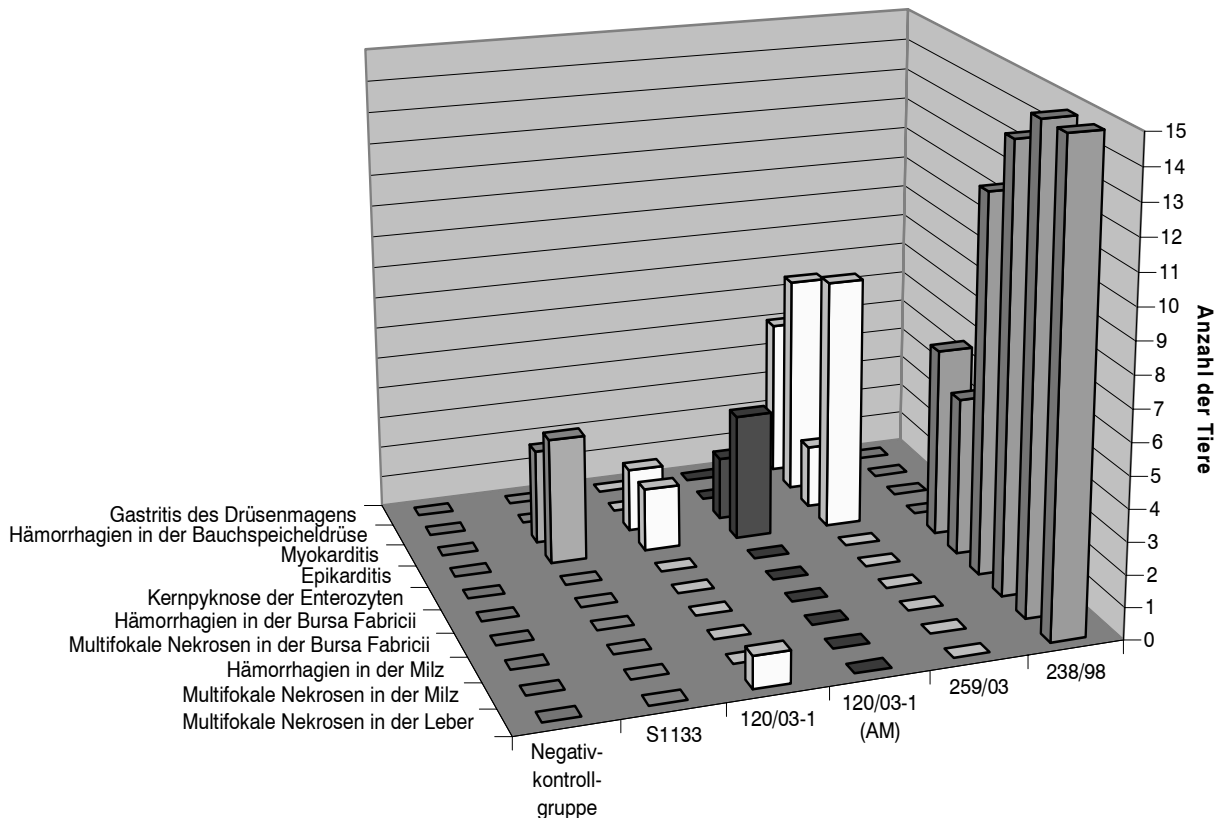


Abbildung 10: Histopathologische Befunde

Die massiven, makroskopisch erhobenen Befunde in der Gruppe 238/98 konnten mikroskopisch genauer beschrieben werden. Alle Tiere der Gruppe wiesen hochgradige, multifokale bis konfluierende Nekrosen in Milz und Leber auf. Die minimale Infiltration von Entzündungszellen deutet auf einen schnellen Verlauf der Erkrankung hin. Darüber hinaus zeigten 14 der Tiere hochgradige an die Follikel angrenzende Hämorrhagien in der Milz. In Abbildung 11 ist erkennbar, dass die Struktur von Leber und Milz fast vollständig zerstört war. Bei elf Tieren fanden sich hochgradige, multifokale Nekrosen der Bursa Fabricii sowie bei lediglich fünf Tieren hochgradige, an die Follikel der Bursa Fabricii angrenzende Hämorrhagien. Bei sechs Tieren wurden multifokale Kernpyknosen der lumennahen Enterozyten festgestellt. Die massiven Veränderungen bei den Tieren dieser Gruppe bestätigen die hohe Pathogenität dieses Reovirus-Stammes.

Die Tiere der Negativkontrollgruppe wiesen keinen dieser Befunde auf.

Ergebnisse

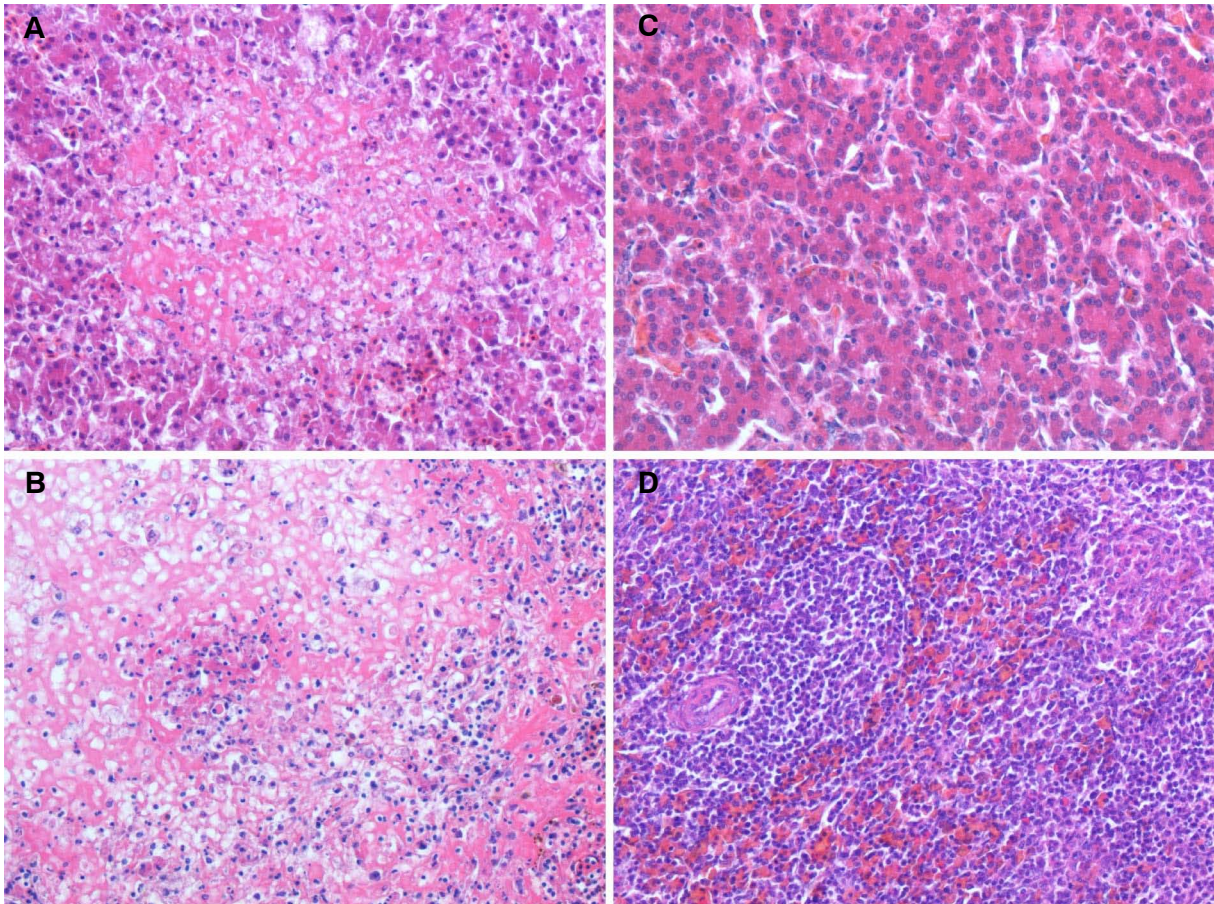


Abbildung 11: Hochgradige, akute Nekrosen in der Leber (A) und der Milz (B) eines mit dem Reovirusisolat 238/98 infizierten SPF-Broilers 5 d p.i. im Vergleich zu der Leber (C) und der Milz (D) eines nicht infizierten Tieres. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Vergrößerung 200x.

Alle Tiere der Gruppe S1133, 13 der Gruppe 120/03-1, jeweils 14 Tiere der Gruppen 120/03-1 (AM) und 259/03 sowie 10 Tiere der Negativkontrollgruppe wiesen mittelgradige, multifokale, lymphoplasmazelluläre Infiltrationen der Leber auf, die als physiologische Lymphfollikel eingestuft wurden. Lediglich bei einem der mit dem Isolat 238/98 infizierten Tiere zeigte sich dieser physiologische Befund. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Lebergewebe und somit auch die Lymphfollikel in dieser Gruppe durch die Nekrosen und Hämorrhagien nahezu vollständig zerstört waren.

4.5.6 Immunhistochemische Befunde

Die Verteilung des Reovirus Antigens innerhalb der Gewebe der verendeten bzw. nach Ende des Versuchs getöteten Tiere wurde immunhistochemisch festgestellt.

Bei den Tieren, die mit dem Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 infiziert wurden, fand sich Virus Antigen in Fibroblasten aller Blinddärme (15/15) sowie im lymphatischen Gewebe der Blinddarmonsillen (15/15). Bei zwölf Tieren wurde Antigen im Zentrum der Follikel in der Milz festgestellt. Bei acht Tieren fand sich das Reovirus Antigen in den Fibrozyten des Zwölffingerdarms, während lediglich wenige positive Herde in den lymphatischen Zellen der Bursa Fabricii von vier Tieren, in den Hepatozyten von drei Tieren und den Epikarditis-assoziierten Entzündungszellen von einem Tier festgestellt wurden. Histopathologisch konnten hingegen nur am Myo- und Epikard Veränderungen beobachtet werden. Weder im Gehirn noch in der Niere, der Bauchspeicheldrüse oder im Drüsenmagen konnte Virus Antigen gefunden werden. Bei den Tieren, die mit dem Isolat 120/03-1 bzw. mit seinem Ausgangsmaterial 120/03-1 (AM) infiziert wurden, wurde das Virus Antigen im lymphatischen Gewebe der Blinddarmonsillen von zwölf bzw. acht Tieren und den Lymphozyten in der Milz von acht Tieren bzw. einem Tier nachgewiesen. Bei drei Tieren der Gruppe 120/03-1 wurde Antigen zusätzlich in der Bursa Fabricii detektiert. Es zeigte sich somit eine ähnliche Verteilung des Reovirus Antigens bei den beiden Gruppen. Bei der Gruppe 120/03-1 (AM) war im Vergleich zur Gruppe 120/03-1 jedoch in den Blinddarmonsillen und in der Milz bei weniger Tieren Antigen festgestellt worden. Einige Tiere beider Gruppen zeigten mikroskopisch eine Myo- und Epikarditis. Sowohl im Herzgewebe als auch in den restlichen untersuchten Organen konnte jedoch in den beiden Gruppen kein Virus Antigen detektiert werden. Erstaunlicherweise konnte bei den Tieren der Gruppe 259/03, die klinische Symptome zeigten, das geringste Gewicht aufwiesen und starke histopathologische Veränderungen zeigten, das Virus Antigen am 33 d p.i. in keinem der untersuchten Organe detektiert werden.

Bei Betrachtung der verschiedenen untersuchten Organe in allen Gruppen ist auffällig, dass Virus Antigen am häufigsten in lymphatischen Geweben wie der Milz, der Bursa Fabricii und den Blinddarmonsillen detektiert werden konnte, was darauf hindeutet, dass Reoviren in diesen Organen persistieren.

Die Tiere der Negativkontrollgruppe zeigten in allen untersuchten Organen kein Vorhandensein von Reovirus Antigen.

Die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises von Reovirus Antigen in Organproben sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises von Reovirus Antigen in Organproben

Organmaterial	Immunhistochemischer Nachweis am 33. d p.i. nach Infektion mit Reovirusisolat					
	S1133	238/98 ²⁾	120/03-1	120/03-1 (AM)	259/03	Negativ- kontrolle
Gehirn	0 / 15 ¹⁾	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Herz	1 / 15	2 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Leber	3 / 15	15 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Milz	12 / 15	15 / 15	8 / 15	1 / 15	0 / 15	0 / 15
Niere	0 / 15	13 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Bursa Fabricii	4 / 15	14 / 14	3 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Drüsenmagen	0 / 15	n.u.	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Zwölffingerdarm	8 / 15	11 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Bauchspeicheldrüse	0 / 15	12 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Blinddarm	15 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Blinddarmtonsillen	15 / 15	11 / 15	12 / 15	8 / 15	0 / 15	0 / 15
Gesamtanzahl	43 / 150	93 / 150	23 / 150	9 / 150	0 / 150	0 / 150

¹⁾ Anzahl positiver / Anzahl untersuchter Organe

²⁾ Immunhistochemischer Nachweis unmittelbar nach dem Verenden der Tiere

n.u.: nicht untersucht

Bei allen Tieren, die mit dem Isolat 238/98 infiziert wurden, zeigte sich ein massives Auftreten von Antigen im Zentrum der Nekrosen in Leber und Milz (Abbildung 12). Ferner wurde Antigen in den perivasalen, interstitiellen Monozyten der Niere von 13 Tieren sowie in spindelförmigen Zellen (möglicherweise Fibroblasten oder Endothelzellen) im Interstitium der Bursa Fabricii von 14 Tieren sowie des Zwölffingerdarms von elf Tieren detektiert. Weiterhin wurde Reovirus Antigen in den Epithelzellen teilweise der exokrinen Bauchspeicheldrüse von zwölf Tieren sowie im lymphatischen Gewebe der Blinddarmtonsillen von elf Tieren festgestellt. Lediglich zwei der Tiere wiesen zufällige Herde von Virus Antigen im Endokard auf. In den Gehirnproben dieser Tiere wurde kein Antigen detektiert. Ein Vergleich der histopathologischen mit den immunhistochemischen Ergebnissen zeigt, dass in allen mikroskopisch veränderten Organen (Leber, Milz, Zwölffingerdarm und Bursa Fabricii) auch Virus Antigen detektiert werden konnte, aber nicht in allen Organen histopathologische Befunde zu erheben waren, in denen Virus Antigen nachgewiesen werden konnte. Das zeigt, dass sich das Virus innerhalb kurzer Zeit im gesamten Organismus, exklusive des Gehirns, ausgebreitet, aber nicht in allen Organen zu Veränderungen geführt hat, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Tiere zuvor verendeten. Diese Befunde heben erneut die hohe Pathogenität des Stammes 238/98 hervor.

Ergebnisse

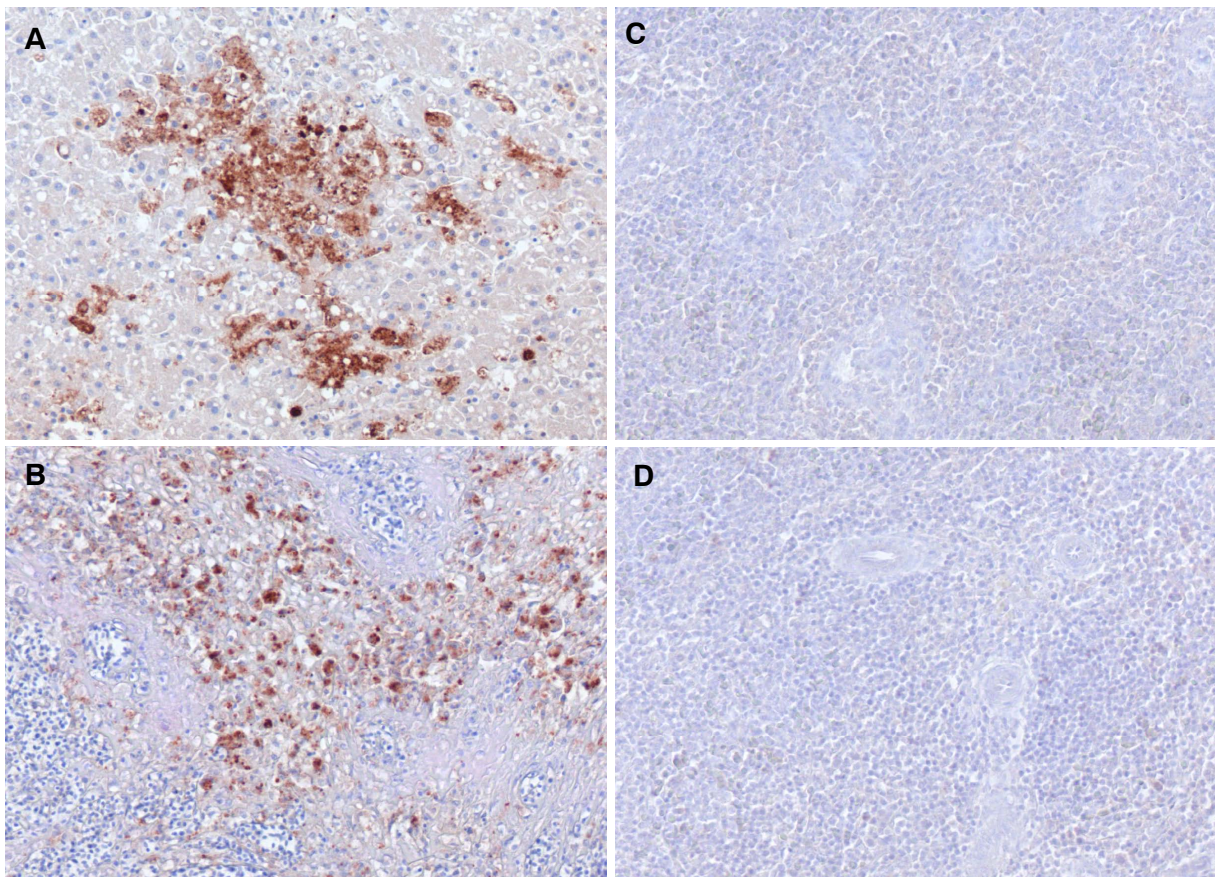


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von Reovirus Antigen. Hochgradige multifokale nekrotisierende Hepatitis (A) und Splenitis (B) bei einem mit dem Reovirusisolat 238/98 infizierten SPF-Broiler 5 d p.i. im Vergleich zu der Leber (C) und der Milz (D) eines nicht infizierten Tieres, die keine Färbung nach Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern aufweisen. Vergrößerung 200 x

4.5.7 Virusreisolierung aus Organproben

Die Virusreisolierung aus den Tieren der Gruppen S1133, 120/03-1, 120/03-1 (AM), 259/03 und der Negativkontrollgruppe erfolgte aus gruppenweise gepoolten Organproben, die am 33. d p.i. entnommen wurden.

Die Virusreisolierung der Gruppe S1133 verlief aus allen Pools von Blinddarm mit Blinddarmonsillen (3/3) positiv. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der immunhistochemischen Untersuchungen überein, da in Blinddarm sowie Blinddarmonsillen aller 15 Tiere dieser Gruppe Virus Antigen detektiert werden konnte. Aus lediglich einem Milzpool dieser Gruppe verlief die Virusreisolierung (1/3) positiv, wohingegen in diesem Organ bei 12/15 Tieren Antigen festgestellt worden war. Obwohl in Herz, Leber, im Zwölffingerdarm und in der Bursa Fabricii Antigen festgestellt wurde, konnte aus keinem dieser Organe Virus reisoliert werden. Ebenso negativ verlief die Virusreisolierung aus dem Gehirn, der Niere, der Bauchspeicheldrüse und dem Drüsenmagen.

Bei den Gruppen 120/03-1 sowie 120/03-1 (AM) konnte aus einem (1/3) bzw. zwei Pools (2/3) von Blinddarm mit Blinddarmonsillen Virus reisoliert werden. Dies war in der Gruppe 120/03-1 zusätzlich aus einem Milzpool (1/3) möglich. Diese Ergebnisse sind ebenfalls vergleichbar mit denen der immunhistochemischen Untersuchungen. Bei diesen wurden in Gruppe 120/03-1 bzw. 120/03-1 (AM) Virus Antigen in den Blinddarmonsillen (12/15 bzw. 8/15) und der Milz (8/15 bzw. 1/15) gefunden. Allerdings wurde bei 3/15 Tieren der Gruppe 120/03-1 zusätzlich Antigen in der Bursa Fabricii detektiert.

Es fällt auf, dass aus keinem Organpool der Gruppe 259/03 eine Virusreisolierung möglich war. Analog zu diesem Ergebnis konnte in keinem der untersuchten Organe Virus Antigen Virus detektiert werden.

Die Organe der Gruppe 238/98 wurden direkt nach dem Verenden der Broiler zwischen Tag 3 und 6 p.i. entnommen. Aus allen 24 Organpools der Gruppe konnte das Virus reisoliert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28: Ergebnisse der Virusreisolierung aus Organpools

Organmaterial	Infektion mit Reovirusisolat					Negativkontrolle
	S1133	238/98	120/03-1	120/03-1 (AM)	259/03	
Gehirn	0 / 3 ¹⁾	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	n.u.
Herz	0 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	n.u.
Leber	0 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Milz	1 / 3	3 / 3	1 / 3	0 / 3	0 / 3	n.u.
Niere	0 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	n.u.
Bursa Fabricii	0 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	n.u.
Drüsenmagen	0 / 3	n.u.	0 / 3	0 / 3	0 / 3	n.u.
Zwölffingerdarm mit Bauchspeicheldrüse	0 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Leerdarm	0 / 3	n.u.	0 / 3	0 / 3	0 / 3	n.u.
Hüftdarm	0 / 3	n.u.	0 / 3	0 / 3	0 / 3	n.u.
Blinddarm mit Blinddarmtonsillen	3 / 3	3 / 3	1 / 3	2 / 3	0 / 3	0 / 3
Gesamtanzahl	4 / 33	24 / 24	2 / 33	2 / 33	0 / 33	0 / 33

¹⁾ Anzahl positiver / Anzahl untersuchter Proben (1 Probe = 5 gepoolte Organproben)

n.u.: nicht untersucht

4.5.8 Antikörperentwicklung

Die Tiere aller Gruppen, mit Ausnahme der in der ersten Woche verendeten Tieren (238/98) und der Negativkontrollgruppe, zeigten eine humorale Immunantwort gegen Reoviren. Die mit den Isolaten S1133, 120/03-1 und 120/03-1 (AM) infizierten Gruppen zeigten ab der dritten Lebenswoche nachweisbare Antikörper-Titer. Die Gruppen unterschieden sich geringfügig im Zeitraum des Beginns der Ak-Bildung und der Höhe der erreichten Ak-Titer. Es fällt jedoch auf, dass die Gruppe, die mit dem Isolat 120/03-1 infiziert worden war, am 33. d p.i. einen höheren Ak-Titer als die Gruppe zeigte, die mit dem Ausgangsmaterial dieses Isolates infiziert worden war. Die Gruppe 259/03 bildete im Gegensatz zu den anderen Gruppen schon innerhalb der zweiten Woche p.i. Ak aus und erreichte am 33. d p.i. die höchsten Ak-Titer. Dieses Ergebnis kann mit den Ergebnissen der Virusreisolierung aus Kloakentupfern und Organproben in Verbindung gebracht werden. Der Höhepunkt der Virusausscheidung war in der Gruppe eine Woche p.i. Ab der zweiten Woche p.i. wurde, mit Ausnahme von jeweils zwei positiven Kloakentupfern drei und vier Wochen p.i., von keinem Tier dieser Gruppe mehr Virus ausgeschieden. Aus keinem Organpool der Tiere konnte am 33 d p.i. Virus reisoliert werden. Das spricht für die Elimination der Viren

Ergebnisse

durch die gebildeten Antikörper. Die Negativkontrollgruppe bildete keine Antikörper gegen Reoviren aus (Abbildung 13).

Vor Beginn des Versuchs wurden alle Seren auch auf das Vorhandensein von Ak gegen Infektiöse Bursitis- (IBD-) und Adenoviren getestet, um maternale Ak auszuschliessen. Zusätzlich wurde nach dem Versuch auf Adenoviren untersucht. In den gewonnenen Seren waren keine Antikörper gegen Infektiöse Bursitis- (IBD-) und Adenoviren nachweisbar.

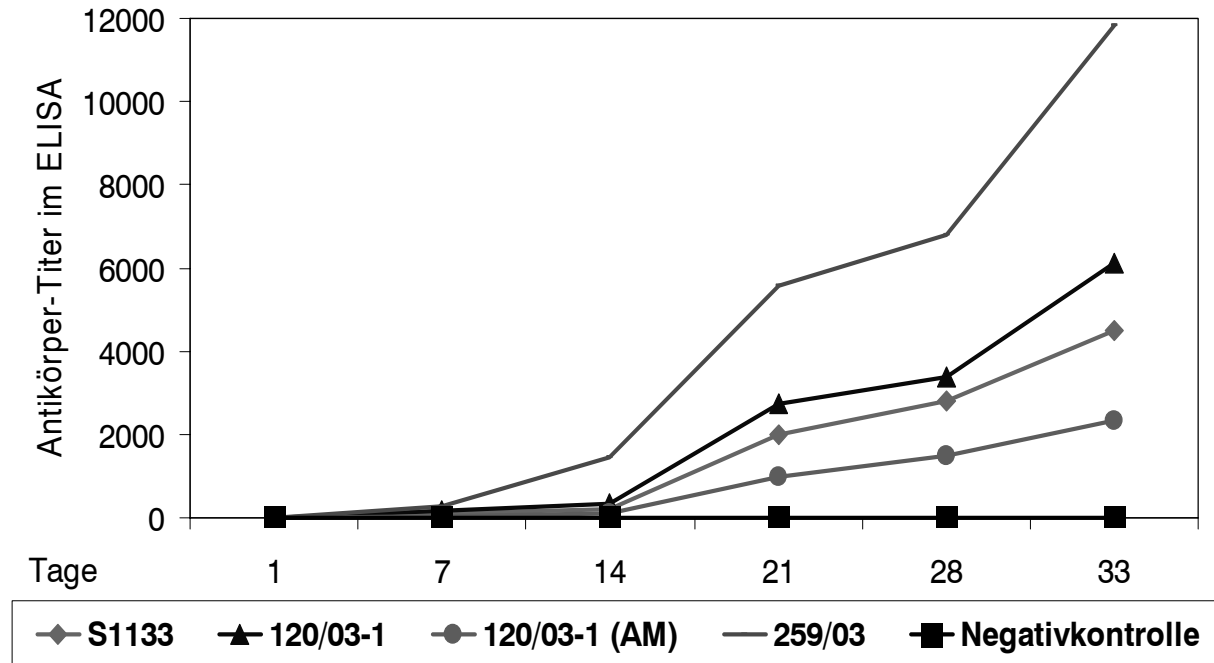


Abbildung 13: Entwicklung der Antikörper-Titer

Die Antikörpertiter sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der Gruppen S1133, 120/03-1, 120/03-1 (AM), 259/03 und der Negativkontrollgruppe vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i. sind in Tabelle 37 bis Tabelle 41 (Anhang) aufgeführt. Die Antikörpertiter der Gruppe 238/98 konnten in diesen Tabellen, wie auch in Abbildung 13, nicht berücksichtigt werden, da die Küken vor der zweiten Blutentnahme verendeten.

5 Diskussion

Das Malabsorptions-Syndrom (MAS) ist eine Erkrankung, die in den 70er Jahren erstmalig beschrieben wurde (Van der Heide et al., 1981). Sie ist weltweit verbreitet und führt insbesondere durch die erhöhte Anzahl verworfener Tiere im Schlachthof zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten in der Broilermast (Vielitz et al., 1989; Dobson und Glisson, 1992). In Deutschland wird seit 2002 das vermehrte Auftreten des Krankheitskomplexes beobachtet. Vor allem aviäre Reoviren konnten aus betroffenen Broilern isoliert werden. Daher wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die Isolierung, Typisierung und Charakterisierung von Reovirusisolaten aus dem aktuellen MAS-Geschehen gelegt. Ausgangspunkt für die Untersuchungen war die Isolierung der Reoviren von Proben aus Niedersachsen, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Baden-Württemberg und Thüringen aus den Jahren 2002 bis 2004 aus Broilerbeständen mit Kümmerwuchs und Auseinanderwachsen der Herden.

5.1 Virusnachweis, -isolierung, -identifizierung, -charakterisierung und -typisierung

Von 68 verschiedenen Organproben von Broilern aus 17 Beständen konnten aus 56 Proben Virus in der Zellkultur angezüchtet und im Indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) als Reovirus identifiziert werden.

Der Vergleich der Virusisolierung auf Hühnerembryoleber (HEL)- mit der auf Hühnerembryofibroblasten (HEF)-Zellen zeigte, dass die Erfolgsquote der Isolierung von Reoviren auf HEL-Zellen deutlich höher war als auf HEF-Zellen. Zudem trat der durch die Reoviren verursachte zytopathische Effekt (cpE) auf HEL- früher und deutlicher auf als auf HEF-Zellen und im Gegensatz zu diesen meist ohne die Notwendigkeit eine Blindpassage durchzuführen. Daraus wird deutlich, dass für die Isolierung von Reoviren aus Tieren mit MAS-Problematik HEL- besser geeignet sind als HEF-Zellen, wie es auch in der Literatur für die Reovirusisolierung aus Tieren mit Arthritis/Tenosynovitis beschrieben ist (McFerran et al., 1976; Guneratne et al., 1982; Barta et al., 1984).

Bei dem Vergleich unterschiedlichen Probenmaterials zur Virusisolierung zeigte sich, dass aus 92% der Darmproben, jedoch nur aus 75% der Organproben Virus isoliert werden konnte. Daher stellte in diesen Untersuchungen Darmmaterial das geeignetere Material zur Diagnostik dar.

Diskussion

Obwohl bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Ausgangsmaterials neben Reoviren auch andere Viren, insbesondere Rotaviren, nachgewiesen wurden, konnten nach der Virusanzüchtung elektronenmikroskopisch nur Reoviren, nicht aber Rotaviren oder andere Viren, dargestellt werden. Auch im Indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) wurden angezüchtete Viren ausschließlich als Reoviren identifiziert. Die Anzüchtung von Caliciviren, die in dem Ausgangsmaterial einer elektronenmikroskopisch untersuchten Probe nachgewiesen worden waren, war nicht zu erwarten, da aviäre Caliciviren aus Tieren mit MAS bislang nicht angezüchtet, sondern nur elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden konnten (Wyeth et al., 1981).

Da Adenoviren von einigen Autoren aus Tieren mit MAS isoliert worden waren (Kouwenhoven, 1988; Zekarias, 2003) und die Morphologie des durch Adenoviren verursachten cpE kein zuverlässiges diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung von Reoviren darstellt, wurden alle Isolate auch im IIFT auf Adenoviren untersucht. Diese konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Isolierung von Rotaviren gelang trotz mehrerer Blindpassagen unter Trypsinzusatz zum Virusinokulum, wie es für die Anzüchtung und Vermehrung von Rotaviren in Zellkulturen beschrieben ist (McNulty, 2003), nicht. Das Trypsin wurde zugesetzt, um durch proteolytische Spaltung des Virusproteins VP4 in VP8* und VP5* das Wachstum *in vitro* durch die Erhöhung der Virusinfektiosität und der Erleichterung der Penetration in die Wirtszelle zu erhöhen (McNulty, 2003). Die meisten Rotaviren zeigen keinen cpE bei der Virusanzüchtung. Es sind oft mehrere Blindpassagen nötig, bevor ein cpE erkennbar wird. Mit Ausnahme von drei Rotavirusisolaten gehören alle Isolate, die bisher auf Zellkulturen angezüchtet werden konnten, zur Gruppe A der aviären Rotaviren. Da die Isolierung von Rotaviren extrem schwierig ist (Murgia et al., 2004), erfolgt die Diagnostik elektronenmikroskopisch (McNulty, 2003) mit anschließender Charakterisierung der Rotaviren mittels molekularbiologischer Verfahren (Otto et al., 2004; Otto et al., 2006). Die Arbeitsgruppe von Otto et al. (2004; 2006), die sich vorrangig mit Rotaviren beschäftigt, stellten bei der molekularbiologischen Charakterisierung von Viren aus Darm- und Kotproben von Tieren aus dem gleichen MAS-Geschehen in Deutschland fest, dass vor allem atypische Rotaviren der Gruppe D beteiligt waren. Diese Ergebnisse lassen möglicherweise den Schluss zu, dass die Rotaviren in den in dieser Arbeit untersuchten Ausgangsmaterialien ebenfalls zur Gruppe D gehören, was eine Erklärung für die negativen Ergebnisse bei der Virusanzüchtung bietet. Möglicherweise kommt es zu einer Verdrängung durch die schnell wachsenden Reoviren, so dass nach der Anzüchtung keine Rotaviren mehr nachweisbar sind. Aufgrund der Tatsache, dass in den Ausgangsmaterialien überwiegend Rotaviren gefunden worden waren, ist nicht auszuschließen, dass diese am MAS-Geschehen beteiligt

sind. In der vorliegenden Arbeit konnten nur Reoviren isoliert werden, und es wurden Untersuchungen zu deren weiteren Charakterisierung und Differenzierung durchgeführt.

Exemplarisch für alle isolierten Reoviren wurden in dieser Arbeit die beiden deutschen Feldisolate 120/03-1 und 259/03 im Vergleich mit dem Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 und dem ERS-Vergleichsstamm 238/98 näher charakterisiert.

Bei den Untersuchungen zur Morphologie der durch die Viren induzierten Veränderungen in der Zellkultur zeigten alle Isolate einen für Reoviren typischen cpE. Dieser war, wie schon von verschiedenen Autoren beschrieben (Kawamura et al., 1965; Von Bülow, 1979; Guneratne et al., 1982) gekennzeichnet durch die Bildung synzytialer Zellverbände und deren späterer Ablösung aus dem Zellverband.

Im Unterschied zu anderen behüllten Viren ist die Fähigkeit zur Synzytienbildung bei Reoviren nicht essentiell für die Virusreplikation (Duncan et al., 1996). Deshalb wird vermutet, dass dieser Mechanismus einen Vorteil bei der Ausbreitung des Virus im Gewebe des infizierten Tiers darstellt (Duncan et al., 1996; Duncan und Sullivan, 1998; Benavente und Martinez-Costas, 2007). Basierend auf diesem Vorteil der schnelleren Ausbreitung im Gewebe des Wirtes, beschrieben Ni und Kemp (1995) einen Zusammenhang zwischen den durch das Virus verursachten Läsionen in den Organen bzw. der Pathogenität und der Schnelligkeit der Ausbreitung des Virus bzw. der Größe der Plaque in Zellkulturen.

Die Untersuchung der Isolate unter diesem Gesichtspunkt zeigte geringe Unterschiede im zeitlichen Auftreten ihrer cpE. Dieser trat beim Vergleichsstamm 238/98 24 h p.i. auf. Bei dem Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 bzw. bei den Feldisolaten konnte das Auftreten eines deutlichen cpE auf HEL-Zellen 12 bzw. 24 Stunden später festgestellt werden. Dieses Ergebnis wird gestützt durch die Untersuchungen verschiedener Autoren, die vom Auftreten eines durch Reoviren verursachten cpE frühestens 12 Stunden p.i. berichten (Kawamura et al., 1965; Von Bülow, 1979; Guneratne et al., 1982). In der Zeit bis zur vollständigen Zerstörung des Zellrasens unterschieden sich die Isolate etwas deutlicher. Dabei benötigten die Feldisolate am Längsten. Beim Vergleich der Morphologie der Synzytien wurde ein ähnliches Ergebnis gefunden. Im Gegensatz zu den beiden Vergleichsstämmen, die großflächige, später aus dem Zellverband gelöste Synzytien bewirkten, verursachten die Isolate 120/03-1 und 259/03 kleine bzw. mittelgroße abgerundete Zellen und kleine aus dem Zellverband gelöste Synzytien sowie aus dem Zellverband gelöste Zelltrümmer.

Die auf HEL-Zellen gewonnenen Ergebnisse ließen sich auf der permanenten Zelllinie chicken embryo rough (CER) unmittelbar ohne Adaptierung reproduzieren, wobei sich die Zeit bis zum Sichtbarwerden der cpE im Vergleich zu HEL-Zellen um wenige Stunden verzögerte. Des Weiteren zeigten die Isolate in Titrationskontrollen schon in der ersten CER-

Passage mit denen auf HEL-Zellen vergleichbare Titer. In Anbetracht der Feststellung, dass auf HEL-Zellen die höchsten Titer zu erreichen sind (Guneratne et al., 1982; Herbst, 1983), ist die CER-Zelllinie sehr gut als Vermehrungssystem für aviäre Reoviren geeignet. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam schon Sievers-Kruse (1992) bei ihren Untersuchungen mit Reoviren, die aus Flugenten isoliert worden waren. Die Autorin konnte schon in der ersten Passage das Auftreten eines cpE sowie das Erreichen von mit auf HEL-Zellen vergleichbaren Titern beobachten. Hingegen erwies sich die CER-Zelllinie bei Untersuchungen zu Reoviren aus Ziervögeln auch nach dreimaliger Passage weder zur Anzüchtung noch zur Vermehrung für alle untersuchten Isolate als geeignet (Huther, 1996). Darüber hinaus stellte Huppert (1996) in ihren Untersuchungen mit Reoviren aus Puten, Flugenten und Tauben auf der CER-Zelllinie die wesentlich später einsetzende und schwache Bildung eines cpE sowie niedrige Titer fest und befand die Zelllinie als keine brauchbare Alternative zu HEL-Zellen.

Trotz der unbefriedigenden Ergebnisse bezüglich der Ermittlung der Synzytiengröße wurde in dieser Arbeit mit der Untersuchung der Plaquemorphologie auf CER-Zellen weiter versucht, ein morphologisches Pathogenitätskriterium zu finden. Die Vergleichsstämme wiesen jedoch auch bei dieser Untersuchung größere Plaque auf als die Feldisolate. Guneratne et al. (1982) beobachteten hingegen bei Ihren Untersuchungen mit verschiedenen Feldisolaten sehr unterschiedliche Plaquegrößen zwischen 1,5 und 5,8 mm und somit unter anderem die Bildung sehr großer Plaque. Die Schwierigkeiten, eine Einstufung der Pathogenität anhand der Ergebnisse in Bezug auf die Ausbildung der cpE und der Synzytiengrößen vorzunehmen, decken sich mit denen der Plaquegrößen. Es konnten im Plaque-Test jedoch Unterschiede zwischen den Feldisolaten festgestellt werden. Der Vergleichsstamm 238/98 zeigte die Ausbildung von etwa 1,3 Mal so großen Plaque wie der Reovirus-Prototyp-Stamm S1133, knapp 3,5 Mal so großen Plaque wie das Isolat 120/03-1 und etwa 7 Mal so große Plaque wie das Isolat 259/03. So bildete das Isolat 120/03-1 mittelgroße und das Isolat 259/03 kleine Plaque.

Ein Vergleich der Ergebnisse mit den durch Ni und Kemp (1995) formulierten Zusammenhängen zeigt, dass die Beziehung zwischen Pathogenität und Synzytiengröße bzw. Plaquemorphologie für die in dieser Arbeit isolierten Viren schwer einzuordnen ist. Würde eine Korrelation zwischen den untersuchten morphologischen Veränderungen durch das Virus in der Zellkultur und der Pathogenität bestehen, würde das Isolat 120/03-1 als mäßig- und das Isolat 259/03 als gering-pathogen eingestuft werden. Der Vergleichsstamm 238/98 weist, an diesen Kriterien gemessen, eine sehr hohe Pathogenität auf. Dieses Ergebnis wird durch die hohe Mortalität im Tierversuch bestätigt. Für den Vergleichsstamm S1133 liegt die Ursache für die schnelle Ausbreitung des Virus in den Zellen des

Kultursubstrates mit hoher Wahrscheinlichkeit darin, dass bei dem vielfach passagierten Laborstamm eine Anpassung an die Zellkulturbedingungen stattgefunden hat und somit die Plaque- bzw. Synzytiengröße keinen Hinweis auf die Pathogenität des Virus darstellt (siehe auch Ergebnisse des Pathogenitätstestes).

Im Rahmen der Untersuchungen zur Serotypisierung konnten durch Verwendung des Neutralisationstests im Mikrotiterverfahren mit Antikörpern gegen den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 keine eindeutigen Neutralisationstiter bestimmt werden. Ein exaktes Ablesen der Neutralisationsergebnisse war nicht möglich. Es entwickelte sich ein schnell fortschreitender cpE, der auch z.T. bei der Reaktion mit hohen Serumkonzentrationen zu beobachten war. Trotz dieser Schwierigkeiten und einer hohen Streuung wurden die Neutralisationstiter aus 20 Paralleluntersuchungen als Richtwerte ermittelt. Eine Aussage über serologische Unterschiede konnte nicht getroffen werden, da die errechneten Neutralisationstiter sehr niedrig waren und maximal eine Titerstufe auseinander lagen. Ursachen können darin gesucht werden, dass das verwendete Reovirus-Referenzserum trotz eines hohen ELISA-Titers von 19832 einen zu niedrigen Neutralisationstiter aufweist. Eine andere Erklärung dieser Ergebnisse wäre, dass durch die vielen im Serum vorhandenen gruppenspezifischen Antikörper keine vollständige Neutralisation aller Viruspartikel stattfinden konnte und auch nach der Neutralisation in vielen Reaktionsansätzen noch Virus vorhanden war, das sich weiter vermehren und einen cpE verursachen konnte, der zwar zeitlich verzögert war, aber die Auswertung der stattgefundenen Neutralisation erschwerte bzw. unmöglich machte. Reoviren besitzen drei neutralisierende Antigene. Nur das Neutralisationsantigen σ C ist typspezifisch, während die beiden übrigen σ B und λ B vorwiegend gruppenspezifisch reagieren (Takehara et al., 1987; Wickramasinghe et al., 1993). Andere Autoren beschreiben sogar, dass selbst die Typspezifität des Proteins σ C nicht absolut zu sein scheint. Das Überwiegen gruppenspezifischer Antikörper im Anti-Serum von Reoviren kommt häufig vor und wird durch die Komplexität der neutralisierenden Virusantigene verursacht (Meanger et al., 1995).

Die Schwierigkeiten der Serotypisierung aviärer Reoviren, die schon von vielen Autoren (Herbst, 1983; Hieronymus et al., 1983; Robertson und Wilcox, 1984; Robertson und Wilcox, 1986) beschrieben wurden, spiegeln sich also auch in dieser Arbeit wider.

Um die Ausbreitung des „nicht neutralisierten“ Virus über das Kulturmedium zu verhindern und damit präzisere Neutralisationstiter zu errechnen, wurden die Neutralisationsteste unter Agar-Overlay durchgeführt. Mittels dieser Methode waren die Ergebnisse eindeutiger. Zwischen den Vergleichsstämmen S1133, 238/98 und dem Feldisolat 120/03-1 konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die

Plaquereduktionstiter unterschieden sich nur geringfügig. Das Feldisolat 259/03 hingegen konnte deutlich abgegrenzt werden.

An die Serotypisierung schlossen sich Untersuchungen zur Typisierung aviärer Reoviren mittels monoklonaler Antikörper (mAk) im IIFT an. In der Literatur sind so genannte enteric reovirus strains (ERS) beschrieben, die eine sehr hohe Pathogenität in Broilern und SPF-Hühnern aufweisen (Van Loon et al., 2001; Hein et al., 2003; Van de Zande et al., 2003; Van de Zande und Lin, 2005; Van de Zande und Kuhn, 2007). Die Autoren beschränken sich bei ihren Untersuchungen zur Pathogenität auf zwei in den Jahren 1998 (Minta et al., 2001) und 1999 isolierte ERS-Stämme aus Polen und einen ERS-Feldausbruch in den USA (Van Loon et al., 2001). Bei einem Vergleich der Reaktionsmuster dieser ERS und einer Vielzahl bisher bekannter Reovirusisolate mit drei definierten mAk zeigten die ERS ein anderes, für diese als typisch eingestuftes Reaktionsmuster (Van Loon et al., 2001). Aufgrund ihrer Reaktion mit den mAk konnten viele aus Broilern mit MAS isolierte Reoviren aus diversen Ländern dem ERS-Typ zugeordnet werden (Van Loon et al., 2001). In den eigenen Untersuchungen wurden daher die Reoviren auf ihre Zugehörigkeit zu den ERS geprüft. Dabei wurden 16 Isolate aus 11 Broiler-Herden dem ERS-Typ und 10 Isolate aus 6 Herden dem „nicht-ERS“-Typ zugeordnet. Es wurde erwartet, dass die dem ERS-Typ zugeordneten Isolate eine höhere Pathogenität oder zumindest serologische Unterschiede aufweisen. Betrachtet man die Ergebnisse der beiden ausgewählten Feldisolate 120/03-1 (ERS) und 259/03 („nicht-ERS“) im Plaquereduktionstest, so spricht der deutliche Unterschied zwischen den beiden Isolaten für eine antigenetische Differenz zwischen dem ERS- und „nicht-ERS“-Isolat, wie es auch von van Loon et al. (2001) und Hein et al. (2003) beschrieben wurde. Die Ergebnisse werden allerdings dadurch in Frage gestellt, dass das ERS-Isolat 120/03-1 dem „nicht-ERS“-Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 ähnelt, aber der ERS-Vergleichsstamm 238/98 und das „nicht-ERS“-Isolat 259/03 sich deutlich von diesen unterscheiden. In den Veröffentlichungen (Van Loon et al., 2001; Hein et al., 2003; Van de Zande et al., 2003; Van de Zande und Lin, 2005; Van de Zande und Kuhn, 2007) wird über die hohe Pathogenität der Isolate und die Unwirksamkeit der Reovirus-Vakzinen im Zusammenhang mit ERS-Infektionen berichtet. Daraus wird der Rückschluss gezogen, ERS-Stämme seien möglicherweise grundsätzlich hoch-pathogen. Dagegen sprechen allerdings die Angaben, die in den Vorberichten für die hier durchgeführten Untersuchungen mitgeteilt wurden. Obwohl 60% der Isolate mittels monoklonaler Antikörper als Reoviren vom ERS-Typ charakterisiert wurden, ergab der Vergleich der durch den einsendenden Tierarzt beschriebenen klinischen Erscheinungen keine Unterschiede zwischen den Feld-ERS- und Feld-„nicht-ERS“-Isolaten. Des Weiteren wurde weder zeitlich noch räumlich begrenzt eine Zuordnung von Reoviren vom ERS- und „nicht-ERS“-Typ ersichtlich. Einen besonderen

Diskussion

Befund, der Anlass gibt, die Einteilung in ERS-Typen zu hinterfragen, ist die doppelt durchgeführte Typisierung von zwei Isolaten aus unterschiedlichen Organen des gleichen Tieres in ERS und „nicht-ERS“. Eine Ausbreitung der Reoviren nach oraler Aufnahme erfolgt zunächst im Darm. Während apathogene Viren nach der Darmpassage relativ schnell ausgeschieden werden, breiten sich pathogene Viren von dort über das Blut in multiple Organe aus (Jones et al., 1989). Unter Berücksichtigung dieser Kenntnis bezüglich der Ausbreitung des Virus im Organismus trifft der Zusammenhang von der Zuordnung als ERS und Pathogenität für die beiden Isolate nicht zu. So wurde das ERS-Isolat 120/03-1 aus dem Darm und das „nicht-ERS“-Isolat 120/03-2 aus einem Organpool aus Leber, Herz, Milz und Bursa Fabricii isoliert. Da eine Korrelation der genannten Kriterien nicht möglich war, konnte nach den erzielten Ergebnissen *in vitro* keine Aussage über die Pathogenität von ERS und „nicht-ERS“ getroffen werden.

Bei der weiteren Charakterisierung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ließ sich das virale Genom jedes Isolates in zehn Segmente mit einem Reovirus-typischen Wanderungsmuster auftrennen. Trotz einiger Übereinstimmungen wurde ein erheblicher Polymorphismus in der elektrophoretischen Beweglichkeit festgestellt. Die Anzahl parallellaufender Segmente lag je nach ihrer Größenklasse (L1-3, M1-3, S1-4) zwischen einem und drei. Im Gegensatz zu anderen Autoren, die die größten Abweichungen unter den Gen-Segmenten S1, S2, S3, S4 und L1 fanden (Rekik et al., 1990), wurden die größten Unterschiede in diesen Untersuchungen bei den Gen-Segmenten S3, M2 und M3 gesehen. Die häufigsten Übereinstimmungen zeigten die Gen-Segmente S1, S2, L1, L2 und L3. Dem Gen-Segment S1 sowie dem von ihm kodierten Strukturprotein σ C wird in der Literatur eine große Bedeutung in Bezug auf die Diagnostik und Differenzierung aviärer Reoviren beigemessen (Martinez-Costas et al., 1995; Shapouri et al., 1995; Bodelon et al., 2001; Benavente und Martinez-Costas, 2007). So zeigt das für die Neutralisierungsaktivität zuständige Strukturprotein σ C den größten Polymorphismus bei der elektrophoretischen Darstellung (Schnitzer et al., 1982). Demnach wäre entsprechend der Ergebnisse aus den Neutralisationstesten zu vermuten gewesen, dass das Gen-Segment S1 des Isolates 259/03 bei der PAGE einen Unterschied zu den anderen Isolaten zeigt und nicht das des Isolates 120/03-1. Die wenigsten Übereinstimmungen in der Anzahl parallellaufender Gen-Segmente zeigte, im Vergleich zu den anderen Isolaten, das Isolat 120/03-1. Der ERS-Vergleichsstamm 238/98, das Isolat 259/03 und der Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 zeigen untereinander fünf, sechs bzw. sieben übereinstimmende parallellaufende Gen-Segmente. Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl übereinstimmender Gen-Segmente und der Pathogenität konnte nicht hergestellt werden. Auch in Bezug auf die Pathogenität spielt das Gen-Segment S1 eine große Rolle. So stellten Ni et al. (1995; 1996) fest, dass für den

Gewebetropismus und die pathologischen Veränderungen in den Broilern das Gen-Segment S1 der Reoviren mit weiteren Kofaktoren verantwortlich zu sein scheint (Ni und Kemp, 1995; Ni et al., 1996). Das ist insofern nahe liegend, als dass S1 für das Strukturprotein σ C kodiert, welches als Zell Attachment Protein für die Adsorption an die Wirtszelle verantwortlich ist (Shapouri et al., 1996; Grande und Benavente, 2000). Zusätzlich wird vom Gen-Segment S1 das Nichtstrukturprotein p10 kodiert (Shmulevitz und Duncan, 2000; Bodelon et al., 2001), welches die Bildung von Synzytien induziert. Infolgedessen kommt es zur Apoptose und einer Membranstabilität, die ihrerseits zum Zerreißen der Synzytien führt, woraufhin Nachkommenviren freigesetzt werden (Salsman et al., 2005). So hätte man vermuten können, dass anhand des Gen-Segmentes S1 eine Unterscheidung der Isolate in Bezug auf ihre Pathogenität möglich gewesen wäre. Jedoch weist das Isolat 120/03-1, das in der PAGE die wenigsten Übereinstimmungen mit den anderen Isolaten zeigt und als einziges Isolat eine andere Wanderungsgeschwindigkeit des Gen-Segmentes S1 aufweist, im Pathogenitätstest *in vivo* eine geringe Pathogenität auf. Ein ausgeprägter Polymorphismus der Wanderungsmuster der Gen-Segmente aviärer Reoviren zeigte sich auch in den Untersuchungen anderer Autoren, die keinen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Pathotyp finden konnten (Gouvea und Schnitzer, 1982a; Gouvea und Schnitzer, 1982b; Clark et al., 1990). Rekik et al. (1990) hingegen stellten einen Unterschied im Wanderungsmuster verschiedener Pathotypen fest. Bei ihren Untersuchungen wanderten die Gen-Segmente S1 von aus Hühnerbeständen mit MAS isolierten Reovirusisolaten langsamer als die von Reoviren aus Beständen mit Arthritis/Tenosynovitis (Rekik et al., 1990). Auch eine Einteilung der Isolate in ERS und „nicht-ERS“ anhand der Anzahl parallellaufender Segmente in der PAGE war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. So zeigte zwar das ERS-Isolat 120/03-1 die größte Abweichung im Vergleich zu den anderen Isolaten, der ERS-Vergleichsstamm 238/98 jedoch viele Übereinstimmungen mit den „nicht-ERS“ S1133 und 259/03.

Beim Vergleich des Versuchs der Sero- und Genotypisierung wird deutlich, dass die ohnehin schwer zu deutenden Einzel-Ergebnisse bezüglich der Einordnung der Isolate in gemeinsame oder sich unterscheidende Kategorien mit beiden Methodenkomplexen nicht übereinstimmen. Serologisch weicht das deutsche „nicht-ERS“-Feldisolat 259/03 deutlich von den anderen ab, während in der PAGE das deutsche ERS-Feldisolat 120/03-1 die größten Unterschiede im Vergleich zu den anderen aufweist. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Nick et al. (1975), die die von Ihnen untersuchten Isolate unterschiedlichen Genotypen zuordnen konnten, jedoch gehörten alle zu einem einheitlichen Serotyp.

5.2 Prüfung der Pathogenität *in vivo*

Um Kenntnisse über die Pathogenität der isolierten Reoviren und der Vergleichsstämme *in vivo*, insbesondere hinsichtlich der Reproduzierbarkeit des MAS, zu erlangen, schloss sich den labor diagnostischen Untersuchungen ein Infektionsversuch an. Anstatt SPF-Hühnern, die dem Legetyp zugeordnet sind, oder kommerziellen Broilern, die in aller zur Verfügung stehenden Literatur für Infektionsversuche verwendet wurden, wurden in dieser Arbeit SPF-Broiler oral infiziert, um eine möglichst praxisnahe Prüfung der Pathogenität zu erreichen.

Das durch den Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 ursprünglich hervorgerufene Krankheitsbild einer akuten, nicht eitrigen Tenosynovitis, Arthritis und einer chronischen Fibrose der Sehnenscheiden (Van der Heide und Kalbac, 1975) konnte im Pathogenitätstest *in vivo* mit dem verwendeten Isolat nur teilweise reproduziert werden. Es waren keine klinischen Erscheinungen zu beobachten, jedoch wurden im Rahmen der pathologisch-anatomischen Untersuchung bei 5 von 15 Tieren Gelenkschwellungen festgestellt. Es handelt sich um einen Laborstamm, der unbestimmt häufig in Hühnerembryonen passagiert worden war und der dadurch vermutlich seine Pathogenität weitgehend verloren hat. Von allen Broilern der Gruppe wurde in der zweiten Woche p.i. Virus im Kot ausgeschieden, in Woche drei und vier p.i. hingegen war dies nur noch bei jeweils zwei Tieren festzustellen. Somit wurde das Virus von den Tieren relativ schnell eliminiert. Die Tiere wiesen keine Gewichtsverminderung gegenüber der Kontrollgruppe auf, das Durchschnittsgewicht war sogar leicht erhöht. Allerdings konnte im Vergleich zur Negativkontrollgruppe eine gering erhöhte Standardabweichung festgestellt werden, die, wie von Montgomery et al. (1986) beschrieben, für ein leichtes Auseinanderwachsen der Herde sprach. Bei der histopathologischen Untersuchung wurden vereinzelt Myo- und Epikarditis festgestellt. Myokarditiden konnten schon von anderen Autoren (Page et al., 1982; Glavits et al., 1984) beobachtet werden. Darüber hinaus konnten bei den Tieren dieser Gruppe in vielen verschiedenen Organen, v.a. in Blinddarm, Blinddarmentonsillen und Milz, aber auch in Zwölffingerdarm, Bursa Fabricii, Leber und Herz, Virus Antigen detektiert und aus Blinddarm mit -tonsillen sowie Milz Virus reisoliert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Reovirus-Prototyp-Stamm noch genügend pathogenes Potential aufweist, um sich über die Blutbahn in diese Organe auszubreiten, obwohl er nur zu sehr geringen pathologisch-anatomischen Veränderungen, wie vereinzelt Gelenkschwellungen, geführt hat.

Da während des gesamten Versuchs aus keinem der untersuchten Kloakentupfer der Negativkontrollgruppe Virus reisoliert werden konnte, wurden in dieser Gruppe lediglich Organpools aus Leber, Zwölffingerdarm mit Bauchspeicheldrüse und Blinddarm mit

Blinddarmentonsillen untersucht. Aus keinem dieser Organpools war eine Virusreisolierung möglich.

Ganz andere Reaktionen als der Arthritis/Tenosynovitis Vergleichsstamm wies der ERS-Vergleichsstamm 238/98 im Pathogenitätstest auf. Die infizierten Küken zeigten ab dem dritten d p.i. nicht nur ein gestörtes Allgemeinbefinden, sondern auch starken Durchfall. Alle Küken verendeten zwischen drei und sechs d p.i. In der Herde, aus dem der ERS-Vergleichsstamm 238/98 isoliert worden war, zeigten die Broiler Apathie und Schwäche (Minta et al., 2001). Der Erfolg der Virusreisolierung aus allen untersuchten Proben ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich das Virus in alle Organe ausgebreitet und sich dort vermehrt hat, was zum Tod der Tiere führte. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen, in denen Durchfall beobachtet wurde, zeigten die Broiler in Polen nach natürlicher Infektion fortschreitende Ataxie und Tortikollis. Der Höhepunkt der Erkrankung lag erst in der zweiten bis dritten Lebenswoche, wobei die Mortalität in der Ursprungsherde in den 10 Ställen zwischen 7 und 50% lag (Minta et al., 2001). Diese Befunde konnten nach oraler Infektion mit aus der Herde stammenden Isolaten von Broilern mit maternalen Antikörpern gegen Reoviren von Minta et al. (2001) reproduziert werden. Die Mortalität lag bei 60-80%. Die in den eigenen Untersuchungen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch festgestellten massiven Nekrosen und Hämorrhagien in Leber und Milz, die zu einer fast vollständigen Zerstörung des jeweiligen Gewebes geführt haben, wurden auch von Minta et al. (2001) beschrieben. Der Virus-Stamm 238/98 wies im Vergleich zu den deutschen Feldisolaten eine deutlichere Affinität zu Leber und Milz auf. Schon Jones und Guneratne (1984) fanden makroskopisch erkennbare Leberveränderungen in SPF-Hühnern, die aus mehr oder weniger ausgedehnten Nekroseherden bestanden, welche von mononukleären Zellen und einigen regenerierenden Hepatozyten infiltriert wurden. Diese Leberveränderungen sind allerdings in ihrer Ausprägung bei weitem nicht mit den hier beobachteten Veränderungen zu vergleichen. Bei der histopathologischen Untersuchung konnten zwar neben den massiven Nekrosen und Hämorrhagien in Leber und Milz keine wie von Minta et al. (2001) beschriebenen Nephritiden, jedoch hochgradige Nekrosen und Hämorrhagien in der Bursa Fabricii beobachtet werden. Kerr und Olson (1969) berichteten nach einer Reovirusinfektion bei Hühnern von einer Atrophie der Bursa Fabricii, verursacht durch Kernpyknosen in den Follikeln im Frühstadium der Entzündung, gefolgt von Lymphozytendegeneration sowie interfollikulärer Fibrose und zystischer Degeneration im Spätstadium (Kerr und Olson, 1969). Virus-Antigen konnte mittels der Immunhistochemie in allen untersuchten Organen, auch in denen ohne histopathologische Veränderungen nachgewiesen werden, wobei das Gehirn eine Ausnahme darstellt. Die Detektion von Reovirus-Antigen im Plexus chorioideus hingegen wurde von van de Zande und Hein (2007)

beschrieben. Der verfügbaren Literatur zufolge ist dies der erste *in vivo* Pathogenitätstest mit einem aus dem Geschehen von 1998 stammenden Reovirusisolat in SPF-Broilern. Mit dem Isolat 238/98 konnte das von Minta et al. (2001) beschriebene Krankheitsbild in kommerziellen Broilern mit maternalen Antikörpern in diesen Arbeiten vollständig reproduziert werden. Zu einem vergleichbaren Ergebnis wie in diesen und den Untersuchungen von Minta et al. (2001) kamen auch van de Zande und Kuhn (2007) bei Untersuchungen mit einem Isolat aus einem von ihnen beschriebenen zweiten ERS-Ausbruch in Polen 1999. Mit diesem Isolat waren die Autoren auch in der Lage, in SPF-Hühnern ZNS-Symptome hervorzurufen. Die in den eigenen Untersuchungen im Vergleich zum Ursprungsgeschehen und in den weiteren Arbeiten von Minta et al. (2001) beobachteten Abweichungen, wie das frühere Auftreten der klinischen Erscheinungen und die erhöhte Mortalität, liegen möglicherweise in dem SPF-Status und den somit nicht vorhandenen maternalen Antikörpern gegen Reoviren der verwendeten Broiler begründet. Diese Vermutung wird durch Page et al. (1982) gestützt, die mehrere Reovirus-Stämme isolieren konnten, mit denen klinische Erscheinungen bei Küken erzeugt werden konnten, vor allem, wenn diese nur über niedrige maternale Antikörper verfügten. Möglicherweise wurde in den eigenen Untersuchungen aber auch eine höhere Infektionsdosis verwendet als bei Minta et al. (2001), der keine Angaben über die Infektionsdosis machte. In Übereinstimmung mit Autoren einer anderen Arbeitsgruppe (Hein et al., 2003; Van de Zande et al., 2003; Van de Zande und Kuhn, 2007) sprechen die Ergebnisse der Pathogenitätsstudie *in vivo* dafür, dass es sich um ein hoch-pathogenes aviäres Reovirus handelt, welches sich innerhalb kurzer Zeit in den Organen ausbreitet, sich dort vermehrt und das Krankheitsbild monokausal verursacht.

Nachdem die Ergebnisse des ERS-Vergleichsstammes gezeigt haben, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen die Klinik reproduziert werden kann, ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse der Isolate aus dem aktuellen MAS-Geschehen aussagekräftig hinsichtlich der Pathogenität dieser Stämme sind. Der Verlauf einer Reovirusinfektion mit ähnlicher Symptomatik und Mortalität wie in Polen in den Jahren 1998 und 1999, konnte in Deutschland bei keiner untersuchten Herde beobachtet werden. Keines der untersuchten deutschen Reovirusfeldisolate wies eine dem ERS-Vergleichsstamm 238/98 vergleichbare Pathogenität auf.

Die Gewichtsentwicklung der Gruppe 120/03-1 (Isolat) und der, die mit dem dazugehörigen Ausgangsmaterial 120/03-1 (AM) infiziert worden war, lag etwa auf dem Level der Negativkontrollgruppe. Die mit dem Ausgangsmaterial infizierten Tiere zeigten jedoch gegen Ende des Versuches eine hohe Standardabweichung des Durchschnittsgewichts im

Vergleich zu den anderen Gruppen und der Negativkontrollgruppe. Wie schon Montgomery et al. (1986) berichteten, deutet dies auf eine ungleichmäßige Größenentwicklung hin, die ein Auseinanderwachsen der Tiere zur Folge hat. Eine vollständige Reproduktion des MAS war bislang nur unter Verwendung von Darmhomogenaten aus Tieren mit MAS erfolgreich (Kouwenhoven et al., 1978b; Vertommen et al., 1980; Page et al., 1982; Kouwenhoven, 1988; Rosenberger et al., 1989; Montgomery et al., 1997; Songserm et al., 2002; Zekarias, 2003). In Übereinstimmung damit konnte in den eigenen Untersuchungen mit dem sterilfiltrierten Darmhomogenat 120/03-1 (AM) das MAS zwar nicht vollständig reproduziert werden, es führte aber im Vergleich zum Isolat 120/03-1 zu einer Uniformitätsminderung der Gruppe, die typisch für das MAS ist. Dies deutet darauf hin, dass andere im Ausgangsmaterial vorhandene Agentien wahrscheinlich für das Krankheitsbild MAS mitverantwortlich sind, wie es auch in der Literatur beschrieben ist. So berichteten Wyeth et al. (1981) über den elektronenmikroskopischen Nachweis von Caliciviren aus Darminhalt von Küken mit MAS. Eine Virusanzüchtung und infolgedessen ein Infektionsversuch waren jedoch nicht möglich. Untersuchungen von Otto et al. (2004; 2006) zufolge sind an dem aktuellen MAS-Geschehen Rotaviren beteiligt. Kisary et al. (1984) isolierten ein Parvovirus aus Küken mit MAS, mittels dessen es ihnen möglich war, bei einem Infektionsversuch schlechte Befiederung, Wachstumsdepression und Beinschäden hervorzurufen. Über den Nachweis von enterovirus-ähnlichen Partikeln in den Darmzellen erkrankter Tiere, mit denen die Krankheit in Broilern reproduziert werden konnte, berichteten McNulty et al. (1984). Im vorliegenden Fall kann folglich vermutet werden, dass die im Ausgangsmaterial 120/03-1 (AM) vorhandenen Rota- und Caliciviren eine Rolle gespielt haben. Die Gruppe, die mit dem Isolat 120/03-1 infiziert worden war, zeigte am 33. d p.i. einen höheren Ak-Titer wie die Gruppe, die mit dem Ausgangsmaterial dieses Isolates infiziert worden war, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Konzentration der Reoviren in dem Isolat 120/03-1 wesentlich höher war als die in seinem Ausgangsmaterial. Die pathologisch-anatomisch erhobenen Befunde stimmten nicht mit denen überein, die im Feld beobachtet worden waren. So zeigte keiner der Broiler Exsikkose, Rachitis oder einen Harnleiterstau. Die diagnostizierten Nierenveränderungen wurden vom Einsender nicht näher beschrieben, es könnte sich hierbei also auch Hämorrhagien in der Niere gehandelt haben, wie sie bei einem Tier der Gruppe 120/03-1 gefunden wurden. Dennoch kann das ERS-Isolat 120/03-1 aufgrund der pathologisch-anatomischen Untersuchungen als niedrig-pathogen eingestuft werden.

Bei der histopathologischen Untersuchung dieser beiden Gruppen zeigten sich bei wenigen Tieren eine Epikarditis und eine Myokarditis, ohne dass dort Virus Antigen detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde in diesen beiden Gruppen Virus Antigen in Milz, Blinddarm mit -tonsillen sowie bei einigen Tieren der Gruppe 120/03-1 zusätzlich in der

Diskussion

Bursa Fabricii detektiert sowie aus Blinddarm und -tonsillen (120/03-1 und 120/03-1 (AM)) sowie Milz (120/03-1) Virus reisoliert, ohne dass in diesen Organen histopathologische Veränderungen gefunden werden konnten. Die Tatsache, dass in den genannten Organen aus wesentlich mehr Tieren der Gruppe 120/03-1 Reovirus-Antigen detektiert werden konnte, jedoch die Tiere der mit dem Ausgangsmaterial infizierten Gruppe auseinander wuchsen und somit einen deutlicheren Unterschied zu der Negativkontrollgruppe zeigten, deutet möglicherweise auf eine Persistenz des Virus in diesen Organen hin, die aber keine klinische Relevanz hat. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Virusreisolierung aus Kloakentupfern. Der Verlauf der Virusausscheidung war in beiden Gruppen ähnlich, allerdings schieden 14 d p.i. doppelt so viele Tiere der Gruppe 120/03-1 (AM) aus wie die Tiere der Gruppe 120/03-1. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass durch die wesentlich geringere Menge an injiziertem Reovirus in der Gruppe 120/03-1 (AM) die Immunantwort der Tiere nicht so stark war wie in der Gruppe 120/03-1, so dass das Virus sich länger in den Tieren vermehren und von ihnen ausgeschieden werden konnte. Dass die Tiere der Gruppe 120/03-1 zu jedem Untersuchungszeitpunkt Virus ausschieden, wenn auch wochenweise kontinuierlich weniger Tiere, deutet auf eine mäßige Pathogenität des ERS-Isolates hin. Die Virusreisolierung aus zwei von drei Organpools aus Blinddarm mit Blinddarmentonsillen der Gruppe 120/03-1 (AM), widerspricht jedoch dem negativen Ergebnis der Virusreisolierung aus Kloakentupfern am 28. d p.i. in dieser Gruppe.

Bei den Tieren, die mit dem Feldisolat 259/03 infiziert wurden, traten deutlich stärkere Befunde als bei dem Feldisolat 120/03-1 auf. Es wurden ein gestörtes Allgemeinbefinden sowie Gelenkschwellungen und Störungen des Bewegungsapparates beobachtet. Die vom einsendenden Tierarzt erhobenen Befunde konnten jedoch auch bei den Tieren dieser Gruppe nicht festgestellt werden. So zeigte keines der Tiere wässrigen Durchfall oder Knochenweiche. Es waren ebenfalls keine MAS-typische Befunde wie Enteritis, Schleimhautschwellungen im Drüsenmagen oder Pankreasatrophie festzustellen, jedoch führte das „nicht-ERS“-Isolat 259/03, welches aus Därmen von Broilern aus Deutschland isoliert worden war, zu signifikant verminderten Gewichtszunahmen in den Broilern im Vergleich zur Negativkontrollgruppe. Diese *in vivo* erlangten Pathogenitätskriterien stehen jedoch im Gegensatz zu den auf Grund der labordiagnostischen Untersuchungen erwarteten relativ geringen Pathogenität des „nicht-ERS“-Isolates 259/03. Über ähnliche wie in den eigenen Untersuchungen erzielte Ergebnisse einer signifikanten Gewichtsreduktion bei experimentell mit MAS-Isolaten infizierten Broiler-Eintagsküken berichten Vertommen et al. (1980), van der Heide et al. (1981) und Rekik (1991). Songserm et al. (2000) machen zunächst Veränderungen im Bereich des Dünndarmes für die Reduktion des Gewichts in ihren Untersuchungen verantwortlich. In den eigenen Untersuchungen konnten sowohl

makroskopisch als auch mikroskopisch keine Läsionen im gesamten Darm gefunden werden. In weiteren Studien stellten Songserm et al. (2003) fest, dass die Infektion mit Reoviren bei Broilern zwar zu histologischen Veränderungen im Darm führte, jedoch nicht zwingend mit verminderter Gewichtszunahme verbunden war. Bei der histopathologischen Untersuchung der Tiere der Gruppe 259/03 konnten eine Gastritis im Bereich des Drüsenmagens, Hämorrhagien in der Bauchspeicheldrüse sowie Myo- und Epikarditis festgestellt werden. Ähnliche Veränderungen in Drüsenmagen und Pankreas sind in verschiedenen Studien (Pass et al., 1982; Riddell und Derow, 1985; Reece und Frazier, 1990) beschrieben. Nach den Angaben von Martland & Farmer (1986) führten die Veränderungen im Pankreas zu Maldigestion und reduzierter Gewichtszunahme, so dass zu vermuten ist, dass die Gewichtsreduktion der Gruppe 259/03 durch die entzündlichen Veränderungen an Drüsenmagen und Bauchspeicheldrüse hervorgerufen wurde. Einen zusätzlichen Beitrag zu der verminderten Zunahme in der letzten Lebenswoche der Broiler haben sicherlich die Störungen des Bewegungsapparates geleistet. Da die Gewichtszunahme aber im Vergleich zu den anderen Gruppen schon ab der dritten Lebenswoche stetig geringer wurde, sind diese Befunde wahrscheinlich nicht als primäre Ursache anzusehen. Die These, dass die Gewichtsdepression vermutlich durch die nachgewiesenen Veränderungen in Pankreas und Drüsenmagen sowie z.T. durch die aufgetretene Gelenkentzündung hervorgerufen wurde, wird dadurch gestützt, dass am 33. Tag p.i. zwar die oben genannten histopathologischen Veränderungen nachgewiesen werden konnten, jedoch bei den immunhistochemischen Untersuchungen in keinem untersuchten Organ Virus-Antigen detektiert, noch aus den Organen Virus reisoliert werden konnte. Es ist schwierig zu erklären, wieso in der Ausgangsherde, von dessen Tieren das Isolat 259/03 stammt, keine Gelenkveränderungen wie im Infektionsversuch beobachtet worden waren. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass die eingesendeten Därme aus zehn Tage alten Broilern stammten und die Gelenkveränderungen im Pathogenitätstest *in vivo* erst ab dem 31. d p.i. beobachtet wurden. Eine weitere Erklärung dafür könnten die in einem Versuch mit SPF-Tieren vorliegenden definierten Bedingungen sein. Die im Feld herrschenden zusätzlichen Einflüsse durch die Umwelt oder andere Erreger sind unter definierten Versuchsbedingungen ausgeschaltet oder auf ein minimales Maß reduziert, so dass die Reaktion des Tieres auf den spezifischen Erreger nicht vollständig mit den Feldbedingungen zu vergleichen ist. Für die meisten Reoviren wird eine Affinität zu den Sprunggelenken vermutet, wenn der Erreger lange genug im Wirtsorganismus persistieren kann (Sahu und Olson, 1975; Jones und Guneratne, 1984). Da SPF-Broiler keine maternalen Antikörper aufweisen, die bei den Tieren im Feld in der Regel vorhanden sind, liegt der Schluss nahe, dass der Erreger meist ausgeschieden bzw. erst eliminiert wird, wenn die Immunantwort auf die Infektion einsetzt. Deshalb besteht die

Diskussion

Möglichkeit, dass sich bis zu diesem Zeitpunkt ein Teil der Viruspartikel in den Gelenken ansammeln und der Inaktivierung durch gebildete Antikörper entgehen können. Kibenge et al. (1985) beschrieben in diesem Zusammenhang die teilweise zellassozierte Virämie der Reoviren, die so ohne Inaktivierung durch Antikörper in die Gelenke gelangen können. Es wurde beschrieben, dass neutralisierende Antikörper gegen Reoviren schon sieben bis zehn Tage p.i. nachgewiesen werden können (Jones und Nwajei, 1985). Mittels des ELISA war ein deutlicher Antikörper-Titer gegen Reoviren in den eigenen Untersuchungen ab dem 14 d p.i. festzustellen. Das lässt möglicherweise den Schluss zu, dass die Reoviren innerhalb der ersten zwei Lebenswochen in die Gelenke der Broiler gelangen konnten, aber erst gegen Ende des Versuches klinische Erscheinungen hervorriefen. Beim Vergleich der Virusausscheidung (Kloakentupfer) und der Antikörperentwicklung der infizierten Tiere wird deutlich, dass der Rückgang der Virusausscheidung mit dem Einsetzen der AK-Bildung innerhalb der zweiten Woche p.i. korrelierte. Obwohl die Tiere, mit Ausnahme von jeweils einem Broiler in der dritten und vierten Lebenswoche, ab der zweiten Lebenswoche kein Virus mehr ausschieden und aus den Organen am 33. d p.i. weder Virus reisoliert noch in den Organen Antigen detektiert werden konnte, stiegen die Antikörper-Titer in der gesamten Gruppe bis zum 33. d p.i. stetig an. Jones und Nwajei (1985) beschrieben, dass auch bei persistent infizierten Tieren hohe Antikörperlevel festgestellt werden konnten. Diese Ergebnisse stützt die oben beschriebene These einer möglicherweise in den Gelenken persistierenden Infektion. Des Weiteren wird die These gestützt durch die Ergebnisse anderer Autoren, die beschrieben, dass die Bildung humoraler Antikörper die Elimination der Reoviren aus dem Darm und den inneren Organen bewirken, diese aber eine Persistenz des Erregers in den Gelenken und Sehnen nicht verhindern kann (Van der Heide, 1973; Ide und Dewitt, 1979; Jones und Georgiou, 1984; Jones und Kibenge, 1984). Auch Salyi und Glavits (1999) berichteten über durch Tenosynovitis bedingte Bewegungsstörungen als sekundäre Veränderungen beim MAS. Im Vergleich zu den anderen Gruppen stiegen die Antikörper-Titer etwa eine Woche früher an und lagen bis zum Ende des Versuchs deutlich über denen der anderen Gruppen. Roessler und Rosenberger (1989) beschrieben, dass der Beginn der Antikörperbildung und die Titerhöhe auch abhängig von der Pathogenität des Reovirus sind. Anhand dieser Ergebnisse im Pathogenitätstest *in vivo* weist das „nicht-ERS“-Feldisolat 259/03 eine höhere Pathogenität auf als das ERS-Feldisolat 120/03-1, die jedoch bei weitem nicht an die Pathogenität des ERS-Vergleichsstammes 238/98 heranreicht.

In den meisten Veröffentlichungen waren die Untersuchungen auf bestimmte Organe begrenzt. In dem Pathogenitätstest *in vivo* im Rahmen dieser Arbeit wurde eine große Bandbreite an Organen makroskopisch, histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Isolate eine Affinität zu

Diskussion

verschiedenen Organen haben. So wurden bei mit dem Isolat 120/03-1 eine Myo- und Epikarditis beobachtet, immunhistochemisch wurde jedoch Virus-Antigen in den Blinddarmentonsillen, der Milz und der Bursa Fabricii detektiert. Aus Blinddarm und Milz konnte auch Virus reisoliert werden. Die Gruppe 259/03 zeigte Gelenkschwellungen, histopathologisch wurden Epi- und Myokarditiden, Gastritiden und Hämorrhagien in den Bauchspeicheldrüsen beobachtet, während mittels Immunhistochemie und bei der Virusreisolierung aus den Organen keine Befunde erhoben werden konnten.

Es wird deutlich, dass die pathologisch-anatomisch erhobenen Befunde, die histopathologisch erkennbaren Läsionen, die immunhistochemisch erhaltenen Ergebnisse und die aus der Virusreisolierung nur selten übereinstimmen. Histopathologisch erkennbare Befunde gehen nicht automatisch mit der Detektion von Virus in demselben Organ einher. Umgekehrt konnten nicht in allen Organen, in denen Virus detektiert werden konnte, histopathologisch Veränderungen beobachtet werden.

Bei einem Vergleich der immunhistochemischen Untersuchung der Organe und dem Versuch der Virusreisolierung aus diesen zeigt sich, dass in allen Organen sämtlicher Gruppen, aus denen Virus reisoliert werden konnte, bei den immunhistochemischen Untersuchungen auch Virus detektiert werden konnte. Eine Ausnahme bildet hier der hochpathogene ERS-Vergleichsstamm 238/98. Aus allen Organpools der mit ihm infizierten Tiere konnte Virus reisoliert werden, auch aus dem Gehirn, in welchem jedoch immunhistochemisch kein Antigen festgestellt werden konnte. Der Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass die immunhistochemische Untersuchung eine sensitivere Methode zum Nachweis von Reovirus Antigen darstellt als die Virusreisolierung. Zusätzlich kann bei der immunhistochemischen Untersuchung von Gewebeproben herausgefunden werden, welche Zellen von den Reoviren präferiert werden. In diesen Untersuchungen war außerdem hilfreich, dass immunhistochemisch eine Unterscheidung der Organe Zwölffingerdarm und Bauchspeicheldrüse sowie Blinddarm und Blinddarmentonsillen erfolgen konnte.

5.3 Schlussfolgerungen

Die in der vorliegenden Arbeit festgehaltenen Ergebnisse zeigen, dass es mit den zum gegenwärtigen Zeitpunkt zur Verfügung stehenden labordiagnostischen Methoden nicht möglich ist, die Pathogenität von Reoviren ohne Tierversuche eindeutig zu bestimmen. In Übereinstimmung mit anderen Autoren konnte auch in diesen Untersuchungen kein Zusammenhang zwischen Sero-, Elektrophero- und Pathotyp ermittelt werden. Die beiden untersuchten Feldisolate zeigten in Abhängigkeit von der verwendeten Testmethode variierende Ergebnisse bezüglich ihrer Übereinstimmung oder Unterschiedlichkeit zu den beiden Vergleichsstämmen. Eine Differenzierungsmöglichkeit mit morphologischen und serologischen Methoden wird außerdem dadurch in Frage gestellt, dass die beiden sehr unterschiedlichen Vergleichsstämme bei diesen Untersuchungen teilweise sehr ähnliche Charakteristika aufwiesen. Dagegen zeigten der Tierversuch und die sich daran anschließenden histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen deutliche Ergebnisse, die eine eindeutige Unterscheidung sowohl der Vergleichsstämme, als auch der Feldisolate, sowie eine Einstufung der Pathogenität ermöglichten. Auf Infektionsversuche kann nach den Ergebnissen dieser Arbeit für die Einschätzung der Pathogenität eines Isolates bisher nicht verzichtet werden. Aus den Untersuchungen wird deutlich, dass mit keiner der angewandten Untersuchungsmethoden ein einheitlicher, das MAS-Geschehen dominierender Subtyp von Reoviren differenziert werden konnte. Die beiden Feldisolate könnten, unabhängig von den labordiagnostischen Ergebnissen, als gering- und mäßigpathogen eingestuft werden. Das im Infektionsversuch in unterschiedlichem aber geringem Maße reproduzierte Auseinanderwachsen der Tiere und das Fehlen aller sonstigen klinischen Erscheinungen spricht gegen ein monokausales, durch bestimmte Reoviren verursachtes MAS-Geschehen. Vielmehr ist anzunehmen, dass das in Deutschland bei Broilern diagnostizierte Krankheitsbild durch mehrere Faktoren und das Zusammenspiel unterschiedlicher Erreger beeinflusst wird. Reoviren spielen, da sie immer wieder nachgewiesen werden, eine nicht zu unterschätzende Rolle, sind aber mit hoher Wahrscheinlichkeit nur ein Faktor, der das Krankheitsbild beeinflusst, dieses aber allein nicht hervorruft.

6 Zusammenfassung

Reovirusinfektion bei Broilern: Charakterisierung und *in vivo* Bestimmung der Pathogenität neuer Isolate aus Masthähnchenbeständen mit Malabsorptions-Syndrom

Seit Ende 2002 wurde in Deutschland bei Mastküken aus verschiedenen Herden ab dem sechsten Lebenstag ein Krankheitsgeschehen beobachtet, das durch Durchfall und anschließende Wachstumsdepression gekennzeichnet ist. Der Krankheitskomplex wird in der Literatur als Malabsorptionssyndrom (MAS) bezeichnet. Da eine antimikrobielle Therapie keinen Erfolg brachte, wurde eine virale Ätiologie vermutet.

Aus 17 Broiler-Beständen mit aktueller MAS-Problematik wurden aus 56 von 68 Organproben Reoviren isoliert und mittels Indirektem Immunfluoreszenztest sowie elektronenmikroskopisch identifiziert. In neun ausgewählten Proben, aus denen später ausschließlich Reoviren isoliert werden konnten, wurden in der elektronenmikroskopischen Untersuchung 4x Rotaviren, 1x Reoviren, 1x Rota- und Reoviren, 1x Calici- sowie einzelne Rota- und Reoviren und 1x Paramyxovirus-ähnliche Partikel nachgewiesen. In einer untersuchten Probe konnte kein Virus gefunden werden. 24 Reovirus-Isolate wurden mit monoklonalen Antikörpern (mAk) untersucht, die eine Einteilung der Isolate in enteric reovirus strains (ERS) und Reoviren („nicht-ERS“) erlauben. 16 Isolate erwiesen sich als ERS.

Eine weitere Differenzierung ausgewählter Isolate wurde mittels der vergleichenden Morphologie der cpE sowie der Plaquerößen, mit Plaquereduktions-Testen und mit der RNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Die Ergebnisse, die mit diesen morphologischen, serologischen und molekularbiologischen Methoden erzielt wurden, haben keine einheitliche Einteilung der MAS Isolate in pathogen bzw. nicht pathogen zugelassen.

Zur Bestimmung der Pathogenität ausgewählter Isolate *in vivo* wurden einen Tag alte SPF-Broiler oral infiziert. Alle Küken der Gruppe, die mit dem ERS-Vergleichsstamm aus Polen 238/98 infiziert worden waren, verstarben innerhalb von sechs Tagen p.i. Das beschriebene Krankheitsbild konnte vollständig reproduziert werden, während dies mit dem ERS-Feldisolat 120/03-1 aus Deutschland und dem Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 nicht möglich war. Das „nicht-ERS“-Feldisolat 259/03 aus Deutschland führte zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichts der Tiere und zu klinischen Erscheinungen, die jedoch nicht mit denen der ursprünglichen Herdenproblematik übereinstimmten. Der Rückgang der Virusausscheidung anhand der Ergebnisse der Virusreisolierung aus Kloakentupfern korrelierte innerhalb der Gruppen entsprechend mit dem Einsetzen bzw. dem Anstieg der AK-Bildung. Bei den histopathologischen Untersuchungen wurden in der Gruppe

Zusammenfassung

238/98 v.a. Nekrosen in Leber, Milz und Bursa gefunden, während in den Gruppen S1133, 120/03-1, 120/03-1 (AM) und 259/03 primär Myo- und Epikarditiden konstatiert wurden. Bei der Gruppe 259/03 wurden zusätzlich Gastritiden beobachtet. Mittels Immunhistochemie konnten vor allem in Milz, Bursa Fabricii sowie Blinddarm und Blinddarmtonsillen Virus Antigen nachgewiesen werden. Aus am Ende des Versuchs entnommenen Organprobenpools der mit dem deutschen ERS-Feldisolat 120/03-1, dessen Ausgangsmaterial 120/03-1 (AM) sowie dem Reovirus-Prototyp-Stamm S1133 infizierten Tiere wurde sporadisch Virus aus Blinddarm und Blinddarmtonsillen sowie der Milz reisoliert. Bei den mit dem „nicht-ERS“-Feldisolat 259/03 infizierten Tieren wurde aus den untersuchten Organen weder Virus reisoliert noch Antigen nachgewiesen. Aus jedem Organpool der Tiere, die mit dem ERS-Vergleichsstamm aus Polen 238/98 infiziert worden waren und bis zum sechsten Tag p.i. starben, konnte Virus reisoliert und in den Organen exklusive des Gehirns Reovirus Antigen detektiert werden.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass es mit den verwendeten labordiagnostischen Methoden nicht möglich war, die Pathogenität von Reoviren ohne Tierversuche eindeutig zu bestimmen. Es konnte in diesen Untersuchungen kein Zusammenhang zwischen Sero-Elektrophero- und Pathotyp ermittelt werden. Die Heterogenität der untersuchten Isolate spricht gegen ein monokausales, durch bestimmte Reoviren verursachtes MAS-Geschehen, darüber hinaus sind nicht alle ERS-Isolate als pathogen zu betrachten. Aus den Untersuchungen wird deutlich, dass mit keiner der angewandten Untersuchungsmethoden ein gemeinsames Merkmal aller MAS verursachenden Isolate gefunden werden kann.

Der verfügbaren Literatur zufolge ist dies die erste Arbeit, in der eine experimentelle Infektion mit SPF-Broilern durchgeführt wurde.

7 Summary

Reovirusinfection in broiler: Characterization and *in vivo* determination of the pathogenicity of new isolates from broiler flocks with malabsorption syndrome

Since the end of 2002 the incidence of a syndrome characterized by diarrhoea and subsequent stunting in broilers starting at six days of age has increased drastically in Germany. In the literature this disease complex is called malabsorption syndrome (MAS). A viral aetiology has been suspected because antimicrobial therapy was not successful.

In the present study 68 samples of different organs from 17 broiler flocks with MAS history were investigated virologically. In 56 out of 68 samples reoviruses were isolated and identified by IIFT and electron microscopy. 9 selected samples of the original material, from which only reoviruses had been isolated, were also examined by electron microscopy. Following results were obtained: 4x rotavirus, 1x reovirus, 1x rota- and reovirus, 1x calicivirus with some rota- and reovirus particles and 1x paramyxovirus-like particles. In one sample no any viruses were found. 24 reovirus isolates were selected and classified as enteric reovirus strains (ERS) or reovirus ("non-ERS") using monoclonal antibodies. 16 isolates were found to be to ERS.

For further characterization of selected isolates, morphology of cytopathic effect, size of plaques, results of plaquereduction tests and polyacrylamid gel electrophoresis of extracted RNA were compared. The obtained results did not allow a classification of the reovirus isolates in pathogenic and non-pathogenic.

The pathogenicity *in vivo* of selected isolates was investigated in orally infected one day old SPF-broiler chickens. All birds of the group, which were infected with the ERS-prototype 238/98 (polish strain) died within six days p.i. and the described disease pattern was reproduced. This was not possible with the German ERS-field isolate 120/03-1 as well as the reovirus-prototype-strain S1133. The German "non-ERS"-isolate 259/03 caused a significant reduction of body weight and clinical signs which did not correspond to those in the original flock. The examination of cloacal swabs for virus shedding at different ages showed that a shedding reduction correlated with the increase of antibody level. Histopathological examinations showed in group 238/98 mainly necrosis in liver, spleen and Bursa of Fabricius while in groups S1133, 120/03-1, 120/03-1 (original material, AM) and 259/03 primarily myo- and epicarditis were seen. In addition in group 259/03 gastritis were observed. By immunohistochemistry at the end of the experiment virus antigen could be detected mainly in spleen, Bursa of Fabricius and caecum with caecal tonsils. In samples of organs from birds infected with the German ERS-field isolate 120/03-1, its original material 120/03-1 (AM) as

Summary

well as the reovirus-prototype-strain S1133 sporadically virus could be reisolated from caecum with caecal tonsils and spleen. In birds infected with the German “non-ERS”-isolate 259/03 neither virus could be reisolated nor virus antigen could be detected in any organ at the end of the experiment. From birds infected with the ERS-prototype 238/98 which died before or on day six p.i. virus could be reisolated from all organs and virus antigen could be detected in all organs except the brain.

The results show that it was impossible to determine the pathogenicity of reovirus using *in vitro* methods used in this study without experimental infection *in vivo*. No correlation between sero-, elektrophero-and pathotype could be found in this study. The heterogeneity of the examined isolates makes it unlikely that MAS is a disease caused only by reoviruses. Furthermore it was shown that not all ERS isolates are pathogenic. The *in vitro* methods used in this study did not allow to identify a common marker of reoviruses causing MAS.

According to available literature this is the first report on experimental infection with reovirus in SPF-broilers.

8 Literatur

8.1 Webseiten

<http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/RNA-HO.htm>

http://www.pei.de/cln_048/nn_161774/DE/arsneimittel/vet-mittel/gefluegel/gefluegel-node.html?__nnn=true

8.2 Rechtsvorschriften

Geflügelfleischhygienegesetz (GFIHG) vom 17.07.1996 (BGB1. I, S. 991), zuletzt geändert am 13.05.2004 (BGB1. I, S. 934)

Geflügelfleischhygiene-Verordnung (GFIHVO) vom 03.12.1997 (BGB1. I, S. 2786), in der Fassung vom 21.12.2001 (BGB1. I, S. 4098)

Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts vom 01.09.2005 (BGB1. I, S. 2618)

Richtlinie 71/118/EWG des Rates vom 15.02.1971 zur Regelung gesundheitlicher Fragen bei der Gewinnung und dem Inverkehrbringen von frischem Geflügelfleisch (Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L55/23)

Richtlinie 92/116/EWG des Rates vom 17.12.1992 zur Änderung und Aktualisierung der Richtlinie 71/118/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim Handelsverkehr mit frischem Geflügelfleisch (Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L62/1)

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29.04.2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs (Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L226/22)

Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29.04.2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs (Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L226/83)

8.3 Publikationen

Adair, B. M., Burns, K. und McKillop, E. R. (1987): Serological studies with reoviruses in chickens, turkeys and ducks. *J Comp Pathol*, 97: 495-501

Ahne, W., Dorn, P., Hoffmann, R., Weesling, E. und Wiedemann, H. (1974): Zur Charakterisierung des Erregers der sogenannten Einschlusskörperchenhepatitis beim Huhn. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 81: 299-302

Al Afaleq, A. I. und Jones, R. C. (1990): Localisation of avian reovirus in the hock joints of chicks after entry through broken skin. *Res Vet Sci*, 48: 381-382

Literatur

- Alfieri, A. F., Alfieri, A. A., Resende, M. und de Resende, J. S. (1989): Detection and propagation of avian reovirus in chickens. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica*, 41: 493-501
- Bagust, T. J. und Westbury, H. A. (1975): Letter: Isolation of reoviruses associated with diseases of chickens in Victoria. *Aust Vet J*, 51: 406-407
- Bains, B. S., MacKenzie, M. und Spradbrow, P. B. (1974): Reovirus-associated mortality in broiler chickens. *Avian Dis*, 18: 472-476
- Bar-Shira, E., Sklan, D. und Friedman, A. (2003): Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Dev Comp Immunol*, 27: 147-157
- Barta, V., Springer, W. T. und Millar, D. L. (1984): A comparison of avian and mammalian cell cultures for the propagation of avian reovirus WVU 2937. *Avian Dis*, 28: 216-223
- Barton, E. S., Forrest, J. C., Connolly, J. L., Chappell, J. D., Liu, Y., Schnell, F. J., Nusrat, A., Parkos, C. A. und Dermody, T. S. (2001): Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*, 104: 441-451
- Bayyari, G. R., Huff, W. E., Rath, N. C., Balog, J. M., Newberry, L. A., Villines, J. D., Skeeles, J. K., Anthony, N. B. und Nestor, K. E. (1997): Effect of the genetic selection of turkeys for increased body weight and egg production on immune and physiological responses. *Poult Sci*, 76: 289-296
- Benavente, J. und Martinez-Costas, J. (2007): Avian reovirus: Structure and biology. *Virus Res*, 123: 105-119
- Bergmann, V. (2001): Infektiöses Kümmerwuchs-Syndrom. In: *Praxis der Geflügelfleischuntersuchung*. 1st edition. Fries, R., Bergmann, V., Fehlhaber, K. Hannover, Schlütersche: 98-99
- Bodelon, G., Labrada, L., Martinez-Costas, J. und Benavente, J. (2001): The avian reovirus genome segment S1 is a functionally tricistronic gene that expresses one structural and two nonstructural proteins in infected cells. *Virology*, 290: 181-191
- Bodelon, G., Labrada, L., Martinez-Costas, J. und Benavente, J. (2002): Modification of late membrane permeability in avian reovirus-infected cells: viroporin activity of the S1-encoded nonstructural p10 protein. *J Biol Chem*, 277: 17789-17796
- Bracewell, C. D. und Wyeth, P. (1981): Infectious stunting of chickens. *Vet Rec*, 109: 64
- Bracewell, C. D. und Randall, C. J. (1984): The infectious stunting syndrome. *Worlds Poultry Science*, 38: 31-37
- Bruhn, S., Bruckner, L. und Ottiger, H. P. (2005): Application of RT-PCR for the detection of avian reovirus contamination in avian viral vaccines. *J Virol Methods*, 123: 179-186
- Carboni, A., Cervio, G., Cessi, D., Lodetti, E., Lodrini, E., Mandelli, G. und Valeri, A. (1975): Studies on viral arthritis (tenosynovitis) in Italy. *Avian Pathol*, 4: 87-95
- Carrasco, L. (1994): Entry of animal viruses and macromolecules into cells. *FEBS Lett*, 350: 151-154

Literatur

- Chiu, C. J. und Lee, L. H. (1997): Cloning and nucleotide sequencing of the S4 genome segment of avian reovirus S1133. *Arch Virol*, 142: 2515-2520
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162: 156-159
- Clark, F. D., Ni, Y., Collisson, E. W. und Kemp, M. C. (1990): Characterization of avian reovirus strain-specific polymorphisms. *Avian Dis*, 34: 304-314
- Committee on the echo viruses (1955). *Science*, 122: 1187
- Cortez-San Martin, M., Martinez-Costas, J. und Benavente, J. (2005): Avian orthoreovirus strain S1133 segment L3 guanylyltransferase gene, complete cds. Online Submission AccessionNr. DQ300175 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=83284016>)
- Csontos, L. und Miklovich-Kis, C. (1967): Etiological studies on gosling influenza. II. Experimental infections with the isolated virus. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 17: 115-120
- Dalton, P. J. und Henry, R. (1967): Tenosynovitis in poultry. *Vet Rec*, 80: 638
- Decaesstecker, M., Charlier, G. und Meulemans, G. (1986): Significance of parvoviruses, entero-like viruses and reoviruses in the aetiology of the chicken malabsorption syndrome. *Avian Pathol*, 15: 769-782
- Deshmukh, D. R. und Pomeroy, B. S. (1969a): Avian reoviruses I. Isolation and serological characterization. *Avian Dis*, 13: 239-243
- Deshmukh, D. R. und Pomeroy, B. S. (1969b): Avian reoviruses II. Physicochemical characterization and classification. *Avian Dis*, 13: 243-251
- Deshmukh, D. R. und Pomeroy, B. S. (1969c): Avian reoviruses III. Infectivity and egg transmission. *Avian Dis*, 13: 427-439
- Dobson, K. N. und Glisson, J. R. (1992): Economic impact of a documented case of reovirus infection in broiler breeders. *Avian Dis*, 36: 788-791
- Duncan, R., Chen, Z., Walsh, S. und Wu, S. (1996): Avian reovirus-induced syncytium formation is independent of infectious progeny virus production and enhances the rate, but is not essential, for virus-induced cytopathology and virus egress. *Virology*, 224: 453-464
- Duncan, R. und Sullivan, K. (1998): Characterization of two avian reoviruses that exhibit strain-specific quantitative differences in their syncytium-inducing and pathogenic capabilities. *Virology*, 250: 263-272
- Duncan, R., Corcoran, J., Shou, J. und Stoltz, D. (2004): Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species. *Virology*, 319: 131-140
- Dutta, S. K. und Pomeroy, B. S. (1967a): Isolation and characterization of an enterovirus from baby chicks having an enteric infection I. Isolation and pathogenicity. *Avian Dis*, 11: 1-9

Literatur

- Dutta, S. K. und Pomeroy, B. S. (1967b): Isolation and characterization of an enterovirus from baby chicks having an enteric infection II. Physical and chemical characteristics and ultrastructure. *Avian Dis*, 11: 9-15
- Endo-Munoz, L. B. (1990): A western blot to detect antibody to avian reovirus. *Avian Pathol*, 19: 477-487
- Fahey, J. E. und Crawley, J. F. (1954): Studies on chronic respiratory disease of chickens. II. Isolation of a virus. *Can J comp Med*, 18: 13-21
- Farmer, H. (1985): Stunting syndrome of broilers. *Vet Rec*, 117: 154
- Farmer, H. (1986): Research progress on infectious stunting syndrome. *Poultry International*, September: 12-13
- Frazier, J. A. und Reece, R. L. (1990): Infectious stunting syndrome of chickens in Great Britain: Intestinal ultrastructural pathology. *Avian Pathol*, 19: 759-777
- Gershowitz, A. und Wooley, R. E. (1973): Characterization of two reoviruses isolated from turkeys with infectious enteritis. *Avian Dis*, 17: 406-414
- Glass, S. E., Naqui, S. A., Hall, C. F. und Kerr, K. M. (1973): Isolation and characterization of a virus associated with arthritis of chickens. *Avian Dis*, 17: 415-424
- Glavits, R., Molnar, E., Ratz, F., Saghy, E., Fehervari, T. und Meder, M. (1984): Pathological studies in chicken embryos and day-old chicks experimentally infected with avian reovirus. *Acta Vet Hung*. 32: 23-37
- Goodwin, M. A., Davis, J. F., McNulty, M. S., Brown, J. und Player, E. C. (1993): Enteritis (so-called runting stunting syndrome) in Georgia broiler chicks. *Avian Dis*, 37: 451-458
- Gouvea, V. S. und Schnitzer, T. J. (1982a): Polymorphism of the genomic RNAs among the avian reoviruses. *J Gen Virol*, 61: 87-91
- Gouvea, V. S. und Schnitzer, T. J. (1982b): Polymorphism of the migration of double-stranded RNA genome segments of avian reoviruses. *J Virol*, 43: 465-471
- Grande, A. und Benavente, J. (2000): Optimal conditions for the growth, purification and storage of the avian reovirus S1133. *J Virol Methods*, 85: 43-54
- Guneratne, J. R. M., Jones, R. C. und Georgiou, K. (1982): Some observations on the isolation and cultivation of avian reoviruses. *Avian Pathol*, 11: 453-462
- Heffels, U. (1980): Serologische Untersuchungen zur Verbreitung der Herpes-, Adeno-, Reo-, Newcastle-, Influenza A- und Rubellavirusinfektion bei Tauben in der Bundesrepublik Deutschland. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Heffels-Redmann, U., Kaleta, E. F. und Hermanns, W. (1992): Reovirusinfektionen. In: *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels*. 1st edition. Heider, G., Monreal, G., Mészáros, J. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag Jena. 1: 525-551
- Heggen-Peay, C. L., Cheema, M. A., Ali, R. A., Schat, K. A. und Qureshi, M. A. (2002): Interactions of poult enteritis and mortality syndrome-associated reovirus with various cell types in vitro. *Poult Sci*. 81: 1661-1667

Literatur

- Hein, R. G., Slacum, G., Lynch, P. und Van de Zande, S. (2003): Novel characteristics of recent isolated avian reoviruses in the USA. In: Proc. of XIII International Congress of the World Veterinary Poultry Association. Denver: 73
- Herbst, W. (1983): Zum Nachweis biologischer und serologischer Eigenschaften aviärer Reoviren aus Broilern. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Hieronimus, D. R., Villegas, P. und Kleven, S. H. (1983): Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malabsorption syndrome. *Avian Dis*, 27: 246-254
- Hrdy, D. B., Rosen, L. und Fields, B. N. (1979): Polymorphism of the migration of double-stranded RNA genome segments of reovirus isolates from humans, cattle, and mice. *J Virol*, 31: 104-111
- Huppert, K. (1996): Untersuchungen zur Geno-, Patho- und Serotypisierung von Reovirusisolaten aus Pute, Flugente und Taube. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Huther, S. (1996): Identifizierung und Charakterisierung von Reoviren aus verschiedenen Ziervogelarten. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Ide, P. R. und Dewitt, W. (1979): Serological incidence of avian reovirus infection in broiler-breeders and progeny in Nova Scotia. *Can Vet J*, 20: 348-353
- Ide, P. R. (1982): Avian reovirus antibody assay by indirect immunofluorescence using plastic microculture plates. *Can J Comp Med*, 46: 39-42
- Islam, M. R. und Jones, R. C. (1988): An enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody titre against avian reovirus using a single dilution of serum. *Avian Pathol*, 17: 411-425
- Jones, R. C. und Onunkwo, O. (1978): Studies on experimental tenosynovitis in light hybrid chickens. *Avian Pathol*, 7: 171-181
- Jones, R. C. und Georgiou, K. (1984): Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The influence of age at infection. *Avian Pathol*, 13: 441-457
- Jones, R. C. und Guneratne, J. R. M. (1984): The pathogenicity of some avian reoviruses with particular reference to tenosynovitis. *Avian Pathol*, 13: 173-189
- Jones, R. C. und Kibenge, F. S. B. (1984): Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The effect of breed. *Avian Pathol*, 13: 511-528
- Jones, R. C. und Nwajei, B. N. (1985): Reovirus-induced tenosynovitis: persistence of homologous challenge virus in broiler chicks after vaccination of parents. *Res Vet Sci*, 39: 39-41
- Jones, R. C., Islam, M. R. und Kelly, D. F. (1989): Early pathogenesis of experimental reovirus infection in chickens. *Avian Pathol*, 18: 239-253
- Jones, R. C. (2000): Avian reovirus infections. *Rev Sci Tech*, 19: 614-625

Literatur

- Jones, R. C. (2003): Other reovirus infections. In: Diseases of poultry. 11th. Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., Swayne, D. E. Ames, Iowa State Press: 293-298
- Julian, R. J. (1998): Rapid growth problems: ascites and skeletal deformities in broilers. *Poult Sci*, 77: 1773-1780
- Kant, A., Balk, F., Born, L., van Roozelaar, D., Heijmans, J., Gielkens, A. und ter Huurne, A. (2003): Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the sigma C protein. *Vet Res*, 34: 203-212
- Kawamura, H., Shimizu, F., Maeda, M. und Tsubahara, H. (1965): Avian reoviruses: Its properties and serological classification. *National Institute of Animal Health Quart.*, 5: 115-124
- Kawamura, H. und Tsubahara, H. (1966): Common antigenicity of avian reoviruses. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, 6: 187-193
- Kerr, K. M. und Olson, N. O. (1964): Control of infectious synovitis: the effect of age of chickens on the susceptibility to three agents. *Avian Dis*, 8: 256-263
- Kerr, K. M. und Olson, N. O. (1969): Pathology of chickens experimentally inoculated or contact-infected with an arthritis-producing virus. *Avian Dis*, 13: 729-745
- Kibenge, F. S. B., Robertson, M. D., Wilcox, G. E. und Pass, D. A. (1982): Bacterial and viral agents associated with tenosynovitis in broiler breeders in Western Australia. *Avian Pathol*, 11: 351-359
- Kibenge, F. S. B., Gwaze, G. E., Jones, R. C., Chapman, A. F. und Savage, C. E. (1985): Experimental reovirus infection in chickens: observations on early viraemia and virus distribution in bone marrow, liver and enteric tissues. *Avian Pathol*, 14: 87-98
- Kisary, J., Nagy, B. und Bitay, Z. (1984): Presence of parvoviruses in the intestine of chickens showing stunting syndrome. *Avian Pathol*, 13: 339-343
- Koide, F., Suzuka, I. und Sekiguchi, K. (1968): Some properties of an adenine-rich polynucleotide fragment from avian reovirus. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 30: 95-99
- Koide, F. (1970): Molecular biology of avian reovirus. *National Institute of Animal Health Quart.*, 10: 83-96
- Kouwenhoven, B., Davelaar, F. G. und Van Walsum, J. (1978a): Infectious proventriculitis causing runting in broilers. *Avian Pathol*, 7: 183-187
- Kouwenhoven, B., Vertommen, M. H. und Van Eck, J. H. H. (1978b): Runting and leg weakness in broilers: involvement of infectious factors. *Vet Sci Commun*, 2: 253-259
- Kouwenhoven, B. (1996): Malabsorption syndrome in broilers. *World Poultry-Misset*, 12: 69-71
- Kouwenhoven, B., Vertommen, M., Goren, E. (1988): Investigations into the role of reovirus in the malabsorption syndrome. *Avian Pathol*, 17: 879-892

Literatur

- Krasselt, M. und Voute, E. J. (1969): Synovitis in broiler parent chickens. Tijdschr. Diergeneeskd., 94: 601-607
- Krauss, H. und Ueberschär, S. (1966): Zur Struktur eines neuen Geflügel-orphan-virus. Zbl Vet Med B, 13: 239-249
- Krauss, H. (1967): Aviäre REO-Viren. Berl Münch Tierärztl Wochenschr, 80: 458-461
- Krauss, H. (1968): Inapparente Virusinfektionen beim Geflügel und ihre Bedeutung unter Berücksichtigung eines erstmals isolierten Agens. Zbl Vet Med B, 15: 317-352
- Labrada, L., Bodelon, G., Vinuela, J. und Benavente, J. (2002): Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. J Virol, 76: 7932-7941
- Lee, L. F., Nazerian, K. und Burmester, B. R. (1973): Characterization of avian reovirus 24. Avian Dis, 17: 559-567
- Lee, L. H., Shien, J. H. und Shieh, H. K. (1998): Detection of avian reovirus RNA and comparison of a portion of genome segment S3 by polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. Res Vet Sci, 65: 11-15
- Li, L., Giambrone, J. J., Panangala, V. S. und Hoerr, F. J. (1996): Production and characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus strain S1133. Avian Dis, 40: 349-357
- Li, Z., Nestor, K. E., Saif, Y. M. und Luhtala, M. (2000): Flow cytometric analysis of T lymphocyte subpopulations in large-bodied turkey lines and a randombred control population. Poult Sci, 79: 219-223
- Liu, H. J., Giambrone, J. J. und Nielsen, B. L. (1997): Molecular characterization of avian reoviruses using nested PCR and nucleotide sequence analysis. J Virol Methods, 65: 159-167
- Liu, H. J. und Giambrone, J. J. (1997a): Amplification, cloning and sequencing of the sigmaC-encoded gene of avian reovirus. J Virol Methods, 63: 203-208
- Liu, H. J. und Giambrone, J. J. (1997b): Characterization of a nonradioactive cloned cDNA probe for detecting avian reoviruses. Avian Dis, 41: 374-378
- Liu, H. J. und Giambrone, J. J. (1997c): In situ detection of reovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues using a digoxigenin-labeled cDNA probe. Avian Dis, 41: 447-451
- Liu, H. J., Chen, J. H., Liao, M. H., Lin, M. Y. und Chang, G. N. (1999): Identification of the sigma C-encoded gene of avian reovirus by nested PCR and restriction endonuclease analysis. J Virol Methods, 81: 83-90
- Liu, H. J. und Huang, P. H. (2001): Sequence and phylogenetic analysis of the sigmaA-encoding gene of avian reovirus. J Virol Methods, 98: 99-107
- Liu, H. J., Lee, L. H. und Chiou, Y. F. (2004a): Cloning, sequencing and phylogenetic analysis of avian reovirus L3 gene. Online Submission AccessionNr. A4652693 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=55846588>)

Literatur

- Liu, H. J., Lee, L. H., Shih, W. L., Li, Y. J. und Su, H. Y. (2004b): Rapid characterization of avian reoviruses using phylogenetic analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Avian Pathol*, 33: 171-180
- Lozano, L. F., Hammami, S., Castro, A. E. und Osburn, B. (1992): Comparison of electron microscopy and polyacrylamide gel electrophoresis in the diagnosis of avian reovirus and rotavirus infections. *Avian Dis*, 36: 183-188
- Lupiani, B., Subramanian, K. und Samal, S. K. (1995): Aquareoviruses. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, 5: 175-208
- Malkinson, M., Perk, K. und Weisman, J. (1981): Reovirus infection in young Muscovy ducks. *Avian Pathol*, 10: 433-440
- Mandelli, G., Valeri, A., Rinaldi, A. und Lodetti, E. (1971): Reperti istologici ed ultramicroscopici di una malattia virale delle giovani oche. *Folia Vet Lat*, 1: 121-170
- Martinez-Costas, J., Varela, R. und Benavente, J. (1995): Endogenous enzymatic activities of the avian reovirus S1133: identification of the viral capping enzyme. *Virology*, 206: 1017-1026
- Martinez-Costas, J., Grande, A., Varela, R., Garcia-Martinez, C. und Benavente, J. (1997): Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J Virol*, 71: 59-64
- Martland, M. F. und Farmer, H. (1986): Pancreatic duct obstruction in a stunting syndrome of broiler chickens. *Vet Rec*, 118: 531-534
- Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B. und Wittmann, G. (1974): *Virologische Arbeitsmethoden 1 und 2*. Jena, Gustav Fischer Verlag Jena
- Mazurkiewicz, M., Madej, J. A., Sobiech, K. A. und Giebel, O. (1993): Further studies on the etiopathology of malabsorption syndrome in broiler chickens. *Arch Vet Pol*, 33: 177-188
- McFerran, J. B., Connor, T. J. und McCracken, R. M. (1976): Isolation of adenoviruses and reoviruses from avian species other than domestic fowl. *Avian Dis*, 20: 519-524
- McNulty, M. S., Allan, G. M., Connor, T. J., McFerran, J. B. und McCracken, R. M. (1984): An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. *Avian Pathol*, 13: 429-439
- McNulty, M. S. (2003): Rotavirus infections. In: *Diseases of poultry*. 11th. Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., Swayne, D. E. Ames, Iowa State Press: 308 - 320
- Meanger, J., Wickramasinghe, R., Enriquez, C. E., Robertson, M. D. und Wilcox, G. E. (1995): Type-specific antigenicity of avian reoviruses. *Avian Pathol*, 24: 121-134
- Meanger, J., Wickramasinghe, R., Enriquez, C. E. und Wilcox, G. E. (1999): Tissue tropism of avian reoviruses is genetically determined. *Vet Res*, 30: 523-529
- Menendez, N. A., Calnek, B. W. und Cowen, B. S. (1975a): Experimental egg-transmission of avian reovirus. *Avian Dis*, 19: 104-111

Literatur

- Menendez, N. A., Calnek, B. W. und Cowen, B. S. (1975b): Localization of avian reovirus (FDO isolant) in tissues of mature chickens. *Avian Dis*, 19: 112-117
- Mertens, P. (2004): The dsRNA viruses. *Virus Res*, 101: 3-13
- Miltenburg, J. T., Kouwenhoven, B. und Vertommen, M. (1981): Infectious stunting of chickens. *Vet Rec*, 109: 477
- Minta, Z., Tomczyk, G., Domanska, K. und Kozaczynski, W. (2001): Pathogenicity of new reoviruses isolated from broiler chickens in Poland. Proceedings of the XIIth International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Cairo, Egypt: 188
- Monreal, G. (1992): Malabsorptionssyndrom. In: Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. 1st edition. Heider, G., Monreal, G., Mészáros, J. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag Jena. 2: 695-701
- Montgomery, R. D., Villegas, P. und Kleven, S. H. (1986): Role of route of exposure, age, sex, and type of chicken on the pathogenicity of avian reovirus strain 81-176. *Avian Dis*, 30: 460-467
- Montgomery, R. D., Boyle, C. R., Maslin, W. R. und Magee, D. L. (1997): Attempts to reproduce a runting/stunting-type syndrome using infectious agents isolated from affected Mississippi broilers. *Avian Dis*, 41: 80-92
- Murgia, M. V., Battilani, M., Cecchinato, M., Catelli, E., Crudi, M., Vinco, L. J., Cerioli, M., Tosi, G. und Lavazza, A. (2004): Preliminary data on the molecular characterization of rotavirus detected in diarrhoeic turkey poults in Italy. Proceedings of the 5th International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, Germany, DVG-Service GmbH Verlag Giessen: 211-219
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P., Horzinek, M. C. und Studdert, M. J. (1999): Reoviridae. *Veterinary Virology*. San Diego, Academic Press: 391-404
- Mustaffa-Babjee, A., Spradbrow, P. B. und Omar, A. R. (1973): Characterization of an avian reovirus isolated in Queensland. *J Comp Pathol*, 83: 387-400
- Nersessian, B. N., Lukert, P. D. und Goodwin, M. A. (1989): Antigenic comparisons of selected avian reoviruses by use of the plaque-reduction neutralization assay. *Am J Vet Res*, 50: 1475-1480
- Ni, Y. und Kemp, M. C. (1990): Selection of genome segments following coinfection of chicken fibroblasts with avian reoviruses. *Virology*, 177: 625-633
- Ni, Y. und Kemp, M. (1992): Strain-specific selection of genome segments in avian reovirus coinfections. *J Gen Virol*, 73: 3107-3113
- Ni, Y. und Kemp, M. C. (1995): A comparative study of avian reovirus pathogenicity: virus spread and replication and induction of lesions. *Avian Dis*, 39: 554-566
- Ni, Y., Kemp, M. C. und Ramig, R. F. (1996): Genetic determinants of avian reovirus pathogenesis. Proceedings of the International Symposium on adenovirus and reovirus infections of poultry, Rauschholzhausen, Germany: 143-157

Literatur

- Nibert, M. L. und Schiff, L. A. (2001): Reoviruses and their replication. In: Fields Virology. 4th edition. Knipe, D. M., Howley, P. M. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkens. 2: 1679-1728
- Nick, H., Cursiefen, D. und Becht, H. (1975): Structural and growth characteristics of two avian reoviruses. Arch Virol, 48: 261-269
- Nwajei, B. N. C., Al Afaleq, A. und Jones, R. C. (1988): Comparison of chick embryo liver and vero cell cultures for the isolation and growth of avian reoviruses. Avian Pathol, 17: 759-766
- Olson, N. O., Shelton, D. C. und Munro, D. A. (1957): Infectious synovitis control by medication; effect of strain differences and pleuropneumonia-like organisms. Am J Vet Res, 18: 735-739
- Olson, N. O. (1959): Transmissible synovitis of poultry laboratory investigation. Avian Dis, 8: 1384-1393
- Olson, N. O. und Kerr, K. M. (1966): Some characteristics of an avian arthritis viral agent. Avian Dis, 10: 470-476
- Olson, N. O. und Solomon, D. P. (1968): A natural outbreak of synovitis caused by the viral arthritis agent. Avian Dis, 12: 311-316
- Olson, N. O. und Weiss, R. (1972): Similarity between arthritis virus and Fahey-Crawley virus. Avian Dis, 16: 535-540
- Otto, P., Elschner, M., Reetz, J. und Löhren, U. (2004): Vorkommen von Rotaviren in Masthühnerbeständen. In: Bundesgesundheitsblatt A 49265 47/2: 154
- Otto, P., Liebler-Tenorio, E. M., Elschner, M., Reetz, J., Löhren, U. und Diller, R. (2006): Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). Avian Dis, 50: 411-418
- Page, R. K., Fletcher, O. J., Rowland, G. N., Gaudry, D. und Villegas, P. (1982): Malabsorption syndrome in broiler chickens. Avian Dis, 26: 618-624
- Pass, D. A., Robertson, M. D. und Wilcox, G. E. (1982): Runting syndrome in broiler chickens in Australia. Vet Rec, 110: 386-387
- Petek, M. (1967a): Studi sul reovirus di Crawley. Atti Soc. Ital. Sci. Vet., 21: 888-891
- Petek, M., Felluga, B., Borghi, G. und Baroni, A. (1967b): The Crawley agent: an avian reovirus. Arch Gesamte Virusforsch, 21: 413-424
- Prusas, C. und Hafez, H. M. (2002): Mixed infection of meat turkeys with turkey adenovirus and reovirus. Proceedings of the 4th International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, Germany, Verlag der DVG Service GmbH, Giessen: 220-228
- Qureshi, M. A. und Havenstein, G. B. (1994): A comparison of the immune performance of a 1991 commercial broiler with a 1957 randombred strain when fed "typical" 1957 and 1991 broiler diets. Poult Sci, 73: 1805-1812

Literatur

- Ramos-Alvarez, M. und Sabin, A. B. (1954): Characteristics of poliomyelitis and other enteric viruses recovered in tissue culture from healthy American children. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 87: 655-661
- Ramos-Alvarez, M. (1957): Cytopathogenic enteric viruses associated with undifferentiated diarrheal syndromes in early childhood. Ann. NY Acad. Sci., 67: 326-331
- Randall, C. J., Wyeth, P. J. und Higgins, R. J. (1981): Pancreatic lesions in stunted broilers. Vet Rec, 109: 125-126
- Reece, R. L., Hooper, P. T., Tate, S. H., Beddome, V. D., Forsyth, W. M., Scott, P. C. und Barr, D. A. (1984): Field, clinical and pathological observations of a runting and stunting syndrome in broilers. Vet Rec, 115: 483-485
- Reece, R. L. und Frazier, J. A. (1990): Infectious stunting syndrome of chickens in Great Britain: Field and experimental studies. Avian Pathol, 19: 723-758
- Reece, R. L. und Frazier, J. A. (1991): Infectious stunting syndrome breakthrough. Poultry International, 30: 16-24
- Rekik, M. R., Silim, A. und Elazhary, M. A. (1990): Characteristics and analysis of electropherotypes of avian reovirus field isolates. Vet Microbiol, 23: 273-281
- Rekik, M. R., Silim, A. und Bernier, G. (1991): Serological and pathogenic characterization of avian reoviruses isolated in Quebec. Avian Pathol, 20: 607-617
- Rekik, M. R. und Silim, A. (1992): Comparison of a vaccine strain and field isolates of avian reovirus by T1-oligonucleotide mapping. Avian Dis, 36: 237-246
- Rhim, J. S., Jordan, L. E. und Mayor, H. D. (1962): Cytochemical, fluorescent-antibody and electron microscopic studies on the growth of reovirus (ECHO 10) in tissue culture. Virology, 17: 342-355
- Riddell, C. und Derow, D. (1985): Infectious stunting and pancreatic fibrosis in broiler chickens in Saskatchewan. Avian Dis, 29: 107-115
- Rinaldi, A., Cervio, G., Lodetti, E. und Mandelli, G. (1973): Enterite da reovirus nel pulcino. Folia Vet Lat, 3: 359-386
- Robertson, M. D. und Wilcox, G. E. (1984): Serological characteristics of avian reoviruses of Australian origin. Avian Pathol, 13: 585-594
- Robertson, M. D. und Wilcox, G. E. (1986): Avian reovirus. Vet Bull, 56: 155-174
- Roessler, D. E. und Rosenberger, J. K. (1989): In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. III. Host factors affecting virulence and persistence. Avian Dis, 33: 555-565
- Romeis, B. (1989): *Mayers saures Hämalaun*. Mikroskopische Technik. Böck, P. München, Verlag Urban und Schwarzenberg: 215
- Rosenberger, J. K., Sterner, F. J., Botts, S., Lee, K. P. und Margolin, A. (1989): In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. Avian Dis, 33: 535-544

Literatur

- Rosenberger, J. K. und Jones, R. C. (2003): Reovirus infections. In: Diseases of poultry. 11th. Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., Swayne, D. E. Ames, Iowa State Press: 283-298
- Rossi, B., Babrini, A., Beccaria, E. und Guarda, F. (1969): An outbreak of viral tenosynovitis in fowls. *Virological and histological research. Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, 23: 1049-1052
- Ruff, M. D. (1982): Nutrient absorption and changes in blood plasma of stunted broilers. *Avian Dis*, 26: 852-859
- Sabin, A. B. (1957): Viruses in search of disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 67: 250-252
- Sabin, A. B. (1959): Reoviruses. *Science*, 130: 1387-1389
- Sahu, S. P. und Olson, N. O. (1975): Comparison of the characteristics of avian reoviruses isolated from the digestive and respiratory tract, with viruses isolated from the synovia. *Am J Vet Res*, 36: 847-850
- Salsman, J., Top, D., Boutilier, J. und Duncan, R. (2005): Extensive syncytium formation mediated by the reovirus FAST proteins triggers apoptosis-induced membrane instability. *J Virol*, 79: 8090-8100
- Salyi, G. und Glavits, R. (1999): Infectious stunting syndrome associated with disturbances of mineral metabolism and bone development in broiler chickens. *Acta Vet Hung*, 47: 361-378
- Schnitzer, T. J., Ramos, T. und Gouvea, V. (1982): Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. *J Virol*, 43: 1006-1014
- Schnitzer, T. J. (1985): Protein coding assignment of the S genes of the avian reovirus S1133. *Virology*, 141: 167-170
- Schwarzmaier, J. (1983): Bestimmung von Antikörpern gegen Reoviren und Adeno-assoziierte Viren beim Huhn mit Hilfe des ELISA. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin
- Schweikl, M., Grund, C., Johannknecht, S., Jodas, S., Bachmeier, J. und Korbel, R. (2007): Klinische, virologische und bakteriologische Untersuchungen zum Malabsorptionssyndrom (MAS) beim Masthähnchen. *Tierärztl Praxis*, 35 (G)
- Sekiguchi, K., Koide, F. und Kawamura, H. (1968): Physico-chemical properties of avian reovirus and its nucleic acid. *Arch Gesamte Virusforsch*, 24: 123-136
- Sekiguchi, K. und Koide, F. (1974): Characterization of avian reovirus ribonucleic acid. *Arch Gesamte Virusforsch*, 46: 156-166
- Shapiro, F., Mahagna, M. und Nir, I. (1997): Stunting syndrome in broilers: effect of glucose or maltose supplementation on digestive organs, intestinal disaccharidases, and some blood metabolites. *Poult Sci*, 76: 369-380
- Shapiro, F., Nir, I. und Heller, D. (1998): Stunting syndrome in broilers: effect of stunting syndrome inoculum obtained from stunting syndrome affected broilers, on broilers, leghorns and turkey poults. *Poult Sci*, 77: 230-236

Literatur

- Shapouri, M. R., Kane, M., Letarte, M., Bergeron, J., Arella, M. und Silim, A. (1995): Cloning, sequencing and expression of the S1 gene of avian reovirus. *J Gen Virol*, 76: 1515-1520
- Shapouri, M. R., Arella, M. und Silim, A. (1996): Evidence for the multimeric nature and cell binding ability of avian reovirus sigma 3 protein. *J Gen Virol*, 77 (Pt 6): 1203-1210
- Shatkin, A. J., Sipe, J. D. und Loh, P. (1968): Separation of ten reovirus genome segments by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Virol*. 2: 986-991
- Shih, W. L., Hsu, H. W., Liao, M. H., Lee, L. H. und Liu, H. J. (2004): Avian reovirus sigmaC protein induces apoptosis in cultured cells. *Virology*, 321: 65-74
- Shirai, J., Obata, H., Nakamura, K., Furuta, K., Hihara, H. und Kawamura, H. (1990): Experimental infection in specific-pathogen-free chicks with avian reovirus and avian nephritis virus isolated from broiler chicks showing runting syndrome. *Avian Dis*, 34: 295-303
- Shmulevitz, M. und Duncan, R. (2000): A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *Embo J*, 19: 902-912
- Sievers-Kruse, G. A. (1992): Untersuchungen an zwei Reovirusstämmen aus Flugenten (*Cairina moschata*) sowie zur Epizootiologie dieser Viren bei Flugenten in der Bundesrepublik Deutschland. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Silverstein, S. C. und Schur, P. H. (1970): Immunofluorescent localization of double-stranded RNA in reovirus-infected cells. *Virology*, 41: 564-566
- Sinclair, A. J., Embury, D. H., Smart, I. J., Barr, D. A., Reece, R. L., Hooper, P. T. und Gould, J. A. (1984): Pancreatic degeneration in broilers with runting and stunting syndrome. *Vet Rec*, 115: 485-488
- Slaght, S. S., Yang, T. J., van der Heide, L. und Fredrickson, T. N. (1978): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting chicken anti-reovirus antibody at high sensitivity. *Avian Dis*, 22: 802-805
- Smith, A. L., Tignor, G. H., Mifune, K. und Motohashi, T. (1977): Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. *Intervirology*. 8: 92-99
- Smith, M. W., Mitchell, M. A. und Peacock, M. A. (1990): Effects of genetic selection on growth rate and intestinal structure in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol A*, 97: 57-63
- Songserm, T., Pol, J. M., van Roozelaar, D., Kok, G. L., Wagenaar, F. und ter Huurne, A. A. (2000): A comparative study of the pathogenesis of malabsorption syndrome in broilers. *Avian Dis*, 44: 556-567
- Songserm, T., Zekarias, B., van Roozelaar, D. J., Kok, R. S., Pol, J. M., Pijpers, A. A. und ter Huurne, A. A. (2002): Experimental reproduction of malabsorption syndrome with different combinations of reovirus, *Escherichia coli*, and treated homogenates obtained from broilers. *Avian Dis*, 46: 87-94

Literatur

- Songserm, T., van Roozelaar, D., Kant, A., Pol, J., Pijpers, A. und ter Huurne, A. (2003): Enteropathogenicity of Dutch and German avian reoviruses in SPF white leghorn chickens and broilers. *Vet Res*, 34: 285-295
- Spandidos, D. A. und Graham, A. F. (1976a): Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J Virol*, 19: 968-976
- Spandidos, D. A. und Graham, A. F. (1976b): Nonpermissive infection of L cells by an avian reovirus: restricted transcription of the viral genome. *J Virol*, 19: 977-984
- Stanley, N. F., Dorman, D. C. und Ponsford, J. (1953): Studies on the pathogenesis of a hitherto undescribed virus (hepato-encephalomyelitis) producing unusual symptoms in suckling mice. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 31: 147-159
- Su, Y. P., Su, B. S., Shien, J. H., Liu, H. J. und Lee, L. H. (2006): The sequence and phylogenetic analysis of avian reovirus genome segments M1, M2, and M3 encoding the minor core protein muA, the major outer capsid protein muB, and the nonstructural protein muNS. *J Virol Methods*, 133: 146-157
- Subramanyam, P. und Pomeroy, B. S. (1960): Studies on Fahey-Crawley virus. *Avian Dis*, 4: 165-175
- Szabo, J., Salyi, G. und Rudas, P. (1989): Effect of malabsorption syndrome on pancreatic function in broilers. *Poult Sci*, 68: 1553-1560
- Takehara, K., Kimura, Y., Tanaka, Y. und Yoshimura, M. (1987): Preparation and characterization of monoclonal antibodies against an avian reovirus. *Avian Dis*, 31: 730-734
- Tang, K. N. und Fletcher, O. J. (1987a): Application of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) technique for detecting avian reovirus in chickens. *Avian Dis*, 31: 591-596
- Tang, K. N., Fletcher, O. J. und Villegas, P. (1987b): Comparative study of the pathogenicity of avian reoviruses. *Avian Dis*, 31: 577-583
- Touris-Otero, F., Cortez-San Martin, M., Martinez-Costas, J. und Benavente, J. (2004): Avian reovirus morphogenesis occurs within viral factories and begins with the selective recruitment of sigmaNS and lambdaA to microNS inclusions. *J Mol Biol*, 341: 361-374
- Van de Zande, S., Van Bommel, S., Kuhn, E. und Hein, R. (2003): Central nervous system disorders caused by a new avian reovirus. In: *Proc. Congress of the World Veterinary Poultry Association*. Denver: 73
- Van de Zande, S. und Lin, F. (2005): Enteric reovirus strain (ERS) infections: How to control the disease? *Proceedings of the 14th World Veterinary Poultry Congress*, Istanbul, Turkey: 325
- Van de Zande, S. und Kuhn, E. M. (2007): Central nervous system signs in chickens caused by a new avian reovirus strain: a pathogenesis study. *Vet Microbiol*, 120: 42-49
- Van de Zande, S., Kuhn, E., van Bommel, S., Hafez, H. M. (2004): The pathogenicity of enteric reovirus strains in one day old turkey poult after experimental infection. *Proceedings of the 5th International Symposium on Turkey Diseases*, Berlin, Germany, DVG-Service GmbH Verlag Giessen: 220-224

Literatur

- Van der Heide, L. (1973): Infectious tenosynovitis in poultry: diagnosis and possible control. Proceedings of the 4th International Congress World's Veterinary Poultry Association, Munich, Germany: 1198-1199
- Van der Heide, L., Geissler, J. und Bryant, E. S. (1974): Infectious tenosynovitis: serological and histopathological response after experimental infection with a Connecticut isolate. *Avian Dis*, 18: 289-296
- Van der Heide, L. und Kalbac, M. (1975): Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Dis*, 19: 683-688
- Van der Heide, L., Kalbac, M. und Hall, W. C. (1976): Infectious tenosynovitis (viral arthritis): influence of maternal antibodies on the development of tenosynovitis lesions after experimental infection by day-old chickens with tenosynovitis virus. *Avian Dis*, 20: 641-648
- Van der Heide, L. (1977): Viral arthritis/tenosynovitis: A review. *Avian Pathol*, 6: 271-284
- Van der Heide, L., Lutticken, D. und Horzinek, M. (1981): Isolation of avian reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis ("brittle bone disease"; "femoral head necrosis") in broiler chickens. *Avian Dis*, 25: 847-856
- Van der Heide, L. (1996): Introduction on avian reovirus. Proceedings of the International symposium on adenovirus and reovirus infections in poultry, Rauschholzhausen, Germany: 24-27
- Van der Heide, L. (2000): The history of avian reovirus. *Avian Dis*, 44: 638-641
- Van Loon, A. A., Koopman, H. C., Kosman, W., Mumczur, J., Szeleszczuk, O., Karpinska, E., Kosowska, G. und Lutticken, D. (2001): Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chickens. *Vet Q*, 23: 129-133
- Varela, R. und Benavente, J. (1994): Protein coding of assignment of avian reovirus strain S1133. *J Virol*, 70: 2974-2981
- Varela, R., Martinez-Costas, J., Mallo, M. und Benavente, J. (1996): Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *J Virol*, 70: 2974-2981
- Vasquez, C. und Tournier, P. (1964): New interpretation of the reovirus structure. *Virology*, 24: 128-130
- Vertommen, M., Van Eck, J. H. H., Kouwenhoven, B. und van Kol, N. (1980): Infectious stunting and leg weakness in broilers: I. Pathology and biochemical changes in blood plasma. *Avian Pathol*, 9: 133-142
- Vielitz, E., Conrad, C. und Voss, M. (1989): Zum Auftreten einer Reovirus-Variante in deutschen Broilerbeständen. *Dtsch Tierärztl Wochenschr*, 96: 380-382
- Von Bülow, V. (1979): Inapparente Reovirusinfektion einer isolierten Rhodeländer-Herde: Diagnose und serologische Untersuchungen. *Zbl Vet Med B*, 26: 805-819
- Walker, E. R., Friedman, M. H. und Olson, N. O. (1972): An elektron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis. *J. Ultrastruct. Res.*, 41: 67-79

Literatur

- Wickramasinghe, R., Meanger, J., Enriquez, C. E. und Wilcox, G. E. (1993): Avian reovirus proteins associated with neutralization of virus infectivity. *Virology*, 194: 688-696
- Wiesner, E. und Ribbeck, R. (2000): Lexikon der Veterinärmedizin. 4th Edition. Stuttgart, Enke Verlag
- Woernle, H., Brunner, A. und Kussmaul, K.-F. (1974): Nachweis aviärer Reoviren im Agar-Gel-Präzipitationstest. *Tierärztliche Umschau*, 29: 307-380
- Wood, G. W., Nicholas, R. A., Hebert, C. N. und Thornton, D. H. (1980): Serological comparisons of avian reoviruses. *J Comp Pathol*, 90: 29-38
- Wooley, R. E. und Gratzek, J. B. (1969): Certain characteristics of viruses isolated from turkeys with blue comb. *Am J Vet Res*, 30
- Wyeth, J. P., Chettle, N. J. und Labram, J. (1981): Avian calicivirus. *Vet Rec*, 109: 477
- Xie, Z., Fadl, A. A., Girshick, T. und Khan, M. I. (1997): Amplification of avian reovirus RNA using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Dis*, 41: 654-660
- Yin, H. S., Shieh, H. K. und Lee, L. H. (1997): Characterization of the double-stranded RNA genome segment S3 of avian reovirus. *J Virol Methods*, 67: 93-101
- Yin, H. S. und Lee, L. H. (1998): Development and characterization of a nucleic acid probe for avian reoviruses. *Avian Pathol*, 27: 423-426
- Yin, H. S., Shien, J. H. und Lee, L. H. (2000): Synthesis in *Escherichia coli* of avian reovirus core protein σA and its dsRNA-binding activity. *Virology*, 266: 33-41
- Yu, M., Ismail, M. M., Qureshi, M. A., Dearth, R. N., Barnes, H. J. und Saif, Y. M. (2000): Viral agents associated with poult enteritis and mortality syndrome: the role of a small round virus and a turkey coronavirus. *Avian Dis*, 44: 297-304
- Zekarias, B., Songserm, T., Post, J., Kok, G. L., Pol, J. M., Engel, B. und ter, H. A. (2002a): Development of organs and intestinal mucosa leukocytes in four broiler lines that differ in susceptibility to malabsorption syndrome. *Poult Sci*, 81: 1283-1288
- Zekarias, B., Ter Huurne, A. A., Landman, W. J., Rebel, J. M., Pol, J. M. und Gruys, E. (2002b): Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet Res*, 33: 109-125
- Zekarias, B. (2003): Pathogenetic factors in susceptibility differences to malabsorption syndrome and amyloid arthropathy in chickens. Doctoral Thesis, Utrecht University
- Zekarias, B., Stockhofe-Zurwieden, N., Post, J., Balk, F., van Reenen, C., Gruys, E. und Rebel, J. M. (2005): The pathogenesis of and susceptibility to malabsorption syndrome in broilers is associated with heterophil influx into the intestinal mucosa and epithelial apoptosis. *Avian Pathol*, 34: 402-407
- Zhang, X., Tang, J., Walker, S. B., O'Hara, D., Nibert, M. L., Duncan, R. und Baker, T. S. (2005): Structure of avian orthoreovirus virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Virology*, 343: 25-35

9 Anhang

9.1 Virusisolierung

Tabelle 29: Virusisolierung in HEL- und HEF-Zellen

Probennummer	Probenart	Reovirusisolierung	
		auf HEL-Zellen	auf HEF-Zellen
1306/02-1,2	Dünndarm	1 / 2 ¹⁾	0 / 2
1333/ 02-1 bis 3	Dünndarm	2 / 3	0 / 3
1345/02	Darm	1 / 1	0 / 1
1348/02-1 bis 3	Leber, Darm	1 / 3	0 / 3
1384/02-1	Leber	0 / 1	0 / 1
1384/02-2	Darm	1 / 1	1 / 1
120/03-1	Darm	1 / 1	0 / 1
120/03-2	Herz, Leber, Milz, Bursa Fabricii	1 / 1	0 / 1
259/03	Darm	1 / 1	1 / 1
578/03-1 bis 8	Darm	1 / 3	n.d.
708/03-1 bis 11, 13	Organpool	11 / 12	n.d.
741/03-1, 2	Darm	2 / 2	n.d.
807/03-1 bis 3	Darm	3 / 3	n.d.
821/03-1 bis 6	Zwölffingerdarm, Bauchspeicheldrüse	4 / 6	4 / 6
981/03-1	Niere	1 / 1	1 / 1
981/03-2	Bursa	1 / 1	0 / 1
981/03-3	Leber	0 / 1	0 / 1
981/03-4	Milz	1 / 1	0 / 1
981/03-5	Zwölffingerdarm, Bauchspeicheldrüse	1 / 1	1 / 1
981/03-6	Thymus	0 / 1	0 / 1
981/03-11 bis 15	Zwölffingerdarm, Bauchspeicheldrüse, Leber, Niere, Drüsenmagen	5 / 5	3 / 5
990/03	Darm	1 / 1	1 / 1
994/03-1 bis 11	Darminhalt	11 / 11	8 / 11
1051/03-Darm	Darm	1 / 1	1 / 1
1051/03-Gelenk	Gelenkflüssigkeit	1 / 1	1 / 1
1172/03	Darm	1 / 1	1 / 1
24/04-1	Darm	1 / 1	1 / 1
24/04-2	Darminhalt	1 / 1	1 / 1
Gesamtzahl		56 / 68	25 / 48

¹⁾ Anzahl positiver / Anzahl untersuchter Proben

n.d.: nicht durchgeführt

9.2 Viruscharakterisierung

Tabelle 30: Größen der auf CER-Zellen gebildeten Plaques 5 d p.i. in zwei Paralleluntersuchungen

	Reovirus-Vergleichsstamm				Feldisolat			
	S1133		238/98		120/03-1		259/03	
	1. US	2. US	1. US	2. US	1. US	2. US	1. US	2. US
Plaquesgröße in mm	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	1	0,5	1	1	0,5	1	0,5	0,5
	1,5	2	1,5	1,5	1	1	0,5	0,5
	3	2,5	3,5	2	1	1	0,5	0,5
	4,5	4	4,5	3,5	1	1	0,5	0,5
	4,5	4,5	5,5	4,5	1	1	0,5	0,5
	5	5	6,5	5,5	1	1	0,5	0,5
	5,5	5,5	6,5	6,5	1	1	0,5	0,5
	5,5	5,5	7,5	7	1	1	0,5	0,5
	5,5	6	7,5	7	1	1,5	0,5	0,5
	6	6,5	7,5	7,5	1,5	1,5	0,5	0,5
	6		7,5	7,5	1,5	1,5	0,5	0,5
				7,5	1,5	1,5	0,5	0,5
				7,5	1,5	1,5	0,5	0,5
					1,5	1,5	0,5	0,5
					1,5		0,5	0,5
					1,5		0,5	1
							1	
						1		
Mittelwerte der Plaques- größen	4,04	3,86	5,19	5,1	1,17	1,17	0,55	0,53
Standard- abweichung	2,02	2,16	2,62	2,7	0,34	0,31	0,15	0,12
Mittelwerte der Plaques- größen ¹⁾	3,95		5,15		1,17		0,54	
Standard- abweichung ¹⁾	2,04		2,6		0,32		0,14	

US Untersuchung

¹⁾ errechnet aus den Werten beider Paralleluntersuchungen

9.3 Virustypisierung

Tabelle 31: Reziproke Neutralisationstiter mit dem Referenzserum „Avian Reovirus S1133“

Test- Nummer	Reziproker Neutralisationstiter des			
	Reovirus-Vergleichsstammes S1133	238/98	Feldisolates 120/03-1 259/03	
1	64	128	512	128
2	256	256	256	512
3	128	256	256	128
4	64	128	512	64
5	256	256	128	512
6	128	128	256	128
7	256	128	256	128
8	64	128	256	64
9	128	128	256	128
10	128	128	512	128
11	64	128	256	512
12	64	256	128	512
13	64	128	512	128
14	256	128	256	128
15	64	128	256	128
16	256	256	512	64
17	64	128	128	128
18	64	128	128	512
19	128	128	256	64
20	64	128	128	64

9.4 Prüfung der Pathogenität in vitro

Tabelle 32: Gewicht sowie Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichts der Tiere der Gruppe S1133 vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Gewicht am Tag					
	der Infektion	7 p.i.	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1	35,3	128,9	325,7	624,0	1110,0	1405,0
2	36,6	119,9	291,8	523,0	890,0	1130,0
3	42,7	138,4	395,3	725,0	1310,0	1680,0
4	39,8	116,7	304,3	570,0	999,0	1260,0
5	37,2	118,2	340,0	630,0	1061,0	1390,0
6	36,7	127,5	357,0	653,0	1170,0	1505,0
7	39,8	147,6	377,0	655,0	1148,0	1455,0
8	38,7	75,9	217,9	418,0	785,0	1050,0
9	45,4	118,8	306,7	570,0	1009,0	1330,0
10	34,3	132,9	355,0	367,0	1130,0	1450,0
11	43,7	138,5	353,3	632,0	1103,0	1430,0
12	37,9	114,5	324,3	636,0	1140,0	1540,0
13	33,0	93,0	254,0	505,0	930,0	1220,0
14	32,0	130,5	350,2	635,0	1120,0	1450,0
15	34,0	148,1	333,4	585,0	993,0	1280,0
Mittelwert	37,81	123,29	325,73	599,89	1059,9	1371,7
Standardabweichung	3,95	19,27	46,04	74,62	129,24	163,17

Anhang

Tabelle 33: Gewicht sowie Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichts der Tiere der Gruppe 120/03-1 vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Gewicht am Tag					
	der Infektion	7 p.i	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1	37,8	118,0	345,2	680,0	1128,0	1500,0
2	42,2	113,7	281,9	544,0	883,0	1170,0
3	40,0	131,6	326,0	580,0	885,0	1140,0
4	34,7	121,7	337,8	639,0	1020,0	1345,0
5	39,0	111,8	320,8	612,0	1050,0	1400,0
6	34,4	112,8	304,5	568,0	900,0	1140,0
7	33,7	74,1	315,0	594,0	965,0	1265,0
8	34,0	126,6	362,0	672,0	1084,0	1420,0
9	33,0	99,6	305,0	597,0	996,0	1320,0
10	35,6	120,1	323,8	594,0	970,0	1240,0
11	42,7	120,4	311,9	568,0	898,0	1160,0
12	39,8	97,0	300,7	574,0	1004,0	1350,0
13	35,1	87,1	226,0	430,0	690,0	940,0
14	42,9	130,5	329,0	580,0	900,0	1180,0
15	41,2	142,5	338,5	680,0	1112,0	1460,0
Mittelwert	37,74	113,83	315,22	594,14	965,71	1268,93
Standardabweichung	3,57	17,98	31,69	62,55	112,37	150,41

Anhang

Tabelle 34: Gewicht sowie Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichts der Tiere der Gruppe 120/03-1 (AM) vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Gewicht am Tag					
	der Infektion	7 p.i.	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1	41,7	141,0	397,8	766,0	1220,0	1490,0
2	35,3	97,2	282,7	580,0	968,0	1260,0
3	38,9	100,8	291,1	597,0	980,0	1240,0
4	35,4	112,2	313,0	616,0	990,0	1250,0
5	34,1	105,0	283,9	520,0	781,0	950,0
6	35,1	90,6	278,7	563,0	895,0	1070,0
7	37,2	116,4	326,8	615,0	954,0	1180,0
8	34,0	124,0	340,0	676,0	1050,0	1270,0
9	44,5	139,0	390,5	748,0	1136,0	1430,0
10	28,4	98,7	284,0	551,0	867,0	1110,0
11	35,9	118,7	346,0	680,0	1100,0	1395,0
12	35,2	107,3	300,0	565,0	850,0	1100,0
13	44,5	139,2	434,0	832,0	1280,0	1620,0
14	38,0	90,9	261,0	537,0	896,0	1145,0
15	35,1	129,6	340,0	607,0	896,0	1085,0
Mittelwert	36,89	114,04	324,63	630,2	990,87	1239,7
Standardabweichung	4,2	17,45	50,48	91,84	141,67	180,19

Anhang

Tabelle 35: Gewicht sowie Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichts der Tiere der Gruppe 259/03 vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Gewicht am Tag					
	der Infektion	7 p.i	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1	34,4	101,3	201,7	410,0	706,0	910,0
2	35,5	119,5	286,1	524,0	810,0	970,0
3	35,8	118,7	317,5	635,0	1022,0	1305,0
4	38,4	105,2	295,0	580,0	940,0	1170,0
5	38,3	118,0	278,3	485,0	751,0	945,0
6	38,7	114,5	285,6	561,0	860,0	110,0
7	37,3	107,0	322,9	606,0	928,0	1170,0
8	31,5	106,3	217,8	441,0	765,0	940,0
9	37,7	129,9	330,0	588,0	830,0	880,0
10	41,4	99,1	226,4	460,0	785,0	1020,0
11	39,3	92,8	205,6	393,0	601,0	775,0
12	33,9	106,3	245,9	533,0	900,0	1125,0
13	41,6	84,8	199,7	382,0	593,0	760,0
14	37,6	99,5	246,0	465,0	737,0	940,0
15	35,3	122,8	285,3	563,0	890,0	1120,0
Mittelwert	37,11	108,38	262,92	508,4	807,9	1008,7
Standardabweichung	2,76	12,15	45,41	81,02	121,35	153,99

Anhang

Tabelle 36: Gewicht sowie Mittelwerte und Standardabweichungen des Gewichts der Tiere der Negativkontrollgruppe vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Gewicht am Tag					
	der Infektion	7 p.i	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1	36,5	113,0	310,0	619,0	964,0	1200,0
2	37,3	82,3	325,0	617,0	998,0	1268,0
3	41,1	132,5	347,0	621,0	985,0	1220,0
4	37,1	144,4	411,0	800,0	1309,0	1660,0
5	33,7	107,6	315,0	634,0	1033,0	1310,0
6	40,2	133,8	348,0	650,0	1075,0	1380,0
7	40,7	120,	324,0	616,0	995,0	1260,0
8	39,5	96,9	288,0	580,0	964,0	1225,0
9	38,4	134,0	335,0	608,0	950,0	1190,0
10	38,0	127,7	308,0	537,0	895,0	1165,0
11	31,8	96,5	284,0	570,0	926,0	1215,0
12	39,6	118,0	328,0	620,0	986,0	1250,0
13	38,4	130,0	332,0	612,0	965,0	1230,0
14	40,9	121,5	331,0	616,0	996,0	1240,0
15	35,4	113,5	299,1	561,0	938,0	1220,0
Mittelwert	37,9	118,11	325,72	617,43	998,64	1268,93
Standardabweichung	2,7	16,91	30,39	58,62	96,1	119,9

Anhang

Tabelle 37: Antikörpertiter sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der Titer der Tiere der Gruppe S1133 vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Antikörpertiter am Tag					
	der Infektion	7 p.i.	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1		1	1	696	1983	1689
2		56	93	579	2159	3533
3	1	36	1	997	1774	1808
4		1	225	2630	4253	7408
5		271	550	4813	4736	8964
6		116	20	334	200	420
7		1	1	334	612	1512
8		17	510	3839	5066	8715
9	1	20	254	2141	3134	4148
10		138	1	597	388	265
11		29	103	2281	4185	6939
12		294	739	5143	5698	9009
13		227	394	1260	2159	3554
14		36	328	4298	5601	8509
15		95	36	154	190	748
Mittelwert	1	89	217	2006	2809	4481
Standardabweichung	0	100	239	1756	2000	3414

Anhang

Tabelle 38: Antikörpertiter sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der Titer der Tiere der Gruppe 120/03-1 vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Antikörpertiter am Tag					
	der Infektion	7 p.i.	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1	1	138	209	2311	1818	4789
2		1	768	4224	4500	5507
3		364	473	2701	3502	7968
4		1	539	2701	2537	4061
5		95	154	1623	2886	5989
6		225	209	2092	3008	10659
7		161	335	2730	3381	6128
8		227	172	2741	2446	3850
9		56	172	2441	2323	6627
10		56	309	3149	6323	4532
11		1	309	2261	4185	5703
12		1	309	1546	2015	3954
13		341	309	3077	4959	8376
14		116	290	2985	3044	8037
15	1	36	481	4371	3790	5746
Mittelwert	1	121	336	2730	3381	6128
Standardabweichung	0	121	167	793	1217	1930

Anhang

Tabelle 39: Antikörpertiter sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der Titer der Tiere der Gruppe 120/03-1 (AM) vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Antikörpertiter am Tag					
	der Infektion	7 p.i.	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1		1	1	2511	3650	4232
2		205	1	351	1	3093
3		1	36	203	844	1432
4		1	118	227	302	1220
5		1	20	2965	2988	4319
6		271	262	741	895	1104
7		1	128	6	164	116
8		74	254	186	172	766
9	1	1	154	2760	3306	3406
10		1	111	138	2401	3764
11		1	29	1308	895	1949
12		1	111	1081	3871	5900
13	1	1	1	1137	1218	1067
14		74	52	242	368	545
15		1	1	821	1039	1968
Mittelwert	1	42	85	978	1474	2325
Standardabweichung	0	84	88	1003	1376	1692

Anhang

Tabelle 40: Antikörpertiter sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der Titer der Tiere der Gruppe 259/03 vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Antikörpertiter am Tag					
	der Infektion	7 p.i.	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1		364	2736	7073	11176	17540
2		364	1222	5623	6442	12678
3		1	1170	4098	4219	10911
4	1	17	830	3746	3593	7700
5		481	1466	6268	7672	12259
6		262	1086	5451	5768	9831
7		190	1107	6236	5386	10475
8		341	2301	6214	7844	11769
9		309	1253	7488	9006	17514
10	1	209	952	4277	5255	8284
11		414	1222	4983	6917	9555
12		172	1118	5504	6963	12164
13		347	1711	5090	7772	13335
14		388	1349	5881	7623	14204
15		1	2268	5537	6298	9009
Mittelwert	1	257	1453	5565	6796	11815
Standardabweichung	0	155	557	1040	1896	2967

Anhang

Tabelle 41: Antikörpertiter sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der Titer der Tiere der Negativkontrollgruppe vom Tag der Infektion bis zum 33 d p.i.

Tiernummer	Antikörpertiter am Tag					
	der Infektion	7 p.i.	14 p.i.	21 p.i.	28 p.i.	33 p.i.
1		1	1	1	1	1
2		1	1	1	1	1
3		1	1	1	1	1
4		1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1
6		1	1	1	1	1
7		1	1	1	1	1
8		1	1	1	1	1
9		1	1	1	1	1
10		1	1	1	1	1
11		1	1	1	1	1
12		1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1
14		1	1	1	1	1
15		1	1	1	1	1
Mittelwert	1	1	1	1	1	1
Standardabweichung	0	0	0	0	0	0

Danksagungen

Zunächst möchte ich dem „Chef“, Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Bereitstellung von Material, Geräten und Räumlichkeiten ganz herzlich danken. Seine Unterstützung, seine Menschlichkeit, seine Ratschläge, sein Humor, die Geduld mit meiner Dissertation und nicht zuletzt sein immenses fachliches Wissen im Geflügelbereich haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich ihm für die stets offene Tür für alle fachlichen, aber auch persönlichen Fragen und Probleme sowie für die Geduld mit meiner Penetranz, insbesondere dann, wenn die Tür mal angelehnt war.

Dr. Christine Prusas danke ich für ihre Herzlichkeit, ihre Geduld, ihre Motivation, ihre Aufmunterungen und nicht zuletzt für ihre unermüdliche Unterstützung in sämtlichen Bereichen meiner Dissertation vom ersten bis zum letzten Tag. Ich wünsche ihr alles Gute im wohlverdienten Ruhestand, in dem sie mir auch noch unterstützend zur Seite stand.

Dr. Dörte Lüschow möchte ich für ihre Kritik, ihre Aufmunterungen, ihre Geduld, für ihr Verständnis, ihre Herzlichkeit und für die Wissensvermittlung im molekularbiologischen Bereich bedanken.

Dr. Michael Lierz danke ich für seine Anregungen, seine Kritik, seinen Humor und den Einblick, den er mir in den Ziervogelbereich gewährte.

Den anderen Mitarbeitern des Instituts für Geflügelkrankheiten danke ich recht herzlich für die Hilfe in verschiedenen Bereichen: Regina Schurich und Bärbel Liedtke in der Virologie; Birgit Göllner und Monika Bertram in der Bakteriologie, Bettina Valder in der Serologie; Gabi Grotehenn und Karola Kelz in der Molekularbiologie, Christina Sabl und Frank Schneider in der Betreuung meiner Broiler, Angelica Mendez in der Bereitstellung benutzungsfähiger Laborutensilien sowie Heidi Czech in organisatorischen und verwaltungstechnischen Belangen. Danken möchte ich ihnen auch für das stets offene Ohr bei Fragen und Problemen sowie die lustigen Zeiten im Institut. Besonders möchte ich Gabi Grotehenn danken für die wertvollen Tipps rund ums Qualitätsmanagement-System und die lustigen Bier-Abende.

Im chronologischen Auftreten als Doktoranden im Institut danke ich herzlich Dr. Torge Hoffmann, Dr. Nils Hagen, Dr. Rüdiger Hauck, Mirjam Zimmermann, Mandy Carnarius und Konny Waldow. Neben den vielen lustigen Stunden u.a. bei der Organisation und

Danksagungen

Durchführung interner und externer Veranstaltungen (Käsekuchen-Kontest, Bier-Kontest, Frühstück, Mittagessen, Grillen, Bowling, International Symposium on Turkey Diseases oder Production usw.) und dem Umzug aus der Käfig-Batterie in die Bodenhaltung danke ich ihnen für die Hilfe bei den unzähligen Blutprobenentnahmen, Wiegungen und Organprobenentnahmen im Rahmen dieser Dissertation. Insbesondere möchte ich Dr. Rüdiger Hauck für seine unermüdliche Hilfe in allen computerrelevanten Dingen, die Korrekturen des Englischen und für das Gorgonzolasauce-Rezept danken.

Prof. Dr. Achim Gruber und Dr. Annabelle Gräfin von der Schulenburg aus dem Institut für Tier-Pathologie der FU Berlin danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe bei den histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen sowie die Auswertung der Ergebnisse. Prof. Dr. Achim Gruber danke ich zusätzlich für die Korrekturen dieser Ergebnisse.

Dem Laborpersonal des Instituts für Tier-Pathologie der FU Berlin danke ich für die freundliche Einweisung in die histologischen Arbeitsmethoden.

Dr. Saskia van de Zande danke ich für die Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern und die Beantwortung diverser Fragen rund um ERS.

Dr. Dirk Soike aus dem Landeslabor Brandenburg, Potsdam danke ich für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und das zur Verfügung Stellen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Prof. Dr. Reinhard Fries aus dem Institut für Fleischhygiene und -technologie der FU Berlin möchte ich für die Beantwortung diverser Fragen zum Geflügelfleischhygienerecht und die Korrekturen dieses Abschnittes, auch im Flugzeug neben Dr.-Papa, danken.

Dr. Ulrich Löhren, Brüterei Weser-Ems danke ich für die Beantwortung meiner Fragen zur Reovirus-Impfung von Broiler-Elterntieren.

Ein großer Dank gebührt den Geflügel-Kollegen aus halb Deutschland, die die in dieser Arbeit verwendeten Proben aus Broilern genommen und eingesendet haben.

Danken möchte ich auch Annabelle, Petra, Benjamin und Björn aus der Kochgruppe für ihr leckeres Mittagessen.

Danksagungen

Dr. Barbara Storck danke ich für die Zeit, die sie mir zur Verfügung stellte, um diese Arbeit zu Papier bringen zu können und für Ihr Wissen im Geflügelbereich, welches Sie mir vermittelt hat. Dem gesamten Team der Praxis zur alten Mühle und des Labor hinterm Esch in Garrel möchte ich für die freundliche Aufnahme und die Geduld mit meiner Dissertation danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen lieben Freunden Silke Heinsohn, Rebecca Siefer, Frauke von Essen und Kolja Kurth bedanken, die mit mir in jeder Lebenslage durch dick und dünn gegangen sind. Ohne ihre Unterstützung, Aufmunterung und Kritik wäre diese Dissertation nicht zum Abschluß gelangt. Frauke danke ich zusätzlich sehr für die Korrekturen des Deutschen.

Herzlich danke ich meinem geliebten Freund Martin Behr, der es mit seiner positiven Einstellung und seinem Humor immer geschafft hat, mich zu motivieren, zu erheitern und glücklich zu machen.

Meinen Eltern danke ich herzlich für ihre Unterstützung in den langen Jahren des Studiums und der Zeit zum Anfertigen dieser Dissertation.

Nicht zuletzt danke ich meiner lieben Oma für ihr immer offenes Ohr bei allen Wehwehchen, ihre Unterstützung und ihre Motivation.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt zu haben.

Zur Verwendung kamen ausschließlich die in der Arbeit aufgeführten Materialien und Methoden sowie die angefügte Literatur.

Olivia Goß