

Aus
der Klinik für Vögel
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leitung: Prof. Dr. Rüdiger Korb

und

dem Institut für Virusdiagnostik
des Friedrich-Loeffler-Instituts,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Insel Riems
Leitung: PD Dr. Martin Beer

Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. Christian Grund

**Studien zum Verlauf einer
in ovo Infektion in Haushühnern
(*Gallus gallus*)
mit einem ausgewählten
Aviären Orthoreovirusisolat**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Ingetraud Müller
aus
Marburg
München, 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Grund
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Erhard

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung	9
2. Literatur	10
2.1 Aviäre Orthoreoviren	10
2.1.1 Klassifizierung der Aviären Orthoreoviren	10
2.1.2 Struktur der Aviären Orthoreoviren	12
2.1.2.1 Genom	12
2.1.2.2 Proteom	13
2.1.2.3 Struktur des Virus	16
2.1.3 Replikation der Aviären Orthoreoviren	19
2.1.4 Virus-Zell-Interaktionen	20
2.1.5 Infektionen des Haushuhnes mit ARV	21
2.1.5.1 Geschichte und Allgemeines	21
2.1.5.2 Respiratorische Erkrankungen	22
2.1.5.3 Virale Arthritis/ Tendosynovitis	22
2.1.5.4 Hydroperikard	23
2.1.5.5 Enterale Infektionen	23
2.1.5.6 Malabsorptionssyndrom bei Masthähnchen (MAS)	24
2.1.5.7 Epidemiologische Aspekte zur ARV-Infektion des Huhnes	29
2.1.6 Infektionen weiterer Vogelspezies mit ARV	31
2.1.6.1 Infektionen des Wirtschaftsgeflügels	31
2.1.6.2 Infektionen der Ziervögel	32
2.1.6.3 Infektionen der Wildvögel	33
2.1.7 Eigenschaften des ARV-Isolates 8474DP4-6	34
2.2 Zur Kausalität von Erregern bei der Entstehung von Krankheit	39

3. Material und Methoden	43
3.1 Material	43
3.1.1 Eier	43
3.1.2 Zellen	43
3.1.3 Virusstämme	43
3.1.4 Seren und Antikörper	44
3.1.5 Testkits	44
3.1.6 Chemikalien	45
3.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterial	47
3.1.8 Puffer, Lösungen und Medien	48
3.1.8.1 Puffer und Lösungen	48
3.1.8.2 Zellkulturmedien	49
3.1.8.3 Mikrobiologische Medien und Nährböden	50
3.1.8.4 Medikamente und Desinfektionsmittel	50
3.2 Methoden	51
3.2.1 Herstellen primärer Hühnerembryozellen	51
3.2.2 Herstellen von Virusanzuchten (Virusstocks)	52
3.2.3 Titration der Virusanzuchten	52
3.2.4 Plaquereduktionstest	53
3.2.5 Immunperoxidasefärbung zum Nachweis von ARV-Antigen	53
3.2.6 Nachweis von ARV aus Organen infizierter Tiere	55
3.2.7 ELISA-Test zum Nachweis von ARV-spezifischen Antikörpern	56
3.2.8 Bebrütung der Hühnereier	58
3.2.9 Inokulation der embryonierten Hühnereier	58
3.2.9.1 Dottersackinokulation	58
3.2.9.2. Allantoishöhleninokulation	58
3.2.9.3 Titration von Virus in embryonierten Hühnereiern	59

3.2.10 Tierversuch	60
3.2.10.1 Tierversuchsgenehmigung	60
3.2.10.2 Versuchsaufbau	60
3.2.10.3 Untersuchungen und Probennahmen im zeitlichen Verlauf	60
3.2.10.4 Organspektrum für die einzelnen Untersuchungen	61
3.2.10.5 Inokulation der Eier	64
3.2.10.6 Aufstallung und Haltung der Tiere	64
3.2.10.7 Untersuchungen	65
3.2.10.7.1 Klinische Untersuchung	65
3.2.10.7.2 Wiegen	65
3.2.10.7.3 Töten der Tiere	65
3.2.10.7.4 Pathologische Untersuchung	66
3.2.10.7.5 Bakteriologische Untersuchung	66
3.2.10.7.6 Histologische Untersuchung	67
3.2.10.7.6.1 Einbetten und Anfertigen der Gewebedünnschnitte	67
3.2.10.7.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	68
3.2.10.8 Statistische Auswertung der Daten zum Körpergewicht	70

4. Ergebnisse	71
4.1 Untersuchungen in spezifiziert pathogenfreien Hühnereiern	71
4.1.1 Vergleichende Infektion von spf-Eiern in Dottersack und Allantoishöhle	71
4.2 Tierversuch	75
4.2.1 Inokulation und Schlupfrate	75
4.2.2 Klinische Herdenuntersuchung	76
4.2.3 Tierzahlen	80
4.2.4 Körpergewicht	82
4.2.5 Virusnachweis	89
4.2.6 Pathologisch-anatomische und histopathologische Untersuchungen	96
4.2.6.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung	96
4.2.6.2 Histopathologische Untersuchung	100
4.2.7 Bakteriologische Untersuchungen	104
4.2.8 Serologische Untersuchung	106
4.3 Untersuchungen in Eiern aus vakzinierten Masthühnern	108
4.3.1 Infektionsversuche in embryonierten Masthuhneiern aus ARV-spezifisch vakzinierten Elterntieren	108
4.3.2 Serologische Untersuchung mittels ELISA-Technik	108
4.3.3 Untersuchung von Dotterproben im Plaquereduktionstest	111
4.3.4 Vergleichende Infektion von Hühnereiern in den Dottersack	113

1. Einleitung

Aviäre Orthoreoviren (ARV) sind weltweit verbreitet und weisen innerhalb der Klasse Aves ein sehr breites Wirtsspektrum auf. Sie sind das ursächliche Agens der viralen Arthritis/Tendosynovitis des Huhnes und werden für diese Spezies mit verschiedenen anderen Krankheitsgeschehen mit gastroenteralen, respiratorischen und neurologischen Symptomen in Verbindung gebracht. Gleichmaßen werden sie aber auch aus klinisch gesunden Hühnern isoliert. Eine Übertragung der ARV erfolgt im Bestand sowohl horizontal von Tier zu Tier, als auch vertikal. Dadurch ist ein sehr früher Eintrag in den Bestand durch bereits im Ei infizierte Eintagsküken mit anschließender horizontaler Ausbreitung im Bestand möglich. Eine Bekämpfung von ARV wird durch Vakzinierung mit Lebendimpfstoffen und stallspezifischen Inaktivatvakzinen angestrebt. Eine wichtige Maßnahme stellt hier die Impfung der Elterntierherden dar, über die ein passiver Schutz der Nachkommen durch maternale Antikörper erreicht werden soll. Trotz Impfung der Elterntierbestände sind ARV allerdings regelmäßig aus Masthuhnbeständen, die das klinische Bild des Malabsorptionssyndroms (MAS) aufweisen zu isolieren. Ihre ätiologische Bedeutung für dieses Krankheitsbild ist jedoch noch nicht gesichert (SCHWEIKL, 2008).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein aus einem MAS erkrankten Masthuhnbestand gewonnenes ARV-Isolat (8474DP4-6) auf seine pathogenen Eigenschaften hin zu untersuchen. Dabei sollte ein besonderer Schwerpunkt auf die Auswirkungen einer sehr frühen Infektion in Hühnern der Rasse Lohmann Selected White Leghorn gelegt werden. Neben grundsätzlichen Fragen zum Infektionsverlauf, welcher durch die Virusreisolierung aus verschiedenen Organen der Versuchstiere, sowie durch serologische Untersuchungen angestrebt wurde, sollten auch die klinischen Auswirkungen der Infektion eingehend untersucht werden. Die Beeinflussbarkeit einer *in ovo* Infektion durch maternale Antikörper sollte an embryonierten Hühnereiern aus vakzinierten Broilerelterntieren überprüft werden. Die Versuche sollen einen Beitrag leisten, das pathogene Potential MAS-assoziiierter ARV-Isolate abzuklären und mögliche Interventionsstrategien aufzeigen.

2. Literatur

2.1 Aviäre Orthoreoviren

2.1.1 Klassifizierung der Aviären Orthoreoviren

Die Aviären Orthoreoviren (ARV) werden dem Genus *Orthoreovirus* innerhalb der Familie der *Reoviridae* zugeordnet (International Committee on Taxonomy of Viruses; FAUQUET et al., 2005). Das Akronym „Reo“ aus den Wörtern respiratory (dt.: respiratorisch), enteric (dt.: enteral) und orphan (dt.: Waise) wurde durch SABIN (1959) geprägt, da man Reoviren zwar aus dem Respirations- und Darmtrakt isolieren, ihnen jedoch kein spezifisches Krankheitsbild zuordnen konnte.

Aviäre Orthoreoviren sind unbehüllte ikosaedrische Viruspartikeln mit einem Durchmesser von 80-82 nm. Die Virionen bestehen aus einem Kapsid (capsid) und einem davon umschlossenen Core-Partikel. In diesem ist die genetische Information enthalten. Das Genom besteht aus doppelsträngiger Ribonukleinsäure (RNA), die in zehn Segmenten vorliegt (FAUQUET et al., 2005). Nach der Struktur ihres Genoms und der damit verbundenen Transkriptionsart von genomischer zu mRNA werden die *Reoviridae* der Baltimore-Gruppe III zugeordnet (BALTIMORE, 1971). Nach ihrer Fähigkeit, in infizierten Zellkulturen eine Zellfusion zu induzieren, werden die Aviären Orthoreoviren der Untergruppe 2 (fusogenic orthoreoviruses) zugerechnet. Im Gegensatz zu den Säugetier-Orthoreoviren führen Aviäre Orthoreoviren nicht zur Hämagglutination (SCHIFF et al., 2007).

Die Säugetier-Orthoreoviren (MRV) werden in die Untergruppe 1 (nonfusogenic orthoreoviruses) eingeordnet und wirken *in vitro* hämagglutinierend. Es werden derzeit drei Serotypen unterschieden, welche gleichermaßen aus Mensch und Tier isoliert wurden. Die MRV gelten daher als anthroozoonotischer Erreger (KAADEN, 2002; SCHIFF et al., 2007). Im Säugetier und Mensch verursachen Orthoreoviren respiratorische und enterale Symptome, sie werden aber auch aus augenscheinlich gesunden Individuen isoliert. Klinisch tritt die Infektion im Allgemeinen als fieberhafte Allgemeininfektion mit Rhinitis, Pharyngitis, Husten, Diarrhoe und Emesis in Erscheinung.

Neben dem Genus *Orthoreovirus* umfasst die Familie der *Reoviridae* weitere elf Genera, von denen drei veterinär- und humanmedizinisch bedeutsam sind. Von veterinärmedizinischer Bedeutung sind in erster Linie Vertreter des Genus *Orbivirus*. Dieses beinhaltet mit dem Virus der Blauzungkrankheit, dem Virus der Afrikanischen Pferdepest, dem Virus der Hämorrhagie der Hirsche, dem Ibaraki-Virus und dem Virus der Pferdeencephalose fünf Spezies, die durch Vektoren übertragen werden und zum Teil zu verlustreichen Erkrankungen führen (KAADEN, 2002). Gleichsam von veterinär- wie von humanmedizinischer Bedeutung sind Spezies des Genus *Rotavirus*, die in Mensch (IQBAL UND SHAW, 1997) und Tier (KAADEN, 2002) schwerwiegende Darminfektionen verursachen. In der Humanmedizin sind weiterhin die Genera *Coltivirus* mit dem vektorübertragenen Colorado-Zeckenfieber-Virus und *Seadornavirus* mit dem ebenfalls vektorübertragenen Banna Virus relevant. Sie führen im Menschen zu fiebriger Allgemeinerkrankung und auch zu Encephalitiden (WONG, 1997).

Darüber hinaus umfasst die Familie weitere Genera, die verschiedene Fisch-, Pflanzen-, Pilz- und Insektenspezies infizieren. Sie haben insbesondere als Krankheitserreger der Futter- und Nutzpflanzen Bedeutung (FAUQUET et al., 2005).

2.1.2 Struktur der Aviären Orthoreoviren

2.1.2.1 Genom

Das Genom der ARV besteht aus doppelsträngiger RNA, die in zehn Segmenten vorliegt. Anhand ihres Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld werden diese Segmente in die drei Größenklassen S (small, dt.: klein), M (medium, dt.: mittel) und L (large, dt.: groß) eingeteilt (SPANDIDOS und GRAHAM, 1976). Es liegen vier Segmente vor, die zur Größenklasse S (S1-S4) gerechnet werden und jeweils drei Segmente, die den Größenklassen M (M1-M3) und L (L1-L3) zugeordnet werden. Die S-Segmente weisen eine Größe von etwa 1500 Nukleotiden, die M-Segmente eine Größe von etwa 2100 Nukleotiden und die L-Segmente eine Größe von etwa 4000 Nukleotiden auf. Diese von den MRV übertragene Einteilung trifft auf die ARV nur bedingt zu, da das S1-Segment in der Elektrophorese näher an M3 als an S2 bandet (BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS, 2007). Mit Ausnahme des Segments L2 liegen für alle Segmente des Standardimpfstammes S1133 Sequenzen vor (Tab. 1). Alle bereits sequenzierten Segmente stimmen in ihrer Sequenz in den Endbereichen überein. Der Positivstrang eines jeden Segmentes beginnt mit den sieben Nukleotiden (5'GCUUUUU3') und endet auf die fünf Nukleotide (5'UCAUC3'). Diesen übereinstimmenden Sequenzbereichen wird eine mögliche Funktion als Signalsequenzen für die Transkription oder Replikation zugesprochen (BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS, 2007). Neben diesen möglichen Signalsequenzen, die in der Primärstruktur verankert sind, ist auch von anderen Reoviridae bekannt, dass bestimmte Sekundärstrukturen über RNA-Protein-Interaktionen die korrekte Verpackung der dsRNA-Segmente in das Virion vermitteln (TOURIS-OTERO et al., 2005; LYMPEROPOULOS et al., 2006).

Der Negativstrang der dsRNA dient als Matrize für die Transkription von mRNA. Mit Ausnahme des Segmentes S1, welches drei offene Leserahmen enthält, findet sich auf jedem Segment des ARV-Stammes S1133 ein offener Leserahmen (VARELA und BENAVENTE, 1994).

Tab. 1: Übersicht über Genom und Proteom von ARV
(modifiziert nach BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS (2007))

Genom-segment	Offene Leserahmen	Kodierte Proteine	Lokalisation	Funktion
S1	3	σ C	Kapsid	Bindung an Wirtszelle
		p10	Nichtstrukturprotein	Modulation der Wirtszellmembran
		p17	Nichtstrukturprotein	unbekannt
S2	1	σ A	Core	Bindung von dsRNA
S3	1	σ B	Kapsid	unbekannt
S4	1	σ NS	Nichtstrukturprotein	Bindung von ssRNA
M1	1	μ A	Core	Kofaktor der Transkriptase**
M2	1	μ B* (μ BN, μ BC)	Kapsid	Eintritt in Wirtszelle
M3	1	μ NS* (μ NNS, μ NSC)	Nichtstrukturprotein	Bildung der Virusfabriken
L1	1	λ A	Core	Strukturprotein
L2	1	λ B	Core	Transkriptase**
L3	1	λ C	Core/ Kapsid	Capping-Enzym

* Posttranslationale Spaltung; **vermutete Funktion

2.1.2.2 Proteom

Eine grundlegende Beschreibung des Proteoms der ARV und der Funktion der gebildeten Proteine findet sich bei BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS (2007). Die Expression von insgesamt zwölf Translationsprodukten wurde für den Stamm S1133 nachgewiesen. Von diesen finden sich acht Proteine im Virion (Strukturproteine) und vier weitere in infizierten Zellen (Nicht-Strukturproteine).

Analog zu den kodierenden Genomsegmenten (S, M, L) werden die Proteine mit den griechischen Buchstaben σ , μ und λ bezeichnet. Innerhalb dieser Klassen werden die Proteine mit römischen Buchstaben bezeichnet (σ C, σ A, σ B, σ NS, μ A, μ B, μ NS, λ A, λ B, λ C). Einzig die Proteine p10 und p17, die neben dem Protein σ C in zwei weiteren Leserahmen des Segmentes S1 kodiert werden, folgen nicht dieser Nomenklatur (Tab. 1).

Die Strukturproteine λ A, σ A, μ A und λ B sind im Core des ARV lokalisiert. Hierbei wird das Gerüst des Core von dem Protein λ A gebildet, welches während der Replikation in infizierten Zellen assoziiert mit dem Nichtstrukturprotein μ NS vorliegt (TOURIS-OTERO et al., 2004a). Einen weiteren wichtigen Bestandteil des Core stellt das Protein σ A dar, welches darüber hinaus eine unspezifische Nukleotidyl-

Phosphatase-Aktivität aufweist und in nativem Zustand dsRNA bindet (YIN et al., 2000; 2002). Die Fähigkeit dsRNA zu binden befähigt das Protein σA mit großer Wahrscheinlichkeit dazu, eine dsRNA-abhängige-Proteinkinase zu hemmen (GONZALEZ-LOPEZ et al., 2003) und damit die Interferon-Antwort des Wirtes zu stören (MARTINEZ-COSTAS et al., 2000). Als zusätzliche Bausteine des Core konnten die Proteine μA und λB identifiziert werden, deren Funktionen bislang nicht völlig geklärt sind. In Analogie zu anderen Reoviren wird jedoch vermutet, dass es sich bei dem Protein λB um die virale RNA-Polymerase handelt. Die Sequenzierung des Proteins und auch des entsprechenden kodierenden Gensegments L2 ist bis dato jedoch nicht erfolgt.

Die Proteine λC , μB , σC und σB sind ebenfalls als Strukturproteine anzusprechen und finden sich im Kapsid des Virions.

Die Hauptkomponente der äußeren Schale des Kapsids ist das Protein σB , dessen Eigenschaften noch nicht vollständig charakterisiert wurden. Im Zytosol assoziiert es sich rasch mit den Proteinen μB und μBC und bildet mit diesen einen vorgefertigten Dreierkomplex, welcher während der Virusreproduktion an das Core angelagert wird (TOURIS-OTERO et al., 2004a, b). Das Protein μB wird vom Segment M2 als Primärprodukt translatiert und zerfällt durch eine proteolytische Spaltung in das kleinere amino-terminale Protein μBN und das größere carboxy-terminale Protein μBC , wobei die Spaltung möglicherweise durch das Protein σB vermittelt wird. Das Spaltprodukt μBC spielt neben der Funktion als Baustein der äußeren Schale eine Rolle bei der Aufnahme des Virus in die Wirtszelle. In der infizierten Zelle erfährt das Spaltprodukt μBC zwei weitere proteolytische Abspaltungen an seinem carboxy-terminalen Ende, wodurch die Polypeptide δ und δ' entstehen. DUNCAN (1996) schreibt der proteolytischen Spaltung des Proteins μB eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit lysosomalen Membranen zu.

Eine weitere Strukturkomponente des Kapsids stellt das Protein λC dar. Dieses liegt in den Virionen in pentameren Komplexen vor, die im Core verankert sind, aus dem äußeren Kapsid hervorragen und die Vertices des ikosaedralen Virions bilden (ZHANG et al., 2005). Daneben überträgt das Protein λC Guanosinmonophosphatreste auf die 5'-Enden der mRNA und ist damit das virale Capping-Enzym. So wird die virale mRNA vor einem schnellen Abbau durch Ribonukleasen geschützt.

Das vierte Strukturprotein der äußeren Schale des Kapsids ist das Protein σC , welches die Adsorption des Virions an die Wirtszelle vermittelt (SHAPOURI et al., 1996; MARTINEZ-COSTAS et al., 1997). Das Protein liegt als homotrimerer Komplex vor und kann offenkundig nur in dieser Konformation mit der Wirtszellmembran interagieren (GRANDE et al., 2002). Weiterhin wird eine proapoptotische Wirkung des Proteins σC in infizierten Zellen diskutiert (LABRADA et al., 2002).

Neben den beschriebenen Strukturproteinen werden in infizierten Zellkulturen mindestens vier weitere virale Proteine exprimiert, die jedoch nicht mit dem Virion assoziiert sind und daher als Nichtstrukturproteine bezeichnet werden. Als Nichtstrukturproteine sind die Proteine μNS , σNS , p10 und p17 bekannt.

Das Protein μNS bildet bei alleiniger Expression in infizierten Zellen Einschlusskörper, TOURIS-OTERO et al. (2004b) schlossen daraus, dass μNS ein essentieller Bestandteil bei der Bildung der Virusfabriken (engl.: *virus factories*) ist. Das Protein μNS bindet selektiv die Proteine λA und σNS , die damit ebenfalls in den Einschlüssen vorliegen. Das Protein wird in infizierten Zellen möglicherweise in die Produkte μNSN und μNSC prozessiert (BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS, 2007). Die Funktionen der Spaltprodukte sind ebenso wenig geklärt wie die Lokalisation der Spaltung und die Identität der Protease. Das Protein σNS bindet einzelsträngige RNA (ssRNA) unabhängig von deren Sequenz (YIN und LEE, 1998) und liegt wie oben beschrieben in den *virus factories* vor. Es nimmt vermutlich eine Schlüsselrolle bei der Verpackung der RNA ein.

Das Protein p10 ist ein Typ-1-Transmembranprotein mit einer aminoterminalen Ekto- und einer carboxyterminalen Endodomäne, sowie einer dazwischen liegenden Transmembrandomäne (SHMULEVITZ und DUNCAN, 2000). Das Protein p10 bedingt in infizierten Zellen die für ARV charakteristische Zell-Zell-Fusion (BODELON et al., 2001). Weiterhin erhöht das Protein p10 in infizierten Zellen über einen unabhängigen Mechanismus die Membranpermeabilität und destabilisiert damit die Zellmembran (BODELON et al., 2002).

Das Protein p17 reichert sich im Kern infizierter Zellen an und beeinflusst hier die Transkriptionsaktivität der Zelle (COSTAS et al., 2005). LIU et al. (2005) konnten in Abhängigkeit von p17 ein verlangsamtes Zellwachstum feststellen, welches auf die Beeinflussung der intrazellulären Proteine p53 und p21cip1/waf1 zurückgeführt wurde.

2.1.2.3 Struktur des Virus

Eine schematische Darstellung des Aufbaus eines ARV-Partikels zeigt Abb. 1.

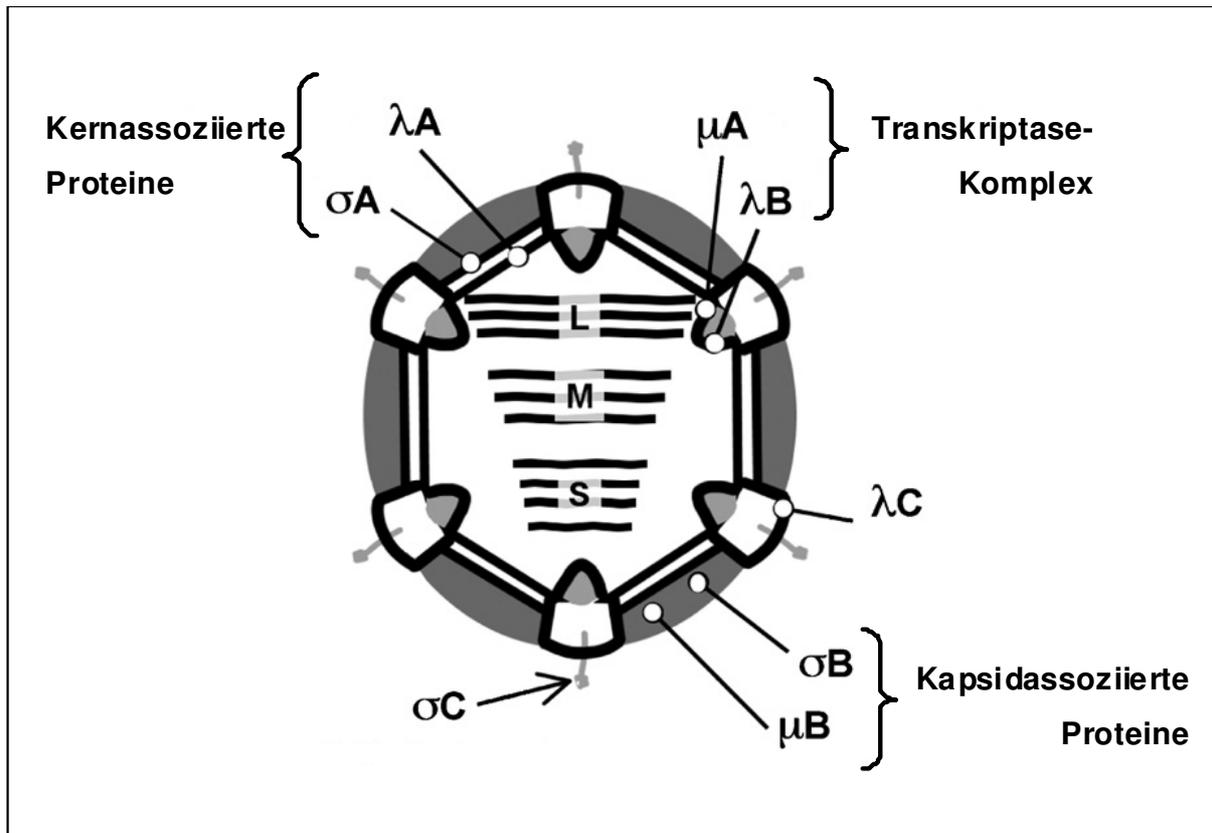
Die Struktur des ARV konnte in den vergangenen Jahrzehnten durch das Zusammenwirken verschiedener Untersuchungsmethoden entschlüsselt werden. Die Verteilung der viralen Proteine innerhalb des Partikels wurde durch klassische biochemische Untersuchungen analysiert. SCHNITZER et al. (1982) und MARTINEZ-COSTAS et al. (1997) zeigen, dass die Proteine μB , σB und σC Bestandteile des Kapsids sind, während die Proteine λA , λB , μA und σA mit dem Core assoziiert sind. Das Protein λC nimmt eine Sonderstellung ein, da es vom Core ausgehend aus dem äußeren Kapsid hervorragt.

Vergleichend zu den Säugetier-Orthoreoviren (METCALF et al., 1991; REINISCH et al., 2000; OLLAND et al., 2001) untersuchten ZHANG et al. (2005) die Struktur der ARV mittels Kryoelektronenmikroskopie und anschließender dreidimensionaler Bildrekonstruktion.

Das Virion der ARV hat, gemessen auf Höhe des Proteins σB , einen Durchmesser von 85,7 nm (ZHANG et al., 2005). Das fibrilläre Protein σC , welches bei MRV bis zu 40 nm über die Oberfläche herausragen soll (FURLONG et al., 1988), ist bei der Messung nicht berücksichtigt. Die Oberfläche besteht aus Molekülkomplexen des Proteins σB . Dieses liegt in Gruppen von vier oder sechs Molekülen vor, in deren Mitte sich kanalartige Strukturen ausbilden. Diese Ausbildung von Kanalstrukturen, die das äußere Kapsid durchbrechen, findet sich auch bei den MRV (METCALF et al., 1991), hier werden diese als P2 und P3 Kanäle bezeichnet. Ein P3 Kanal wird von sechs Molekülen des Proteins σB gebildet. Ein P2 Kanal wird dem gegenüber von einer Seite von vier Molekülen des Proteins σB begrenzt und auf der anderen Seite von einem pentameren Komplex des Proteins λC abgeschlossen. Die pentameren Komplexe des Proteins λC bilden auf der Oberfläche insgesamt zwölf Vertexkapsomeren (turrets), die an ihrer Basis eine Bindungsstelle für das Protein σC ausbilden. Die Vertexkapsomeren setzen sich in das Innere des Virions fort und sind dort im Core des Virions verankert. Dieses zentrisch lokalisierte Core weist einen Durchmesser von 53,6 nm auf (ZHANG et al., 2005). Die Schale des Core wird vom Protein λA gebildet und weist eine gleichförmige Struktur auf. Das Protein σA liegt auf der Außenseite der Coreschale vor, während sich ihrer Innenseite an den Achsen

von zehn der insgesamt zwölf Vertexkapsomere (Protein λ C) die Proteine μ A und λ B befinden. Diese beiden Proteine bilden den viralen Transkriptase-Komplex aus, wobei die Funktion der Transkriptase dem Protein λ B zugeschrieben wird und μ A mutmaßlich die Funktion eines Kofaktors einnimmt. Im Inneren des Core fallen konzentrische Ringe von höherer Dichte auf, die einen Abstand von 2,3 nm haben (ZHANG et al., 2005). Hierbei handelt es sich um das dichtgepackte Genom, welches aus zehn Segmenten doppelsträngiger RNA besteht.

Intakte Partikel reichern sich bei der Ultrazentrifugation im Caesiumchloridgradienten in einer Schwimmdichte von 1,37 g/ml an (GRANDE und BENAVENTE, 2000). Während der Auftrennung bildet sich eine leichtere Bande in einer Schwimmdichte von 1,29 g/ml. Diese enthält „leere“ Partikel (ohne RNA), welche nicht infektiös sind (SPANDIDOS und GRAHAM, 1976). Die Anreicherung der Core-Partikeln findet im Caesiumchloridgradienten in einer Schwimmdichte von 1,44 g/ml statt (SCHNITZER et al., 1982).



(modifiziert nach BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS , 2007)

Abbildung 1: Aufbau des ARV-Virions

Die Abbildung zeigt grobschematisch den Aufbau eines ARV-Virions. Im Inneren des Core-Partikels, bestehend aus den Proteinen σA und λA , liegen dicht gepackt die 10 Genomsegmente (S, M, L). Das Protein λC bildet die Vertixkapsomeren und reicht vom Kern bis zum Kapsid. Auf Seite des Kerns ist an den Vertixkapsomeren der Transkriptase-Komplex (μA , λB) angelagert, während an der Oberfläche das fibrilläre Protein σC vorliegt, welches die rezeptorvermittelte Bindung an die Wirtszelle vermittelt. Das Kapsid wird durch die Proteine σB und μB gebildet.

2.1.3 Replikation der Aviären Orthoreoviren

Die Aufnahme der ARV-Partikeln in die Wirtszelle erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose (Viropexis). Die Adsorption des Virus an die Wirtszelle wird durch das Protein σ C vermittelt (SHAPOURI et al., 1996; GRANDE et al., 2002). Bei den Rezeptoren handelt es sich vermutlich um Proteinstrukturen (BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS, 2007). Das Absinken des pH-Wertes im virushaltigen Endosom durch Fusion mit einem primären Lysosom führt zum Verlust der Hüllproteine. Die dadurch entstandenen infektiösen subviralen Partikel sind befähigt die endosomale Membran zu durchdringen. Sie werden schließlich als transkriptionskompetente Core-Partikeln in das Zytoplasma entlassen (DUNCAN, 1996; BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS, 2007). Die Transkription des viralen Genoms in mRNA vermittelt die Core-assoziierte virale RNA-Polymerase. Die Translation der viralen Proteine erfolgt dann an den freien Ribosomen der Wirtszelle. Innerhalb der infizierten Zellen kommt es lokal zur Ansammlung verschiedenster Virusbausteine. Es bilden sich die sogenannten Virusfabriken (virus factories). Die Entstehung der Virusfabriken wird grundlegend durch das Nichtstrukturprotein μ NS vermittelt. Sie enthalten mit der mRNA und den Strukturproteinen alle Bausteine für die Morphogenese der Viruspartikeln (TOURIS-OTERO et al., 2004b). Die Virusfabriken sind oft zellkernnah lokalisiert und von Zellorganellen (Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum) umgeben. Der Aufbau der Core-Partikeln erfolgt ausschließlich in den Virusfabriken und ist bereits 30 Minuten nach der Synthese der Virusproteine abgeschlossen. In jedes Core-Partikel wird ein Genomsatz, bestehend aus 10 Segmenten positivsträngiger mRNA integriert. Diese dienen als Matrize für die Synthese des Gegenstrangs der dsRNA. Auf die neusynthetisierten Core-Partikeln werden abschließend die Hüllproteine und damit das äußere Kapsid angelagert. (BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS, 2007). Die Freisetzung der fertigen Viruspartikeln wird vermutlich durch das Nichtstrukturprotein p10, welches auf die Permeabilität der Zellmembran einwirkt, vermittelt (BODELON et al., 2002).

2.1.4 Virus-Zell-Interaktionen

Aviäre Orthoreoviren wirken auf verschiedene Weise auf die infizierte Wirtszelle ein.

Den ARV wird, wie anderen Reoviridae eine proapoptotische Wirkung auf die Wirtszelle zugeschrieben. LABRADA et al. (2002) wiesen in infizierten Zellen in der frühen Phase der Replikation Zeichen der Apoptose, wie die Fragmentation des Genoms und das Auftreten von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten nach.

Die ARV werden innerhalb des Genus Orthoreovirus zur Gruppe der zellfusionsinduzierenden Reoviren (fusogenic reoviruses) gezählt (BENAVENTE und MARTINEZ-COSTAS, 2007). Die Zellfusion wird aus dem Inneren der infizierten Zelle induziert. Daher wird angenommen, dass neusynthetisierte virale Proteine für die Zellfusion verantwortlich sind (DUNCAN et al., 1996). Als fusionsinduzierendes Agens konnte das Nichtstrukturprotein p10 identifiziert werden, welches zur Gruppe der FAST-Proteine (fusion-associated small transmembrane) gehört (SHMULEVITZ und DUNCAN, 2000). SALSMAN et al. (2005) zeigten, dass die Zellfusion die Übertragung der neusynthetisierten Viren von Zelle zu Zelle ermöglicht, und dass nach einem durch apoptotische Vorgänge ausgelöstem Aufbrechen der Zelle die Freisetzung von großen Mengen an Virus erfolgt.

Wie alle lytischen Viren wirken auch ARV auf die Permeabilität der Wirtszellmembran ein. BODELON et al. wiesen 2001 nach, dass das virale Protein p10 die Durchlässigkeit der Wirtszellmembran erhöht. Sie zeigten, dass diese erhöhte Permeabilität in infizierten Hühnerembryofibroblasten nur im späten Stadium der Replikation auftritt (BODELON et al., 2002).

Eine wichtige Rolle bei der Immunantwort der virusinfizierten Wirtszelle spielen Interferone, welche die Proteinexpression der infizierten Zelle beeinflussen (GOODBOURN et al., 2000). Eines der Proteine, die durch den Einfluss von Interferon vermehrt gebildet werden, ist die dsRNA-abhängige Proteinkinase PKR. Bei Vorliegen von dsRNA in der Zelle wird dieses Enzym aktiviert und inhibiert die Translation. Um diesem Abwehrmechanismus zu entgehen bindet das virale Protein σA doppelsträngige RNA und verhindert so die Aktivierung der Proteinkinase PKR (MARTINEZ-COSTAS et al., 2000; GONZALEZ-LOPEZ et al., 2003).

2.1.5 Infektionen des Haushuhnes mit ARV

2.1.5.1 Geschichte und Allgemeines

Die Erstisolation von ARV erfolgte durch FAHEY und CRAWLEY (1954) aus dem Respirationstrakt eines Haushuhns (*Gallus gallus variatio domestica*), welches chronische respiratorische Symptome aufwies. Durch PETEK et al. (1967) konnte das zunächst als Fahey-Crawley-Agens bezeichnete infektiöse Agens als ARV identifiziert werden. Auch das auslösende Agens der Viralen Arthritis, das von OLSON und KERR (1967) zunächst als Virales-Arthritis-Agens beschrieben wurde, konnte später durch WALKER et al. (1972) als ARV identifiziert werden. Eine Isolation von ARV aus Masthühnern, die Symptome des Malabsorptionssyndroms aufwiesen, erfolgte erstmals durch OLSEN (1977). Darüber hinaus wurden ARV auch aus Hühnern mit anderen klinischen Symptomen isoliert. McFERRAN et al. (1976) wiesen ARV aus Hühnerküken nach, die an Einschlusskörperchenhepatitis litten. Eine Isolation von ARV erfolgte auch aus zwei Mastkükenherden, die eine erhöhte Mortalität und in der pathologischen Untersuchung ein Hydroperikard aufwiesen (BAINS et al., 1974). VAN DE ZANDE und KUHN (2007) beschrieben die experimentelle Infektion von Hühnern mit einem polnischen Feldisolat (van LOON et al., 2001), welche mit einer hohen Mortalität und zentralnervösen Symptomen einherging. Wiederholt wurde ARV auch aus klinisch gesunden Haushühnern isoliert (KAWAMURA et al., 1965; MUSTAFFA-BABJEE und SPRADBROW, 1971; VON BÜLOW, 1979; ROBERTSON et al., 1984). Einzelne Autoren gehen sogar davon aus, dass 80% oder mehr der isolierten ARV als apathogen für Hühner einzustufen sind (VAN DER HEIDE, 1996, JONES, 2000).

Die Klassifizierung der ARV in Pathotypen anhand der verursachten klinischen Veränderungen ist nicht unbedingt möglich. Das aus Hühnern mit respiratorischen Symptomen isolierte Fahey-Crawley-Virus verursachte im Tierexperiment nach intranasaler Inokulation neben milden respiratorischen Symptomen auch Knorpelläsionen, wie sie bei der Viralen Arthritis auftreten (OLSON und KHAN, 1972). Isolate, die aus an Viraler Arthritis erkrankten Tieren gewonnen wurden, sind in der Lage auch enterale Symptome wie Durchfall zu verursachen (GOUVEA und SCHNITZER, 1982).

2.1.5.2 Respiratorische Erkrankungen

Nach der Erstisolation (FAHEY und CRAWLEY, 1954) wurden ARV wiederholt aus Hühnern isoliert, die respiratorische Symptome aufwiesen (MCFERRAN et al., 1971; SIMMONS und LUKERT, 1972; HUSSAIN et al., 1981). Experimentell mit dem ARV Isolat von Fahey und Crawley infizierte Hühner, zeigten milde respiratorische Symptome (SUBRAMANYAM und POMEROY, 1960). Die alleinige Infektion mit einem ARV-Isolat führt nicht unbedingt zu einer klinischen Erkrankung, Symptome können zum Teil erst durch nach Koinfektion, z.B. mit einem schwach pathogenen Stamm von *Mycoplasma gallisepticum*, auftreten (SIMMONS und LUKERT, 1972)

2.1.5.3 Virale Arthritis/ Tendosynovitis

Die wichtigste durch ARV verursachte Erkrankung des Haushuhnes ist die Virale Arthritis/Tendosynovitis, die erstmals von OLSON et al. (1957) beschrieben wurde. Die Virale Arthritis stellt darüber hinaus die einzige Erkrankung des Haushuhnes dar, für welche die ätiologische Beteiligung von ARV zweifelsfrei gezeigt werden konnte (JOHNSON, 1972; VAN DER HEIDE et al., 1974).

Von der Viralen Arthritis sind im Allgemeinen schwere Hühnerrassen betroffen, wobei die Erkrankung selten auch bei Legehennen beobachtet wird (SCHWARTZ et al., 1976; MACDONALD et al., 1978). Die Virale Arthritis tritt gehäuft zwischen der siebten und sechszehnten Lebenswoche auf, jüngere (vor der fünften Lebenswoche) oder ältere (ab der 20. Lebenswoche) Hühner sind dagegen nur sehr selten betroffen (JONES, 2000). Die Morbidität ist variabel, gewöhnlich ist etwa ein Zehntel des Bestandes erkrankt (JONES, 2000). In manchen Fällen führt die Erkrankung zum Tod (JONES und KIBENGE, 1984), die Mortalität ist insgesamt jedoch gering. Nach einer Inkubationszeit von einigen Tagen fällt eine gering- bis hochgradige Störung des Allgemeinbefindens auf, die Krankheit kann mit Durchfall einhergehen (GOUVEA und SCHNITZER, 1982). Das Auftreten von lahmen Tieren ab zwei Wochen post infectionem gilt als typisches Symptom (HEFFELS-REDMANN et al., 1992). Bei den erkrankten Tieren zeigt sich eine Schwellung auf der Plantarseite des Fußes bis auf Höhe der Fersengelenke. Die betroffenen Gelenke sind vermehrt warm, im Lauf der Erkrankung treten Verhärtungen auf (JONES und KIBENGE, 1984). Eine Ruptur der

geschädigten Sehnen, insbesondere der Sehne des M. gastrocnemius kann auftreten (JONES et al., 1975). In der pathologischen Untersuchung zeigt sich ein Ödem der betroffenen Sehnen, petechiale Blutungen der synovialen Häute und in chronischen Fällen eine narbige Verwachsung der Sehnen mit den Sehnenscheiden. Auf den Gelenkflächen fallen Erosionen des Knorpels auf, die auf den darunter liegenden Knochen übergreifen können. Gelegentlich zeigt sich im Gelenk ein überschießendes Wachstum von bindegewebigem Material (Pannus). Die Schwellung der betroffenen Gelenke kann über Monate hinweg erhalten bleiben und in schweren Fällen kann eine Versteifung der Gelenke auftreten (HEFFELS-REDMANN et al., 1992).

2.1.5.4 Hydroperikard

Bei Jungtieren vor dem vierzehnten Lebenstag tritt ein Krankheitsbild auf, welches klinisch in erster Linie durch eine erhöhte Sterblichkeit auffällt. In der pathologischen Untersuchung wurde als einzige Veränderung ein Hydroperikard offensichtlich. Aus veränderten Herzen wurde ARV isoliert. Bei experimenteller Infektion mit dem gewonnenen Isolat konnten die Herzveränderungen, nicht jedoch die erhöhte Sterblichkeit hervorgerufen werden (BAINS et al., 1974; JONES, 1976).

2.1.5.5 Enterale Infektionen

ARV wurden aus Hühnern mit verschiedenartigen Darmveränderungen isoliert. KRAUSS und UEBERSCHÄR (1966) wiesen ARV aus dem Darminhalt von Hühnern nach, welche an ulzerierender Enteritis litten.

Darüber hinaus wurden ARV auch aus Tieren isoliert, die verklebte Kloaken (cloacal pasting) aufwiesen (DUTTA und POMEROY, 1967ab; DESMUKH und POMEROY, 1969ab). Die beobachteten Symptome waren mit dem isolierten ARV-Stamm bei experimenteller Infektion nur unzuverlässig zu reproduzieren (DESMUKH und POMEROY, 1969c).

2.1.5.6 Malabsorptionssyndrom bei Masthähnchen (MAS)

Das MAS wurde erstmals in den Niederlanden beobachtet (KOUWENHOVEN et al., 1978a). Nachfolgend wurden mit ähnlichen Symptomen behaftete Herden auch in England (BRACEWELL und WYETH, 1981), den USA (PAGE et al., 1982) und Australien (PASS et al., 1982) beobachtet. Das Malabsorptionssyndrom der Masthühner ist in seinem klinischen Bild sehr variabel, und in der Literatur existieren daher zahlreiche gleichbedeutende Bezeichnungen für dieses Krankheitsbild. Nach den vorherrschenden klinischen Veränderungen wird der Krankheitskomplex auch als Runting and Stunting Syndrome (MCLOUGHLIN et al, 1987), Infectious Stunting Syndrome (BRACEWELL und RANDALL, 1984; FRAZIER und REECE, 1990), Infectious Proventriculitis (KOUWENHOVEN et al., 1978b), Femoral Head Necrosis, Brittle Bone Disease (VAN DER HEIDE et al., 1981), Pale Bird Syndrome (GOOD, 1982) und Helicopter Disease (KOUWENHOVEN et al., 1978a) bezeichnet.

Innerhalb betroffener Herden zeigt sich ab dem vierten Lebenstag bei etwa einem Fünftel der Herde eine starke Wachstumsdepression (JONES, 1986), welche sich in einem Auseinanderwachsen der Herde niederschlägt. In der zweiten Lebenswoche fällt ein leichter Anstieg der Mortalität auf (BRACEWELL und RANDALL, 1984). Die erkrankten Tiere nehmen ungewöhnlich viel Wasser (BRACEWELL und RANDALL, 1984) und Futter (FRAZIER und REECE, 1990) auf, die Futtermittelverwertung ist jedoch schlecht (CERVANTES, 2003). Als typisches Symptom tritt wässriger Durchfall mit Schleimbeimengungen auf, der Kot ist von gelboranger Farbe (FRAZIER und REECE, 1990; CERVANTES, 2003). Die schlechte Futtermittelverwertung und die damit verbundene Unterversorgung an Nährstoffen führt zu verschiedenen Folgeerscheinungen. Die Mangelversorgung mit Karotinoiden (VERTOMMEN et al., 1980a) führt zu einer verminderten Pigmentation der Haut, diese erscheint insbesondere an den Kämmen blass (FRAZIER und REECE, 1990). Die Federn der Tiere sind brüchig und die Tiere weisen ein abnormes Befiederungsmuster auf. Die ersten Schwungfedern wachsen unregelmäßig, während auf dem Kopf der Tiere gelbes Kükengefieder verbleibt (KOUWENHOVEN et al., 1978a; PAGE et al., 1982a; BRACEWELL und RANDALL, 1984). Als weiteres klinisches Symptom tritt eine Schwächung der Beinmuskulatur mit nachfolgender Lahmheit auf (JONES, 1986).

In der pathologischen Untersuchung zeigt sich eine Entzündung des Drüsenmagens, die in ihrer Art fibrinös, nekrotisierend oder hämorrhagisch ausgeprägt sein kann und

mit einer Verdickung der Mukosa einhergeht. In der feingeweblichen Untersuchung wird eine gemischtzellige Entzündung deutlich, die auch die Drüsen mit erfasst und fibrotische Veränderungen nach sich zieht (KOUWENHOVEN et al., 1978b; BRACEWELL und RANDALL, 1984).

Der Dünndarm ist im Sinne einer katarrhalischen Enteritis verändert, der Darm präsentiert sich durchscheinend und weist eine brüchige Wandstruktur auf. Der Inhalt ist flüssig und enthält teils unverdaute Futterbestandteile. Insbesondere im proximalen und mittleren Abschnitt des Jejunums fallen in der histologischen Untersuchung Veränderungen auf. Die Darmzotten sind verkürzt (Villusatrophie) und zeigen sich distal verdickt. Die Darmzotten können im Verlauf der Erkrankung fusionieren. Gleichzeitig sind die Lieberkühn-Krypten erweitert (Krypthyperplasie) und mit Zelldetritus, welcher aus zugrunde gegangenen Enterozyten besteht, angefüllt. Begleitet werden diese Veränderungen von einer gemischtzelligen Entzündung, die vorwiegend lymphozytären, gelegentlich aber auch heterophilen Charakters ist. Die Lamina propria ist ödematös verändert (VERTOMMEN et al., 1980a; BRACEWELL und RANDALL, 1984, FRAZIER und REECE, 1990).

Die Blinddärme zeigen sich dilatiert und enthalten schaumige Flüssigkeit, sowie Gas (BRACEWELL und RANDALL, 1984).

Veränderungen des Pankreas fallen in der zweiten bis dritten Lebenswoche auf und manifestieren sich in erster Linie in der Atrophie einzelner oder mehrerer Lappen. Erste Anzeichen der degenerativen Veränderungen des Organs sind eine Abrundung der Ränder, sowie eine brüchige Konsistenz des Gewebes (RANDALL et al., 1981; BRACEWELL und RANDALL, 1984). In der feingeweblichen Untersuchung zeigt sich eine Atrophie der Azinuszellen, die gelegentlich im Sinne einer Nekrose verändert sind. Die Azinozyten enthalten wenig Zymogen, das basophile Zytoplasma ist verringert und die Nuklei erscheinen groß und blass. Es bilden sich darüber hinaus Vakuolen aus, die in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung leer erscheinen. Nach der degenerativen Schädigung erfolgt ein Ersatz des Drüsengewebes durch Bindegewebe (Pankreasfibrose). In den fibrotischen Bereichen fallen auch mononukleäre entzündliche Infiltrate auf (PASS et al., 1982; ASDRUBALI et al., 1984, 1985; REECE und FRAZIER, 1990).

Auch am Skelettsystem manifestieren sich Veränderungen. In die Rippen erfolgt eine verminderte Kalziumeinlagerung, diese sind daher von brüchiger Struktur (KOUWENHOVEN et al., 1978a) und weisen zusätzlich Verdickungen auf. Die

langen Röhrenknochen sind weich und biegsam, im Bereich der Wachstumszonen zeigen sich Proliferationen (PAGE et al., 1982; BRACEWELL und RANDALL, 1984). Bei der blutchemischen Diagnostik fällt häufig eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase auf, welche neben den Abbauprozessen im Knochengewebe auch durch die Dünndarmläsionen erklärbar ist (VERTOMMEN et al., 1980b).

Die lymphatischen Organe, namentlich Thymus und Bursa Fabricii, zeigen sich in der makroskopischen Untersuchung atrophiert. Bei der feingeweblichen Beurteilung fällt eine Lymphozytendepletion auf, Mark und Rinde der Lymphfollikel sind undeutlich abgegrenzt und das interfollikuläre Bindegewebe ist vermehrt (REECE und FRAZIER, 1990).

In der histologischen Untersuchung des Herzens fällt eine nonpurulente Myokarditis auf (PAGE et al., 1982).

Die Ätiologie des MAS konnte bislang nicht abschließend geklärt werden, zahlreiche Infektionsexperimente zeigen jedoch, dass es sich um ein infektiöses Krankheitsgeschehen handelt. VERTOMMEN et al. (1980a) zeigten eine grundsätzliche Übertragbarkeit von erkrankten auf zugesetzte Hühnern auf. Das klinische Bild von MAS konnte darüber hinaus durch die orale Verabreichung von Darmhomogenat aus erkrankten Tieren an Eintagsküken reproduziert werden (KOUWENHOVEN et al., 1978a; VERTOMMEN et al., 1980a). Auch in Küken, welche die erste Lebenswoche bereits vollendet hatten, ließ sich das Krankheitsbild durch die orale Inokulation mit Darmhomogenat aus erkrankten Hühnern hervorrufen (KOUWENHOVEN et al., 1978b). Die Übertragbarkeit von MAS auf gesunde Hühner durch die Verabreichung von Homogenat aus Verdauungsorganen erkrankter Tiere beschreiben auch zahlreiche weitere Autoren (BRACEWELL und WYETH, 1981; KOUWENHOVEN et al., 1988; SMART et al., 1988; SZABO et al., 1989; REECE und FRAZIER, 1990; SHAPIRO und NIR, 1995a; MONTGOMERY et al., 1997; FRIEDMAN et al., 1998; SONGSERM et al., 2000).

Formalinbehandeltes Homogenat, welches weder Bakterien, noch Viruspartikeln enthielt, löste das klinische Bild des MAS nach oraler Verabreichung nicht aus (SONGSERM et al., 2002). Demgegenüber konnten KOUWENHOVEN et al. (1978a) und SELL et al. (1992) mit gefiltertem Darmhomogenat, welches frei von Bakterien und Mykoplasmen war, das klinische Bild von MAS in abgeschwächter Form reproduzieren. Hierbei war eine Gewichtsdepression ebenso auffällig wie das Auftreten von Knochenveränderungen. Eine Gewichtsdepression beobachteten auch

SMART et al. (1988) nach Infektion von Küken mit Darmhomogenat, welches mit verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen vorbehandelt worden war. KOUWENHOVEN et al. (1978a) verabreichten auch mit Methanol und Chloroform vorbehandeltes Darmhomogenat, konnten damit das klinische Bild von MAS jedoch nicht reproduzieren.

Durch die dargestellten Infektionsversuche konnte gezeigt werden, dass Bakterien nicht als primäres ätiologisches Agens in Betracht kommen. Als primäres ätiologisches Agens werden von zahlreichen Autoren verschiedene Viren, in erster Linie ARV, diskutiert.

Wiederholt wurden ARV aus von MAS betroffenen Tieren isoliert (OLSEN, 1977; PASS et al., 1982; HIERONYMUS et al., 1983; KOUWENHOVEN et al., 1983; ROBERTSON et al., 1984; SCHWEIKL, 2008). Infektionsstudien mit ARV-Isolaten aus erkrankten Tieren führten in einigen Fällen zur Ausprägung von klinischen Symptomen, am häufigsten wurden eine verringerte Gewichtszunahme und enterale Symptome, wie Durchfall beobachtet (VAN DER HEIDE et al.; 1981; REKIK et al., 1991; AL-AFALEQ and JONES, 1994). Andere Autoren konnten nach der Inokulation von Hühnern mit ARV-Isolaten keine klinische Symptomatik beobachten (DECAESSTECKER et al., 1986; KOUWENHOVEN et al., 1988)

Neben ARV wurden aus an MAS erkrankten Hühnern auch andere Viren isoliert, deren Rolle als ätiologisches Agens bislang jedoch nicht geklärt ist.

OTTO et al. (2006) zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MAS und der Infektion mit Rotaviren der Gruppe D auf.

Ebenso wird eine Beteiligung von Parvoviren an der Entstehung des MAS diskutiert. Nach der Infektion von Eintagsküken einer Masthuhnrasse mit einem aus erkrankten Hühnern isolierten Parvovirusstamm beobachtete KISARY (1985) eine Wachstumsdepression, Enteritis, Befiederungsstörungen und Knochenveränderungen. Demgegenüber stellten MEULEMANS et al. (1986) nach der oralen Verabreichung eines Parvovirusstammes an eintägige Masthuhnküken keine spezifischen Veränderungen fest.

Weiterhin wurden aus klinisch an MAS erkrankten Tieren verschiedene Viruspezies isoliert. Nachgewiesen wurden neben Enterovirus-, Togavirus-, Arenavirus-artigen Partikeln auch Calici-, sowie Coronaviren (BRACEWELL und RANDALL, 1984; GOODWIN et al., 1985; FRAZIER et al., 1986; McFERRAN und McNULTY, 1986; CASTRO et al., 1995;). Der Verdacht auf eine ätiologische Beteiligung bei MAS

konnte durch Infektionsstudien für keine der genannten Virusspezies erhärtet werden.

Bakterien konnten durch Infektionsversuche mit filtriertem Darmhomogenat als primäre Ursache für MAS ausgeschlossen werden, ihre Bedeutung als Kofaktor oder Sekundärpathogenen wird diskutiert. Aus an MAS erkrankten Tieren wurde eine Vielzahl an Gram-positiven wie Gram-negativen Bakterienspezies isoliert, beschrieben ist der Nachweis von *Bacillus licheniformis*, *Bakteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus cohnii* (MONTGOMERY et al., 1997).

Eine Beeinflussung des klinischen Bildes kann darüber hinaus auch durch weitere Faktoren, wie sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, Mykotoxine oder hormonale Faktoren erfolgen (OSBORNE und HAMILTON, 1981; HEFFELS-REDMANN et al., 1992). Der genetische Hintergrund der Hühner scheint ebenso wie durch die Haltungsbedingungen induzierter Stress Einfluss auf die Ausprägung der Symptome zu haben (O'BRIEN, 1983; SMART et al., 1988; REBEL et al., 2005; SCHWEIKL, 2008).

2.1.5.7 Epidemiologische Aspekte zur ARV-Infektion des Huhnes

Der Übertragung von ARV erfolgt horizontal ebenso, wie vertikal. Die horizontale Übertragung wurde von zahlreichen Autoren, auch im experimentellen Ansatz, dargestellt (KERR und OLSON, 1969; OLSON und KHAN, 1972; VAN DER HEIDE et al., 1974). Die Isolation von ARV aus Kontakttieren zu infizierten Hühner erfolgte aus der Trachea und dem Darm über etwa zehn Tage (JONES und GUNERATNE, 1984). Die Ausscheidung von ARV erfolgt in erster Linie über die Faeces und in geringerem Maße auch über den Respirationstrakt (JONES et al., 1975).

Die natürliche vertikale Übertragung von ARV von der Henne über das Ei auf die nachkommenden Küken wurde von DESMUKH und POMEROY (1969c) und GLASS et al. (1973) beschrieben. MENENDEZ et al. (1975a) infizierten Legehennen und isolierten ARV aus Eiern dieser Tiere bis zum 60. Tag *post inoculationem*. Experimentelle Studien zur vertikalen Übertragung von ARV wurden von MENENDEZ et al. (1975a) und HUSSAIN und SPRADBROW (1981) durchgeführt. Beide Autoren konnten die vertikale Infektion nach Inokulation von embryonierten Hühnereiern simulieren und den Schlupf infizierter Küken belegen.

Geographisch sind ARV weltweit verbreitet und werden regelmäßig aus Hühnerbeständen isoliert. Durch Hygienemaßnahmen wird versucht die horizontale Übertragung von ARV zu unterbinden. Die Viruspartikeln weisen eine hohe Tenazität auf und zeigten sich sowohl gegenüber phenol- und alkoholhaltigen Desinfektionsmitteln, als auch gegenüber Hitze und einem sauren Umgebungsmilieu als sehr stabil (JONES, 2000). Auf organischen Materialien wie Federn, Holz, Futter und Eierschalen sind über Tage infektiöse ARV nachzuweisen, in Trinkwasser bleibt ARV sogar über Wochen infektiös (SAVAGE und JONES, 2003).

Auch durch eine Vakzinierung der Tiere wird versucht, ARV-Infektionen im Haushuhn zu kontrollieren. Kommerziell erhältlich sind sowohl inaktivierte Ölemulsionsvakzine, als auch Lebendvakzine. Die Empfänglichkeit der Hühner für Infektionen mit ARV ist auch vom Alter der Tiere abhängig, jüngere Tiere erwiesen sich als empfänglicher und zeigten vermehrt klinische Symptome (JONES und GEORGIU, 1984). Eine Vakzinierung sollte daher bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt einen Schutz vor einer Erkrankung vermitteln. Die experimentelle Vakzinierung von Eintagsküken mit einem attenuierten Lebendimpfstoff führte indes nicht zum Aufbau eines Schutzes (MUKIIBI-MUKA und JONES, 1999). Eine mögliche Ursache hierfür ist auch das am

ersten Lebenstag noch nicht voll entwickelte Immunsystem des Kükens (JONES, 2000).

Eine mögliche Lösung, um einen Schutz in sehr jungen Tieren zu induzieren ist die passive Immunisierung der Küken. Hierbei werden die Elterntierherden vakziniert und Immunglobuline werden über den Dotter an den Embryo weitergegeben (CESSI und LOMBARDINI, 1975). Um einen ausreichenden Antikörperspiegel im Dotter zu erzielen, hat sich eine kombinierte Impfung mit einem Lebendimpfstoff in den ersten Lebenswochen, gefolgt von einer Verabreichung einer Inaktivatvakzine in der sechsten Lebenswoche und zusätzlich kurz vor Eintritt der Legereife bewährt (GIAMBRONE und CLAY, 1986). In Belastungsexperimenten zeigen sich die Nachkommen als geschützt gegen eine Infektion mit einem homologen Stamm, ein Schutz vor Infektion mit einem heterologen Stamm besteht dagegen nicht unbedingt (RAU et al., 1980). Ein weiteres Problem stellt die Tatsache dar, dass in manchen Fällen zwar die Inzidenz der Krankheitssymptome verringert ist, die Tiere aber dennoch infektiöses ARV beherbergen (JONES und NWAJEI, 1985).

Die Vakzinierung der Elterntierherden, insbesondere in Kombination mit Hygienemaßnahmen, stellt ein probates Mittel dar, den Infektionsdruck in den Beständen senken (JONES, 2000).

2.1.6 Infektionen weiterer Vogelspezies mit ARV

2.1.6.1 Infektionen des Wirtschaftsgeflügels

ARV weisen ein breites Wirtsspektrum auf, neben dem Haushuhn sind zahlreiche weitere Vogelspezies für eine Infektion empfänglich. Aus der Gruppe des Wirtschaftsgeflügels sind Puten, Gänse, Flugenten und Tauben von Infektionen mit ARV betroffen.

Puten (*Meleagris gallopavo var. dom.*) erkranken ebenfalls an der Viralen Arthritis, die Symptomatik ist hier jedoch von milder Ausprägung (LEVISOHN et al., 1980). Weiterhin wurden ARV aus dem Darm gesunder und erkrankter Puten isoliert. Erkrankte Tiere wiesen eine Enteritis auf, die Mortalität in der Herde war erhöht (JONES, 2008).

Gänseküken (*Anser anser var. dom.*) erkranken an der Infektiösen Myokarditis der Gössele. Es handelt sich hierbei um eine seuchenhaft verlaufende Erkrankung, die mit erhöhter Mortalität, Durchfall und einem hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden einhergeht. In der pathologischen Untersuchung fällt eine Entzündung des Herzmuskels mit degenerativen Veränderungen der Myofibrillen auf (HEFFELS-REDMANN und KALETA, 1992a).

Die Reovirusinfektion der **Flugenten** (*Cairina moschata var. dom.*) ist eine für diese Spezies bedeutsame Jungtiererkrankung. In den ersten Lebenswochen tritt in betroffenen Herden ein unspezifisches Krankheitsbild mit erhöhter Mortalität auf. Neben Durchfall weisen die Tiere Bewegungsstörungen auf, überlebende Tiere bleiben in ihrem Wachstum deutlich zurück. Pathologische Veränderungen betreffen in erster Linie das Herz sowie parenchymatöse Organe, welche eine multifokale nekrotisierende Entzündung aufweisen (HEFFELS-REDMANN und KALETA, 1992b).

Taubennestlinge (*Columba livia var. dom.*) und selten auch Jungtauben erkranken mit unspezifischen klinischen Symptomen, wie Apathie, Anorexie und Emesis. Im Bestand tritt eine erhöhte Mortalität auf, in der pathologischen Untersuchung wird eine Hepatomegalie, eine Hepatitis necroticans et haemorrhagica und eine Enteritis catarrhalis beobachtet (VINDEVOGEL et al., 1982).

2.1.6.2 Infektionen der Ziervögel

Bei den Ziervögeln wurden Infektionen mit ARV insbesondere bei den Papageienartigen festgestellt. **Afrikanische Graupapageien** (*Psittacus erithacus*) erkranken akut mit unspezifischen Symptomen und Durchfall (ASHTON et al., 1984). Die Leber ist im Sinne einer multifokalen nekrotisierenden Entzündung verändert (GRAHAM, 1987; WILSON et al., 1985). Die lymphatischen Organe zeigen sich im Sinne von Splenomegalie, Splenitis necroticans und Atrophia bursae geschädigt (SANCHEZ-CORDON et al., 2002). Die Infektion mit ARV ist nicht selten mit einer zusätzlichen Infektion beispielsweise mit Herpesviren (Pacheco-Krankheit) oder Aspergillen (SANCHEZ-CORDON et al., 2002) assoziiert.

Beim **Wellensittich** (*Melopsittacus undulatus*) zeigen sich im Zusammenhang mit einer ARV-Infektion gleichsinnige klinische Symptome und pathologische Veränderungen, wie bei den Graupapageien. Die ARV-Infektion kann in Beständen einen seuchenhaften Verlauf mit einer Sterblichkeit um 50% nehmen (MANVELL et al., 2004; PENNYCOTT, 2004).

In weiteren **Papageienartigen** wird eine ARV-Infektion weniger häufig beschrieben. Eine Isolation von ARV gelang aus verschiedenen Amazonenarten (*Amazona xanthops*, *Amazona ochrocephala*, *Amazona leucocephala*), Edelpapageien (*Eclectus roratus*), Loris (*Trichoglossus sp.*) und aus verschiedenen Kleinpapageien (*Alisterus scapularis*, *Neophema bourkii*, *Poicephalus senegalus*, *Poicephalus gulielmi*, *Psephotus haematonotus*, *Psittacula krameri*).

Klinisch treten ähnliche Symptome wie bei den Graupapageien auf, übereinstimmend berichten die Autoren von Leberveränderungen, die in ihrer Ausprägung von einer Vergrößerung des Organs bis hin zu nekrotisierenden Entzündungen reichen. Die Mortalität in den Beständen kann erhöht sein. (MEULEMANS et al., 1983; GASKIN, 1989; CONZO et al., 2001; PENNYCOTT, 2004; VAN DEN BRAND et al., 2007).

2.1.6.3 Infektionen der Wildvögel

Darüber hinaus wurden ARV aus diversen Wildvogelspezies isoliert.

In Finnland wurde ARV aus einer **Nebelkrähe** (*Corvus corone cornix*) mit zentralnervösen Störungen isoliert (HUHTAMO et al., 2007). Ebenfalls in Finnland erfolgte der Nachweis von ARV aus einer **Eiderente** (*Somateria mollissima*), in der Population fiel eine deutlich erhöhte Mortalität auf (HOLLMÉN et al., 2002). DOCHERTY et al. (1994) beschreiben den Nachweis von ARV aus **Kanadaschnepfen** (*Scolopax minor*), auffällig wurde eine generalisierte Infektion und eine erhöhte Sterblichkeit. JONES und GUNERATNE (1984) induzierten in Hühnerküken Sehnenveränderungen mit einem ARV-Stamm, welcher aus einem **Keilschwanzadler** (*Aquila audax*) isoliert wurde. Weiterhin erfolgte der Nachweis von ARV aus einer **Wachtel** (*Coturnix coturnix*), einem **Gelbkehlfrankolin** (*Francolinus leucoscepus*), einem **Triel** (*Burhinus oedicnemus*) und aus zwei **Kragentrappen** (*Chlamydotis undulata*) (MÜLLER et al., 2008).

2.1.7 Eigenschaften des ARV-Isolates 8474DP4-6

Das in der vorliegenden Arbeit für Infektionsexperimente verwendete ARV-Isolat stammt von Masthühnern, die im Rahmen einer Feldstudie zum Malabsorptionssyndrom (MAS) beprobt wurden (SCHWEIKL, 2008). Bei der virologischen Untersuchung von 13 Herden zweier schnellwüchsiger Rassen (Ross und Cobb) und einer langsamwüchsigen Rasse (ISA-JV) wurden vom ersten Auftreten von MAS mit sieben bis 15 Tagen und 14 Tage später, im Alter von 20 bis 27 Tagen häufig ARV nachgewiesen. Der Nachweis von ARV erfolgte trotz einer Impfung der Elterntiere mit stallspezifischen und kommerziellen ARV-spezifischen Vakzinen. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt wurden ARV aus 14 von 26 Darmproben (acht Herden) isoliert. ARV persistierten in den Beständen und waren noch 14 Tage nach der ersten Probennahme (Darmproben) in zehn von zwölf untersuchten Herden zu finden. Die ARV-Isolate stellten sich serologisch heterogen dar. Bei sieben von zehn isolierten ARV-Stämmen handelte es sich um enteric reovirus (ERS)-ähnliche Isolate. In Kreuzneutralisationsexperimenten wurde deutlich, dass die erhaltenen ARV-Isolate zum Teil ausgeprägte antigenetische Unterschiede zum Impfstamm S1133 aufwiesen. In durchgeführten Neutralisationstests wiesen die MAS-Isolate zudem ein ungewöhnliches Muster auf. Gegen verschiedene ARV-Isolate hergestellte Seren und Feldseren aus Elterntierherden neutralisierten den heterologen ARV-Impfstamm S1133 *in vitro* stets besser als das homologe Isolat oder andere MAS-assoziierte ARV-Isolate (SAHM, 2009).

Das Isolat 8474DP4-6 stammt aus der zweiten Beprobung und grenzt sich serologisch sehr deutlich vom Impfstamm S1133 ab. Es wurde aus Tieren der schnellwüchsigen Rasse Cobb gewonnen, welche zum Zeitpunkt der Isolation 21 Tage alt waren. Der Bestand fiel klinisch durch klassische Symptome des MAS auf. Es wurde ein Auseinanderwachsen der Herde festgestellt. Das durchschnittliche Körpergewicht blieb hinter dem für Tiere dieses Alters erwarteten Wert zurück. Darüber hinaus wurden Diarrhoe, verklebte Kloaken und Befiederungsstörungen in Form von struppigem Gefieder und Federanomalien der Handschwingen festgestellt. Die Herde stammte von vakzinierten Elterntieren ab, welche am sechsten und 20. Lebensstag mit einer inaktivierten stallspezifischen Vakzine gegen ARV immunisiert worden war. Die Virusisolierung erfolgte durch Anzucht auf primären Hühnerembryoleberzellen aus einer Sammelprobe (Duodenum und Pankreas von je

drei Tieren). Eine Identifizierung wurde mittels Immunfluoreszenztest durchgeführt. Für weitergehende Untersuchungen wurde das Isolat plaquegereinigt.

Die Kultivierung in primären Hühnerembryoleberzellen führt zu einem zytopathischen Effekt (Abb. 2) unter Ausbildung von ausgeprägten Synzytien und Herauslösung infizierter Zellen aus dem Monolayer. Elektronenmikroskopisch weisen Partikeln aus Zellkulturüberständen nach Negativkontrastierung die typischen Merkmale der Orthoreoviren auf (Abb. 3). Untersuchungen von Ultradünnschnitten mit diesem Isolat infizierter Zellen ließen als auffälligstes Merkmal ausgedehnte pseudokristalline Aggregationen reifer Viruspartikeln erkennen. (Abb. 4).

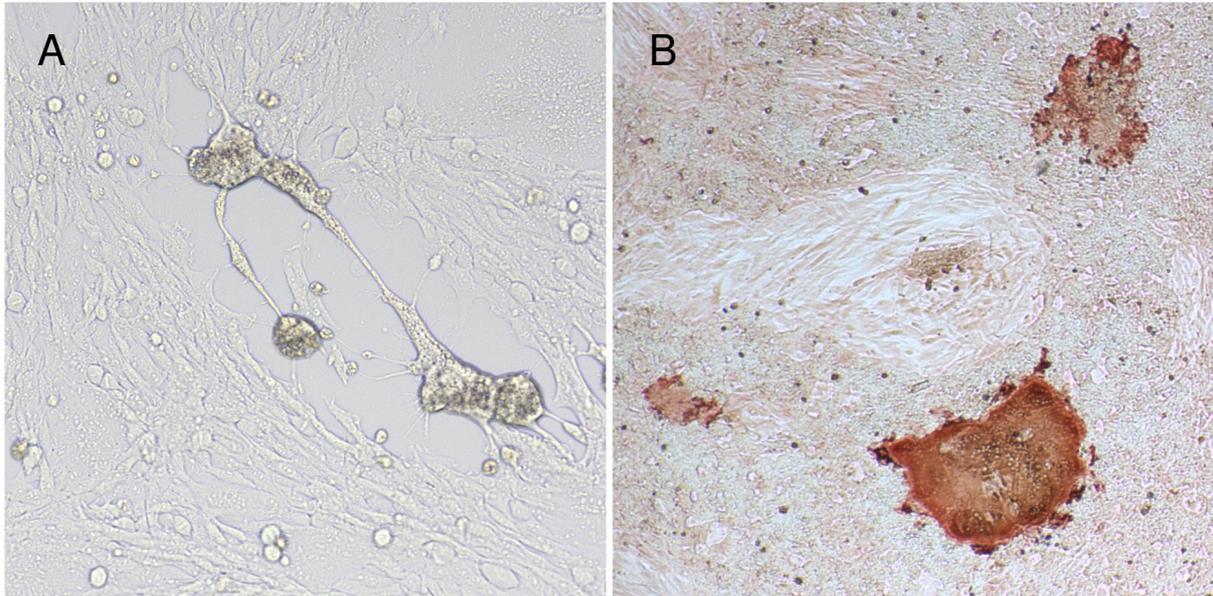


Abb. 2: Nachweis von ARV (Isolat 8474DP4-6) in Zellkultur

A: Ausprägung eines zytopathischen Effekts in primären Hühnerembryoleberzellen, mit Synzytienbildung und Ablösung infizierter Zellen aus dem Monolayer (72 Stunden p.i.; 100-fache Vergrößerung).

B: Plaques nach Immunperoxidase-Färbung mit AEC, antigenhaltige primäre Hühnerembryoleberzellen präsentieren sich mit deutlich roter Färbung (48 Stunden p.i.; 40-fache Vergrößerung).

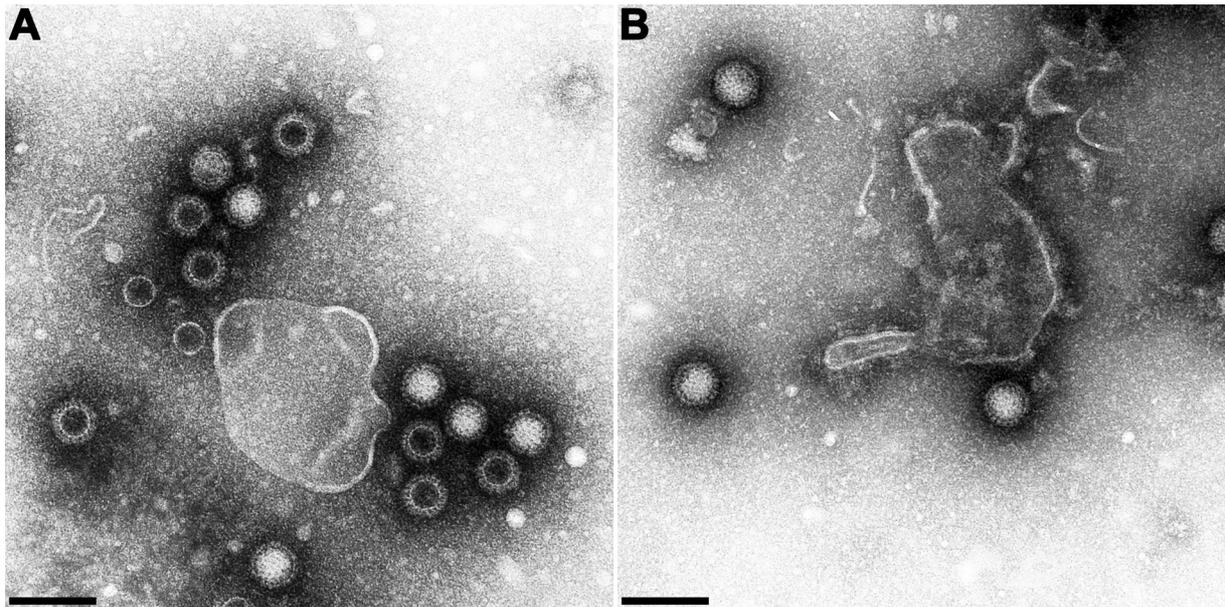


Abb. 3: Elektronenoptischer Nachweis von ARV aus Zellkulturüberstand ¹

A: ARV-Isolat 8474DP4-6; B: ARV-Impfstamm S1133

Zellkulturüberstand ohne weitere Reinigung oder Anreicherung.

Negativkontrast, Phosphor-Wolframsäure (pH 6)

Maßstab: 150 nm

¹ Bildnachweis:

Die elektronenoptischen Untersuchungen, deren Ergebnisse in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt sind, wurden durch Dr. rer. nat. habil. Harald Granzow (Labor für Elektronenmikroskopie, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems) durchgeführt.

Das Bildmaterial wurde freundlicherweise für die Veröffentlichung in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

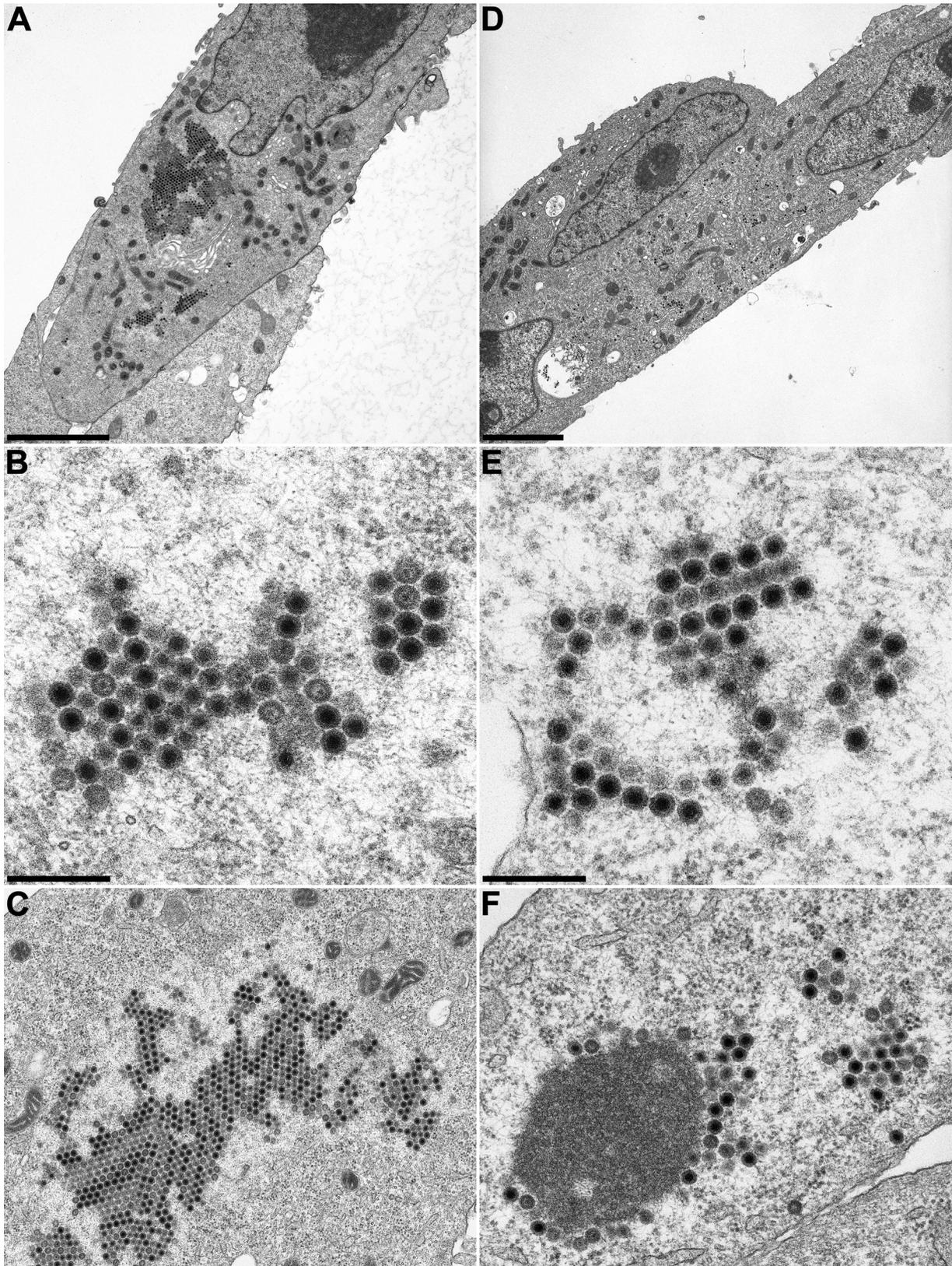


Abb. 4: Darstellung von Morphogenesestadien von ARV im Ultradünnschnitt¹

A-C: ARV-Isolat 8474DP4-6; D-F: ARV-Impfstamm S1133

Ultradünnschnitt infizierter QM9-Zellen (moi 1; 24 Stunden p.i.)

A, D: Übersicht infizierter Zellen; Maßstab: 3,0 μm

B, E: Morphogenese der Virionen im Viroplasma; Maßstab: 300 nm

C: Pseudokristalline Aggregationen reifer Virionen im Viroplasma;

F: Lockere Aggregationen reifer Virionen im Viroplasma; Maßstab (C, F): 500 nm

2.2 Zur Kausalität von Erregern bei der Entstehung von Krankheit

Es existiert keine allgemeingültige Methode, mit welcher die Bedeutung eines bestimmten Erregers bei der Entstehung eines Krankheitsbildes zu evaluieren ist. Die grundlegende Ursache-Wirkungsbeziehung zwischen einem Erreger und der betreffenden Krankheit beschreiben die Henle-Koch-Postulate. Jacob HENLE (1809-1885) vermutete bereits 1840 einen Zusammenhang zwischen einem belebten Ansteckungsstoff (contagium animatum) und der Entstehung von Krankheit. Er stellte drei Bedingungen auf, mit welchen er die ätiologische Bedeutung dieses Kontagiums, im weiteren als Erreger bezeichnet, zu belegen suchte. Erstens sollte der betreffende Erreger regelmäßig im infizierten Körper nachzuweisen sein, zweitens sollte dieser Erreger aus dem erkrankten Körper isoliert und außerhalb dessen in Reinkultur untersucht werden können. Als dritte Forderung formulierte Henle, dass mit dem isolierten Erreger im Körper das gleiche Krankheitsbild erzeugt werden sollte (HENLE, 1840).

Fünzig Jahre später, nachdem durch Louis Pasteur (1822-1895) und andere die ersten Krankheitserreger entdeckt worden waren, überarbeitete Robert Koch (1843-1910) die von Henle formulierten Postulate. Er forderte erstens, dass der Erreger in jedem Falle bei der entsprechenden Krankheit nachweisbar sein muss und dies unter Bedingungen, die der Pathologie und Klinik des Krankheitsgeschehens entsprechen. Zweitens sollte der Erreger weder bei einer anderen Erkrankung, noch bei gesunden Individuen zu isolieren sein. Drittens postulierte Koch, dass der Erreger nach Kultivierung außerhalb des erkrankten Organismus in der Lage sein sollte in gesunden Individuen der gleichen Art das gleiche Krankheitsbild zu verursachen (KOCH, 1884).

Bereits Robert Koch selbst stellte fest, dass die von ihm formulierten Postulate nicht in jedem Falle erfüllt werden konnten. Insbesondere die erneute Erzeugung eines Krankheitsbildes durch den isolierten Erreger, aber auch die Kultivierung von Erregern außerhalb des Wirtes warfen Probleme auf (KOCH, 1891). Zutreffend sind die Henle-Koch-Postulate in ihrer ursprünglichen Form für strikt monokausale Erkrankungen, für multikausale Krankheitsgeschehen treffen sie jedoch ebenso wenig zu wie für Erreger, welche nur unter bestimmten Voraussetzungen Krankheit verursachen (fakultativ pathogene Erreger).

Mit der Entdeckung der Viren, welche selbst nur in lebenden Zellsystemen kultiviert werden können, wurde die Gültigkeit der Henle-Koch-Postulate weiter relativiert. Thomas Milton Rivers (1888-1962), ein amerikanischer Virologe, bezweifelte die Gültigkeit der Henle-Koch-Postulate für virale Erkrankungen und zeigte auch, dass erst das Zusammenwirken verschiedener Agentien zur Entstehung von Erkrankung führen kann. Rivers selbst stellte in der Folge Bedingungen auf, welche die Beziehung eines Virus zur Entstehung von Erkrankung aufklären sollten. Demnach sollte ein Erreger regelmäßig in Assoziation mit der entsprechenden Erkrankung gefunden werden. Er räumte damit ein, dass der Erreger nicht in jedem einzelnen erkrankten Individuum auffindbar sein muss und wies gleichzeitig darauf hin, dass auch asymptomatische Träger des Erregers vorkommen können. Weiterhin relativierte er das dritte Henle-Koch-Postulat und verzichtete damit auf die Bedingung, dass ein Virus in unbelebten Medien oder aber in Zellkultur anzuzüchten sein muss. Weitere Überlegungen betrafen die Entstehung von Krankheit im empfänglichen Organismus. Hier forderte Rivers, dass das Vorhandensein des Erregers im erkrankten Individuum in spezifischen Läsionen und nicht als zufälliger Nachweis zu erfolgen hat. Als Beweis für die Kausalität eines Erregers forderte Rivers, dass die entsprechende Krankheit in empfänglichen Individuen durch Inokulation mit Gewebematerial, welches frei von Bakterien und Rickettsien sein sollte, reproduziert werden kann. Er warnte aber gleichzeitig vor dem Einfluss, den eine bereits vorhandene Infektion der Versuchstiere auf die Entstehung eines Krankheitsbildes nehmen könnte und gab zu bedenken, dass bei der Isolierung eines Erreger unwissentlich ein unbeteiligtes Virus kultiviert werden könnte.

Darüber hinaus betrachtete Rivers in differenzierter Weise die Bedeutung der Antikörperbildung des Wirtes gegen das entsprechenden Virus. Er beobachtete, dass Antikörper oftmals nicht gleichzeitig mit der Entkrankung nachzuweisen sind, sondern erst in der Genesungsphase auftreten können. Weiterhin stellte er dar, dass eine Infektion trotz nachgewiesener Antikörper im Serum erfolgen kann (RIVERS, 1937).

In den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts brachte schließlich Robert Huebner (1914-1998) in die von Henle, Koch und Rivers formulierten Thesen zur Ätiologie von Infektionskrankheiten epidemiologische Aspekte mit ein. Geprägt von der Unzahl an erstmalig isolierten Viren, die auch in klinisch gesunden Personen nachgewiesen wurden, formulierte er Richtlinien, um deren Bedeutung bei der

Entstehung von Krankheit zu beleuchten. Besonderes Augenmerk legte Huebner hier auf die genaue Charakterisierung des viralen Erregers, einschließlich immunologischer Untersuchungen. Er forderte weiterhin epidemiologische Studien, sowie doppelblinde Infektionsstudien und sprach auch die Möglichkeit an über Vakzinierungsstudien Aussagen über das ätiologische Potential eines Virus treffen zu können (HUEBNER, 1957).

Alfred Evans formulierte schließlich 1976 Kriterien zur Evaluierung eines Erregers, die noch heute eine breite Zustimmung finden. Er bezog sich in seinen Überlegungen nicht nur auf multifaktorielle Krankheitsgeschehen, sondern auch auf Sonderfälle wie die Entstehung von Krebs durch virale Erreger oder chronische virale Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Er etablierte mit seinen Postulaten (Tab. 2) Kriterien, welche in besonderem Maße die in biologischen Systemen vorkommende Variabilität unterstreichen. Nach Evans ist die Entstehung von Krankheit damit nicht mehr als starres Ursache-Wirkungs-Prinzip anzusehen, sondern muss als Wechselwirkung zwischen Erreger und Wirt verstanden werden, welche auch statistischen Gesetzmäßigkeiten unterworfen ist (EVANS, 1976).

Tab. 2 : EVANS (1976):**Kriterien der Ursächlichkeit: ein vereinheitlichtes Konzept**

1	Die Prävalenz der Erkrankung soll bei denen, die der mutmaßlichen Ursache exponiert sind, signifikant höher sein, als bei weniger exponierten Kontrollen.
2	Die Exposition gegenüber der mutmaßlichen Ursache soll bei Erkrankten eher gegeben sein, als bei nicht erkrankten Kontrollen; dies gilt für den Fall, dass alle Risikofaktoren konstant gehalten werden.
3	Die Inzidenz der Erkrankung soll bei denen, die der mutmaßlichen Ursache exponiert sind, signifikant höher sein, als bei weniger exponierten Kontrollen; dies ist anhand prospektiver Studien zu zeigen.
4	Zeitlich soll die Infektion der Exposition mit der mutmaßlichen Ursache folgen, die Inkubationszeiten sollen nach einer Glockenkurve verteilt sein.
5	Ein Spektrum an Reaktionen des Wirtes, entlang eines logischen biologischen Gradienten von mild bis schwer, soll nach der Exposition mit der mutmaßlichen Ursache erfolgen.
6	Eine messbare Antwort des Wirtes nach der Exposition mit der mutmaßlichen Ursache soll regelmäßig in denen auftreten, die diese (z.B. Antikörper, Krebszellen) vor der Exposition nicht aufwiesen oder soll, wenn sie vorher vorhanden war, in ihrer Stärke deutlich ansteigen. Diese Antwort soll nicht in nicht exponierten Kontrollen auftreten.
7	Die experimentelle Reproduktion der Erkrankung soll in mit der mutmaßlichen Ursache angemessen exponierten Menschen oder Tieren mit einer höheren Inzidenz erfolgen, als in nicht so exponierten; die Exposition soll an Freiwilligen erfolgen, experimentell im Labor induziert werden oder an einer kontrollierten Regulation einer natürlichen Exposition demonstriert werden.
8	Die Elimination oder Modifikation der mutmaßlichen Ursache oder des sie transportierenden Vektors soll die Inzidenz der Erkrankung senken (Kontrolle von verschmutztem Wasser oder Rauch oder Entfernen des spezifischen Agens)
9	Prävention oder die Modifikation der Antwort des Wirtes auf die Exposition mit der mutmaßlichen Ursache soll die Krankheit abmildern oder eliminieren (Immunisierung, cholesterolsenkende Medikamente, spezifischer Lymphozyten-Transfer-Faktor bei Krebs).
10	Die ganze Sache soll in biologischer und epidemiologischer Hinsicht Sinn machen.

3.1 Material

3.1.1 Eier

Hühnereier, Lohmann Selected White Leghorn, embryoniert, spezifiziert pathogenfrei (Lohmann GmbH, Cuxhaven)

Hühnereier, Ross 308, embryoniert, Charge I, II. Die Eier stammten aus zwei Eltern-tierherden, die sich in der 26. Lebenswoche und elften Produktionswoche befanden. Die Vakzinierung der Elterntiere war in der achten und zwanzigsten Lebenswoche mit einer stallspezifischen, inaktivierten Vakzine erfolgt, welche neben dem ARV-Impfstamm auch drei MAS-assoziierte ARV-Isolate beinhaltete.

Die Masthuhneier wurden freundlicherweise durch die Brüterei Süd (Regenstauf) zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Zellen

Hühnerembryoleberzellen, (Huhn; fetale Leber; primäre Zelllinie)

Hühnerembryofibroblasten, (Huhn; fetales Bindegewebe; primäre Zelllinie)

3.1.3 Virusstämme

Aviärer Orthoreovirusstamm S1133; Impfvirus; Reovac Nobilis; (Intervet, München)

Aviärer Orthoreovirusstamm 8474DP4-6; Feldisolat; Sahm et al., (Klinik für Vögel, Oberschleißheim)

3.1.4 Seren und Antikörper

Huhn- α -Reo8588#12; Hyperimmunserum aus einem Huhn, das mit einem MAS-assoziierten ARV-Isolat immunisiert worden war (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Sahn, Klinik für Vögel, Oberschleißheim)

Rabbit- α -Chicken IgY, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

3.1.5 Testkits

FlockChek[®] Reo:

Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen Aviäre Orthoreoviren (IDEXX GmbH, Ludwigsburg)

3.1.6 Chemikalien

3-Amino-6-Ethyl-Karbazol, AEC (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Aceton (Applichem GmbH, Darmstadt)
Carboxymethylcellulose, CMC (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Chloralhydrat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid, DMSO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Eisessig (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Eosin Y (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Ethanol (Applichem GmbH, Darmstadt)
Ethylendiamin-tetraessigsäure, EDTA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Formaldehyd (Formalin) 37% (Applichem GmbH, Darmstadt)
Fötale Kälberserum, FKS (Biochrom AG, Berlin)
Glycerol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Hämatoxylin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Isopronanol, n-Propanol (Applichem GmbH, Darmstadt)
Jod (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Kaliumalaun (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Kaliumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Magermilchpulver (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Natriumacetat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Natriumchlorid (Applichem GmbH, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Applichem GmbH, Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat, Natriumbicarbonat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
Natriumjodat (Applichem GmbH, Darmstadt)
Natronlauge (Applichem GmbH, Darmstadt)
O-Phenylendiamin-Dihydrochlorid, OPD (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)
Paraffin, pelletiert (Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn)
Phloxin B (Merck KGaA, Darmstadt)
Salzsäure (Applichem GmbH, Darmstadt)
Schwefelsäure (Applichem GmbH, Darmstadt)
Triton X-100 (Fa. NeoLab, Karlsruhe)

Trypanblau (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Tween 20 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Wasserstoffperoxid (Applichem GmbH, Darmstadt)

Xylol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Zitronensäure (Applichem GmbH, Darmstadt)

3.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterial

Brutmaschine:	Top-Profi 360 (Hemel Brutgeräte GmbH, Verl)
Brutschrank:	Hereaus B 6000 (Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn)
Cell Strainer:	100 µm, Nylon (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien)
CO ₂ -Brutschrank:	Modell 3862 (Forma Scientific, Marietta, USA)
Einbettssystem:	Thermo Shandon Histocentre 2 (Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn)
ELISA-Reader:	Sunrise Remote (Tecan, Männedorf, Schweiz)
Gewebeeinbettautomat:	ThermoShandon Citadel 1000 (Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn)
Lichtmikroskope:	TELAVAL 31 (Fa. Zeiss, Jena) Olympus BH-2 (Olympus GmbH, Hamburg)
Pipetten:	Research, 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
Schlittenmikrotom:	Leica SM 200 R (Leica Mikrosysteme, Wetzlar)
Zellkulturgefäße:	Costar, 24-well-Zellkulturplatte (Corning Inc. New York, USA) CorningFlask, 25 cm ² (Corning Inc. New York, USA)
Zentrifugen:	Hereaus Megafuge 1.0; Rotor: #2705 (Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn) Biofuge Primo R; Rotor: #7599B (Thermo Fisher Scientific Germany, Bonn)

3.1.8 Puffer, Lösungen und Medien

3.1.8.1 Puffer und Lösungen

AEC-Lösung:

0,33% 3-Amino-6-Ethyl-Karbazol (w/v) in Dimethylsulfoxid

Bicarbonatpuffer :

50 mM Natriumbicarbonat; pH 9,6

Blockpuffer für die Immunperoxidasefärbung:

1% Fötale Kälberserum (FKS) in PBS

Eosin-Phloxin-Lösung:

20 ml Eosin (1% in Aq. dest.); 2 ml Phloxin B (1% in Aq. dest.);

156 ml Ethanol (95%); 0,8 ml Eisessig

Formalinlösung 3,7%:

3,7% Formaldehyd (v/v) in PBS

Hämalaun nach Meyer:

1g Hämatoxylin ad 1 L Aq. Dest.

Zugabe von 200 mg Natriumjodat und 50 g Kaliumalaun

Zugabe von 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure

Jodlösung:

10% Jod (w/v) (in Ethanol)

Magermilchpuffer für den ELISA-Test:

2% Magermilch (w/v) in PBS

Phosphate Buffered Saline (PBS):

137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 10 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat; 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat; pH 7,4

1% Triton X-100-Lösung:

1% (v/v) Triton X-100 in PBS

Waschpuffer für den ELISA-Test:

0,1% Tween 20 (v/v) in PBS

Waschpuffer für die Immunperoxidasefärbung:

0,05% Tween 20 (v/v) in PBS

3.1.8.2 Zellkulturmedien

Als Basismedium für die Zellkultur wurde Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (Biochrom AG, Berlin) verwendet. Das Medium wurde standardmäßig mit einer Antibiotika-Lösung (Antibiotic-Antimycotic, 100x liquid [10000 U Penicillin; 10000 µg Streptomycin; 25µg Amphotericin B], Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und wird mit diesem Zusatz in der Folge als MEM bezeichnet.

MEM (2% FKS):

2% (v/v) FKS in MEM

MEM (10% FKS):

10% (v/v) FKS in MEM

1,6% CMC

1,6% (w/v) Carboxymethylcellulose in MEM

3.1.8.3 Mikrobiologische Medien und Nährböden

Colistinsulfat-Nalidixinsäure- Agarnährböden, CNA (Oxoid GmbH, Wesel)

Columbia-Blut- Agarnährböden (Oxoid GmbH, Wesel)

Eosin-Methylenblau-Agarnährböden, EMBA (Oxoid GmbH, Wesel)

Peptonwasser, gepuffert (Applichem GmbH, Darmstadt)

Rappaport-Vassiliadis-Medium (Oxoid GmbH, Wesel)

Xylose-Lysin-Desoxycholat- Agarnährböden, XLDA (Oxoid GmbH, Wesel)

3.1.8.4 Medikamente und Desinfektionsmittel

Wofasteril® Wirkstoff: Peressigsäure (KESLA Hygiene GmbH, Greppin)

Baytril® 10%; Wirkstoff: Enrofloxacin (Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen)

Mastimyxin® 1 Mio. IU/ ml Wirkstoff: Colistinsulfat (Vétoquinol, Aulendorf)

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellen primärer Hühnerembryozellen

Zur Herstellung primärer Hühnerembryoleberzellen wurden embryonierte spezifiziert pathogenfreie Hühnereier am zehnten Bebrütungstag verwendet. Die Eischale wurde mit 70% Ethanol desinfiziert, der Embryo entnommen und unverzüglich dekapitiert.

Zur Präparation von primären Leberzellen wurden die Lebern herauspräpariert. Aus der Karkasse wurden die inneren Organe (Herz, Mägen, Darm) entnommen und das verbleibende Material zur Herstellung von primären Fibroblasten verwendet. Das Organmaterial wurde grob zerkleinert und in einem Erlenmeyerkolben zunächst mit PBS gewaschen und anschließend unter Rühren in Trypsin/EDTA-Lösung für etwa 20 min inkubiert. Um eine Vereinzelung der Zellen zu bewirken, wurde die Organsuspension schließlich im Falle der Leberzellen durch ein Mikrosieb (Cell Strainer, 100 µm Maschenweite) und im Falle der Fibroblasten durch sechsfach gefaltete Baumwollgaze gefiltert. Um den enzymatischen Verdau zu unterbrechen wurden der Zellsuspension 10 % Fötale Kälberserum (FKS) zugesetzt. Die Zellsuspension wurde niedertourig zentrifugiert (10 min, 1000 rpm, Rotor: Heraeus #2705) und das erhaltene Zellpellet in vorgewärmtem (40°C) antibiotikahaltigem Medium (MEM, 10% FKS) in einem Gesamtvolumen von 10 ml resuspendiert. Die Zellzählung wurde in Form einer Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Ein Aliquot (10 µl) der Zellsuspension wurde hierfür mit 890 µl PBS und 100 µl Trypanblaulösung versetzt und in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer eingefüllt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungs- (100) und Kammerfaktors (500) wurde die Zellzahl errechnet. Die Suspension wurde dann mit MEM (10% FKS) auf das entsprechende Volumen gebracht.

Die Aussaat erfolgte in einer Dichte von 2×10^5 Zellen (Leberzellen) oder 1×10^5 Zellen (Fibroblasten) je Quadratcentimeter Wachstumsfläche.

Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 39°C, einer Luftfeuchte von 100% und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Nach der Aussaat wurden die Zellen inkubiert bis sich ein Monolayer ausbildete. Die weitere Kultivierung erfolgte mit MEM (2% FKS).

3.2.2 Herstellen von Virusanzuchten (Virusstocks)

Die Anzucht der im Versuch eingesetzten Virusstämme erfolgte auf primären Hühnerembryoleberzellen (8474DP4-6) sowie primären Hühnerembryofibroblasten (S1133). Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² wurden mit 100 µl eines bestehenden Virusstocks inokuliert und für 72 Stunden inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und abzentrifugiert (1 min, 8000 rpm, Rotor: Sorvall-Heraeus #7599B), um eine zellfreie Lösung zu erhalten. Der Zentrifugationsüberstand wurde in Portionen von 1 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Titration der Virusanzuchten

Zur Bestimmung der Infektiosität der Virusanzuchten wurde eine Titration auf primären Hühnerembryoleberzellen mit anschließender Plauefärbung durchgeführt. Aus einem einmalig eingefrorenen Aliquot der Virusanzucht wurden Verdünnungslösungen in Dreierschritten beginnend bei einer Verdünnung von 1:30 hergestellt. Mit je 100 µl der Verdünnungsstufen wurden im Mehrfachansatz primäre Hühnerembryoleberzellen inokuliert, die in einer 24-Loch-Zellkulturplatte vorlagen. Auf jeder Platte blieben Zellen zur Kontrolle uninfiziert. Nach einer Adsorptionszeit von einer Stunde bei 39°C wurden die Zellen mit 1,6% CMC in MEM (500 µl/Vertiefung) überschichtet. Die Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert (39°C) und anschließend mit 3,7% gepufferter Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen mittels Immunperoxidasefärbung angefärbt, um bestehende Virusplaques sichtbar zu machen.

3.2.4 Plaquereduktionstest

Die Plaquereduktionstests wurden analog zu den Virustitrationen durchgeführt, wobei die Zellen mit einer konstanten Viruskonzentration von 2500 pbE je ml Inokulat infiziert wurden. Die zu testenden Dotterproben wurden 1:5 in PBS verdünnt und durch dreimaliges Frieren und Tauen (-20 °C) mit anschließendem Zentrifugieren (1 min, 3000 rpm, Rotor: Sorvall-Heraeus #7599B) vorbereitet. Anschließend wurden Verdünnungen in PBS in Zweisritten (1:2 bis 1:128) hergestellt. Dotterprobe und Virussuspension wurden zu gleichen Teilen zusammengegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem Gemisch aus Dotterprobe und Virussuspension wurden primäre Hühnerembryoleberzellen in 24-well-Zellkulturplatten inokuliert (100 µl/ Vertiefung). Nach einer Absorption von 60 min (39°C) wurden die Zellen mit 1,6 % CMC in MEM überschichtet, für 48 Stunden inkubiert und formalinfixiert. Auf jeder Zellkulturplatte wurden scheininfizierte Kontrollen mitgeführt, deren Infektiosität gemessen in pbE als 100% Infektiosität gewertet wurde. Die Anfärbung der Plaques erfolgte mittels der Immunperoxidasefärbung.

3.2.5 Immunperoxidasefärbung zum Nachweis von ARV-Antigen

Durch die Immunperoxidasefärbung erfolgte ein spezifischer Nachweis von ARV-Antigen in infizierten, formalinfixierten Zellen, die in 24-Loch Zellkulturplatten kultiviert wurden. Durch Inkubation mit 1% TritonX-Lösung wurde zunächst ein Aufbrechen der Zellmembranen erwirkt. Unspezifische Reaktivität wurde mit Blockpuffer (1% FKS in PBS) gehemmt. Die Detektion des Antigens erfolgte durch ein aus Hühnern gewonnenem, gegen einen ARV-Stamm gerichtetes Positivserum (Huhn- α -Reo8588#12). Mittels eines gegen Hühner-IgY gerichteten und mit Meerrettichperoxidase konjugierten Hyperimmunserums aus Kaninchen (Rabbit- α -Huhn-POD) wurden die im Positivserum enthaltenen Antikörper aus einem Huhn markiert und setzten das Substrat Wasserstoffperoxid um. Dieses verursacht unter Zugabe von AEC eine rote Färbung. Auf jeder Zellkulturplatte wurde eine uninfizierte Zellkontrolle mitgeführt.

Im Einzelnen wurden die folgenden Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt:

- 1 Abschütten der 3,7% Formalinlösung, Ausklopfen der Platte
- 2 Zugabe Triton X (1% in PBS), 200 µl, 30 min Inkubation
- 3 Abschütten und Ausklopfen der Platte
- 4 Zugabe Blockpuffer (1% FKS in PBS), 200 µl, 60 min Inkubation
- 5 Abschütten und Ausklopfen der Platte
- 6 Zugabe Hyperimmunserum (Huhn- α -Reo8588#1; 1:50 in Blockpuffer), 200 µl, 60 min Inkubation
- 7 Abschütten und Ausklopfen der Platte
- 8 Zugabe Waschpuffer (0,05% Tween in PBS), 200 µl, 3 min Inkubation
- 9 Abschütten und Ausklopfen der Platte
- 10 zweimalige Wiederholung der Schritte 8 und 9
- 11 Zugabe konjugierter Sekundärantikörper (Rabbit- α -Huhn-POD; 1:1000 in Blockpuffer), 200 µl, 60 min Inkubation
- 12 Abschütten und Ausklopfen der Platte
- 13 Zugabe Waschpuffer (0,05% Tween in PBS), 200 µl, 3 min Inkubation
- 14 Abschütten und Ausklopfen der Platte
- 15 zweimalige Wiederholung der Schritte 13 und 14
- 16 Zugabe AEC-Lösung (3,3 mg/ ml DMSO, zusätzlich 12 µl H₂O₂ je ml), 200 µl, 20 min Inkubation bis zur Rosafärbung des Monolayers
- 17 Waschen unter fließendem Leitungswasser
- 18 Zugabe Leitungswasser (200 µl)

Die angefärbten Plaques wurden unter einer Lupe ausgezählt, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Infektiosität des Virus in plaquebildenden Einheiten je ml Virusanzucht berechnet.

3.2.6 Nachweis von ARV aus Organen infizierter Tiere

Der Nachweis von ARV aus Organen infizierter Tiere erfolgte durch Anzucht auf primären Hühnerembryoleberzellen. Die Organproben wurden auf eine Kantenlänge von 0,5 cm zugeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingefüllt. Wurden Embryonen untersucht, wurden die embryonalen Organe ohne weiteren Zuschnitt in das Gefäß eingefüllt. Das fünffache Probenvolumen an PBS, sowie eine 5 mm Stahlkugel wurden zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden in einen Tissue Lyser (Qiagen, Hilden) eingesetzt und bei 25 Hz für zwei Minuten homogenisiert. Das Homogenat wurde abzentrifugiert (1 min, 8000 rpm, Rotor: Sorvall-Heraeus #7599B). Der Überstand wurde zur Inokulation der Zellen eingesetzt.

Die eingesetzten Zellkulturen lagen im 24-well-Format vor, eine Inokulation erfolgte mit 100 µl Überstand/ Vertiefung im Doppelansatz. Nach einer Inkubation von 60 min bei 39 °C wurden die Zellen mit vorgewärmtem MEM dreimalig vorsichtig gewaschen, um Reste der Organsuspension zu entfernen. Je Vertiefung wurden 1 ml MEM (2% FKS) zugegeben. Die Zellen wurden über vier Tage bebrütet und täglich lichtmikroskopisch untersucht. Proben, die einen für ARV charakteristischen zytopathischen Effekt mit Bildung von Riesenzellen und dem Ablösen infizierter Zellen aus dem Monolayer verursachten, wurden als ARV-infiziert beurteilt. Negative Proben wurden einmalig passagiert. Hierzu wurden 100 µl des Zellkulturüberstandes auf frische Hühnerembryoleberzellen überführt, das Volumen wurde mit MEM (2%) auf 1 ml aufgefüllt. Diese Zellen wurden wiederum über vier Tage bei 39 °C inkubiert und täglich untersucht. Trat auch bei Passagierung kein zytopathischer Effekt auf, wurde die Probe als negativ für ARV beurteilt.

3.2.7 ELISA-Test zum Nachweis von ARV-spezifischen Antikörpern

Ein Nachweis von ARV-spezifischen Antikörpern aus dem Dotter von Masthuhneiern erfolgte mit einem hauseigenen ELISA. Als Antigen wurden durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigte Virionen des Stammes S1133 eingesetzt. Zur Beschichtung der Reaktionsplatten (96-well-Format, Polysorp) wurde das Antigen in Bicarbonatpuffer auf einen Proteingehalt von 10 µg/ ml eingestellt. In jede Vertiefung der Reaktionsplatte wurden 50 µl der Antigenlösung eingefüllt. Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 2% Magermilch in PBS gewaschen und mit dieser Lösung für eine Stunde inkubiert. Nach dem Ausschütten und Ausklopfen der Platten wurden dieselben bei – 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die zur Untersuchung vorgesehenen Dotterproben wurden 1:5 in PBS verdünnt und durch dreimaliges Frieren und Tauen (-20 °C) mit anschließendem Zentrifugieren (1 min, 3000 rpm, Rotor: Sorvall-Heraeus #7599B) vorbereitet. Zur Testung im ELISA wurden die Proben im Verhältnis 1:10 verdünnt. Mittels eines gegen Hühner-IgY gerichteten und mit Meerrettichperoxidase konjugierten Hyperimmunserums aus Kaninchen (Rabbit- α -Huhn-POD) wurden die im Positivserum enthaltenen Antikörper aus einem Huhn markiert und setzten das Substrat Wasserstoffperoxid um. Dieses verursacht unter Zugabe von OPD im positiven Fall eine gelbe Färbung, deren Intensität photometrisch gemessen wird.

Als Negativkontrollen wurden drei Seren aus spf-Hühnern eingesetzt, als Positivkontrollen dienten Seren aus mit ARV immunisierten Hühnern. Alle Proben und Kontrollen wurden im Doppelansatz getestet.

Die Durchführung des Testes erfolgte bei Raumtemperatur nach dem folgenden Protokoll:

- 1 Zugabe der Dotter- oder Serumprobe, 50 µl, 30 min Inkubation
- 2 Abschütten und Ausklopfen der Platte
- 3 Zugabe Waschpuffer (0,1% Tween in PBS), 50 µl, 1 min Inkubation
- 4 Abschütten und Ausklopfen der Platte
- 5 zweimalige Wiederholung der Schritte 3 und 4
- 6 Zugabe konjugierter Sekundärantikörper (Rabbit- α -Huhn-POD; 1:1000 in PBS), 50 µl, 30 min Inkubation

-
- 7 Zugabe OPD (1mg / ml in Zitratpuffer, zusätzlich 5 μ l H_2O_2 je ml), 50 μ l, 10 min Inkubation in Dunkelheit
 - 8 Zugabe 2M H_2SO_4 , 50 μ l

Eine Auslesung erfolgte durch eine photometrische Messung der Farbreaktion. Die Messung wurde in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm unter Verwendung eines 630 nm Referenzfilters vorgenommen.

3.2.8 Bebrütung der Hühnereier

Die zur Bebrütung vorgesehenen embryonierten Hühnereier wurden mit einem Desinfektionsmittel auf Peressigsäurebasis (Wofasteril®) oberflächlich desinfiziert. Die Eier wurden stehend auf eine Horde platziert und nach einer Ruhephase von 24 Stunden in einem Motorbrüter mit Kippwendung bei 37,5 °C und einer Luftfeuchte von 60% bis zur Inokulation inkubiert.

Nach der Inokulation wurden die Eier stehend in einem Brutschrank bei 37,5 °C und einer Luftfeuchte von 60 % bebrütet. Die Eier wurden täglich durch Schieren auf Vitalität überprüft.

3.2.9 Inokulation der embryonierten Hühnereier

3.2.9.1 Dottersackinokulation

Die Inokulation in den Dottersack erfolgte am sechsten Bebrütungstag nach Standardmethoden (MAYR et al., 1974). Nach Anzeichnung der Luftkammer und Desinfektion der Eischale mit Jodlösung wurden die Eier am stumpfen Pol perforiert. Das Inokulat wurde in einer 1 ml Spritze mit aufgesetzter Kanüle (22G, 1,25“) aufgezogen. Die Kanüle wurde senkrecht in voller Länge in das senkrecht stehende Ei eingestochen. Nach Aspiration von Dotter wurden 0,2 ml Inokulat appliziert. Abschließend wurde das Loch in der Eischale mit Nitrocelluloseklebstoff (UHU hart®) verschlossen und die Eier stehend weiter bebrütet. Eine Kontrolle der Vitalität erfolgte täglich durch Schieren der Eier.

3.2.9.2. Allantoishöhleninokulation

Die Inokulation in die Allantoishöhle nach üblicher Vorgehensweise (MAYR et al., 1974) erfolgte am neunten (in ovo Infektionsversuche) oder 14. (Tierversuch) Bebrütungstag, die Eier wurden analog zur Dottersackinokulation vorbereitet und weiter bebrütet.

Die Allantoishöhlenbeimpfung wurde am senkrecht stehenden Ei durchgeführt. Die Eischale wurde zwischen dem stumpfen Eipol und der Stelle der Luftsackbegrenzung, die dem Embryo am nächsten liegt perforiert. Mit einer Kanüle wurde senkrecht in das Ei eingestochen, nach dem Durchstechen der Eihaut wurde die Kanüle weitere 3 mm vorgeschoben und 0,2 ml des Inokulats wurden appliziert.

3.2.9.3 Titration von Virus in embryonierten Hühnereiern

Der zur Inokulation vorgesehene Virusstock wurde in Zehnerschritten in PBS verdünnt. Je Verdünnungsstufe wurden fünf Eier inokuliert. Die Eier wurden täglich durch Schieren auf Vitalität geprüft. Abgestorbene Eier wurden eröffnet und den enthaltenen Embryonen wurden Organsammelproben (Herz, Leber, Darm) zur weiteren Untersuchung entnommen.

Die Eiinfektiose (EID_{50}) und Eiletale (ELD_{50}) Dosis 50 wurden mit der Methode nach REED und MUENCH (1938) bestimmt.

3.2.10 Tierversuch

3.2.10.1 Tierversuchsgenehmigung

Eine Genehmigung für den durchgeführten Tierversuch wurde durch die Regierung von Oberbayern erteilt. Sie ist dort mit dem Titel „Manifestation einer in ovo Infektion mit Malabsorptionssyndrom- assoziierten aviären Reoviren in Hühnern“ unter dem Aktenzeichen AZ 55.2 -1 -54 -2531 – 55 – 06 dokumentiert.

3.2.10.2 Versuchsaufbau

Im vorliegenden Tierversuch wurden embryonierte Hühnereier der Rasse Lohmann Selected White Leghorn am 14. Lebenstag mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 in die Allantoishöhle inokuliert. Die Versuchstiere wurden gemeinsam mit nicht inokulierten Sentineltieren erbrütet und bis zum 35. Lebenstag aufgezogen. Eine Kontrollgruppe wurde unter gleichen Bedingungen scheininfiziert und aufgezogen. Neben der Evaluierung des klinischen Verlaufs und der Gewichtsentwicklung, wurde eine Virusisolierung aus Versuchs- und Sentineltieren angestrebt, und eine serologische Untersuchung der Tiere durchgeführt. Weiterhin wurden Tiere der pathologischen Untersuchung mit nachfolgender histopathologischer und bakteriologischer Untersuchung zugeführt.

3.2.10.3 Untersuchungen und Probennahmen im zeitlichen Verlauf

Der zeitliche Verlauf des Versuches ist für die Versuchsgruppe in Abb. 5 dargestellt. Eine klinische Untersuchung wurde täglich in beiden Gruppen durchgeführt. Alle Tiere wurden am Tag des Schlupfes, am dritten, siebten, 14., 21., 28., und 35. Lebenstag gewogen.

Aus der Gruppe der Versuchstiere wurden am Tag des Schlupfes, am dritten, siebten, 14., 21. und 28. Lebenstag mindestens je drei Tiere den weiterführenden Untersuchungen zugeführt. Zu Versuchende am 35. und 36. Lebenstag wurden alle verbleibenden Tiere der Versuchsgruppe, sowie die Sentineltiere untersucht. Eine

virologische und pathologische Untersuchung der Kontrolltiere erfolgte am 35. Lebenstag anhand einer Stichprobe, die zehn Tiere umfasste.

Zusätzlich wurden alle verendeten und euthanasierten Tiere virologisch und pathologisch untersucht, wobei eine weiterführende Diagnostik nicht in jedem Falle durchgeführt wurde. Die durchgeführte Probennahme im zeitlichen Verlauf ist im Einzelnen in Tab.1 aufgeführt.

3.2.10.4 Organspektrum für die einzelnen Untersuchungen

Eine Übersicht über das Organspektrum für die einzelnen Untersuchungen gibt Tab.3. Im Einzelnen wurden für die Untersuchungen die folgenden Organe beprobt:

Virologische Untersuchung:

Ein Nachweis von ARV aus infizierten Versuchs- sowie zugesetzten Sentineltieren wurde aus insgesamt sechs verschiedenen Organen angestrebt. Dies waren Leber, Drüsenmagen, Duodenum, Pankreas, Jejunioileum und Bursa Fabricii. Duodenum und Pankreas lagen als Sammelprobe vor. Zusätzlich wurden am 20. Bebrütungstag aus drei embryonierten Eiern Proben der embryonalen Lebern sowie der Chorionallantoismembran entnommen.

Für die virologische Untersuchung der Kontrolltiere wurden Leber sowie Duodenum und Pankreas (ebenfalls als Sammelprobe) entnommen.

Bakteriologische Untersuchung:

Für die bakteriologische Untersuchung wurden Abstriche von Herz, Leber und Lunge genommen. Organproben von Leber, Jejunum, Kolon und so vorhanden Dottersack wurden für die Untersuchung auf *Salmonella sp.* entnommen.

Histologische Untersuchung:

Proben von Herz, Lunge, Leber, Niere, Nebenniere, Milz, Pankreas, Drüsenmagen, Muskelmagen, Duodenum, Jejunioileum, Zäkum und Kolon wurden zur weiterführenden histopathologischen Untersuchung entnommen.

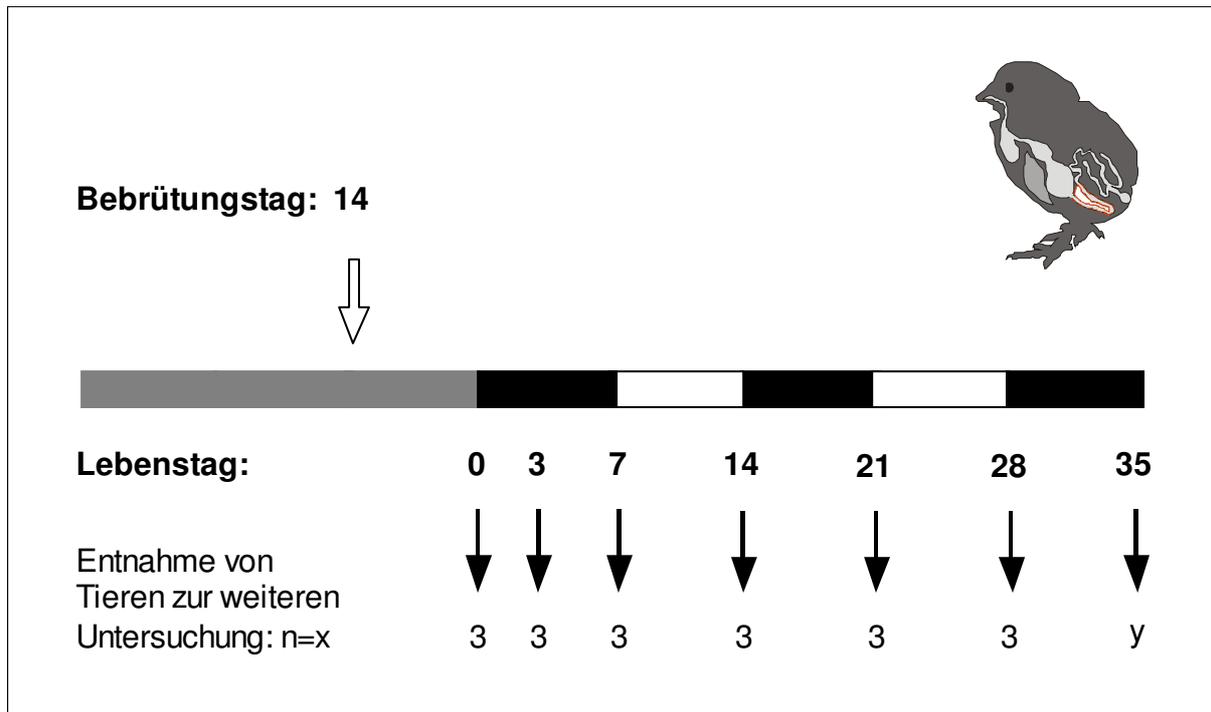


Abb. 5: Skizzierung des Versuchsablaufs in der Versuchsgruppe

Abgebildet ist der zeitliche Verlauf in Wochenabschnitten, dargestellt durch Balken in grau, schwarz und weiß. Aufgetragen ist der Zeitpunkt der Inokulation mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 (\Downarrow) am 14. Bebrütungstag, sowie die Entnahme von Versuchstieren zur weiteren Untersuchung (\downarrow) an den angegebenen Lebenstagen. Am 35. Lebenstag endet der Versuch, und alle noch lebenden Tiere (y) werden zur Beprobung entnommen. Die Beprobung von verstorbenen und euthanasierten Tieren ist hier nicht dargestellt.

Tab. 3: Durchgeführte Untersuchungen bei Tieren der Versuchsgruppe

Lebenstag	0	1	2	3	4	5	6	7
Untersuchte Tiere gesamt (n)	5	1	1	10	4	10	4	6
Abgangsursache (v*, e**)	v e	v e	v e	v e	v e	v e	v e	v e
Anzahl	- 5	1 -	1 -	3 7	4 -	6 4	- 4	- 6
Durchgeführte Untersuchungen bei x Tieren								
Virologie	- 5	1 -	0 -	0 6	4 -	0 4	- 4	- 6
Serologie	- 0	0 -	0 -	0 0	0 -	0 0	- 0	- 0
Pathologie	- 5	1 -	1 -	3 7	4 -	6 4	- 4	- 6
Bakteriologie	- 5	1 -	0 -	0 6	4 -	0 4	- 2	- 6
Histopathologie	- 0	0 -	0 -	0 6	0 -	0 4	- 4	- 6
Lebenstag	11	12	14	21	28	35	36	
Untersuchte Tiere gesamt (n)	1	2	3	3	3	11	10	
Abgangsursache (v*, e**)	v e	v e	v e	v e	v e	v e	v e	
Anzahl	1 -	1 1	- 3	- 3	- 3	- 11	- 10	
Durchgeführte Untersuchungen bei x Tieren								
Virologie	1 -	1 1	- 3	- 3	- 3	- 11	- 10	
Serologie	0 -	0 0	- 2	- 3	- 3	- 11	- 10	
Pathologie	1 -	1 1	- 3	- 3	- 3	- 11	- 10	
Bakteriologie	1 -	1 0	- 3	- 3	- 3	- 11	- 10	
Histopathologie	1 -	1 1	- 3	- 3	- 3	- 11	- 10	

*(v) verendet; **(e) euthanasiert

3.2.10.5 Inokulation der Eier

Am 14. Bebrütungstag wurden die Eier, wie bereits dargelegt, in die Allantoishöhle inokuliert. Die zur Erbrütung der Versuchstiere vorgesehenen Eier wurden mit 10^4 pbE des ARV-Isolats 8474DP4-6 in einem Volumen von 0,2 ml inokuliert, die zur Erbrütung der Kontrolltiere vorgesehenen Eier wurden mit 0,2 ml PBS scheininfiziert. Die Eier zur Erbrütung der Sentineltiere wurden nicht inokuliert.

Nach der Inokulation wurden die Eier bis zum Schlupf der Küken liegend bebrütet (37,5 °C, 60% Luftfeuchte). Der Schlupf der Kontrolltiere erfolgte zeitlich versetzt und räumlich getrennt von den Versuchstieren. Nach dem Schlupf verblieben die Küken bis zur vollständigen Trocknung im Brutschrank, wurden mit Flügelmarken gekennzeichnet und in einem geschlossenen Behältnis in einen Isolierstall überführt.

3.2.10.6 Aufstallung und Haltung der Tiere

Die Tiere wurden nach Gruppen getrennt in separaten Abteilen eines Isolierstalls aufgestellt. Die Abteile standen unter Unterdruck und waren mit HEPA-Abluftfiltern ausgestattet. Weiterhin wiesen die Abteile Fenster auf, so dass das einfallende Licht dem Tageslicht entsprach. Der Zutritt zu den Abteilen erfolgte über eine Hygieneschleuse. Hier wurden ein Kleider- und Schuhwechsel, sowie eine Händedesinfektion durchgeführt, weiterhin wurden vor Betreten des Abteils Handschuhe angelegt.

Jeder Gruppe stand eine Fläche von neun Quadratmetern zur Verfügung, die Tiere wurden in Bodenhaltung auf Sägespänen gehalten. In den ersten zehn Lebenstagen wurden in den Abteilen Wärmelampen betrieben: Die Stalltemperatur wurde anhand des Verhaltens der Küken beurteilt und so eingestellt, dass die Tiere sich in allen Bereichen des Stalls gleichmäßig bewegten. Den Tieren stand Wasser und ein Aufzuchtfutter (all-mash-A, Deuka, Regensburg) ad libitum zur Verfügung.

3.2.10.7 Untersuchungen

3.2.10.7.1 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung wurde in beiden Gruppen täglich in Form einer Herdenuntersuchung durchgeführt. Nach einer Kontrolle der Umweltbedingungen (Temperatur, Belüftung, Lichtverhältnisse) wurden zunächst das Herdenverhalten, die Futter- und Wasseraufnahme und die Beschaffenheit der Ausscheidungen überprüft. Daraufhin erfolgte eine adspektorische Untersuchung der Tiere, wobei die Tiere auf Krankheitszeichen wie gesträubtes Gefieder, geschlossene Augen, Bewegungsunlust, Durchfälle und respiratorische Symptome untersucht wurden. Zusätzlich wurde im Rahmen der klinischen Untersuchung die aktuelle Tierzahl erhoben.

3.2.10.7.2 Wiegen

Das Körpergewicht der einzelnen Tiere wurde am Tag des Schlupfes, am dritten, siebten, 14., 21., 28. und 35. Lebenstag durch Wiegen ermittelt. Die Tiere wurden hierzu auf eine Waage (Kern 510, Kern und Sohn GmbH, Balingen) gesetzt, das Gewicht in Gramm wurde abgelesen und dokumentiert.

3.2.10.7.3 Töten der Tiere

Das Töten von Tieren wurde vor der Probennahme an den entsprechenden Tagen, sowie am Ende des Versuchs erforderlich. Die Tiere wurden an den Beinen fixiert und durch einen kräftigen Schlag auf das Hinterhaupt mit einem Holzstab betäubt. Anschließend wurde die Arteria carotis communis durch einen scharfen Schnitt durchtrennt und die Tiere durch Ausbluten getötet. Das Blut wurde für nachfolgende serologische Untersuchungen aufgefangen.

Bei Tieren, die mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden aus Tierschutzgründen euthanasiert werden mussten, wurde gleichermaßen verfahren.

3.2.10.7.4 Pathologische Untersuchung

Bei der pathologischen Untersuchung wurden die Tiere zunächst adspektorisch begutachtet. Die Befiederung und die äußere Haut wurden auf Veränderungen hin untersucht, außerdem erfolgte eine Adspektion der Körperöffnungen. Weiterhin wurde der Ernährungszustand anhand der Dicke des M. pectoralis im Vergleich zur Carina sterni beurteilt.

Nach der Eröffnung der Körperhöhle wurden zunächst Abstriche von Leber, Herz und Lunge für die bakteriologische Untersuchung genommen. Anschließend erfolgte eine adspektorische Untersuchung der Körperhöhle mit eingehender Betrachtung der inneren Organe. Eine zügige Entnahme der Organproben für die histologische, virologische und bakteriologische Untersuchung folgte. Dabei wurden die Organe auch im Anschnitt beurteilt, Organe des Magen-Darmtraktes wurden eröffnet.

3.2.10.7.5 Bakteriologische Untersuchung

Im Rahmen der pathologischen Untersuchung wurden Abstriche von Leber, Herz und Lunge genommen. Die Abstriche wurden mit einer Impföse im Drei-Ösen-Ausstrich auf Columbia-Blut- (Blutagar), Colistinsulfat-Nalidixinsäure- (CNA) und Eosin-Methylenblau-Agar (EMBA) ausgestrichen. Während Blutagar ein nicht selektives Medium darstellt, ist CNA ein Selektivmedium für grampositive Keime. EMBA ist ein besonders für *Enterobacteriaceae* günstiges Medium. Die Nährböden wurden über Nacht bei 37° C aerob bebrütet. Gewachsene Kolonien wurden subkultiviert, um eine Reinkultur zu erhalten. Die Differenzierung der isolierten Bakterien erfolgte im bakteriologischen Labor der Klinik für Vögel. Grundsätzlich wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

Zur Differenzierung wurde zunächst eine Färbung nach Gram durchgeführt. Durch die Gramfärbung wurden in einem ersten Schritt *Bacillus sp.* identifiziert. Diese Spezies zeigt sich als Gram-labiles dünnes Stäbchen. Eine Klassifizierung in Subspezies wurde nicht durchgeführt.

Die Gram-negativen Bakterien wurden durch einen Oxidase-Test weiter differenziert. Eine biochemische Identifikation der Oxidase-negativen Bakterien, darunter *Escherichia coli*, wurde mit dem API 20 E Test (bioMérieux GmbH, Nürtingen)

durchgeführt. Die Oxidase-positiven Spezies wurden mit Hilfe des API 20 NE Tests (bioMérieux GmbH, Nürtingen) identifiziert, zu dieser Gruppe zählt beispielsweise *Enterobacter sp.*

Die Gram-Positiven Bakterien wurden im Katalase-Test weiter differenziert. *Staphylococcus sp.* ist Katalase-positiv. Eine Ausschlussdiagnostik von *Staphylococcus aureus*, der unter anderem Hyaluronidase als Virulenzfaktor aufweist, wurde durch einen Dekapsulationstest geführt. Hierbei wird der fragliche Keim auf Blutagar in parallelen Strichen ausgebracht. Senkrecht dazu wird *Streptococcus equi* ausgestrichen. In den Kreuzungspunkten zeigt sich bei Vorhandensein von Hyaluronidase ein schleimiges Wachstum der Streptokokken.

Die Katalase-negativen Bakterien, darunter *Streptococcus sp.* und *Enterococcus sp.* wurden zur weiteren Differenzierung auf Kanamycin-Aesculinsäure-Agar (KAA) subkultiviert.

Die bakteriologische Untersuchung auf *Salmonella sp.* erfolgte in Anlehnung an das Protokoll nach ISO 6579:2002. Zur Anreicherung wurden Organproben von Leber, Jejunum, Kolon und so vorhanden Dottersack in gepuffertes Peptonwasser gegeben und für 20 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte eine Selektion in Rappaport-Vassiliadis-Medium, die Inkubation erfolgte hier für 24 Stunden bei 41,5 °C. Von dem Selektionsansatz wurde ein Ausstrich auf Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLDA) angefertigt. Die XLDA-Nährböden wurden bei 37 °C für 24 Stunden bebrütet.

3.2.10.7.6 Histologische Untersuchung

3.2.10.7.6.1 Einbetten und Anfertigen der Gewebedünnschnitte

Für die histologische Untersuchung wurden Proben von Herz, Lunge, Leber, Niere, Nebenniere, Milz, Pankreas, Drüsenmagen, Muskelmagen, Duodenum, Jejunioileum, Zäkum und Kolon entnommen. Die Proben, die eine Kantenlänge von etwa einem Zentimeter aufwiesen, wurden nach der Entnahme sofort in 3,7% Formalin in PBS fixiert. Hohlorgane wurden mit Hilfe einer Knopfkanüle vorsichtig mit Formalinlösung gespült, um insbesondere im Darm Artefakte durch Autolyse zu vermeiden. Die Fixierung der Proben erfolgte über einen Zeitraum von wenigstens 24 Stunden.

Die formalinfixierten Proben wurden in etwa drei Millimeter dicke Scheiben zugeschnitten und in eine Einbettkassette gegeben. Hierbei wurde eine Austrocknung der Proben vermieden. Die Kassetten wurden zunächst unter fließendem Wasser für 60 Minuten gewässert und anschließend in einen Gewebeeinbettautomaten (ThermoShandon Citadel) in Paraffin eingebettet. Im Automat wurden die Proben automatisch für jeweils 60 Minuten in flüssigkeitsgefüllte Behälter getaucht und in diesen automatisch bewegt. Zunächst wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80%, 96%, 100% Ethanol) entwässert, hierbei standen je Konzentrationsstufe zwei Behälter zu Verfügung. Danach wurde der Alkohol durch Aceton und Xylol entfernt und es folgte die abschließende Einbettung in Paraffin.

Nach der Einbettung erfolgte die Herstellung der Paraffinblöcke mit Hilfe eines Einbettsystems (ThermoShandon Histocentre 2). Die Einbettkassetten wurden in den Paraffintank überführt. Die eingebetteten Organe wurden auf einer Wärmeplatte aus den Kassetten entnommen und in Einbettschälchen eingelegt. Diese wurden mit flüssigem Paraffin gefüllt und mit der Einbettkassette als Träger abgedeckt. Nach dem Erkalten des Paraffins wurden die Blöcke aus den Einbettschälchen ausgelöst und auf einer Kühlplatte (-10 °C) gekühlt. Der gekühlte Paraffinblock wurde in ein Schlittenmikrotom eingespannt. Nach Erzeugung einer planen Schnittfläche wurden Dünnschnitte mit einer Stärke von 2 µm angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad (40 °C) gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 50 °C getrocknet.

3.2.10.7.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Färbung wurden die auf Objektträger aufgezogenen Gewebedünnschnitte mit Xylol entparaffiniert. Nach einer Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe erfolgte die Färbung. Anschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe erneut entwässert. Die Lösungen lagen in Küvetten vor, in welche die Objektträger eingetaucht wurden. Das Färbeprotokoll im Einzelnen:

Entparaffinierung:

- 1 Xylol, 5 min, eine Wiederholung

Rehydrierung:

- 2 Isopropanol, 3 min, eine Wiederholung
- 3 96% Isopropanol, 3 min
- 4 80% Isopropanol, 3 min
- 5 70% Isopropanol, 3 min
- 6 50% Isopropanol, 3 min
- 7 Aqua destillata, 3 min

Färbung:

- 8 Hämalaun nach Meyer, 15 min
- 9 Wässern mit fließendem Leitungswasser, 10 min
- 10 Eosin, 2 min
- 11 Spülen in Aqua dest.

Entwässerung:

- 12 70% Isopropanol, kurz spülen
- 13 80% Isopropanol, kurz spülen
- 14 90% Isopropanol, kurz spülen
- 15 Isopropanol, 1 min, eine Wiederholung
- 16 Xylol, 5 min, eine Wiederholung

Die Schnitte wurden mit einem wasserfreien Einschlussmittel (Roti[®]-Histokitt; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) unter Deckgläschen eingedeckelt. Abschließend erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung und Befundung der Gewebeschnitte.

3.2.10.8 Statistische Auswertung der Daten zum Körpergewicht

Ziel war der Nachweis einer geringeren Gewichtszunahme in der Versuchsgruppe. Für jeden Untersuchungszeitpunkt wird jeweils die Gewichtszunahme (Differenz des aktuellen Gewichtes zum Ausgangsgewicht am Tag 0) betrachtet. Diese Gewichtszunahme wird für die jeweiligen Untersuchungstage mit Hilfe des exakten Wilcoxon Rangsummentests (Mann-Whitney-Test) verglichen. Die Berechnungen erfolgten mit R 2.0.1 (R : Copyright 2005, The R Foundation for Statistical Computing, Version 2.1.1 (2005-06-20), ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>)

Statistische Nullhypothese: Die mittlere Gewichtszunahme ist in beiden Gruppen gleich.

Alternativhypothese: Die mittlere Gewichtszunahme in der Versuchsgruppe ist kleiner als die mittlere Gewichtszunahme in der Kontrollgruppe.

Irrtumswahrscheinlichkeit: $\alpha=0.05$

Kritischer p-Wert: Es finden 6 parallele Testungen statt (Tage 3,7,14,21,28,35). Deshalb wird eine Bonferroni-Korrektur angewendet. Der kritische p-Wert ist somit $\alpha^*=0.05/6=0.008333$.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen in spezifiziert pathogenfreien Hühnereiern

4.1.1 Vergleichende Infektion von spf-Eiern in Dottersack und Allantoishöhle

Mit dem Ziel, die Pathogenität von ARV im embryonierten Hühnerei zu evaluieren, wurden spf-Eier der Rasse Lohmann Selected White Leghorn mit dem MAS-assoziierten ARV-Isolat 8474DP4-6, sowie dem ARV-Impfstamm S1133 vergleichend in den Dottersack und in die Allantoishöhle inokuliert. Aus den Virusstocks wurden in Zehnerschritten Verdünnungsreihen erstellt, je Verdünnungsstufe wurden fünf bis acht Eier inokuliert. Der Infektionsstatus der Embryonen wurde durch Anzucht von ARV auf primären Hühnerembryoleberzellen aus einer Organsuspension (Sammelprobe aus Herz, Leber und Darm) überprüft. Die eifektiöse Dosis 50 (EID₅₀) und die eiletale Dosis 50 (ELD₅₀) wurden mit der Infektiosität des jeweiligen Virusstocks (pbE/ ml) in Relation gesetzt, um eine für beide Virusstämme vergleichbare Angabe zu erhalten (Tab. 4).

Die Inokulation in den Dottersack erfolgte am sechsten Bebrütungstag, für den Stamm S1133 betrug eine EID₅₀ 0,27 pbE, eine ELD₅₀ nahm den gleichen Wert ein. Nach Dottersackinokulation mit dem Stamm 8474DP4-6 nahmen EID₅₀ und ELD₅₀ mit 0,05 pbE für diesen Stamm ebenfalls den gleichen Wert ein. Um 50% der Embryonen zu infizieren oder zu töten, ist bei dem Stamm S1133 verglichen mit dem Stamm 8474DP4-6 etwa die fünffache Dosis (gemessen in pbE) erforderlich. Nach Dottersackinokulation kam es bei beiden Stämmen nicht zum Überleben infizierter Embryonen, dies spiegelt sich in dem Verhältnis von EID₅₀ zu ELD₅₀ wider, welches hier 1 beträgt.

Die Allantoishöhleninokulation wurde am neunten Bebrütungstag vorgenommen, für den Stamm S1133 betrug eine EID₅₀ 1,82 pbE, eine ELD₅₀ betrug für diesen Stamm 3,28 pbE. Eine EID₅₀ nahm für den Stamm 8474DP4-6 einen Wert von 4,87 pbE ein. Alle infizierten Embryonen überlebten nach Allantoishöhleninokulation mit diesem Stamm und bis zum 19. Bebrütungstag starb keines der inokulierten Eier, damit war keine ELD₅₀ zu bestimmen. Gemessen in pbE war für den Stamm 8474DP4-6 im

Vergleich zum Stamm S1133 etwa die doppelte Dosis erforderlich um nach Allantoishöhleninokulation 50% der Embryonen zu infizieren. Nach der Inokulation in die Allantoishöhle mit dem Stamm S1133 kam es vereinzelt zu überlebenden infizierten Embryonen, während nach Beimpfung mit dem Stamm 8474DP4-6 alle infizierten Embryonen überlebten.

Vergleicht man die Inokulationswege für die einzelnen Stämme so ist festzustellen, dass nach Inokulation in die Allantoishöhle eine höhere Impfdosis toleriert wird.

Um 50% der Embryonen zu infizieren, war bei Allantoishöhleninokulation mit dem Stamm S1133 im Vergleich zur Dottersackbeimpfung etwa die 6fache Dosis erforderlich, um 50% der Embryonen zu töten, in etwa die 10fache Dosis.

Für den Stamm 8474DP4-6 war nach Allantoishöhleninokulation eine nahezu 100fache Dosis nötig um 50 % der Eier zu infizieren, als nach Dottersackbeimpfung.

Tab. 4: Vergleichende Inokulation von spf-Eiern

Virusstamm		S1133	8474DP4-6
pbE/ ml		$9,1 \times 10^4$	$7,7 \times 10^3$
Dottersack- inokulation	EID ₅₀	$3,39 \times 10^5$	$1,48 \times 10^5$
	ELD ₅₀	$3,39 \times 10^5$	$1,48 \times 10^5$
	EID ₅₀ / ELD ₅₀	1	1
	pbE/ EID ₅₀	0,27	0,05
	pbE/ ELD ₅₀	0,27	0,05
Allantoishöhlen- inokulation	EID ₅₀	5×10^4	$1,58 \times 10^3$
	ELD ₅₀	$2,81 \times 10^4$	-
	EID ₅₀ / ELD ₅₀	1,8	-
	pbE/ EID ₅₀	1,82	4,87
	pbE/ ELD ₅₀	3,24	-

Zusätzlich wurde der Zeitraum von der Inokulation bis zum Absterben der infizierten Embryonen bestimmt (Tab. 5). Die Untersuchung der Eier erfolgte einmal täglich, so dass die kleinste gemessene Zeiteinheit 24 Stunden betrug.

Für den Stamm S1133 betrug die mittlere Absterbezeit nach Inokulation in den Dottersack konzentrationsabhängig zwischen 110 und 240 Stunden. Betrachtet man die mittlere Absterbezeit nach Dottersackbeimpfung mit dem Stamm 8474DP4-6, so

zeigt sich ebenfalls ein konzentrationsabhängiger Verlauf. Inokuliert wurde mit 15,4; 1,54 und 0,15 pbE. Die mittlere Absterbezeit betrug für diese Inokulationsdosen 162, 192 und 296 Stunden und nahm damit gleichartige Werte ein, wie nach der Dottersackinokulation mit gleicher Dosis des Stammes S1133.

Nach Allantoishöhleninokulation mit dem Stamm S1133 betrug die mittlere Absterbezeit dosisabhängig zwischen 100 und 168 Stunden und war damit geringförmig kürzer als nach Dottersackinokulation. Nach Allantoishöhleninokulation mit dem Stamm 8474DP4-6 kam es nicht zum Absterben von Embryonen.

Tab. 5: Mittlere Absterbezeit der infizierten Embryonen nach Inokulation

Virusstamm	S1133			8474DP4-6		
	Inokulationsdosis (pbE/ Inokulum)	mittlere Absterbezeit (Stunden)	Überlebende/ Infizierte Embryonen	Inokulationsdosis (pbE/ Inokulum)	mittlere Absterbezeit (Stunden)	Überlebende/ Infizierte Embryonen
Dottersackinokulation	$1,8 \times 10^3$	110,4	0/5	$1,54 \times 10^3$	-	-
	$1,8 \times 10^2$	126	0/5	$1,54 \times 10^2$	-	-
	$1,8 \times 10^1$	153,6	0/5	$1,54 \times 10^1$	162	0/4
	$1,8 \times 10^0$	192	0/5	$1,54 \times 10^0$	192	0/5
	$1,8 \times 10^{-1}$	240	0/2	$1,54 \times 10^{-1}$	296	1/3
Allantoishöhleninokulation	$1,8 \times 10^3$	100	0/6	$1,54 \times 10^3$	-	-
	$1,8 \times 10^2$	108	0/6	$1,54 \times 10^2$	-	-
	$1,8 \times 10^1$	112	0/6	$1,54 \times 10^1$	∞	4/4
	$1,8 \times 10^0$	156	1/3	$1,54 \times 10^0$	∞	1/1
	$1,8 \times 10^{-1}$	168	0/0	$1,54 \times 10^{-1}$	∞	0/0

(-) nicht untersucht; (∞) kein Absterben von Embryonen

Da es bei der Allantoishöhlenbeimpfung mit dem Stamm 8474DP4-6 nicht zum Absterben von Embryonen kam, wurde eine Wiederholung des Versuches durchgeführt (Tab. 6). Die für den oben dargestellten Inokulationsversuch eingesetzte Virusanzucht hatte mit $7,7 \times 10^3$ pbE/ ml einen relativ niedrigen Titer. Da Verdünnungsreihen erstellt wurden, wies die höchste überprüfte Inokulationsdosis eine Konzentration von $7,7 \times 10^1$ pbE/ ml auf. Die Allantoishöhleninokulation wurde daher mit einem Virusstock mit höherer Ausgangsinfektiosität ($3,6 \times 10^5$ pbE/ ml) wiederholt, der auch unverdünnt verimpft wurde. Zur Inokulation wurden spf-Eier einer Charge verwendet, die Inokulation wurde gleichförmig und am selben Tag durchgeführt.

In den drei Wiederholungsversuchen wurde die mittlere Zeit bis zum Absterben der infizierten Embryonen ermittelt und zusätzlich beurteilt, wie viele der infizierten Embryonen bis zum 19. Bebrütungstag überlebten (Tab. 6).

Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Allantoishöhleninokulation mit einer höheren Virusdosis zum Absterben von infizierten Embryonen kommen kann. Die ermittelte mittlere Zeit bis zum Absterben der infizierten Embryonen wies starke Schwankungen auf. So waren die Absterbezeiten bei gleicher Inokulationsdosis deutlich unterschiedlich. Zusätzlich zeigte sich, anders als bei den oben dargestellten Inokulationsversuchen mit dem Stamm S1133, keine Dosisabhängigkeit, so dass Eier, welche mit einer höheren Dosis inokuliert wurden, teilweise länger überlebten als mit einer niedrigeren Dosis inokulierte Eier. Auffällig wurde für den Stamm 8474DP4-6, der hohe Anteil an Überlebenden an den infizierten Embryonen. Auch beim Auftreten von bis zum 19. Bebrütungstag überlebenden Embryonen konnte keine Korrelation mit der Inokulationsdosis gefunden werden.

Tab 6: Wiederholte Allantoishöhlennokulation von spf-Eiern mit dem Stamm 8474DP4-6

8474DP4-6		I		II		III	
Allantoishöhlen- inokulation	Inokulations- dosis (pbE/ Inokulum)	mittlere	Überlebende/ Infizierte	mittlere	Überlebende/ Infizierte	mittlere	Überlebende/ Infizierte
		Absterbezeit (Stunden)	Embryonen	Absterbezeit (Stunden)	Embryonen	Absterbezeit (Stunden)	Embryonen
	$7,2 \times 10^4$	60	1/3	104	0/3	102	0/4
	$7,2 \times 10^3$	80	1/4	80	1/4	125	2/7
	$7,2 \times 10^2$	132	3/5	240	1/2	112	0/6
	$7,2 \times 10^1$	144	1/3	112	1/4	120	2/5
	$7,2 \times 10^0$	128	2/5	126	0/4	144	2/4
	$7,2 \times 10^{-1}$	136	0/3	∞	1/1	120	0/4

(∞) kein Absterben von Embryonen

4.2 Tierversuch

4.2.1 Inokulation und Schlupfrate

Die embryonierten Eier, aus denen die Tiere der **Kontrollgruppe** schlüpfen sollten wurden am 14. Bebrütungstag mit 0,25 ml PBS-Puffer inokuliert. Bis zum 21. Bebrütungstag wurden die Eier täglich geschickt. In diesem Zeitraum starben keine Embryonen ab. Aus 108 beimpften Eiern schlüpften am 21. Bebrütungstag n=50 Kontrolltiere. Die Schlupfrate nahm einen Wert von 46,3% ein.

Für den Aufbau der **Versuchsgruppe** wurden n=133 am 14. Bebrütungstag mit 0,25 ml Inokulum in die Allantoishöhle beimpft. Die Infektionsdosis betrug $2,5 \times 10^4$ pbE je Ei. Zwischen Inokulation und dem 21. Bebrütungstag wurden die Eier mittels Schieren täglich auf Lebenszeichen untersucht, in diesem Zeitraum starben 26 Eier ab. Aus 133 inokulierten Eiern schlüpften am 21. Bebrütungstag n=69 Küken. Die Schlupfrate betrug damit 51,9%.

Aus 17 unbeimpften embryonierten Hühnereiern sollten **Sentineltiere** schlüpfen. Bis zum 21. Bebrütungstag starben 5 Eier ab. Am 21. Bebrütungstag schlüpften n=8 Sentineltiere, die Schlupfrate betrug 47%.

4.2.2 Klinische Herdenuntersuchung

Im Rahmen der klinischen Herdenuntersuchung wurde täglich der Gesundheitszustand der Tiere beurteilt und der Anteil klinisch erkrankter Tiere an der Herde ermittelt. Der Anteil klinisch erkrankter Tiere wurde getrennt für einzelne Symptomkomplexe in einen semiquantitativen klinischen Index umgesetzt. Dieser semiquantitative Index spiegelt den Anteil erkrankter Tiere an der Herde wider, ein Index von 1 entspricht einem Anteil erkrankter Tiere von bis zu 15% (einige Tiere), ein Index von 2 kommt einem Anteil von 15-50% (mehrere Tiere) gleich und ein Index von 3 entspricht einem Anteil von über 50 % (die Mehrzahl der Tiere).

In der **Kontrollgruppe** zeigte sich ein zeitlich begrenztes Krankheitsgeschehen mit einem reduziertem Allgemeinbefinden der Tiere und einer milden Durchfallsymptomatik von Tag sechs bis neun nach Schlupf. Die betroffenen Tiere zeigten ein leicht- bis mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden, das mit einer verminderten Fress- und Bewegungsaktivität, sowie einem erhöhten Schlaf- und Wärmebedürfnis einherging. Bei der Ermittlung des Anteils an Tieren mit gestörtem Allgemeinbefinden (Abb.6 A) zeigte sich eine rasche Zunahme erkrankter Tiere in der Herde bis an Tag sieben die Mehrzahl der Tiere erkrankt war. An den Tagen acht und neun erfolgte dann ein nachfolgendes ebenso rasches Abnehmen des Anteils erkrankter Tiere.

Die erkrankten Tiere zeigten darüber hinaus milden Durchfall (Abb. 6 B), der Kotanteil der Ausscheidungen der Hühner war in diesem Fall von dünnbreiiger Konsistenz. Darüber hinaus wurden auch eine erhöhte Feuchtigkeit der Einstreu, sowie kotverklebtes Gefieder in der Kloakenregion auffällig. Von der Durchfallsymptomatik waren an Tag sechs mehrere Tiere, an den Tagen sieben und acht die Mehrzahl der Herde und an Tag neun einige Tiere betroffen. Eine antibiotische Behandlung der Tiere mit Enrofloxacin wurde vom sechsten bis zehnten Lebenstag durchgeführt, um die Auswirkungen einer bakteriellen Infektion zu begrenzen. Enrofloxacin wurde in einer Dosierung von 10 mg je kg Körpermasse und Tag über das Trinkwasser verabreicht. Ab Tag zehn nach Schlupf zeigten alle Tiere der Kontrollgruppe ein ungestörtes Allgemeinbefinden. An Tag 28 nach Schlupf zeigten einzelne Tiere der Kontrollgruppe Pickverletzungen im Bereich der Kloake und des Bürzels. Nach Abdunkelung des Stalles und Verabreichung von Kochsalz

über das Trinkwasser (1g/ L) für je sechs Stunden an den Tagen 28 und 29 traten keine weiteren verletzten Tiere auf und die bestehenden Verletzungen heilten ab.

In der **Versuchsgruppe** wurden von Tag zwei bis Tag 17 nach Schlupf Tiere mit hochgradig reduziertem Allgemeinbefinden auffällig (Abb.6 C; Abb. 7). Erkrankte Tiere verweigerten das Futter und nahmen auch weniger Wasser auf. Einzel untersuchte Tiere wiesen eine schlechte Kropffüllung und einen reduzierten Hydratationszustand auf. Die betroffenen Tiere zeigten sich apathisch und verharrten meist stehend oder sitzend mit geschlossenen Augen, der Fluchtreflex fehlte bei erkrankten Tieren. Das Wärmebedürfnis der Tiere war deutlich erhöht. Erkrankte Küken drängten sich unter der Wärmelampe und in den Ecken dicht zusammen. Einige der betroffenen Tiere zeigten ein feines, generalisiertes Muskelzittern. Der Anteil der Tiere mit gestörtem Allgemeinbefinden in der Versuchsgruppe stieg an den Tagen zwei und drei kontinuierlich an, bis an den Tagen vier bis sieben die Mehrheit der Gruppe betroffen war. Ab Tag acht nahm der Anteil der Tiere mit reduziertem Allgemeinbefinden wieder ab, bis einschließlich Tag zehn waren noch einige Tiere betroffen und zwischen Tag zehn und siebzehn einzelne Tiere.

Von Tag zwei bis acht zeigten die erkrankten Tiere eine mittelgradige Durchfallsymptomatik (Abb. 6 D). Hierbei fiel eine Verflüssigung des Kotanteils in den Ausscheidungen bis zu supziger Konsistenz ebenso auf wie kotverklebte Kloaken und eine vermehrte Feuchtigkeit der Einstreu. Der Anteil an Tieren mit Durchfallsymptomatik stieg von Tag zwei bis fünf kontinuierlich an, bis an den Tagen sechs und sieben die Mehrheit der Versuchsgruppe betroffen war. An Tag acht zeigten dann nur noch einige Tiere Durchfall.

Eine antibiotische Behandlung der Tiere mit Enrofloxacin in einer Dosierung von 10 mg je kg Körpermasse je Tag erfolgte vom zweiten bis zum sechsten Lebenstag. Nach Auftreten von Bakterien, die sich im Resistenztest als unempfindlich gegen Enrofloxacin erwiesen, wurde die antibiotische Behandlung vom siebten bis elften Tag auf Colistin in einer Dosierung von 125.000 IE umgestellt. Beide Präparate wurden über das Trinkwasser verabreicht.

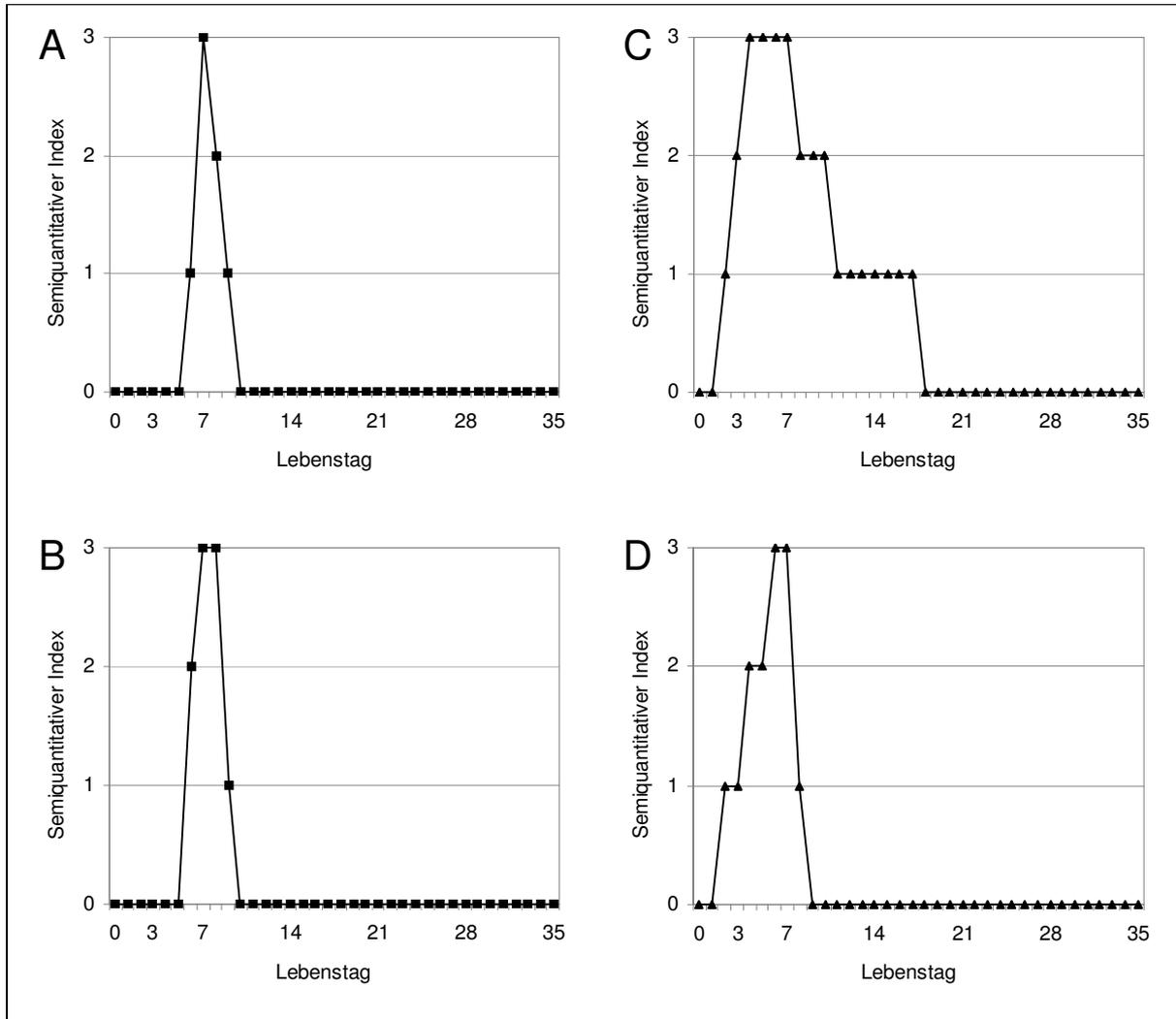


Abb. 6: Anteil erkrankter Tiere an den Gruppen

Dargestellt ist der relative Anteil erkrankter Tiere mit reduziertem Allgemeinbefinden an der Kontroll- (A) und der Versuchsgruppe (C) im zeitlichen Verlauf. Weiterhin ist der Anteil an Tieren mit Durchfallsymptomen an der Kontroll- (B) und der Versuchsgruppe (D) im Verlauf des Versuches aufgetragen. Der semiquantitative Index beschreibt den geschätzten Anteil erkrankter Tiere an der Herde. Ein semiquantitativer Index von 1 entspricht einem Anteil erkrankter Tiere von bis zu 15% (einige Tiere), ein Index von 2 kommt einem Anteil von 15-50% (mehrere Tiere) gleich und ein Index von 3 entspricht einem Anteil von über 50 % (die Mehrzahl der Tiere).

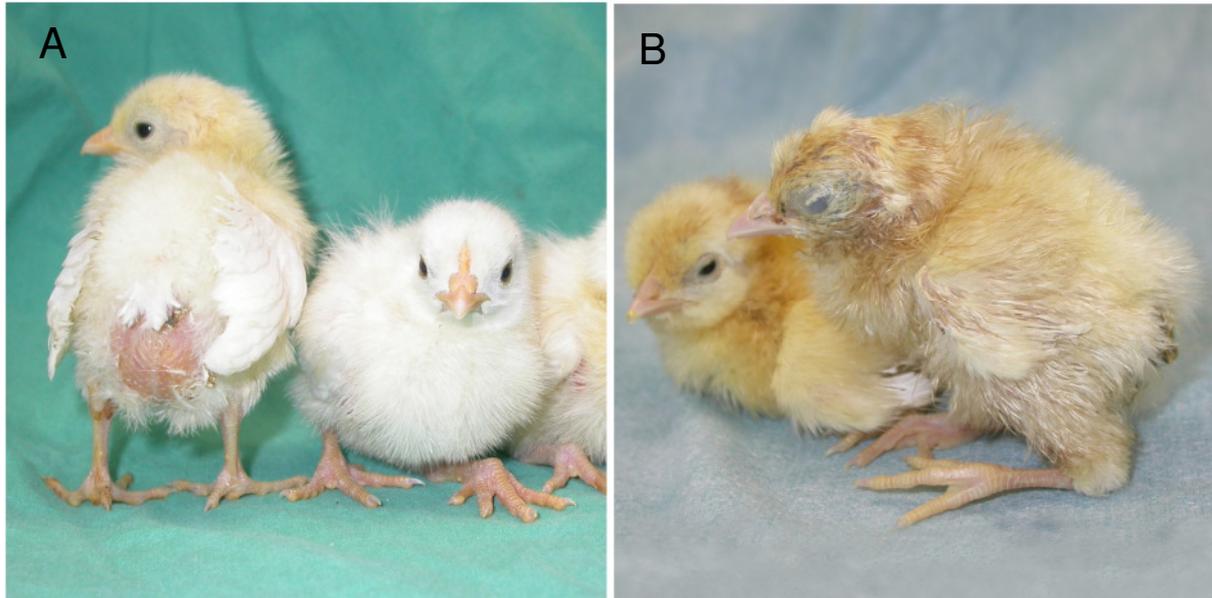


Abb. 7: Klinisch erkrankte Küken aus der Versuchsgruppe

Die Abbildung zeigt klinisch erkrankte Küken am siebten (A) und dritten (B) Lebenstag. In Bild A fällt das Küken links auf, welches ein pralles Abdomen aufweist. In der pathologischen Untersuchung wies dieses Tier eine Dottersackretention auf. In Bild B ist im Vordergrund ein hochgradig erkranktes, apathisches Tier zu sehen. Zusätzlich wird eine kotverklebte Kloake (cloacal pasting) offensichtlich. Das Tier wurde aus Tierschutzgründen euthanasiert.

4.2.3 Tierzahlen

Bei der täglichen Adspektion der Kontroll- und Versuchsgruppe wurde zudem die Anzahl der Tiere in der jeweiligen Herde erfasst (Abb. 8). Am Tag des Schlupfes zählte die Kontrollgruppe 50, die Gruppe der infizierten Tiere 69 und die der Sentineltiere acht Individuen.

In der **Kontrollgruppe** waren bis zu Versuchende sieben Abgänge zu verzeichnen, drei Tiere starben und vier wurden euthanasiert. Am sechsten, achten und 27. Lebenstag verendete je ein Tier. Tiere mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden wurden an den Tagen vier (n=1), fünf (n=1) und acht (n=2) nach Schlupf durch Blutentzug nach Schlagbetäubung getötet. Am 35. Lebenstag wurden alle 43 überlebenden Tiere durch Blutentzug nach Schlagbetäubung getötet, davon wurden zehn Tiere den spezifischen Untersuchungen zugeführt.

Von 69 **Versuchstieren** verendeten 17 Tiere und 22 wurden mit stark reduziertem Allgemeinbefinden euthanasiert. An den Tagen eins (n=1), zwei (n=1), drei (n=3), vier (n=4), fünf (n=6), elf (n=1) und zwölf (n=1) nach Schlupf verendeten Tiere. Eine Tötung von Tieren durch Blutentzug nach Schlagbetäubung wurde an den Lebenstagen drei (n=7), fünf (n=4), sechs (n=4), sieben (n=6) und zwölf (n=1) bei Tieren mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden erforderlich. Neun Tiere wurden an den Tagen 14, 21 und 28 randomisiert zur Probennahme ausgewählt und nach der Schlachtung der Probenentnahme zugeführt. Die verbleibenden 21 Tiere wurden an den Tagen 35 (n=11) und 36 (n=10) nach Schlupf durch Blutentzug nach Schlagbetäubung getötet und weitergehend untersucht.

Aus der Gruppe der **Sentineltiere** verendeten an den Tagen eins und zwei nach Schlupf je ein Tier, ein weiteres wurde an Tag 24 nach Schlupf mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden euthanasiert. Die verbleibenden fünf Tiere wurden an den Tagen 35 (n=2) und 36 (n=3) nach Schlupf durch Blutentzug nach Schlagbetäubung getötet und den weiteren Untersuchungen zugeführt.

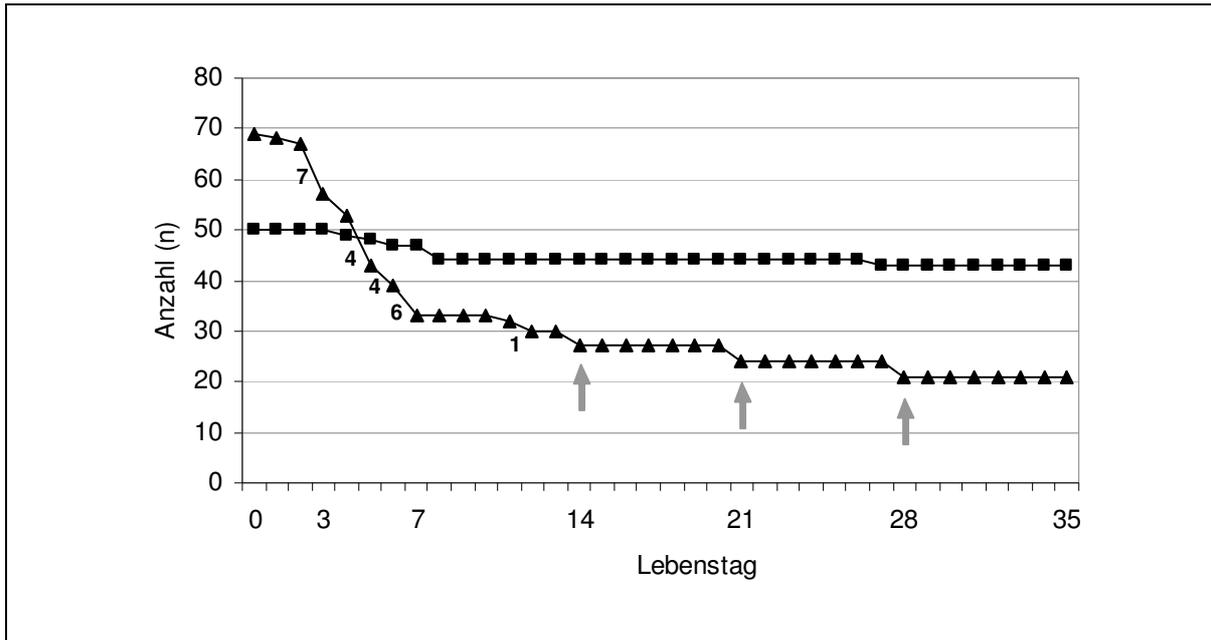


Abb. 8: Tierzahlen

Die Abbildung stellt die absolute Anzahl an Tieren der Kontroll- (■) und Versuchsgruppe (▲) im Verlauf des Versuches dar. In die Reduktion der Tierzahlen wurden verendete Tiere ebenso einbezogen wie mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden euthanasierte Tiere. Fettgedruckte arabische Ziffern geben die Anzahl (n) an euthanasierten Tieren aus der Versuchsgruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten an. Zeitpunkte, zu denen aus der Versuchsgruppe randomisiert Tiere entnommen wurden sind mit (↑) gekennzeichnet.

4.2.4 Körpergewicht

Das Körpergewicht der einzelnen Tiere wurde am Tag des Schlupfes, am dritten, siebten, 14., 21., 28., und 35. Lebenstag durch Wiegen gemessen.

Im Rahmen der Analyse der Gewichtsdaten wurde zunächst das mittlere Körpergewicht ermittelt, hierzu wurden die Körpergewichte aller zum jeweiligen Zeitpunkt lebenden Küken einbezogen (Abb. 9). Am Tag des Schlupfes wog ein Küken der Kontrollgruppe im Mittel 38,2 g und eines der Versuchsgruppe im Mittel 37,4 g. Bis zum dritten Lebenstag verloren die Tiere beider Gruppen an Gewicht und am dritten Lebenstag wurde ein mittleres Körpergewicht von 36,5 g für die Kontrollgruppe, sowie 35,8 g für die Versuchsgruppe ermittelt. Bis zum siebten Lebenstag war in beiden Gruppen eine Zunahme des mittleren Körpergewichts zu verzeichnen. Dieses betrug für die Kontrollgruppe an Tag sieben 51,1 g und für die Versuchsgruppe 43,9g. Im weiteren Verlauf des Versuches stieg das mittlere Körpergewicht beider Gruppen kontinuierlich an, wobei das mittlere Körpergewicht der Versuchstiere hinter dem der Kontrolltiere zurückblieb. An Tag 35 wurde für die Kontrollgruppe ein mittleres Körpergewicht von 287,3 g verzeichnet, während die Tiere der Versuchsgruppe zu Versuchende im Mittel 228,6 g wogen.

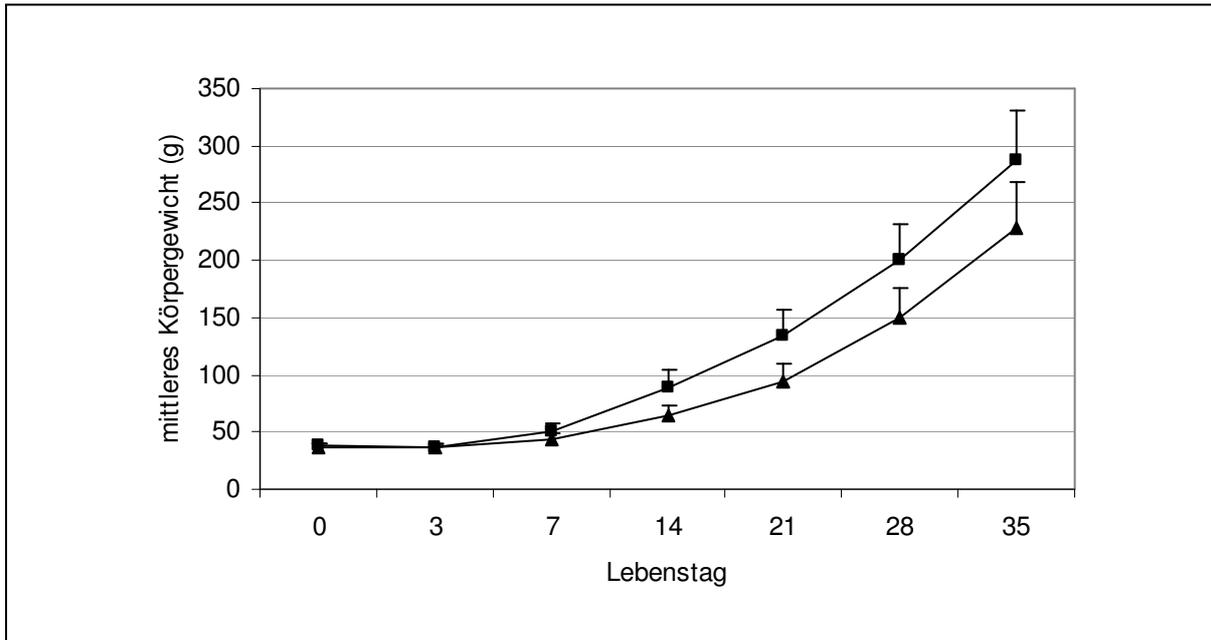


Abb. 9: Mittleres Körpergewicht

Aufgetragen ist das arithmetische Mittel der Körpergewichte der Kontroll- (■) und der Versuchsgruppe (▲). Fehlerindikatoren (T) kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung. Das mittlere Körpergewicht wurde unter Berücksichtigung aller am entsprechenden Tag ermittelten Einzelgewichte berechnet.

Zur Analyse der Verteilung der Messwerte wurden der Median, das obere und untere Quartil, sowie Minimum und Maximum für die jeweiligen Messzeitpunkte bestimmt. Diese Ergebnisse sind für die einzelnen Gruppen als Box-and-Whisker Diagramme dargestellt (Abb. 10), berücksichtigt sind ebenfalls alle zum jeweiligen Zeitpunkt lebenden Tiere.

Der Median der Körpergewichte entwickelte sich gleichsinnig zum arithmetischen Mittel und wich vom Mittel nicht weiter als die jeweilige Standardabweichung ab.

Die Streuung der Verteilungen von Median zu Minimum war in der Kontrollgruppe zu allen Messpunkten größer als die Streuung von Median zu Maximum. In der Versuchsgruppe war die Streuung von Median zu Maximum am 14. Lebenstag größer als diejenige von Median zu Minimum. Zu allen anderen Messpunkten war die Streuung von Median zu Minimum größer, als diejenige von Median zu Maximum.

In beiden Gruppen nahm die Streuung von Minimum zu Maximum im Verlauf des Versuches kontinuierlich zu. So betrug diese Streuung am Tag des Schlupfes 9,8 g für die Kontrollgruppe und 12,3 g für die Versuchsgruppe. Die Streuung von Minimum zu Maximum bleibt auch am dritten Lebenstag für die Versuchsgruppe geringfügig größer, während sie ab Tag sieben für die Kontrollgruppe einen größeren Wert einnimmt. An Tag 35 kann die Streuung mit 185g für die Kontrollgruppe und 168,3 g für die Versuchsgruppe angegeben werden.

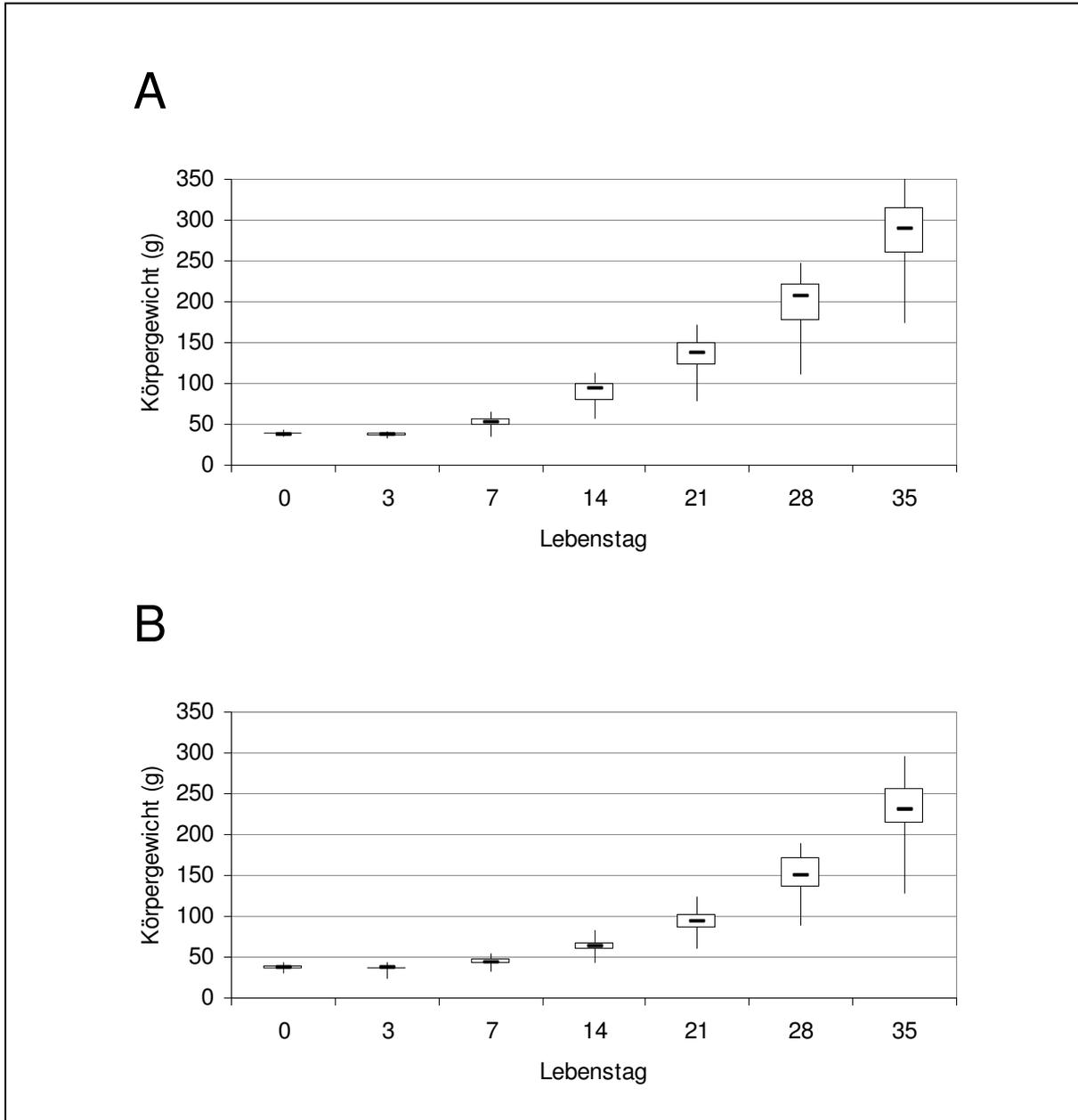


Abb. 10: Verteilung der Messwerte zum Körpergewicht

Dargestellt ist die Verteilung der Messwerte zum Körpergewicht für die Kontroll- (A) und Versuchsgruppe (B) zu den jeweiligen Zeitpunkten. Waagrechte Balken kennzeichnen den Median, der dünn gezeichnete Kasten umfasst das erste und dritte Quartil. Minimum und Maximum sind durch senkrechte Linien dargestellt. Bei der Erhebung der Daten wurden alle zum angegebenen Zeitpunkt lebenden Tiere der jeweiligen Gruppe berücksichtigt.

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden die Gewichtsdaten der beiden Gruppen darüber hinaus auch auf das Auftreten von Ausreißern hin untersucht. Als Ausreißer wurden Werte kleiner als das untere Quartil weniger des anderthalbfachen Interquartilabstandes (unterer Whisker) oder größer als das obere Quartil zuzüglich des anderthalbfachen Interquartilabstandes (oberer Whisker) definiert. Bei der Analyse der Daten der Kontrollgruppe war je ein Messwert an den Tagen 28 und 35 kleiner als der untere Whisker, hierbei handelte sich um die Gewichtsdaten des selben Huhnes. Unter den Messwerten, die in der Versuchsgruppe erhoben wurden, waren an den Tagen drei, sieben und 35 Werte festzustellen, die kleiner als der untere Whisker waren. Schwere Ausreißer, definiert als Werte kleiner als das untere Quartil weniger des dreifachen Interquartilabstandes traten nur in der Kontrollgruppe auf und hier nur am dritten Tag (Tab. 7). Alle Tiere der Versuchsgruppe, die in ihrem Gewicht an den Tagen drei und sieben unter dem unteren Whisker lagen wurden noch am selben Tag mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden euthanasiert. An den Tagen drei und vierzehn lagen Messwerte über dem oberen Whisker, die entsprechenden Tiere überlebten bis zum Ende des Versuches.

Tab 7: Ausreißer unter den in der Versuchsgruppe erhobenen Daten

	Tag 3	Tag 7	Tag 35
unterer Whisker (einfache Ausreißer)	30,9 g	33,7 g	145,1 g
	30,8 g 29,8 g 28,9 g 28,4 g	32 g	127,2 g
unterer Whisker (schwere Ausreißer)	26,8 g	25,5 g	77,9 g
	26,7 g 25,2 g 23 g		

Um den Einfluss vor Ende des Versuches verendeter oder euthanasierter Tiere zu untersuchen, wurde die Verteilung der Messdaten aus der Versuchsgruppe nochmals nur aus den Daten derjenigen Tiere erhoben, die bis zum Ende des Versuches überlebten. Mit Ausnahme des an Tag drei erhobenen Minimums, das mit 35 g einen deutlich höheren Wert einnimmt, wurden keine Unterschiede offensichtlich. Ausreißer traten in der Verteilung der Daten dieser Teilgruppe jedoch deutlich seltener auf. So lag nur ein an Tag 35 bestimmter Messwert unter dem unteren Whisker für einfache Ausreißer.

Die mittlere Gewichtszunahme der Tiere wurde als Differenz des aktuellen Gewichtes zum Ausgangsgewicht am Tag des Schlupfes ermittelt (Abb.11). In beiden Gruppen verloren die Tiere vom Tag des Schlupfes bis zum dritten Lebenstag geringfügig an Gewicht. Bis zum siebten Tag nahmen die Kontrolltiere im Mittel 14 g an Gewicht zu, die Versuchstiere acht g. Bis zum 21. Lebenstag betrug die Zunahme in der Kontrollgruppe durchschnittlich 97 g, gegenüber 56 g in der Versuchsgruppe. Bis zum Versuchende am 35. Lebenstag war die mittlere Zunahme des Körpergewichts für die Kontrolltiere mit 249 g etwa ein Drittel größer als diejenige für die Versuchstiere mit 191 g.

Um eine Verfälschung der Gewichtszunahme durch schwer erkrankte Tiere auszuschließen wurden nur die Daten der Tiere einbezogen, die bis zum 35. Tag überlebt hatten. Die Kontrollgruppe enthält so 43 und die Versuchsgruppe 21 Tiere. Zum Nachweis einer geringeren Gewichtszunahme in der Versuchsgruppe wurden die so erhobenen Daten mit Hilfe des exakten Wilcoxon-Rangsummentestes verglichen. Dabei wurde ein kritischer p-Wert von 0,00833 ermittelt. Die p-Werte, die für die Untersuchungstage 7, 14, 21, 28 und 35 berechnet wurden waren kleiner als der kritische p-Wert (Tab. 8). Die mittlere Gewichtszunahme der Versuchstiere ist somit an all diesen Tagen kleiner als die der Kontrolltiere.

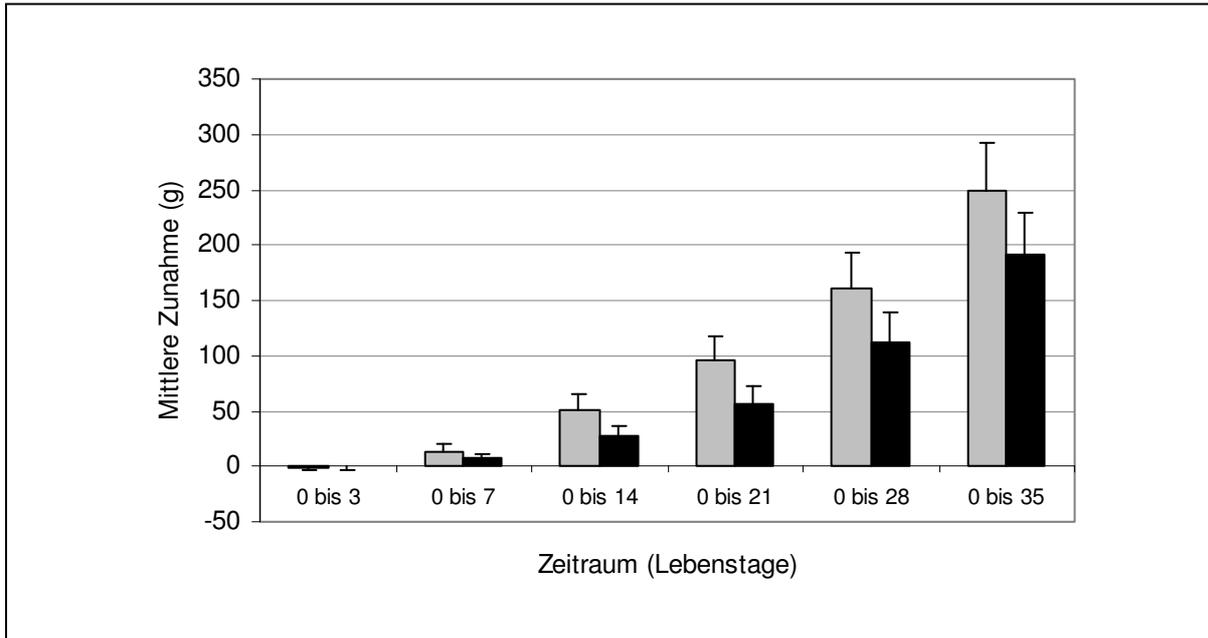


Abb. 11: Mittlere Zunahme des Körpergewichtes

Dargestellt ist die mittlere Zunahme des Körpergewichtes der Tiere der Kontroll- (■) und der Versuchsgruppe (■) in den Zeiträumen vom Tag des Schlupfes bis zu den jeweilig angegebenen Lebenstagen. Fehlerindikatoren (T) kennzeichnen die Standardabweichung. Zur Berechnung der mittleren Zunahme des Körpergewichtes wurden nur die Gewichtsdaten derjenigen Hühner berücksichtigt, welche bis zum 35. Lebenstag überlebt hatten.

Tab 8: Statistische Beurteilung der Gewichtszunahme anhand von p-Werten

Lebenstag	W-Statistik	p-Wert*
3	613,5	$0,99 \times 10^1$
7	189,0	$5,08 \times 10^{-2}$
14	79,5	$2,04 \times 10^{-6}$
21	68,0	$4,38 \times 10^{-7}$
28	100,5	$2,48 \times 10^{-5}$
35	134,0	$7,15 \times 10^{-4}$

* kritischer p-Wert (α^*) = $0,05 / 6 = 0.008333$

4.2.5 Virusnachweis

Der Nachweis von vermehrungsfähigen Orthoreoviren erfolgte durch Anzucht aus Organmaterial in Kulturen primärer Hühnerembryoleberzellen.

Aus keinem untersuchten Tier der **Kontrollgruppe** (n=20) wurde ARV isoliert. Verendete oder moribund euthanasierte Tiere der Kontrollgruppe wurden am Tag des Schlupfes (n=5), sowie an den Tagen vier (n=1), fünf (n=1), acht (n=2) und 27 (n=1) untersucht. Darüber hinaus wurden am 35. Lebenstag zehn Tiere der Kontrollgruppe der virologischen Untersuchung zugeführt. Aus Tieren der Kontrollgruppe wurden zur virologischen Untersuchung jeweils Leber, sowie Duodenum mit Pankreas beprobt.

Dem gegenüber wurde ARV aus Tieren der **Versuchsgruppe** zu verschiedenen Zeitpunkten und aus verschiedenen untersuchten Organen isoliert. Aus Tieren der Versuchsgruppe war ARV vom Tag des Schlupfes (Tag 0) bis zum Ende des Versuches (Tag 36) nachzuweisen (Abb.12). Von Tag null bis Tag 21 wurde ARV, mit Ausnahme zweier an Tag 14 untersuchter Tiere aus allen untersuchten Hühnern reisoliert. Während an Tag 28 keines der untersuchten Tiere vermehrungsfähiges ARV beinhaltete, war an den letzten Tagen des Versuchs (Tag 35 und 36) ARV aus je einem Tier zu reisolieren.

Aus **Sentineltieren** erfolgte eine Isolierung von Virus aus je einem an den Lebenstagen eins und zwei verendeten Tier. Weiterhin wurden an den Tagen 24 (n=1), 35 (n=2) und 36 (n=3) Küken untersucht, aus keinem der Tiere wurde replikationsfähiges ARV isoliert.

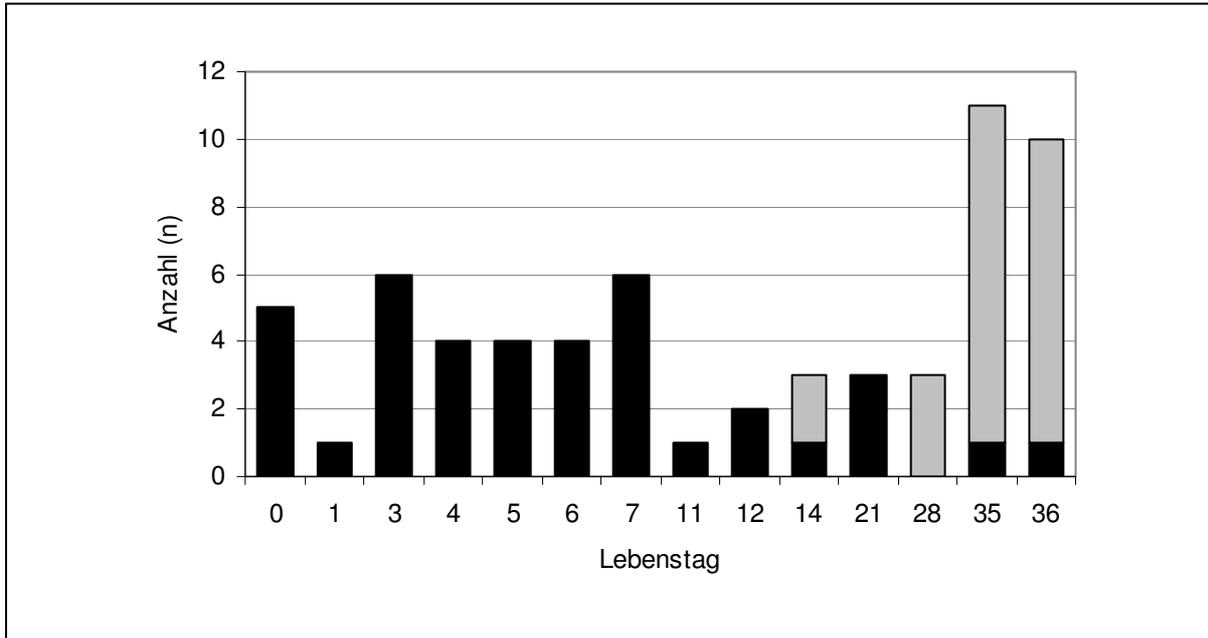


Abb. 12: Infektionsstatus untersuchter Tiere der Versuchsgruppe

Aufgetragen ist die Anzahl der am jeweiligen Lebenstag untersuchten Tiere der Versuchsgruppe. Tiere, aus denen aus wenigstens einem untersuchten Organ ARV durch Anzucht auf primären Hühnerembryoleberzellen isoliert wurde sind in Form schwarzer Balkenabschnitte dargestellt. Lichtgraue Balkenabschnitte stellen Tiere dar, aus welchen zum entsprechenden Zeitpunkt aus keinem untersuchten Organ ARV isoliert wurde.

Aus den Tieren der **Versuchsgruppe** wurden insgesamt sechs verschiedene Organe auf ihren Infektionsstatus bezüglich ARV untersucht. Aus allen untersuchten Organen (Leber, Drüsenmagen, Duodenum mit Pankreas, Jejunioileum und Bursa Fabricii) wurde ARV zu verschiedenen Zeitpunkten reisoliert.

Aus den untersuchten Lebern (Abb. 13 A) wurden am Tag des Schlupfes aus drei Organen ARV isoliert. An den Tagen drei bis fünf waren alle entnommenen Organe positiv für ARV und an den Tagen sechs und sieben waren mit Ausnahme jeweils eines Organs alle untersuchten Lebern mit ARV infiziert. Danach wurden ARV noch aus jeweils einer der an den Tagen zwölf und 36 gewonnenen Lebern reisoliert.

Aus den untersuchten Drüsenmägen (Abb. 13 B) wurden am Tag des Schlupfes ARV aus drei der beprobten Tiere isoliert. Alle von Tag drei bis einschließlich Tag sieben entnommenen Drüsenmägen waren positiv für ARV. Nach Tag sieben wurde ARV vereinzelt an den Tagen zwölf und 21 aus entnommenen Drüsenmägen nachgewiesen.

Duodenum und Pankreas (Abb. 13 C) wurden gemeinsam in einer Probe untersucht. Aus diesen Mischproben wurde ARV am Tag des Schlupfes ebenfalls aus drei der untersuchten Tieren isoliert. Nachfolgend waren alle zwischen den Tagen drei und elf entnommenen Proben mit ARV infiziert. Der Nachweis erfolgte dann bis zum 35. Lebenstag aus einzelnen der untersuchten Sammelproben.

Aus den gewonnenen Proben des Jejunioileums (Abb. 13 D) wurde ARV am Tag des Schlupfes aus vier der untersuchten Organe reisoliert. Alle zwischen den Tagen eins und sieben untersuchten Organe waren mit ARV infiziert. Bis zum Ende des Versuchs wurden ARV an den Tagen zwölf, 14 und 35 aus je einer der untersuchten Proben des Jejunioileums reisoliert.

Als fünfte Organprobe wurde aus den Versuchstieren die Bursa Fabricii (Abb. 13 E) entnommen. Von den am Tag des Schlupfes gewonnenen Bursen waren drei mit ARV infiziert. Aus allen zwischen Tag drei und sechs entnommenen Organproben wurden ARV reisoliert. An Tag sieben waren sechs der untersuchten Bursen positiv für ARV. Ein Nachweis von ARV erfolgte danach aus zwei an Tag zwölf entnommenen Organen und aus einer der an Tag 35 gewonnenen Bursaprobe.

Aus den Sentineltieren wurde die gleichen Organe beprobt wie aus den Versuchstieren. Aus dem am ersten Lebenstag beprobten Küken erfolgte der Nachweis aus Duodenum und Pankreas (Sammelprobe), in dem am zweiten

Lebenstag untersuchten Tier war ARV aus allen untersuchten Organen nachzuweisen.

Aus der Versuchsgruppe wurden zusätzlich am 20. Bebrütungstag drei Eier hinsichtlich einer Infektion mit ARV untersucht. Es wurden Proben der embryonalen Leber, sowie der Chorionallantoismembran entnommen. ARV war aus einer untersuchten Leber nachgewiesen, alle drei untersuchten Proben der Chorionallantoismembran waren positiv für ARV.

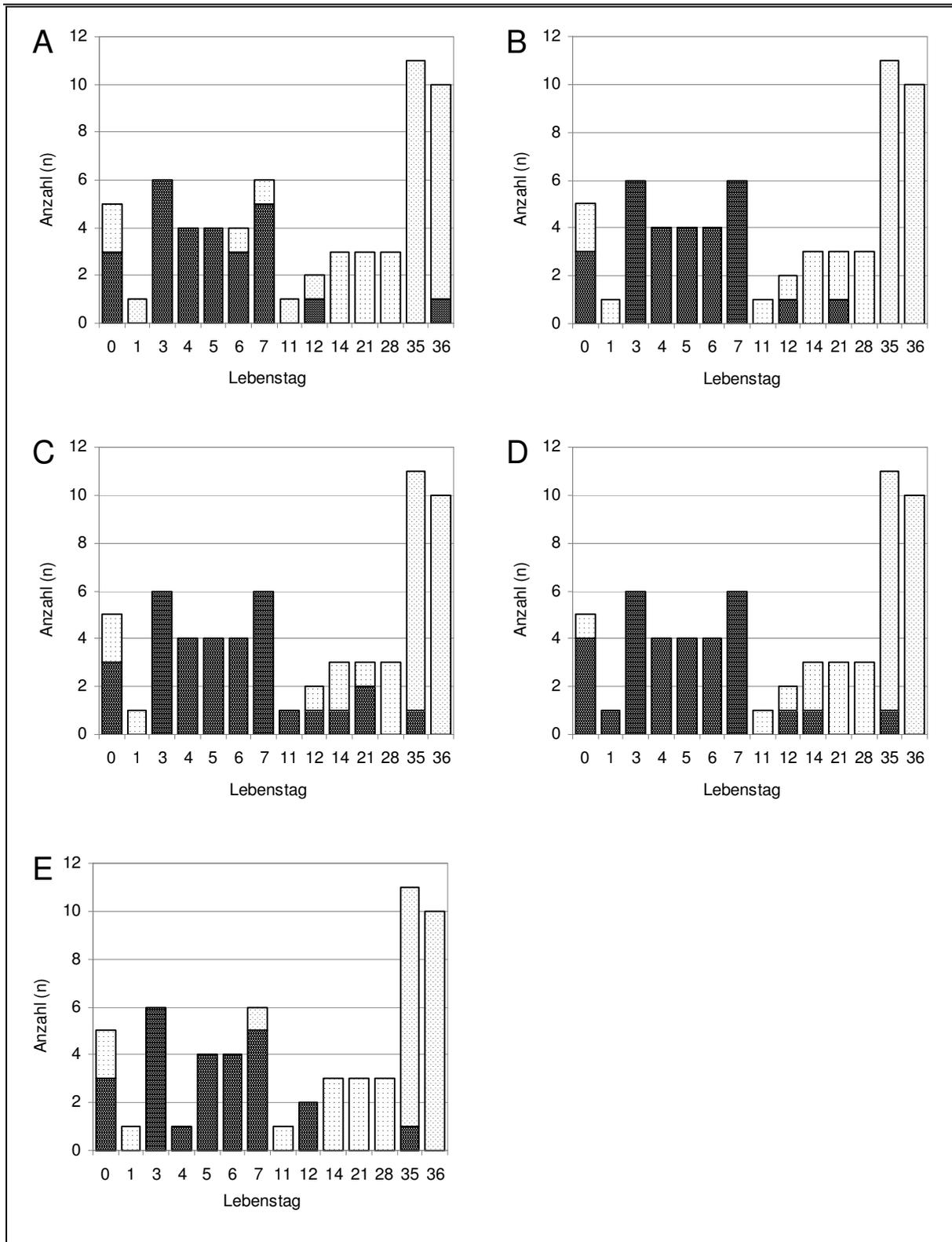


Abb. 13: Infektionsstatus untersuchter Organe aus der Versuchsgruppe
 Dargestellt ist die Anzahl der an den jeweiligen Lebenstagen entnommenen Proben der Leber (A), des Drüsenmagens (B), des Duodenums mit Pankreas (C), des Jejunioileums (D) und der Bursa Fabricii (E). Organe, aus welchen ARV isoliert wurde, sind durch schwarz schraffierte Balkenabschnitte dargestellt. Weiße, gepunktete Balkenabschnitte stellen Organe dar, aus welchen kein ARV isoliert wurde.

Neben der Betrachtung des Infektionsstatus der einzelnen Organe wurde auch analysiert, welches Verteilungsmuster die Infektion innerhalb der beprobten Hühner der Versuchsgruppe (n=63) einnimmt (Tab. 9).

Insgesamt wurden am Tag des Schlupfes und am ersten Lebenstag sechs Tiere beprobt. Eine Virusreisolierung erfolgte bei vier Tieren aus einem bis drei Organen, bei zwei Tieren waren alle untersuchten Organe mit ARV infiziert.

Zwischen dem dritten und einschließlich siebten Tag wurden 24 Tiere beprobt, aus allen in diesem Zeitraum untersuchten Tieren wurde ARV aus mindestens vier (n= 3), in den meisten Fällen (n=21) jedoch aus allen untersuchten Organen reisoliert.

Bei den ab Tag elf bis zum Versuchende beprobten Tieren (n=33) wurde nur bei einem Tier aus allen Organen ARV nachgewiesen, bei acht Tieren waren ein bis drei der untersuchten Organe mit ARV infiziert. Aus der Mehrzahl der in dieser Zeitspanne beprobten Tiere (n=24) wurde ARV jedoch aus keinem der untersuchten Organe reisoliert.

Tab 9: Organverteilung der Infektion untersuchter Versuchstiere

Lebenstag	0	1	3	4	5	6	7	11	12	14	21	28	35	36	
<i>insgesamt untersuchte Tiere (n)</i>	5	1	6	4	4	4	6	1	2	3	3	3	11	10	
Virusnachweis bei x Tieren aus:															
keinem Organ *											2	3	10	9	
allen Organen	2	6		1	4	3	4	1							
allen Organen (Bursa nicht entnommen)				3											
allen Organen (außer Leber)						1	1								
allen Organen (außer Bursa Fab.)							1								
Drüsenmagen, Duodenum/ Pankreas, Bursa Fabricii	1														
Duodenum/ Pankreas, Jejunoileum, Bursa Fabricii													1		
Leber und Jejunoileum	1														
Duodenum/ Pankreas und Jejunoileum										1					
Leber														1	
Drüsenmagen											1				
Duodenum/ Pankreas								1	2						
Jejunoileum	1	1													
Bursa Fabricii									1						

4.2.6 Pathologisch-anatomische und histopathologische Untersuchungen

4.2.6.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung

In der **Kontrollgruppe** wies ein am fünften Lebenstag mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden euthanasiertes Tier in der Bauchhöhle gelbliche Beläge auf allen serösen Häuten auf, die Darmschlingen waren durch dieses Material zusammengeklebt. Die Gefäße der serösen Häute präsentierten sich injiziert. Zusammenfassend konnte die pathologische Diagnose einer Serositis fibrinosa gestellt werden.

Am 35. Lebenstag war bei zwei Tieren ein mit circa 2,5 cm im Durchmesser vergrößerter Dottersack festzustellen, der mit gelblich-bröckeligem Material angefüllt war. Die Veränderungen wurden zusammenfassend als Dottersackretention bezeichnet.

Aus der Gruppe der **Versuchstiere** wiesen zwei Tiere das oben beschriebene Bild einer Serositis fibrinosa auf. Es handelte sich hierbei um ein am siebten Tag mit gestörtem Allgemeinbefinden euthanasiertes Tier, sowie ein am 35. Lebenstag untersuchtes Tier. Die Veränderungen in dem am 35. Lebenstag begutachteten Tier waren lokal auf die Umbilikalregion begrenzt.

Weiterhin zeigte sich in der Versuchsgruppe bei mehreren Tieren eine Störung der Dottersackinvolution (Abb. 14; Tab. 10). Am vierten Lebenstag wiesen vier verendete Tiere einen Dottersack auf, der im Durchmesser etwa vier cm maß und sich damit seit dem Schlupf nicht verkleinert hatte. Am fünften Lebenstag beinhalteten drei euthanasierte und fünf verendete Tiere einen ungewöhnlich großen Dottersack. Ab Tag sieben fielen regelmäßig Einzeltiere auf, deren Dottersack vergrößert und mit gelblich-bröckeligem Material angefüllt war. Zum Ende des Versuches, am 35. und 36. Lebenstag war der Dottersack bei 10 von insgesamt 21 untersuchten Tieren noch vorhanden. Die Organe maßen 0,5-1 cm im Durchmesser und enthielten ebenfalls Reste von Dottermaterial. Die ab dem siebten Lebenstag beobachteten Veränderungen entsprachen dem Bild einer Dottersackretention.

Mit Ausnahme des Pankreas und der Blinddärme zeigten sich alle Organe und Anhangsorgane des Gastrointestinaltrakts ohne besonderen Befund. Am fünften Lebenstag zeigten je ein verendetes und euthanasiertes Tier stark dilatierte Zäka, die mit dünnflüssigem, schaumigen Inhalt gefüllt waren.

Das Pankreas präsentierte sich an den Tagen 35 und 36 bei fünf von insgesamt 21 untersuchten Versuchstieren verhärtet und wies eine unregelmäßige Oberfläche mit multifokalen, punktförmigen, weißlichen Einziehungen auf. Anhand der beobachteten Veränderungen wurde hier der Verdacht auf eine Pancreatitis multifocalis necroticans ausgesprochen.

Darüber hinaus waren vom dritten bis siebten Lebenstag bei zahlreichen Tieren die Ureteren erweitert und mit einer weißlichen, pastösen Masse angefüllt (Tab. 11). Diese konnte in einer mikroskopischen Untersuchung anhand der Struktur der enthaltenen Kristalle als Harnsäure definiert werden. Bei einzelnen Tieren wurde ausgefallene Harnsäure auch in den Nieren nachgewiesen.

Bei der pathologischen Untersuchung der **Sentineltiere** waren an Tag 35 und 36 bei je einem Tier Veränderungen des Pankreas auffällig. Diese entsprachen in Form und Ausprägung den bei den Versuchstieren beobachteten Veränderungen, so dass auch hier die Verdachtsdiagnose einer Pancreatitis multifocalis necroticans gestellt wurde.

Ein einzelnes Sentineltier, welches am 24. Lebenstag mit gestörtem Allgemeinbefinden getötet wurde wies eine Serositis fibrinosa auf. Wie oben beschrieben zeigten sich hier ebenfalls gelbliche Beläge auf allen serösen Häuten und eine deutliche Zeichnung der Blutgefäße des Bauchfells.

Tab 10: Vorhandensein und Größe des Dottersacks in untersuchten Versuchstieren

Lebenstag	4	5	6	7	11	12	14	21	28	35	36
Untersuchte Tiere gesamt (n)	4	10	4	6	1	2	3	3	3	11	10
Dottersack											
in x Tieren vorhanden	4	8	1	2	1	1	1	2	2	6	4
mittlerer Durchmesser in cm	4	3,75	3,5	3,5	4	3,5	3	2,5	2	0,75	1

Tab 11: Veränderungen der Ureteren und Nieren untersuchter Versuchstiere

Lebenstag	3		4		5		6		7	
Untersuchte Tiere gesamt (n)	10		4		10		4		6	
Abgangsursache (v*, e**)	v	e	v	e	v	e	v	e	v	e
Anzahl	4	6	4	-	6	4	4	-	6	-
in x Tieren Uratablagerungen in										
Ureteren	3	1	4	-	5	0	1	-	2	-
Nieren	2	0	3	-	4	0	0	-	0	-

*(v) verendet; **(e) euthanasiert

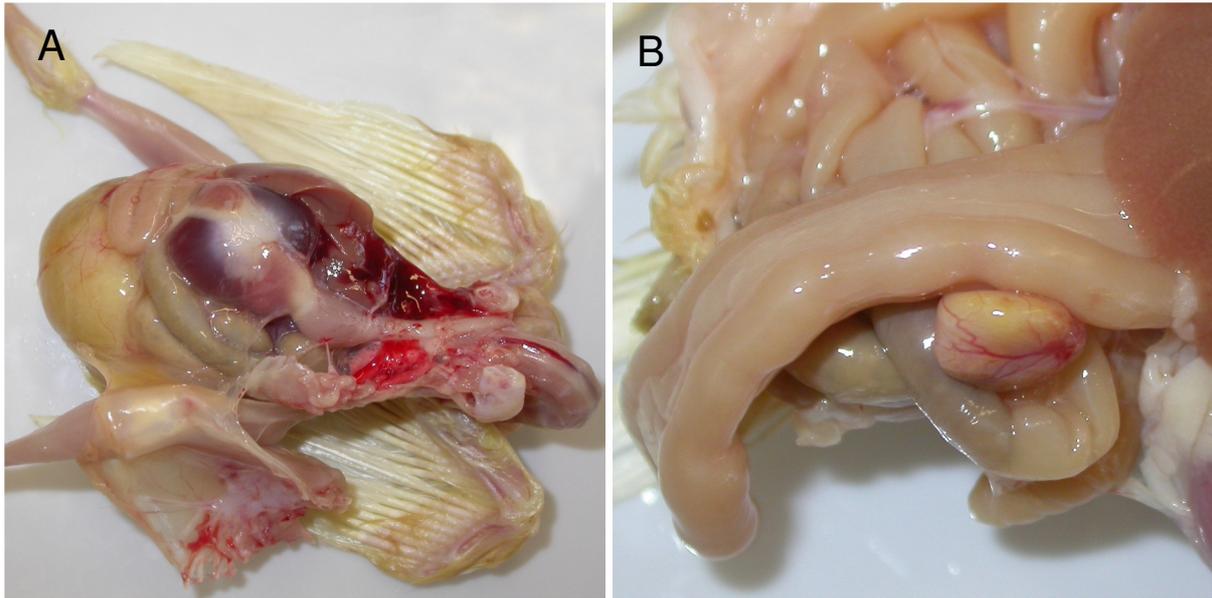


Abb. 14: Makroskopische Veränderungen des Dottersacks

Dargestellt ist der Sektionssitus von zwei 21 Tage alten Küken aus der Versuchsgruppe. In Bild A fällt zeigt sich der Dottersack deutlich vergrößert. Das Organ hatte einen Durchmesser von etwa 4 cm und war mit flüssigem Dotter gefüllt. Das Küken in Bild B weist ebenfalls eine Retention des Dottersackes auf. Allerdings präsentierte sich das Organ hier kleiner (etwa 1 cm im Durchmesser) und war mit käsig-bröckeligem Material angefüllt.

4.2.6.2 Histopathologische Untersuchung

Die untersuchten Organe aus Tieren der **Kontrollgruppe** wiesen in der feingeweblichen Untersuchung keine Auffälligkeiten auf.

Das am fünften Lebenstag verstorbene Küken, welches in der pathologisch-anatomischen Untersuchung mit einer Serositis fibrinosa auffiel, wurde aufgrund des bereits fortgeschrittenen Verwesungszustandes nicht histopathologisch untersucht.

Unter den aus Tieren der **Versuchsgruppe** entnommenen Organen zeigten sich in der feingeweblichen Untersuchung insbesondere Herz, Milz und Pankreas verändert.

Ab dem dritten Lebenstag wurden entzündliche Veränderungen des Herzens festgestellt (Tab. 12; Abb. 15 A, B). Im Myokard wurden gemischtzellige, mononukleäre Infiltrate manifest, es handelte sich hierbei um primär lymphoplasmozytäre Infiltrate, vereinzelt zeigten sich auch heterophile Granulozyten. Die entzündlichen Infiltrate waren in ihrer Lokalisation meist auf das Myokard begrenzt, seltener umfasste die Entzündung auch das Subserosa im Bereich des Epikards. Die Myofibrillen in den betroffenen Bereichen wiesen einen Verlust der Querstreifung auf und waren zum Teil in Sinne einer Nekrose verändert. Zusammenfassend konnte die Diagnose einer Myocarditis focalis nonpurulenta gestellt werden.

Einige der untersuchten Tiere wiesen Veränderungen der Milz auf (Tab. 12). Die Milzpulpa wies auffallend wenig Lymphozyten auf, das zugrunde liegende Bindegewebe erschien unverändert. Die Veränderungen wurden als Lymphozytendepletion der Milz angesprochen.

Weiterhin zeigten sich im Pankreas von zehn zwischen dem dritten und zwölften Lebenstag untersuchten Versuchstieren milde Veränderungen (Tab.12, Abb. 15 C, D). Im Parenchym der Organe wurde in den Azinozyten die Bildung von Vakuolen auffällig, welche sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung leer darstellten. Das Zytoplasma präsentierte sich vermehrt azidophil. Im Gewebe zeigten sich auch deutlich umgrenzte lymphoplasmozytäre Infiltrate. Letztere waren jedoch in Organen aus Kontrolltieren gleichförmig zu beobachten. Die Veränderungen wurden als moderate vakuoläre Degeneration der Azinozyten angesprochen, der in der makroskopischen Untersuchung ausgesprochene Verdacht auf eine Pancreatitis multifocalis necroticans bestätigte sich in der pathohistologischen Untersuchung nicht.

Alle weiteren begutachteten Organe, auch diejenigen des Gastrointestinaltraktes, präsentierten sich ohne besonderen Befund (Abb. 16).

Die bereits in der pathologischen Untersuchung aufgefallene Serositis fibrinosa bei zwei untersuchten Tieren wurde histopathologisch als Serositis purulenta fibrinosa bestätigt. Es zeigten sich fibrinöse Auflagerungen auf der Serosa, im subserösen Gewebe war eine hochgradige Infiltration mit heterophilen Granulozyten vorhanden.

Von den untersuchten Organen der **Sentineltiere** zeigte sich das Herz eines am 35. Lebenstag begutachteten Tieres ebenfalls im Sinne einer Myocarditis focalis nonpurulenta verändert. Die Veränderungen entsprachen den oben besprochenen Befunden bei den Versuchstieren.

Bei keinem Tier wurde in der feingeweblichen Untersuchung der Bauchspeicheldrüse ein besonderer Befund erhoben. Im Parenchym der Pankreata wurden gleichförmig zu Kontroll- und Versuchstieren deutlich umgrenzte lymphoplasmozytäre Infiltrate beobachtet, der Verdacht auf eine Pancreatitis multifocalis necroticans bestätigte sich nicht.

Bei dem am 24. Lebenstag euthanasierten Tier konnte die makroskopisch festgestellte Serositis fibrinosa ebenfalls in der feingeweblichen Untersuchung bestätigt werden.

Tab 12: Pathohistologische Veränderungen in Organen der Versuchstiere

Lebenstag	3	5	6	7	12	14	21	28	35	36
Untersuchte Tiere gesamt (n)	6	4	4	6	1	3	3	3	11	10
in x Tieren festgestellt										
Myocarditis nonpurulenta	2	1	1	5	1	2	1	1	1	2
Lymphozytendepletion Milz	5	1	0	3	1	0	0	0	1	0
Vakuoläre Degeneration der Azinozyten des Pankreas	3	1	1	4	1	0	0	0	0	0

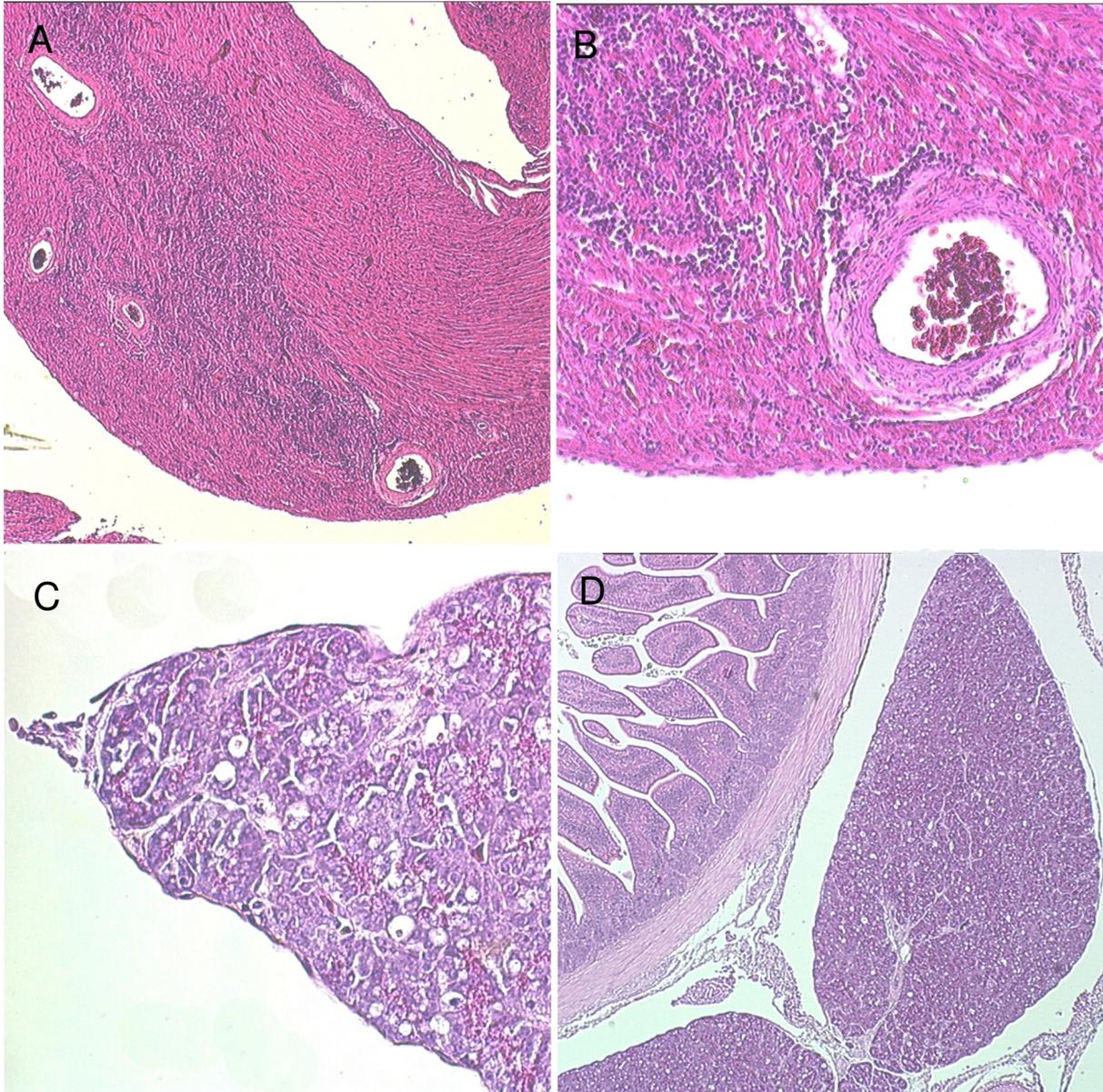


Abb. 15: Feingewebliche Schnitte (HE) von Herz und Pankreas aus Versuchstieren

Die Abbildung zeigt HE-gefärbte Dünnschnitte aus zwei Versuchstieren. Dargestellt sind Herz (A, B) eines fünf Tage alten Kükens, sowie Pankreas (C, D) eines siebentägigen Tiers. Im Herz fallen mononukleäre lymphozytäre Infiltrate auf. Das Pankreas zeigt sich im Sinne einer vakuolären Degeneration verändert.

Vergrößerung: A, D, 25-fach; B, 100-fach; C, 200-fach

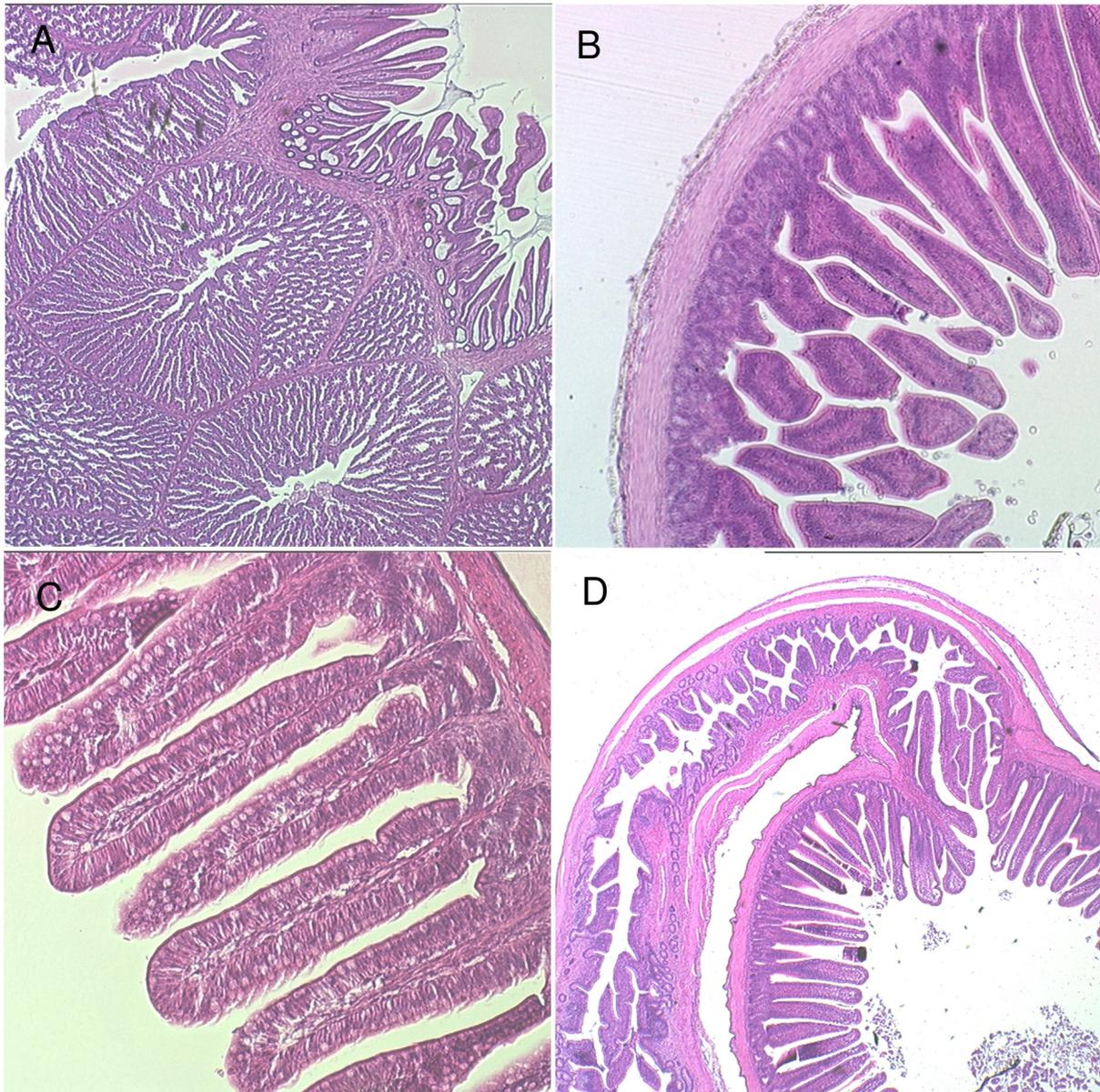


Abb. 16: Feingewebliche Schnitte (HE) des Verdauungstraktes von Versuchstieren

Die Abbildung zeigt HE-gefärbte Gewebefeinschnitte des Verdauungstraktes eines sieben Tage alten Versuchstiers. Die untersuchten Organe Drüsenmagen (A); Duodenum (B); Jejunum (C) und Jejunum mit Diverticulum ductus vitellini (D). präsentieren sich ohne besonderen Befund.

Vergrößerung: A, B, 25-fach; C, 100-fach; D, 12,5-fach

4.2.7 Bakteriologische Untersuchungen

Aus Tieren beider Tiergruppen wurden verschiedene, sowohl Gram-positive, wie auch Gram-negative Bakterienspezies isoliert (Abb. 17). Aus der Gruppe der Gram-positiven Bakterien wurden Bakterien der Spezies *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.* und *Bacillus sp.* nachgewiesen. Weiterhin trat eine Gram-positive, kokkoide Mischflora bestehend aus *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* und *Enterococcus sp.* auf. Aus der Gruppe der Gram-negativen Bakterien wurden *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* und *Enterobacter cloacae* kultiviert. Von diesen Spezies wurde *Enterococcus sp.* am häufigsten isoliert, gefolgt von *E. coli sp.* und einer Gram-positiven, kokkoiden Mischflora.

Am Tag des Schlupfes wurde *Citrobacter freundii* aus mehreren Tieren der **Kontrollgruppe** kultiviert. Aus später beprobten Einzeltieren mit klinischen Symptomen wurden zahlreich bis massenhaft *Enterococcus sp.* und *E. coli sp.* isoliert. Zu Versuchende am 35. Tag wurden Gram-positive Bakterien und *E. coli sp.* in geringen Mengen nachgewiesen.

Die Organe der **Versuchstiere** waren zum Zeitpunkt des Schlupfes mit geringen bis mittleren Mengen an Gram-positiver, kokkoider Mischflora behaftet. In der Folge wurden aus klinisch erkrankten Tieren zahlreich bis massenhaft *Enterococcus sp.* und *E. coli* angezogen. Aus den am 14., 21. und 28. Lebenstag beprobten klinisch unauffälligen Tieren wurde in nur einem Fall vereinzelte Kolonien von *Enterococcus sp.* kultiviert. An den letzten Tagen des Versuches (Tag 35 und 36) waren sehr geringe Mengen an Gram-positiver, kokkoider Mischflora aus zwei Tieren zu isolieren.

Aus den beprobten Sentineltieren wurden aus erkrankten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten geringe bis hohe Mengen an *Enterococcus sp.*, *E. coli* und *Bacillus sp.* angezogen. Zu Versuchende gelang die Isolierung sehr geringer Mengen an Gram-positiver, kokkoider Mischflora, sowie geringer Mengen an *Enterococcus sp.*, *E. coli*. Von allen bakteriologisch untersuchten Tieren wurden weiterhin Proben von Leber und Darm zur Untersuchung auf *Salmonella sp.* entnommen. Eine Isolierung von *Salmonella sp.* oder anderen obligat pathogenen Bakterienspezies erfolgte jedoch zu keinem Zeitpunkt.

Die im Anhang beigefügte Tabelle gibt einen detaillierten Überblick über den Nachweis der verschiedenen Bakterienspezies aus den untersuchten Organen der beprobten Tiere zu den einzelnen Zeitpunkten (Anhang 1).

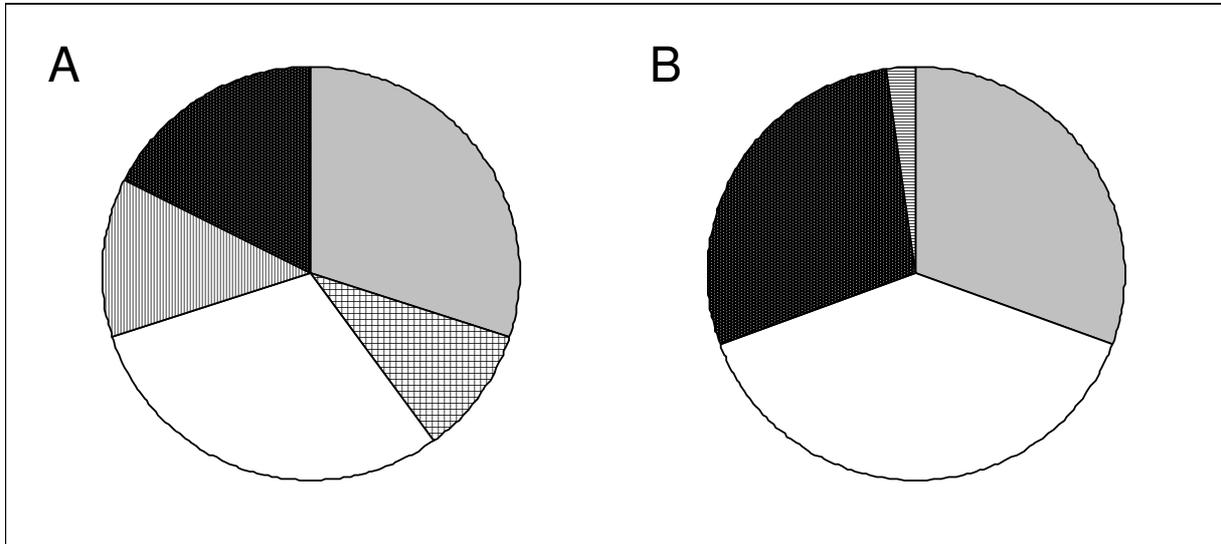


Abb. 17: Bakteriennachweis aus getöteten Tieren nach Spezies

Dargestellt ist der Anteil verschiedener Bakterienspezies, gemessen an der absoluten Zahl der Bakteriennachweise aus Organen getöteter Kontroll- (A) und Versuchstiere (B). Die verschiedenartig strukturierten Flächenanteile stehen für die isolierten Bakterienspezies. Der relative Anteil an isolierten Gram-positiven Bakterien ist durch lichtgraue (■) für eine kokkoide Mischflora, durch karierte (▣) für *Staphylococcus sp.*, durch weiße (□) für *Enterococcus sp.*, sowie durch vertikal gestreifte (▤) für *Bacillus sp.* Flächenanteile dargestellt. Der Anteil an isolierten Gram-negativen Bakterienspezies an den Nachweisen ist durch schwarz gepunktete (■) für *E. coli*, sowie durch horizontal gestreifte (▥) für *Enterobacter sp.* Flächenanteile symbolisiert.

4.2.8 Serologische Untersuchung

Aus Tieren der beiden Gruppen und aus Sentineltieren wurden Serumproben gewonnen und mittels ELISA-Technik auf das Vorhandensein von gegen ARV gerichteten Antikörpern untersucht (Abb. 18).

Die gemessene Antikörperkonzentration in den untersuchten Serumproben aus der Kontrollgruppe (n=43) lag unter dem für den angewandten Test gegebenen Schwellenwert (sp-Wert kleiner 0,2), so dass alle untersuchten Tiere der Kontrollgruppe eindeutig als seronegativ zu beurteilen waren.

Von 29 untersuchten Serumproben der Versuchsgruppe waren in 28 spezifische Antikörper in einer Menge nachzuweisen, die eine Serokonversion der entsprechenden Tiere belegt. Eine am 35. Tag entnommene Serumprobe war im gegebenen Testsystem als seronegativ zu beurteilen.

Aus der Gruppe der Sentineltiere wurden sechs Tiere serologisch untersucht (Tab. 13). In fünf dieser Serumproben lag die gemessene Antikörperkonzentration über dem ermittelten Schwellenwert und die Proben wurden als seropositiv gewertet. Eine am 36. Lebenstag entnommenen Probe lag in ihrer Antikörperkonzentration unter dem Schwellenwert (sp-Wert 0,2) und war damit seronegativ.

Tab. 13: Ermittelte sp-Werte für die Serumproben aus Sentineltieren

Probennahme Lebenstag	24	35	35	36	36	36
sp-Wert	0,42	0,28	0,23	0,83	0,36	0,08

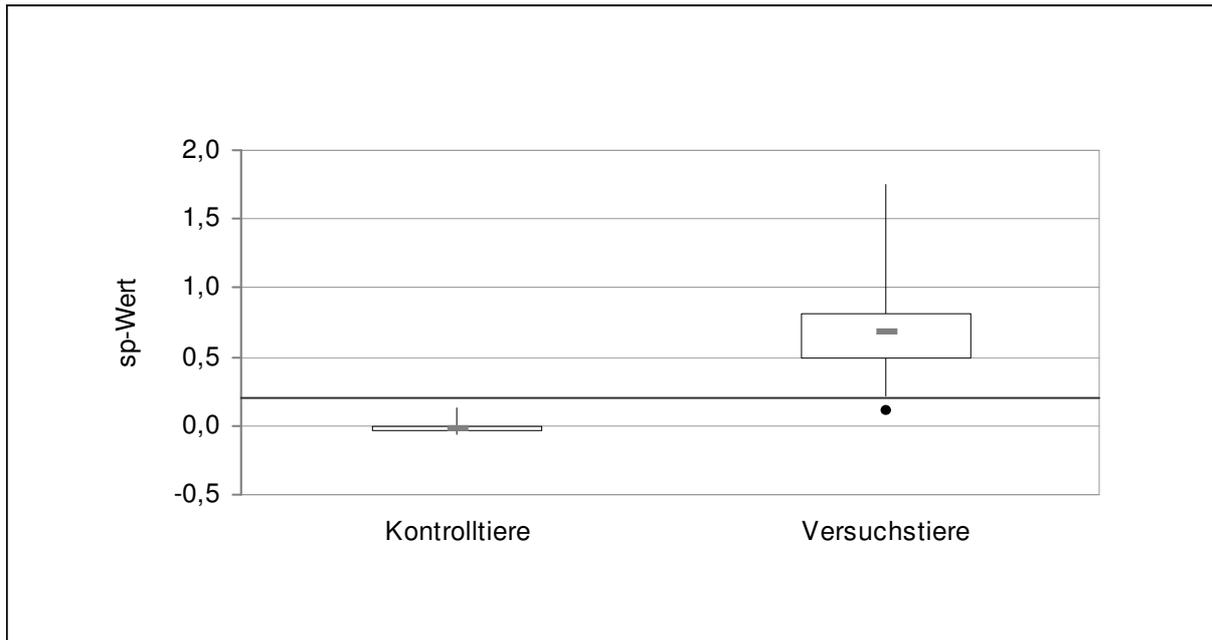


Abb. 18: Verteilung der sp-Werte

Dargestellt ist die Verteilung der im ELISA-Test ermittelten sp-Werte für die untersuchten Seren der Kontroll- (n=43) und Versuchsgruppe (n=29). Die waagrechte Linie in Höhe des sp-Wertes 0,2 zeigt den für den angewandten Test gegebenen Schwellenwert an. In den gegebenen Box-Plot-Diagrammen ist für die Messwerte jeder Gruppe Minimum, erstes Quartil, Median, drittes Quartil und Maximum dargestellt. Der in der Versuchsgruppe ermittelte Messwert, welcher unter dem Schwellenwert liegt, ist als Punkt dargestellt.

4.3 Untersuchungen in Eiern aus vakzinierten Masthühnern

4.3.1 Infektionsversuche in embryonierten Masthuhneiern aus ARV-spezifisch vakzinierten Elterntieren

In einem weiteren Experiment sollten die Auswirkungen von ARV-spezifischen Antikörpern im Dotter embryonierter Masthuhneier auf den Verlauf einer ARV-Infektion untersucht werden. Dazu wurden zwei Chargen an Masthuhneiern (I, II) von zwei verschiedenen vakzinierten Elterntierherden untersucht. Die Masthuhneier wurden vergleichend mit den ARV-Stämmen S1133 und 8474DP4-6 am sechsten Bebrütungstag in den Dottersack inokuliert. Zum Vergleich wurden embryonierte Hühnereier aus spezifiziert pathogenfreier Haltung gleichförmig infiziert. Es wurden zwei Virusanzuchten des ARV-Isolats 8474DP4-6 eingesetzt.

Vor der Inokulation wurde aus jedem Masthuhnei eine Dotterprobe (0,2 ml) entnommen und hinsichtlich ihres Antikörperstatus mittels ELISA-Technik untersucht. Eine Auswahl von fünf Proben wurde zusätzlich im Neutralisationstest auf neutralisierende Antikörper hin untersucht.

4.3.2 Serologische Untersuchung mittels ELISA-Technik

Eine erste Charge (I) an Masthuhneiern (n=77), welche für die Dottersackinfektion mit dem Stamm S1133 und mit dem $1,7 \times 10^4$ pbE enthaltenen Stock des ARV-Isolats 8474DP4-6 zur Verfügung stand, wurde mit einem hauseigenen ELISA-Test untersucht (Abb. 19 A, B).

Der Schwellenwert wurde für jede der beiden eingesetzten Reaktionsplatten anhand mitgeführter Negativseren neu bestimmt und als mittlerer Extinktionswert zuzüglich der dreifachen Standardabweichung definiert. Alle gemessenen Werte, welche größer als der Schwellenwert waren, wurden als seropositiv gewertet. Von n=77 untersuchten Dotterproben enthielten 75 gegen ARV gerichtete Antikörper, zwei Proben wurden als seronegativ beurteilt. Die untersuchten Proben wiesen Extinktionswerte von 0,05 bis 1,2 OD auf.

Eine weitere Charge (II) an Masthuhneiern (n=68), die für die Dottersackinokulation mit dem $7,7 \times 10^3$ pbE enthaltenden Virusstock eingesetzt wurden, wurden mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Test (FlockChek REO, IDEXX GmbH, Ludwigsburg) nach den Angaben des Herstellers auf ihren Gehalt an gegen ARV gerichtete Antikörpern untersucht (Abb. 19 C, D). Eine Auswertung des Testes erfolgt anhand ermittelter sp-Werte. Sp-Werte, größer als der mit 0,2 festgelegte Schwellenwert wurden als seropositiv gewertet. Alle Proben lagen über dem Schwellenwert und wurden als seropositiv beurteilt. Die Proben wiesen Extinktionswerte von 0,15 bis 1,2 OD auf.

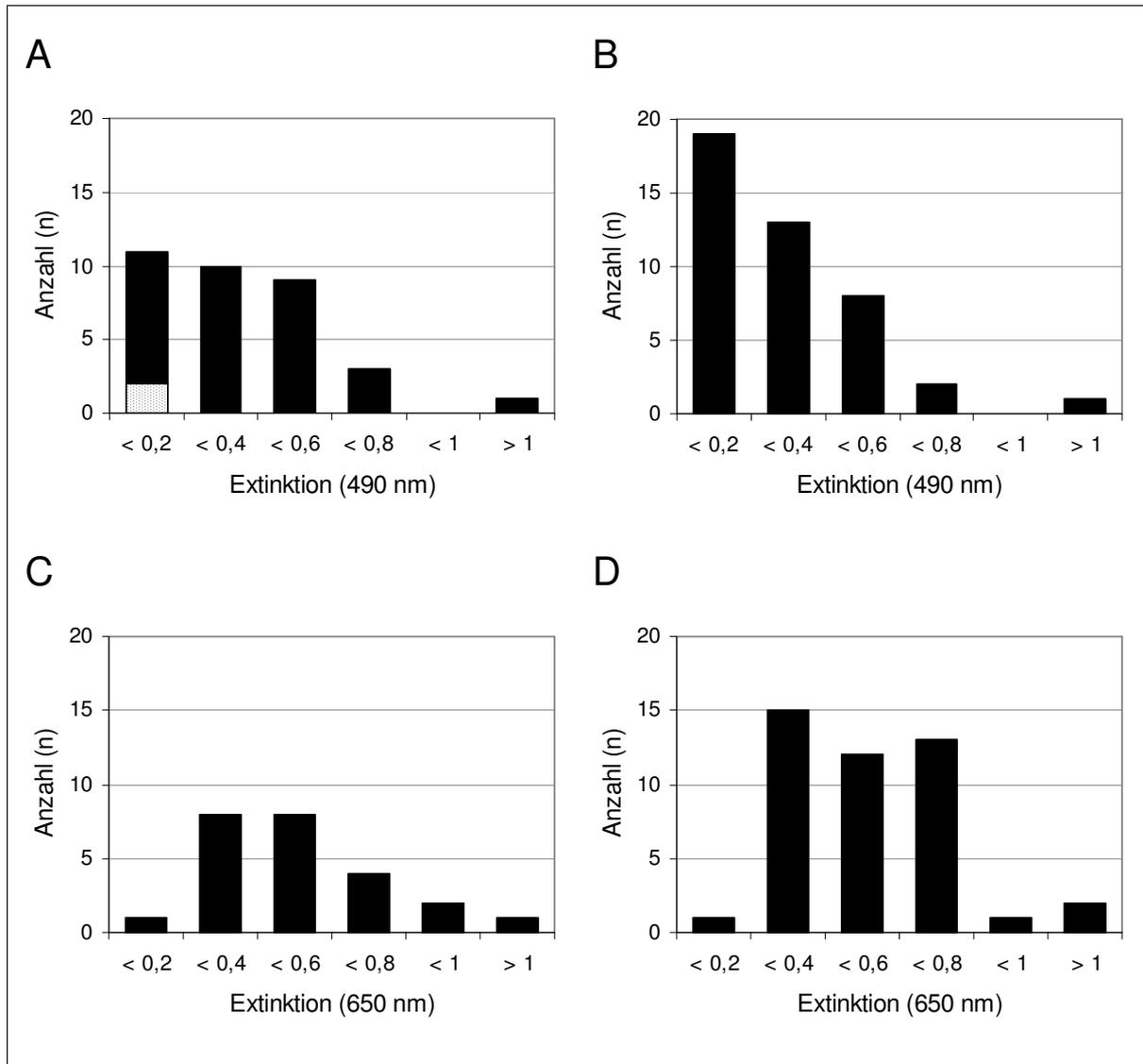


Abb. 19: Antikörpernachweis aus Dotterproben mittels ELISA-Test

Dargestellt ist die Anzahl (n) an Proben je Extinktionsbereich. Die Werte wurden in einem hauseigenen ELISA (A, B), bzw. in einem kommerziellen ELISA (C, D) bei angegebener Wellenlänge ermittelt. Werte größer des Schwellenwertes (A: 0,07; B:0,03; C:0,1; D:0,08) sind als schwarze (■) Balkenanteile dargestellt, Werte kleiner als dieser als weiß gepunktete (▨)Balkenanteile.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Masthuhneier der Charge I (n=77) sind unter A (n=34) und B (n=43) dargestellt, diejenigen der Charge II sind unter C (n=24) und D (n=44) aufgetragen.

4.3.3 Untersuchung von Dotterproben im Plaquereduktionstest

Eine weitergehende Charakterisierung der in Dotterproben aus den embryonierten Masthuhneiern enthaltenen ARV-spezifischen Antikörper erfolgte im Plaquereduktionstest anhand zufällig ausgewählter Proben (n=5) aus der ersten Charge (I) an Broilereiern (Abb. 20).

Vergleichend wurde eine neutralisierende Wirkung der Antikörper sowohl gegenüber dem Stamm S1133, als auch dem Feldisolat 8474DP4-6 evaluiert.

Der ARV-Stamm S1133 wurde sehr effektiv durch die Dotterproben neutralisiert. So lag die Restinfektiosität auch bei größter Verdünnung bei allen untersuchten Proben (Id 7; 1:128) unter 20%. Bei geringerer Verdünnung (bis Id 6; 1:64) nimmt die Restinfektiosität einen Wert um 4% ein, ist aber in jedem Fall größer 0.

Die Effizienz der Neutralisation gegenüber dem ARV-Stamm ist geringer, die Restinfektiosität des Stammes demnach deutlich höher. Bei einer Verdünnung des Dotters von 1:8 (Id 3) beträgt die Restinfektiosität zwischen 17 und 45 %. Bei stärkerer Verdünnung der Dotterprobe steigt die Restinfektiosität an um bei der größten Verdünnung (Id 7; 1:128) Werte zwischen 44 und 119 % einzunehmen.

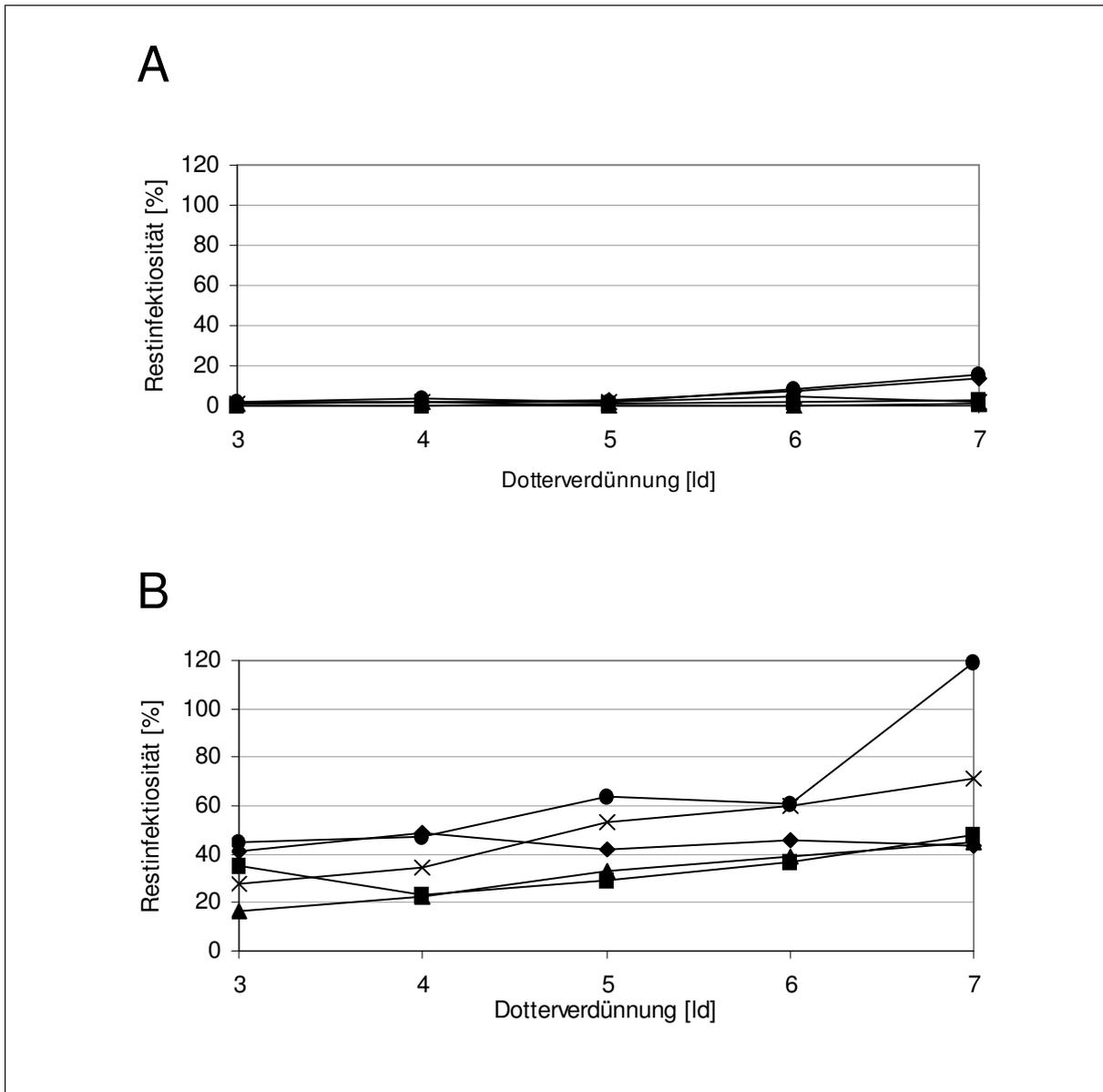


Abb. 20: Restinfektiosität der ARV-Stämme S1133 und 8474DP4-6

Fünf Dotterproben wurden im Plaquereduktionstest vergleichend gegen die ARV-Stämme S1133 (A) und 8474DP4-6 (B) getestet und auf neutralisierende Antikörper hin untersucht. Aufgetragen ist die Restinfektion im Vergleich mit der ungehemmten Viruskontrolle (2500 pbE/ ml Inokulat) des jeweiligen Stammes bei den eingesetzten Verdünnungsstufen.

4.3.4 Vergleichende Infektion von Hühnereiern in den Dottersack

Die in ovo Virustitration des Stamms S1133 weist in spf-Eiern einen Titer von $2,1 \times 10^6$ EID₅₀/ ml nach (Tab. 14). Dies entspricht einem Verhältnis (Tab. 15) von 1,09 zu den in Zellkultur ermittelten plaquebildenden Einheiten. Demgegenüber liegt die in Masthühnereiern ermittelte EID₅₀ mit $1,5 \times 10^6$ EID₅₀ geringfügig darunter und ergibt mit 1,45 eine leichte Erhöhung des Verhältnisses pbE/ EID₅₀. Die Infektion mit S1133 führt sowohl bei den spf- als auch bei den Masthühnereiern zum Absterben der Embryonen. Verdeutlicht wird dies durch das Verhältnis EID₅₀ zu ELD₅₀, der sowohl für die spf- als auch für die Masthühneier 1 betrug.

Bei dem Vergleich der Inokulation mit zwei Virusstocks des ARV-Stammes 8474DP4-6 zeigten sich in spf-Eiern deutlich höhere Werte für die EID₅₀ und ELD₅₀ als in den zeitgleich inokulierten Broilereiern. Die EID₅₀ war bei den Masthühnereiern der Charge I im Vergleich zu den spf-Eiern um das 77-fache, für die Charge II um das 14 fache erhöht.

Nach Dottersackinokulation induziert der Stamm 8474DP4-6 eine ausgeprägte Embryomortalität und es kam nur vereinzelt zu infizierten überlebenden Embryonen. Dies wird durch den Quotienten aus infizierten zu gestorbenen Embryonen verdeutlicht, der bei Infektion von spf-Eiern 1,6 und 1 beträgt. Nach Infektion von Masthühnereiern erhöht sich der Quotient EID₅₀/ ELD₅₀ und beträgt nun 1,9 für die erste Charge und 5,8 bis 6,6 für Charge II. Dies verdeutlicht, dass insbesondere Embryonen der zweiten Charge von Masthühnereiern die Infektion mit dem Stamm 8474DP4-6 im Beobachtungszeitraum überlebt haben. Allerdings darf der Quotient aus EID₅₀/ELD₅₀ nicht darüber hinwegtäuschen, dass auch in Masthühnereiern der ersten Charge eine protektive Wirkung eintrat.

Tab. 14: Vergleichende Inokulation von spf- und Masthuhneiern

Virusstamm	Ausgangskonzentration Virus pbE/ ml Anzucht	S1133	8474DP4-6		
		2,3 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁴	7,7 x 10 ³	
			A	B	
spf-Eier	Eiinfektiöse Dosis ₅₀	2,11 x 10 ⁶	1,18 x 10 ⁵	1,48 x 10 ⁵	
	Eiletale Dosis ₅₀	2,11 x 10 ⁶	7,32 x 10 ⁴	1,48 x 10 ⁵	
Masthuhneier	Charge der Eier	I	I	II	II
	Eiinfektiöse Dosis ₅₀	1,58 x 10 ⁶	1,58 x 10 ³	1,15 x 10 ⁴	1,04 x 10 ⁴
	Eiletale Dosis ₅₀	1,58 x 10 ⁶	8,33 x 10 ²	1,99 x 10 ³	1,58 x 10 ³

Tab. 15: Kennzahlen zur vergleichenden Inokulation von spf- und Masthuhneiern

Virusstamm	Ausgangskonzentration Virus pbE/ ml Anzucht Charge (Masthuhneier)	S1133	8474DP4-6		
		2,3 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁴	7,7 x 10 ³	
		I	A I	B II	II
pbE/ EID₅₀	spf-Eier	1,09	0,14	0,05	
	Masthuhneier	1,45	10,75	0,66	0,74
	Quotient	1,33	76,79	13,20	14,80
pbE/ ELD₅₀	spf-Eier	1,09	0,23	0,05	
	Masthuhneier	1,45	20,39	3,86	4,87
	Quotient	1,33	88,65	77,20	97,40
EID₅₀/ ELD₅₀	spf-Eier	1	1,60	1	
	Masthuhneier	1	1,90	5,80	6,60
	Quotient	1	1,19	5,80	6,60

5. Diskussion

5.1 Untersuchungen in spezifiziert pathogenfreien Hühnereiern

5.1.1 Vergleichende Inokulation in Dottersack und Allantoishöhle

Mit den durchgeführten *in ovo* Infektionsexperimenten sollten die Auswirkungen einer ARV-Infektion auf den Embryo untersucht werden. Embryonierte Hühnereier wurden am sechsten Bebrütungstag in den Dottersack oder am neunten Bebrütungstag in die Allantoishöhle inokuliert. Die inneren Organe der Embryonen wurden auf primären Hühnerembryoleberzellkulturen hinsichtlich einer ARV-Infektion untersucht. Die Virusreisolation aus den inneren Organen lässt, insbesondere bei Absterben des Embryos, auf eine generalisierte Infektion desselben schließen. Die Inokulation wurde mit dem MAS-assoziierten ARV-Stamm 8474DP4-6 und vergleichend mit dem ARV-Impfstamm S1133 vorgenommen. Für jeden Stamm wurden die Kennzahlen EID_{50} und ELD_{50} ermittelt. Anhand des Verhältnisses von EID_{50} zu ELD_{50} wird ersichtlich, ob es zum Überleben von infizierten Embryonen gekommen ist. Dies ist dann der Fall, wenn dieses Verhältnis einen Wert größer 1 einnimmt.

Nach Inokulation in den Dottersack kam es bei beiden ARV-Stämmen nicht zum Überleben infizierter Embryonen, das Verhältnis von EID_{50} zu ELD_{50} betrug folglich 1. Nach Allantoishöhleninokulation traten demgegenüber überlebende infizierte Embryonen auf. Das Überleben infizierter Embryonen trat nach Inokulation mit dem Stamm S1133 in einem einzelnen Fall auf, das Verhältnis von EID_{50} zu ELD_{50} betrug hier 1,8. Für den Stamm 8474DP4-6 war initial keine ELD_{50} zu ermitteln, alle infizierten Embryonen überlebten.

Deutliche Unterschiede zeigten sich auch bei der erforderlichen Dosis um 50 % der Embryonen zu infizieren oder zu töten. Für den Stamm S1133 war bei Allantoishöhleninokulation die sechsfache Dosis erforderlich um 50% der Embryonen zu infizieren, um 50% der Embryonen zu töten in etwa die 10fache Dosis als bei Dottersackinokulation. Für den Stamm 8474DP4-6 zeigte sich ein deutlicherer Unterschied, hier war nach Allantoishöhleninokulation eine nahezu 100fache Dosis nötig um 50 % der Eier zu infizieren, als nach Dottersackbeimpfung.

Zusammenfassend kann die Inokulation in den Dottersack für den Stamm 8474DP4-6 als der effektivere Infektionsmodus beschrieben werden. Hier zeigten sich im Vergleich der beiden Infektionsmodi deutliche Unterschiede, während die Inokulation mit dem Stamm S1133 bei den beiden Inokulationsarten vergleichbare Ergebnisse erbrachte. Bei Inokulation mit dem Stamm 8474DP4-6 kam es nach Inokulation in die Allantoishöhle im ersten Durchgang nicht zum Absterben infizierter Embryonen und im Vergleich zur Dottersackinokulation wurde eine ungleich höhere Inokulationsdosis toleriert.

Eine Ursache für die deutlich unterschiedlichen Auswirkungen nach den beiden Inokulationsmodi kann in der Entwicklung des Embryos liegen. Die Inokulation in den Dottersack erfolgte am sechsten Bebrütungstag und damit deutlich früher als die Allantoishöhlenbeimpfung am neunten Bebrütungstag. Würde man die Entwicklung des Embryos als Ursache annehmen, wäre allerdings ein gleichförmiges Verhalten der beiden ARV-Stämme zu erwarten gewesen. Da der Stamm S1133 bei beiden Inokulationsmodi vergleichbare Ergebnisse hervorbrachte, der Stamm 8474DP4-6 hingegen stark divergierende Ergebnisse aufwies, erscheint der Entwicklungsunterschied des Embryos als alleinige Ursache unwahrscheinlich.

Durch die Wahl des Inokulationsmodus werden verschiedene Eintrittswege des Virus in den Embryo nachgestellt.

Nach der Inokulation in die Allantoishöhle ist der Eintritt des Virus in den Embryo ausschließlich über den Allantoiskreislauf möglich. Der Allantoiskreislauf ist ab dem fünften Bebrütungstag funktionsfähig und dient bis etwa zwei Tage vor Schlupf der Sauerstoffversorgung. Zusätzlich erfolgt ab dem zehnten Bebrütungstag eine Rückresorption von Flüssigkeit aus der Allantoishöhle, wodurch es zur Ausfällung der enthaltenen Harnsäure kommt. Die Infektion des Embryos erfolgt so nach der lokalen Vermehrung im Allantoisepithel hämatogen.

Eine hämatogene Infektion ist auch nach Inokulation in den Dottersack am sechsten Bebrütungstag möglich. Nach einer lokalen Vermehrung im Dottersackepithel, würde das Virus den Embryo über den Dottersackkreislauf und die Dottersackvene erreichen. Der Dottersackkreislauf gewährleistet die frühe Sauerstoffversorgung des Embryos und ist bereits am 4. Bebrütungstag gut ausgebildet (PATTEN, 1971). Der Embryo würde so nach lokaler Vermehrung im außerhalb gelegenen Dottersackepithel direkt im Sinne einer Virämie erfasst und eine Absiedelung in die

Zielorgane wäre so ohne vorherige primäre Replikation in Geweben des Embryos erfolgt.

Ein zweiter möglicher Infektionsweg nach Dottersackbeimpfung besteht über den Dottersackstiel, welcher sich ab dem fünften Bebrütungstag ausbildet. Der Dottersackstiel verbindet den Dottersack mit dem embryonalen Darmkanal und ist bereits ab dem sechsten Bebrütungstag und ergo dem Zeitpunkt der Inokulation durchlässig. Durch den Dottersackstiel fließt Dotter in den Darmkanal ab und wird dort bis zum Drüsenmagen regurgitiert (FEHER, 1975). Nach der Inokulation von Virus in den Dottersack ist also ein Abtransport des Inokulats in den embryonalen Darmkanal möglich. Dort kann eine primäre Replikation des Virus in den Mukosazellen des Darmes oder Drüsenmagens stattfinden, bis es zu einer Virämie mit anschließender Generalisation kommt, welche dann zum Absterben des Embryos führt. Das Auftreten einer Virämie nach lokaler Replikation in der Mukosa des Verdauungstraktes wurde für andere ARV-Stämme gezeigt (MENENDEZ, 1975b) und ist daher auch für den Stamm 8474DP4-6 denkbar.

Der ARV-Impfstamm weist bei beiden Inokulationsarten vergleichbare Werte auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Impfvirus nach einer lokalen Vermehrung im Epithel von Dottersack und Allantoishöhle effizient über die abführenden Gefäße den Embryo erreichen kann und dort zu einer generalisierten Infektion führt. Das Auftreten einer Virämie ist auch für andere ARV-Stämme beschrieben (MENENDEZ, 1975a), hierbei wird eine lymphozytenassoziierte Virämie vermutet.

Der MAS-assoziierte Stamm verursacht demgegenüber nach Inokulation in die Allantoishöhle eine weniger effektive Infektion und profitiert deutlich von der Inokulation in den Dottersack. Eine mögliche Ursache für die höhere Infektionseffizienz nach dieser Art der Inokulation kann in der primären lokalen Vermehrung im embryonalen Darm liegen. Nach der lokalen Vermehrung im Darm ist neben der Generalisation über eine Virämie auch eine aufsteigende Infektion der Leber möglich. Die effektive enterale Replikation erfolgt möglicherweise erst nach einer Prozessierung des Virus durch Enzyme, welche bereits im embryonalen Darm vorhanden sind (MOTHES et al., 1985). In der elektronenmikroskopischen Untersuchung von ARV-infizierten Zellkulturen konnte für den Stamm 8474DP4-6 gezeigt werden, dass sich im Laufe der Replikation in infizierten Zellen dichte Aggregate aus Viruspartikeln ausbilden. Da die zur Inokulation verwendeten

Virusstocks lediglich von Zellresten befreit und nicht durch Ultraschallbehandlung oder enzymatischen Verdau weiter vorbehandelt wurden ist davon auszugehen, dass die beobachteten Aggregate im Inokulum noch vorhanden waren. Die Enzyme im embryonalen Darm könnten die Virusaggregationen auflösen und so zu einer effektiveren Infektion beigetragen haben. Zur Überprüfung dieser These sollte eine vergleichende Inokulation in die Allantoishöhle und den Dottersack mit durch Ultraschall- oder Enzymbehandlung präparierten Virusaufarbeitungen erfolgen. In erster Linie bleibt jedoch die mögliche Bedeutung der primären enteralen Replikation abzuklären. Hier empfiehlt sich eine vergleichende Inokulation mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 zum gleichen Zeitpunkt in Allantoishöhle und Dottersack.

In einem Wiederholungsversuch wurde abgeklärt, ob es nach Inokulation in die Allantoishöhle mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 zu einem Absterben der Embryonen kommen kann. Nach Inokulation mit einer höhertitrigen Virusanzucht kam es zum Absterben von Embryonen, gleichzeitig überlebten aber auch zahlreiche infizierte Embryonen bis zum 19. Bebrütungstag. Das Auftreten infizierter Überlebender war, wie anhand der durchgeführten Titration dargestellt wurde, weitgehend unabhängig von der absoluten Inokulationsdosis.

Das embryonierte Hühnerei kann ein geeignetes Modell darstellen, um die Pathogenität von Virusstämmen zu charakterisieren. Hierbei wird im Allgemeinen die Vitalität der inokulierten Eier überprüft und die Zeit von der Inokulation bis zum Absterben infizierter Embryonen gemessen. *In ovo* Modelle zur Charakterisierung der Pathogenität sind für zahlreiche Viren, unter anderem für das Virus der Newcastle-Krankheit (NDV), etabliert. Es handelt sich hierbei um ein Aviäres Paramyxovirus des Serotyps 1, welches im Tierversuch durch eine intracerebrale Inokulation von Eintagsküken in die vier Pathotypen (apathogen, lentogen, mesogen und velogen) eingeteilt werden kann. Für NDV besteht eine deutliche Korrelation zwischen den im Tierversuch ermittelten Pathotypen und der mittleren Absterbezeit nach *in ovo* Inokulation (ALEXANDER, 2000).

Die für die ARV-Stämme S1133 und 8474DP4-6 nach Dottersackinokulation ermittelten mittleren Absterbezeiten zeigten keine deutlichen stammspezifischen Unterschiede. Bei wiederholter Inokulation von spf-Eiern mit dem Stamm 8474DP4-6 in die Allantoishöhle kam es zwar zum Absterben infizierter Embryonen, die mittlere Zeit bis zum Absterben von Embryonen war jedoch starken Schwankungen unterworfen und führte bei wiederholter Infektion mit der gleichen Dosis nicht zu

reproduzierbaren Ergebnissen. Zusätzlich bedingt die Infektion nicht das Absterben der Embryonen, überlebende infizierte Embryonen traten regelmäßig auf. Dadurch ist es nicht möglich den Infektionsstatus der Eier anhand der Vitalität durch einfaches Schieren der Eier zu beurteilen, dieser muss vielmehr über einen ungleich aufwendigeren Virusnachweis überprüft werden. Die Bestimmung der mittleren Absterbezeit nach Inokulation von Hühnereiern lässt damit keine Rückschlüsse auf die Pathogenität eines bestimmten Stammes zu und die *in ovo* Untersuchung stellt keine geeignete Methode zur Charakterisierung von ARV-Stämmen dar.

5.2 Tierversuch

5.2.1 Beurteilung der Sterblichkeit

Insbesondere in der Versuchsgruppe, in geringerem Maße auch in der Kontrollgruppe waren im Verlauf des Versuches Abgänge zu verzeichnen. Die Mortalität in der Versuchsgruppe war deutlich höher als in der Kontrollgruppe, zusätzlich fielen zwischen dem zweiten und zwölften Lebenstag Versuchstiere mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden auf, welche aus Tierschutzgründen euthanasiert wurden. Insgesamt verendeten zwischen den Tagen eins und zwölf 17 von 69 Versuchstieren, zusätzlich wurden zwischen dem dritten und zwölften Lebenstag 22 Versuchstiere aus Tierschutzgründen nach Schlagbetäubung getötet. Die euthanasierten Tiere wiesen ein höchstgradig gestörtes Allgemeinbefinden auf und wurden als moribund beurteilt. Da damit der Tod der Tiere zwar zeitlich nicht vorhersehbar, aber unausweichlich erschien, wurden die euthanasierten Tiere in die Mortalität eingerechnet. Die Mortalität betrug für den Zeitraum zwischen Schlupf und siebtem Lebenstag 52,2%, für den Zeitraum bis zum zwölften Tag erhöhte sich die Sterblichkeit auf insgesamt 56,5%. In der Kontrollgruppe war im Vergleichszeitraum bis zum siebten Lebenstag eine Sterblichkeit von 6% zu verzeichnen, bis zum zwölften Tag betrug die Sterblichkeit unter den Kontrolltieren 12%. Im Rahmen von Leistungsprüfungen wurden für Hühner der Rasse White Leghorn Tierverluste bis zum 140. Lebenstag ermittelt, die unter einem Prozent lagen. Für Masthühner wird bei 35-tägiger Mastdauer von Tierverlusten bis zu 3,5% ausgegangen (DISTL und SIEGMANN, 2005). Die ermittelten Mortalitätsraten sind demnach für beide Gruppen als zu hoch anzusehen.

ARV-Infektionen können eine deutlich erhöhte Sterblichkeit mit sich bringen, VAN DE ZANDE und KUHN (2007) stellten nach intramuskulärer Inokulation von Eintagsküken der Rasse White Leghorn mit dem MAS-assoziierten ARV-Isolat ERS-2 (VAN LOON et al., 2001) eine Sterblichkeit von 79% innerhalb von sieben Tagen fest. Im vorliegenden Versuch ist die Infektion mit dem ARV-Stamm 8474DP4-6 als alleinige Ursache für die deutlich erhöhte Sterblichkeit in der Versuchsgruppe jedoch unwahrscheinlich, da auch in der Kontrollgruppe eine Erhöhung der Sterblichkeit auftrat.

5.2.2 Beurteilung der Daten zum Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde als Kriterium eines gestörten Wachstums betrachtet und am Tag des Schlupfes sowie am dritten, siebten, 14., 21., 28. und 35. Lebenstag durch Wiegen der Einzeltiere ermittelt.

Das durchschnittliche Körpergewicht nahm in beiden Gruppen bis zum dritten Lebenstag leicht ab. Dies ist als physiologischer Befund zu beurteilen, da in den ersten Lebenstagen der Dotter resorbiert und zudem noch wenig Futter aufgenommen wird. Ab dem dritten Lebenstag nahmen die Tiere beider Gruppen an Gewicht zu, wobei das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere bereits ab dem siebten Lebenstag hinter demjenigen der Kontrollgruppe zurückblieb. Das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere war zu jedem Messpunkt bis zum 35. Lebenstag kleiner als das Durchschnittsgewicht der Kontrolltiere.

Eine reduzierte Gewichtszunahme ist nach experimenteller Infektion von Hühnern mit ARV bereits hinlänglich beschrieben. Mehrere Forschungsgruppen inokulierten spf-Eintagsküken einer Masthuhnrasse mit ARV-Isolaten, welche aus klinisch an MAS erkrankten Masthühnern isoliert worden waren. Eine vorübergehende, statistisch signifikante Reduktion in der Gewichtszunahme stellten AL-AFALEQ und JONES (1994) sowie REKIK et al. (1991) nach oraler Inokulation von Eintagsküken mit einem ARV-Isolat fest. Dies war auch nach Inokulation in den Fußballen zu bestätigen, welche REKIK et al. (1991) parallel durchführten. Auch VERTOMMEN et al. (1980a) beobachteten nach der oralen Verabreichung eines ARV-Isolates an Eintagsküken eine verringerte Gewichtszunahme, wobei zusätzlich enterale Symptome wie Durchfall auftraten. Auch im vorliegenden Versuch führte die Infektion mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 zu einer signifikant erniedrigten Gewichtszunahme.

Als Ursache für die verringerte Gewichtszunahme kommen verschiedene Aspekte in Betracht. In der Versuchsgruppe wurden moribunde Tiere mit einem hochgradig gestörten Allgemeinbefinden auffällig, die eine Inappetenz aufwiesen. Bei Betrachtung der Gewichtsdaten der Versuchsgruppe am dritten und siebten Lebenstag zeigte sich, dass alle Tiere, deren Gewicht deutlich vom Median abwich und Werte kleiner des unteren Whiskers einnahm, noch am selben Tag moribund euthanasiert wurden.

Mit dem Ziel eine Verfälschung der Auswertung durch diese klinisch schwer erkrankten Tiere zu vermeiden, wurden für die Beurteilung der Zunahme nur die

Daten derjenigen Tiere berücksichtigt, welche bis zum 35. Lebenstag überlebten. Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurde jeweils die Gewichtszunahme als Differenz des aktuellen Gewichtes zum Ausgangsgewicht am Tag des Schlupfes betrachtet. Die Gewichtszunahme in der Versuchsgruppe war ab dem siebten Tag geringer als in der Kontrollgruppe, dies wurde durch einen Vergleich der Daten mit Hilfe des exakten Wilcoxon Rangsummentestes bestätigt.

Eine primäre Schädigung des Dünndarms mit nachfolgender Malabsorption und Malassimilation von Nährstoffen, erscheint in Anbetracht der Ergebnisse der pathohistologischen Untersuchung als unwahrscheinlich. Zu keinem Zeitpunkt wurden Veränderungen des Dünndarms festgestellt, die auf eine eingeschränkte Funktion des Darmepithels schließen lassen könnten. Die beobachtete vakuoläre Degeneration der Azinozyten des Pankreas wurde auch bei an MAS erkrankten Hühnern beobachtet (ASDRUBALI et al., 1984, 1985). Eine eingeschränkte Funktion des exokrinen Pankreas könnte eine Maldigestion und nachfolgend eine Reduktion der Gewichtszunahme bedingen. Die an den Versuchstieren beobachteten Veränderungen waren jedoch nur bei einzelnen Tieren vorhanden und von milder Ausprägung, so dass sie als Ursache für die anhaltende Minderung der Gewichtszunahme nicht wahrscheinlich sind.

Demgegenüber könnte die beobachtete Durchfallsymptomatik ursächlich für die erniedrigte Gewichtszunahme sein. In der Versuchsgruppe fielen vom zweiten bis zum achten Lebenstag Tiere mit Durchfallsymptomatik auf, während in der Kontrollgruppe lediglich von sechsten bis achten Lebenstag Durchfall beobachtet wurde. Die früher einsetzende und länger andauernde Durchfallsymptomatik könnte zeitlich begrenzt eine verringerte Gewichtszunahme bedingen, als alleinige Ursache für eine anhaltend verringerte Gewichtszunahme erscheint das Durchfallgeschehen jedoch unwahrscheinlich. Nach einer kurzfristigen Leistungsdepression wäre dann zu erwarten gewesen, dass sich die Werte zur Gewichtszunahme bis zum 35. Lebenstag wieder den in der Kontrollgruppe gemessenen Werten annähern. Unter den Versuchstieren mit Durchfallsymptomatik, waren darüber hinaus zahlreiche Tiere mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden, welche vor Versuche starben oder euthanasiert wurden und damit nicht in die Auswertung zur Gewichtsentwicklung einbezogen wurden.

Durch die Ausnahme der hochgradig erkrankten Tiere, welche vor dem 35. Lebenstag verendeten, ergibt sich bei den verbleibenden Versuchstieren bezüglich

der Schwere der beobachteten klinischen Symptome eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Situation. Damit stehen die Auswirkungen der Infektion mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 als Ursache für die reduzierte Gewichtsentwicklung im Vordergrund. Möglich erscheint zum einen eine Schädigung des Darmepithels und auch des Pankreas auf zellulärer Ebene, so dass die Veränderungen in der feingeweblichen Untersuchung nicht erkennbar sind. Eine immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von ARV-Antigen in den Zellen könnte hier in nachfolgenden Untersuchungen hinweisend sein.

Zum anderen könnten auch im Bezug auf die Gewichtsentwicklung mögliche Einflüsse der ARV-Infektion auf den Immunstatus der Tiere zum Tragen kommen. Eine durch ARV verursachte Immunsuppression macht das betroffene Küken anfällig für Sekundärinfektionen, deren Begrenzung für das betroffene Tier mit einem hohen energetischen Aufwand verbunden ist und damit eine erniedrigte Gewichtszunahme nach sich zieht. Die Auswirkungen einer Infektion mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 auf den Immunstatus der Tiere bleibt in weiterführenden Untersuchungen abzuklären.

Über welchen pathogenetischen Mechanismus die ARV-Infektion zu einer verringerten Gewichtszunahme führt, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig zu klären.

5.2.3 Beurteilung der bakteriologischen Befunde

Aus Tieren beider Gruppen wurden verschiedene Gram-positive (*Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*), wie Gram-negative (*E.coli*) Bakterienspezies isoliert. Aus Tieren der Kontrollgruppe wurde zusätzlich *Bacillus sp.* und *Citrobacter freundii* nachgewiesen, aus Tieren der Versuchsgruppe wurde zusätzlich *Enterobacter cloacae* nachgewiesen. Die Isolierung aus der Kontrollgruppe erfolgte vermehrt zwischen dem vierten und achten Lebenstag, aus Versuchstieren wurden vom Tag des Schlupfes bis zum siebten Lebenstag vermehrt Bakterien isoliert. Alle isolierten Spezies sind in der Lage, pathologische Veränderungen im Huhn auszulösen, sind aber gleichsam als physiologische Mikroflora beschrieben.

Staphylococcus sp.:

Infektionen mit *Staphylococcus sp.* treten im Huhn häufig auf, wobei schwerwiegende klinische Erscheinungen im Allgemeinen durch *Staphylococcus aureus* hervorgerufen werden. Die Differenzierung von *Staphylococcus sp.* erfolgt im Dekapsulationstest, *Staphylococcus aureus* reagiert in diesem Test positiv. Der Deapsulationstest weist die von *Staphylococcus aureus* gebildete Hyaluronidase nach. Die im gegebenen Versuch isolierten Staphylokokken wurden hingegen als Hyaluronidase-negativ charakterisiert. Hyaluronidase-negative Staphylokokken sind beim Huhn als autochthone Flora beschrieben, manche Subspezies können als fakultativ pathogene Keime auftreten, wenn ihnen durch eine Vorschädigung das Eindringen in das Gewebe ermöglicht wird (ANDREASEN, 2008).

Streptococcus sp.:

Streptococcus sp. sind in der Umwelt ubiquitär verbreitet und werden auch aus gesunden Hühnern isoliert. Im Geflügel sind Streptokokken vor allem als opportunistischer Erreger beschrieben (THAYER et al., 2008).

Enterococcus sp.:

Enterococcus sp. wurden lange Zeit als Streptokokkus der Lancefield-Gruppe D klassifiziert und ist im englischen Sprachgebrauch auch als „fecal strep“ (dtsh: Fäkal-Streptokokke) bekannt. *Enterococcus sp.* sind Teil der natürlichen Darmflora des Huhnes. Einige Spezies, insbesondere *Enterococcus faecalis*, sind auch mit Krankheit assoziiert. Es sind sowohl akute septikämische Verläufe mit erhöhter Mortalität, als auch subakut bis chronische Verlaufsformen mit Depression und

Gewichtsverlust beschrieben. In der pathologischen Untersuchung wird häufig granulomatöse Hepatitis und eine eitrige Endokarditis festgestellt (THAYER et al., 2008). Nach experimenteller Infektion mit *Enterococcus faecalis* wiesen Hühnerküken eine Retention des Dottersacks auf, zusätzlich wurden maternale Antikörper, welche gegen das Newcastle Disease Virus gerichtet waren, deutlich schlechter aus dem Dotter resorbiert (SANDER et al., 1998).

Bacillus sp.:

Aus der Kontrollgruppe wurde als weitere Gram-positive Spezies auch *Bacillus sp.* isoliert. Diese steht im Zusammenhang mit Dottersackinfektionen (BARNES und NOLAN, 2008).

Citrobacter freundii und *Enterobacter cloacae*:

Die beiden Gram-negativen Bakterienspezies *Citrobacter freundii* und *Enterobacter cloacae* besiedeln als physiologische Mikroflora die mukosalen Membranen von Verdauungs- und Respirationstrakt. Beide treten als opportunistische Erreger bei Infektionen des Respirationstraktes, des Dottersacks, sowie der Haut auf (BARNES und NOLAN, 2008).

Escherichia coli:

Aus einigen Tieren der Versuchs- und auch der Kontrollgruppe wurde auch *Escherichia coli* (im weiteren als *E. coli* bezeichnet) isoliert. Die Spezies *E. coli* zeigt große stammspezifische Unterschiede bezüglich ihrer Pathogenität. Während apathogene Stämme als natürliche Darmflora auftreten, führen andere Stämme zu schweren klinischen Verläufen. Die Klassifizierung von *E. coli* in Serovare erfolgt nach dem Kauffmann-Schema anhand der Oberflächenantigene. Berücksichtigt werden hierbei in erster Linie das somatische Antigen O und das flagellare Antigen H, es sind etwa 180 verschiedene O- und 60 K-Antigene bekannt. Weitere Antigene (K, F) ermöglichen bei Bedarf eine noch differenziertere Unterteilung.

Die krankheitsauslösenden Stämme können nach der Lokalisation der verursachten Läsionen in intestinale und extraintestinale Stämme eingeteilt werden. Unter den intestinalen Stämmen werden unter anderen die Pathovare enterotoxische (ETEC), enterohämorrhagische (EHEC), enteropathogene (EPEC) und enteroinvasive *E. coli* (EIEC) unterschieden. Die pathogenen Eigenschaften der verschiedenen Stämme werden durch Entero-, Endo- und Cytotoxine, sowie durch Adhäsionsfaktoren bedingt.

Die für Vögel pathogenen (engl.: avian pathogenic) Stämme werden auch als APEC bezeichnet, sie unterscheiden sich von den Säugetier-assoziierten Stämmen und sind für Säuger in den meisten Fällen nicht oder nur schwach pathogen. Primäre Darminfektionen mit den erwähnten teilweise toxinbildenden Pathovaren ETEC, EIEC, EHEC und EPEC sind bei Vögeln selten. Gesunde Vögel mit einem intakten Immunsystem erweisen sich im Allgemeinen als bemerkenswert resistent gegenüber einer Infektion auch mit hochpathogenen *E. coli*- Stämmen. Bei einer Schwächung des Immunsystems oder bei Störung der natürlichen Barrieren (Haut, mukosale Membranen) durch Traumata oder Infektionen kann eine Infektion mit *E. coli* jedoch leicht erfolgen und sich auch rasch im betroffenen Vogel ausbreiten. Die Empfänglichkeit des Huhnes gegenüber Infektionen mit *E. coli* kann durch verschiedene Faktoren gesteigert werden. Neben physiologischen Aspekten (Alter, Rasse etc.), Haltungsbedingungen (Staubbelastung, Besatzdichte u. v. m.), Toxinbelastung (z. B. Ammoniak, Mykotoxine) sind in diesem Zusammenhang auch parasitäre (*Ascaris sp.*; *Eimeria sp.*) sowie bakterielle (*Bordetella avium*, *Mycoplasma sp.*) Infektionen als modulierende Faktoren bekannt. Auch eine Reihe viraler Infektionen spielen bei der *E. coli*-Infektion des Huhnes eine Rolle als agravierender Faktor: in diesem Kontext sind das Adenovirus Typ 1, das Virus der Atypischen Geflügelpest (NDV), das Virus der Infektiösen Bursitis, aber auch ARV beschrieben. Klinisch treten Infektionen mit *E. coli* im Huhn insbesondere als Colibazilllose oder als Coligranulomatose in Erscheinung. Die Colibazilllose kann sich als akutes septikämisches Krankheitsgeschehen darstellen und mit deutlich erhöhter Mortalität einhergehen, aber auch einen protrahierten Verlauf mit einer fibrinösen Entzündung der serösen Häute nehmen. Weiterhin kann sich die Colibazilllose auch lokal manifestieren, neben Hautinfektionen sind hier insbesondere Nabel- und Dottersackentzündungen beschrieben. Die Coligranulomatose (Hjärre-Krankheit) wird durch spezifische *E. coli*-Stämme des Serotyps O8 und O9 hervorgerufen und tritt insbesondere bei älteren Hühnern als granulomatöse Darmentzündung auf. *E. coli* ist nicht zuletzt als Keim der autochthonen Darmflora des Haushuhnes beschrieben. Aus dem Darm gesunder Hühner wird *E. coli* mit Keimzahlen von 10^6 und mehr Keimen je Gramm Kot nachgewiesen. Als opportunistische Erreger können auch primär nicht pathogene Stämme nach Vorschädigung der Mukosa des Darmes in die Blutbahn übertreten und eine systemische Infektion verursachen (BARNES et al., 2008).

Bei den isolierten *E. coli* ist davon auszugehen, dass es sich um ubiquitär auftretende Stämme handelt. Ein Eintrag von APEC erscheint als unwahrscheinlich, da die Tiere in isolierten Abteilungen mit HEPA-Luftfiltersystem aufgezogen wurden. Zu keiner Zeit bestand direkter Kontakt zu anderen Vögeln. Zusätzlich wurde ein Hygienekonzept etabliert, welches unter anderem einen Kleiderwechsel vor Betreten des Stallabteiles, sowie Desinfektionsmaßnahmen beinhaltet.

Bei allen isolierten Bakterienspezies handelt es sich also um primär apathogene Bakterien, die auch in der autochthonen Mikroflora des Huhnes nachzuweisen sind. Daher stellt sich die Frage, ob der Nachweis der beschriebenen Bakterienspezies als physiologischer Befund einzuordnen ist.

Auch die Tatsache, dass eine Isolierung der Bakterienspezies aus den inneren Organen Herz, Lunge und Leber erfolgte, lässt nicht automatisch auf ein pathologisches Geschehen schließen. Nach dem Tod eines Huhns kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einer Autolyse der Darmwand und damit zum Übertritt von darmassoziierten Bakterien in die Bauchhöhle (BARNES et al., 2008). Während beim Säuger durch das Zwerchfell eine deutliche Trennung von Brust- und Bauchhöhle erfolgt, sind die Körperhöhlen des Vogels nur durch vergleichsweise dünne seröse Häute abgegrenzt (VOLLMERHAUS, 1992). Im Rahmen von autolytischen Vorgängen kann so auch eine Kontamination von Herz und Lunge durch darmassoziierte Bakterien in einem relativ kurzen Zeitraum erfolgen.

Um zumindest den Einfluss postmortalen Autolyse auszuschließen wurde, für die Beurteilung nur die an euthanasierten Tieren erhobenen bakteriologischen Befunde herangezogen. In geringem Maße ist ein Übertritt von darmassoziierten Bakterien auch bei moribunden Tieren vorstellbar, da hier von einer eingeschränkten Abwehrhaltung des stark geschwächten Organismus ausgegangen werden muss. Darüber hinaus weisen Vögel keine Lymphknoten auf, so dass keine effektive Filtration der Lymphe vor dem Wiedereintritt der Flüssigkeit in den Blutkreislauf erfolgt. Der Übertritt von Bakterien in die interzelluläre Flüssigkeit führt damit deutlich schneller und häufiger zu einer Bakteriämie, als dies bei Säugetieren der Fall ist.

In der Kontrollgruppe war vom sechsten bis neunten Lebenstag ein klinisches Geschehen mit reduziertem Allgemeinbefinden und leichter Durchfallsymptomatik auffällig. Am achten Lebenstag wurden aus den Lungen von zwei Tieren *Enterococcus sp.* und *E. coli* isoliert. Der Befund ist mit Vorsicht zu betrachten, da am achten Lebenstag bereits eine antibiotische Behandlung mit Enrofloxacin

eingeleitet war. Nach Verabreichung des antibiotischen Wirkstoffes ab dem sechsten Tag besserte sich das klinische Bild rasch, so dass eine bakterielle Infektion als Ursache wahrscheinlich erscheint.

Auch aus der Versuchsgruppe wurden gleichzeitig mit dem Auftreten von klinischen Symptomen zwischen dem zweiten und siebzehnten Lebenstag verschiedene Bakterienspezies aus den Organen getöteter Tiere isoliert. Wiederum wurden in erster Linie *Enterococcus sp.* und *E. coli* isoliert. Anders als in der Kontrollgruppe hatte eine antibiotische Behandlung mit Enrofloxacin und anschließend mit Colistin über je fünf Tage ab dem zweiten Lebenstag keine deutliche Besserung der klinischen Symptome zur Folge. Die klinischen Symptome waren deutlich schwerer ausgeprägt, als in der Versuchsgruppe. Ursächlich ist auch hier von einer bakteriellen Beteiligung an der Entstehung der klinischen Symptome auszugehen. Aus den getöteten Tieren der Versuchsgruppe wurden zu etwa gleichen Teilen eine Gram-positive kokkoide Mischflora, sowie *Enterococcus sp.* und *E. coli* isoliert. Die beobachteten Symptome könnten gleichsam allein durch einen pathogenen Stamm, beispielsweise der Spezies *E. coli* verursacht worden sein, in diesem Falle wäre jedoch eine deutlich Häufung des Nachweises von *E. coli* zu erwarten gewesen. Die anteilig gleichförmige Isolierung verschiedener Bakterienspezies deutet vielmehr auf ein Entgleisen der autochthonen Mikroflora mit anschließender Generalisierung im Sinne eines septischen Geschehens.

5.2.4 Beurteilung der virologischen Befunde

5.2.4.1 Eintrag in die Herde

Anhand der erhobenen Daten zu Reisolierung von ARV sollte zunächst geklärt werden, ob es nach Allantoishöhleninokulation von embryonierten Eiern mit dem Stamm 8474DP4-6 zum Schlupf infizierter Küken kommen kann. Damit sollte ein sehr früher Eintrag von ARV in die Herde ermöglicht werden. Aus Tieren der Versuchsgruppe wurde ARV vom Tag des Schlupfes bis zum zwölften Lebenstag aus allen untersuchten Tieren reisoliert. Damit konnte gezeigt werden, dass eine vertikale Infektion von Hühnern der Rasse Lohmann Selected White Leghorn mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 möglich ist.

Die natürliche vertikale Infektion von Küken mit ARV wurde in zahlreichen vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesen (KERR und OLSON, 1969; OLSON und KHAN, 1972; VAN DER HEIDE, 1974). Auch durch die experimentelle Inokulation von embryonierten Hühnereiern konnte ein vertikaler Eintrag von ARV in eine Herde erreicht werden (MENENDEZ et al., 1975a; HUSSAIN und SPRADBROW, 1981). Beide Arbeitsgruppen wählten den Inokulationsmodus in den Dottersack und inokulierten embryonierte Hühnereier zu einem sehr frühen Zeitpunkt am ersten (HUSSAIN und SPRADBROW, 1981) und vierten Bebrütungstag (MENENDEZ et al., 1975a). In beiden vorgestellten Publikationen wird eine erhöhte Mortalität der Embryonen nach Inokulation der Eier und eine reduzierte Schlupfrate abhängig von der Inokulationsdosis beschrieben. Auch für das Isolat 8474DP4-6 wurde bei der frühen Infektion in den Dottersack am sechsten Tag dosisabhängig eine hohe Sterblichkeit der Embryonen festgestellt; nahezu alle infizierten Embryonen starben ab. Für den durchgeführten Tierversuch wurde daher der Infektionsmodus in die Allantoishöhle zu einem späten Zeitpunkt gewählt. Es handelt sich hierbei um eine Standardmethode zur Inokulation von embryonierten Hühnereiern (MAYR et al., 1974), die sich insbesondere in der späten Phase der Bebrütung bewährt hat und bei geringer Spontansterblichkeit nach Inokulation zu zuverlässigen Infektionsergebnissen führt.

Nach Inokulation der embryonierten Eier mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 in die Allantoishöhle am 14. Bebrütungstag betrug die Schlupfrate 51,9% und war damit höher als die Schlupfrate der Kontrollgruppe mit 46,3%. Die Inokulation mit ARV in

einer späten Phase der Bebrütung hatte demnach keinen Einfluss auf die Schlupffähigkeit der Küken. Diese Beobachtungen decken sich auch mit den oben vorgestellten *in ovo* Infektionsversuchen, auch hier hatte die Inokulation mit dem ARV-Stamm 8474DP4-6 bezüglich der Mortalität geringere Auswirkungen als das Impfvirus S1133. Die Inokulation in die Allantoishöhle kann jedoch nur Modellcharakter haben, da es sich um ein artifizielles System handelt. Die natürliche Infektion des Embryos über die Allantoishöhle kann nicht erfolgen, da die Allantois ausgehend von der hinteren entodermalen Darmbucht des Embryos ausgebildet wird und nicht mit maternalen Strukturen in Verbindung steht.

Im Rahmen einer natürlichen vertikalen Infektion kann das Virus entweder ausgehend vom Ovar über den Dotter oder ausgehend vom Salpinx über das Eiklar in das Ei gelangen. Befindet sich das Virus nach der Replikation im Ovar im Dotter, so ist von einer Infektion des Embryos über den Dottersack auszugehen, befindet sich der Erreger hingegen im Eiklar, erfolgt die Infektion über die Amnionhöhle, nachdem diese ab dem 11. Bebrütungstag mit dem Albumen kommuniziert (RÜSSE, 1998).

Bei einer natürlichen vertikalen Infektion ist weiterhin davon auszugehen, dass nur ein Teil der Eier infiziert ist. MENENDEZ et al. (1975b) wiesen ARV aus einzelnen Eiern experimentell infizierter Hühner nach, die bis zu 61 Tage nach Inokulation gelegt wurden. Die vertikale Infektion könnte so den primären Eintrag bedingen, die oft rasch erfolgende Ausbreitung im Bestand wird hingegen hauptsächlich einer anschließend erfolgenden horizontalen Infektion zugeschrieben (JONES, 1986).

Der Infektionsstatus der Sentineltiere belegt die horizontale Übertragung der ARV im Bestand. Ein Virusnachweis erfolgte aus Sentineltieren, welche am ersten und zweiten Lebenstag verendet waren. Während am ersten Tag ARV nur in der Sammelprobe aus Duodenum und Pankreas reisoliert wurde, erfolgte der ARV-Nachweis am zweiten Lebenstag aus allen fünf untersuchten Organproben. Unter den untersuchten Organen war auch die Bursa Fabricii. Diese ist im Sinne einer aufsteigenden Infektion ausgehend vom Darm nicht zu erreichen, so dass bereits am zweiten Lebenstag von einer Generalisation der ARV-Infektion auf hämatogenem Weg ausgegangen werden kann. Der Virusnachweis aus Trachea und Darm von Kontakttieren über einen Zeitraum von bis zu zehn Tagen wurde durch JONES und GUNERATNE (1984) beschrieben.

Im vorliegenden Versuch erfolgte der Nachweis von ARV aus Sentineltieren zunächst nur am ersten und zweiten Lebenstag, zu einem späteren Zeitpunkt war kein replikationsfähiges ARV nachzuweisen. Die am 24., 35. und 36. Lebenstag untersuchten Sentineltiere wiesen mit Ausnahme eines Tieres in der serologischen Untersuchung Antikörper gegen ARV auf. Dies weist auf eine Auseinandersetzung mit dem ARV hin, die Ausbildung einer humoralen Immunantwort lässt auf eine generalisierte Infektion schließen, die eliminiert werden konnte.

Als kritische Phase für eine Infektion wird die Zeit unmittelbar nach dem Schlupf angesehen, die Küken weisen hier eine erhöhte Empfänglichkeit für eine Infektion mit ARV auf (JONES und GUNERATNE, 1984). Im gegebenen Versuchsmodell schlüpften die Sentineltiere zwischen den Versuchstieren, eine Infektion konnte so unmittelbar nach dem Schlupf erfolgen.

Die Vermehrung von ARV nach Inokulation in die Allantoishöhle wurde beschrieben (PETEK et al., 1967). Während des Schlupfes kommt es zum Zerreißen der Allantois und in der Allantoisflüssigkeit enthaltenes Virus wird in die Umgebung abgegeben. Eine Infektion der Sentineltiere konnte so bereits stattfinden, bevor eine Ausscheidung von ARV über den Darm oder Respirationstrakt der Versuchstiere erfolgte.

5.2.4.2 Organotropismus und zeitlicher Verlauf der Infektion

Das untersuchte Organspektrum umfasste Leber, Drüsenmagen, Duodenum mit Pankreas, Jejunioileum und Bursa Fabricii. Alle untersuchten Organe zeigten sich für eine Infektion mit dem Stamm 8474DP4-6 empfänglich, insgesamt wurden n=60 Bursaprobe und je n=63 Proben aus den weiteren Organen untersucht. Am häufigsten erfolgte der Virusnachweis aus Duodenum mit Pankreas (ARV-Nachweis aus 53% der untersuchten Proben) und Jejunioileum (52%). Etwas seltener wurde ARV aus dem Drüsenmagen nachgewiesen (ARV-Nachweis aus 46% der untersuchten Proben). Die untersuchten Lebern und Bursen zeigten sich als noch weniger häufig mit ARV infiziert, hier wurde ARV aus je 43% der untersuchten Organe reisoliert. Vorbehaltlich einer statistischen Prüfung zeigte sich geringe Präferenz des Virus für Organe des Gastrointestinaltraktes, insbesondere des Dünndarmes, während Leber und Bursa seltener infiziert waren.

ARV weisen stammspezifische Unterschiede bezüglich des Gewebetropismus auf, dies spiegelt sich auch in der Bandbreite der verursachten klinische Erscheinungen wider.

Der **Darm** ist als wichtiges Zielorgan der ARV bekannt und wird als wichtigster Ort der Virusreplikation diskutiert (JONES, 2000). KIBENGE et al. (1985) führten einen Virusnachweis aus verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (Ösophagus, Drüsenmagen, Duodenum, Ileum, Zäkum, Rektum, Pankreas und Leber) eines experimentell mit einem arthrotropischen ARV-Stamm infizierten Huhnes durch. Sie zeigten einen Nachweis aus allen untersuchten Abschnitten, eine Vermehrung mit hohen Titern fand insbesondere in Duodenum, Pankreas, Ileum, Zäkum und Rektum statt, wobei das Virus in Ileum, Zäkum und Rektum am längsten persistierte. Für MAS-assoziierte ARV-Stämme wurden derart detaillierte Studien zum Tropismus bezüglich der einzelnen Darmabschnitte bislang nicht durchgeführt, ähnliche Untersuchungen wären jedoch wünschenswert.

Die **Lunge** wird von mehreren Autoren als Ort der primären Replikation beschrieben (SUBRAMANYAM und POMEROY, 1960; ELLIS et al., 1983), auch die Ausscheidung von ARV aus infizierten Tieren über den Respirationstrakt ist bekannt (JONES und GUNERATNE, 1984).

Viele ARV-Stämme replizieren in den **synovialen Häuten** und können in diesem Gewebe längere Zeit persistieren (JONES, 2000; SAHU und OLSON, 1975).

Ein weiteres wichtiges Zielgewebe stellen **lymphatische Organe** dar. ELLIS et al. (1983) wiesen ARV in hoher Konzentration aus einer Sammelprobe lymphatischer Organe, die Milz, Thymus und Bursa Fabricii enthielt nach. ARV wurde auch aus dem Knochenmark experimentell infizierter Hühner isoliert (KIBENGE et al., 1985).

Während der Phase der **Virämie** ist ARV hauptsächlich im Serum nachzuweisen, zu einem geringeren Anteil ist Virus aber auch aus den im Blut zirkulierenden mononukleären Zellen zu isolieren (KIBENGE et al., 1985).

Als Zielorgan für eine ARV-Infektion ist auch die **Leber** beschrieben (JONES und GUNERATNE, 1984). Weiterhin fielen Stämme auf, welche eine hohe Affinität zum zentralen Nervensystem aufwiesen (VAN DE ZANDE und KUHN, 2007).

Während bezüglich des Organtropismus für den ARV-Stamm 8474DP4-6 keine eindeutige Präferenz nachgewiesen werden konnte, zeigten sich im zeitlichen Verlauf der Infektion interessante Verteilungsmuster. Am Tag des Schlupfes und am ersten Lebenstag wiesen einzelne Tiere der Versuchsgruppe bereits eine generalisierte Infektion mit Virusnachweis aus allen Organen auf. Andere Tiere zeigten eine Infektion einzelner Organe, wobei stets auch Darmabschnitte infiziert waren. Zwischen dem dritten und siebten Tag wies die überwiegende Mehrheit der Tiere eine generalisierte Infektion mit Virusnachweis aus allen untersuchten Organen auf. Ab dem elften Lebenstag waren wiederum nur einzelne Organe infiziert, wobei auch hier ein gehäufter ARV-Nachweis aus dem Darm auffiel.

Alle am 20. Bebrütungstag untersuchte Embryonen (n=3) wiesen eine Infektion der Chorionallantoismembran auf, während nur bei einem Tier eine Infektion der Leber vorlag. Die beobachteten Ergebnisse lassen begrenzt Schlüsse auf den Infektionsweg zu. Während bei den Embryonen nur ein Teil der untersuchten Tiere eine generalisierte Infektion aufwies, konnte bei allen eine Virusreplikation in der Allantoishöhle nachgewiesen werden. Offensichtlich kommt es also nach *in ovo* Inokulation in die Allantoishöhle nicht in jedem Falle zu einer Infektion des Embryos vor dem Schlupf. Während der Nachweis von ARV aus allen Organen am Tag des Schlupfes eine bereits bestehende Infektion annehmen lässt, kann der Nachweis aus Einzelorganen auch darauf hindeuten, dass die Infektion noch lokalisiert vorliegt. Analog zu den Sentineltieren ist auch bei den Versuchstieren denkbar, dass die Infektion des Kükens erst während des Schlupfes gesetzt wird. Es ist anzunehmen, dass die Versuchstiere einer höheren Infektionsdosis ausgesetzt sind und dass möglicherweise eine Schwächung durch die bestehende Infektion in der

Allantoishöhle auftreten kann. Die Chorionallantoismembran beherbergt den Allantoiskreislauf, der bis etwa einen Tag vor Schlupf die Sauerstoffversorgung des Embryos gewährleistet, zusätzlich wird aus der Allantoishöhle Flüssigkeit rückresorbiert, so dass durch die Infektion auch eine Beeinträchtigung des Flüssigkeitshaushaltes erfolgen könnte. Der späte Nachweis aus einzelnen Organen, insbesondere des Darmes deutet eine Persistenz in diesen Organen an.

5.2.4.3 Klinische Auswirkungen der Infektion mit dem Isolat 8474DP4-6

In der Versuchsgruppe zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe neben der schwerer ausgeprägten Symptomatik ein protrahierter Verlauf des klinischen Geschehens bis zum 17. Lebenstag, die Sterblichkeit in der Herde war deutlich erhöht. Darüber hinaus war die Gewichtszunahme der Versuchstiere signifikant geringer als, die der Versuchstiere. Die Serokonversion aller untersuchten Versuchstiere, mit Ausnahme eines am 35. Lebenstag beprobten Huhnes, belegt eine erfolgte Infektion mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6. Die Ausbildung einer humoralen Immunantwort, sowie die Virusreisolierung aus nahezu allen zwischen dem dritten und siebten Lebenstag untersuchten Organen deutet eine generalisierte Infektion an, welche bei der überwiegenden Mehrheit der Tiere auftrat. Durch die ARV-Infektion könnte auf verschiedenen Wegen eine Primärschädigung erreicht werden, welche einen Einfluss auf den klinischen Verlauf nehmen konnte.

Zunächst erscheint eine primär schädigende Wirkung im Bereich des Magen-Darmtraktes, auch als Wegbereiter für eine opportunistische bakterielle Infektion, wahrscheinlich. ARV weist eine hohe Affinität zu enteralem Gewebe auf, andere Autoren beschreiben die enterale Mukosa als Ort der primären Vermehrung (MENENDEZ, 1975b). In der pathologischen und histopathologischen Untersuchung von an MAS erkrankten Hühnern fallen regelmäßig Veränderungen insbesondere des Dünndarms im Sinne einer Villusatrophie, einer Krypthyperplasie und einer gemischtzelligen Entzündung auf (VERTOMMEN et al., 1980a; BRACEWELL und RANDALL, 1984, FRAZIER und REECE, 1990). Für den hier durchgeführten Versuch erscheint eine primäre Schädigung des Dünndarmes unwahrscheinlich, alle begutachteten feingeweblichen Schnitte aus Organen des Magen- und Darmtrakts der Versuchsgruppe präsentierten sich in der histopathologischen Untersuchung unverändert, entzündliche Veränderungen im Sinne lymphoplasmozytärer Infiltrate wurden nicht beobachtet. Schädigungen auf zellulärer Ebene, die in der histopathologischen Untersuchung nicht sichtbar werden können jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

In der histopathologischen Untersuchung zeigte sich das Pankreas als Darmanhangsorgan verändert, so dass eine begrenzte Affinität zu Organen des Gastrointestinaltraktes auch für den Stamm 8474DP4-6 konstatiert werden kann. Die Organe zeigten sich im Sinne einer milden vakuolären Degeneration der Azinozyten

verändert. Obwohl sie zeitlich mit dem klinischen Geschehen korrelieren ist nicht anzunehmen, dass die Veränderungen, welche als geringgradig einzustufen sind, für die hochgradigen klinischen Symptome und die erhöhte Sterblichkeit ursächlich sind. Die beobachteten Veränderungen wurden auch nach Infektion mit anderen ARV-Stämmen beobachtet (ASDRUBALI et al., 1984, 1985; REECE und FRAZIER, 1990; PASS et al., 1982).

An der schweren Ausprägung der beobachteten Symptome und der erhöhten Sterblichkeit könnte auch eine Primärschädigung des kardiovaskulären Systems teilhaben. In der pathologischen Untersuchung wurde eine nonpurulente Entzündung des Myokards festgestellt, letztere wurde im Zusammenhang mit ARV-Infektionen beschrieben. Im Gänseküken tritt die durch eine Infektion mit ARV verursachte infektiöse Myokarditis der Gössele auf. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch einen seuchenhaften Verlauf mit Durchfall, hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden und einer gesteigerten Mortalität. Als Hauptbefund der histopathologischen Untersuchung fällt eine nichteitrigte Entzündung des Herzmuskels mit einer degenerativen Schädigung der Myofibrillen auf (HEFFELS-REDMANN und KALETA, 1992). Auch für MAS-assoziierte ARV-Isolate ist ein Zusammenhang mit dem Auftreten von nichteitrigten Entzündungen des Herzmuskels beschrieben (PAGE et al., 1982). Eine Schädigung des Myokards durch die Infektion mit dem Stamm 8474DP4-6 ist also durchaus denkbar. Die Entzündung des Herzmuskels könnte die Leistung des Herzens mindern und nachfolgend zu einer Schwächung der Tiere führen, welche nachfolgend auftretende Symptome verschlimmern kann. Dass die Schädigung des Herzmuskels die erhöhte Sterblichkeit bedingt, erscheint unwahrscheinlich. Zum einen waren die beobachteten Veränderungen von milder Ausprägung, zum anderen wurden keine Symptome (z.B. Ödembildung, Zyanose, Schnabelatmung) beobachtet, welche auf eine drastisch erniedrigte Herzleistung schließen lassen könnten. Auch für Infektionen mit *E. coli* ist das Auftreten einer gemischtzelligen, überwiegend lymphoplasmazytären Myocarditis beschrieben (BARNES et al., 2008). Der dritte Mechanismus, über den die Infektion mit dem Stamm 8474DP4-6 den klinischen Verlauf beeinflussen könnte, besteht in einer Primärschädigung des lymphatischen Systems. ARV weist neben der Affinität zu enteralem Gewebe auch eine hohe Affinität zu lymphozytärem Gewebe auf. Die Virämie im Rahmen einer ARV-Infektion ist zumindest teilweise zellassoziiert, hohe Virustiter wurden in den mononukleären Zellen des Blutes nachgewiesen (MENENDEZ, 1975a). Eine

Isolation von ARV aus lymphatischen Organen ist mehrfach beschrieben. In einer Sammelprobe aus Milz, Thymus und Bursa fabricii wiesen ELLIS et al. (1983) hohe Titer an ARV nach. Einen Nachweis von ARV aus dem Knochenmark und der Milz nennen auch KIBENGE et al. (1985). In den Zäkaltonsillen kann ARV lange Zeit persistieren, KIBENGE et al. (1985) wiesen ARV aus diesem Gewebe bis zu 21 Tage nach Infektion nach, während MACDONALD et al. (1978) ARV hier bis zu 35 Tage nach Infektion nachwies. Im Zusammenhang mit ARV-Infektionen sind vielfach auch pathologische und pathohistologische Veränderungen der lymphatischen Organe beschrieben. Thymus und Bursa fabricii zeigen sich im Sinne einer Atrophie verändert, in der feingeweblichen Untersuchung fällt eine Lymphozytendepletion, sowie eine undeutliche Abgrenzung von Rinde und Mark auf (BRACEWELL und RANDALL, 1984; FRAZIER und REECE, 1990; JONES, 1986).

Neben dem Nachweis aus lymphatischen Organen ist auch bekannt, dass ARV auf zellulärer Ebene Schädigungen in den lymphatischen Zellen bedingen kann. PERTILE et al. (1996) zeigten in Hühnern eine verringerte Lymphoproliferation, die durch die Ausbildung von Suppressormakrophagen vermittelt wird. Auch NEELIMA et al. (2003) beschrieben die Auswirkungen einer ARV-Infektion auf die zelluläre Immunantwort des Huhnes. Nach Infektion mit zwei ausgewählten ARV-Stämmen zeigte sich eine Inhibition der lymphoproliferativen Antwort von peripheren mononukleären Blutzellen und auch von Milz-assoziierten mononukleären Zellen, welche über sechs Tage anhielt.

Im vorliegenden Versuch wurde ARV bis zum 35. Lebenstag regelmäßig aus der Bursa Fabricii nachgewiesen, ein gehäufte Nachweis aus diesem Organ erfolgte vom Tag des Schlupfes bis zum zwölften Lebenstag. Aus Tieren der Versuchsgruppe wurden ab dem Tag des Schlupfes Proben der Milz untersucht, Proben der Bursa Fabricii wurden mit Rücksicht auf die virologische Untersuchung nicht feingeweblich untersucht. In der Milz zeigte sich qualitativ eine Lymphozytendepletion. Eine quantitative Auswertung der Gewebefeinschnitte war nicht möglich, da aus der Kontrollgruppe keine Vergleichsorgane gewonnen werden konnten, um eine ausreichende Tierzahl für die statistische Auswertung der Daten zum Körpergewicht zu erhalten. Neben den virologischen und histopathologischen Befunden spricht auch die oben beschriebene erhöhte Empfänglichkeit für bakterielle Sekundärinfektionen dafür, dass die Infektion mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 eine Modulation der Immunantwort bewirkt. Die Folgen einer ARV-Infektion auf das

Immunsystem von Hühnern stellen jedoch ein Feld für weitere tierexperimentelle Studien dar, neben speziellen immunologischen Untersuchungen sollten hier in besonderem Maße auch die Auswirkungen von opportunistischen bakteriellen Erregern berücksichtigt werden.

Zur Evaluierung einer ätiologischen Beteiligung von ARV an den beobachteten Organveränderungen bieten sich darüber hinaus immunhistochemische Untersuchungen an, welche das Vorhandensein von ARV-Antigen in den Zellen belegen. Dadurch können auch Hinweise für eine mögliche Schädigung auf zellulärer Ebene gewonnen werden, welche in der klassischen histopathologischen Untersuchung nicht sichtbar werden.

Zusammenfassend ist bei dem beobachteten klinischen Geschehen von einer multifaktoriellen Ätiologie auszugehen. Neben einer Primärschädigung scheint dabei insbesondere der Entgleisung der autochthonen bakteriellen Flora eine entscheidende Rolle zuzukommen. Damit stellen sich auch für zukünftige tierexperimentelle Studien große Herausforderungen. Die Reproduktion eines bestimmten klinischen Bildes bei einer multifaktoriellen Ätiologie würde eine exakte Wiederholung aller Bedingungen verlangen. Dies kann jedoch nicht erreicht werden, da insbesondere die Zusammensetzung der autochthonen Flora für jede Herde als individuell anzunehmen ist und sich nur schwer standardisieren lässt, wenn gleichzeitig eine physiologische Darmflora erhalten bleiben soll. Die Infektion mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 führt demnach möglicherweise zu einer konstanten Primärschädigung, durch sekundäre Faktoren können sich dann aber variable Auswirkungen ergeben, die nicht zu einem eindeutigen klinischen Krankheitsbild führen.

5.2.4.4 Beurteilung der Reproduktion des MAS durch eine ARV-Infektion

Das klinische Bild des MAS trat nach Inokulation von embryonierten Hühnereiern der Rasse Lohmann Selected White Leghorn mit dem MAS-assoziierten ARV-Isolat 8474DP4-6 am 14. Bebrütungstag in die Allantoishöhle nicht auf. Die Reproduktion des klinischen Bildes des MAS im experimentellen Ansatz gelang durch orale Verabreichung von unbehandeltem Darmhomogenat aus infizierten Tieren an Eintagsküken (KOUWENHOVEN et al., 1978b). ARV wurde aus an MAS erkrankten Tieren regelmäßig isoliert, zahlreiche Forscher führten Infektionsexperimente mit MAS-assoziierten ARV-Isolaten mit dem Ziel durch, die ätiologische Bedeutung von ARV an diesem Syndrom zu erhellen (REKIK et al., 1991; VAN DER HEIDE et al.; 1981; VERTOMMEN et al.; 1980a; AL-AFALEQ und JONES, 1994). In allen Studien wurde übereinstimmend eine reduzierte Gewichtsentwicklung festgestellt. In einzelnen Studien wurden darüber hinaus gastrointestinale Symptome und Veränderungen konstatiert. Die von VERTOMMEN et al. (1980a) inokulierten Eintagsküken entwickelten Durchfall und wiesen einen erniedrigten Karotinoidspiegel im Blutplasma auf. Pathologische Veränderungen des Drüsenmagens im Sinne einer Entzündung wurden von REKIK et al. (1991) beobachtet, histologisch fielen auch Veränderungen des Dünndarms (Villusatrophie) auf. In keinem Fall konnte nach der Infektion mit ARV das volle klinische Bild des MAS reproduziert werden.

Die im gegebenen Versuch aufgefallenen Auswirkungen mit Begünstigung einer sekundären bakteriellen Infektion lassen darauf schließen, dass einer frühen ARV-Infektion eine wichtige Rolle in einem multifaktoriellen Krankheitsgeschehen zukommen kann. Folgt man den Evans-Postulaten können ätiologische Zusammenhänge auch in multifaktoriellen Krankheitsgeschehen nur umfassend beleuchtet werden, wenn auch epidemiologische Aspekte berücksichtigt werden. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass in diesem Zusammenhang der Zeitpunkt eines Eintrages in einen Bestand Berücksichtigung finden muss.

5.3 Untersuchungen in Eiern aus vakzinierten Masthühnern

Durch in ovo Infektionsversuche mit Masthühneiern aus einer gegen ARV vakzinierten Herde sollte der Einfluss maternaler Antikörper auf eine Infektion mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 grundsätzlich überprüft werden. Die Vakziniierung der Elterntierherde wurde mit einer inaktivierten stallspezifischen Vakzine durchgeführt, die neben dem ARV-Impfstamm auch drei MAS-assoziierte ARV-Stämme enthielt und so ein breites Spektrum an ARV-Stämmen abdecken sollte (SAHM, 2009).

Bei einer einleitenden Untersuchung wurde zunächst der Antikörperstatus der Eier durch Untersuchung von Dotterproben mittels ELISA-Technik evaluiert. Mit Ausnahme zweier Dotterproben konnten in allen untersuchten Proben (n=145) ARV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Nach Impfung von Elterntierherden mit dem Stamm S1133 konnte durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Nachkommen nach Belastungsinfektionen mit dem homologen Virus vor einer Erkrankung (Virale Arthritis/ Tendosynovitis) geschützt waren (VAN DER HEIDE und PAGE, 1980). Ein Schutz vor Infektionen mit einem heterologen ARV-Isolat ist nach Impfung der Elterntiere nicht unbedingt gegeben (RAU et al., 1980).

Mittels ELISA-Technik ist in erster Linie ein qualitativer Nachweis der Antikörper im Sinne einer ja-nein-Antwort zu erreichen, weiterhin kann bis zu einem gewissen Maße auch eine Quantifizierung des Antikörpergehaltes in den Proben erfolgen. Demgegenüber ist eine Charakterisierung der Antikörper hinsichtlich ihrer neutralisierenden Eigenschaften nicht möglich.

Mittels Plaquereduktionstests wurden die neutralisierenden Eigenschaften der im Dotter enthaltenen Antikörper zunächst in vitro evaluiert.

Bei geringster getesteter Verdünnung der Dotterproben (Id 3; 1:8) betrug die Restinfektiosität des ARV-Stammes S1133 zwischen 0,7 und 2%, während diejenige des ARV-Isolats 8474DP4-6 zwischen 17 und 45% lag. Bei der höchsten gewählten Dotterverdünnung (Id 7; 1:128) nahm die Restinfektiosität für den Stamm S1133 Werte zwischen 0,7 und 16% ein und betrug für das ARV-Isolat 8474DP4-6 43 bis 120%.

Es konnte damit gezeigt werden, dass der Impfstamm S1133 durch die in den Dotterproben enthaltenen ARV-spezifischen Antikörper in vitro gut neutralisiert wurde, der ARV-Stamm 8474DP4-6 dagegen deutlich schlechter. Diese Ergebnisse

decken sich mit vorangegangenen in vitro Neutralisationstests die aufgezeigt haben, dass der Stamm S1133 in vitro sehr effektiv neutralisiert wird. Demgegenüber wurden MAS-assoziierte ARV-Isolate zum Teil auch durch homologe Hyperimmunseren in vitro deutlich schlechter neutralisiert als der heterologe ARV-Impfstamm S1133 (SAHM, 2009).

Vergleicht man die Ergebnisse der Dottersackinokulation mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 zwischen spf- und Masthuhneiern zeigen sich deutliche Unterschiede. Um die gleiche EID_{50} zu erzielen waren bei den Masthuhn- im Vergleich zu den spf-Eiern 14- bis 77-fach höhere Mengen an plaquebildenden Viruseinheiten notwendig. Dem gegenüber waren zwischen Masthuhn- und spf-Eiern nach Infektion mit dem Stamm S1133 keine Unterschiede zu sehen. Eine mögliche Ursache für die erhöhte Resistenz gegenüber einer Infektion mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 kann die Modulation des Infektionsverlaufs durch die ARV-spezifischen Antikörper sein. Unterschiede zwischen den Stämmen erscheinen unter diesem Aspekt widersprüchlich, lassen sie doch annehmen, dass der ARV-Stamm S1133 in ovo deutlich schlechter neutralisiert wurde als das Isolat 8474DP4-6. Dies scheint den Ergebnissen der in vitro Neutralisation zunächst entgegen zu stehen. Bedenkt man aber, dass in vitro zwar eine deutliche Reduktion der infektiösen Einheiten beobachtet wurde, nicht jedoch eine vollständige Neutralisation, sind die Ergebnisse auch durch eine gegenüber dem Stamm 8474DP4-6 erhöhte Embryopathogenität zu erklären. Die Ergebnisse nach in ovo Beimpfung würden dann darauf hindeuten, dass auch in ovo nur eine teilweise Neutralisation des Stammes S1133 erreicht wurde, die Restinfektiosität allerdings ausreichte um zum Absterben der Embryonen zu führen. Aufgrund einer geringeren Restvirulenz würden im Dotter enthaltene Antikörper beim ARV-Isolat 8474DP4-6 allerdings zu einer Modulation der Infektion beitragen. Ob die bei den Masthuhneiern als Verhältnis pbE/EID_{50} zu beobachtende Reduktion der Infektiosität Ausdruck der Elimination von Restinfektiosität oder aber für den Stamm 8474DP4-6 das Ergebnis einer vollständigen Neutralisation darstellt, kann durch diese Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden. Ebenso sind keine eindeutigen Aussagen darüber möglich, ob die beobachteten Unterschiede zwischen den zwei Chargen der Masthuhneier auf Unterschiede bezüglich des Antikörperstatus zurückzuführen sind, da zwei unterschiedliche Virusstocks verwendet wurden. Nicht auszuschließen ist, dass die Viren in den verschiedenen Stocks verschieden stark aggregiert vorlagen (siehe 5.1.1), welches die

Neutralisierbarkeit beeinflusst hätte. Unabhängig von der Charge traten allerdings infizierte überlebende Embryonen nach Inokulation der Broilereier mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 deutlich häufiger auf. Demgegenüber starben nach Inokulation mit dem ARV-Stamm S1133 sowohl in spf- wie auch in Broilereiern alle infizierten Embryonen ab. Auch nach Beimpfung von spf-Eiern mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 kam es nur in Einzelfällen zum Überleben infizierter Embryonen.

Der im Rahmen der Untersuchungen beobachtete schwere klinische Verlauf einer ARV-Infektion nach simulierter in ovo Infektion weist auf die Gefahren einer frühen ARV-Infektion hin. Im Zusammenhang mit Überlegungen zum Schutz der Küken vor einer frühen ARV-Infektion würden die Ergebnisse der in ovo Infektion von Masthuhneiern darauf hindeuten, dass Vakzinierungsmaßnahmen geeignet erscheinen den Infektionsdruck in den Beständen zu senken. Das Auftreten infizierter überlebender Embryonen bei dem Stamm 8474DP4-6 weist aber auch darauf hin, dass ein vertikaler Eintrag in die Bestände dadurch nicht grundsätzlich unterbunden werden kann. Es bleibt zu untersuchen, inwiefern maternale Antikörper eine frühe ARV Infektion modulieren. Die Untersuchungen verdeutlichen aber auf jeden Fall, dass allgemeine Hygienemaßnahmen die einen Viruseintrag vermeiden, ein wichtiges Instrument in der Bekämpfung von ARV-Infektionen darstellen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung eines ARV-Isolates, das aus Masthühnern mit klinischen Symptomen des Malabsorptionssyndroms (MAS) isoliert wurde, nach simulierter vertikaler Infektion untersucht werden.

Der Zeitpunkt der Infektion ist für den Verlauf einer Infektion mit ARV von entscheidender Bedeutung. Daher wurden zunächst die Auswirkungen einer frühen in ovo Inokulation mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 in embryonierten, spezifiziert pathogenfreien Hühnereiern beurteilt. Nach Inokulation mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 kam es nach Allantoishöhleninokulation unabhängig von der Inokulationsdosis regelmäßig zum Auftreten infizierter Embryonen, welche bis zum 19. Bebrütungstag überlebten. Die Dottersackinokulation mit dem ARV-Isolat 8474DP4-6 am sechsten Bebrütungstag führte nur in Einzelfällen zum Überleben infizierter Embryonen. Der vergleichend untersuchte ARV-Impfstamm S1133 führte demgegenüber nach in ovo Infektionen, sowohl nach Dottersack- als auch nach Allantoishöhleninokulation zum Absterben infizierter Embryonen. Die Absterbezeit der Embryonen wies eine hohe Variabilität auf und betrug nach Allantoishöhleninokulation mit dem Stamm S1133 zwischen 100 und 168 Stunden, für das ARV-Isolat 8474DP4-6 zwischen 60 und 240 Stunden.

In dem anschließend durchgeführten Tierversuch kam es nach Allantoishöhleninokulation von spezifiziert pathogenfreien Hühnereiern der Rasse Lohmann Selected White Leghorn am 14. Bebrütungstag mit 10^4 pbE des ARV-Isolats 8474DP4-6 zum Schlupf infizierter Küken. Die Schlupfrate war in der infizierten Versuchsgruppe mit 52% höher, als in einer scheininfizierten Kontrollgruppe mit 46%.

Aus den geschlüpften Küken der Versuchsgruppe konnte ARV bis zum zwölften Tag regelmäßig und in Einzelfällen bis zum 36. Lebenstag nachgewiesen werden. Alle untersuchten Organe (Leber, Drüsenmagen, Duodenum mit Pankreas, Jejunioileum und Bursa Fabricii) zeigten sich für eine Infektion mit dem Stamm 8474DP4-6 empfänglich, etwas häufiger erfolgte ein Nachweis aus den untersuchten Proben des Darmes. Eine Übertragung des Virus auf nicht inokulierte Kontakttiere wurde festgestellt. Sowohl infizierte Versuchstiere, als auch zugesetzte Kontakttiere wiesen eine Serokonversion auf.

Die Mortalität in der infizierten Versuchsgruppe war deutlich erhöht und betrug für den Zeitraum zwischen Schlupf und siebtem Lebenstag 52,2%, für den Zeitraum bis zum zwölften Tag erhöhte sich die kumulative Sterblichkeit auf insgesamt 56,5%. Die Kontrollgruppe wies in den Vergleichszeiträumen eine Mortalität von 6 bzw. 12% auf. Klinisch war in Tieren beider Gruppen ein Krankheitsgeschehen mit gestörtem Allgemeinbefinden und Durchfall festzustellen. Während in der Kontrollgruppe nach antibiotischer Behandlung eine rasche Besserung der Symptomatik erfolgte, erholten sich die gleichförmig behandelten Versuchstiere nur langsam.

Die Sektionsbefunde waren in beiden Gruppen unauffällig. In der histopathologischen Untersuchung wurde in Tieren der Kontrollgruppe ab dem dritten Lebenstag eine Myocarditis focalis nonpurulenta festgestellt. Weiterhin traten zwischen dem dritten und zwölften Tag Veränderungen des Pankreas im Sinne einer vakuolären Degeneration und der Milz im Sinne einer lymphoplasmazytären Depletion auf. In der bakteriologischen Untersuchung wurden aus Tieren beider Gruppen verschiedene fakultativ pathogene Bakterienspezies isoliert. Im einzelnen wurden *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* und *Enterobacter cloacae* nachgewiesen.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchstiere blieb bereits ab dem siebten Lebenstag hinter demjenigen der Kontrollgruppe zurück. Die Gewichtszunahme ab dem Tag des Schlupfes war in der Versuchsgruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe.

Infektionsexperimente mit embryonierten Broilereiern aus gegen ARV vakzinierten Elterntieren zeigten, dass eine in ovo Neutralisation des ARV-Isolates 8474DP4-6 stattfindet. Im Vergleich zu embryonierten spf-Eiern wurden um bis zu hundertfach niedrigere Werte für die eiinfektiöse Dosis 50 ermittelt. Darüber hinaus zeigten sich deutliche Schwankungen bezüglich der eiinfektiösen Dosis 50 bei der vergleichenden Inokulation von Broilereiern aus verschiedenen Elterntierherden.

Die Ergebnisse zeigen eine Schädigung von Küken nach in ovo Infektion mit dem MAS-assoziierten ARV-Stamm 8474DP4-6. Dabei ist aufgrund der bakteriologischen Befunde eine Beteiligung einer bakteriellen Sekundärinfektion anzunehmen. Ob dem ursächlich eine Suppression des Immunsystems zugrunde liegt, bleibt durch weiterführende Untersuchungen aufzuklären.

7. Summary

The aim of the present study was to evaluate the relevance of an Avian Orthoreovirus (ARV) isolated from broiler chicken suffering from infectious runting and stunting syndrome (RSS) after simulated vertical infection of chicken.

The influence of the age at infection on the progression of ARV infection is of particular importance. At first, the consequences of an early *in ovo* inoculation with the ARV-isolate 8474DP4-6 in specific pathogen free (spf) embryonated chicken eggs were evaluated. Infected embryos that survived until the 19th day of incubation were observed regularly after inoculation into the allantoic cavity of embryonated chicken eggs with varying doses of the ARV-isolate 8474DP4-6 on the ninth day of incubation. The inoculation into the yolk sac of embryonated chicken eggs on the sixth day of incubation with the same virus resulted in surviving infected embryos only in singular cases. On the other hand, infected embryos died after *in ovo* inoculation with the ARV vaccine strain S1133 into the allantoic cavity or the yolk sac on the corresponding days of hatch. The mean death time for the infected embryos displayed a high variability. The mean death time after *in ovo* inoculation with the ARV strain S1133 was observed between 100 and 168 hours while embryos infected with the ARV-isolate died between 60 and 120 hours post inoculation.

For a subsequent animal experiment embryonated chicken eggs (Lohmann Selected White Leghorn) were inoculated with the ARV-strain 8474DP4-6 into the allantoic cavity on the 14th day of incubation and the hatched chickens were raised until the age of 36 days. Inoculated birds were kept together with non-inoculated sentinels while a mock-infected group was raised separately. The *in ovo* inoculation resulted in the hatch of ARV-infected chicks. The hatchability was reduced in the infected group (56%) as well as in the mock-infected control group (46%).

ARV was reisolated regularly from organs of infected chicks until the 12th day post hatch and sporadically until day 36 post hatch.

Several organs (liver, duodenum and pancreas [pooled], proventriculus, jejunioileum and bursa of Fabricius) were sampled in order to evaluate the organotropism and the progression of infection in inoculated chicks. ARV was reisolated from all kinds of examined organs, whereas the isolation from intestinal organs occurred more frequently.

The transmission to non-inoculated sentinels was demonstrated by reisolation of ARV. The inoculated as well as the sentinel chicks developed antibodies against ARV. The results demonstrate the possibility of a vertical and likewise a horizontal transmission for the ARV-strain 8474DP4-6.

An increased mortality became evident within the infected group. From the day of hatch and the seventh day of life 52,2% of the animals died, until the 12th day of life the mortality peaked to 56,5%. Within the control group a mortality of 6 and 12% respectively was observed during the corresponding period.

Inoculated as well as control animals were of poor condition and suffered from diarrhea. Not inoculated control birds recovered quickly after an antibiotic treatment while the inoculated chicken did not respond well to the therapy.

The gross pathology did not reveal any alterations in neither of the groups. Histopathological changes included myocarditis, pancreatic degeneration and lymphocyte depletion in the spleen.

Within the bacteriological examination various ubiquitous bacterial species including *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae* were cultivated from organ swabs from animals of both groups.

Body weight and weight gain were significantly decreased in inoculated chicks from day seven post hatch on.

In ovo infection of embryonated eggs from ARV-vaccinated broiler breeders with the ARV-isolate 8474DP4-6 resulted in a hundredfold lower egg infectious dose 50 compared to embryonated spf chicken eggs. Furthermore, a larger proportion of infected embryos survived until the 19th day of incubation.

In conclusion, the *in ovo* inoculation of embryonated eggs with the RSS-associated ARV strain resulted in the impairment of hatched chicks. The bacteriological findings indicate an increased susceptibility of the ARV-infected chicks to bacterial overgrowth.

Future experiments evaluating the effects of early ARV-infections with the focus on alterations of the immune-response will help to elucidate the role of early ARV-infections in chicks.

- 1 al Afaleq, A. & Jones, R. C. (1994). A comparison of single and repeated oral infection of chicks with two avian reoviruses. *Res Vet Sci* **57**(1), 96-99.
- 2 Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech* **19**, 443-462.
- 3 Andreasen, C. B. (2008). Staphylococcosis. In: Y. M. Saif; A. M. Fadly; J. R. Glisson; L. R. McDougald; L. K. Nolan & D. E. Swayne (Hrsg.), *Diseases of Poultry*, Blackwell Publishing, Oxford, 892-900.
- 4 Asdrubali, G.; Coletti, M. & Tacconi, G. (1984). [Microscopic changes of the pancreas in chickens with malabsorption syndrome]. *Obiettivi e Documenti Veterinari* **5**, 67-70.
- 5 Asdrubali, G.; Coletti, M. & Tacconi, G. (1985). [Malabsorption syndrome: histologic aspects of chicken pancreas]. *Rivista di Avicoltura* **54**, 33-36.
- 6 Ashton, W. L.; Randall, C. J.; Dagless, M. D. & Eaton, T. M. (1984). Suspected reovirus-associated hepatitis in parrots. *Vet Rec* **114**(19), 476-477.
- 7 Bains, B. S.; MacKenzie, M. & Spradbrow, P. B. (1974). Reovirus-associated mortality in broiler chickens. *Avian Dis* **18**(3), 472-476.
- 8 Baltimore, D. (1971). Expression of Animal Virus Genomes. *Bacteriol Rev* **35**(3), 235-241.
- 9 Barnes, H. J. & Nolan, L. K. (2008). Other Bacterial Diseases. In: Y. M. Saif; A. M. Fadly; J. R. Glisson; L. R. McDougald; L. K. Nolan & D. E. Swayne (Hrsg.), *Diseases of Poultry*, Blackwell Publishing, Oxford, 952-970.
- 10 Barnes, H. J.; Nolan, L. K. & Vaillancourt, J.-P. (2008). Colibacillosis. In: Y. M. Saif; A. M. Fadly; J. R. Glisson; L. R. McDougald; L. K. Nolan & D. E. Swayne (Hrsg.), *Diseases of Poultry*, Blackwell Publishing, Oxford, 691-737.
- 11 Benavente, J. & Martínez-Costas, J. (2007). Avian reovirus: Structure and biology. *Virus Res* **123**(2), 105-119.
- 12 Bodelón, G.; Labrada, L.; Martínez-Costas, J. & 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**(20), 17789-17796.
- 13 Bodelón, G.; Labrada, L.; Martínez-Costas, J. & 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**(2), 181-191.

-
- 14 Bracewell, C. D. & Randall, C. J. (1984). The infectious stunting syndrome. *World Poultry Sci J* **40**, 31-37.
 - 15 Bracewell, C. D. & Wyeth, P. (1981). Infectious stunting of chickens. *Vet Rec* **109**(3), 64.
 - 16 Van den Brand, J.; Manvell, R.; Paul, G.; Kik, M. & Dorrestein, G. (2007). Reovirus infections associated with high mortality in psittaciformes in The Netherlands *Avian Pathol* **36**, 293-299.
 - 17 Von Bülow, V. (1979). Inapparente Reovirus-Infektion einer isolierten Rhodeländer-Herde: Diagnose und serologische Untersuchungen. *Zbl Vet Med B.* **26**, 805-19.
 - 18 Castro, A. E.; Davis, J.; Doman, J.; de la Torre, J. & Stoffregen, W. (1995). Arenavirus-like agent in Broilers: an emerging viral disease? *Western Poultry Disease Conference*, Sacramento, USA.
 - 19 Cervantes, H. M. (2003). Feeding strategies to reduce malabsorption and enteric disorders in poultry. *Proc. of the Multi-State Feeding and Nutrition Conference, May 20-22, Marriott Hotel, Indianapolis.*
 - 20 Cessi, D. & Lombardini, F. (1975). Orientamenti sulla profilassi dell'artrite virale aviare. Vaccinazione dei riprodotti, gran parenti e parentali. *La Clinica veterinaria* **98**, 414-417.
 - 21 Conzo, G.; Magnino, S.; Sironi, G.; Lavazza, A.; Vigo, P. G.; Fioretti, A. & Kaleta, E. F. (2001). Reovirus infection in two species of Psittaciformes recently imported into Italy. *Avian Pathol* **30**, 43-47.
 - 22 Costas, C.; Martínez-Costas, J.; Bodelón, G. & Benavente, J. (2005). The second open reading frame of the avian reovirus S1 gene encodes a transcription-dependent and CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling protein. *J Virol* **79**(4), 2141-2150.
 - 23 Decaesstecker, M.; Charlier, G. & Meulemans, G. (1986). Significance of parvoviruses, entero-like viruses and reoviruses in the aetiology of the chicken malabsorption syndrome. *Avian Pathol* **15**(4), 769-782.
 - 24 Deshmukh, D. R. & Pomeroy, B. S. (1969a). Avian reoviruses. I. Isolation and serological characterization. *Avian Dis* **13**(2), 239-243.
 - 25 Deshmukh, D. R. & Pomeroy, B. S. (1969b). Avian reoviruses II. Physicochemical characterization and classification. *Avian Dis* **13**(2), 243-251.
 - 26 Deshmukh, D. R. & Pomeroy, B. S. (1969c). Avian reoviruses. III. Infectivity and egg transmission. *Avian Dis* **13**(3), 427-439.
 - 27 Distl, O. & Siegmann, O. (2005). Leistungsprüfungen. In: O. Siegmann &

-
- U. Neumann (Hrsg.), *Kompendium der Geflügelkrankheiten*, Schlütersche, Hannover, 25-26.
- 28 Docherty, D. E.; Converse, K. A.; Hansen, W. R. & Norman, G. W. (1994). American woodcock (*Scolopax minor*) mortality associated with a reovirus. *Avian Dis* **38**(4), 899-904.
- 29 Duncan, R. (1996). The low pH-dependent entry of avian reovirus is accompanied by two specific cleavages of the major outer capsid protein mu 2C. *Virology* **219**(1), 179-189.
- 30 Duncan, R.; Chen, Z.; Walsh, S. & 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**(2), 453-464.
- 31 Dutta, S. K. & 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), 1-8.
- 32 Dutta, S. K. & 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**(1), 9-14.
- 33 Ellis, M. N.; Eidson, C. S.; Fletcher, O. J. & Kleven, S. H. (1983). Viral tissue tropisms and interferon production in white leghorn chickens infected with two avian reovirus strains. *Avian Dis* **27**(3), 644-651.
- 34 Evans, A. S. (1976). Causation and Disease *Yale J Biol Med* **49**, 175-195.
- 35 Fahey, J. E. & Crawley, J. F. (1954). Studies On Chronic Respiratory Disease Of Chickens II. Isolation of A Virus. *Can J Comp Med Vet S* **18**(1), 13-21.
- 36 Fauquet, C. M; Mayo, M. A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; & Ball, L. A. (2005). *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.*, Elsevier Academic Press, London, 447-510.
- 37 Frazier, J. A.; Farmer, H. & Martland, M. F. (1986). A togavirus-like agent in the pancreatic duct of chickens with infectious stunting syndrome. *Vet Rec* **119**(9), 209-210.
- 38 Frazier, J. A. & Reece, R. L. (1990). Infectious stunting syndrome of chickens in Great Britain: Intestinal ultrastructural pathology. *Avian Pathol* **19**(4), 759-777.
- 39 Fehèr, G. (1975). Die ontogenetische Entwicklung des Dottersackstiels der Hausvögel und seine Rolle bei der Absorption des Dotters. *Anatomia Histologia, Embryologia* **4**, 113-126.

-
- 40 Friedman, A.; Aryeh, I.; Melamed, D. & Nir, I. (1998). Defective immune response and failure to induce oral tolerance following enteral exposure to antigen in broilers afflicted with stunting syndrome *Avian Pathol* **27**, 518-525.
- 41 Furlong, D. B.; Nibert, M. L. & Fields, B. N. (1988). Sigma 1 protein of mammalian reoviruses extends from the surfaces of viral particles. *J Virol* **62**(1), 246-256.
- 42 Gaskin, J. (1989). Psittacine viral disease: A perspective. *J Zoo Wildlife Med* **20**, 249-264.
- 43 Giambrone, J. & Clay, R. (1986). Evaluation of broiler breeder pullet vaccination programs for preventing clinical reovirus infections in the progeny. *Poult Sci* **65**, 457-461.
- 44 Glass, S. E.; Naqi, S. A.; Hall, C. F. & Kerr, K. M. (1973). Isolation and characterization of a virus associated with arthritis of chickens. *Avian Dis* **17**(2), 415-424.
- 45 González-López, C.; Martínez-Costas, J.; Esteban, M. & Benavente, J. (2003). Evidence that avian reovirus sigmaA protein is an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Gen Virol* **84**(Pt 6), 1629-1639.
- 46 Good, R. E. (1982). The pale bird syndrome. *Poultry Digest*. **41**, 278.
- 47 Goodbourn, S.; Didcock, L. & Randall, R. E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**, 2341-2364.
- 48 Goodwin, M. A.; Dekich, M. A.; Latimer, K. S. & Fletcher, O. J. (1985). Quantitation of intestinal D-xylose absorption in normal broilers and in broilers with pale-bird syndrome. *Avian Dis* **29**(3), 630-639.
- 49 Gouvea, V. & Schnitzer, T. J. (1982). Pathogenicity of avian reoviruses: examination of six isolates and a vaccine strain. *Infect Immun* **38**(2), 731-738.
- 50 Graham, D. (1987). Characterization of a reo-like virus and its isolation from and pathogenicity for parrots. *Avian Dis* **31**, 411-419.
- 51 Grande, A. & Benavente, J. (2000). Optimal conditions for the growth, purification and storage of the avian reovirus S1133. *J Virol Methods* **85**(1-2), 43-54.
- 52 Grande, A.; Costas, C. & Benavente, J. (2002). Subunit composition and conformational stability of the oligomeric form of the avian reovirus cell-attachment protein sigmaC. *J Gen Virol* **83**(Pt 1), 131-139.

-
- 53 Heffels-Redmann, U. & Kaleta, E. F. (1992a). Infektiöse Myokarditis der Gösse. In: G. Heider; G. Monreal & J. Mészáros (Hrsg.), *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels (Band 1)*, Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, 538 ff.
- 54 Heffels-Redmann, U. & Kaleta, E. F. (1992b). Reovirusinfektion der Flugenten. In: G. Heider; G. Monreal & J. Mészáros (Hrsg.), *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels (Band 1)*, Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, 541 ff.
- 55 Heffels-Redmann, U.; Hermanns, W. & Kaleta, E. F. (1992). Reovirusarthritis. In: G. Heider; G. Monreal & J. Mészáros (Hrsg.), *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels (Band 1)*, Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, 529 ff.
- 56 Van der Heide, L. (1996). Introduction on avian reovirus. *Proceedings. International Symposium on Adenovirus and Reovirus Infections in Poultry, Rauischholzhausen, Germany.*, 138-142.
- 57 Van der Heide, L. & Page, R. K. (1980). Field experiments with viral arthritis/tenosynovitis vaccination of breeder chickens. *Avian Dis* **24**(2), 493-497.
- 58 Van der Heide, L. V.; Geissler, J. & Bryant, E. S. (1974). Infectious tenosynovitis: serologic and histopathologic response after experimental infection with a Connecticut isolate. *Avian Dis* **18**(3), 289-296.
- 59 Van der Heide, L.; Lütticken, D. & 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**(4), 847-856.
- 60 Henle, J. (1840). Von den Miasmen und Kontagien und von den miasmatisch-kontagiösen Krankheiten. In: K. Sudhoff (Hrsg.), *Klassiker der Medizin*, Johann Ambrosius Barth, Leipzig 1910 (Nachdruck 1968).
- 61 Hieronymus, D. R.; Villegas, P. & Kleven, S. H. (1983). Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malabsorption syndrome. *Avian Dis* **27**(1), 246-254.
- 62 Hollmén, T.; Franson, J. C.; Kilpi, M.; Docherty, D. E.; Hansen, W. R. & Hario, M. (2002). Isolation and characterization of a reovirus from common eiders (*Somateria mollissima*) from Finland. *Avian Dis.* **46**, 478-84.
- 63 Huebner, R. J. (1957). Criteria for etiologic association of prevalent viruses with prevalent diseases; the virologist's dilemma. *Ann N Y Acad Sci* **67**(8), 430-438.
- 64 Huhtamo, E.; Uzcátegui, N. Y.; Manni, T.; Munsterhjelm, R.; Brummer-

-
- Korvenkontio, M.; Vaheri, A. & Vapalahti, O. (2007). Novel orthoreovirus from diseased crow, Finland. *Emerg Infect Dis* **13**(12), 1967-1969.
- 65 Hussain, M. & Spradbrow, P. B. (1981). Experimental transmission of avian reovirus and avian adenovirus through embryonated eggs. *Aust Vet J* **57**(5), 255-256.
- 66 Hussain, M.; Spradbrow, P. B. & Mackenzie, M. (1981). Avian adenoviruses and avian reoviruses isolated from diseased chickens. *Aust Vet J* **57**(9), 436-437.
- 67 Iqbal, N. & Shaw, R. D. (1997). Rotaviruses. In: D. D. Richman; R. J. Whitley & F. G. Hayden (Hrsg), *Clinical Virology*, Churchill Livingstone, New York, 765-786.
- 68 Johnson, D. C. (1972). Diagnosis, pathology, and etiology of tenosynovitis in broilers and broiler breeders. *Avian Dis.* **16**, 1067-72.
- 69 Jones, R. C. (1976). Reoviruses from chickens with hydropericardium. *Vet Rec* **99**(23), 458.
- 70 Jones, R. C. (1986). Avian reovirus. *The Veterinary Bulletin* **56**, No.3.
- 71 Jones, R. C. (2000). Avian reovirus infections. *Rev Sci Tech* **19**(2), 614-625.
- 72 Jones, R. C. (2008). Reovirus Infections. In: Y. M. Saif; A. M. Fadly; J. R. Glisson; L. R. McDougald; L. K. Nolan & D. E. Swayne (Hrsg.), *Diseases of Poultry*, Blackwell Publishing, Oxford, 309-328.
- 73 Jones, R. C. & Georgiou, K. (1984). The temporal distribution of an arthrotropic reovirus in the leg of the chicken after oral infection. *Avian Pathol* **14**, 75-85.
- 74 Jones, R. C. & Guneratne, J. R. (1984). The pathogenicity of some avian reoviruses with particular reference to tenosynovitis. *Avian Pathol* **13**(2), 173-189.
- 75 Jones, R. C. & Kibenge, F. S. B. (1984). Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The effect of breed. *Avian Pathol* **13**, 511-28.
- 76 Jones, R. C. & Nwajei, B. N. (1985). Reovirus-induced tenosynovitis: persistence of homologous challenge virus in broiler chicks after vaccination of parents. *Res Vet Sci* **39**(1), 39-41.
- 77 Jones, R. C.; Jordan, T. W. & Lioupis, S. (1975). Characteristics of reovirus isolated from ruptured gastrocnemius tendons of chickens. *Vet Rec* **96**(7), 153-154.
- 78 Kaaden, O.-R. (2002). Infektionen und Krankheiten durch Reoviren. In: A.

-
- Mayr (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, Enke Verlag, Stuttgart, 232-243.
- 79 Kawamura, H., Shimizu, F.; Maeda, M. & Tsubahara, H. (1965). Avian reovirus: its properties and serological characterization. *National Institute of Animal Health Quarterly* **5**, 115-124.
- 80 Kerr, K. M. & Olson, N. O. (1969). Pathology of chickens experimentally inoculated or contact-infected with an arthritis-producing virus. *Avian Dis* **13**(4), 729-745.
- 81 Kibenge, F. S.; Gwaze, G. E.; Jones, R. C.; Chapman, A. F. & 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**(1), 87-98.
- 82 Kisary, J. (1985). Experimental infection of chicken embryos and day-old chickens with parvovirus of chicken origin. *Avian Pathol* **14**(1), 1-7.
- 83 Koch, R. (1884). Die Aetiologie der Tuberculose *Mitt. Kaiser Gesundh* **2**.
- 84 Koch, R. (1891). Ueber bakteriologische Forschung. Verhandlungen des X Internationalen Medizinischen Congresses, Berlin, 1890, 1, 35, August Hirschwald, Berlin.
- 85 Kouwenhoven, B.; Vertommen, M. & Eck, J. V. (1978a). Runting and leg weakness in broilers; Involvement of infectious factors. *Vet Res Commun* **2**, 253-59.
- 86 Kouwenhoven, B.; Davelaar, F. G. & Walsum, J. V. (1978b). Infectious proventriculitis causing runting in broilers. *Avian Pathol* **7**, 183-87.
- 87 Kouwenhoven, B.; Vertommen, M. & Goren, E. (1983). Runting and stunting syndrome in broilers; the disease with many names and faces. *Proceedings. International Union of Immunological Societies*. **66**, 73-79.
- 88 Kouwenhoven, B.; Vertommen, M. & Goren, E. (1988). Investigations into the role of reovirus in the malabsorption syndrome. *Avian Pathol* **17**, 879 - 892.
- 89 Krauss, H. & Ueberschär, S. (1966). [Structure of a new avian orphan virus]. *Zentralbl Veterinarmed B* **13**(3), 239-249.
- 90 Labrada, L.; Bodelón, G.; Viñuela, J. & 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**(16), 7932-7941.
- 91 Levisohn, S.; Gur-Lavie, A. & Weisman, J. (1980). Infectious synovitis in Turkeys: Isolation of tenosynovitis virus-like agent. *Avian Pathol* **9**, 1 - 4.

-
- 92 Liu, H.; Lin, P.; Lee, J.; Hsu, H. & Shih, W. (2005). Retardation of cell growth by avian reovirus p17 through the activation of p53 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **336**(2), 709-715.
- 93 van Loon, A. A.; Koopman, H. C.; Kosman, W.; Mumczur, J.; Szeleszczuk, O.; Karpinska, E.; Kosowska, G. & Lütticken, D. (2001). Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chickens. *Vet Q* **23**(3), 129-133.
- 94 Lympelopoulos, K.; Noad, R.; Tosi, S.; Nethisinghe, S.; Brierley, I. & Roy, P. (2006). Specific binding of Bluetongue virus NS2 to different viral plus-strand RNAs. *Virology* **353**(1), 17-26.
- 95 Macdonald, J. W.; Randall, C. J.; Dagless, M. D. & McMartin, D. A. (1978). Observations on viral tenosynovitis (viral arthritis) in Scotland. *Avian Pathol* **7**, 471 - 482.
- 96 Manvell, R.; Gough, D.; Major, N. & Fouchier, R. A. M. (2004). Mortality in budgerigars associated with a reovirus-like agent. *Vet Rec* **154**(17), 539-540.
- 97 Martínez-Costas, J.; González-López, C.; Vakharia, V. N. & Benavente, J. (2000). Possible involvement of the double-stranded RNA-binding core protein sigmaA in the resistance of avian reovirus to interferon. *J Virol* **74**(3), 1124-1131.
- 98 Martínez-Costas, J.; Grande, A.; Varela, R.; García-Martínez, C. & Benavente, J. (1997). Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J Virol* **71**(1), 59-64.
- 99 Mayr, A.; Bachmann, P.A.; Bibrack, B. & Wittmann, G. (1974). Technik der Eibeimpfung. In: A. Mayr; P. A. Bachmann; B. Bibrack & G. Wittmann (Hrsg.), *Virologische Arbeitsmethoden* 1, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 393-434.
- 100 McFerran, J. B.; Gordon, W. A.; Taylor, S. M. & McParland, P. J. (1971). Isolation of viruses from 94 flocks of fowls with respiratory disease. *Res Vet Sci* **12**(6), 565-569.
- 101 McFerran, J. B.; McCracken, R. M.; Connor, T. J. & Evans, R. T. (1976). Isolation of viruses from clinical outbreaks of inclusion body hepatitis. *Avian Pathol.* **5**, 315 - 324.
- 102 McFerran, J. B. & McNulty, M. S. (1986). Recent advances in enterovirus infections of birds. In: McFerran, J. B. & McNulty, M. S. (Hrsg.), *Acute Virus Infections of Poultry*, Martinus Nijhoff Publishers, Luxembourg, 195-202.
- 103 McLoughlin, M. F.; McLoone, D. A. & Connor, T. J. (1987). Runting and stunting syndrome in turkeys. *Vet Rec* **121**(25-26), 583-586.

-
- 104 Menendez, N. A.; Calnek, B. W. & Cowen, B. S. (1975). Localization of avian reovirus (FDO isolant) in tissues of mature chickens. *Avian Dis* **19**(1), 112-117.
- 105 Menendez, N. A.; Calnek, B. W. & Cowen, B. S. (1975). Experimental egg-transmission of avian reovirus. *Avian Dis* **19**(1), 104-111.
- 106 Metcalf, P.; Cyrklaff, M. & Adrian, M. (1991). The three-dimensional structure of reovirus obtained by cryo-electron microscopy. *EMBO J* **10**(11), 3129-3136.
- 107 Meulemans, G. (1986). Runting syndrome in chickens. Experimental reproduction studies. In: McFerran, J. B. & McNulty, M. S. (Hrsg.), *Acute Virus Infections of Poultry*, Martinus Nijhoff Publishers, Luxembourg, 179-189.
- 108 Meulemans, G.; Dekegel, D.; Charlier, G.; Froyman, R.; Tilburg, J. V. & Halen, P. (1983). Isolation of orthoreoviruses from psittacine birds. *J Comp Pathol* **93**(1), 127-134.
- 109 Monreal, G. (1992). Malabsorptionssyndrom. In: G. Heider; G. Monreal & J. Mészáros (Hrsg.), *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels (Band 2)*, Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, 695-701.
- 110 Montgomery, R. D.; Boyle, C. R.; Maslin, W. R. & Magee, D. L. (1997). Attempts to reproduce a runting/stunting-type syndrome using infectious agents isolated from affected Mississippi broilers. *Avian Dis* **41**(1), 80-92.
- 111 Mothes, T.; Mühle, W.; Müller, F. & Schmidt, W. (1985). Chicken fetal intestine in tissue culture. *Biomed Biochim Acta* **44**(4), 561-571.
- 112 Mukiibi-Muka, G. & Jones, R. C. (1999). Local and systemic IgA and IgG responses of chicks to avian reoviruses: effects of age of chick, route of infection and virus strain. *Avian Pathol* **28**, 54-60.
- 113 Mustaffa-Babjee, A. & Spradbrow, P. B. (1971). The isolation of an avian reovirus. *Aust Vet J* **47**(6), 284.
- 114 Müller, I.; Wernery, U.; Joseph, S.; Wernery, R. & Grund, C. (2008). Bedeutung aviärer Reoviren als Pathogene bei Zier- und Wildvögeln un deren labordiagnostischer Nachweis. 15. DVG-Tagung Vogelkrankheiten, München.
- 115 Neelima, S.; Ram, G. C.; Kataria, J. M. & Goswami, T. K. (2003). Avian reovirus induces an inhibitory effect on lymphoproliferation in chickens. *Vet Res Commun* **27**(1), 73-85.
- 116 O'Brien, J. D. (1983). 'Stunting syndrome' in broiler chickens. *Vet Rec* **113**(9), 203.

-
- 117 Olland, A. M.; Jané-Valbuena, J.; Schiff, L. A.; Nibert, M. L. & Harrison, S. C. (2001). Structure of the reovirus outer capsid and dsRNA-binding protein sigma3 at 1.8 Å resolution. *EMBO J* **20**(5), 979-989.
- 118 Olsen, D. E. (1977). Isolation Of A Reovirus-Like Agent From Broiler Chicks With Diarrhea And Stunting. *Proceedings 26th Western Poultry Disease Conference.*, 131-139.
- 119 Olson, N. O. & Kerr, K. M. (1967). The duration and distribution of synovitis-producing agent in chickens. *Avian Dis* **11**(4), 578-585.
- 120 Olson, N. O. & Khan, M. A. (1972). The effect of intranasal exposure of chickens to the Fahey-Crawley virus on the development of synovial lesions. *Avian Dis* **16**(5), 1073-1078.
- 121 Olson, N. O.; Shelton, D. C. & Munro, D. A. (1957). Infectious synovitis control by medication; effect of strain differences and pleuropneumonia-like organisms. *Am J Vet Res* **18**(69), 735-739.
- 122 Osborne, D. J. & Hamilton, P. B. (1981). Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. *Poult Sci* **60**(8), 1818-1821.
- 123 Otto, P.; Liebler-Tenorio, E. M.; Elschner, M.; Reetz, J.; Löhren, U. & Diller, R. (2006). Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). *Avian Dis* **50**(3), 411-418.
- 124 Page, R. K.; Fletcher, O. J.; Rowland, G. N.; Gaudry, D. & Villegas, P. (1982). Malabsorption syndrome in broiler chickens. *Avian Dis* **26**(3), 618-624.
- 125 Pass, D. A.; Robertson, M. D. & Wilcox, G. E. (1982). Runting syndrome in broiler chickens in Australia. *Vet Rec* **110**(16), 386-387.
- 126 Patten, B. M. (1971), *Early embryology of the chick* , 5th ed., 1971. 591.3 P2774ed.
- 127 Pennycott, T. (2004). Mortality in budgerigars in Scotland: pathological findings. *Vet Rec* **154**(17), 538-539.
- 128 Pertile, T. L.; Karaca, K.; Walser, M. M. & Sharma, J. M. (1996). Suppressor macrophages mediate depressed lymphoproliferation in chickens infected with avian reovirus. *Vet Immunol Immunopathol* **53**(1-2), 129-145.
- 129 Petek, M.; Felluga, B.; Borghi, G. & Baroni, A. (1967). The Crawley agent: an avian reovirus. *Arch Ges Virusforsch* **21**(3), 413-424.
- 130 Randall, C. J.; Wyeth, P. J. & Higgins, R. J. (1981). Pancreatic lesions in

- stunted broilers. *Vet Rec* **109**(6), 125-126.
- 131 Rau, W. E.; van der Heide, L.; Kalbac, M. & Girshick, T. (1980). Onset of progeny immunity against viral arthritis/tenosynovitis after experimental vaccination of parent breeder chickens and cross-immunity against six reovirus isolates. *Avian Dis* **24**(3), 648-657.
- 132 Rebel, J. M. J.; Balk, F. R. M. & Boersma, W. J. A. (2005). Cytokine responses in broiler lines that differ in susceptibility to malabsorption syndrome. *Br Poult Sci* **46**(6), 679-686.
- 133 Reece, R. L. & Frazier, J. A. (1990). Infectious stunting syndrome of chickens in Great Britain: field and experimental studies. *Avian Pathol* **19**(4), 723-758.
- 134 Reed, L. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* **27**, 493-497.
- 135 Reinisch, K. M.; Nibert, M. L. & Harrison, S. C. (2000). Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature* **404**(6781), 960-967.
- 136 Rekik, M. R.; Silim, A. & Bernier, G. (1991). Serological and pathogenic characterization of avian reoviruses isolated in Quebec. *Avian Pathol* **20**, 607-617.
- 137 Rivers, T. M. (1937). Viruses and Koch's Postulates. *J Bacteriol* **33**(1), 1-12.
- 138 Robertson, M. D.; Wilcox, G. E. & Kibenge, F. S. (1984). Prevalence of reoviruses in commercial chickens. *Aust Vet J* **61**(10), 319-322.
- 139 Rüsse, I. (1998). Fruchthüllen des Vogels. In: I. Rüsse, F. Sinowatz (Hrsg.) *Embryologie der Haustiere*, Parey Buchverlag, Berlin, 204-206.
- 140 Sabin, A. B. (1959). Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science* **130**, 1387-1389.
- 141 Sahm, I. (2009). Untersuchungen zur antigenetischen Verwandtschaft aviärer reoviren aus Broilern mit Malabsorptionssyndrom (MAS). *Dissertationsschrift, Ludwigs-Maximilians-Universität München*.
- 142 Sahu, S. P. & 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**(6), 847-850.
- 143 Salsman, J.; Top, D.; Boutilier, J. & Duncan, R. (2005). Extensive syncytium formation mediated by the reovirus FAST proteins triggers apoptosis-induced membrane instability. *J Virol* **79**(13), 8090-8100.

-
- 144 Sander, J. E.; Willingham, E. M.; Wilson, J. L. & Thayer, S. G. (1998). The effect of inoculating *Enterococcus faecalis* into the yolk sac on chick quality and maternal antibody absorption. *Avian Dis* **42**(2), 359-363.
- 145 Savage, C. E. & Jones, R. C. (2003). The survival of avian reoviruses on materials associated with the poultry house environment. *Avian Pathol* **32**(4), 419-425.
- 146 Schiff, L. A.; Nibert, M. L. & Tyler, K. L. (2007). Orthoreoviruses and Their replication. In: D. M. Knipe; P. M. Howley & D. E. Griffin (Hrsg.), *Fields Virology. 5th edition*, Lippincott Williams & Wilkins, Conshohocken, USA.
- 147 Schnitzer, T. J.; Ramos, T. & Gouvea, V. (1982). Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. *J Virol* **43**(3), 1006-1014.
- 148 Schwartz, L. D.; Gentry, R. F.; Rothenbacher, H. & van der Heide, L. (1976). Infectious tenosynovitis in commercial White Leghorn chickens. *Avian Dis* **20**(4), 769-773.
- 149 Schweikl, M. (2008). Untersuchungen zum Malabsorptionssyndrom (MAS) bei Masthähnchen- eine Feldstudie. *Dissertationsschrift, Ludwigs-Maximilians-Universität München*.
- 150 Sell, J. L.; Reynolds, D. L. & Jeffrey, M. (1992). Evidence that bacteria are not causative agents of stunting syndrome in poults. *Poult Sci* **71**(9), 1480-1485.
- 151 Shapiro, F. & Nir, I. (1995a). Stunting syndrome in broilers: physical, physiological, and behavioral aspects. *Poult Sci* **74**(1), 33-44.
- 152 Shapiro, F. & Nir, I. (1995b). Stunting syndrome in broilers: effect of age and exogenous amylase and protease on performance, development of the digestive tract, digestive enzyme activity, and apparent digestibility. *Poult Sci* **74**(12), 2019-2028.
- 153 Shapouri, M. R.; Arella, M. & Silim, A. (1996). Evidence for the multimeric nature and cell binding ability of avian reovirus sigma 3 protein. *J Gen Virol* **77**, 1203-1210.
- 154 Shmulevitz, M. & Duncan, R. (2000). A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J* **19**(5), 902-912.
- 155 Simmons, D. G. & Lukert, P. D. (1972). Isolation, identification and characterization of an avian respiratory virus. *Bulletin of the Georgia Academy of Science*. **30**, 1-10.
- 156 Smart, I. J.; Barr, D. A.; Reece, R. L.; Forsyth, W. M. & Ewing, I. (1988). Experimental reproduction of the runting-stunting syndrome of broiler

- chickens. *Avian Pathol* **3**, 617 - 627.
- 157 Songserm, T.; Pol, J. M.; van Roozelaar, D.; Kok, G. L.; Wagenaar, F. & ter Huurne, A. A. (2000). A comparative study of the pathogenesis of malabsorption syndrome in broilers. *Avian Dis* **44**(3), 556-567.
- 158 Songserm, T.; Zekarias, B.; van Roozelaar, D. J.; Kok, R. S.; Pol, J. M. A.; Pijpers, A. A. & ter Huurne, A. A. H. M. (2002). Experimental reproduction of malabsorption syndrome with different combinations of reovirus, *Escherichia coli*, and treated homogenates obtained from broilers. *Avian Dis* **46**(1), 87-94.
- 159 Spandidos, D. A. & Graham, A. F. (1976). Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J Virol* **19**(3), 968-976.
- 160 Subramanyam, P. & Pomeroy, B. S. (1960). Studies on the Fahey-Crawley Virus. *Avian Dis.* **4**, 165-175.
- 161 Szabo, J.; Salyi, G. & Rudas, P. (1989). Effect of malabsorption syndrome on pancreatic function in broilers. *Poult Sci* **68**(11), 1553-1560.
- 162 Sánchez-Cordón, P. J.; Hervás, J.; de Lara, F. C.; Jahn, J.; Salguero, F. J. & Gómez-Villamandos, J. C. (2002). Reovirus infection in psittacine birds (*Psittacus erithacus*): morphologic and immunohistochemical study. *Avian Dis* **46**(2), 485-492.
- 163 Thayer, S. G.; Waltman, W. D. & Wages, D. P. (2008). Streptococcus and Enterococcus. In: Y. M. Saif; A. M. Fadly; J. R. Glisson; L. R. McDougald; L. K. Nolan & D. E. Swayne (Hrsg.), *Diseases of Poultry*, Blackwell Publishing, Oxford, p. 900-908.
- 164 Tourís-Otero, F.; Martín, M. C.; Martínez-Costas, J. & Benavente, J. (2004a). Avian reovirus morphogenesis occurs within viral factories and begins with the selective recruitment of sigmaNS and lambdaA to microNS inclusions. *J Mol Biol* **341**(2), 361-374.
- 165 Touris-Otero, F.; Martínez-Costas, J.; Vakharia, V. N. & Benavente, J. (2004b). Avian reovirus nonstructural protein microNS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein sigmaNS to these structures. *Virology* **319**(1), 94-106.
- 166 Tourís-Otero, F.; Martínez-Costas, J.; Vakharia, V. N. & Benavente, J. (2005). Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus non-structural protein sigmaNS. *J Gen Virol* **86**, 1159-1169.
- 167 Varela, R. & Benavente, J. (1994). Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *J Virol* **68**(10), 6775-6777.
- 168 Varela, R.; Martínez-Costas, J.; Mallo, M. & Benavente, J. (1996). Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus

- proteins. *J Virol* **70**(5), 2974-2981.
- 169 Vertommen, M.; van Eck, J. H.; Kouwenhoven, B. & van Kol, N. (1980a). Infectious stunting and leg weakness in broilers: i. Pathology and biochemical changes in blood plasma. *Avian Pathol*, **9**, 133-142.
- 170 Vertommen, M.; van der Laan, A. & Veenendaal-Hesselman, H. M. (1980b). Infectious stunting and leg weakness in broilers II. Studies on alkaline phosphatase isoenzymes in blood plasma. *Avian Pathol* **9**, 143-153.
- 171 Vindevogel, H.; Meulemans, G.; Pastoret, P. P.; Schwers, A. & Calberg-Bacq, C. M. (1982). Reovirus infection in the pigeon. *Ann Rech Vet* **13**(2), 149-152.
- 172 Vollmerhaus, B. (1992). Körperhöhlen. In: R. Nickel; A. Schummer & E. Seiferle (Hrsg.), *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V, Anatomie der Vögel*, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 155 f.
- 173 Walker, E. R.; Friedman, M. H. & Olson, N. O. (1972). Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis. *J Ultrastruct Res* **41**(1), 67-79.
- 174 Wilson, R. B.; Holscher, M.; Hodges, J. R. & Thomas, S. (1985). Necrotizing hepatitis associated with a reo-like virus infection in a parrot. *Avian Dis* **29**(2), 568-571.
- 175 Wong, J. K. (1997). Colorado tick fever virus and other arthropod-borne reoviridae. In: D. D. Richman; R. J. Whitley & F. G. Hayden (Hrsg.), *Clinical Virology*, Churchill Livingstone, New York, 755-764.
- 176 Yin, H. S. & Lee, L. H. (1998). Identification and characterization of RNA-binding activities of avian reovirus non-structural protein sigmaNS. *J Gen Virol* **79**, 1411-1413.
- 177 Yin, H. S.; Shien, J. H. & Lee, L. H. (2000). Synthesis in *Escherichia coli* of avian reovirus core protein sigmaA and its dsRNA-binding activity. *Virology* **266**(1), 33-41.
- 178 Yin, H. S.; Su, Y. P. & Lee, L. H. (2002). Evidence of nucleotidyl phosphatase activity associated with core protein sigma A of avian reovirus S1133. *Virology* **293**(2), 379-385.
- 179 Van de Zande, S. V. & Kuhn, E. (2007). Central nervous system signs in chickens caused by a new avian reovirus strain: a pathogenesis study. *Vet Microbiol* **120**(1-2), 42-49.
- 180 Zhang, X.; Tang, J.; Walker, S. B.; O'Hara, D.; Nibert, M. L.; Duncan, R. & Baker, T. S. (2005). Structure of avian orthoreovirus virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Virology* **343**(1), 25-35.

9. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Aufbau des ARV-Virions	18
Abb. 2: Nachweis von ARV (Isolat 8474DP4-6) in Zellkultur	36
Abb. 3: Elektronenoptischer Nachweis von ARV aus Zellkulturüberstand	37
Abb. 4: Darstellung von Morphogenesestadien von ARV im Ultradünnschnitt	38
Abb. 5: Skizzierung des Versuchsablaufs in der Versuchsgruppe	62
Abb. 6: Anteil erkrankter Tiere an den Gruppen	78
Abb. 7: Klinisch erkrankte Küken aus der Versuchsgruppe	79
Abb. 8: Tierzahlen	81
Abb. 9: Mittleres Körpergewicht	83
Abb. 10: Verteilung der Messwerte zum Körpergewicht	85
Abb. 11: Mittlere Zunahme des Körpergewichtes	88
Abb. 12: Infektionsstatus untersuchter Tiere der Versuchsgruppe	90
Abb. 13: Infektionsstatus untersuchter Organe aus der Versuchsgruppe	93
Abb. 14: Makroskopische Veränderungen des Dottersacks	99
Abb. 15: Feingewebliche Schnitte (HE) von Herz und Pankreas aus Versuchstieren	102
Abb. 16: Feingewebliche Schnitte (HE) des Verdauungstraktes von Versuchstieren	103
Abb. 17: Bakteriennachweis aus getöteten Tieren nach Spezies	105
Abb. 18: Verteilung der sp-Werte	107
Abb. 19: Antikörperrnachweis aus Dotterproben mittels ELISA-Test	110
Abb. 20: Restinfektiosität der ARV-Stämme S 1133 und 8474 DP 4-6	112

10. Tabellenverzeichnis

	Seite	
Tab. 1:	Übersicht über Genom und Proteom von ARV	13
Tab. 2 :	EVANS (1976): Kriterien der Ursächlichkeit: ein vereinheitlichtes Konzept	42
Tab. 3:	Durchgeführte Untersuchungen bei Tieren der Versuchsgruppe	63
Tab. 4:	Vergleichende Inokulation von spf-Eiern	72
Tab. 5:	Mittlere Absterbezeit der infizierten Embryonen nach Inokulation	73
Tab 6:	Wiederholte Allantoishöhlennokulation von spf-Eiern mit dem Stamm 8474 DP 4-6	74
Tab 7:	Ausreißer unter den in der Versuchsgruppe erhobenen Daten	86
Tab 8:	Statistische Beurteilung der Gewichtszunahme anhand von p-Werten	88
Tab 9:	Organverteilung der Infektion untersuchter Versuchstiere	95
Tab 10:	Vorhandensein und Größe des Dottersacks in untersuchten Versuchstieren	98
Tab 11:	Veränderungen der Ureteren und Nieren untersuchter Versuchstiere	98
Tab 12:	Pathohistologische Veränderungen in Organen der Versuchstiere	101
Tab. 13:	Ermittelte sp-Werte für die Serumproben aus Sentineltieren	106
Tab. 14:	Vergleichende Inokulation von spf- und Masthuhneiern	114
Tab. 15:	Kennzahlen zur vergleichenden Inokulation von spf- und Masthuhneiern	114
Tab. 16:	Bakteriologische Untersuchung getöteter Tiere der Kontrollgruppe	163
Tab. 17:	Bakteriologische Untersuchung verendeter Tiere der Kontrollgruppe	163
Tab. 18:	Bakteriologische Untersuchung getöteter Tiere der Versuchsgruppe	164
Tab. 19:	Bakteriologische Untersuchung verendeter Tiere der Versuchsgruppe	165

11. Anhang

Tab. 16: Bakteriologische Untersuchung getöteter Tiere der Kontrollgruppe

		grampositive, kokkoide Mischflora	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>E. coli</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Lebenstag	Organ							
4	Herz	0/1 0	0/1 0	1/1 2	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0
	Lunge	0/1 0	0/1 0	1/1 2	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0
	Leber	0/1 0	0/1 0	1/1 3	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0
5	Herz	0/1 0	0/1 0	1/1 4	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0
	Lunge	0/1 0	0/1 0	1/1 4	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0
	Leber	0/1 0	0/1 0	1/1 4	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0
8 (E)*	Herz	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0
	Lunge	0/2 0	0/2 0	2/2 3	0/2 0	2/1 3	0/2 0	0/2 0
	Leber	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0
35	Herz	4/10 2	1/10 2	2/10 2	2/10 2	1/10 2	0/10 0	0/10 0
	Lunge	4/10 2	1/10 2	1/10 2	2/10 2,5	2/10 1,5	0/10 0	0/10 0
	Leber	4/10 2	2/10 2	1/10 2	1/10 2	2/10 1,5	0/10 0	0/10 0

Tab. 17: Bakteriologische Untersuchung verendeter Tiere der Kontrollgruppe

		grampositive, kokkoide Mischflora	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>E. coli</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Lebenstag	Organ							
0	Herz	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	2/5 2,5	0/1 0
	Lunge	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	3/5 2	0/1 0
	Leber	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	0/5 0	2/5 1,5	0/1 0

Tab. 19: Bakteriologische Untersuchung verendeter Tiere der Versuchsgruppe

		grampositive, kokkoide Mischflora	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>E. coli</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Lebenstag	Organ							
1	Herz	0/1 0	0/1 0	1/1 4	0/1 0	1/1 3	0/1 0	0/1 0
	Lunge	0/1 0	0/1 0	1/1 4	0/1 0	1/1 3	0/1 0	0/1 0
	Leber	0/1 0	0/1 0	1/1 4	0/1 0	1/1 4	0/1 0	0/1 0
4 (E)*	Herz	0/4 0	0/4 0	1/4 3	0/4 0	1/4 2	0/4 0	0/4 0
	Lunge	0/4 0	0/4 0	2/4 3	0/4 0	1/4 2	0/4 0	0/4 0
	Leber	0/4 0	0/4 0	2/4 3	0/4 0	1/4 2	0/4 0	0/4 0
11 (C)*	Herz	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0
	Lunge	1/1 4	0/1 0	0/1 0	0/1 0	1/1 4	0/1 0	0/1 0
	Leber	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0
12	Herz	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0
	Lunge	1/1 3	0/1 0	0/1 0	0/1 0	1/1 3	0/1 0	0/1 0
	Leber	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0

Legende:

$\frac{x}{n}$ 1 - 4

n: Anzahl der beprobten Tiere

x: Anzahl der Proben aus denen Bakterien kultiviert wurden

1 – 4: Semiquantitative Bestimmung der Bakterienlast

(1: Einzelkolonien, 2: geringgradiges, 3: mittelgradiges, 4:

hochgradiges Keimwachstum in der Kultur)

(E), (C)

Verabreichung von Enrofloxacin bzw. Colistin

12. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
al	<i>alii, aliae</i> , andere
ARV	Aviäres Orthoreovirus, Aviäre Orthoreoviren
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
ca	circa
DNA	deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
dom	<i>domestica</i> , gezähmt
dsRNA	double stranded RNA, doppelsträngige Ribonukleinsäure
dt	deutsch
EID ₅₀	einfektiöse Dosis 50
ELD ₅₀	eiletale Dosis 50
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et	und
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
HE	Hämatoxylin-Eosin
L	<i>large</i> , groß
L	Liter
ld	<i>logarithmus dualis</i> Logarithmus zur Basis 2
M	<i>medium</i> , mittel
MAS	Malabsorptionssyndrom
mg	Milligramm
min	Minute, Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MRV	mammalian orthoreovirus, Säugetier-Orthoreovirus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

nm	Nanometer
NS	<i>nonstructural</i> , Nichtstruktur-
pbE	plaquebildende Einheit
PBS	phosphate buffered saline
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
p-Wert	Wert zur Überschreitungswahrscheinlichkeit
POD	Peroxidase
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
S	<i>small</i> , klein
Spf	spezifiziert pathogenfrei
Tab	Tabelle
U	Uracil
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
var	<i>variatio</i> , Form

13. Danksagung

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich ganz enorm für die Unterstützung und das mir entgegengebrachte Verständnis. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern.

In besonderem Maße möchte ich Herrn PD Dr. Grund für die sehr gute Betreuung, seine große Hilfsbereitschaft, die konstruktive Kritik und die Überlassung des Themas danken.

Bei Herrn Professor Korbelt bedanke ich mich herzlich für seine Unterstützung und die interessante und schöne Zeit in Oberschleißheim.

Herrn PD Dr. Beer danke ich sehr für die herzliche Aufnahme am FLI und dafür, dass ich diese Arbeit dort fortsetzen und beenden konnte.

Isabel Sahn und Monika Schweikl danke ich ganz herzlich für die ausführlichen Vorarbeiten. An Franz Kronthaler, Kristin Kahl, Katharina Huber, Renate Englert und Bärbel Hohenleitner ein großes Dankeschön für die Hilfe bei der Bewältigung der Probenmassen.

Dem Labor für Pathologie des FLI, im Besonderen Herrn Professor Teifke, danke ich sehr für die Hilfe bei der Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate.

Einen herzlichen Dank an Herrn Dr. rer. nat. habil Granzow für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und das kritische Lesen des Manuskripts.

Vielen Dank an Herrn Dr. rer. nat. Mario Ziller für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Bei PD Dr. Timm Harder bedanke ich mich herzlich für seine Unterstützung und Hilfe.

Dr. Regula Wäckerlin danke ich außerordentlich für vieles.

Meinen Kollegen aus den Laboren für Influenza und Newcastle Disease und meinen ehemaligen Kollegen an der Klinik für Vögel möchte ich von ganzem Herzen für die Unterstützung und Motivation danken.