

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

**Untersuchungen zur
antigenetischen Verwandtschaft
aviärer Reoviren
aus Broilern
mit Malabsorptionssyndrom (MAS)**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Isabel Antonia Sahn

aus
Waiblingen

München 2009

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Korbel
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Kienzle

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

***In Liebe
meinen Eltern Margit und Michael***

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
2 Literatur	10
2.1 Geschichte der aviären Reoviren	10
2.2 Klassifizierung von ARV	10
2.3 Erkrankungen	11
2.3.1 Tenosynovitis	12
2.3.1.1 Allgemeines	12
2.3.1.2 Pathogenese/ Pathologie	13
2.3.1.3 Histologie	13
2.3.2 Leber	14
2.3.2.1 Allgemeines	14
2.3.2.2 Pathologie und Histologie	15
2.3.3 Herz	15
2.3.4 Milz	15
2.3.5 Bursa Fabricii	16
2.3.6 Thymus	16
2.3.7 Darm	16
2.3.8 Pankreas	17
2.3.9 Ösophagus und Magen	17
2.3.10 Nieren	18
2.3.11 Geschlechtsorgane	18
2.3.12 Blut und Knochenmark	18
2.3.13 Respirationstrakt	18
2.3.14 Gehirn und Nervensystem	19
2.3.15 Schäden an bebrüteten Hühnereiern	19
2.3.16 Malabsorptionssyndrom	20
2.3.16.1 Allgemeines	20
2.3.16.2 Ätiologie	21
2.3.16.3 Pathologie	22
2.3.16.4 Histologie	22

2.4	Epizootiologie, Immunologie und Vakzinierung	23
2.5	Eigenschaften aviärer Reoviren	27
2.6	Genom	28
2.6.1	Eigenschaften	28
2.6.2	Differenzierung	28
2.6.3	Sequenzierung	29
2.7	Proteine	31
2.7.1	λ -Proteine	32
2.7.1.1	Protein λ A	32
2.7.1.2	Protein λ B	33
2.7.1.3	Protein λ C	33
2.7.2	μ -Proteine	33
2.7.2.1	Protein μ A	34
2.7.2.2	Protein μ B	34
2.7.2.3	Protein μ NS	35
2.7.3	σ -Proteine	36
2.7.3.1	Protein σ A	36
2.7.3.2	Protein σ B	37
2.7.3.3	Proteine des S1-Genomsegments	37
2.7.3.3.1	Protein p10	37
2.7.3.3.2	Protein p17	38
2.7.3.3.3	Protein σ C	39
2.7.3.4	Protein σ NS	40
2.8	Replikationszyklus und Morphogenese	42
2.9	Interaktionen mit der Wirtszelle	45
2.10	Serologie	47
2.10.1	Antikörperbildung und Veränderung von Laborwerten	47
2.10.2	Serologische Nachweis- und Messverfahren	48
2.10.3	Neutralisation	49
3	Material und Methoden	52
3.1	Zellkulturen	52
3.2	PBS (phosphate buffered saline)	53
3.3	Antibiotikallösung	53
3.4	Viren	54

3.5 Eikultur	55
3.6 Plaueklonierung.....	55
3.7 Immunfluoreszenz	55
3.8 Serumgewinnung	56
3.9 Reo-ELISA	59
3.10 Plaquetitration	60
3.11 Plaueneutralisation.....	61
3.12 Relatedness-Werte.....	63
3.13 Statistik.....	64
4 Ergebnisse	65
4.1 Plaquetypen	65
4.2 Plaquetitration	67
4.3 Plaueneutralisation des Referenzstamms S1133.....	71
4.4 Kreuzneutralisation mit Hyperimmunseren.....	72
4.5 Neutralisation mit Elterntierseren	76
4.6 Effekt von Auffrischungsimmunisierungen auf die Neutralisation	78
4.7 Ursprungsabhängige Neutralisation auf HEL-Zellen	80
4.8 Relatedness-Werte.....	85
4.9 Einfluss der Wirtszelle auf die Neutralisation	87
4.10 Adaptation eines MAS-Isolats nach häufiger Passage auf HEF-Zellen....	91
5 Diskussion	93
6 Literaturverzeichnis	103
7 Zusammenfassung.....	127
8 Summary	129
Danksagung	131

Abkürzungsverzeichnis

293-Zellen: permanente Zelllinie, humane embryonale Nierenzellen

a-8474: Hyperimmunserum, das gegen das MAS-Isolat 8474DP4-6 gerichtet ist

a-8501: Hyperimmunserum, das gegen das MAS-Isolat 8501DP4-6 gerichtet ist

a-8588: Hyperimmunserum, das gegen das MAS-Isolat 8588DP4-6 gerichtet ist

a-8914: Hyperimmunserum, das gegen das MAS-Isolat 8914DP4-6 gerichtet ist

Abb.: Abbildung

AGP: Agargelpräzipitationstest

a-K: Hyperimmunserum, das gegen einen K-Stamm gerichtet ist

Aqua bidest.: Aqua bidestillata

ARV: aviäre Reoviren

a-S1133: Hyperimmunserum, das gegen den Stamm S1133 gerichtet ist

ATP: Adenosintriphosphat

bzw.: beziehungsweise

ca.: circa

Ca: Calcium

CD4+-Zellen: T-Helferzellen

CD8+-Zellen: cytotoxische T-Zellen

CMC: Carboxymethylcellulose

cpE: cytopathischer Effekt

Da: Dalton

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNS: Desoxyribonukleinsäure

dsRNS: Doppelstrang-Ribonukleinsäure

EDTA: Ethylendiamintetraacetat

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

ER: endoplasmatisches Retikulum

ERS: enteric reovirus strain

FC-Stamm: ARV-Stamm Fahey-Crawley, benannt nach seinen Entdeckern

FITC: Fluorescein-5-isothiocyanat

FKS: fötales Kälberserum

g: Gramm

GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

H₂O₂: Wasserstoffperoxid

HD11-Zellen: permanente Zelllinie, Hühnermakrophagen

HEF (engl.: CEF): Hühnerembryofibroblasten

HEL (engl.: CEL): Hühnerembryoleberzellen

HeLa-Zellen: permanente Zelllinie, humane Epithelzellen eines Cervixkarzinoms

HEN: Hühnerembryonierenzellen

HN: Hühnernierenzellen

IBV: Virus, das infektiöse Bursitits auslöst

ISVPs: intermediäre subvirale Partikel

IudR: Ioduracildesoxyribosid/ Idoxuridin

KCl: Kaliumchlorid

kDa: Kilodalton

KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat

L929: permanente Zelllinie, Mäusefibroblasten

MAks: monoklonale Antikörper

MAS: Malabsorptionssyndrom

MAS-Isolate: Isolate aus Tieren mit Malabsorptionssyndrom

MEM: Minimal essential medium

Mg: Magnesium

min: Minute(n)

ml: Milliliter

Mn: Mangan

mRNS: Messenger-Ribonukleinsäure

MRV: mammalian reoviruses, Reoviren der Säuger

Na₂HPO₄ x 2 H₂O: Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat

NaCitrat: Natriumcitrat

NaCl: Natriumchlorid

NaHCO₃: Natriumhydrogencarbonat

NBCS: newborn calf serum, Kälberserum von Neugeborenen

NLS: nuclear localization signal

NO: Stickstoffmonoxid

NS: non structural/ nicht strukturbildend

NTP: Nukleosidtriphosphat

OPD: O-Phenylendiamin-Dihydrochlorid

ORF: open reading frame

p.i.: post infectionem

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction/ Polymerasekettenreaktion

pH: pondus Hydrogenii

pI: isoelektrischer Punkt

POD: Peroxidase

RNS: Ribonukleinsäure

RT: Raumtemperatur

R-Werte: Relatedness-Werte

SPF: spezifisch pathogenfrei

ssRNS: Einzelstrang-Ribonukleinsäure

Tab.: Tabelle

TGF- β : transforming growth factor- β

UTP: Uridintriphosphat

Vero-Zellen: permanente Zelllinie aus normalen Nierenzellen Grüner Meerkatzen

μ l: Mikroliter

1 Einleitung

Aviäre Reoviren (ARV) sind seit langem als Erreger von Tenosynovitis in Broilerherden bekannt (187). Darüber hinaus spielen sie eine Rolle bei Darmerkrankungen und werden häufig aus Tieren isoliert, die vom Malabsorptionssyndrom (MAS) betroffen sind (70). Dabei wird ihnen eine wichtige Rolle in der Ätiologie zugeschrieben. Besonders empfänglich sind Tiere in den ersten zwei bis drei Lebenswochen (73). Die Gewichtszunahme ist dabei beeinträchtigt, und es ist ein starkes Auseinanderwachsen der Herden zu beobachten (11, 84, 128). Trotz Erholung von den Krankheitszuständen mit zunehmendem Alter haben die Tiere zum Schlachtzeitpunkt noch immer Untergewicht bei hohen Verwurfraten im Schlachtprozess. Der ökonomische Schaden ist daher erheblich (11).

Neben verbesserten Hygienemaßnahmen hat sich insbesondere die Vakzinierung von Elterntierherden als Hauptbekämpfungsmethode herausgebildet, um die Nachzucht durch vertikal übertragene, maternale Antikörper vor frühen Infektionen mit ARV zu schützen. Bei der Bekämpfung von Tenosynovitis konnten damit gute Erfolge erzielt werden. Jedoch trat das MAS trotz Vakzinierung immer wieder auf; dabei konnten regelmäßig aviäre Reoviren isoliert werden (187).

In Süddeutschland wurden ebenfalls aviäre Reoviren aus Broilern isoliert, die aus vom MAS betroffenen Herden stammten (148). Die Elterntiere waren mit dem Vakzinestamm S1133 und stallspezifischen Stämmen unter Einhaltung verschiedener Vakzineprotokolle gegen Reoviren immunisiert worden.

Daraus leitete sich die Fragestellung ab, ob es sich bei den Isolaten um Varianten handele, die den Impfschutz unterlaufen können.

Als Untersuchungsmethode, die auch feine antigenetische Unterschiede detektieren kann, wurden dazu Kreuzneutralisationstests in Form von Plaquereduktionsassays ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten eine Interpretation hinsichtlich antigenetischer Verwandtschaftsgrade sowie Impfstrategien ermöglichen.

2 Literatur

2.1 Geschichte der aviären Reoviren

Aviäre Reoviren wurden erstmals 1954 aus Hühnern mit chronischen Atemwegserkrankungen isoliert (34). Dieses Agens wurde 1967 in Italien als Reovirus charakterisiert (130) und induzierte 1972 im Tierversuch Tenosynovitis (126). Ende der 50er Jahre wurde ein Synovitis erzeugendes Agens isoliert (124). In Arthritis-Fällen fand man ein virales Agens (125), das 1972 elektronenmikroskopisch als Reovirus identifiziert wurde (198). Bald wurden weltweit Reoviren aus Tenosynovitis-Fällen isoliert. 1976 gab es erste Versuche zur Entwicklung einer Lebendvakzine aus dem Connecticut-Isolat S1133 (189). 1978 wurde in den USA eine erste Reovirusvakzine zugelassen (187).

Ab den späten 60er Jahren fand man auch im Zusammenhang mit Reoviren stehende Darmerkrankungen (86). Außerdem wurden Reoviren im Zusammenhang mit Myocarditis und Hepatitis isoliert.

In den späten 70er Jahren wurden erste Ausbrüche des Malabsorptionssyndroms beschrieben (85), Anfang der 80er Jahre fand man dieses Syndrom weltweit vor. Seit 1981 (191) wurden immer wieder Reoviren aus erkrankten Tieren isoliert. Jedoch kommt es trotz Einbeziehung lokaler Isolate in Vakzineprogramme bis zum heutigen Tag immer wieder zu Feldausbrüchen. Im Jahr 2001 fand man in Polen ein Reovirus-Isolat, das sowohl zentralnervöse Symptome als auch hohe Mortalität auslöste (192). Es wurde serologisch in eine Gruppe von ERS-Stämmen, „enteric reovirus strains“, eingeordnet.

2.2 Klassifizierung von ARV

Aviäre Reoviren sind eine von fünf Spezies – neben Reoviren der Säugetiere (MRV), Nelson Bay Virus, Baboon Reovirus und Reoviren der Reptilien – innerhalb der Gattung Orthoreovirus. Diese wiederum gehört zur zwölf Gattungen zählenden Familie Reoviridae (7).

Obwohl aviäre Reoviren denen der Säuger in vieler Hinsicht ähnlich sind, gibt es doch auch wesentliche Unterschiede, nicht nur das Wirtsspektrum betreffend. Aviäre Reoviren haben keine Hämagglutinations-Eigenschaft (58, 79), wie sie den Reoviren der Säuger zukommt, sind aber im Gegensatz zu diesen fähig zur Induktion von Zellfusion und Synzytiumbildung.

Antigenetisch lassen sie sich nicht wie Reoviren der Säuger in drei klar abgrenzbare Serotypen untergliedern (7). Antiseren gegen aviäre Reoviren neutralisieren diejenigen der Säuger nicht. Das Migrationsmuster der Gensegmente und Proteine in der Gelelektrophorese unterscheidet sich ebenfalls (49).

2.3 Erkrankungen

Zwei große Erkrankungskomplexe bei Hühnern werden mit aviären Reoviren in Verbindung gebracht. ARV gelten als ätiologische Ursache infektiöser Tenosynovitis, außerdem wird ein Zusammenhang von Reoviren und dem Malabsorptionssyndrom angenommen. Weiterhin treten vielfältige Organschädigungen alleine oder kombiniert auf.

Bei vielen Versuchen wurden Isolate in drei Pathogenitätsstufen unterteilt (18, 141, 142). Regelmäßig ist Mortalität bei mit ARV infizierten Tieren beobachtbar, zwischen 8 (142) und 100 % (90, 172), abhängig von Virusstamm, -dosis, Alter der Tiere bei Infektion und Applikationsart. Insbesondere bei sehr jungen Tieren und parenteraler Applikation sind Todesfälle gehäuft zu verzeichnen. Bei hoher Dosierung konnte selbst ein stark attenuierter Vakzinestamm Mortalität hervorrufen (48). Die Mortalität tritt vor allem zwischen drei und neun Tagen nach Infektion auf (48, 98). Aviäre Reoviren konnten jedoch auch aus klinisch gesunden Tieren isoliert werden (115). In Küken oder Embryonen verbracht, waren allerdings auch solche Isolate fähig, Mortalität hervorzurufen (115).

Ein polnischer Reovirusstamm löste zentralnervöse Symptome aus und verursachte hohe Mortalität (186).

2.3.1 Tenosynovitis

2.3.1.1 Allgemeines

In den 70er und 80er Jahren traten gehäuft Beinschwäche, insbesondere Sehnen- und Gelenkentzündungen in Broilerfarmen auf (23, 189, 191, 198). Aus betroffenen Tieren wurde Virus isoliert, das als Reovirus charakterisiert werden konnte und identische Schäden im Tierversuch hervorrief. Der US-amerikanische Stamm S1133 ist vielleicht der bekannteste. Er wurde später häufig – auf unterschiedliche Weise attenuiert - als Vakzinestamm eingesetzt (189).

Jedoch können auch Reoviren, die aus Tieren mit MAS oder Durchfall isoliert wurden, Tenosynovitis auslösen (191). Die Schäden sind häufig nicht auf Sehnen und Gelenke beschränkt: auch andere Organe wie Leber und Herz werden regelmäßig beeinträchtigt (42, 69, 73, 75, 81, 90).

Virusisolationen sind besonders häufig aus dem hypotarsalen Sesambein, den Sehnen der Zehenbeuger (104), der Achillessehne (bis 22 Wochen nach Infektion) (104, 141) und dem Gelenkknorpel des Intertarsalgelenks (48) möglich und resultieren in hohen Virustitern. Deshalb sind insbesondere Sesambein und Gelenkknorpel die Gewebe der Wahl bei diagnostischer Probenentnahme. Weniger häufig und mit geringeren Titern ist Reovirus aus Femurkopf, Gelenktupfern und Synovialmembran des Intertarsalgelenks reisolierbar (74).

In den Gelenken konnte die Induktion eines mit Arthritis korrelierenden Faktors nachgewiesen werden, der zum Spleißen von mRNS proinflammatorischer Chemo- und Cytokine benötigt wird und eventuell eine immunpathologische Rolle bei ARV-Arthritis spielt (35).

Als klinische Symptome werden vor allem Beinschwäche (23, 138), Bewegungsunlust (74, 142, 205) sowie eine verzögerte Gewichtszunahme beschrieben (48, 57, 90, 142, 172). Auch Mortalität kann auftreten, insbesondere im Zusammenhang mit einer Schädigung der Leber (98). Bei Elterntieren war ein Abfall der Eiproduktion und eine reduzierte Schlupffähigkeit bei Bruteiern über einen Zeitraum von sieben bis acht Wochen beobachtbar (23).

2.3.1.2 Pathogenese/ Pathologie

Nach Infektion mit aviären Reoviren entwickeln sich Schäden verschiedenster Art an den Ständern, die am gravierendsten und schnellsten nach Injektion in die Zehenballen (73) oder auch intra-artikulär auftreten. Von einer anfänglichen ödematösen Schwellung an den Zehenballen (35, 138) breiten sich Entzündungsreaktionen über den gesamten Ständer aus und erfassen auch den kontralateralen Ständer (73). Vor allem die Achillessehne und die Sehnen der Zehenbeuger sind betroffen, einschließlich der umgebenden Sehnenscheiden (22, 74, 75). Sehnen und Sehnenscheiden erscheinen verdickt, ödematös bzw. auch vermehrt gefüllt (48, 73, 81, 141). Zwischen den Sehnen und in den Sehnenscheiden findet sich ein gelblich-braunes, gelatinöses Exsudat (73). In schweren Fällen treten ca. drei bis vier Wochen nach Infektion sogar Sehnenfusionen und –rupturen auf (73, 74, 81, 90, 178, 205).

Die Gelenke sind ebenfalls betroffen, insbesondere das Intertarsalgelenk (35, 75, 178). Etwa zwei Wochen nach Infektion findet sich eine vermehrte Füllung (48, 90). Die Gelenkkapseln sind verdickt und die Gelenkhöhle kann mit serös-blutigem Exsudat gefüllt sein (176). Am Gelenkknorpel können – ca. sechs bis acht Wochen nach Infektion – Erosionen auftreten (69, 73, 74, 81, 178). Darauf folgend kann sich eine fibröse Ankylose entwickeln (81). Die normale Entwicklung von Sesambeinen kann ausfallen, und manchmal treten Femurkopffrakturen auf (138, 191).

2.3.1.3 Histologie

An Sehnen und Gelenken können zahlreiche histologische Veränderungen beobachtet werden, wobei die Zeitangaben – Tage oder Wochen nach Infektion bis zum Auftreten der jeweiligen Veränderung – stark variieren.

Das Paratendineum ist verdickt mit Hyperplasie des fibrösen Bindegewebes (176, 177), insbesondere die Achillessehne betreffend. Später erfassen diese Veränderungen auch das Peritendineum (176). Sowohl das Sehngewebe selbst als auch Sehnenscheiden werden mit Makrophagen, Lymphozyten, heterophilen Granulozyten und Plasmazellen infiltriert (73, 75, 141, 176, 177), gelegentlich bilden sich auch lymphoide Follikel (69, 73, 81). Kollagenfasern können irregulär angeordnet sein (69). Zwischen Para- und Peritendineum können sich Adhäsionen

entwickeln (177). Synoviozyten und Fibroblasten der Sehnenscheiden sind hyperplastisch. Teilweise konnte eine Einlagerung von Erythrozyten in Form hämorrhagischer Bänder beobachtet werden (73). In schweren Fällen bildet sich Faserknorpel in oder um Sehnen aus (81). Sehnenscheiden enthalten fibrinöses Exsudat und weisen granulomatöse Veränderungen auf (81).

Die Synovialmembranen der Gelenke, die zottenförmige Auswüchse entwickeln (73, 75, 81), sind sowohl hypertrophisch als auch hyperplastisch (48, 69, 73, 81, 117, 131, 177) und zeigen Infiltration mit Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und heterophilen Zellen (69, 73, 81, 90, 117). Auch petechiale Blutungen können auftreten (69, 81). Die Gelenkhöhlen sind mit Entzündungszellen und abgeschilferten Synoviozyten angefüllt (81, 90). Die Wände von Blutgefäßen sind verdickt (75).

Beobachtbar sind auch erhöhte Osteoklastenzahlen und Periostitis (81); das Knochenmark wird teilweise durch Retikulozyten ersetzt (81). Die Wachstumszonen im proximalen und distalen Tibiotarsus weisen manchmal eine verengte, ungleichmäßige Struktur auf (81).

Bei elektronenmikroskopischen Betrachtungen scheinen subsynoviale Fibroblasten der Ort der Virusreplikation zu sein. Die Zellen bilden cytoplasmatische Vakuolen aus. Lipidansammlungen im Cytoplasma häufen sich. Es zeigen sich ein besonders prominentes granuläres endoplasmatisches Retikulum und rupturierte Mitochondrien. Viele Blutgefäße sind obstruiert und verschlossen (199).

2.3.2 Leber

2.3.2.1 Allgemeines

In vielen Fällen von Reovirus-Infektionen wird – neben anderen Organen – auch die Leber in Mitleidenschaft gezogen. Dabei ist die Mortalitätsrate häufig assoziiert mit dem Schweregrad der hervorgerufenen Lebernekrose (75). Ein Isolat aus einem Tenosynovitis-Fall verursachte im Tierversuch vorwiegend nekrotisierende Hepatitis ohne Tenosynovitis (98). Eine Virusreisolation war in einem Versuch durchgängig bis zu einer Woche nach Infektion möglich, darüber hinaus nur noch manchmal bzw. bei hochpathogenen Isolaten auch weiterhin bis zum Experimentende (142).

2.3.2.2 Pathologie und Histologie

Aufgefunden werden geschwollene (90), gefleckte (176), gelbbraun verfärbte (90) und vergrößerte (98, 186) Lebern mit weißen oder gelblichen Herden (108, 176, 186, 192) sowie mitunter ausgedehnten Hämorrhagien. Teilweise sind petechiale Blutungen sichtbar (75). Bei den Veränderungen handelt es sich um nekrotisierende Hepatitis (98) mit Herden von Koagulationsnekrosen (117, 177). Dabei sind sowohl um die Herde als auch periportal Infiltrate mit mononukleären Zellen, heterophilen Granulozyten, Makrophagen, Plasmazellen und Lymphozyten zu erkennen (90, 176, 177, 186). Auch Fettablagerungen (142) und fettig bzw. hydropisch degenerierende Hepatozyten (69, 98) kommen vor. Viele hyalinisierte Polykaryozyten mit pyknotischen Kernen (98) und vakuolisierte Hepatozyten (69, 117) treten auf. Auf zellulärer Ebene finden sich geschwollene Mitochondrien, reduzierte Glykogengehalte und vermehrt Lipidtropfen im Cytoplasma (98). Daneben zeigen sich auch subkapsuläre eosinophile Nekrosen. Auch Perihepatitis kann vorkommen (142). Nach fünf bis sechs Tagen setzt Regeneration ein (98).

2.3.3 Herz

Häufig gehen Reovirusinfektionen mit Peri- (57, 73, 115, 117, 142, 177, 192), Epi- (42, 176, 177) und Myokarditis (42, 73, 81, 115, 177) einher. Der Herzbeutel kann flüssigkeitsgefüllt sein (186). Infiltration mit mononukleären Zellen, heterophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen wird beobachtet (73, 81, 117, 176, 177), daneben finden sich mitunter Nekroseherde im Myokard (177).

2.3.4 Milz

Regelmäßig wird auch eine Schädigung der Milz im Zusammenhang mit Reovirusinfektionen beobachtet. Dabei sind vor allem hochpathogene Isolate aus der Milz reisolierbar (77, 141, 192), meist aber in eher geringen Titern (83). Die Milzen erscheinen vergrößert und mitunter ödematisiert (81, 90, 186).

Dabei finden sich sowohl eine Hyperplasie des Lymphgewebes (81, 90, 176) mit Ausbildung lymphoider Aggregate und Follikel im Milzparenchym (90) als auch eine Hyperplasie retikulo-endothelialer Zellen (81). Die Stromazellzahl ist erhöht (90, 176). Hyperplastische Stromazellen zeigen vesikuläre Kerne, prominente Nukleoli und teilweise Vakuolen im Cytoplasma (90). Auch Herde von Koagulationsnekrose sind erkennbar (57, 117, 176, 186). Die periarteriolen Scheiden sind häufig verdickt (177).

2.3.5 Bursa Fabricii

Hochpathogene Reovirusisolate sind auch aus der Bursa Fabricii reisolierbar (141, 192). Dabei ist vor allem Bursa-Atrophie zu beobachten (176, 177). Hierbei kommt es intrafollikulär zu Fibrose (81) sowie zum Schwund lymphoider Zellen (81, 117, 141, 165, 177). Im Parenchym finden sich multifokale Infiltrate von heterophilen Granulozyten (117, 177). Auch Nekroseherde wurden schon beobachtet (57).

2.3.6 Thymus

Hochpathogene Isolate sind im Tierversuch aus dem Thymus reisolierbar (141, 192). Im Thymus selbst finden sich entzündliche Infiltrate (176). Die Rindenstärke nimmt ab und die Rinde-Mark-Differenzierung wird unklar (128, 141). Thymuslappen weisen kleine, durchscheinende, rotbraune bis rote Knoten auf (128). In Rinde und Mark geht die Zahl der Lymphozyten zurück (141).

2.3.7 Darm

Infektionen mit Reovirus aus Tenosynovitis- und Malabsorptionssyndrom-Fällen können eine Darmschädigung zur Folge haben. An dieser Stelle wird nur auf die Schäden eingegangen, die aus einer reinen, experimentellen Reovirus-Infektion resultieren. Das Malabsorptionssyndrom wird gesondert behandelt.

Das Ausmaß der Schäden ist dabei abhängig von der Virulenz des jeweiligen Isolats. Etwa eine Woche nach Infektion tritt Regeneration ein (165). Bis dahin ist Virus aus dem gesamten Darm inklusive der Caecaltonsillen isolierbar, später seltener (72, 77, 141, 142, 192). Höchste Titer aus Kloakentupfern ergeben sich ein bis fünf Tage nach Infektion (83). Es werden erweiterte, blasse Dünndärme mit wässrigem oder mukösem Inhalt vorgefunden (165). Eine Atrophie der Darmzotten (138, 142) und Hypertrophie der Lieberkühn'schen Krypten kann beobachtet werden (142). Das Zottenepithel unterliegt einer vakuolären bis ballonierenden Degeneration (2, 165). Hierbei kann sich das Epithel vollständig von der Zottenspitze ablösen (165). Hauptsächlich betroffen sind Jejunum und Ileum (165). Zusätzlich ist eine Infiltration der Lamina propria mit Lymphozyten beobachtbar (138, 142) sowie eine Hyperplasie lymphoiden Gewebes in den Caecaltonsillen (81).

2.3.8 Pankreas

Nach Infektion mit Reoviren ist Virus teilweise auch aus dem Pankreas reisolierbar, abhängig vom Isolat und über einen Zeitraum von etwa vier bis 14 Tagen nach Infektion (73, 142, 192). Das Pankreas kann blass aussehen und kleiner erscheinen als bei uninfizierten Tieren (83). Manchmal tritt Pankreasnekrose auf (176).

2.3.9 Ösophagus und Magen

Mitunter kann Reovirus aus Ösophagus, Drüsen- und Muskelmagen wenige Tage nach Infektion reisoliert werden, allerdings mit meist eher geringen Titern (83, 104). Der Drüsenmagen kann dabei vergrößert sein (138) und sein Epithel Nekroseherde aufweisen (57). Auch kann es dort zu einer Hyperplasie des Lymphgewebes kommen (81).

2.3.10 Nieren

Im Zusammenhang mit Reovirusinfektionen (77, 83, 192), jedoch auch bei klinisch gesunden Hühnern (115) konnte Virus (re-)isoliert werden. Selten wurden Nephritis oder Hämorrhagien in der Niere beobachtet (57).

2.3.11 Geschlechtsorgane

Ohne dass diese Auffälligkeiten aufwiesen, konnte Reovirus vier Tage nach Infektion aus allen weiblichen Geschlechtsorganen reisoliert werden, aus dem Eileiter z.T. auch noch zwei Wochen nach Infektion (104).

2.3.12 Blut und Knochenmark

Sowohl aus Blut als auch aus Knochenmark (195) konnte Reovirus nach Infektion isoliert werden, dabei aus Erythrozyten erstmals 24 Stunden nach Infektion mit einem Peak 30 Stunden nach Infektion und bis zu fünf Tage lang, aus dem Plasma ebenfalls bis fünf Tage nach Infektion. Die Erythrozyten waren allerdings nicht gewaschen worden. Aus mononukleären Zellen konnte Virus bis sieben Tage nach Infektion reisoliert werden. Die Virämie erschien dabei vor allem plasma-assoziiert zu sein und bis zu zehn Tage nach Infektion anzuhalten, teilweise assoziiert an mononukleäre Zellen (83).

2.3.13 Respirationstrakt

Aviäre Reoviren wurden erstmals aus dem Respirationstrakt isoliert (34). Immer wieder ist Reovirus nach Infektion aus der Mukosa und Submukosa der Trachea (77, 104, 141, 142), dem Bindegewebe der Nasenmuschel (104), aus Larynx (104), Luftsäcken (104) und Lunge (77, 104) reisolierbar. Teilweise wird Aerosacculitis beobachtet (23, 142). Die Lunge kann dunkelrot verfärbt sein und eine Infiltration mit

heterophilen Granulozyten und Lymphozyten intralobulär sowie in peribronchialen Lungenbezirken aufweisen (77).

2.3.14 Gehirn und Nervensystem

In einer älteren Studie mit einem arthritisproduzierenden Reovirus fanden sich eine Woche nach Infektion perivaskulär Lymphozytenansammlungen im Gehirn (81). In den Niederlanden wurde ein Reovirus-Stamm aus Polen beschrieben, der zentralnervöse Symptome auslöste und von Tag drei bis zehn nach Infektion aus dem Gehirn reisolierbar war. Dabei konnte Antigen im Plexus chorioideus, in einem Spinalganglion und im Bindegewebe um den Ischiasnerv nachgewiesen werden, was an den Serotyp T1 von Reoviren der Säuger in Mäusen erinnert (185).

Veränderungen im Gehirn umfassten dunkelrote Areale im kaudalen Teil der Großhirnhemisphären. Perivaskulär fanden sich Gliose-Herde. Windungen des Plexus chorioideus erschienen von Kongestion erfasst. Im anhängenden Bindegewebe eines Spinalganglions fanden sich Entzündungserscheinungen, innerhalb des Ganglions Gliazellaggregate und Infiltration mit mononukleären Zellen (186).

2.3.15 Schäden an bebrüteten Hühnereiern

Nach Beimpfung bebrüteter Hühnereier tritt – meist ein bis sieben Tage nach Infektion – Mortalität ein (58, 138). Der Zeitpunkt des Absterbens ist dabei mit der verwendeten Virusdosis korrelierend (72, 172). Bei Dottersackbeimpfung sterben die Embryonen schneller ab als bei Beimpfung über die Allantoishöhle oder die Chorioallantoismembran (58, 138, 172). Während eine Studie hochvirulente und weniger virulente Isolate anhand der bebrüteten Eier unterscheiden konnte (138), fanden andere keine Unterschiede vor (142).

Die Embryonen erscheinen insgesamt hämorrhagisch (42, 58), teilweise gelblich verfärbt (43) und leicht verzwert (42, 114, 115). Die Chorioallantoismembran ist gräulich verdickt (191) und nekrotisch (58, 115), es finden sich hämorrhagische Stellen (114), gräulichweiße Pocken (114, 178) und gestaute, gewundene Blutgefäße

(114, 115). Die Lebern weisen gelblich-weiße Nekroseherde auf (43, 58) und erscheinen grünlich verfärbt (114, 115). Teilweise treten Riesenzellen auf (43). Die Endothelzellen der Sinusoide erscheinen geschwollen (43), im Lumen der Sinusoide finden sich heterophile Granulozyten, Monozyten und Kupffer-Sternzellen (43), um die Leberpforte auch vermehrt eosinophile Granulozyten (115). Die Gallengänge beinhalten Zelltrümmer (115). Die Milz erscheint vergrößert (114, 115) mit Zellnekrosen, Riesenzellbildung und Infiltration mit eosinophilen Granulozyten (43). Der Drüsenmagen weist eine Hyperplasie der Epithelzellen auf (58) sowie Infiltration mit heterophilen Granulozyten, letzteres auch das exokrine Pankreas, das Myokard sowie intralobulär die Lungen (43). Es kann Perikarditis auftreten (114, 115).

2.3.16 Malabsorptionssyndrom

2.3.16.1 Allgemeines

Seit den 80er Jahren tritt vor allem in Broilerfarmen ein Krankheitskomplex auf, der mit verschiedenen Namen belegt wird: Malabsorptionssyndrom, Runting-Stunting-Syndrom, Helikopterkrankheit, Brittle Bone Disease oder Pale Bird-Syndrom (105). Der Zustand ist dadurch gekennzeichnet, dass die Herden stark auseinanderwachsen (11, 84, 128) und die Gewichtszunahme deutlich verringert ist (84, 105, 106, 143, 163, 164, 213). Die Tiere fressen Einstreu, die Kloake ist verschmutzt (46). Es findet sich unverdautes Futter im Kot. Dabei werden gelblich-orange, mukoide Exkremente ausgeschieden (45, 84). Viele Tiere haben ein pralles Abdomen (11). Mitunter sind die Mortalitätsraten hoch. Auch Osteoporose kann auftreten (105). Das Umfiedern vom juvenilen zum Adultgefieder ist verzögert, die Schwingen bilden sich nur unregelmäßig und ungleichmäßig aus (11, 45, 84, 105, 143, 163, 164). Insgesamt wirken die Tiere blass und wenig pigmentiert (45). Auch nach Erholung haben die Tiere zum Schlachtzeitpunkt immer noch Untergewicht, sodass große ökonomische Verluste eintreten (11). Im Plasma betroffener Tiere findet sich eine erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie eine erniedrigte Karotenoid-Konzentration (105).

2.3.16.2 Ätiologie

Das Syndrom ist im Tierversuch durch orale Gabe von Darmhomogenisaten erkrankter Tiere reproduzierbar (4, 11, 84, 106, 135, 163, 213). Bereits dabei kann die Ausprägung allerdings unterschiedlich stark sein (164). Umstritten ist jedoch, welcher Erreger hauptverantwortlich für die Krankheitszustände ist. Eine Vielzahl von Bakterien und Viren konnte in Darmhomogenisaten erkrankter Tiere aufgefunden, wenn auch nicht immer eindeutig bestimmt werden: Adenoviren (4), aviäres Nephritis-Virus (45, 135), Enterovirus-612 (45), IBV (infektiöse Bursitis auslösendes Virus) (106), Bakteriophagen (106), enterovirus-ähnliche Partikel (37, 103, 164), Enterokokken (106, 135), *Staphylococcus cohnii* ssp. *urealyticum* (106), *Bacillus licheniformis* (106), verschiedene *E.coli*-Stämme (106, 166), *Proteus mirabilis* (106), Clostridien (106, 135), *Bacteroides fragilis* (106) sowie auch Protozoen (45). Aufgefundene Bakterien zählen jedoch überwiegend zur normalen Darmflora. Bakteriophagen gelten ebenfalls als apathogen (106).

Sehr häufig konnten Reoviren aufgefunden oder auch isoliert werden (4, 45, 46, 106, 128, 135, 164, 166). Jedoch lösten Reovirus-Isolate im Tierversuch meist zwar eine verzögerte Gewichtszunahme und Darmschädigungen aus, nicht jedoch das Syndrom in seiner vollen Ausprägung (2, 4, 84, 106, 138, 158, 165, 176). Für ein aus Polen stammendes Isolat, das in eine Gruppe von „enteric reovirus strains“ eingeordnet wurde, wurde allerdings die Induktion des Malabsorptionssyndroms beschrieben (192).

In anderen Versuchen konnten weder Bakterien (106, 166) noch aviäres Nephritis-Virus oder Chicken Anemia Agent das Malabsorptionssyndrom voll induzieren, der Effekt war sogar geringer als bei Reovirus (135, 158). Enterovirus-ähnliche Partikel fanden sich beim Vergleich verschiedener Darmhomogenisate nicht in demjenigen, das die schwersten Schäden hervorrief (164).

Es erscheint daher wahrscheinlich, dass verschiedene Faktoren zu diesem Syndrom beitragen und Reoviren hier eine Trigger-Rolle spielen, wobei einzelne hochpathogene Isolate auch alleine schwere Darmschäden auslösen können.

2.3.16.3 Pathologie

Verschiedene Organe werden in betroffenen Tieren verändert vorgefunden. Die Darmlängen sind größer als bei gesunden Tieren (135), die Därme enthalten teilweise unverdautes Futter und gelblich-orangen Schleim (45). Dünndärme sind blass (45, 164) mit geschwollenen Wänden (143), und Dün- und Blinddärme sind häufig mit wässrigem Inhalt gefüllt (46, 143). Der Drüsenmagen kann vergrößert (45) und ödematös sein (164). Die Leber ist verfärbt und entzündlich verändert, die Gallenblase erweitert (45). Das Pankreas weist teilweise dünnere Lappen auf und ist kleiner als bei gesunden Tieren (135, 164). Verschiedene Knochenveränderungen können auftreten: Femurkopfnekrose, Fraktur des Femurhalses, Dyschondroplasien der Tibia und verbogene Sterni (135, 164).

2.3.16.4 Histologie

Am charakteristischsten sind die Veränderungen im Dünndarm, vor allem im Jejunum und Ileum. Die Darmzotten können atrophiert, verkürzt und fusioniert sein (45, 46, 84, 135, 163, 164, 213). Enterozyten unterliegen teilweise einer vakuolären Degeneration (84, 163, 164, 213) und weisen cytoplasmatische Einschlüsse (Virusaggregate) sowie vermehrt Vakuolen auf (37).

Die Lamina propria zeigt eine zunehmende Zahl von Fibroblasten, CD8+-T-Zellen (cytotoxische T-Zellen) (163), weitere Lymphozyten, Makrophagen und heterophile Granulozyten (37, 135, 163, 164, 213). Die Lieberkühn-Krypten sind dilatiert (45, 106, 213), vertieft und cystisch verändert (37), das Kryptenepithel hyperplastisch (163, 164), teilweise einer ballonierenden Degeneration unterliegend (46) und mit zahlreichen intraepithelialen Leukozyten durchsetzt (45, 46). Das Lumen der Krypten und Zysten, das mitunter keinen Kontakt zum Darmlumen mehr besitzt (135), ist angefüllt mit Entzündungszellen, abgeschilferten degenerierenden oder nekrotischen Epithelzellen, Mukopolysacchariden und Zelltrümmern (37, 45, 46, 84, 135, 163). Kleine Zysten in den Lieberkühn-Krypten sind umgeben von epithelialen Zellen und Myofibroblasten, jedoch nicht von einer Basalmembran (37); große Zysten weisen kuboidale bis squamöse Epithelzellen mit Basalmembran auf, darunter liegen Fibroblasten, Kollagenfasern und nur wenige Drüsenzellen (37, 135). Später

verschwinden viele Krypten ganz; das Darmgewebe regeneriert sich ab etwa zwei Wochen nach Infektion (84, 213).

Im Drüsenmagen finden sich degenerierte, cystische Drüsen sowie Infiltrationen mit Entzündungszellen (164).

Die Leber enthält zentrolobuläre Nekroseherde (45), die Gallengänge sind hyperplastisch (45). Es finden sich Anzeichen für Pericholangitis (45).

In Niere und Pankreas treten interstitielle Infiltrate von Lymphozyten auf (84, 106). Letzteres kann noch andere Veränderungen zeigen: Azinuszellen sind nekrotisch und die Lumen der Azini erweitert. Es kann Fibroplasie auftreten und Zymogengranula können verschwinden. Die Ausführungsgänge sind irregulär gestaltet, etwa in Form vieler kleiner Gänge; sie können erweitert oder auch obliteriert sein. In ihrem Lumen, dessen Epithelzellen nekrotisch sein können, finden sich heterophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten sowie Zelltrümmer (128, 135, 164). Pankreasveränderungen wurden vor allem bei Feldausbrüchen, kaum bei experimenteller Infektion beobachtet (135).

In der Bursa Fabricii kann das Lymphgewebe zugunsten von Bindegewebe stark zurückgedrängt sein (135, 164), ebenso im Thymus. Im Mark finden sich degenerierende Zellen und Zelltrümmer (135, 164).

Irregulär gewachsene Federn weisen in der Pulpa vermehrt heterophile Granulozyten und Makrophagen auf (135). Die Parathyreoidea kann hypertrophiert sein (135).

Eine Osteodystrophie des Tibiotarsus kann auftreten, entweder in Form einer Verbreiterung der Proliferationszone mit Fehlausrichtung der Knorpelsäulen in der Hypertrophiezone oder aber einer Verbreiterung der Hypertrophiezone mit gleichmäßigen Knorpelsäulen (84, 135, 164).

2.4 Epizootiologie, Immunologie und Vakzinierung

Aviäre Reoviren können sowohl horizontal (19) als auch vertikal (40, 189) übertragen werden. Die Übertragung auf Kontakttiere ist noch Monate nach initialer Infektion möglich (19). Dabei können ARV im Gewebe inokulierter Hühner persistieren (108). Die Empfänglichkeit für ARV ist dabei altersabhängig: je älter die Tiere bei Kontakt mit dem Erreger sind, desto geringer sind die Gewebeschäden, desto seltener die Virusisolationen und desto größer die Resistenz (73). Dies kann damit

zusammenhängen, dass das Immunsystem bei sehr jungen Tieren noch nicht vollständig ausgereift ist. Beispielsweise war nach Infektion von SPF-Hühnern am ersten Lebenstag keine intestinale IgA-Antwort messbar, bei Infektionen mit sieben Tagen oder drei Wochen jedoch stieg der intestinale IgA-Titer sehr stark an (111).

Aviäre Reoviren wurden als immunsuppressiv beschrieben. Dies betraf sowohl die humorale als auch die T-Zellantwort (154). In einer frühen akuten Phase zeigten T-Zellen in der Milz mangelnde Proliferation nach Stimulierung durch Mitogene, was sich aber nach sieben bis zehn Tagen wieder gab. Es wird vermutet, dass nach einer Infektion „geprimte Makrophagen“ die T-Zell-Mitogenese sowohl durch gesteigerte NO-Produktion (NO: Stickstoffmonoxid) als auch durch Faktoren wie aktivierten Faktor TGF- β (transforming growth factor- β) inhibieren (154). Andere Autoren beschrieben, dass Makrophagen – abhängig vom Virusstamm – produktiv infiziert werden können (123, 171) und möglicherweise sogar eine bevorzugte Zielzelle darstellen (123).

Eine Immunsuppression wurde jedoch nicht immer beobachtet. In einem Versuch mit verschiedenen Vitaminmangeldiäten hatte eine Reovirusinfektion alleine keinen nachteiligen Effekt auf die Immunkompetenz von Eintagsküken acht Wochen nach Infektion. Die Immunkompetenz war dabei mit Hilfe der Kehllappen-Reaktion auf das Mitogen Phytohemagglutinin P, auf ein Proteinderivat von Rindern nach Tuberkulin-Sensitivierung sowie der Antikörperproduktion gegen Schaf-Erythrozyten gemessen worden (19).

Möglicherweise ist ARV-induzierte Immunsuppression temporär begrenzt (109).

Wenige Untersuchungen beschäftigen sich mit dem zeitlichen Ablauf des Auftretens von Zellen des Immunsystems nach Infektion mit MAS-Homogenisaten. In der Synovialmembran sind zwei bis sechs Tage nach Infektion vermehrt CD8⁺-Zellen perivaskulär und in oberflächlichen Arealen der Synovialmembran zu beobachten. Acht bis 14 Tage nach Infektion sind sowohl CD4⁺-als auch CD8⁺-Zellen vermehrt vorhanden, es gibt eine starke Infiltration mit Lymphozyten sowie Aggregate von T-Zellen und IgM-produzierenden Plasmazellen. Nach 14 Tagen p.i. (post infectionem) finden sich CD8⁺-Zellen in mittelgroßen bis großen Aggregaten sowie Ansammlungen von CD4⁺- (T-Helferzellen) und Plasmazellen (163).

Bei einem Vergleich zweier Broilerlinien (Cornish und White Plymouth Rock) nach Inokulation mit MAS-Homogenisaten fanden sich bei letzterer deutlich mehr CD8⁺-Zellen in der Lamina propria des Dünndarms (163).

Aviäre Reoviren wirken außerdem als Interferoninducer (32, 202), allerdings war Interferon nur im Serum zwölf Stunden nach Infektion und in der Lunge 24 und 72 Stunden p.i. in größeren Titern nachweisbar, nicht jedoch in anderen Organen (32).

In einer Studie wurden antinukleäre Antikörper in Form von IgM und IgG gefunden, deren Titer zehn Wochen nach Infektion am höchsten war. Hierbei handelt es sich um Indikatoren für Autoimmunreaktionen (131).

Eine attenuierte Lebendvakzine mit dem heute klassischen Impfstamm S1133 wurde 1983 entwickelt, die bei Challenge Schutz vor Tenosynovitis bot und 235 Ei- sowie 100 Zellpassagen auf Fibroblasten, davon 65 bei 32 °C, umfasste (190). Auch andere attenuierte Vakzinen wurden entwickelt. Bei einem Versuch mit der 73. bzw. 175. Eipassage des Stammes S1133, über Augentropfen bzw. Trinkwasser verabreicht, zeigte sich, dass die Nachzucht aus Eiern der ersten Woche nach Vakzinierung nicht gegen Challenge geschützt war, wohl aber aus später gewonnenen Bruteiern. Die Neutralisationsreaktion in vitro entsprach dabei etwa dem Grad der Immunität in vivo gegen Challenge am ersten Lebenstag. Dabei führte die 175. Passage zu geringerer und später einsetzender Immunität als die 73. Eipassage (133).

Ein Versuch mit vier modifizierten Lebendvakzinen ergab, dass bei drei von vier Vakzinen über den ganzen Versuch hinweg Virus aus Sehnen isoliert werden konnte, wenn Eintagsküken vakziniert wurden, jedoch nicht bei Vakzination im Alter von einer Woche. Nach Challenge konnte jedoch in allen Gruppen Virus isoliert werden (107).

Applikation von kommerziellen S1133-Vakzinen in Sprayform ergab etwa 40 % Protektion, gemessen an Morbidität, Mortalität, makroskopischen Schäden und Gewichtsentwicklung. Die Resistenz stieg mit der Zeit, die zwischen Vakzinierung und Challenge verstrich. Bei SPF-Eintagsküken (SPF: spezifisch pathogenfrei) einer Legerasse betrug die Immunität 100 %, bei Broilerküken aus kommerziellen Herden jedoch nur 60-80 % (38, 39).

Auch die Vakzinegabe in bebrütete Hühnereier mit Lebendvakzinen wurde untersucht. Während die Schlupffähigkeit kaum bis gar nicht beeinträchtigt wurde, lag die Sterblichkeit junger Küken bei 17 %. Die Protektion überlebender Küken gegen Challenge lag bei 90 %. Geringere Sterblichkeit (0 – 3,4 %), aber auch geringere Protektion (70 – 77 %) gegen Challenge wurde mit Hilfe von Komplexvakzinen aus Virus- und Antiserumkombinationen erzielt (54, 55, 56).

Eine inaktivierte Ölemulsionsvakzine, eingesetzt bei Broiler-Elterntieren, ergab hohe und einheitliche Antikörpertiter, wirkte sich positiv auf die Gewichtszunahme der Nachzucht aus und hatte verminderte Produktionskosten und Verwurfraten beim Schlachtvorgang zur Folge (30).

Ein Versuch mit einer Kombination aus Lebend- und inaktivierter S1133-Vakzine schützte die Nachzucht vor klinischen Symptomen und Todesfällen sowohl bei Challenge mit homologen als auch heterologen Stämmen, jedoch war das Ausmaß der Kreuzprotektion verschieden (203).

Beim Vergleich einer kommerziellen ARV-Lebendvakzine und einer kommerziellen inaktivierten Vakzine stieg der Antikörpertiter nur nach Vakzinierung mit inaktivierter Vakzine zufriedenstellend an. Die mit Lebendvakzine geimpften Tiere zeigten Durchfall bis 14 Tage nach dem Impfen, eine verringerte Schalenqualität sowie erhöhte embryonale Mortalität der Bruteier in der zweiten und vierten Woche nach Vakzinierung. Auch war die Nachzucht weniger schlupffähig. Im Gegensatz zur Nachzucht von Tieren, die mit inaktivierter Vakzine geimpft wurden, zeigte die Nachzucht von Tieren, die eine Lebendvakzine erhielten, Serokonversion (40).

Ein Versuch der Vakzinierung mit rekombinantem ARV-Protein σC (206), das dreimal oral in drei aufeinander folgenden Wochen gegeben wurde, führte zu 64 % (bei 125 μg σC / Huhn) bzw. 91 % Protektion (bei 250 μg σC / Huhn) . Protektion wurde hierbei definiert als fehlende Schwellung der Zehenballen. Im Vergleich dazu führte eine kommerzielle Vakzine zu 82 % Protektion gegen Challenge. Protein σC erwies sich dabei als stabil im Gastrotintestinaltrakt. Aufgrund der erheblich verschiedenen Rahmenbedingungen sind die Verfahren nicht direkt vergleichbar. Gebräuchliche Kombinationen aus attenuierten Lebend- und inaktivierten Vakzinen mit klassischen Impfstämmen wie S1133 und stall- und regionspezifischen Isolaten bieten in der Regel keinen vollkommenen Schutz für die Nachzucht.

Versuche, die Nachzucht direkt zu vakzinieren, sehen sich mit der Problematik maternalen Antikörper und deren Interferenz mit applizierten Impfstoffen konfrontiert und zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Während bei einer Applikation von Lebendvakzine in Sprayform die Protektion von Broilern mit maternalen Antikörpern deutlich unter der von SPF-Legehühnern lag (39) und bei Gabe von Antigen-Antikörper-Komplexen in ovo ebenfalls eine deutlich geringere Protektion bei Eiern mit maternalen Antikörpern zu verzeichnen war (54), verhinderten maternale Antikörper nicht die Protektion von Broilern durch eine stark attenuierte, apathogene

S1133-Lebendvakzine (190). Wurden B-Zellen mit Cyclophosphamid aus Küken eradiert und die Küken frühzeitig mit einer Lebendvakzine geimpft, reichte die zellvermittelte Immunität aus, um auch Broiler mit maternalen Antikörpern vor Challenge zu schützen und keine Virusisolationen aus Organen nach Challenge zur Folge zu haben. Die antigenspezifische T-Zell-Antwort scheint demzufolge größtenteils unbeeinflusst durch passive Antikörper zu sein (193). Vakzinevirus konnte bei Broilern mit maternalen Antikörpern nach vier bis fünf Wochen post vaccinationem detektierbare Antikörpertiter induzieren, die mindestens 70 Tage persistierten, obwohl drei Wochen nach Vakzination keine messbaren Titer vorhanden waren (194).

Der Einfluss maternaler Antikörper auf die Empfänglichkeit bebrüteter Hühnereier gegen hochvirulente ARV aus Tenosynovitis erwies sich als sehr gering. Alle Eier waren ungefähr gleich empfänglich, daher wurde als unmöglich angesehen, die Immunkondition von Elterntieren durch Challenge an bebrüteten Eiern abzulesen (174).

2.5 Eigenschaften aviärer Reoviren

Aviäre Reoviren sind ikosahedral (58, 79, 198), besitzen ein Doppelkapsid (58) und weisen keine Lipidhülle auf (88, 198), sind daher auch stabil gegen Chloroform (58, 110, 189). Ihr Durchmesser wird mit 68 – 75nm angegeben (58, 114, 121, 167, 191). In der Caesiumchlorid-Gleichgewichtsdichtezentrifugation haben sie eine Dichte von 1,37 g/ml (167, 191). Als Nukleinsäure besitzen sie doppelsträngige, segmentierte RNS (Ribonukleinsäure) (88, 121, 150, 167), und dementsprechend unempfindlich sind sie gegenüber Idoxuridin (58, 79, 189). Sie sind bis zu sechs Stunden hitzestabil bei 56 °C (58), stabil gegen Äther, Natrium-Deoxycholat und gegenüber pH3 (1, 79, 110, 189).

2.6 Genom

2.6.1 Eigenschaften

Das Genom besteht aus zehn Segmenten doppelsträngiger RNS (149, 150, 167), die in drei Größeklassen eingeteilt werden: L (large), M (medium) und S (small) (18, 49, 139).

Die Molekulargewichte liegen für die L-Segmente bei $2,4 - 2,42 \times 10^6$ Da (Dalton) für L1, $2,35 - 2,4 \times 10^6$ Da für L2, $2,25 - 2,3 \times 10^6$ Da für L3, die der M-Segmente liegen bei $1,52 - 1,6 \times 10^6$ Da (M1), $1,42 - 1,45 \times 10^6$ Da (M2) und $1,34 \times 10^6$ Da (M3), wohingegen die der vier S-Segmente $0,98 - 1,1 \times 10^6$ Da (S1), $0,7 - 0,74 \times 10^6$ Da (S2), $0,65 - 0,69 \times 10^6$ Da (S3) und $0,62 - 0,64 \times 10^6$ Da (S4) betragen (49). Hinzu kommen adenosin-reiche Oligonukleotide (167).

Bis auf eines sind alle Segmente monocistronisch, das S1-Segment jedoch ist tricistronisch (9). So kodieren die L-Segmente die Proteine λ A - C, die M-Segmente die Proteine μ A, μ B und μ NS, die Segmente S2 - S4 die Proteine σ A, σ B, σ NS und das Segment S1 mit dem ersten Open Reading Frame (ORF) das Protein p10, mit dem ORF2 das Protein p17 und mit ORF3 das Protein σ C (9, 100, 146, 195).

2.6.2 Differenzierung

Unterschieden wurden verschiedene Isolate zunächst anhand ihres Mobilitätsmusters in der Gelelektrophorese, dem Elektropherotyp ihrer RNS-Segmente. Hierbei erwiesen sich die Segmente des Genoms als stark polymorphisch beim Vergleich verschiedener ARV-Stämme (18, 50, 139) und als deutlich unterscheidbar vom Migrationsmuster der Segmente von Reoviren der Säugetiere, insbesondere anhand des M3- und S1-Segments (49, 149, 167).

Dabei konnte keine Korrelation zwischen Elektropherotyp und Sero- oder Pathotyp erkannt werden (18, 50, 63, 207).

Auch Isolate aus demselben geographischen Gebiet zeigten nicht zwingend ein einheitliches Migrationsmuster (139), wenn auch teilweise eine geringere Variabilität festgestellt werden und einem Elektropherotyp ein lokaler Ausbruch zugeordnet werden konnte (50). Seit Einführung modifizierter Lebendvakzinen gegen Reoviren

konnte ein Anwachsen elektrophoretisch unterschiedlicher Stämme beobachtet werden (139).

Nicht alle Segmente variieren gleich stark; die variabelsten sind S1 und M3 (18), wohingegen sich andere Segmente beim Vergleich von Isolaten weniger stark unterscheiden: L1, L3 oder S4 (50).

Nach wiederholter Eipassage oder Passage in Zellkulturen konnte keine Variation des Migrationsmusters entdeckt werden (49, 50), wenn auch bei Hybridisierungen Verschiedenartigkeiten einzelner Segmente erkennbar waren (64), insbesondere der Segmente S1 und M3, die frühen Passagen betreffend, später dann auch der Segmente M2, S2 und S3, hier vor allem bei kälteadaptierten Stämmen (63).

Eine andere Möglichkeit, Unterschiede zwischen ARV-Stämmen und -Isolaten zu detektieren, ist die Amplifikation mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) mit anschließendem Verdau durch Restriktionsenzyme und Vergleich der Fragmentlängen. Alle getesteten ARV-Isolate hatten verschiedene Cleavage-Muster und konnten anhand des σ C-kodierenden Gens in vier Gruppen eingeteilt werden. Das σ NS-kodierende Gen auf dem Segment S4 wies demgegenüber eine größere Variabilität auf (96).

Auch die Methode des Oligonukleotid-Mappings kam bei Differenzierungsversuchen zur Anwendung, wobei sieben Isolate aus MAS-Fällen mit dem Vakzinestamm S1133 verglichen wurden. Eine Korrelation zu Serotyp oder Elektropherotyp konnte nicht festgestellt werden, jedoch ließen sich die Isolate in eine Gruppe einteilen, die aus dem Vakzinestamm hervorgegangen sein könnte, und eine weitere mit größeren Unterschieden (137).

2.6.3 Sequenzierung

In den letzten Jahren wurde es möglich, einzelne Segmente und Protein-kodierende Gene zu amplifizieren, zu klonieren und zu sequenzieren. Die L-Segmente waren bisher noch von geringerem Interesse. Für L1 konnte beim Vergleich von 12 ARV-Stämmen 92 % Sequenzübereinstimmung festgestellt werden, für L3 91 % Sequenzübereinstimmung (3).

Die M-Segmente haben folgende Charakteristika: M1 umfasst 2283 Basenpaare mit einem ORF zwischen Nukleotid 13 – 2211. Es sind drei Evolutionslinien erkennbar,

und beim Vergleich verschiedener Stämme liegen 87 – 100 % Sequenzübereinstimmung vor (122, 170). Das M2-Segment beinhaltet 2156 (122) bzw. 2158 (170) Basenpaare mit einem ORF zwischen Nukleotid 30 – 2060. Fünf Evolutionslinien wurden beschrieben; es herrschen 73 – 99 % Sequenzübereinstimmung, womit es zum variabelsten M-Segment wird. Segment M3 umfasst 1996 Basenpaare, sein ORF liegt zwischen Nukleotid 25 und 1932 (170) bzw. 1929 (183). Wie bei den anderen M-Segmenten steht sein Startcodon für die Translation in einem optimalen Kontext: sowohl an Position -3 als auch an Position +4 findet sich eine Purinbase. Zwei evolutionäre Linien werden beschrieben, wie bei den anderen Segmenten ist jedoch keine Korrelation zwischen Sero- und Pathotyp erkennbar. Bei Koinfektionen mit verschiedenen ARV-Stämmen scheinen Segmente untereinander ausgetauscht zu werden. Zwischen verschiedenen ARV-Stämmen herrscht 80 – 99 % Sequenzübereinstimmung. Allgemein sind viele Basensubstitutionen still, d.h. sie ändern nicht die kodierte Aminosäure. Am 3'-Ende der M-Segmente findet sich – typisch für Reoviren – das Basenquintett UCAUC, am 5'-Ende das Sextett GCUUUU (170).

Auch die S-Genomsegmente oder Teile davon wurden mehrfach untersucht. Zunächst zum Segment S1: es beinhaltet drei teilweise überlappende ORFs bei insgesamt 1636 (153) bzw. 1643 (162) Basenpaaren.

ORF1, zwischen Nukleotid 25 und 321, kodiert das Protein p10, ORF2 (Nukleotid 293 – 733) kodiert Protein p17, und das Protein σ C wird durch ORF3 kodiert (Nukleotid 630 – 1610) (9).

Für das p10-kodierende Gen konnten fünf Evolutionslinien gefunden werden, das p17-kodierende Gen wies noch größere Variabilität auf. Beide Gene scheinen sich unabhängig von den σ -Genen entwickelt zu haben. Eine Korrelation zwischen Gensequenzen und Sero- bzw. Pathotyp war nicht feststellbar. In beiden Genen überwiegen synonyme Basensubstitutionen (61).

Anhand des σ C-kodierenden Gens konnten fünf (78) bzw. sechs (95) Genotyp-Cluster gefunden werden. Auch hier war es nicht möglich, Geno- und Pathotyp zu korrelieren. Während US-Isolate und australische Isolate jeweils eng verwandt sind, verteilten sich Isolate aus Deutschland, den Niederlanden oder Taiwan über die Gruppen (78). Die Evolutionsrate des σ C-Gens erwies sich als höher als die der

anderen σ -Gene, zudem dominieren hier nicht synonyme Basensubstitutionen über synonyme (95).

Das S2-Genomsegment umfasst 1325 (211) bzw. 1251 (93) Basenpaare mit einem langen ORF zwischen Nukleotid 16 und 1266 (211). An seinem 3'-Ende befindet sich die typische Sequenz UCAUC, sein 5'-Ende enthält die Sequenz GCUUUUU. Zwei Genotyp-Cluster konnten ermittelt werden (93, 95), wobei eine Korrelation mit Isolationsdatum und geographischer Lokalisation gegeben war (93). Das σ A-kodierende Gen hat eine geringere Variabilität als alle anderen σ -Gene.

Das S3-Segment umfasst 1196 Basenpaare mit einem ORF zwischen Nukleotid 24 – 1124, dessen Startcodon in einem optimalen Kontext mit zwei Purinbasen an den entscheidenden Stellen steht (210). Drei Evolutionslinien konnten gefunden werden (95).

Segment S4 umfasst 1185 Basenpaare mit einem ORF zwischen Nukleotid 17 – 1120, dessen Startcodon in einem starken Initiationskontext steht. Am 3'-Ende des Positivstrangs findet sich die Reovirus-typische Sequenz UCAUC (16). Drei Evolutionslinien wurden beschrieben (95).

Generell entwickeln sich die Gene auf den S-Segmenten unabhängig voneinander, es kommt immer wieder zu Reassortment zwischen einzelnen Linien. Der Genotyp korreliert weder mit der Wirtsspezies noch mit dem Pathotyp. Bei allen σ -Genen mit Ausnahme des σ C-kodierenden Gens werden Basenpaare während der Evolution meist synonym substituiert und folgen damit der Neutralitätstheorie molekularer Evolution (95).

2.7 Proteine

Die Proteine aviärer Reoviren (100, 118, 147, 167) lassen sich in drei Größeklassen unterteilen, die den Größeklassen der Genomsegmente, die sie kodieren, entsprechen. Weiterhin können sie differenziert werden in Strukturproteine, die das Virion aufbauen, und nicht strukturbildende Proteine, meist als „NS“ (non structural) bezeichnet. Zudem gibt es Proteine, die durch posttranslationale Modifikation primärer Translationsprodukte entstehen (118).

Insgesamt werden bislang 15 (182) verschiedene Proteine unterschieden. Die Genomsegmente L1 – L3 kodieren die Strukturproteine λ A, λ B und λ C, die Segmente

M1 – M3 dagegen die Strukturproteine μ A und μ B (100) sowie das nicht strukturbildende Protein μ NS mit seiner Isoform μ NSC (182). Aus Protein μ B gehen durch posttranslationales Cleavage die Proteine μ BC und μ BN hervor (196). Die Gensegmente der S-Klasse kodieren fünf verschiedene Proteine, denn das S1-Segment ist tricistronisch (9) und kodiert sowohl das Strukturprotein σ C als auch die nicht strukturbildenden Proteine p10 und p17. Die anderen S-Segmente sind jedoch monocistronisch und kodieren jeweils ein einziges σ -Protein, nämlich σ A, σ B und σ NS.

Diese Proteine sind zwar bei allen bisher untersuchten ARV-Stämmen vorhanden, unterscheiden sich allerdings je nach Stamm im Elektropherotyp, d.h. der Mobilität auf Elektrophoresegelen. Auf die einzelnen Proteine wird im Folgenden näher eingegangen.

2.7.1 λ -Proteine

Die Proteine mit dem größten Molekulargewicht werden von den drei L-Genomsegmenten kodiert und als λ A, λ B und λ C bezeichnet (100). Die λ -Proteine sind bisher wenig erforscht.

2.7.1.1 Protein λ A

Das glykosylierte (196) Protein λ A besitzt ein Molekulargewicht zwischen 140 und 147 kDa (Kilodalton) (3, 100, 167) und wird vom Gensegment L1 kodiert. Es hat einen Anteil von 12 % an den Proteinen des Virions (147) und bildet hauptsächlich das innere Kapsid (214). Es besteht aus 1293 Aminosäuren und ist bei pH 6,3 – 6,5 isoelektrisch, also leicht sauer. Zwischen verschiedenen ARV-Stämmen bestehen 98 % Sequenzübereinstimmung. Auffällig ist ein zinkbindendes Motiv aus jeweils zwei konservierten Cysteinen und Histidinen. Das Verhältnis zwischen α -Helices und β -Faltblattstrukturen beträgt 1:2 (155). Neben seiner Funktion als Strukturprotein ist bisher keine weitere bekannt.

2.7.1.2 Protein λ B

Das Strukturprotein λ B wird vom Genomsegment L2 kodiert (100), außerdem wird ein Molekulargewicht von 125 – 130 kDa angegeben (167, 100). Es ist Bestandteil des Core sowie des äußeren Kapsid und macht 1 % des Virion aus (147). Zudem war es Ziel eines gruppenspezifisch neutralisierenden monoklonalen Antikörpers (200).

2.7.1.3 Protein λ C

Kodiert wird das Strukturprotein λ C vom Genomsegment L3 (100, 195). Sein Molekulargewicht beträgt zwischen 115 und 120 kDa (3, 100, 147, 167), es macht 9 % des Virion aus (147) und bildet pentamere türmchenartige Strukturen im Core um jede bestehende Fünffachsymmetrieachse (214). Es besteht aus 1285 Aminosäuren und ist isoelektrisch bei pH 5,05 – 5,35, also leicht sauer. Die Sequenzübereinstimmung bei verschiedenen ARV-Stämmen beträgt 95 %, das Verhältnis zwischen α -Helices und β -Faltblattstrukturen liegt bei 1:10. Seine Aminosäurestruktur enthält zwei auffällige Motive: eine Bindungsstelle für ATP/ GTP sowie ein S-Adenosyl-L-Methionin-bindendes Motiv. Aus letzterem lässt sich eventuell eine Methyltransferase-Aktivität ableiten (155).

Nachgewiesen wurde eine Funktion als Guanylyltransferase, die die Capping-Reaktion an mRNA (Messenger-RNA) katalysiert, welche eine Typ-1-Cap-Struktur besitzt. Dazu braucht λ C die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen (Mg: Magnesium); das pH-Optimum dieser enzymatischen Aktivität liegt bei pH 7 – 8,5 (101). λ C ist ein glykosyliertes Protein (196).

2.7.2 μ -Proteine

Die μ -Proteine sind mittelgroße Proteine aviärer Reoviren und werden von den M-Genomsegmenten kodiert (100, 195). Unter ihnen befinden sich sowohl Strukturproteine als auch ein nicht strukturbildendes Protein (118, 147). Eines der drei primären Translationsprodukte der M-Segmente wird posttranslational durch mindestens zwei Cleavage-Schritte verändert (118, 196).

2.7.2.1 Protein μ A

Das vom M1-Genomsegment kodierte Strukturprotein μ A (100) hat ein Molekulargewicht zwischen 79 und 85 kDa (100, 122, 147, 167) und macht etwa 6 % des Virion aus (147). Es befindet sich im Core (100, 147), ist glykosyliert (196) und besteht aus 732 Aminosäuren (122). Sein isoelektrischer Punkt (pI) liegt bei pH 8,0 – 8,4, es ist also leicht basisch. Zwischen verschiedenen ARV-Stämmen bestehen etwa 96 – 100 % Sequenzübereinstimmung.

Seine Struktur setzt sich zu 25 – 27 % aus α -Helices, zu 54 – 56 % aus β -Faltblattstrukturen, zu 11 – 12 % Turns und 8 – 9 % Random Coils zusammen. Auffällig sind A- und B-Motive von ATPasen (122). Eine NTPase-Aktivität ist beschrieben (122, 169), es katalysiert die Hydrolyse der β - γ -Phosphoanhydridbindung aller vier NTPs (Nukleosidtriphosphate), dabei ist ATP (Adenosintriphosphat) das bevorzugteste Substrat und UTP (Uridintriphosphat) das am wenigsten bevorzugte.

Zwei Lysine sind essentiell für seine enzymatische Aktivität, die außerdem abhängig von divalenten Kationen ist. Das pH-Optimum der Enzymaktivität liegt bei pH 5,5 – 6,0, das Temperaturoptimum bei 30 – 40 °C (169).

Dem Protein μ A wird daher eine wichtige Rolle in der viralen RNS-Synthese zugeschrieben (169).

2.7.2.2 Protein μ B

Das μ B-Protein wird vom M2-Genomsegment kodiert (195) und ist dessen primäres Translationsprodukt, aus dem weitere Proteine hervorgehen. Es handelt sich bei ihm wie bei seinen Cleavage-Produkten um Strukturproteine. Zunächst entstehen aus μ B die beiden Proteine μ BC und μ BN (196); μ BC, das das größere Teilstück darstellt und das ursprüngliche Carboxylende des Proteins enthält, wird ein zweites Mal zu δ (Aminoende) und ϕ (Carboxylende) geschnitten (28, 170). Erwähnt wird noch eine weitere Spaltung von μ BC zu δ' (28). Die Cleavage-Schritte erscheinen virusstammunabhängig zu sein (28).

Die Molekulargewichte der μ B-Proteine betragen 70 – 73 kDa für μ B (100, 122, 147, 167), 68 – 70 kDa für μ BC (3, 100) und 5,5 kDa für μ BN (196). Diese Proteine sind Bestandteil des äußeren Kapsids (100, 167).

Das Protein μB besteht aus 676 Aminosäuren (122); zwischen verschiedenen ARV-Stämmen herrscht $\sim 94\%$ Sequenzübereinstimmung (147). Es macht ca. 32% des Virions aus (229) und ist ein Hauptprotein des äußeren Kapsids. Monoklonale Antikörper, die gegen μB gerichtet waren, besaßen jedoch keinerlei Neutralisationsaktivität (152).

Der pI liegt für μB bei $5,2 - 5,5$ und für μBC sowie μBN bei $4,2 - 5,4$ (122, 170). Hingegen unterscheiden sich die beiden Cleavage-Produkte δ und ϕ stark: der pI von δ liegt bei $\sim 4,7$, der von ϕ bei etwa $11,7$ (170).

Die Struktur von μB setzt sich aus ca. 29% α -Helices, $46 - 51\%$ β -Faltblattstrukturen, $8 - 15\%$ Turns und $9 - 11\%$ Random Coils zusammen. Nahe dem Carboxylende liegen Strukturen α -helikaler Coiled Coils (170). μB und μBC sind glykosyliert, μBN ist myristoyliert (196).

2.7.2.3 Protein μNS

Das nicht strukturbildende Protein μNS (119, 147, 195) wird kodiert vom M3-Genomsegment (195) und hat ein Molekulargewicht von $71 - 75$ kDa (122, 147, 182). Es besteht aus 635 Aminosäuren (182) und zwischen den ARV-Stämmen herrscht $\sim 95 - 97\%$ Sequenzübereinstimmung (122, 170). Seine Struktur setzt sich zusammen aus 52% α -Helices, 13% β -Faltblattstrukturen und 30% Random Coils; nahe des Carboxylendes besteht eventuell eine Coiled Coil-Struktur. Es handelt sich um ein leicht saures Protein mit einem pI bei $\sim 5,9$ (122).

Seine Funktion wurde ausführlich untersucht. Es bildet globuläre cytoplasmatische Einschlüsse, in denen vollständige Virionen aus synthetisierten Proteinen zusammengefügt werden (181).

Zwei Isoformen werden beschrieben, wobei nur die größere, μNS , die Fähigkeit besitzt, Proteine zu rekrutieren. Die kleinere, μNSC , entsteht möglicherweise durch interne Initiierung der Translation oder durch Cleavage. Ihr Vorkommen könnte ein Hinweis darauf sein, dass das M3-Genomsegment bicistronisch ist (182).

2.7.3 σ -Proteine

Die σ -Proteine stellen Translationsprodukte der S-Genomsegmente dar (100) und gehören somit zu den kleinsten ARV-Proteinen. Da das S1-Genomsegment zwei weitere Proteine kodiert (9), werden auch diese im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Die Sigma-Proteine sind Strukturproteine (100) mit Ausnahme des nicht strukturbildenden Proteins σ NS (119, 147) sowie der beiden S1-Translationsprodukten p10 und p17 (9).

2.7.3.1 Protein σ A

Das Strukturprotein σ A wird vom S2-Genomsegment kodiert (100) und besitzt ein Molekulargewicht von 39 – 46 kDa (3, 147, 167, 211). Es handelt sich um ein Coreprotein (147, 214) und umgibt dort in Form knopfähnlicher Strukturen die Türmchengebilde aus λ C (214). Es macht ca. 9 % des Virions aus (147). Epitop-Mapping mit Hilfe monoklonaler Antikörper ergab zwei Epitope, das konformationsabhängige Epitop I und das konformationsunabhängige Epitop II (65, 127). Beide sind bei verschiedenen ARV-Stämmen hoch konserviert (127). Das Carboxylende macht ca. $\frac{1}{4}$ des Proteins aus und besteht vor allem aus α -Helices und β -Turns, wohingegen das Aminoende $\frac{3}{4}$ des Proteins umfasst und vor allem aus β -Turns und β -Faltblattstrukturen besteht (65, 95). Es liegt weder glykosyliert noch phosphoryliert vor (196, 211).

Eine Korrelation zwischen der Proteinsequenz von Epitop II und dem Sero- oder Pathotyp des entsprechenden ARV-Stammes war nicht erkennbar (65). Monoklonale Antikörper gegen σ A waren zwar kreuzreaktiv, aber nicht neutralisierend (200).

Sein isoelektrischer Punkt liegt bei \sim pH 6,8 (211). Zwischen den verschiedenen ARV-Stämmen besteht \leq 3,8 % Sequenzdivergenz (95).

Das Protein σ A bindet doppelsträngige RNS (dsRNS) irreversibel (99) und kann damit dsRNS-abhängige Proteinkinasen inhibieren, die eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der intrazellulären Proteinsynthese einnehmen. Wahrscheinlich kann σ A allgemein dsRNS von dsRNS-abhängigen Enzymen abziehen. Es ist somit fähig, einen Interferon-induzierten antiviralen Zustand der Zelle aufzuheben (44). Zudem besitzt σ A eine nichtspezifische Nucleotidyl-phosphatase-Aktivität und hydrolysiert

bei Anwesenheit divalenter Kationen wie Mn^{2+} (Mangan), Mg^{2+} oder Ca^{2+} (Calcium) und einem pH-Optimum von 7,5 – 8,5 alle vier NTPs zu Di- und Monophosphaten sowie freiem Phosphat. Zinkionen dagegen inhibieren das Enzym (212).

2.7.3.2 Protein σB

Das Strukturprotein σB (100), ein Hauptprotein des äußeren Kapsids (28), wird vom S3-Genomsegment kodiert (100, 210) und besitzt ein Molekulargewicht von 36 – 42 kDa (9, 100, 147, 152, 167). Es macht ca. 30 % des Virions aus (147) und ist stark glykosyliert (196). Seine Struktur besteht aus 31 – 32 % α -Helices, 29 % β -Faltblattstrukturen, 19 % Turns und 21 % Random Coils (95, 210). Zwischen den ARV-Stämmen herrscht 0 – 7,6 % Sequenzdivergenz (95).

Beim Zusammenbau neusynthetisierter Virusproteine wird es mit μB und μBC in intrazytoplasmatischen Einschlüssen an das Core als „Coating-Komplex“ angefügt (181).

Monoklonale Antikörper gegen σB besitzen teilweise eine – gruppenspezifische – Neutralisationsaktivität (152).

2.7.3.3 Proteine des S1-Genomsegments

2.7.3.3.1 Protein p10

Das nicht strukturbildende Protein p10 wird vom ersten Open reading frame (ORF1) des S1-Genomsegments kodiert (9). Es besteht aus 95 – 98 Aminosäuren (162) und hat ein Molekulargewicht von 10,5 kDa (9, 162). Sein Aminoende macht die Ektodomäne des Proteins aus, weitere Anteile sind eine Transmembranregion sowie die Endodomäne am Carboxylende (160, 161). Es teilt diese Merkmale mit Fusionsproteinen behüllter Viren (160) und liegt palmitoyliert vor (161). Seine Funktion ist nach der Integration in die Zellmembran der Wirtszelle in der Induktion von Zellfusionen zu suchen, dazu tragen eine konservierte Region der Ektodomäne sowie konservierte Cysteinreste bei, ebenso ein Triglycin-Motiv der Transmembranregion und deren Palmitoylierung. Die Zellfusion kommt nicht durch Paarung von p10 in gegenüberliegenden Membranen zustande. Zwischen den ARV-

Stämmen besteht bis zu 32 % Sequenzdivergenz (61), wobei das Aminoende stärker konserviert ist als das Carboxylende (95).

Eine weitere Funktion ist die Erhöhung der Membranpermeabilität der Wirtszellmembran bei pro- und eukaryotischen Zellen, es wirkt also als Viroporin. Hierbei ist das Aminoende entbehrlich (8).

Interessanterweise ist die p10-induzierte Zellfusion begrenzt durch die schnelle Degradierung von neusynthetisiertem p10. Nach Integration in ER-Membranen (ER: endoplasmatisches Retikulum) wird die Ektodomäne zum Ziel der Degradierung, ein Großteil wird innerhalb von 30 min nach der Synthese abgebaut. Der Degradierung entgehende p10-Proteine akkumulieren an der Zelloberfläche. Gleichzeitig allerdings trägt die Ektodomäne strukturell zur Stabilisierung des Proteins bei.

Die Degradierung erfolgt wahrscheinlich durch eine Zielprogrammierung auf Proteasomen. Sinkt die p10-Degradierung in infizierten Zellen, steigt die Synzytium-Formierung an (159).

2.7.3.3.2 Protein p17

Das nicht strukturbildende Protein p17 wird vom ORF2 des S1-Genomsegments kodiert (9) und besteht aus 146 Aminosäuren (96). Zwischen ARV-Stämmen besteht 0 – 43 % Sequenzdivergenz. Seine Struktur setzt sich aus 27 % α -Helices, 45 % β -Faltblattstrukturen, 19 % Turns und 10 % Random Coils zusammen (61). Es ist ein globuläres Protein mit einem pI bei 8,3 – 8,9 (162).

Es akkumuliert, unabhängig vom Virusstamm oder Wirtszelltyp, im Kernplasma infizierter und transfizierter Zellen und enthält ein Signal zur Aufnahme in den Zellkern (nuclear localization signal, NLS), eine Anordnung basischer Aminosäurereste. Gebunden an Transkriptionsaktivität, wechselt p17 kontinuierlich zwischen dem Kern und dem Cytoplasma und stellt möglicherweise einen Transkriptionsfaktor oder -kofaktor dar (20).

Weiterhin sinkt bei Überexprimierung von p10 sowohl die Anzahl lebender Zellen als auch die Zellproliferationsrate von Vero-, 293- und HeLa-Zellen, obwohl weder Zelltod noch Apoptose beobachtet werden können. Es scheint eine Funktion der Wachstumsverzögerung innezuhaben und erhöht die Verdopplungszeit von Zellen signifikant. Dies geschieht durch Induktion von Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen,

die den Zellzyklus regulieren: p21^{cip/waf1} und p53. Die Inhibition des Zellwachstums ist nicht vom Wirtszelltyp abhängig.

2.7.3.3.3 Protein σ C

Das glykosylierte (196) Strukturprotein σ C, ein Protein des äußeren Kapsids (100, 147, 167), wird vom 3. ORF des S1-Genomsegments kodiert (9, 153) und hat ein Molekulargewicht von 32 – 34 kDa (3, 100, 147, 151, 167). Es macht ca. 1 % des Virions aus (147) und besitzt die größte Variabilität aller ARV-Proteine (197) sowie den stärksten Polymorphismus in der Gelelektrophorese (147). Es liegt als Homotrimer vor (151) mit einem Molekulargewicht von 102 kDa (51). Seine Struktur beinhaltet etwa 19 % α -Helices, 54 % β -Faltblattstrukturen, < 1 % Turns und 24 % Random Coils (95). Am Carboxylende befindet sich eine globuläre Kopfdomäne, die wahrscheinlich mit Hilfe einer längeren Loop-Struktur Rezeptoren binden kann. Darauf folgt ein schlanker Schaft mit zwei dreifachen Wiederholungen von β -Spiralen und wahrscheinlich einer dreifachen α -helikalen Coiled Coil-Struktur (13).

Das Trimer wird vor allem durch hydrophobe Interaktionen stabilisiert; seine Untereinheiten sind nicht kovalent gebunden. Das Amino- und das Carboxylende besitzen jeweils eine unabhängige aktive Domäne für die Trimerbildung (151).

Es besitzt eine große Resistenz gegen Denaturierung mit Harnstoff, ist hoch thermostabil (bis 65 °C) und wird durch hohe Salzkonzentrationen weiter stabilisiert. Es ist weiterhin stabil bei pH 5,2 – 11,6, dissoziiert aber bei pH 3 in einem einzigen Schritt ohne Bildung von Isoformen (52).

Das Protein σ C ist verantwortlich für die Adsorption des Virion an die Zielzelle (100). Dabei bindet es an Rezeptoren, und zwar nur das Trimer, das Monomer ist nicht bindungsfähig.

Monoklonale Antikörper (MAks) gegen σ C erkannten in einer Studie alle – konformationsunabhängig – dasselbe Epitop (60). Gegen σ C gerichtete MAks besaßen sowohl typspezifische als auch gruppenspezifische Neutralisationsaktivität (152, 200).

Kontrovers wird seine Beteiligung an der Synzytium-Formierung gesehen: teilweise wird eine solche Beteiligung bejaht (179), teilweise wird σ C eine solche Funktion nicht zugesprochen (29).

Weiterhin besitzt σC die Fähigkeit, wirtszellunabhängig Apoptose zu induzieren und kann somit als viruskodiertes Apoptin bezeichnet werden. Das Carboxylende spielt hierbei eine entscheidende Rolle (157).

2.7.3.4 Protein σNS

Das nicht strukturbildende, glykosylierte (195) Protein σNS (118, 147) wird vom S4-Genomsegment kodiert (195) und besitzt ein Molekulargewicht zwischen 34 und 40,6 kDa (3, 16, 147). Es besteht beim Stamm S1133 aus 367 Aminosäuren. Seine Struktur setzt sich zusammen aus 33 % α -Helices, 22 % β -Faltblattstrukturen, 20 % Turns und 22 % Random Coils (16). Zwischen ARV-Stämmen besteht $\leq 7,4$ % Sequenzdivergenz (95).

Epitop-Mapping mit monoklonalen Antikörpern ergab das konformationsabhängige Epitop A sowie die konformationsunabhängigen Epitope B und C (59, 65). Das Epitop B bindet einzelsträngige RNS (ssRNS) sequenzunabhängig (209). Doppelsträngige RNS oder DNS (Desoxyribonukleinsäure) wird von σNS jedoch nicht gebunden (183, 209). Weiterhin ist es – neben λA – eines der ersten Proteine, das an „virale Fabriken“ aus μNS assoziiert wird (181, 182).

Tab. 1: Proteine aviärer Reoviren

Protein	Gensegment	Molekulargewicht [kDa]	Aminosäurezahl	isoelektrischer Punkt/ pI	Glykosylierung	Lokalisation	Viron	ISVP	Core	Neutralisationsziel	Funktion
AA	L1	140 - 147	1293	6,3 - 6,5	ja	Core	x	x	x		strukturbildend
AB	L2	125 - 130				Core	x	x	x	ja, gruppenspezifisch	Transkriptase (?)
AC	L3	115 - 120	1285	5,05 - 5,35	ja	Core und äußeres Kapsid	x	x	x		Methyltransferase (?) Guanylyltransferase
μA	M1	79 - 85	732	8,0 - 8,4	ja	Core	x	x	x		NTPase
μB	M2	70 - 73	676	5,2 - 5,5	ja	äußeres Kapsid	x				Penetration
μBC		68 - 70		4,2 - 5,4	ja	äußeres Kapsid	x				
μBN		5,5		4,2 - 5,4		äußeres Kapsid	x				
δ				4,7				x			
φ				11,7							
μNS	M3	71 - 75	635	5,9		nicht strukturbildend					virale Fabriken
σA	S2	39 - 46		6,8	nein	Core	x	x	x		dsRNS-bindend Nucleotidyl-Phosphatase Anti-Interferon-Aktivität
σB	S3	36 - 42			ja, stark	äußeres Kapsid	x			ja, gruppenspezifisch	Zellfusion Membranpermeabilisierung
p10	S1 - ORF1	10,5	95 - 98			nicht strukturbildend					Transkriptionsfaktor/ -kofaktor (?)
p17	S1 - ORF2		146	8,3 - 8,9		nicht strukturbildend					Rezeptorbindung Apoptose-Induktion
σC	S1 - ORF3	32 - 34			ja	äußeres Kapsid	x	x		ja, typ- und gruppenspezifisch	
σNS	S4	34 - 41	367		ja	nicht strukturbildend					ssRNS-bindend

Referenzen zu den hier angeführten Daten im Fließtext.

2.8 Replikationszyklus und Morphogenese

Der Replikationszyklus aviärer Reoviren beginnt mit der Adsorption des Virus an Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Wirtszelle. Sialylsäure spielt dabei im Unterschied zu Reoviren der Säuger wohl keine Rolle (7). Für die Adsorption verantwortlich ist das äußere Kapsidprotein σC (100, 151). Hühnerembryofibroblasten besitzen $1,8 \times 10^4$ Rezeptoren pro Zelle für den Virusstamm S1133, dagegen aber $2,2 \times 10^5$ Rezeptoreinheiten für das σC -Protein von S1133 (53). Die Zahl mag differieren, da σC möglicherweise an Membrankomponenten bindet, die dem Virion nicht zugänglich sind, oder wo bereits gebundene Reovirionen weiteres Andocken sterisch verhindern (53). Für Reoviren der Säuger ist auch eine direkte Penetration der Zellmembran beschrieben (10). Dem Andocken an Rezeptoren folgt die Aufnahme der Virionen in Endosomen, wo sie einem Uncoating-Prozess unterliegen, der sie zu intermediären subviralen Partikeln (ISVPs) macht. Hierbei werden zunächst die σB -Proteine abgespalten sowie μB bzw. μBC zu μBC und μBN bzw. δ und ϕ geschnitten. Auch das Produkt δ' ist bekannt und stellt vielleicht den letzten Zwischenschritt dar, bevor das transkriptionsaktive Core daraus hervorgeht (7, 27). Analog zu Reoviren der Säuger verändert dabei – zumindest bei Enzymverdau in vitro – das Andockprotein σC seine Konformation zu einer über die Oberfläche ragenden, gestreckten Form, bevor es im Übergang zum Core gänzlich abgespalten wird. Wichtig dabei ist ein saurer pH-Wert innerhalb der Endosomen (27).

Die nun frei im Cytoplasma befindlichen Cores besitzen Transkriptionsaktivität. Gebildete mRNS verlässt vermutlich über die türmchenartigen, kanalbildenden λC -Proteine das Core und wird dabei mit einer Typ1-Kappenstruktur versehen (Positivstrang: „GpppN^mpNp“, Negativstrang: ppNp). Dies wird durch die Guanylyltransferase- und Methyltransferaseaktivität der λC -Proteine bewirkt (101).

Die RNS-Polymeraseaktivität ist vermutlich dem Protein λB anzurechnen (7). Nach der Transkription folgt die Translation. Eine Besonderheit liegt für das S1-Genomsegment vor, das tricistronisch ist. Nur das Startcodon von ORF3 befindet sich in einem optimalen Kontext für die Initiation der Translation, aber auch der Kontext von ORF2 ist noch ein starker Initiator mit einem Purin an Position -3. ORF1 jedoch besitzt mit zwei Pyrimidinbasen an den entscheidenden Stellen einen nur schwachen Initiationskontext (9, 153). Die Proteine p10 und p17, die von den ersten

beiden Genen kodiert werden, werden durch „Leaky Scanning“ exprimiert, bei dem der Translationsinitiationskomplex nur manchmal beim ersten Startcodon mit der Translation beginnt, es aber auch regelmäßig übergeht und erst beim folgenden anfängt (132). Für die Translation des σ C-Gens, das über 600 Basen vom 5'-Ende des Genomsegments entfernt ist, werden interne Ribosomeneintrittsstellen oder ein „Shunting“-Mechanismus diskutiert (132). Nach der Synthese werden viele Proteine glykosyliert. Der Zusammenbau von Proteinen zu vollständigen Virionen erfolgt in „Viral Factories“, die im Gegensatz zu Reoviren der Säuger globulär und nicht mikrotubulus-assoziiert sind (181, 182). Diese „Viral Factories“ werden zunächst vom Protein μ NS gebildet, das in Folge σ NS und λ A zu sich heranzieht, woraufhin eine erste Core-Schicht aus λ A gebildet wird (181). Durch seine Fähigkeit, RNS zu binden, könnte σ NS eine wichtige Rolle bei der Verpackung neusynthetisierten Genoms spielen (182). Durch bisher unbekannte Faktoren werden die übrigen Proteine herangezogen, zunächst λ B, dann λ C, μ A, σ A und σ C. Die Proteine des äußeren Kapsids μ B, σ B und das Cleavage-Produkt μ BC aus μ B bilden zunächst einen ternären Komplex, der dann als Ganzes angelagert wird (181). Wie aviäre Reoviren freigesetzt werden, ist bislang unbekannt; möglicherweise spielt p10 mit seiner Fähigkeit, Zellfusionen und erhöhte Membranpermeabilität zu erzeugen, eine Rolle (8, 159).

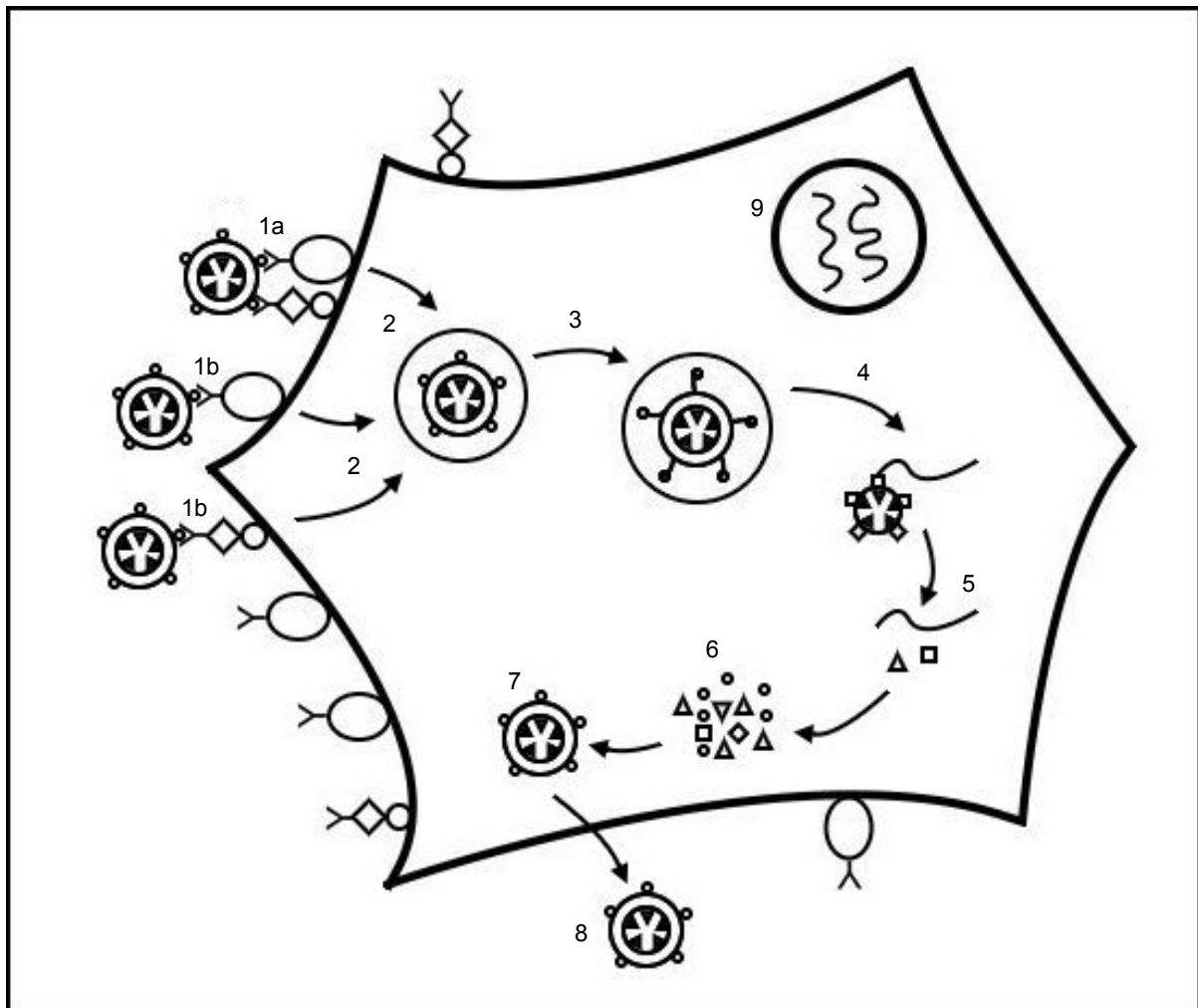


Abb. 1: Replikationszyklus aviärer Reoviren

Der Replikationszyklus beginnt mit dem Andocken eines aviären Reovirus an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche (1). Für Reoviren der Säuger wird angenommen, dass aviäre Reoviren an verschiedene Rezeptoren binden können. Dabei soll es möglich sein, dass ein mit geringer Affinität gebundener Rezeptor die Bindung an einen anderen verstärkt (1a). Die verschiedenen Rezeptoren sollen aber auch einzeln als Eintrittsstellen fungieren können (1b) (36). Für aviäre Reoviren jedoch ist dies noch nicht nachgewiesen.

Danach wird das adsorbierte Virion aviärer Reoviren in ein Endosom aufgenommen (2) und dort enzymatisch zu einem intermediären subviralen Partikel prozessiert (3). Dieses verliert während der Membranpenetration weitere Proteine und wird zum transkriptionsaktiven Core (4, mit mRNA). Die mRNA verlässt – wahrscheinlich über die türmchenartigen Gebilde des λ C-Proteins – das Core und wird im Cytoplasma translatiert (5). In „viralen Fabriken“ werden die Proteine zu Nachkommenvirus zusammengesetzt (6). Neugebildete Virionen (7) werden mittels Zellyse externalisiert (8). Der Zellkern ist schematisch angedeutet (9).

2.9 Interaktionen mit der Wirtszelle

Aviäre Reoviren rufen in Zellkulturen einen charakteristischen cytopathischen Effekt (cpE) hervor, der, je nach verwendetem Zelltyp, Virusstamm und Dosis, etwa zehn bis 48 Stunden nach Infektion erstmals sichtbar wird (18, 32, 79, 184, 201). Dabei bilden sich zunächst vermehrt Vakuolen in den Zellen (79, 90). Wenige Stunden später setzt die Bildung von vielkernigen Synzytien mit über 50 Nuklei ein (79, 118, 184). Teilweise können mitotische Figuren beobachtet werden (184). Die Zellen wirken granulär, runden sich und heben in einem späteren Stadium vom Untergrund ab (79, 90, 114, 115). Bei manchen Zelltypen zeigen sich lange cytoplasmatische Ausläufer (114, 115). Azido- und basophile Einschlusskörperchen treten auf (79, 114, 184). Unter Agar bilden sich nach mehreren Tagen Plaques. Dabei wurde erwähnt, dass der FC-Stamm (Fahey-Crawley) auf Verozellen größere Plaques hervorruft als andere Stämme (118). In einer amerikanischen Studie findet sich ein kurzer Hinweis auf drei verschiedene Plaquegrößen: solche, deren Durchmesser nach zehn Tagen Inkubationszeit 1 - 4,5 mm beträgt, solche mit 1 - 4 mm großen Plaques und solche mit 1 - 3 mm großen (79). Eine andere Studie fand im Vergleich zu Hühnerisolaten kleinere Plaques vor, wenn Putenisolate auf Hühnerzellen heranwuchsen. Eine schlechtere Adaptation von Putenisolaten an Hühnerzellen wurde als mögliche Erklärung angenommen (116). Anderswo findet sich erwähnt, dass 17 von 89 Isolaten – und zwar diejenigen, die auch für Embryonen und Küken besonders pathogen sind – einen deutlichen cpE auf HEF-Zellen (Hühnerembryofibroblasten) hervorrufen, zehn von 89 – mit niedrigerer Pathogenität für Embryonen und Küken – ohne deutlichen cpE bleiben (173).

Insgesamt ist die Zellfusion kein essentieller Schritt für die Virusreplikation, befördert aber die rasche Virusausbreitung und lässt das Virus zwischen Zellen passieren, ohne neutralisierenden Antikörpern ausgesetzt zu sein. Zellfusion bietet also einen erheblichen Selektionsvorteil (28).

Generell sind aviäre Reoviren an viele verschiedene Zelllinien adaptierbar, sowohl an primäre als auch permanente Zellen von Vögeln (6, 21, 144) sowie an verschiedene permanente Zelllinien aus Säugetiergeweben (6, 26, 97, 178, 201). Dabei unterscheiden sich die Zelllinien jedoch stark in der Zahl der Blindpassagen, die nötig werden, bevor ein cytopathischer Effekt eintritt (6, 21). Dies hängt zusätzlich noch vom verwendeten Virusisolat ab.

Beim Stamm WVU 2937 tritt beispielsweise der cytopathische Effekt bereits in der ersten Passage auf HEL (Hühnerembryoleber)- oder Verozellen auf, jedoch erst in der 10. Passage auf Schweinenierenzellen und auch nach zehn Passagen noch nicht auf Knochenmarkzellen der Kaninchen. Außerdem unterscheidet sich hier der Titer an produziertem Virus um mehrere Zehnerpotenzen (6). Auf welchen Zelllinien Reovirus anzüchtbar ist, darüber variieren die Angaben aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Virusisolate stark. Manche Isolate lassen sich beispielsweise an Verozellen adaptieren (26, 201), andere nicht (201). Auch kann die Replikation von Virus bei demselben Zelltyp aus unterschiedlichen Quellen ein unterschiedliches Ausmaß innehaben (71). Abhängig kann sie außerdem vom verwendeten Medium und pH-Wert sein (71, 97). Zelllinien des Immunsystems, wie die Makrophagenlinie HD11, erlauben ebenfalls Replikation. Hier ließ sich ein hochpathogenes Isolat mit deutlich ausgeprägtem cpE und bis zu 1000fach höherer Virusproduktion von einem schwach pathogenen mit verzögerter viraler RNS- und Proteinsynthese, insbesondere mit supprimierter Expression des μ B-Proteins, unterscheiden (171).

Deutlich unterschiedlich ist auch die Replikation beim Vergleich von HEF- und primären Hühnersehnenzellen. Bei letzteren ist die Transkription von mRNS verzögert und die Produktion von dsRNS inhibiert. Da sich andere Viren, z.B. Newcastle Disease Virus, auf Sehnenzellen normal vermehren, scheint dieser Effekt virusspezifisch zu sein. Außerdem bleibt gebildetes Virus sehr stark zellassoziiert (62), wie es auch bei der Anzucht auf verschiedenen Säugerzellen der Fall sein kann (26, 201, 208).

Als sensitivste Zelllinie für aviäre Reoviren werden primäre Hühnerembryoleberzellkulturen angegeben (48).

Die Neutralisationsreaktion kann auf verschiedenen Zellsystemen unterschiedlich ausfallen. Erwähnt wurde in einer Studie mit MAks, dass ein gegen σ C gerichteter Antikörper nicht auf Verozellen, jedoch auf Hühnernierenzellen Virus neutralisieren konnte (151).

Der cpE von Reoviren ist eng assoziiert mit dem Auftreten von Apoptose, deren Kriterien etwa die Kondensation von Kernchromatin und Cytoplasma, die Fragmentierung der DNS und Segmentation der Zelle in apoptotische Körper sind. Dieser Prozess tritt zelltyp- und virusstammunabhängig auf (157). Dabei ist intraendosomales Uncoating notwendig, bloße Adsorption und Internalisierung allein

reichen nicht aus (87). Jedoch muss nicht das ganze Virion zur Apoptoseauslösung vorhanden sein, σC konnte auch allein Apoptose in verschiedenen Zelllinien induzieren (157).

Die Mehrzahl antigenexprimierender Zellen ist nicht apoptotisch, aber Zellen in deren näheren Umgebung unterlaufen diesen Prozess häufig, der abhängig von der Aktivierung zellulärer Enzyme, der Kaspasen, ist. Reovirusinfektionen haben eine vermehrte Produktion von Proteinen zur Folge, die zu deren Aktivierung führen (17). Aviäre Reoviren sind auch in der Lage, Interferon zu induzieren. Gesteigert ist diese Fähigkeit nach UV-Bestrahlung. Denkbar ist, dass dsRNS die Interferonbildung auslöst, da Reovirus ohne dsRNS kein Interferon induziert (202, 31). Gleichzeitig ist ARV – wobei σA durch Bindung von dsRNS und somit Inhibierung davon abhängiger Enzyme wesentlich dazu beitragen soll – hochresistent gegenüber Interferon und hat damit einen Vorteil gegenüber anderen Viren (44, 99).

2.10 Serologie

2.10.1 Antikörperbildung und Veränderung von Laborwerten

Bei experimentell infizierten oder vakzinierten Tieren sowie bei Feldinfektionen kommt es zur Ausbildung von Antikörpern gegen aviäre Reoviren. Die Serokonversion ist bei Küken meist im Alter von zwei bis drei Wochen nach Infektion feststellbar (67, 75, 76, 165, 176, 178, 180, 191). Vereinzelt wurden auch bereits zu einem früheren Zeitpunkt, eine Woche nach Infektion, neutralisierende Antikörper detektiert (77). Die Serokonversion tritt sowohl bei oraler (76, 178) oder intratrachealer (77) Inokulation als auch bei Injektion in die Zehenballen (76, 145, 178), intramuskulär (178) oder subkutan (69) ein. Bei einem Versuch, der Legerassen und Broiler vergleichend betrachtete, trat die Serokonversion bei Broilern mit vier Wochen nach Infektion erst eine Woche später auf als bei Legerassen (76). Kontakttiere entwickelten teilweise ebenfalls Antikörpertiter gegen Reoviren, allerdings erst vier bis fünf Wochen nach Infektion (144, 191). Neutralisierende Antikörper persistieren sechs Monate oder länger im Blut, präzipitierende Antikörper waren jedoch zum selben Zeitpunkt nur noch bei 12 % der Tiere feststellbar (67). Zum Teil wurde ein höherer Antikörpertiter, frühere Serokonversion und längere

Persistenz in Abhängigkeit von der Pathogenität der eingesetzten Virusstämme beobachtet (141, 142).

Die Antikörperantwort nach Vakzinierung war sehr unterschiedlich, je nach eingesetzter Vakzine. So induzierte die Applikation einer attenuierten Lebendvakzine als Spray bei Eintagsküken keine zirkulierenden neutralisierenden Antikörper, jedoch bei Applikation oder Auffrischungsimpfimmunisierung im Alter von sieben Tagen (39). Vakzinierung mit inaktivierter Ölemulsionsvakzine hatte einmal eine hohe und einheitliche Antikörperantwort zur Folge (30), wogegen eine andere Studie von einzelnen Tieren mit nur geringen Titern berichtete (84). Hier allerdings wies die Nachzucht mäßig hohe bis hohe Antikörpertiter auf, teilweise sogar höhere als die der Elterntiere.

Vakzinierung mit Lebendimpfstoffen hatte drei bis vier Wochen nach Vakzinierung kontinuierliche bis steile Titeranstiege zur Folge (107, 194), jedoch waren bei Broilern mit maternalen Antikörpern die Antworten eher gering (193) bzw. verzögert (194).

Nach Gabe einer experimentellen Vakzine in ovo an 18 Tage lang bebrütete Embryonen waren sechs Tage nach dem Schlupf Antikörper detektierbar, deren Titer nach neun Tagen abzufallen begann (56). Bei einer Messung von Antikörpern gegen das nicht strukturbildende Protein σ NS zeigte sich, dass Antikörper nur detektierbar waren, wenn das Vakzinierungsprotokoll inaktivierte Vakzine enthielt (15).

Laborwerte des Blutes verändern sich ebenfalls nach Infektion mit ARV. Es kommt zu einem Anstieg des Plasma-Albumins, der Calciumwerte und des Enzyms Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) am siebten Tag nach Infektion, während Glucose-, Amylase- und Phosphorwerte absinken sowie ein Abfall der GOT an Tag neun und 14 zu beobachten ist (168).

2.10.2 Serologische Nachweis- und Messverfahren

Neben Neutralisationstests, die später ausführlicher behandelt werden, dienen als serologische Nachweisverfahren der Agargelpräzipitationstest (AGP), verschiedene ELISA-Kombinationen (ELISA: enzyme linked immunosorbent assay) sowie Fluoreszenztests (1, 66), Western Blot (33), Komplementfixationstest (80), Radioimmunopräzipitation (134) und Immunodot-Verfahren (92).

Schon 1966 zeigte sich bei einer japanischen Studie ein gemeinsames Antigen bei durch Neutralisation unterschiedenen fünf verschiedenen Serotypen aviärer Reoviren, da es sowohl im Agargelpräzipitationstest (AGP) als auch im Komplementfixationstest und einem Fluoreszenztestverfahren zu umfangreicher Kreuzreaktivität trotz schwacher Kreuzneutralisation kam (80). Kreuzreaktivität mit Reoviren der Säuger im AGP gab es jedoch nicht (54). Als Nachweis für eine ARV-Infektion reicht der AGP allerdings nicht aus, denn oftmals kam es bei einem positiven Ergebnis in der Neutralisation zu einem negativen Ergebnis im AGP, manchmal sogar bei ganzen Herden (67).

Verschiedene ELISA-Verfahren sind beschrieben, etwa eine ausführliche Studie zu einem indirekten ELISA, der zum Neutralisationstest eine positive Korrelation aufwies (68). Auch ELISAs, die mit einzelnen ARV-Proteinen arbeiten, wurden entwickelt. Als Coating-Antigen wurden σ NS (15), σ B (156), σ C (197), σ A (91) sowie eine Kombination aus σ C und σ B zweier verschiedener ARV-Stämme (94) verwendet. Im Fall von σ NS (15) und σ A (91) zeigte sich, dass nur bei Verwendung inaktivierter Vakzinen eine gute Korrelation zu Neutralisationstests gegeben war. Eine gute Korrelation zur Neutralisationsreaktion wiesen hingegen ELISAs gegen σ B und kombinierte σ C- σ B-ELISAs auf.

2.10.3 Neutralisation

Zur Unterscheidung von ARV-Isolaten und -Stämmen anhand antigenetischer Eigenschaften wurde meistens die Untersuchung mittels Kreuzneutralisationstests gewählt, wobei sich die Durchführung in einigen Punkten unterscheidet. Nur in wenigen Fällen wurde ein einfacher Neutralisationstest durchgeführt, d.h. ohne feste oder halbfeste Übersichtung (133, 138, 140, 203), meist wurde die Form des Plaquereduktionstests unter Agar-Übersichtungsmedium gewählt (6, 47, 67, 79, 80, 113, 116, 118, 120, 144, 150, 152, 167, 173, 175, 192, 201, 204) mit Konzentrationen von 0,8 % (79, 80, 150, 152, 175, 201, 204) bis 3 % Agar (192). In der Regel kam die β -Methode mit konstanter Virusverdünnung und serieller Serumverdünnung zur Anwendung (67, 79, 80, 116, 133, 138, 140, 144, 152, 175, 203, 204). Nach einer Inkubationszeit von drei (116) bis zehn (79, 201) Tagen wurde meist mit Neutralrot in verschiedenen Konzentrationen gefärbt (6, 8, 47, 67, 80, 113,

118, 120, 140, 144, 150, 167, 173, 192, 201), selten auch mit Kristallviolett (140). Als Neutralisationstiter wurden Serumtiter mit 50 (152, 175), 75 (204), 80 (67) oder 90 % (80, 144, 173) Neutralisation gewählt.

Durchgeführt wurden die Tests auf verschiedenen Zellsystemen wie HN-Zellen (Hühnernierenzellen) (67, 79, 80, 113, 144, 150, 173, 175, 204), Verozellen (6, 118, 138, 152, 201), HEF-Zellen (47, 120, 133, 167, 203), HEN-Zellen (Hühnerembryonierenzellen) (58, 116, 140) und HEL-Zellen (47, 82, 192).

Die benötigten Positiv- bzw. Hyperimmunseren wurden auf verschiedene Weise hergestellt. Das Virusmaterial entstammte Zellkulturen (1, 33, 41, 58, 82, 204) oder Eikulturen (204), war manchmal aufgereinigt (134) oder Teil einer kommerziellen Lebend- (156, 206) oder Totvakzine (156, 206). Verschiedenste Applikationsarten und -kombinationen wurden gewählt: intramuskulär (33, 89, 134, 204, 206), intraperitoneal (134), okular (41, 58, 156, 206), subkutan (69, 206), intranasal (1, 41, 58), oral (41, 58), per Injektion über die Zehenballen (204) oder intratracheal (82). Geboostert wurde teilweise gar nicht (204) oder bis zu dreimal (206), meist aber einmal (1, 33, 41, 58, 69, 82, 156).

Während zwischen ARV und Reoviren der Säuger (MRV, mammalian reoviruses) keine Kreuzreaktivität festgestellt werden konnte (113, 121, 167), fand sich zwischen verschiedenen ARV-Isolaten und -Stämmen meist eine ausgeprägte Kreuzreaktivität (41, 58, 113, 116, 138, 140, 142, 144, 145, 204). Die Untergliederung in Serotypen erwies sich daher als ausgesprochen schwierig und die Angaben variieren stark. Eine frühe japanische Studie gliederte 77 Isolate in fünf Serotypen, die untereinander nur schwach kreuzreaktiv waren (79). Bei einem Vergleich von drei aviären Reoviren aus Puten und vier aus Hühnern fanden sich zwei Serotypen, ansonsten näher und ferner verwandte Subtypen (116). Die Untersuchung zehn weiterer ARV-Isolate aus Hühnern mit verschiedenen Krankheitsbildern in Australien ergab drei größere Gruppen, aber teilweise waren die Isolate nicht eindeutig zuordenbar (140). Sieben amerikanische Isolate konnten in vier Serotypen gruppiert werden (144), zwei weitere waren nicht eingruppierbar. Eine japanische Studie konnte mit der Untersuchung von 89 Isolaten die fünf klassischen japanischen Serotypen bestätigen, wobei sechs Isolate von den Antiseren nicht neutralisiert wurden (173). Bei einer Studie, die vorherig charakterisierte Serotypen aus den USA und Japan mit sechs weiteren aus Europa und Amerika verglich, wurden elf Serotypen dargestellt (204). Weitere fünf ARV-Stämme wurden in drei Serotypen differenziert (58). Eine Auffälligkeit in den

Ergebnissen von Kreuzneutralisationstests ist etwa das Vorkommen von einseitiger Neutralisation zwischen heterologen Stämmen (79, 204). Zudem kommt es vor, dass bis zu drei heterologe Stämme gleich stark (116, 142, 144) oder besser neutralisiert werden als der dem Antiserum homologe Stamm (58, 116, 142, 173, 204).

Die meisten Beschreibungen lassen keine Korrelation zwischen serologischem Verhalten und Pathotyp erkennen (82, 113), jedoch stellte eine japanische Studie eine enge Beziehung zwischen Pathogenität und Serotyp fest. Von 17 hochpathogenen Isolaten (für Hühnerembryonen, Küken und Zellkulturen) gehörten 14 zum selben Serotyp (173).

In einer Studie entsprach die *in vitro*-Neutralisation mit einem Serum gegen den Vakzinestamm S1133 der *in vivo*-Immunität der Nachzucht gegen Challenge als Eintagsküken mit verschiedenen Isolaten. Die Elterntiere waren per Augentropfen mit S1133 geimpft worden (133). Vakzinierung von Elterntieren mit attenuiertem S1133-Virus schützte die Nachzucht gegen Challenge mit S1133 und in unterschiedlichem Ausmaß gegen fünf heterologe ARV-Stämme. Jedoch sind Kreuzneutralisation und Kreuzprotektion ähnlich, aber nicht vollkommen identisch (203).

Bei Untersuchungen *in vitro* mit monoklonalen Antikörpern konnten verschiedene Proteine als Zielprotein der Neutralisation ermittelt werden, dabei wurde unterschieden zwischen Proteinen mit gruppenspezifischen Epitopen, nämlich λ B (200), σ C (200), σ B (152, 175) und typspezifischen Epitopen auf σ C (152, 200). Mit sehr geringem Titer wirkte auch ein monoklonaler Antikörper gegen λ A oder λ C typspezifisch neutralisierend (200). Die Neutralisationsreaktion war dabei abhängig vom verwendeten Zellsystem (152, 200). So fand sie teilweise nur in Vero- oder nur in HN-Zellen statt bzw. wies unterschiedliche Titer in verschiedenen Zellsystemen auf.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkulturen

Für die Untersuchungen wurden primäre Zellkulturen aus Hühnerembryonen verwendet, die in spezifisch pathogenfreien Bruteiern neun Tage lang heranwuchsen. Dann wurden die Eier mit sterilem Besteck unter einem Abzug aufgeschnitten und die Embryonen mit einer Pinzette entnommen. Die Köpfe wurden verworfen und die Bauch- und Brusthöhle der Embryonen eröffnet. Zunächst wurde die Leber entnommen und separiert, Herz und Muskelmagen wurden jedoch verworfen. Die Lebern wurden mechanisch zerkleinert und in einem Kolbenglas mit PBS (phosphate buffered saline, pH 7,5) gewaschen, die übrigen Bestandteile mittels steriler 10ml-Spritzen zerkleinert und in ein separates Kolbenglas gegeben. Auch diese Gewebe wurden mit PBS gewaschen. Nach dem Abgießen der Waschflüssigkeit wurde der Inhalt beider Kolben mittels magnetischem Fischchen und Rührgerät unter Zugabe von einigen Milliliter einer Trypsin-EDTA-Lösung soweit verdaut, dass sich der Großteil der Zellen aus seinem Zellverband löste, was einen Zeitraum von etwa 15 – 25 min in Anspruch nahm. Die Trypsin-EDTA-Lösung bestand aus 0,025 % Trypsin (Biochrom AG, Berlin) und 0,025 % EDTA (Ethyldiamintetraacetat, Biochrom AG, Berlin) in PBS. Anschließend wurden die aus dem Zellverband gelösten Zellen durch Filter (cell strainer BB Falcon, BD Biosciences Europe, Heidelberg) im Fall der Leberzellen bzw. durch sechslagige Mullbinden (Hartmann, Heidenheim) im Fall der Fibroblasten gefiltert und in Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Dazu wurden etwa 2 ml fötales Kälberserum (FKS, Biochrom AG, Berlin) zugegeben, um die Trypsinwirkung aufzuheben. Anschließend wurden die Zellen acht Minuten lang bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und das Zellpellett in einer geringen Menge Earle`s minimal essential medium (Earle`s MEM, Biochrom AG, Berlin) resuspendiert. Ein Teil davon (jeweils 10 µl) wurde mit 890 µl PBS und 100 µl Trypanblau (in physiologischer Salzlösung, Seromed/ Biochrom AG, Berlin) versetzt, um die Zellen für die Zählung lebender Zellen anzufärben. Mit dieser Zellsuspension wurde dann eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gefüllt und die lebenden Zellen innerhalb von vier Gruppenquadraten ausgezählt. Anschließend

wurde berechnet, wieviel Medium der nach der Zentrifugation erhaltenen Zellsuspension zugesetzt werden konnte, um eine Zelldichte von 1 000 000 Zellen/ml bei Leber- und 500 000 Zellen/ml bei Fibroblasten zu erreichen. Diese Endsuspension wurde in 96-, 24- und 6-Loch-Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt und im Brutschrank bei 41 °C und 5 % CO₂ einen Tag lang vor Beimpfung bebrütet. Der Lösung aus 90 % Earle`s MEM und 10 % FKS wurde eine Antibiotikallösung zugesetzt, und zwar 2,5 ml auf je 500 ml Earle`s MEM mit FKS.

3.2 PBS (phosphate buffered saline)

Zur Herstellung von fünf Litern PBS wurden 40g NaCl (Natriumchlorid reinst, AppliChem, Darmstadt), 1g KCl (Kaliumchlorid, ≥ 99,5 %, Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 7,2 g Na₂HPO₄ x 2H₂O (Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse, Merck, Darmstadt) sowie 1g KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse, Merck, Darmstadt) in einen Fünf-Liter-Glaskolben gegeben, mit Aqua bidestillata auf fünf Liter aufgefüllt und mittels Magnetrührer und magnetischem Fischchen in der Flüssigkeit gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls auf pH 7,4 eingestellt. Danach wurde die Flüssigkeit in autoklavierbare Flaschen portioniert abgefüllt und mindestens 20 Minuten bei drei Bar autoklaviert.

3.3 Antibiotikallösung

Die zum Zellkulturmedium hinzugegebene Antibiotikallösung setzte sich aus 3g Penicillin G (1730 U/ mg, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 5g Streptomycin-Sulfat (761 U/mg, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und 12,5 ml Gentamycin (10 mg/ml, Seromed/ Biochrom AG, Berlin) zusammen, die auf 50 ml mit PBS aufgefüllt wurden. Anschließend wurde die Stammlösung mit Hilfe eines 0,45 µl-Filters sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

3.4 Viren

Es wurden drei verschiedenen Reovirusgruppen für die Untersuchungen verwendet. Als Referenzstamm wurde der attenuierte Vakzinstamm S1133 (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) eingesetzt. Weiterhin wurden je drei stallspezifische Vakzineisolate aus dem Bereich der Brüterei Süd (K397/02, K1284/02, K0200/03) (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) und der Brüterei Weser-Ems (K560/02, K261/97, K105/03) (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) sowie ein niederländisches Isolat (SP2004-00344) hinsichtlich ihrer Verwandtschaft im Kreuzneutralisationstest untersucht. Die dritte Gruppe, die Eingang in diese Untersuchungen fand, bildeten Isolate, die in der Klinik für Vögel aus Darm und Pankreas von Tieren mit Anzeichen des Malabsorptionssyndroms über Ei- und Zellkultur isoliert und per Elektronenmikroskop und Immunfluoreszenz als Reoviren charakterisiert worden waren: 8588DP4-6, 8501DP4-6, 8474DP4-6 aus dem Bereich der Brüterei Süd sowie 8914DP4-6 aus dem Bereich der Brüterei Weser-Ems. Alle Isolate wurden auf Hühnerembryoleberzellen vermehrt und die in der Klinik für Vögel isolierten zusätzlich in einem nachfolgend beschriebenen Verfahren plaquekloniert. Um ausreichend große Virusstocks für die Untersuchungen zu erhalten, wurden jeweils 1ml Virussuspension in eine 250ml-Zellkulturflasche (Greiner bio-one, Frickenhausen) gegeben, die einen Monolayer mit primären Hühnerembryoleberzellen enthielt. Die Flaschen wurden bis zur Entwicklung eines deutlichen cpEs inklusive Abheben der Synzytien vom Untergrund bei 41 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Dann wurden die Zellen vollends durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen der Kulturflüssigkeit mittels einer Glaspipette vom Untergrund abgelöst. Anschließend wurden die Flaschen jeweils dreimal bei -70 °C eingefroren und aufgetaut, die Flüssigkeit in Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellreste bei 1000 Umdrehungen zehn Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde zu 1ml-Portionen in Eppendorf-Röhrchen abgefüllt. Ein Isolat, 8474DP4-6, wurde weitere sieben Mal auf HEF-Zellen passagiert.

Für die weitergehenden Untersuchungen wurden drei Isolate ausgewählt (S1133, 8588DP4-6, 8474DP4-6) und zusätzlich zur Vermehrung auf HEL-Zellen auch von HEF-Zellen sowie steril präparierten Lebern und Därmen von Hühnerembryonen gewonnen, die nach sechstägiger Bebrütungszeit über den Dottersack infiziert worden waren.

3.5 Eikultur

Um Virusstocks, die vier verschiedenen Geweben entstammen, vergleichen zu können, wurden SPF-Eier nach sechs Tagen Bebrütungszeit über den Dottersack beimpft und täglich geschickt. Leber und Darm von 18 Tage alten Embryonen wurden nach dem Töten steril präpariert bzw. bei durch die Infektion bereits abgestorbenen Tieren am Tag des Absterbens entnommen. Die Organe wurden mittels Mörser zerkleinert und in einer 10 % (w/v)-Suspension in PBS suspendiert. Anschließend wurde die Suspension 10 Minuten mit Ultraschall beschallt.

3.6 Plaqueklonierung

Zunächst wurden definierte Virusverdünnungen auf 6-Loch-Platten aufgebracht, die am vorangehenden Tag mit 2,5 ml HEL-Zellen pro Vertiefung bei einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml beschickt worden waren. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die in den Vertiefungen enthaltene Virussuspension mit sechsprozentigem, 38 °C warmem Agar (Agarose Type VII, cell culture tested, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in Earle`s MEM (Biochrom AG, Berlin) überschichtet. Nach drei bis fünf Tagen Bebrütungszeit bei 41 °C und 5 % CO₂ wurden optisch als Reovirus-cpE erkennbare Riesenzellen mit Hilfe von sterilen Pasteurpipetten ausgestochen und auf 24-Loch-Platten verbracht, die am Vortag mit 0,4 ml HEL-Zellen pro Vertiefung in einer Ausgangszellkonzentration von 800 000 Zellen/ ml beschickt worden waren. Diese Vorgehensweise wurde noch weitere zwei Mal wiederholt.

3.7 Immunfluoreszenz

Zur Bestätigung, dass die Virusisolate Reoviren seien, wurden Immunfluoreszenztests durchgeführt. Dazu wurden 96-Loch-Platten mit HEL-Zellen in einer Konzentration von 800 000 Zellen/ ml und 100 µl/ Loch beschickt und am folgenden Tag mit einer Virussuspension in Zehnfach-Verdünnungsreihen beimpft, 100 µl/Loch. Eine Zeile pro Platte blieb dabei virusfrei für Zell- und

Konjugatkontrollen. Bis zum ersten Sichtbarwerden eines cpE wurde die Platte im Inkubator bei 41 °C und 5 % CO₂ gehalten. Anschließend wurden die Vertiefungen mit 3,7 % Formalin (AppliChem, Darmstadt) in PBS aufgefüllt. Nach zehn Minuten Einwirkzeit wurde sämtliche Flüssigkeit abgeschüttet und die Vertiefungen wurden erneut mit Formalin befüllt. In diesem Zustand wurden die Platten bei 4 °C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt. Dann wurden das Formalin abgekippt und die Vertiefungen mit je 50 µl einprozentigem Triton X 100 (Serva, Heidelberg) befüllt, das anschließend wieder abgeschüttet wurde. Nun wurden nochmals 50 µl/Loch einprozentiges Triton X 100 in PBS zugegeben, das eine halbe Stunde einwirken konnte, bevor die Flüssigkeit abgekippt und ausgeklopft wurde. Als Blockpuffer wurde nun zweiprozentiges FKS (Biochrom AG, Berlin) in PBS eingesetzt und eine Stunde auf der Platte belassen. Nachdem der Blockpuffer entfernt worden war, wurde – je nachdem, ob An- bzw. Abwesenheit von Reo- oder Adenoviren überprüft werden sollte – Reo- oder Adeno-Positivserum 1:25 in PBS verdünnt und in einer Menge von 50 µl pro Loch aufgetragen. Die Vertiefungen für Zellkontrollen wurden mit Blockpuffer befüllt. Nach einer halben Stunde wurden die Platten mit 0,05 % Tween 20 (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) in PBS dreimal gewaschen. Anti-Huhn-FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurde 1:100 in PBS verdünnt und davon 50 µl pro Loch aufgetragen und 30 min darauf belassen. Ein Waschschrift analog dem ersten, jedoch mit 0,025 % Tween 20 (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) in PBS folgte. Danach wurde 1:5 in PBS verdünntes Glycerin (etwa 87 % zur Analyse, Merck, Darmstadt) aufgetragen, die Platten mit Folie abgeklebt und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

3.8 Serumgewinnung

Für die Herstellung der Hyperimmunseren wurden einwöchigen spezifisch pathogenfreien (SPF) Hühnerküken der Rasse „White Leghorn“ (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) 0,5 ml einer 1:10 verdünnten Virussuspension intramuskulär injiziert. Eine Auffrischungsimpfimmunisierung erfolgte im Alter von fünf Wochen durch intravenöse Applikation von 1ml einer 1:10 verdünnten Virussuspension. Zur Überprüfung der Immunantwort erfolgte eine Woche nach dem zweiten Antigenkontakt eine Blutentnahme. Bei ausreichender ELISA-Reaktivität erfolgte am

darauf folgenden Tag die Gewinnung des Endbluts. Dies war möglich bei der Herstellung der Hyperimmunseren gegen den Referenzstamm S1133 sowie gegen das MAS-Isolat 8588DP4-6. Im Fall der Hyperimmunseren, die gegen die MAS-Isolate 8474DP4-6, 8501DP4-6 sowie 8914DP4-6 produziert wurden, war eine zweite Auffrischungsimpfungsung im Alter von neun Wochen durch ebenfalls intravenöse Applikation einer 1:10 verdünnten Virussuspension notwendig. Die Herstellung der Hyperimmunseren wurde bei der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 55.2-1/54-2531.6-8-05 vermerkt.

Weiterhin wurde ein Hyperimmunserum, das gegen die stallspezifischen K-Stämme gerichtet war, in den Kreuzneutralisationsuntersuchungen eingesetzt (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, Veterinärlabor, Dr. Voss). Auch verschiedene, gepoolte Seren aus Elterntierherden mit von MAS betroffener Nachzucht wurden untersucht. Dies waren Seren der Elterntierherden 428, 429, 430 und 431 (EH 428, EH 429, EH 430, EH 431, Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven). Dabei waren die Elterntiere der Herden 428 und 430 am dritten Lebenstag mit einer S1133-Lebendvakzine geimpft worden sowie in der sechsten und 20. Lebenswoche mit inaktiviertem Stamm S1133 und einem lokalen K-Stamm. Die Elterntiere der Herden 429 und 431 waren ebenfalls am dritten Lebenstag mit S1133 geimpft worden sowie in der sechsten und 20. Lebenswoche mit einer kommerziellen Vakzine (Intervet, Unterschleißheim). Dabei waren aus der Nachzucht der Elterntierherde 428 das Isolat 8588DP4-6, aus derjenigen der Elterntierherde 429 das Isolat 8501DP4-6 isoliert worden.

Tab. 2: Gewinnung von Hyperimmenserem

		Alter				
		7 Tage	35 Tage	42 Tage	63 Tage	70 Tage
Hyper- immun- Serum	a-S1133	0,5 ml i.m. 1,7 x 10 ⁶	1,0 ml i.v. 3,3 x 10 ⁶	ELISA, Blutgewinnung		
	a-8588	0,5 ml i.m. 1,1 x 10 ⁴	1,0 ml i.v. 2,1 x 10 ⁴	ELISA, Blutgewinnung		
	a-8914	0,5 ml i.m. 1,5 x 10 ⁵	1,0 ml i.v. 3,0 x 10 ⁴	ELISA	1,0 ml i.v. 3,0 x 10 ⁴	ELISA, Blutgewinnung
	a-8501	0,5 ml i.m. 2,7 x 10 ³	1,0 ml i.v. 5,4 x 10 ⁴	ELISA	1,0 ml i.v. 5,4 x 10 ⁴	ELISA, Blutgewinnung
	a-8474	0,5 ml i.m. 1,7 x 10 ⁴	1,0 ml i.v. 3,4 x 10 ⁴	ELISA	1,0 ml i.v. 3,4 x 10 ⁴	ELISA, Blutgewinnung

3.9 Reo-ELISA

Zur Überprüfung der Antikörperantwort bei der Erzeugung der Hyperimmunseren wurden ELISA-Tests mit gewonnenen Serumproben durchgeführt.

Für die Beschichtung der Platten wurde mittels Ultrazentrifugation aufgereinigtes Virus als Antigen verwendet, das auf eine Konzentration von 10 µg/ ml mit Bicarbonatpuffer (pH 9,6; 4,2 g NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat zur Analyse, Merck, Darmstadt/ I Aqua bidest.) verdünnt wurde und in einer definierten Menge für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer 96-well-Polysorp-Platte verblieb. Ein Waschschrift mit 0,025 % Tween (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) in PBS folgte. Anschließend wurde Blockpuffer in einer definierten Menge aufgebracht, der aus 2 % handelsüblicher Trockenmilch ohne Geschmackszusätze in 0,025 % Tween in PBS bestand; dieser wurde eine Stunde auf der Platte belassen.

Danach wurde der Blockpuffer entfernt und die Platte bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Für die Durchführung des reoviruspezifischen ELISA wurden zunächst die zu untersuchenden Seren auf einer 96-Loch-Rundbodenplatte zu einer 1:50-Verdünnung mit schon oben erwähntem Blockpuffer verdünnt.

Die hergestellten Verdünnungen wurden als Doppelansatz pro zu untersuchendes Serum auf die mit Antigen beschickte 96-Loch-Platte übertragen, wo sie 30 min bei RT (Raumtemperatur) verblieben.

Zusätzlich zu den zu untersuchenden Seren wurden zwei bis drei Negativseren sowie ein Positivserum in gleicher Weise auf die Platte verbracht; mindestens eine Vertiefung verblieb als Konjugatkontrolle ohne Serumzugabe.

Es folgte ein dreimaliges automatisiertes Waschen mit 0,025 % Tween in PBS auf einem ELISA-Washer.

Ein mit Peroxidase verbundener IgG-Antikörper (Anti-Huhn-POD, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurde im Anschluss daran in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegeben. Nach weiteren 30 min Inkubationszeit bei RT erfolgte ein zweiter Waschschrift in gleicher Weise wie der erste.

Auf die Platte verbracht wurde nun eine Lösung aus OPD (O-Phenylendiamin-Dihydrochlorid, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), Citratpuffer (pH 4, 14,7g Natriumcitrat - Tri-Sodium citrate-5,5-hydrate, Riedel-de Haen RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Seelze) / I Aqua bidest.) und H₂O₂ (Wasserstoffperoxid, 30 % (w/w)

solution, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), wobei OPD in einer Konzentration von 1 mg/ml Citratpuffer eingesetzt wurde und anschließend 5 µl/ml Gesamtvolumen H₂O₂ hinzugefügt wurden.

Die beschickten Platten wurden nun 10 min lang im Dunkeln stehengelassen; die im positiven Fall gelb-orange Farbreaktion wurde mittels Hinzupipettieren einer 2 molaren Schwefelsäure (2,5 mol, Merck, Darmstadt) abgestoppt.

Im ELISA-Reader wurde als letzter Schritt bei einer Einstellung des Testfilters auf 490 nm Wellenlänge und des Referenzfilters auf 630 nm Wellenlänge die Extinktion in der jeweiligen Vertiefung gemessen.

3.10 Plaquetitration

Um den Titer der verwendeten Virusstocks zu bestimmen, wurden primäre HEL-Zellen in 24-Loch-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) in einer Konzentration von $2,1 \times 10^5$ Zellen/cm² verbracht und einen Tag später mit 100 µl Virussuspension pro Loch beimpft.

Neben einer Reihe von Virusverdünnungen beinhaltete jede Platte zwei uninfizierte Löcher als Zell- und Konjugatkontrolle. Einer ursprünglichen Virusverdünnung von 1:30 in Earle's MEM (Biochrom AG, Berlin) jedes Virusisolats folgten Dreifach-Verdünnungsreihen. In jeder 24-Loch-Platte wurden vier Virusverdünnungen in Vierfachansätzen und zwei Virusverdünnungen in Dreifachansätzen getestet. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Zellkulturen mit 1,6 % Carboxymethylcellulose (CMC, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in Earle's MEM überschichtet.

Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellkulturen mit 3,7 % Formalin (AppliChem Darmstadt) in PBS aufgefüllt und zunächst zehn Minuten so belassen. Nach dem Abschütten der Flüssigkeit und erneutem Auffüllen mit Formalin wurden die Platten bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert. Dann wurde das Formalin abgeschüttet, die Platten einmal mit 1 % Triton-X 100 in PBS gewaschen und nochmals 1 % Triton-X 100 für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur aufgebracht. Danach erfolgte ein Waschschriff mit Blockpuffer aus PBS und 1 % NBCS (newborn calf serum, Biochrom AG, Berlin), der anschließend nochmals aufgebracht wurde und eine Stunde auf den Platten verblieb. Dann wurden die Platten mit einer 1:50-Verdünnung

von Reovirus-Positivserum eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellkontrolle wurde hierbei ausgespart und nur mit Blockpuffer beschickt. Anschließend wurden die Platten dreimal für je drei Minuten mit 0,05%igem Tween 20 (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) in PBS gewaschen und mit einer 1:1000-Verdünnung mit Anti-Huhn-IgG, gekoppelt an Peroxidase (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Ein weiterer dreistufiger Waschschrift, diesmal mit 0,025 % Tween 20 (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) folgte.

Als Substrat wurden 10 mg 3-Amino-6-Ethyl-Karbazol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in 3ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Serva, Heidelberg) gelöst und anschließend in 50ml Natriumacetatpuffer (wasserfrei, Merck, Darmstadt; 20 mmol, pH 5,0 – 5,5) und H₂O₂ (Wasserstoffperoxid, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) verdünnt. Pro Loch wurden 200 µl dieser Lösung 15 – 20 Minuten lang aufgebracht, bis sich die Zellrasen leicht rosa färbten. Vorsichtiges Waschen mit Leitungswasser stoppte die Reaktion. Antigenpositive Zellen waren rot angefärbt und konnten bei geringer Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. Nach zwei Tagen begann die Färbung zu verblassen.

3.11 Plaqueneutralisation

Neutralisationstests wurden analog zu Plaquetitrationstests durchgeführt. Die Virusisolate wurden in einer Endkonzentration von 2500 pfu/ml für die Viruskontrollen ohne Serum und 5000 pfu/ml für Virus-Serum-Gemische eingesetzt. Die verschiedenen Seren wurden in Zweifach-Verdünnungsreihen verwendet. Virus- und Serumverdünnungen wurden im Verhältnis 1:1 vermischt und vor dem Aufbringen auf die Zellen eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Infektion von 24-Loch-Platten blieben zwei Löcher für eine Zell- und Konjugatkontrolle virusfrei. Nach einer weiteren Stunde wurden die infizierten Zellen mit 1,6 % CMC (Carboxymethylcellulose, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in Earle`s MEM (Biochrom AG, Berlin) überschichtet und wie bei der Titration beschrieben weiterbehandelt. Nach dem Auszählen der Plaques wurden 50 %-Neutralisationstiter (NT₅₀-Titer) nach der Methode von Reed und Muench (136) berechnet, wobei die

Zahl der Plaques innerhalb der Löcher für die Viruskontrollen als 100 % Infektiosität gesetzt wurde.

		Anti-S1133 [log2]					
		\emptyset	10	11	12	13	14
Plaques		\emptyset 65,5	\emptyset 9,3	\emptyset 20	\emptyset 36,3	\emptyset 45	\emptyset 63,3
Prozent zu Viruskontrolle		100 %	14,1 %	30,4 %	55,2 %	68,4	96,2 %
NT ₅₀ = 11,8							

Abb. 2 : Beispiel eines Plaquereduktionstests nach der β -Methode (konstante Virusvermehrung - variable Serumverdünnung)

Die Abbildung zeigt eine fixierte und immunhistochemisch gefärbte HEL-Zellkultur-Platte am Beispiel des Referenzstammes S1133 und dem homologen Antiserum mit der für die Tests standardisierten Einteilung. In der ersten Spalte ist die Viruskontrolle (\emptyset) aufgetragen, bei der keine Serumzugabe erfolgte und die als Referenz dient (100%). In den folgenden Spalten wurde das Virus mit Serum in den oben aufgeführten Verdünnung (-log₂; 10-14) aufgetragen. Dabei wurde jede Serumverdünnungsstufe sowie die Viruskontrolle in einem Vierfachansatz getestet. Die nach zweitägiger Inkubation und anschließender Immunfärbung mit einem reoviruspezifischen Hyperimmunserum mikroskopisch ermittelten Plaques sind in die entsprechenden Vertiefungen eingetragen. Die oberste Zeile der angefügten Tabelle gibt den jeweiligen Durchschnitt der gezählten Plaques an, die dann in der zweiten Zeile als prozentual zur Viruskontrolle verbleibenden Infektiosität angegeben werden. Aufgrund dieser Kinetik wurde nach der Methode nach Reed und Muench der NT₅₀-Titer [-log 2] ermittelt, der in diesem Fall 11,8 beträgt. Zusätzlich wurden auf den Platten uninfizierte Zellkultur-Kontrollen mitgeführt, die ebenfalls immunhistochemisch gefärbt wurden (ZK) bzw. als Konjugatkontrolle (KK) für den anti-Huhn-IgG-Peroxidase gekoppelten Antikörper dienten.

3.12 Relatedness-Werte

Um die Verwandtschaft von Virusisolaten zu bestimmen, wird oft eine Berechnungsmethode verwendet, die zuerst bei Influenza A-Virus gebraucht wurde (5). Hieraus resultieren sogenannte „R-Werte“, die folgendermaßen differenziert wurden (12): R-Werte unter 10 % definieren verschiedene Serotypen, solche zwischen 10 und 32 bzw. 32 und 70 % entfernter und näher verwandte Subtypen. Isolate, deren R-Werte über 70 % liegen, zeigen keine oder vernachlässigbare Unterschiede.

Die angewandten Formeln lauten:

Verwandtschaft in Prozent (% R) = $100 \times \sqrt{r_1 \times r_2}$, dabei ist

$$r_1 = \frac{\text{heterologer Titer mit Virus 2}}{\text{homologer Titer mit Virus 1}}$$

$$r_2 = \frac{\text{heterologer Titer mit Virus 1}}{\text{homologer Titer mit Virus 2}}$$

3.13 Statistik

Für statistische Berechnungen wurde SPSS verwendet. Signifikanzen wurden in Post-Hoc-Tests berechnet, dabei wurde die Methode nach Tamhane verwendet ($p \leq 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Plaquetypen

Zunächst wurden Titrations- und Neutralisationstests nicht mittels einer immunhistochemischen Färbemethode durchgeführt, sondern Plaquetests unter fester Übersichtung (Zellkulturagar) mit anschließender Neutralrotfärbung verwendet. Jedoch stellte sich hierbei heraus, dass es insbesondere bei den MAS-Isolaten solche gibt, die sehr kleine Plaueformen entwickeln. Das hatte zur Folge, dass sich Isolate mit diesem Plaquetyp auf diese Weise nur schlecht und nicht regelmäßig reproduzierbar darstellen ließen, was mit der beschriebenen immunhistochemischen Methode jedoch möglich war. Auch damit konnten drei unterschiedliche Plaquetypen unterschieden werden. Das ist zum einen der „klassische“ Typ mit großen, runden Synzytien und Plaques, für den exemplarisch der Referenzstamm S1133 steht, der aber auch bei den K-Stämmen und beim MAS-Isolat 8914DP4-6 auftritt. Zum anderen gibt es den schon erwähnten Typ mit sehr kleinen Plaques und winzigen Synzytien, der bei den MAS-Isolaten 8588DP4-6 und 8501DP4-6 sowie beim niederländischen ERS-Stamm vorkommt. Der dritte Plaquetyp mit weniger runden, zusammengeballten, sondern stattdessen eher flächig ausgedehnten Synzytien findet sich beim MAS-Isolat 8474DP4-6. Diese Unterschiede traten nicht nur auf HEL-Zellen, sondern auch auf HEF-Zellen auf, wobei bei letzteren die Plaques und Synzytien insgesamt kleiner waren, und konnten sowohl im ungefärbten als auch gefärbten Zustand erkannt werden. Einen Überblick über die Plaquetypen bietet Abb. 3; eine Auflistung der Isolate mit zugehörigen Plaquetypen findet sich in Tab. 3.

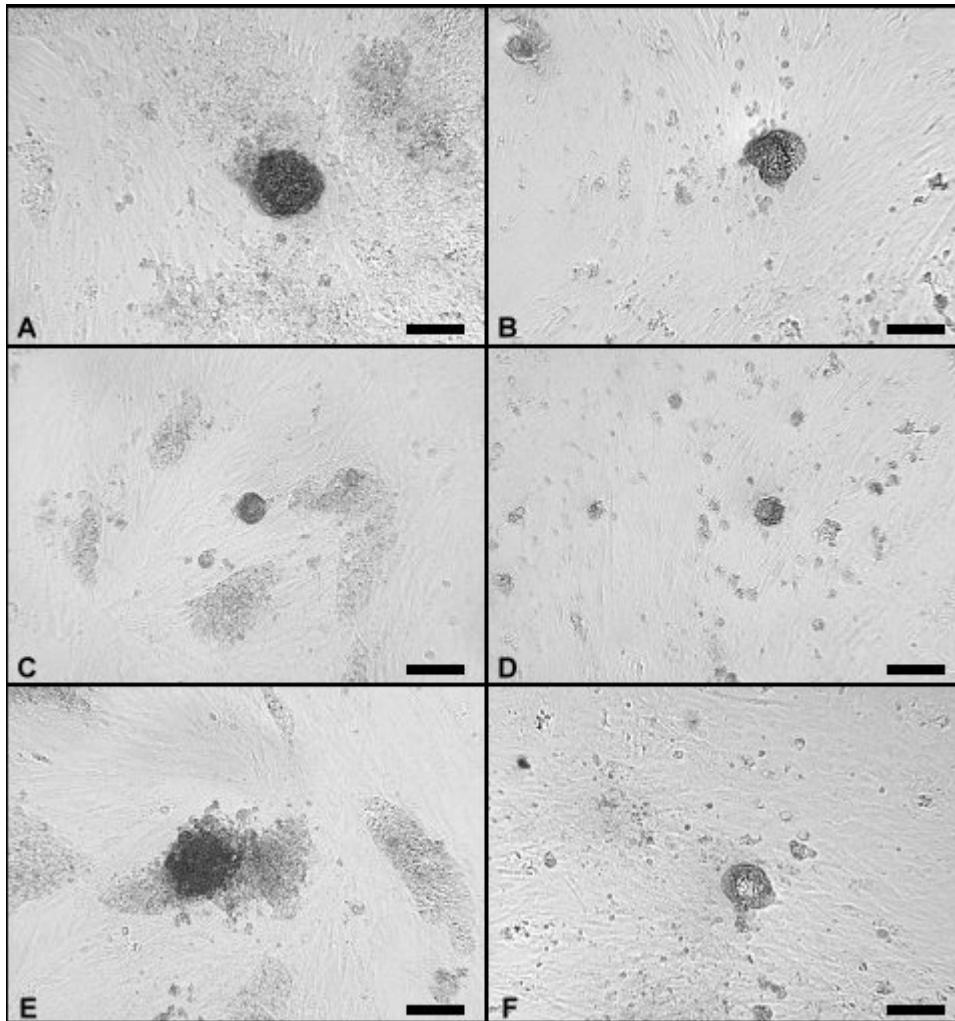


Abb. 3: Plaquetypen

Die Abbildung zeigt den cytopathischen Effekt des Vakzinestamms S1133 und zweier MAS-Isolate auf primären Embryozellkulturen. Dabei steht S1133 exemplarisch für den „klassischen Typ“ mit großen runden Riesenzellen auf HEL- (A) und HEF-Zellen (B). Das Isolat 8588DP4-6 induziert dagegen nur kleine Synzytien auf HEL- (C) und HEF-Zellen (D). Hingegen bildet das Isolat 8474DP4-6 große, fast flächenhafte Riesenzellen auf HEL- (E) und HEF-Zellen (F), die schon einen Tag nach Infektion sichtbar werden. Der schwarze Balken repräsentiert 100 µm.

4.2 Plaquetitration

Mit Hilfe des bereits erwähnten immunhistochemischen Färbeverfahrens ließen sich sowohl Synzytien als auch morphologisch nur leicht veränderte antigenpositive Zellverbände rot anfärben und auszählen (Abb. 5), sodass alle Virusstocks titrierbar waren. Die Titer sämtlicher in den Kreuzneutralisationsuntersuchungen verwendeten Isolate finden sich in Tab. 3 aufgelistet und in Abb. 4 graphisch dargestellt, wobei die logarithmische Skalierung der y-Achse zu beachten ist. Obwohl alle Isolate auf gleiche Weise vermehrt worden waren, fanden sich doch beträchtliche Titerunterschiede. Die höchsten Titer waren beim Referenzstamm S1133 mit $3,3 \times 10^6$ pfu/ml und bei einem stallspezifischen Vakzinestamm, K261/97, mit $1,5 \times 10^6$ pfu/ml feststellbar. Im mittleren Bereich lagen das MAS-Isolat 8914DP4-6 mit $3,0 \times 10^5$ sowie das zwischenzeitlich mehrmals auf HEF-Zellen passagierte MAS-Isolat 8474DP4-6/p7 von HEF mit $1,0 \times 10^5$ pfu/ml. Niedrige Titer fanden sich hingegen bei allen übrigen K-Stämmen, dem ERS-Stamm SP2004-00344 sowie den MAS-Isolaten 8588DP4-6, 8474DP4-6 und 8501DP4-6. Letzteres wies mit $6,0 \times 10^3$ pfu/ml den niedrigsten Titer überhaupt auf (Abb. 4).

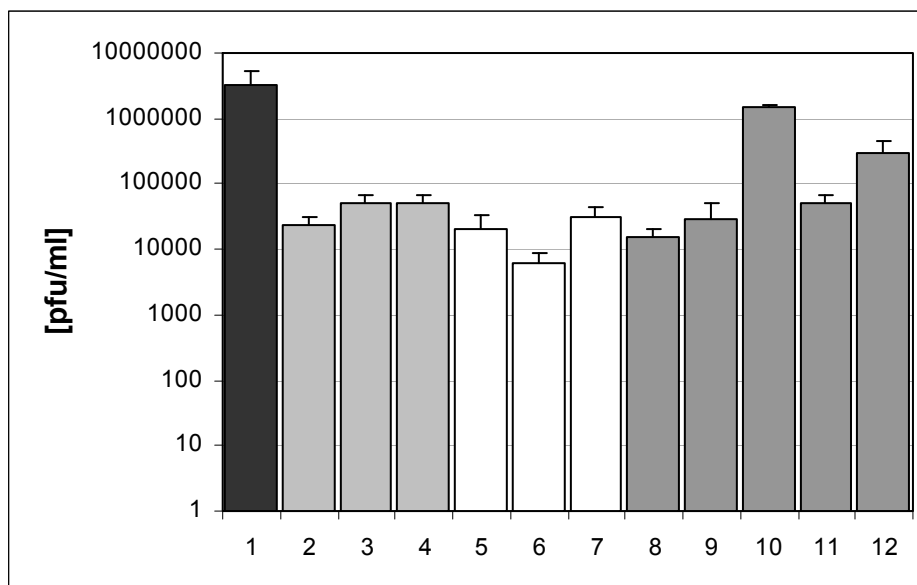


Abb. 4: Titer der verwendeten Virusstocks

Die Abbildung stellt – mit logarithmischer Skalierung – die Titer der in den Kreuzneutralisationstests verwendeten Virusstocks dar. Die unterschiedlichen Balkenfarben repräsentieren die verschiedenen Virusgruppen: dunkelgrau den Referenzstamm S1133 (1), hellgrau die süddeutschen stallspezifischen Stämme K397/02 (2), K1284/02 (3), K0200/03 (4), weiß die MAS-Isolate 8588DP4-6 (5), 8501DP4-6 (6) sowie 8474DP4-6 (7) und mittelgrau die norddeutschen/niederländischen Isolate: den ERS-Stamm SP2004-00344 (8), die stallspezifischen Stämme K560/02 (9), K261/97 (10) und K105/03 (11) sowie das MAS-Isolat 8914DP4-6 (12). Dabei sind Stämme mit hohen (1, 10), mittleren (12) und niedrigen Virustitern (alle übrigen) zu unterscheiden.

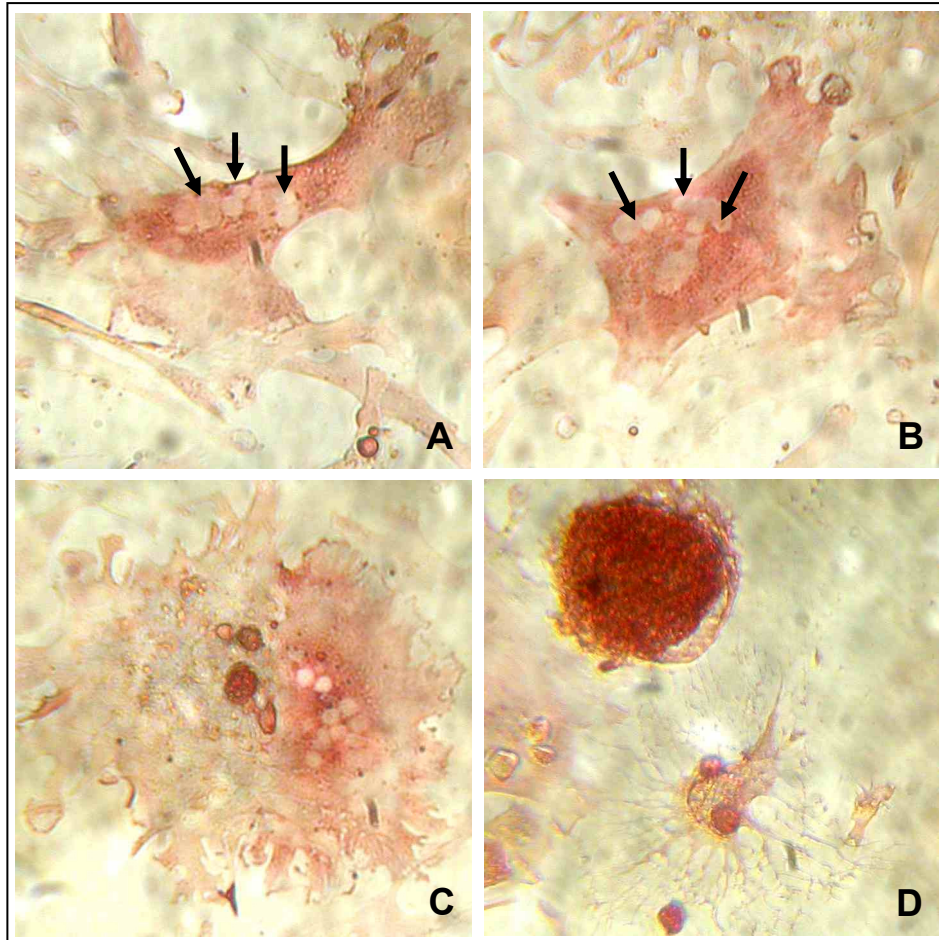


Abb. 5: Immunhistochemische Darstellung von reovirusinfizierten Zellen

Dargestellt sind reovirusinfizierte HEL-Zellen, in denen virales Antigen durch ein reoviruspezifisches Hyperimmunserum nachgewiesen wurde. Infizierte Zellen stellen sich rot dar. Dabei werden auch morphologisch unverändert erscheinenden Zellen als Reovirus-infiziert erkannt (A). Bereits zu diesem Zeitpunkt ist anhand der multiplen Kerne (↘) von Zellverschmelzungen auszugehen, die jedoch nicht zu einem Lösen aus dem Zellverband geführt haben. Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es dann zu einer Größenzunahme (B). An den Rändern sind teilweise abgerundete Zellen erkennbar und es treten sichtbare Defekte im Zellrasen auf (C). Im Endstadium der Infektion mit klassischen aviären Reoviren kommt es dann zu einer Abrundung der verschmolzenen Zellen unter Bildung von Riesenzellen und deutlichen Zellrasendefekten (D).

Tab. 3: Virusstocks für die Kreuzneutralisation

Virusolat	Zelltyp/ Passagzahl	Plaquetyp	Titer	plaquekloniert	Herkunft
S1133	HEF - p3	klassisch	$3,3 \times 10^6$	nein	Vakzinstamm, L
K397/02	HEL - p3	klassisch	$2,3 \times 10^4$	nein	stallspezifische Vakzine, S, L
K1284/02	HEL - p3	klassisch	$5,2 \times 10^4$	nein	stallspezifische Vakzine, S, L
K0200/03	HEL - p3	klassisch	$5,0 \times 10^4$	nein	stallspezifische Vakzine, S, L
8588DP4-6	HEL - p7	klein	$2,1 \times 10^4$	ja, 2x	MAS-Isolat, S
8501DP4-6	HEL - p7	klein	$6,0 \times 10^3$	ja, 2x	MAS-Isolat, S
8474DP4-6	HEL - p7	ausgedehnt	$3,1 \times 10^4$	ja, 2x	MAS-Isolat, S
8474DP4-6/ CEF	HEL - p7, HEF - p7	ausgedehnt	$1,0 \times 10^5$	ja, 2x	MAS-Isolat, S
SP2004-00344	HEL - p2	klein	$1,5 \times 10^4$	nein	ERS-Stamm, Niederlande
K560/02	HEL - p2	klassisch	$2,9 \times 10^4$	nein	stallspezifische Vakzine, N, L
K261/97	HEL - p2	klassisch	$1,5 \times 10^6$	nein	stallspezifische Vakzine, N, L
K105/03	HEL - p2	klassisch	$5,3 \times 10^4$	nein	stallspezifische Vakzine, N, L
8914DP4-6	HEL - p7	klassisch	$3,0 \times 10^5$	ja, 2x	MAS-Isolat, N

S = Süddeutschland, N = Norddeutschland, L = Lohmann Tierzucht GmbH

4.3 Plaqueneutralisation des Referenzstamms S1133

Nachdem sich die immunhistochemische Färbemethode als brauchbar für die Titration erwiesen hatte, wurde sie zunächst am Referenzstamm S1133 mit dem homologen Hyperimmunserum a-S1133 auch für die Neutralisationsuntersuchungen verwendet. Es zeigte sich, dass die Neutralisationsreaktion konzentrationsabhängig verlief, wobei eine Reduktion der Infektiosität um 90 % bei einer reziproken Serumverdünnung von 9 [-log₂] eintrat. Die Neutralisationskapazität des Serums fiel dabei bei starker Serumverdünnung ab, sodass eine Verdünnung von 15 [log₂] die Infektiosität nur noch um 10 % verminderte. Die Berechnung des Neutralisationstiters, der zu 50 % Reduktion der Infektiosität (NT₅₀) führt, nach der Methode von Reed und Muench (136) ergab einen NT₅₀-Titer von 12,5 ± 0,8 [-log₂] unter Einbeziehung von 30 Testergebnissen. Die daraus resultierende Kurve findet sich in Abb. 6.

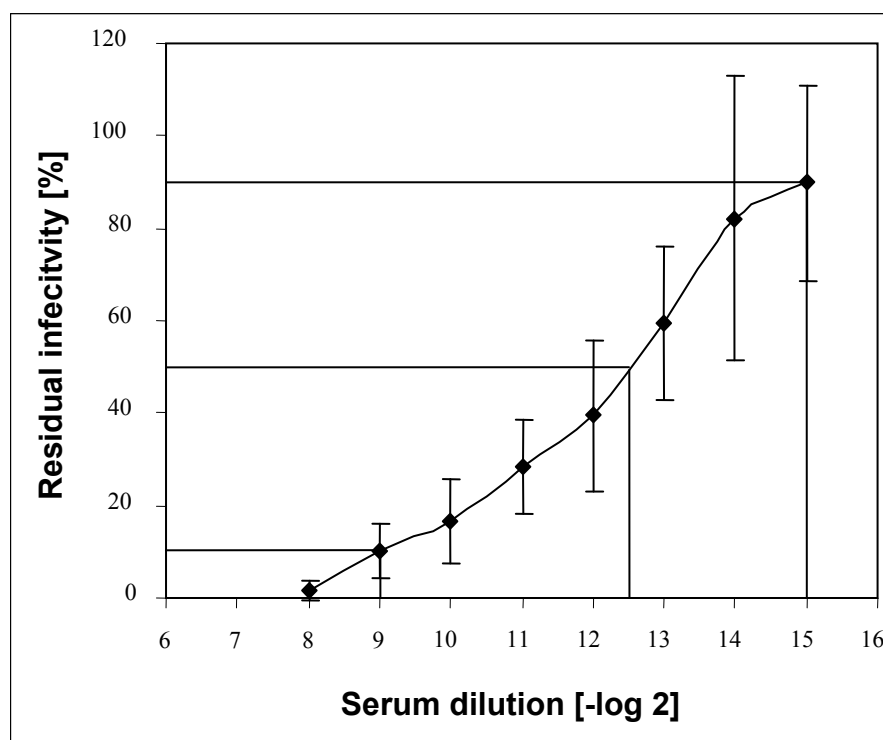


Abb.6: Neutralisierung des Vakzinestamms S1133

Im etablierten immunhistochemischen Färbeverfahren wird die Serumneutralisation durch die Plaquereduktion bei verschiedenen Serumverdünnungen und anschließender Berechnung der Restinfektiosität bestimmt. Dies wird hier anhand des Vakzinestamms S1133 und seinem homologen Hyperimmunserum a-S1133 dargestellt.

4.4 Kreuzneutralisation mit Hyperimmunseren

Wiederholbare Neutralisationsergebnisse waren auch bei den anderen Isolaten möglich, sodass sämtliche in Tab. 3 aufgeführten Isolate in Kreuzneutralisationstests mit Hyperimmunseren, die gegen den Referenzstamm S1133 (a-S1133), gegen den K-Stamm K0200/03 (a-K) sowie gegen die MAS-Isolate 8588DP4-6 (a-8588), 8501DP4-6 (a-8501), 8914DP4-6 (a-8914) und 8474DP4-6 (a-8474) gerichtet waren, verglichen und charakterisiert werden konnten. Eine Abbildung der resultierenden NT₅₀-Titer findet sich in Abb. 7. Alle eingesetzten Seren zeigten neutralisierende Eigenschaften, deren Stärke in Abhängigkeit von der Serumverdünnung jedoch deutlich verschieden war. So wies das Serum a-S1133 bei seinem homologen Stamm einen NT₅₀-Titer von $12,5 \pm 0,8$ [-log₂] auf, das Serum a-8474 beim Isolat 8474DP4-6 nur einen NT₅₀-Titer von $5,2 \pm 0,7$ [-log₂] und das a-K-Serum bei K0200/03 nur einen solchen von $5,9 \pm 1,5$ [-log₂]. Auch war mit letzterem Serum die Infektiosität der MAS-Isolate sowie einiger K-Stämme auch bei geringster Serumverdünnung (1:4) nicht zu 50 % neutralisierbar, sodass kein NT₅₀-Titer ermittelt werden konnte. Die angegebenen Titer basieren dabei auf mindestens vier Einzelergebnissen.

Betrachtet man das gegen den Referenzstamm S1133 gerichtete Hyperimmunserum a-S1133 genauer, zeigen sich deutliche Unterschiede bei der Neutralisation der einzelnen Virusisolate. Während beim Stamm S1133 ein NT₅₀-Titer von $12,5 \pm 0,8$ [-log₂] erzielt wurde, lagen die NT₅₀-Titer bei MAS-Isolaten 4,2 bis 8,4 [-log₂]-Stufen niedriger. Am nächsten kam der NT₅₀-Titer dabei beim Isolat 8588DP4-6 mit $8,2 \pm 0,8$ [-log₂]. Die geringsten NT₅₀-Titer wurden bei den Isolaten 8474DP4-6 und K1284/02 mit Titerunterschieden von 8,4 bzw. 8,5 [-log₂]-Stufen vorgefunden, verglichen mit S1133. Während die Isolate aus Süddeutschland (MAS-Isolate und drei K-Stämme) deutliche NT₅₀-Titerdifferenzen aufwiesen, die zwischen 4,0 [-log₂] bei K1284/02 und 8,2 [-log₂] bei 8588DP4-6 lagen, waren die nördlichen Isolate inklusive des niederländischen ERS-Stamms einheitlicher mit NT₅₀-Titern zwischen 6,0 und 7,6 [-log₂]. Eine Ausnahme bildete der stallspezifische Vakzinestamm K105/03 mit einem NT₅₀-Titer von 4,6 [-log₂].

Auffällig war, dass auch bei allen anderen Hyperimmunseren (a-K, a-8588, a-8501, a-8914, a-8474) nicht das jeweilige homologe Isolat am besten neutralisiert wurde, sondern durchgängig der Referenzstamm S1133.

Im Fall des Serums a-8588 lag der NT_{50} -Titer gegenüber S1133 bei $10,5 \pm 1,2$ [-log2], gegenüber dem homologen Isolat 8588DP4-6 jedoch nur bei 7,7 [-log2]. Weitere drei Isolate wurden besser als 8588DP4-6 neutralisiert, nämlich die Isolate 8501DP4-6, K397/02 und 8474DP4-6.

Die Neutralisation homologer Stämme mit Seren, die gegen die Isolate 8501DP4-6 und 8914DP4-6 gerichtet waren, erwies sich ebenfalls als weniger effizient als die Neutralisation des Stammes S1133, jedoch wurden die Isolate jeweils am zweitbesten neutralisiert. Bei beiden Seren war der NT_{50} -Titer gegen K1284/02 am geringsten.

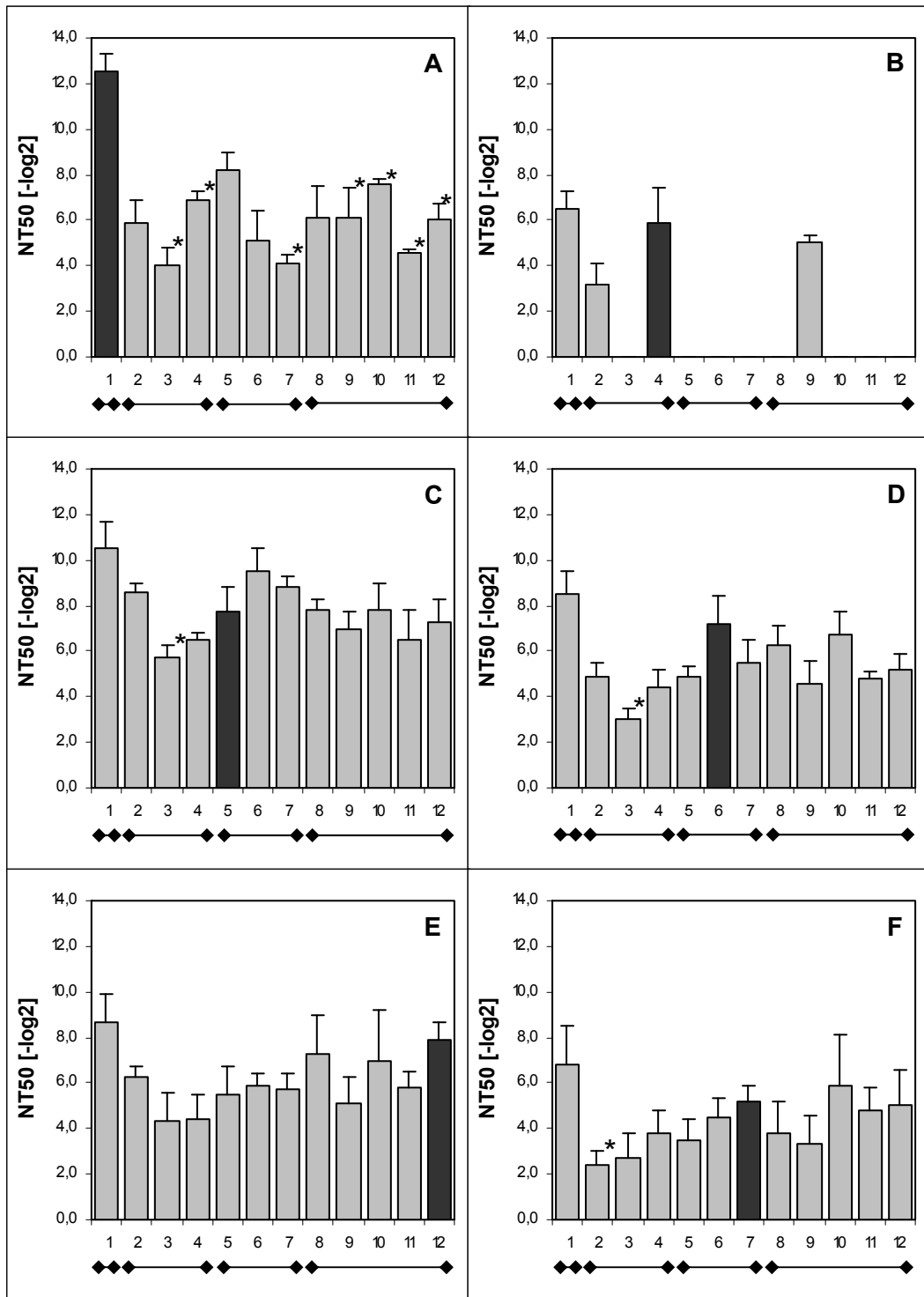
Das Serum a-8474 neutralisierte das homologe Isolat 8474DP4-6 am drittbesten nach S1133 und K261/97, obwohl dieses Isolat vom Serum a-S1133 nur schlecht erkannt worden war. Die NT_{50} -Titerdifferenz zu S1133 lag bei 1,6 [-log2]-Stufen. Auch hier wurde wieder der Stamm K1284/02 am schlechtesten neutralisiert, der somit unter den K-Stämmen eine gewisse Sonderstellung einnahm. Als wenig auffällig in seinem Neutralisationsmuster erwies sich der niederländische ERS-Stamm SP2004-00344. Eine Übersicht über sämtliche NT_{50} -Titer findet sich in Tab. 4 wieder.

Abb. 7: NT_{50} -Titer verschiedener Virusisolate, neutralisiert durch sechs verschiedene Hyperimmunseren

In Abb. 7A sind diejenigen NT_{50} -Titer dargestellt, die vom Hyperimmunserum gegen den Referenzstamm S1133, a-S1133, erzielt wurden. In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse mit den Hyperimmunseren a-K (B), a-8588 (C), a-8501 (D), a-8914 (E) und a-8474 (F) dargestellt. Dunkle Balken repräsentieren diejenigen Isolate, die dem jeweiligen Serum homolog sind.

Die untersuchten Virusisolate wurden durch Nummern abgekürzt und nach geographischen Gesichtspunkten gruppiert: Vakzinestamm S1133 (1), stallspezifische K-Stämme aus Süddeutschland (2-4), nämlich K397/02 (2), K1284/02 (3) und K0200/03 (4), MAS-Isolate aus Süddeutschland (5-7) mit 8588DP4-6 (5), 8501DP4-6 (6) und 8474DP4-6 (7) sowie Isolate aus Nordmitteleuropa (8-12), die den niederländischen ERS-Stamm SP2004-00344 (8), die stallspezifischen Stämme K560/02 (9), K261/97 (10), K105/03 (11) sowie das norddeutsche MAS-Isolat 8914DP4-6 (12) einschließen.

* steht für statistisch signifikante NT_{50} -Titerdifferenzen zum NT_{50} -Titer des Stammes S1133.



Tab. 4: Kreuzneutralisation von 12 ARV-Stämmen mit sechs Hyperimmun- und vier gepoolten Elterntierseren

Virusstämme	Verwendete Seren											
	a-S1133	EH 428	EH 429	EH 431	EH 430	a-K	a-8474	a-8501	a-8588	a-8914		
S1133	12,5 ± 0,8	12,3 ± 0,7	12,7 ± 0,5	11,9 ± 0,2	12,9 ± 0,6	6,5 ± 0,8	6,8 ± 1,7	8,5 ± 1,0	10,5 ± 1,2	8,7 ± 1,2		
K397/02	5,9 ± 1,0	5,5 ± 0,7	11,0 ± 0,7	8,0 ± 0,9	10,5 ± 1,1	3,2 ± 0,9	2,4 ± 0,6	4,9 ± 0,6	8,6 ± 0,4	6,3 ± 0,4		
K1284/02	4,0 ± 0,8	7,6 ± 0,8	7,0 ± 1,1	6,5 ± 1,2	6,4 ± 1,4		2,7 ± 1,1	3,0 ± 0,5	5,7 ± 0,6	4,3 ± 1,3		
K0200/03	6,9 ± 0,4	6,5 ± 1,5	7,1 ± 0,3	8,4 ± 1,3	9,7 ± 0,7	5,9 ± 1,5	3,8 ± 1,0	4,4 ± 0,8	6,5 ± 0,3	4,4 ± 1,1		
8588DP4-6	8,2 ± 0,8	8,0 ± 1,1	8,4 ± 1,3	9,1 ± 2,0	8,9 ± 0,9		3,5 ± 0,9	4,9 ± 0,4	7,7 ± 1,1	5,5 ± 1,2		
8501DP4-6	5,1 ± 1,3	8,6 ± 1,1	8,0 ± 0,2	7,1 ± 0,9	8,4 ± 1,6		4,5 ± 0,8	7,2 ± 1,2	9,5 ± 1,0	5,9 ± 0,5		
8474DP4-6	4,1 ± 0,4	7,0 ± 0,3	6,9 ± 0,7	6,1 ± 0,8	6,3 ± 0,5		5,2 ± 0,7	5,5 ± 1,0	8,8 ± 0,5	5,7 ± 0,7		
SP2004-00344	6,1 ± 1,4	7,2 ± 0,9	7,3 ± 0,7	8,9 ± 1,0	10,8 ± 0,6		3,8 ± 1,4	6,3 ± 0,8	7,8 ± 0,5	7,3 ± 1,7		
K560/02	6,1 ± 1,3	12,1 ± 1,1	11,2 ± 0,9	11,4 ± 0,8	10,1 ± 1,5	5,0 ± 0,3	3,3 ± 1,3	4,6 ± 1,0	7,0 ± 0,7	5,1 ± 1,2		
K261/97	7,6 ± 0,2	7,4 ± 1,1	11,1 ± 0,7	9,6 ± 1,3	10,3 ± 0,4		5,9 ± 2,2	6,7 ± 1,0	7,8 ± 1,2	7,0 ± 2,2		
K105/03	4,6 ± 0,1	8,7 ± 1,2	7,8 ± 1,4	8,2 ± 0,7	9,0 ± 0,6		4,8 ± 1,0	4,8 ± 0,3	6,5 ± 1,3	5,8 ± 0,7		
8914DP4-6	6,0 ± 0,7	7,3 ± 1,2	6,6 ± 0,4	7,7 ± 1,0	7,5 ± 0,4		5,0 ± 1,6	5,2 ± 0,7	7,3 ± 1,0	7,9 ± 0,8		

4.5 Neutralisation mit Elterntierseren

In die Kreuzneutralisationsuntersuchungen wurden auch vier verschiedene Serumpools von Elterntierherden miteinbezogen. Dabei waren die Elterntiere der Herden 428 und 430 mit S1133 und lokalen K-Stämmen immunisiert worden, die Elterntiere der Herden 429 und 431 mit S1133 und einer kommerziellen Vakzine (Intervet, Unterschleißheim).

Aus der Nachzucht der Herde 428 war das Isolat 8588DP4-6, aus der der Herde 429 das Isolat 8501DP4-6 hervorgegangen.

Betrachtet man die neutralisierenden Eigenschaften der Elterntierseren, so findet man allgemein hohe NT_{50} -Titer; die höchsten wiederum beim Vakzinestamm S1133 mit 11,9 [-log₂] (EH 431) bis 12,9 (EH 430), die damit deutlich höher liegen als die NT_{50} -Titer bei den untersuchten Hyperimmunseren gegen die MAS-Isolate und einen K-Stamm. Sie bewegen sich eher im Bereich des Serums a-S1133. Auch die anderen Virusisolate wurden mit mittleren bis hohen NT_{50} -Titern neutralisiert. Der geringste Wert ergab sich beim Isolat 8474DP4-6 und dem Serum EH 431 mit einem NT_{50} -Titer von $6,1 \pm 0,8$ [-log₂]; im Vergleich dazu lag er beim homologen Hyperimmunserum bei $5,2 \pm 0,7$ [-log₂]. Sehr unterschiedlich erkannt wurde das Isolat K397/02 aus dem Bereich der Brüterei Süd, das bei Serum EH 428 nur einen NT_{50} -Titer von 5,5 [-log₂] aufwies, bei den anderen Elterntierseren mit NT_{50} -Titern von 8,0 (EH 431) bis 11,0 (EH 429) jedoch deutlich besser erkannt wurde. Ähnlich unterschiedlich, aber etwas besser neutralisiert wurde der Stamm K261/97.

Trotz dieser Variationen scheinen allerdings beide hier vertretenen Impfschemata eine breit angelegte Immunität induziert zu haben, wie auch aus Abb. 8 hervorgeht. Die jeweiligen NT_{50} -Titer sind zusammen mit denjenigen, die von den Hyperimmunseren erzielt wurden, in Tab. 4 aufgeführt.

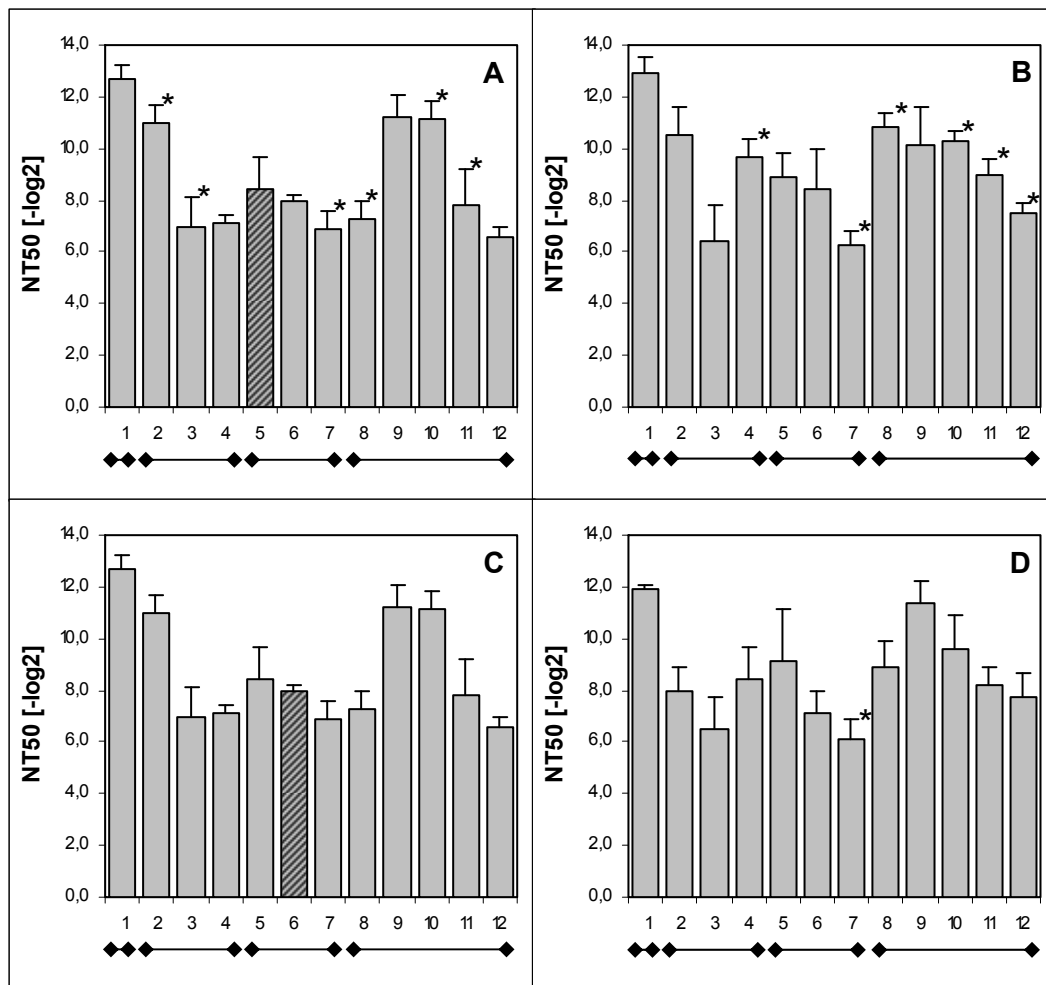


Abb. 8: NT₅₀-Titer verschiedener Virusisolate, neutralisiert durch vier verschiedene, gepoolte Seren von Elterntierherden

Den Abbildungen sind die Elterntierseren EH 428 (A), EH 430 (B), EH 429 (C) und EH 431 (D) zugeordnet, wobei A und B sowie C und D jeweils dasselbe zugrunde liegende Impfschema repräsentieren. Schraffierte Balken stehen für diejenigen Isolate, die aus der Nachzucht der jeweiligen Elterntierherde gewonnen wurden.

Die untersuchten Virusisolate wurden durch Nummern abgekürzt und nach geographischen Gesichtspunkten gruppiert: Vakzinestamm S1133 (1), stallspezifische K-Stämme aus Süddeutschland (2-4), nämlich K397/02 (2), K1284/02 (3) und K0200/03 (4), MAS-Isolate aus Süddeutschland (5-7) mit 8588DP4-6 (5), 8501DP4-6 (6) und 8474DP4-6 (7) sowie Isolate aus Nordmitteleuropa (8-12), die den niederländischen ERS-Stamm SP2004-00344 (8), die stallspezifischen Stämme K560/02 (9), K261/97 (10), K105/03 (11) sowie das norddeutsche MAS-Isolat 8914DP4-6 (12) einschließen.

* steht für statistisch signifikante NT₅₀-Titerdifferenzen zum NT₅₀-Titer des Stamms S1133.

4.6 Effekt von Auffrischungsimpfungen auf die Neutralisation

Um zu überprüfen, inwieweit sich die NT₅₀-Titer unterscheiden, wenn Hyperimmunseren durch ein- oder aber zweimalige Auffrischungsimpfung erzeugt werden, wurden Vergleichsuntersuchungen an Hyperimmunseren durchgeführt, die gegen drei Isolate gerichtet waren: gegen 8501DP4-6, 8914DP4-6 und 8474DP4-6. Die Zahl der neutralisierten Stämme musste dabei stark begrenzt werden, da bei der Erzeugung der Seren nach der ersten Auffrischungsimpfung nur eine geringe Menge an Serum gewonnen wurde. Ausgewählt wurden daher der Referenzstamm S1133, die beiden MAS-Isolate 8474DP4-6 und 8588DP4-6 sowie das dem jeweiligen Serum homologe Isolat. Dabei zeigten sich keine konsistenten Veränderungen. Zwar war der NT₅₀-Titer, das homologe Isolat betreffend, insbesondere bei a-8914 nach der zweiten Auffrischungsimpfung numerisch höherliegend, jedoch waren die Veränderungen in keinem Fall statistisch signifikant. Eine Auflistung der Werte findet sich in Tab. 5, eine graphische Darstellung in Abb. 9.

Tab. 5: Neutralisation nach ein oder zwei Auffrischungsimpfungen

	a-8501		a-8914		a-8474	
	1.Boostern	2.Boostern	1.Boostern	2.Boostern	1.Boostern	2.Boostern
S1133	9,0 ± 1,7	8,5 ± 1,0	9,7 ± 0,5	8,7 ± 1,2	6,0 ± 0,7	6,8 ± 1,7
8474DP4-6	4,6 ± 1,2	5,5 ± 1,0	4,8 ± 1,0	5,7 ± 0,7	4,9 ± 1,6	5,2 ± 0,7
8588Dp4-6	5,7 ± 1,7	4,9 ± 0,4	5,7 ± 1,2	5,5 ± 1,2	4,7 ± 1,2	3,5 ± 0,9
8501DP4-6	7,1 ± 1,0	7,2 ± 1,2				
8914DP4-6			6,7 ± 1,6	7,9 ± 0,8		

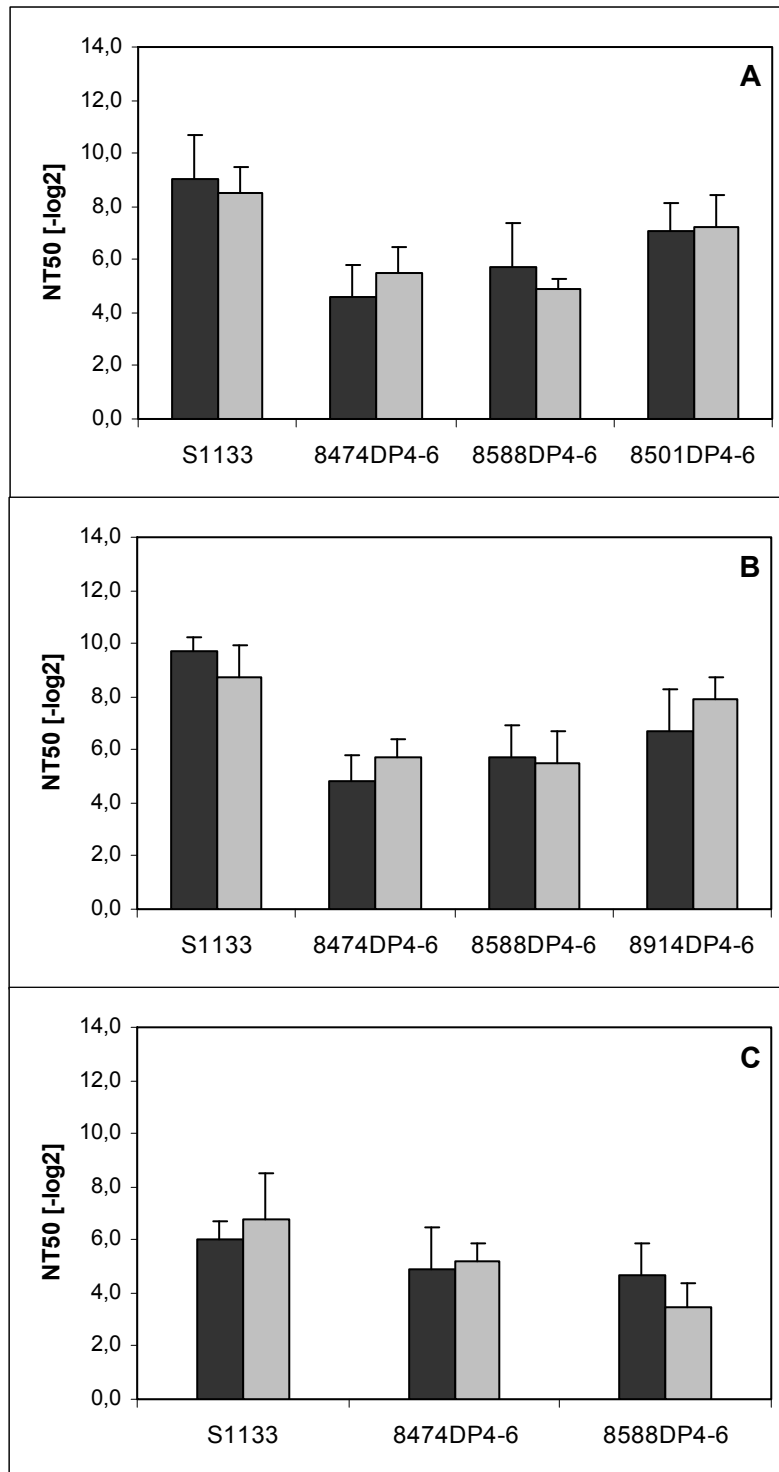


Abb. 9: Vergleich der NT₅₀-Titer von Hyperimmunseren nach ein oder zwei Auffrischungsimpfungen

In dieser Abbildung werden die NT₅₀-Titer der Hyperimmunseren a-8501 (A), a-8914 (B) sowie a-8474 (C) nach einer (dunkelgrauer Balken) oder zwei (hellgrauer Balken) Auffrischungsimpfungen dargestellt. Keine der Veränderungen war statistisch signifikant.

4.7 Ursprungsabhängige Neutralisation auf HEL-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass MAS-Isolate, verglichen mit S1133, eine höhere Neutralisationsresistenz aufweisen, da S1133 von allen Seren am besten erkannt wurde, die MAS-Isolate hingegen häufig wesentlich schlechter. Da Reoviren während der Aufnahme in die Zelle einen Reifungsprozess durchlaufen, der durch zelluläre Enzyme vermittelt wird (7, 27), könnten zelluläre Faktoren den Reifungsprozess und damit die Neutralisierbarkeit von Virus beeinflussen.

Daher wurden drei Isolate ausgewählt, nämlich S1133 sowie die MAS-Isolate 8588DP4-6 und 8474DP4-6, und von vier verschiedenen Geweben gewonnen: HEL- und HEF-Zellen sowie embryonale Leber und embryonaler Darm.

Zunächst wurden die gewonnenen Virusstocks auf HEL-Zellen titriert. Die Ergebnisse der Titrationen finden sich aufgelistet in Tab. 6 sowie graphisch dargestellt in Abb. 10. Dabei war der Titer bei Virusstocks embryonalen Ursprungs in nahezu allen Fällen erheblich höher als bei Virusstocks aus Zellkulturen. Insgesamt am höchsten lag er beim Stamm S1133, gewonnen aus embryonaler Leber; die Titer der MAS-Isolate, vor allem des Isolats 8474DP4-6, lagen allgemein deutlich darunter.

Alle Virusstocks wurden anschließend mit homo- und heterologen Hyperimmunseren untersucht. Die Ergebnisse finden sich aufgelistet in Tab. 8 sowie graphisch dargestellt in Abb. 11, die Signifikanzen sind in Tab. 7 angeführt.

Betrachtet man das Hyperimmunserum a-S1133, so ergeben sich beim Stamm S1133 nahezu identische NT_{50} -Titer unabhängig vom Virusursprung, die nur zwischen 12,0 und 13,7 [-log₂] variieren (A). Jedoch wird das von Zellkultur gewonnene Isolat 8588DP4-6 signifikant effizienter neutralisiert als Virus embryonalen Ursprungs. Der höchste NT_{50} -Titer wurde dabei bei Virus aus HEF-Zellen mit $9,5 \pm 0,4$ [-log₂] erreicht, während der geringste bei Virus aus embryonalem Darm mit $4,2 \pm 0,2$ [-log₂] auftrat.

Hingegen schien embryonaler Ursprung beim Isolat 8474DP4-6 die Neutralisierbarkeit zu erhöhen, denn hier wurden NT_{50} -Titer von 6,1 und 5,5 [-log₂] bei Virus aus embryonaler Leber und Darm erreicht, während sie bei Virus aus HEL- und HEF-Zellen nur bei 2,1 bzw. 2,3 [-log₂] lagen.

Beim Vakzinestamm S1133 ergab sich mit dem Serum a-8588 ein dem Serum a-S1133 vergleichbares Reaktionsmuster (B). Viruspräparationen jeglichen Ursprungs

wurden ungefähr gleich stark neutralisiert. Ein ähnliches Muster entstand auch beim Isolat 8588DP4-6, wo ebenfalls nur geringe NT₅₀-Titervariationen auftraten.

Jedoch zeigte sich bei der Untersuchung des Isolats 8474DP4-6, dass hier – wie schon bei Verwendung des a-S1133-Serums – höhere NT₅₀-Titer auftraten, wenn Virusstocks aus embryonalem Gewebe statt aus Zellkulturen gewonnen worden waren. Signifikante Unterschiede traten beim Vergleich der NT₅₀-Titer von HEL-Ursprung mit embryonalem Ursprung sowie von HEF-Ursprung mit embryonalem Ursprung auf, wohingegen die NT₅₀-Titer beim Vergleich der beiden Zellkulturursprünge oder beim Vergleich der beiden embryonalen Ursprünge untereinander kaum Differenzen aufwiesen.

Auch hier trat die schon früher beobachtete Immundominanz des Stammes S1133 auf. Allerdings war der NT₅₀-Titer des Isolats 8474DP4-6 aus embryonalem Darm gleich hoch wie derjenige des Stammes S1133 aus demselben Gewebe.

Wenn man die Ergebnisse, die mit dem Hyperimmunserum a-8474 erzielt wurden, betrachtet, zeigt auch hier der Vakzinestamm S1133 nur geringfügige Titervariationen, mit einer Ausnahme: der NT₅₀-Titerunterschied zwischen HEF- und Leber-Ursprung ist signifikant (C). Für das Isolat 8588DP4-6 ergaben sich nicht signifikant variierende NT₅₀-Titer bei den variierenden Virusursprüngen. Ähnliche, jedoch klarer zu Tage tretende NT₅₀-Titerdifferenzen wurden erkennbar, wenn das MAS-Isolat 8474DP4-6 näher betrachtet wurde: Virus zellulären Ursprungs wurde deutlich bis signifikant geringer neutralisiert als Virus embryonalen Ursprungs. Deutliche numerische Unterschiede waren dabei zwischen Virus aus HEL-Zellen und solchen aus embryonalem Ursprung sichtbar, signifikante Unterschiede beim Vergleich der Titer von Virus aus HEF-Zellen und Leber-/ Darm-Ursprung.

Tab. 6: Virusstocks für ursprungsabhängige Neutralisation

Virusursprung	Titer			
	auf HEL		auf HEF	
8474/ HEL	3,1 ±	1,3 x10 ⁴	20,4 ±	5,6 x10 ⁴
8474/HEF	5,9 ±	2,0 x10 ⁴	19,6 ±	5,6 x10 ⁴
8474/ embryonale Leber	17,6 ±	5,9 x10 ⁴	22,8 ±	13,5 x10 ⁴
8474/ embryonaler Darm	8,1 ±	1,6 x10 ⁴	7,6 ±	2,9 x10 ⁴
8588/ HEL	2,1 ±	1,2 x10 ⁴		
8588/ HEF	4,4 ±	2,0 x10 ⁴		
8588/ embryonale Leber	66,7 ±	18,4 x10 ⁴		
8588/ embryonaler Darm	30,2 ±	6,3 x10 ⁴		
S1133/ HEL	90,2 ±	20,2 x10 ⁴		
S1133/ HEF	328,6 ±	190,1 x10 ⁴		
S1133/ embryonale Leber	571,6 ±	96,0 x10 ⁴		
S1133/ embryonaler Darm	447,0 ±	114,1 x10 ⁴		

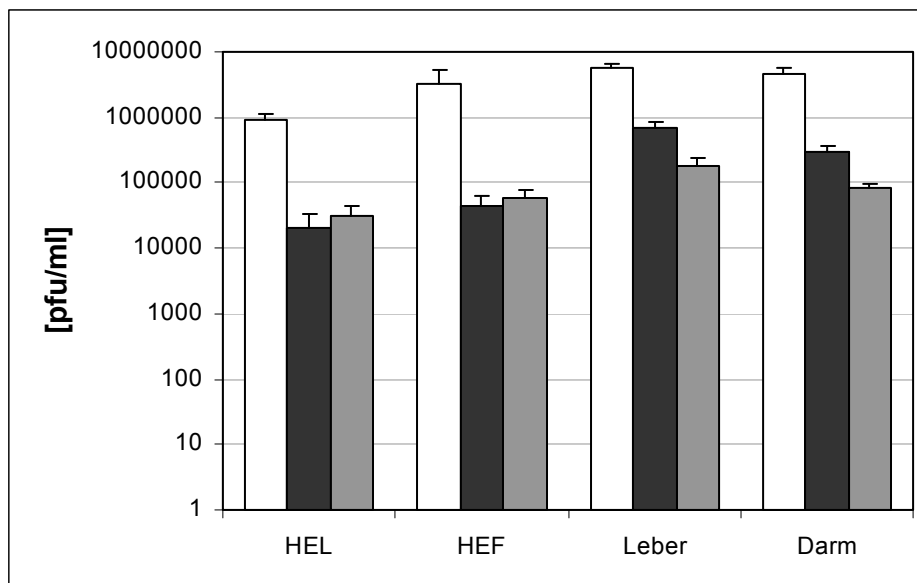


Abb. 10: Vergleich der Virustiter dreier Isolate aus verschiedenen Geweben

Die Abbildung zeigt – unter Verwendung einer logarithmischen Skala – die Titer von Virusstocks der Stämme S1133 (weiß), 8588DP4-6 (dunkelgrau) und 8474DP4-6 (hellgrau), gewonnen aus HEL- und HEF-Zellenkulturen sowie aus embryonalem Gewebe (Leber und Darm).

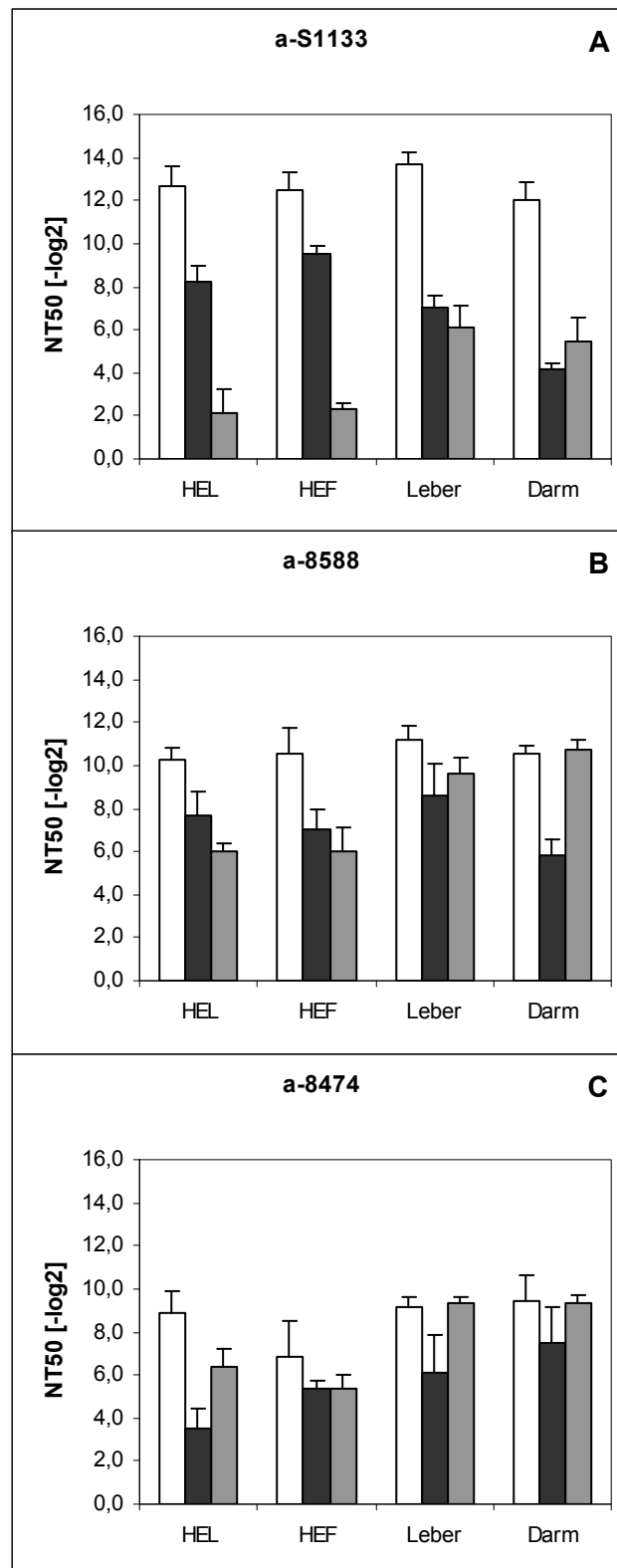


Abb. 11: Ursprungsabhängige Neutralisation bei drei ausgewählten Stämmen

Die Abbildung zeigt NT₅₀-Titer, die mit drei verschiedenen Hyperimmunseren, nämlich a-S1133 (A), a-8588 (B) und a-8474 (C) erzielt wurden. Dabei wurden die Virusstämme S1133 (weiß), 8588DP4-6 (dunkelgrau) und 8474DP4-6 (mittelgrau) von drei verschiedenen Geweben gewonnen und auf HEL-Zellen neutralisiert.

Tab. 7: Signifikante NT₅₀-Titer-Differenzen (p ≤ 0,05)

	8474DP4-6						8588DP4-6						S1133										
	HEL	a-S1133	a-8588	a-8474	HEF	emb. Leber	emb. Darm	HEL	a-S1133	a-8588	a-8474	HEF	emb. Leber	emb. Darm	HEL	a-S1133	a-8588	a-8474	HEF	emb. Leber	emb. Darm		
von HEL	X																						
von HEF	X																						
von emb. Leber	X		X																				
von emb. Darm	X		X																				
von HEL	X						X																
von HEF	X						X																
von emb. Leber																							
von emb. Darm																							
von HEL	X																						
von HEF	X																						
von emb. Leber	X																						
von emb. Darm	X																						

Signifikanzen sind reziprok und wurden nur an einer Stelle eingetragen.

Tab. 8: Ursprungsabhängige Neutralisation bei drei ausgewählten Stämmen

Virusursprünge	Serum			
	a-S1133	a-429	a-8588	a-8474
8474 von HEL	2,1 ± 1,1	6,4 ± 1,0	6,0 ± 0,4	6,4 ± 0,8
8474 von HEF	2,3 ± 0,3	5,7 ± 0,6	6,0 ± 1,1	5,4 ± 0,6
8474 von emb. Leber	6,1 ± 1,0	7,8 ± 1,1	9,6 ± 0,8	9,3 ± 0,3
8474 von emb. Darm	5,5 ± 1,1	10,7 ± 0,7	10,7 ± 0,5	9,3 ± 0,4
8588 von HEL	8,2 ± 0,8		7,7 ± 1,1	3,5 ± 0,9
8588 von HEF	9,5 ± 0,4		7,0 ± 1,0	5,4 ± 0,3
8588 von emb. Leber	7,0 ± 0,6		8,6 ± 1,5	6,1 ± 1,8
8588 von emb. Darm	4,2 ± 0,2		5,8 ± 0,8	7,5 ± 1,7
S1133 von HEL	12,7 ± 0,9		10,3 ± 0,5	8,9 ± 1,0
S1133 von HEF	12,5 ± 0,8		10,5 ± 1,2	6,8 ± 1,7
S1133 von emb. Leber	13,7 ± 0,5		11,2 ± 0,6	9,2 ± 0,4
S1133 von emb. Darm	12,0 ± 0,9		10,5 ± 0,4	9,4 ± 1,2

4.8 „Relatedness“-Werte

Um antigenetische Verwandtschaft zu charakterisieren, wurden – nach Archetti und Horsfall (5) – „Relatedness“-Werte bestimmt und in Tab. 9 aufgelistet. Die den dort präsentierten Werten zugrunde liegenden NT₅₀-Titer, ausgedrückt als reziproke Serumverdünnung, wurden in Tab. 10 beigegeben.

Wenn man die Werte vergleicht, die aus den NT₅₀-Titern von Virus stammen, das aus HEL-Zellen gewonnen wurde, sind Unterschiede zwischen S1133 und den MAS-Isolaten erkennbar. Eine Ausnahme bildet das Isolat 8588DP4-6, das mit S1133 einen R-Wert von 58 % besitzt und einen näheren Verwandtschaftsgrad aufweist. Jedoch sind insbesondere die anderen MAS-Isolate aus Süddeutschland eng mit 8588DP4-6 verwandt. Das norddeutsche Isolat 8914DP4-6 zeigt sich am weitesten entfernt von jedem anderen Isolat.

Berechnet man allerdings die R-Werte mit den Ergebnissen der ursprungsabhängigen Neutralisation, ergeben sich einige Verschiebungen. Betrachtet man Virus aus embryonalen Lebern, scheinen die beiden MAS-Isolate 8588DP4-6 und 8474DP4-6 weiter entfernt von S1133 einzuordnen zu sein als bei Gewinnung von Virusstocks aus Zellkulturen. S1133 und 8588DP4-6 haben nun einen gemeinsamen R-Wert von 25 %, und das Paar S1133 – 8474DP4-6 weist einen R-Wert von nur 7 % statt 10 % wie zuvor auf.

Betrachtet man Virus aus embryonalem Darm, kann man eine ähnliche Verschiebung erkennen. Eine Berechnung des R-Werts für das Paar 8588DP4-6 –

8474DP4-6 war jedoch nicht möglich, da 8474DP4-6 sogar bei Verwendung des a-8588-Serums wesentlich besser neutralisiert wurde.

Tab. 9: Relatedness-Werte

	Virus 1	Virus 2	Relatedness-Wert	Interpretation
aus Zellkultur	S1133	8588DP4-6/05	58%	näherer Subtyp
	S1133	8914DP4-6/05	14%	fernerer Subtyp
	S1133	8501DP4-6/05	12%	fernerer Subtyp
	S1133	8474DP4-6/05	10%	fernerer Subtyp
	8588DP4-6/05	8914DP4-6/05	40%	näherer Subtyp
	8588DP4-6/05	8501DP4-6/05	68%	näherer Subtyp
	8588DP4-6/05	8474DP4-6/05	86%	kein Unterschied
	8914DP4-6/05	8501DP4-6/05	25%	fernerer Subtyp
	8914DP4-6/05	8474DP4-6/05	44%	näherer Subtyp
8501DP4-6/05	8474DP4-6/05	45%	näherer Subtyp	
aus embryonalem Gewebe	S1133/Leber	8588/Leber	25%	fernerer Subtyp
	S1133/Leber	8474/Leber	7%	Serotyp
	8588/Leber	8474/Leber	45%	näherer Subtyp
	S1133/Darm	8588/Darm	34%	näherer Subtyp
	S1133/Darm	8474/Darm	11%	fernerer Subtyp
	8588/Darm	8474/Darm	>100%	kein Unterschied

Tab. 10: Geometrisches Mittel aus mindestens vier NT₅₀-Titern pro reziproke Serumverdünnung

		Hyperimmunsera				
		a-S1133	a-8588	a-8914	a-8501	a-8474
Virus	S1133	5677	1397	426	344	109
	8588DP4-6/05	279	203	47	29	12
	8914DP4-6/05	64	160	237	37	32
	8501DP4-6/05	33	722	59	149	23
	8474DP4-6/05	17	459	51	46	36
	S1133/Leber	12759	2392			605
	8588/Leber	125	390			67
	8474/Leber	69	763			647
	S1133/ Darm	4151	1430			640
	8588/Darm	18	55			24
	8474/Darm	45	1713			613

4.9 Einfluss der Wirtszelle auf die Neutralisation

Da das Isolat 8474DP4-6 deutliche NT_{50} -Titerunterschiede aufwies, wenn verschiedene Virusursprünge verglichen wurden, wurde in Folgeuntersuchungen die Neutralisationsreaktion in zwei verschiedenen Wirtszellsystemen durchgeführt, nämlich auf HEL- und HEF-Zellen (Abb. 13).

Zunächst wurden die vier Virusstocks des Isolats 8474DP4-6 jedoch sowohl auf HEL- als auch auf HEF-Zellen titriert. Dabei ergaben sich deutlich höhere Virustiter, wenn Stocks zellulären Ursprungs auf HEF- statt auf HEL-Zellen titriert wurden, während solche Unterschiede bei Stocks embryonalen Ursprungs nicht oder nur geringfügig vorhanden waren. Eine graphische Darstellung findet sich in Abb. 12, eine Ergebnisauflistung ist in Tab. 6 (S.81) integriert.

Wenn man bei der Neutralisation das homologe Hyperimmunserum a-8474 (C) betrachtet, lassen sich Unterschiede in der Neutralisation zwischen Virus zellulären und embryonalen Ursprungs nur erkennen, wenn die Tests auf HEL-Zellen durchgeführt werden. Auf HEF-Zellen war die Neutralisation von Virus zellulären Ursprungs effizienter, aber die NT_{50} -Titer waren bei Virus embryonalen Ursprungs nicht erhöht.

Ein ähnliches Muster konnte bei Verwendung von a-S1133-Serum beobachtet werden (A). Prinzipiell galt dies auch für die Verwendung des Serums a-8588 (B), jedoch waren die NT_{50} -Titerunterschiede beim Vergleich der Neutralisationsreaktion auf HEF- und HEL-Zellen geringer.

Setzte man das gepoolte Elterntierserum EH429 ein (D), waren Neutralisationsunterschiede zwischen Virus zellulären und embryonalen Ursprungs nur dann sichtbar, wenn ein HEL-Zellsystem verwendet wurde. Eine Auflistung der Ergebnisse findet sich in Tab. 11.

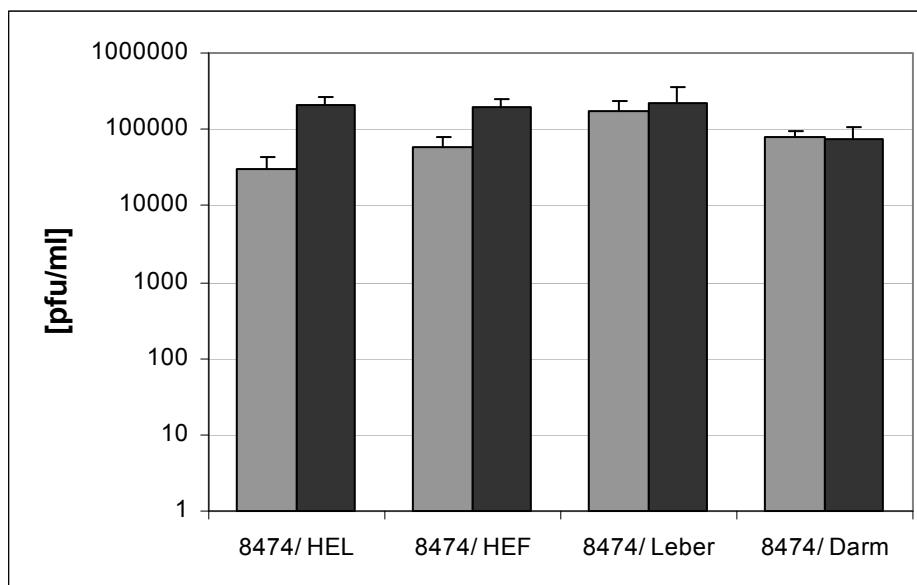


Abb. 12: Isolat 8474, titriert auf HEL- und HEF-Zellen

Die Abbildung zeigt – unter Verwendung einer logarithmischen Skalierung – die Titration des Isolats 8474DP4-6. Dabei wurden Stocks aus vier verschiedenen Geweben gewonnen und auf HEL- (mittelgraue Balken) und HEF-Zellen (dunkelgrauer Balken) titriert.

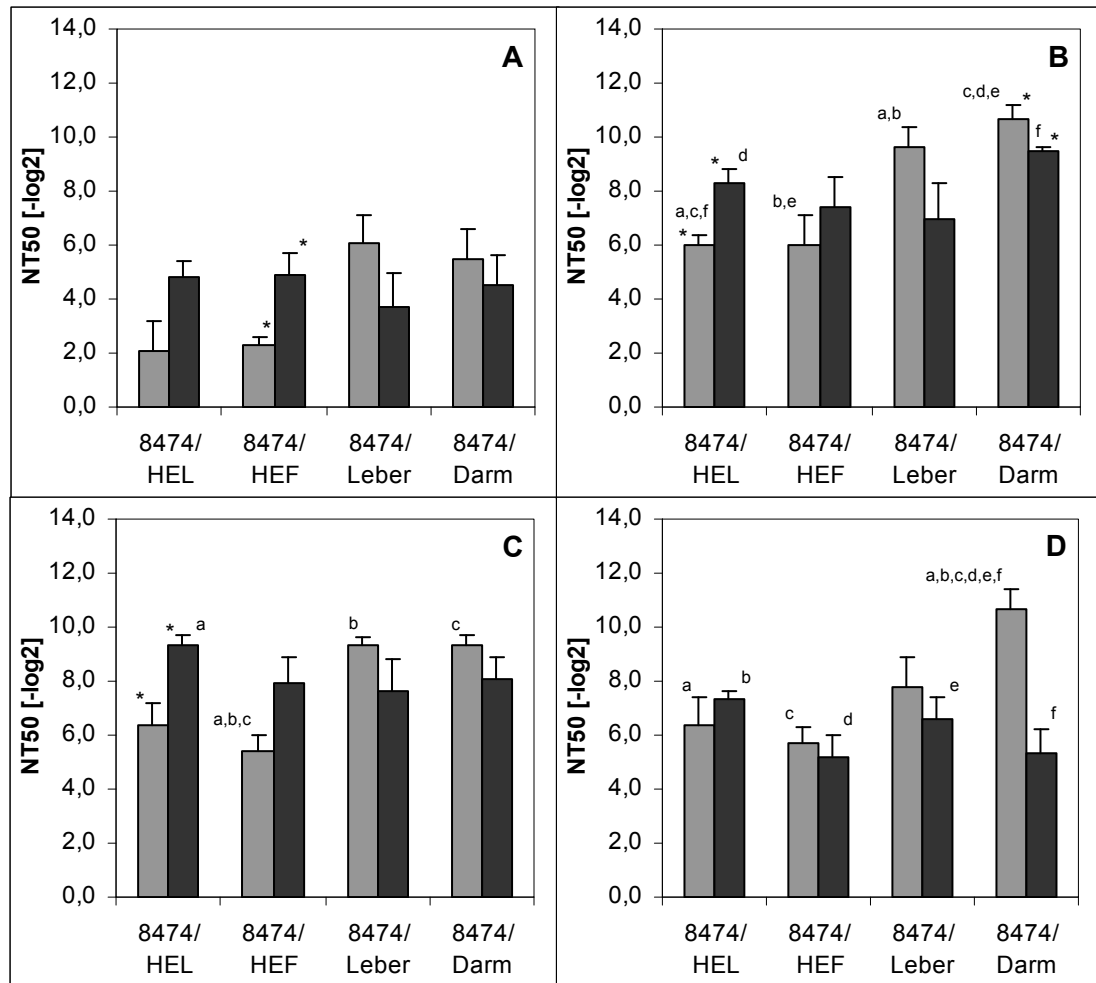


Abb. 13: Einfluss des Wirtszellsystems auf die Neutralisation

In dieser Abbildung sind NT_{50} -Titer graphisch dargestellt, die mit vier verschiedenen Seren, nämlich a-S1133 (A), a-8588 (B), a-8474 (C) und EH 429 (D) auf zwei verschiedenen Wirtszellsystemen erzielt wurden. Der mittelgraue Balken repräsentiert dabei HEL-, der dunkelgraue Balken HEF-Zellen. Für die Untersuchungen wurde das Virusisolat 8474DP4-6 eingesetzt, das aus vier verschiedenen Geweben gewonnen worden war.

Gleiche Buchstaben stehen für statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$), * für Unterschiede $\geq 2x$ Standardabweichung.

Tab. 11: Wirtszellabhängige Neutralisation

Virusursprung	Seren											
	a-S1133		a-429		a-8588		a-8474					
	auf HEL	auf HEF	auf HEL	auf HEF	auf HEL	auf HEF	auf HEL	auf HEF	auf HEL	auf HEF	auf HEL	auf HEF
8474 von HEL	2,1 ± 1,1	4,8 ± 0,6	6,4 ± 1,0	7,3 ± 0,3	6,0 ± 0,4	8,3 ± 0,5	6,4 ± 0,8	9,3 ± 0,4				
8474 von HEF	2,3 ± 0,3	4,9 ± 0,8	5,7 ± 0,6	5,2 ± 0,8	6,0 ± 1,1	7,4 ± 1,1	5,4 ± 0,6	7,9 ± 1,0				
8474 von emb. Leber	6,1 ± 1,0	3,7 ± 1,3	7,8 ± 1,1	6,6 ± 0,8	9,6 ± 0,8	7,0 ± 1,3	9,3 ± 0,3	7,6 ± 1,2				
8474 von emb. Darm	5,5 ± 1,1	4,5 ± 1,1	10,7 ± 0,7	5,3 ± 0,9	10,7 ± 0,5	9,5 ± 0,1	9,3 ± 0,4	8,1 ± 0,8				

4.10 Adaptation eines MAS-Isolats nach häufiger Passage auf HEF-Zellen

Da S1133 an HEF-Zellen adaptiert war, die MAS-Isolate jedoch auf HEL-Zellen isoliert und vermehrt worden waren, wurde anhand eines ausgewählten Isolats, 8474DP4-6, die Auswirkung einer möglichen Zelladaptation untersucht. Dieses Isolat wurde siebenmal auf HEF-Zellen passagiert und anschließend mit allen Hyperimmunseren neutralisiert.

Unter Verwendung der Hyperimmunseren a-8914, a-8501 und a-8474 zeigte sich eine deutlich effizientere Neutralisation des häufig auf HEF-Zellen passagierten Virusstocks von Isolat 8474DP4-6, verglichen mit seinem auf HEL-Zellen vermehrten Pendant. Die Differenz der NT_{50} -Titer betrug dabei 2,2 bis 3,4 $[-\log_2]$ -Stufen, war aber nicht signifikant, sondern nur numerisch erkennbar.

Bei Verwendung der Seren a-S1133 oder a-8588 waren die NT_{50} -Titer des HEF-adaptierten Virusstocks, verglichen mit dem ursprünglichen Isolat, jedoch nicht erhöht. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 12.

Tab. 12: Adaptation eines MAS-Isolats nach häufiger Passage auf HEF-Zellen

		Hyperimmunserum				
		a-S1133	a-8588	a-8914	a-8501	a-8474
Virus- Isolat	S1133	12,5 ± 0,8	10,5 ± 1,2	8,7 ± 1,2	8,5 ± 1,0	6,8 ± 1,7
	8474DP4-6	4,1 ± 0,4	8,8 ± 0,5	5,7 ± 0,7	5,5 ± 1,0	5,2 ± 0,7
	8474 p7/ HEF	3,8 ± 0,9	8,2 ± 2,3	7,9 ± 1,2	8,2 ± 1,3	8,6 ± 0,2

5 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen folgten der Fragestellung, ob es sich bei den aus Broilern trotz Elterntierimmunisierung isolierten aviären Reoviren um Varianten handelt, die den Impfschutz unterlaufen können. Dafür wurden antigenetische Unterschiede zwischen ARV-Isolaten des Jahres 2004 und dem gebräuchlichen Impfstamm sowie Stämmen, die in bestandsspezifischen Impfstoffen Verwendung fanden, mittels Kreuzneutralisationstests bestimmt.

Verschiedene Plaquetypen aviärer Reoviren

Bereits bei anfänglichen Versuchen, Plaquetitrationen nach herkömmlicher Methode durchzuführen, fielen Isolate auf, die nur sehr kleine Plaqueformen und Synzytien ausbildeten. Da für diese Isolate Titrationsergebnisse nicht wiederholbar waren, wurde ein immunhistochemisches Färbeverfahren an Reoviren adaptiert. Auch innerhalb dieses Verfahrens fielen drei verschiedene Plaquetypen auf: ein klassischer Typ mit großen, runden Synzytien und ebensolchen Plaques, ein Typ mit winzigen Synzytien und kleinen Plaques sowie ein Typ mit ausgedehnten, flächigen Synzytien und großen Plaques. Dabei entwickelten neben dem Vakzinestamm S1133 weitere sieben Isolate einschließlich des MAS-Isolats 8914DP4-6 den „klassischen“ Plaquetyp, drei Isolate den kleinen Typ, für den exemplarisch das MAS-Isolat 8588DP4-6 steht, und ein Isolat die ausgedehnte Form, nämlich das MAS-Isolat 8474DP4-6.

In der Literatur finden sich verschiedene Plaquetypen kurz in einer amerikanischen Studie erwähnt und abgebildet. Hierbei gab es Stämme, deren Plaques nach zehn Tagen Inkubationszeit 1 – 4,5 mm groß waren, solche mit 1 – 4 mm großen Plaques sowie Stämme mit 1 – 3 mm großen. Die Plaquetypen fanden sich dabei über Isolate aus Tieren mit verschiedenen Krankheitsbildern verteilt (79). Beim Vergleich von Puten- und Hühnerisolaten bildeten Putenisolate auf Hühnerzellkulturen kleinere Plaques aus. Als mögliche Erklärung wurde eine schlechtere Adaptation an Hühnerzellen angenommen. Einen Zusammenhang zwischen der Ausprägung des cytopathischen Effekts auf Zellkulturen – ohne jedoch von verschiedenen Plaquetypen zu sprechen – nahm eine japanische Studie an, bei der 17 von 89 Isolaten mit ausgeprägtem cpE sich als besonders pathogen für Küken und

Embryonen erwiesen, während sich Isolate mit undeutlichem cpE nur wenig pathogen zeigten (173).

Im vorliegenden Fall erbrachte die Vermehrung der Isolate auf Zellkulturen zur Erzeugung von Arbeitsstocks für Isolate aller Plaquetypen mit Ausnahme zweier „klassischer“ Stämme (S1133, K261/97) Endtiter ungefähr gleicher Höhe, nur das Isolat 8501DP4-6 (kleiner Plaquetyp) blieb dabei noch etwas darunter, sodass sich zumindest für Zellkulturen keine Unterschiede ergeben. Auch ließ sich keine Zuordnung eines Plaquetyps zu einem bestimmten Pathotyp treffen, da sich aus Fällen von MAS isolierte Reoviren über alle Plaquetypgruppen verteilten.

Für die Ausbildung von Plaques werden zumindest zwei Proteine verantwortlich gemacht. Bei einem handelt es sich um das Adsorptionsprotein σ C, für das ein Zusammenhang mit Apoptose hergestellt wurde (157). Das andere Protein ist p10, dessen Ektodomäne Zellfusion induzieren kann (159) und dessen Endodomäne die Membranpermeabilität erhöht (8). Dabei wird die Zellfusionsrate offenbar über einen Degradierungseffekt in Zellen gegenüber p10 gesteuert: je schneller p10 degradiert wird, bevor es in die Zellmembran eingebaut ist, desto geringer ist das Ausmaß der Zellfusionen (159). Insgesamt befördert Zellfusion eine rasche Virusausbreitung und lässt das Virus zwischen Zellen passieren, ohne neutralisierenden Antikörpern ausgesetzt zu sein (28). Demzufolge könnten Stämme mit großen Synzytien einen Selektionsvorteil durch Neutralisationsresistenz besitzen, jedoch müsste diese Frage noch näher untersucht werden.

Adaptation eines Plaquereduktionstests an aviäre Reoviren

Um eine Vielzahl unterschiedlicher aviärer Reovirusisolate einschließlich solcher mit Ausbildung kleiner Plaquetypen wiederholbar titrieren und neutralisieren zu können, wurde ein Plaquereduktionstest mit immunhistochemischem Färbeverfahren an Reoviren adaptiert.

Dabei wurden die Untersuchungen auf primären Zellen durchgeführt, um möglichst nahe an der Situation in vivo hinsichtlich der Enzym- und Rezeptorausstattung der Wirtszellen zu bleiben und eine Veränderung der Isolate während der Adaptation an ein permanentes Zellsystem weitgehend zu vermeiden.

In der Literatur waren bei einem Vergleich verschiedener Zelllinien teilweise bis zu zehn Blindpassagen notwendig, um einen cytopathischen Effekt hervorzurufen (6). Bei Neutralisationsuntersuchungen mit monoklonalen Antikörpern waren auch

Unterschiede in der Neutralisierbarkeit erkennbar, wenn verschiedene Zelltypen verwendet wurden (152, 200).

Der Hauptteil der eigenen Untersuchungen wurde dabei auf Hühnerembryoleberzellen durchgeführt. Die Plaques und Synzytien erwiesen sich dabei als deutlich größer und leichter auszählbar als bei Verwendung von Hühnerembryofibroblasten. Zudem spielt die Leber eine bedeutende Rolle als Zielorgan in experimentell infizierten Hühnerembryonen und Küken (43). HEL-Zellen wurden darüber hinaus als hochempfindlich für Reovirusinfektionen beschrieben (6, 48).

Die Verwendung eines halbfesten statt eines festen Überschichtungsmediums (Carboxymethylcellulose statt Zellkulturagar) ermöglichte eine Fixierung infizierter Zellkulturen nach zwei Tagen Inkubationszeit. Der Vorteil daran liegt nicht nur in einer Zeitersparnis, sondern auch in der Vermeidung von Artefakten aufgrund von Alterungseffekten bei primären Zellen.

Dabei konnte die immunhistochemische Färbemethode im Gegensatz zu Färbeverfahren mit Neutralrot (79, 140, 173, 192), Kristallviolett (141) oder Giemsa bereits nach zwei Tagen antigenpositive Zellgruppen erfassen, die außer vermehrter Vakuolenbildung und leicht irregulärer Strukturen noch keine deutlichen morphologischen Veränderungen aufwiesen. Eine solche Methode wurde beispielsweise für die Plaquetitration von Borna Disease Virus (129) oder bovinem Immundefizienzvirus (112) beschrieben, wo die Inkubationszeit ebenfalls deutlich von 120 auf 48 Stunden verringert werden konnte.

Auf der Grundlage von jeweils bis zu 76 Titrationstests erwies sich die Methode als geeignet, bei allen verwendeten Virusstämmen und -isolaten wiederholbare Titrationsergebnisse zu erzielen. Neben der Plaquetitration waren auch Versuche, Plaqueneutralisationstests durchzuführen, erfolgreich. Die Charakteristika der Neutralisation beim Referenzstamm S1133 glichen den allgemein erwarteten Neutralisationskurven (102) bezüglich des Verhältnisses von Serumverdünnung [$-\log_2$] und Restinfektiosität [%]. Ein 50 %-Neutralisationstiter wurde als Vergleichswert ausgewählt, da zum einen im Bereich hoher Restinfektiosität die Variabilität der Ergebnisse stark zunahm. Zum anderen besaßen einige verwendete Seren nicht die Neutralisationskapazität, einen Bereich um 10 % Restinfektiosität/ 90 % Neutralisation für alle Isolate abzudecken. Ein 50 %-Neutralisationstiter erlaubte also die größtmögliche Differenzierung antigenetischer Unterschiede.

Antigenetische Heterogenität aviärer Reoviren im Kreuzneutralisationstest

Um die gewonnenen Reovirusisolate aus Broilern mit MAS zu charakterisieren, wurden Kreuzneutralisationsuntersuchungen durchgeführt, in die außer den MAS-Isolaten auch der Vakzinestamm S1133, in stallspezifischen Vakzinen verwendete K-Stämme sowie der niederländische ERS-Stamm SP2004-00344 Eingang fanden. Hyperimmunseren wurden jedoch nur gegen S1133 sowie die MAS-Isolate 8588DP4-6, 8501DP4-6, 8474DP4-6 und 8914DP4-6 erzeugt. Ein weiteres, nicht selbst produziertes Hyperimmunserum gegen einen der K-Stämme wurde ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen. Alle dieser Seren wiesen neutralisierende Eigenschaften auf. Keines der Seren konnte jedoch 2500 pfu/ml vollkommen neutralisieren. Auch unterschied sich die Neutralisationskapazität der verschiedenen Seren stark. Insbesondere das gegen einen K-Stamm gerichtete Hyperimmunserum konnte die Infektiosität von nur vier Stämmen zu 50 % oder mehr neutralisieren, bei allen anderen Seren konnte jedoch für jeden Virusstamm ein NT_{50} -Titer errechnet werden. Das Serum a-S1133 besaß dabei den höchsten NT_{50} -Wert mit 12,5 [-log₂], während der höchste überhaupt erzielte NT_{50} -Titer des Serums a-8484 nur 6,8 [-log₂] betrug.

Zwar war das Hyperimmunserum, das gegen S1133 gerichtet ist, mit einer pro Applikation größeren Anzahl plaquebildender Einheiten erzeugt worden als die Hyperimmunseren gegen die MAS-Isolate, jedoch wurden drei dieser MAS-Seren nicht mit zweimaliger, sondern mit dreimaliger Virusapplikation erzeugt, ohne dass die Neutralisationskapazität dieselbe Höhe wie die des Serums a-S1133 erreicht hätte. Die Unterschiede sind daher als Hinweis auf eine unterschiedliche Immunogenität der eingesetzten Stämme zu werten.

Bei Betrachtung der NT_{50} -Titer, die von den verschiedenen Hyperimmunseren gegenüber den verschiedenen Virusstämmen erzielt wurden, lässt sich eine große Heterogenität der Isolate erkennen. Wo etwa das Serum a-S1133 einen NT_{50} -Titer von 12,5 [-log₂] bei der Neutralisation des homologen Stammes S1133 aufwies, waren die NT_{50} -Titer bei der Neutralisation der MAS-Isolate 4,2 bis 8,4 [-log₂]-Stufen niedriger. Große Unterschiede zeigten sich auch bei den anderen Hyperimmunseren. Jedoch waren die Ergebnisse häufig nicht reziprok. Von allen Seren im niedrigsten Bereich erkannt wurde dabei der stallspezifische K-Stamm K1284/02, der niederländische ERS-Stamm dagegen war mit jeweils mittleren Werten wenig auffällig. Da der Stamm 8474DP4-6, der als einziger große, flächenhafte Synzytium

und Plaques ausbildet, insbesondere vom Serum a-S1133, aber auch von anderen Hyperimmunseren sowie Elterntierseren mit niedrigen NT_{50} -Titern erkannt wird, könnte man darin einen Hinweis auf einen Selektionsvorteil solcher Plaquetypen sehen.

Bei der Neutralisation der verschiedenen Stämme durch vier verschiedene Serumpools aus Elterntierherden wurde der Stamm S1133 jeweils am besten erkannt. Insgesamt zeigten die Elterntierseren jedoch eine breite Neutralisationskapazität mit durchgängig hohen und mittleren NT_{50} -Titern. Mit im Vakzineprotokoll enthaltene K-Stämme wurden wie die übrigen MAS-Isolate schlechter als S1133 erkannt.

Große Heterogenität von ARV-Isolaten ist auch aus der Literatur bekannt, wo sich meist eine ausgeprägte Kreuzreaktivität (41, 58, 113, 138, 140, 142, 144, 145, 204) einschließlich des Auftretens nicht-reziproker Neutralisation zwischen heterogenen Stämmen ergab (58, 79, 204).

Auffallend bei den Ergebnissen der hier durchgeführten Kreuzneutralisationsuntersuchungen war, dass der Vakzinestamm S1133 nicht nur von dem ihm homologen Hyperimmunserum a-S1133, sondern von allen verwendeten Hyperimmunseren einschließlich des Serums a-K stets am besten erkannt wurde, selbst besser als die jeweils homologen Isolate.

Auch bei früheren Studien kam es vor, dass einzelne Stämme besser oder gleich stark neutralisiert wurden als bzw. wie der dem jeweiligen Serum homologe Stamm (58, 116, 142, 144, 173, 204), jedoch trat dieses Phänomen nicht so auffällig zu Tage und wurde nicht weiter verfolgt.

Aufgrund dieser Ergebnisse und eingedenk des Reifungsprozesses, den Reoviren enzymvermittelt während der Aufnahme in Zellen durchlaufen (7, 27), stellte sich die Frage, ob das verwendete Testsystem ein reines Abbild antigenetischer Verwandtschaft zwischen Reovirusstämmen und -isolaten ist oder vom Ursprung des Virusstocks und der verwendeten Zielzelle wesentlich geprägt ist.

Daher wurden Folgeuntersuchungen an ausgewählten Isolaten durchgeführt, die den Ursprung von Virusstocks sowie das für die Neutralisationsreaktionen verwendete Zellsystem berücksichtigten.

Abhängigkeit des Neutralisationsgrads vom Virusursprung und dem Wirtszellsystem

Für die Untersuchung der Ursprungs- und Wirtszellabhängigkeit der Neutralisation wurden drei Stämme ausgewählt: der Vakzinestamm S1133 als Referenzstamm, das MAS-Isolat 8474DP4-6 vom großen Plaquetyp, das insbesondere vom Serum a-S1133 nur schlecht neutralisiert wurde, dessen NT_{50} -Titer aber auch mit anderen Seren im eher unteren Bereich lagen, und das MAS-Isolat 8588DP4-6 vom kleinen Plaquetyp mit mittleren NT_{50} -Titern. Anschließend wurden diese Stämme aus vier verschiedenen Geweben gewonnen: von HEL-Zellen, HEF-Zellen, aus embryonalem Darm und embryonaler Leber. Diese Virusstocks wurden dann auf HEL-Zellen neutralisiert, analog zu vorangegangenen Untersuchungen.

Dabei erwies sich das Reaktionsmuster des Vakzinestamms S1133 als unabhängig vom Ursprung der Virusstocks und blieb durchgehend stabil. Das Isolat 8474DP4-6 hingegen wurde insbesondere von dem ihm homologen Serum a-8474 deutlich besser neutralisiert, wenn die Stocks von embryonalem Gewebe gewonnen worden waren. Die Immundominanz des Stamms S1133 wurde also reduziert bzw. vollkommen aufgehoben.

Das gleichförmige Reaktionsmuster des Stamms S1133 kann dabei darauf zurückzuführen sein, dass der Vakzinestamm hochadaptiert an Ei- und Zellkulturen ist, nicht jedoch die Feldisolate aus vom MAS betroffenen Broilerherden. Darauf weist auch die partielle Angleichung der NT_{50} -Titer nach siebenmaliger Passagierung des Isolats 8474DP4-6 auf HEF-Zellen an die NT_{50} -Titer von S1133 hin (Tab. 6).

Unterschiede in der Neutralisierbarkeit der MAS-Isolate, insbesondere des Isolats 8474DP4-6, traten dabei nur auf, wenn die Neutralisationsreaktion auf HEL-Zellen, nicht jedoch, wenn sie auf HEF-Zellen durchgeführt wurde.

Abhängigkeit der Neutralisationsreaktion bei aviären Reoviren vom verwendeten Zellsystem wurde auch in der Literatur erwähnt. Neutralisation mit monoklonalen Antikörpern fand teilweise nur in Vero- oder nur in HN-Zellen statt oder wies zumindest graduelle Unterschiede der Neutralisationstiter auf (152, 200).

Mögliche Ursachen der beobachteten Teilneutralisation von MAS-Isolaten

Aus den Untersuchungen zur Ursprungs- und Wirtszellabhängigkeit der Neutralisationsreaktion geht hervor, dass auf HEL-Zellen MAS-Isolate embryonalen Ursprungs besser neutralisiert werden können als zellulären Ursprungs und die

Immundominanzeffekte von S1133 verringert bis aufgehoben werden, wohingegen auf HEF-Zellen das Reaktionsmuster gleichförmiger bleibt.

Eine Erklärung dafür wäre das Vorliegen zweier verschiedener Partikelformen – Virionen und ISVPs – zu jeweils unterschiedlichen prozentualen Anteilen. ISVPs unterscheiden sich von Virionen durch einen Verlust des äußeren Kapsidproteins σ_B , eine veränderte Konformation des Adsorptionsproteins σ_C , das im Virion in einer kompakten, im ISVP jedoch gestreckten Form vorkommt, und im Vorliegen von δ , das aus dem Protein μ_{BC} durch Cleaving hervorgeht (7, 27).

Hierbei würde der Vakzinestamm S1133 sowohl bei Zellkulturursprung als auch bei Gewinnung aus embryonalem Gewebe zu einem hohen Prozentanteil als ISVP vorliegen, während die MAS-Isolate nur bei embryonalem Ursprung vermehrt ISVP-Form aufwiesen, bei zellulärem Ursprung jedoch einen höheren Prozentsatz an Virionen. Verantwortlich für diese Unterschiede könnte eine unterschiedliche Stabilität des äußeren Kapsidproteins σ_B sein. Über dessen Pendant σ_3 bei Reoviren der Säuger ist bekannt, dass bereits eine Punktmutation im kodierenden Gen die Sensitivität für enzymatische Degradierung verändern kann (14). Für Virionen aviärer Reoviren wurde beschrieben, dass ein spontanes Freisetzen von Proteinen des äußeren Kapsids, auch σ_B , bei Inkubationstemperaturen ab 40 °C möglich ist (51). Damit könnte ein leichterer Zugang zu neutralisierbaren Epitopen, etwa auf dem Adsorptionsprotein σ_C , verbunden sein, wohingegen die kompakte Form der MAS-Virionen aus Zellkulturen Neutralisationsresistenz mit sich brächte.

Das Auftreten von Unterschieden in der Neutralisationsreaktion der MAS-Isolate auf HEL-, nicht jedoch auf HEF-Zellen, ließe sich durch eine unterschiedliche Rezeptorausstattung der Zellen erklären.

Für Reoviren der Säuger sind zwei verschiedene Rezeptortypen beschrieben, zum einen der für alle Serotypen zugängliche Rezeptor JAM-1, der jedoch – und dann stammspezifisch – durch verschiedene mit Karbohydraten wie Sialylsäure verknüpfte Rezeptoren ergänzt würde, die entweder die JAM1-Bindung erleichtern oder als zusätzliche Eintrittsstellen fungieren (36). Analog dazu könnte ein ubiquitärer Rezeptor für ARV auf HEL- und HEF-Zellen vorhanden sein, der auf HEL-Zellen durch einen weiteren ergänzt würde und für verschiedene Partikelformen unterschiedlich zugänglich sein könnte.

Eine weitere, nicht diesem Modell folgende denkbare Erklärung für die auftretende Teilneutralisation der MAS-Isolate wäre die Annahme verschiedener

Glykosylierungsmuster der äußeren Kapsidproteine, abhängig von dem Gewebe, in dem das Virus produziert wurde. Bei σB , einem Hauptprotein des äußeren Kapsids, handelt es sich um ein stark glykosyliertes Protein (196). Da Karbohydrate zellulären Ursprungs sind, könnten in verschiedenen Zellsystemen verschiedene Modifikationen von ARV-Proteinen vorliegen und neutralisierbare Epitope dadurch verborgen und nicht zugänglich sein. Allerdings sind solche Mechanismen für behüllte Viren, nicht jedoch für unbehüllte beschrieben (24, 25).

Solche Erklärungsansätze könnten durch Vergleich von Neutralisationsmustern künstlich erzeugter Partikelformen weiter verfolgt werden. Auch Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen äußere Kapsidproteine nach Virusvermehrung auf verschiedenen Geweben wären interessant, ebenso Sequenzvergleiche der σB -kodierenden Gene verschiedener Reovirusisolate.

Antigenetischer Verwandtschaftsgrad von MAS-Isolaten und Vakzinestamm S1133

Um den Verwandtschaftsgrad von Virusisolaten zu bestimmen, wurde eine Berechnungsmethode häufig auch für aviäre Reoviren gebraucht (41, 58, 204), die zuerst bei Influenza A-Virus zur Anwendung kam (5). Dabei ergeben sich sogenannte R-Werte, anhand derer sich Sero- und Subtypen nach einer Definition für Maul- und Klauenseuche unterscheiden lassen (12).

In der Literatur erwies sich dabei die Einteilung von ARV in klar abgrenzbare Serotypen als ausgesprochen schwierig, da fast immer eine ausgeprägte Kreuzreaktivität auftrat (41, 58, 113, 138, 140, 142, 144, 145, 204). Anhand von R-Werten wurden dabei mindestens elf Serotypen postuliert (204) oder auch nur größere Gruppen ohne Serotypeinteilung gebildet (140).

Bei den hier untersuchten ARV zeigte sich ein deutlich unterschiedlicher antigenetischer Verwandtschaftsgrad zwischen den MAS-Isolaten und dem Stamm S1133 mit Ausnahme des Isolats 8588DP4-6. Letzteres hatte mit S1133 einen R-Wert von 58 % und wies damit einen hohen Verwandtschaftsgrad auf. Jedoch bilden die MAS-Isolate 8588DP4-6, 8501DP4-6 und 8474DP4-6 untereinander eine eng verwandte Gruppe, von der nur das MAS-Isolate 8914DP4-6 etwas abgesetzt erscheint. Dabei waren die R-Werte nach den Neutralisationsergebnissen von Virusstocks aus HEL-Zellen auf HEL-Zellen berechnet worden.

Werden jedoch die R-Werte anhand der Ergebnisse mit Virusstocks aus embryonalem Ursprung berechnet, ergeben sich einige Verschiebungen. Beide MAS-Isolate, sowohl 8588DP4-6 als auch 8474DP4-6, haben jetzt geringere R-Werte mit S1133. Das Isolat 8474DP4-6 ist gar einem eigenen Serotyp zuzuordnen. Bezieht man jedoch die nicht-reziproke Neutralisation, insbesondere die Dominanz des S1133-Stamms mit ein, ist ein einziger Serotyp mit verschiedenen Subtypen am wahrscheinlichsten.

Der Vergleich von Neutralisationsergebnissen unter Verwendung von Virusstocks zellulären und embryonalen Ursprungs ergibt also eine Abhängigkeit der Neutralisationsreaktion von dem Gewebe, in dem Virus produziert wurde. Um stammspezifische antigenetische Unterschiede deutlicher herauszuarbeiten, sollten solchen Untersuchungen Virusstocks aus embryonalem Gewebe zugrunde liegen. Als Zellsystem für die Neutralisationstests selbst sind HEL-Zellen der Vorzug vor HEF-Zellen zu geben, da sie auf Unterschiede feiner reagieren.

Ausblick

Aus den vorangehend beschriebenen Untersuchungsergebnissen wurde deutlich, dass es sich bei den ARV-Isolaten aus Broilern mit MAS um antigenetische Varianten handelt, die sich sowohl vom Vakzinestamm S1133 als auch von den eingesetzten stallspezifischen K-Stämmen unterscheiden.

Während Letzteres nur durch das zuerst verwendete Testsystem mit Virusstocks aus Zellkulturen belegt wurde, zeigten die Folgeuntersuchungen auch antigenetische Unterschiede zu S1133, wenn zwei der MAS-Isolate aus embryonalem Gewebe gewonnen wurden. Die Neutralisationsunterschiede, die sich beim Vergleich beider Testsysteme ergaben, spiegeln dabei wahrscheinlich beide einen Teil der in vivo ablaufenden Reaktionen wieder.

Dabei sind zwei beobachtete Phänomene von entscheidender Bedeutung für Bekämpfungsstrategien gegenüber aviären Reoviren: zum einen die partielle Neutralisationsresistenz der MAS-Isolate gegenüber den Hyperimmun- und Elterntierseren, verglichen mit S1133, zum andere die geringere Immunogenität der neuen Isolate, die sich aus der Neutralisationskapazität der Hyperimmunseren ableiten lässt.

Anscheinend ist dabei eine Selektion auf Stämme eingetreten, die sich trotz eines systemischen Antikörperspiegels im Darm von Hühnerküken ansiedeln können. Aus

diesem Grund ist zu erwarten, dass auch die Aufnahme solcher Varianten in Vakzineprotokolle keine vollkommene Protektion vor einer frühen Besiedelung des Darmtrakts gewährleisten kann, da immer wieder Viren mittels eines noch näher zu untersuchenden Mechanismus der humoralen Immunantwort entkommen können und dadurch einen Selektionsvorteil besitzen.

Zur Bekämpfung einer frühen Manifestation von ARV ist daher nicht allein auf die systemische humorale Immunantwort als Schutzmechanismus zu zielen. Möglicherweise bietet die Stimulierung der T-Zellantwort einig Potential. Dabei ist es notwendig, dass endogene Antigene gebildet und auf Zelloberflächen präsentiert werden. Dies könnte durch eine frühe Verwendung von Lebendvakzinen in Broilerherden erreicht werden, jedoch ergaben bisherige Vakzinstudien uneinheitliche Resultate hinsichtlich der Protektion. Denkbar wäre diesbezüglich auch die Entwicklung von Nukleinsäurevakzinen, die ebenfalls den Weg der T-Zellantwort eröffnen.

Da Hühnerküken besonders in den ersten beiden Lebenswochen bei noch unzureichender Immunkompetenz empfänglich für aviäre Reoviren sind, sind darüber hinaus sorgfältige Hygienemaßnahmen unabdingbar. Diese sollten eine regelmäßige Überprüfung der Effizienz verwendeter Desinfektionsmittel auch gegenüber aktuellen ARV-Varianten einschließen.

6 Literaturverzeichnis

1. Adair BM, Burns K, McKillop ER. Serological studies with reoviruses in chickens, turkeys and ducks. *J Comp Pathol* 1987; 97: 495-501.
2. Al Afaleq A, Jones RC. A comparison of single and repeated oral infection of chicks with two avian reoviruses. *Res Vet Sci* 1994; 57: 96-99.
3. Annadata M, Vakharia VN. Comparative analysis of virus-induced polypeptides of an avirulent and a virulent strain of avian reovirus. *Avian Dis* 1994; 38: 244-250.
4. Apple RO, Skeeles JK, Houghten GE, Beasley JN, Kim KS. Investigation of a chronic feed-passage problem on a broiler farm in Northwest Arkansas. *Avian Dis* 1991; 35: 422-425.
5. Archetti I, Horsfall FL. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J Exp Med* 1950; 92: 441-462.
6. Barta V, Springer WT, Millar DL. A comparison of avian and mammalian cell cultures for the propagation of avian reovirus WVU 2937. *Avian Dis* 1984; 18: 216-223.
7. Benavente J, Martínez-Costas J. Avian reovirus: structure and biology. *Virus Res* 2007; 123: 105-119.
8. Bodelón G, Labrada L, Martínez-Costas J, Benavente J. Modification of late membrane permeability in avian reovirus-infected cells: viroporin activity of the S1-encoded non-structural p10 protein. *J Biol Chem* 2002; 277: 17789-17796.

9. Bodelón G, Labrada L, Martínez-Costas J, Benavente J. The avian reovirus genome segment S1 is a functionally tricistronic gene that expresses one structural and two non-structural proteins in infected cells. *Virology* 2001; 290: 181-191.
10. Borsa J, Morash BD, Sargent MD, Copps TP, Lievaart PA, Szekely JG. Two modes of entry of reovirus particles into L cells. *J Gen Virol* 1979; 45: 161-170.
11. Bracewell CD, Wyeth, P. Infectious stunting of chickens. *Vet Rec* 1981; 18: 64.
12. Brooksby, JB. Variants and immunity: definitions for serological investigations. In: Regmey RH, de Barbieri A, Hennessen W, Ikic D, Perkins FT, Ungar J, Hrsg. *Foot-and-Mouth Disease – Variants and Immunity. Symposium Series in Immunobiological Standardization, Vol. 8. Basel, Schweiz: Karger* 1968; 1-10.
13. Calvo PG, Fox GC, Parrado XLH, Llamas-Saiz AL, Costas C, Martínez-Costas J, Benavente J, van Raaij, MJ. Structure of the carboxy-terminal receptor-binding domain of avian reovirus fibre sigmaC. *J Mol Biol* 2005; 354: 137-149.
14. Chandran K, Nibert ML. Animal cell invasion by a large nonenveloped virus: reovirus delivers the goods. *Trends Microbiol* 2003; 11: 374-382.
15. Chen PN, Liu HJ, Shien JH, Lee LH. Antibody responses against avian reovirus non-structural protein σ NS in experimentally virus-infected chickens monitored by a monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci* 2004; 76: 219-225.
16. Chiu CJ, Lee LH. Cloning and nucleotide sequencing of the S4 genome segment of avian reovirus S1133. *Arch Virol* 1997; 142: 2515-2520.
17. Chulu JLC, Lee LH, Lee YC, Liao SH, Lin FL, Shih WL, Liu HJ. Apoptosis induction by avian reovirus through p53 and mitochondria-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 529-535.

18. Clark FD, Ni Y, Collisson EW, Kemp MC. Characterization of avian reovirus strain-specific polymorphisms. *Avian Dis* 1990; 34: 304-314.
19. Cook ME, Springer WT. Effect of reovirus infection and dietary levels of selected vitamins on immunocompetence of chickens. *Avian Dis* 1983; 27: 367-377.
20. Costas C, Martínez-Costas J, Bodelón G, Benavente J. The second open reading frame of the avian reovirus S1 gene encodes a transcription-dependent and CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling protein. *J Virol* 2005; 79: 2141-2150.
21. Cowen BS, Braune MO. The propagation of avian viruses in a continuous cell line (QT35) of Japanese quail origin. *Avian Dis* 1988; 32: 282-297.
22. Dalton PJ. "Teno Synovitis" in Poultry. *Vet Rec* 1967; 80: 638.
23. Dhillon AS, Kibenge FSB, Page RK. Viral arthritis in fryers related to reovirus infections in breeders. *Avian Dis* 1986; 30: 613-616.
24. Dimmock NJ. Carbohydrates and neutralization. In: Dimmock, NJ. *Neutralization of animal viruses*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1993. 39-40.
25. Dimmock, NJ. Strategies which avoid or minimize expression of, or response to, neutralization sites. In: Dimmock, NJ. *Neutralization of animal viruses*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1993. 81.
26. Drastini Y, Kibenge FSB, McKenna PK, Lopez A. Comparison of eight different procedures for harvesting avian reoviruses grown in Vero cells. *J Virol Methods* 1992; 39: 269-278.

27. Duncan R. The low pH-dependent entry of avian reovirus is accompanied by two specific cleavages of the major outer capsid protein μ 2C. *Virology* 1996; 219: 179-189.
28. Duncan R, Chen Z, Walsh S, Wu S. 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* 1996; 224: 453-464.
29. Duncan R, Sullivan K. Characterization of two avian reoviruses that exhibit strain-specific quantitative differences in their syncytium-inducing and pathogenic capabilities. *Virology* 1998; 250: 263-272.
30. Eidson CS, Kleven SH, Fletcher OJ. Performance of broiler progeny of breeder flocks vaccinated with inactivated oil emulsion malabsorption syndrome virus vaccine. *Poult Sci* 1985; 64: 2081-2086.
31. Ellis MN, Eidson CS, Brown J, Kleven SH. Studies on interferon induction and interferon sensitivity of avian reoviruses. *Avian Dis* 1983; 27: 927-936.
32. Ellis MN, Eidson CS, Fletcher OJ, Kleven SH. Viral tissue tropisms and interferon production in white leghorn chickens infected with two avian reovirus strains. *Avian Dis* 1983; 27: 644-651.
33. Endo-Munoz LB. A western blot to detect antibody to avian reovirus. *Avian Pathol* 1990; 19: 477-487.
34. Fahey JE, Crawley JF. Studies on chronic respiratory disease of chickens. II. Isolation of a virus. *Can J Comp Med Vet Sci* 1954; 18: 13-21.
35. Fan YH, Lin CD, Chiou SH, Chow KC, Chi YS, Lee LH, Shien JH, Shieh HK. Differential expression of U2AF³⁵ in the arthritic joint of avian reovirus-infected chicks. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114: 49-60.

36. Forrest JC, Dermody TS. Reovirus receptors and pathogenesis. *J Virol* 2003; 77: 9109-9115.
37. Frazier JA, Reece RL. Infectious stunting syndrome of chickens in Great Britain: intestinal ultrastructural pathology. *Avian Pathol* 1990; 19, 759-777.
38. Giambrone JJ, Dormitorio T, Lockaby SB. Coarse-spray immunization of one-day-old broilers against enteric reovirus infections. *Avian Dis* 1992; 36: 364-368.
39. Giambrone JJ, Hathcock TL. Efficacy of coarse-spray administration of a reovirus vaccine in young chickens. *Avian Dis* 1991; 35: 204-209.
40. Giambrone JJ, Hathcock TL, Lockaby SB. Effect of a live reovirus vaccine on reproduction performance of broiler breeder hens and development of viral tenosynovitis in progeny. *Avian Dis* 1991; 35: 380-383.
41. Giambrone JJ, Solano W. Serologic comparison of avian reovirus isolates using virus neutralization and an enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 1988; 32: 678-680.
42. Glass SE, Naqi SA, Hall CF, Kerr KM. Isolation and characterization of a virus associated with arthritis of chickens. *Avian Dis* 1973; 17: 415-424.
43. Glávits R, Molnár É, Rátz F, Sághy E, Fehérvári T, Meder M. Pathological studies in chicken embryos and day-old chicks experimentally infected with avian reovirus. *Acta Vet Hung* 1984; 32: 23-37.
44. González-López C, Martínez-Costas J, Esteban M, Benavente J. Evidence that avian reovirus σA protein is an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Gen Virol* 2003; 84: 1629-1639.

45. Goodwin MA, Davis JF, McNulty MS, Brown J, Player EC. Enteritis (So-called runting stunting syndrome) in Georgia broiler chicks. *Avian Dis* 1993; 37: 451-458.
46. Goodwin MA, Davis JF, Player EC. Reovirus-associated enteritis in Georgia broiler chicks. *Avian Dis* 1993; 37: 229-233.
47. Gouvea V, Huang DD, Ramos T, Schnitzer TJ. In vitro characterization of an avian reovirus vaccine strain. *Virology* 1983; 126: 240-247.
48. Gouvea V, Schnitzer TJ. Pathogenicity of avian reoviruses: examination of six isolates and a vaccine strain. *Infect Immun* 1982; 38: 731-738.
49. Gouvea VS, Schnitzer TJ. Polymorphism of the genomic RNAs among the avian reoviruses. *J Gen Virol* 1982; 61: 87-91.
50. Gouvea VS, Schnitzer TJ. Polymorphism of the migration of double-stranded RNA genome segments of avian reoviruses. *J Virol* 1982; 43: 465-471.
51. Grande A, Benavente J. Optimal conditions for the growth, purification and storage of the avian reovirus S1133. *J Virol Methods* 2000; 85: 43-54.
52. Grande A, Costas C, Benavente J. Subunit composition and conformational stability of the oligomeric form of the avian reovirus cell-attachment protein σ C. *J Gen Virol* 2002; 83: 131-139.
53. Grande A, Rodriguez E, Costas C, Everitt E, Benavente J. Oligomerization and cell-binding properties of the avian reovirus cell-attachment protein σ C. *Virology* 2000; 274: 367-377.
54. Guo ZY, Giambrone JJ, Dormitorio TV, Wu H. Influence of a reovirus-antibody complex vaccine on efficacy of Marek's disease vaccine administered in ovo. *Avian Dis* 2003; 47: 1362-1367.

55. Guo ZY, Giambrone JJ, Liu Z, Dormitorio TV, Wu H. Effect of in ovo administered reovirus vaccines on immune response of specific pathogen-free chickens. *Avian Dis* 2004; 48: 224-228.
56. Guo ZY, Giambrone JJ, Wu H, Dormitorio T. Safety and efficacy of an experimental reovirus vaccine for in ovo administration. *Avian Dis* 2003; 47: 1423-1428.
57. Hieronymus DRK, Villegas P, Kleven SH. Characteristics and pathogenicity of two avian reoviruses isolated from chickens with leg problems. *Avian Dis* 1983; 27: 255-260.
58. Hieronymus DRK, Villegas P, Kleven SH. Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malabsorption syndrome. *Avian Dis* 1983; 27: 246-254.
59. Hou HS, Su YP, Shieh HK, Lee LH. Monoclonal antibodies against different epitopes of nonstructural protein σ NS of avian reovirus S1133. *Virology* 2001; 282: 168-175.
60. Hsu CJ, Wang CY, Lee LH, Shih WL, Chang CI, Cheng HL, Chulu JLC, Ji WT, Liu HJ. Development and characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus σ C protein and their application in detection of avian reovirus isolates. *Avian Pathol* 2006; 35: 320-326.
61. Hsu HW, Su HY, Huang PH, Lee LH, Liu HJ. Sequence and phylogenetic analysis of P10- and P17-encoding genes of avian reovirus. *Avian Dis* 2005; 49: 36-42.
62. Huang DD. Restriction of avian reovirus in primary chicken embryo tendon cells. *Virology* 1995; 207: 117-126.

63. Huang DD, Nugent MA, Rosenberger JK, Schnitzer TJ. Association of avian reovirus M and S genes with viral behavior in vivo. II. Viral pathogenicity. *Avian Dis* 1987; 31: 446-454.
64. Huang DD, Schnitzer TJ. Detection of genomic differences between the avian reovirus isolate S1133 and its high-passage derivative P100. *Avian Dis* 1984; 28: 799-803.
65. Huang PH, Li YL, Su YP, Lee LH, Liu HJ. Epitope mapping and functional analysis of sigma A and sigma NS proteins of avian reovirus. *Virology* 2005; 332: 584-595.
66. Ide PR. Avian reovirus antibody assay by indirect immunofluorescence using plastic microculture plates. *Can J Comp Med* 1982; 46: 39-42.
67. Ide PR, Dewitt W. Serological incidence of avian reovirus infection in broiler-breeders and progeny in Nova Scotia. *Can Vet J* 1979; 20: 348-353.
68. Islam MR, Jones RC. An enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody titre against avian reovirus using a single dilution of serum. *Avian Pathol* 1988; 17: 411-425.
69. Islam MR, Jones RC, Kelly DF. Pathogenesis of experimental reovirus tenosynovitis in chickens: influence of the route of infection. *J Comp Pathol* 1988; 98: 325-336.
70. Jones RC. Avian reovirus infection. *Rev Sci Tech* 2000; 19: 614-625.
71. Jones RC, Al Afaleq AI. Different sensitivities of Vero cells from two sources to avian reoviruses. *Res Vet Sci* 1990; 48: 379-380.
72. Jones RC, El-Taher AMM. Reisolation of avian arthrotropic reovirus R2 from chicks infected as embryos. *Avian Pathol* 1985; 14: 377-382.

73. Jones RC, Georgiou K. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The influence of age at infection. *Avian Pathol* 1984; 13: 441-457.
74. Jones RC, Georgiou K. The temporal distribution of an arthrotropic reovirus in the leg of the chicken after oral infection. *Avian Pathol* 1984; 14: 75-85.
75. Jones RC, Guneratne JRM. The pathogenicity of some avian reoviruses with particular reference to tenosynovitis. *Avian Pathol* 1984; 13: 173-189.
76. Jones RC, Kibenge FSB. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The effect of breed. *Avian Pathol* 1984; 13: 511-528.
77. Kaji T, Nonomura I, Sato S, Kobayashi H, Shoya S. Pathogenicity of avian reovirus and its influence on the infection of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 1970; 10: 49-57.
78. Kant A, Balk F, Born L, van Roozelaar D, Heijmans J, Gielkens A, Ter Huurne A. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the σC protein. *Vet Res* 2003; 34: 203-212.
79. Kawamura H, Shimizu F, Maeda M, Tsubahara H. Avian reovirus: its properties and serological classification. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 1965; 5: 115-124.
80. Kawamura H, Tsubahara H. Common antigenicity of avian reoviruses. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 1966; 6: 187-193.
81. Kerr KM, Olson NO. Pathology of chickens experimentally inoculated or contact-infected with an arthritis-producing virus. *Avian Dis* 1969; 13: 729-745.
82. Kibenge FSB, Dhillon AS. A comparison of the pathogenicity of four avian reoviruses in chickens *Avian Dis* 1987; 31: 39-42.

83. Kibenge FSB, Gwaze GE, Jones RC, Chapman AF, Savage CE. Experimental reovirus infection in chickens: Observations on an early viraemia and virus distribution in bone marrow, liver and enteric tissues. *Avian Pathol* 1985; 14: 87-98.
84. Kouwenhoven B, Vertommen M, Goren E. Investigations into the role of reovirus in the malabsorption syndrome. *Avian Pathol* 1988; 17: 879-892.
85. Kouwenhoven B, Vertommen M, van Eck JHH. Runting and leg weakness in broilers: involvement of infectious factors. *Vet Sci Commun* 1978; 2: 253-259.
86. Krauss M, Ueberschär S. Zur Struktur eines neuen Geflügel-Orphan-Virus. *Zentralbl Veterinärmed B* 1966; 13: 239-249.
87. Labrada L, Bodelón G, Viñuela J, Benavente J. Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. *J Virol* 2002; 76: 7932-7941.
88. Lee LF, Nazerian K, Burmester BR. Characterization of avian reovirus 24. *Avian Dis* 1973; 17: 559-567.
89. Lee LH, Wang YH, Shien JH. Comparison of the labeled avidin-biotin and the conventional enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibody to reovirus in chickens. *J Virol Methods* 1994; 48: 343-347.
90. Li L, Giambrone JJ, Panangala VS, Hoerr FJ. Production and characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus strain S1133. *Avian Dis* 1996; 40: 349-357.
91. Lin YL, Shen JH, Lee LH. A monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibody production against avian reovirus protein σ A. *J Virol Methods* 2006; 136: 71-77.

92. Liu HJ, Giambrone JJ, Wu YH, Liao MH, Lu CF. The use of monoclonal antibody probes for the detection of avian reovirus antigens. *J Virol Methods* 2000; 86: 115-119.
93. Liu HJ, Huang PH. Sequence and phylogenetic analysis of the σ A-encoding gene of avian reovirus. *J Virol Methods* 2001; 98: 99-107.
94. Liu HJ, Kuo LC, Hu YC, Liao MH, Lien YY. Development of an ELISA for detection of antibodies to avian reovirus in chickens. *J Virol Methods* 2002; 102: 129-138.
95. Liu HJ, Lee LH, Hsu HW, Kuo LC, Liao MH. Molecular evolution of avian reovirus: evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segments and multiple cocirculating lineages. *Virology* 2003; 314: 336-349.
96. Liu HJ, Lee LH, Shih WL, Li YJ, Su HY. Rapid characterization of avian reoviruses using phylogenetic analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Avian Pathol* 2004; 33: 171-180.
97. Mallo M., Martínez-Costas J, Benavente J. Avian reovirus S1133 can replicate in mouse L cells: effect of pH and cell attachment status on viral infection. *J Virol* 1991; 65: 5499-5505.
98. Mandelli G, Rampin T, Finazzi M. Experimental reovirus hepatitis in newborn chicks. *Vet Pathol* 1978; 15: 531-543.
99. Martínez-Costas J, González-López C, Vakharia VN, Benavente J. Possible involvement of the double-stranded RNA-binding core protein σ A in the resistance of avian reovirus to interferon. *J Virol* 2000; 74: 1124-1131.

100. Martínez-Costas J, Grande A, Varela R, García-Martínez C, Benavente J. Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J Virol* 1997; 71: 59-64.
101. Martínez-Costas J, Varela R, Benavente J. Endogenous enzymatic activities of the avian reovirus S1133 identification of the viral capping enzyme. *Virology* 1995; 206: 1017-1026.
102. Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittmann G. Plaquereduktionstest. In: Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B, Wittmann G, Hrsg. *Virologische Arbeitsmethoden Band II, Serologie*. Stuttgart, New York: Gustav Fischer; 1977; 475.
103. McNulty MS, Allan GM, Connor TJ, McFerran JB, McCracken RM. An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. *Avian Pathol* 1984; 13: 429-439.
104. Menendez NA, Calnek BW, Cowen BS. Localization of avian reovirus (FDO isolant) in tissues of mature chickens. *Avian Dis* 1975; 19: 112-117.
105. Miltenburg JT, Kouwenhoven B, Vertommen M. Infectious stunting of chickens. *Vet Rec* 1981; 21: 477.
106. Montgomery RD, Boyle CR, Maslin WR, Magee DL. Attempts to reproduce a runting/ stunting-type syndrome using infectious agents isolated from affected Mississippi broilers. *Avian Dis* 1997; 41: 80-92.
107. Montgomery RD, Maslin WR. Persistence of commercial modified live reovirus vaccines in chicks. *Avian Dis* 1988; 32: 461-468.
108. Montgomery RD, Maslin WR. Effect of infectious bursal disease virus vaccines on persistence and pathogenicity of modified live reovirus vaccines in chickens. *Avian Dis* 1991; 35: 147-157.

109. Montgomery RD, Villegas P, Dawe DL, Brown J. Effect of avian reoviruses on lymphoid organ weights and antibody response in chickens. *Avian Dis* 1985; 29: 552-560.
110. Montgomery RD, Villegas P, Kleven SH. Role of route of exposure, age, sex, and type of chicken on the pathogenicity of avian reovirus strain 81-176. *Avian Dis* 1986; 30: 460-467.
111. Mukiibi-Muka G, Jones RC. 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* 1999; 28: 54-60.
112. Muluneh A. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-virus (BIV) antibodies in the cattle population in Germany. *Zentralbl Veterinärmed B* 1994; 41: 679-684.
113. Munro TF, Wooley RE. Neutralization kinetics study of selected reoviruses, *Infect Immun* 1973; 8: 628-630.
114. Mustaffa-Babjee A, Spradbow PB. The isolation of an avian reovirus. *Aust Vet J* 1971; 47: 284.
115. Mustaffa-Babjee A, Spradbow PB, Omar AR. Characterization of an avian reovirus isolated in Queensland. *J Comp Pathol* 1973; 83: 387-400.
116. Nersessian BN, Lukert PD, Goodwin MA. Antigenic comparisons of selected avian reoviruses by use of the plaque-reduction neutralization assay. *Am J Vet Res* 1989; 50: 1475-1480.
117. Ni Y, Kemp MC. A comparative study of avian reovirus pathogenicity: virus spread and replication and induction of lesions. *Avian Dis* 1995; 39: 554-566.
118. Ni Y, Ramig RF. Characterization of avian reovirus-induced cell fusion: the role of viral structural proteins. *Virology* 1993; 194: 705-714.

119. Ni Y, Ramig RF, Kemp MC. Identification of proteins encoded by avian reoviruses and evidence for post-translational modification. *Virology* 1993; 193: 466-469.
120. Ni YW, Kemp MC. Selection of genome segments following coinfection of chicken fibroblasts with avian reoviruses. *Virology* 1990; 177: 625-633.
121. Nick H, Cursiefen D, Becht H. Structural and growth characteristics of two avian reoviruses. *Arch Virol* 1975; 48: 261-269.
122. Noad L, Shou J, Coombs KM, Duncan R. Sequences of avian reovirus M1, M2 and M3 genes and predicted structure/ function of the encoded μ proteins. *Virus Res* 2006; 116: 45-57.
123. O'Hara D, Patrick M, Cepica D, Coombs KM, Duncan R. Avian reovirus major μ -class outer capsid protein influences efficiency of productive macrophage infection in a virus strain-specific manner. *J Virol* 2001; 75: 5027-5035.
124. Olson ND, Shelton DC, Munro DA. Infectious synovitis control by medication: effect of strain differences and pleuropneumonia-like organisms. *Am J Vet Res* 1957; 18: 735-739.
125. Olson NO, Kerr KM. Some characteristics of an avian arthritis viral agent. *Avian Dis* 1966; 10: 470-476.
126. Olson NO, Weiss R. Similarity between arthritis virus and Fahey-Crawley virus. *Avian Dis* 1972; 16: 535-540.
127. Pai WC, Shien JH, Liu HJ, Lee LH. Characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus S1133 protein σA synthesized in *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 2003; 91: 309-323.
128. Pass DA, Robertson MD, Wilcox GE. Runting syndrome in broiler chickens in Australia. *Vet Rec* 1982; 17: 386-387.

129. Pauli G, Grunmach J, Ludwig H. Focus-immunoassay for Borna disease virus-specific antigens. *Zentralbl Veterinärmed B* 1984; 31: 552-557.
130. Petek M, Felluga B, Borghi G, Baroni A. The Crawley agent: an avian reovirus. *Arch Gesamte Virusforsch* 1967; 21: 413-424.
131. Pradhan HK, Mohanty GC, Kataria JM, Pattnaik B, Verma KC. Antinuclear antibody in chickens with reoviral arthritis. *Avian Dis* 1987; 31: 249-253.
132. Racine T, Barry C, Roy K, Dawe S, Shmulevitz M, Duncan R. Leaky scanning and scanning-independent ribosome migration on the tricistronic S1 mRNA of avian reovirus. *J Biol Chem* 2007; 282: 25613-25622.
133. Rau WE, van der Heide L, Kalbac M, Girshick T. Onset of progeny immunity against viral arthritis/ tenosynovitis after experimental vaccination of parent breeder chickens and cross-immunity against six reovirus isolates. *Avian Dis* 1980; 24: 648-657.
134. Reddy SK, Sy D, Silim A. Radioimmunoprecipitation of avian reovirus polypeptides using virus-specific IgM and IgG murine monoclonal and chicken polyclonal antibodies. *J Virol Methods* 1993; 42: 13-22.
135. Reece RL, Frazier JA. Infectious stunting syndrome of chickens in Great Britain: Field and experimental studies. *Avian Pathol* 1990; 19: 723-758.
136. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-497.
137. Rekik MR, Silim A. Comparison of a vaccine strain and field isolates of avian reovirus by T1-oligonucleotide mapping. *Avian Dis* 1992; 36: 237-246.
138. Rekik MR, Silim A, Bernier G. Serological and pathogenic characterization of avian reoviruses isolated in Quebec. *Avian Pathol* 1991; 20: 607-617.

139. Rekik MR, Silim A, Elazhary MASY. Characteristics and analysis of electropherotypes of avian reovirus field isolates. *Vet Microbiol* 1990; 23: 273-281.
140. Robertson MD, Wilcox GE. Serological characteristics of avian reoviruses of Australian origin. *Avian Pathol* 1984; 13: 585-594.
141. Roessler DE, Rosenberger JK. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. III. Host factors affecting virulence and persistence. *Avian Dis* 1989; 33: 555-565.
142. Rosenberger JK, Sterner FJ, Botts S, Lee KP, Margolin A. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. *Avian Dis* 1989; 33: 535-544.
143. Rudas P, Sályi G, Szabó J. Decreased thyroxine, triiodothyronine, and 5'-deiodination levels in malabsorption syndrome (runting or stunting syndrome) in artificially inoculated broilers. *Avian Dis* 1986; 30: 293-297.
144. Sahu SP, Olson NO. Comparison of the characteristics of avian reoviruses isolated from the digestive and respiratory tract, with viruses isolated from the synovia. *Am J Vet Res* 1975; 36: 847-850.
145. Sahu SP, Olson NO, Townsend RW. Characterization of avian reoviruses isolated from the synovia and breast blister. *Avian Dis* 1979; 23: 896-903.
146. Schnitzer TJ. Protein coding assignment of the S genes of the avian reovirus S1133. *Virology* 1985; 141: 167-170.
147. Schnitzer TJ, Ramos T, Gouvea V. Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. *J Virol* 1982; 43: 1006-1014.

148. Schweikl M, Grund C, Johannknecht S, Jodas S, Bachmeier J, Korbel R. Klinische, virologische und bakteriologische Untersuchungen zum Malabsorptionssyndrom (MAS) beim Masthähnchen. *Tierärztl Praxis Reihe G* 2007; 35: 369-376.
149. Sekiguchi K, Koide F. Characterization of avian reovirus ribonucleid acid. *Arch Gesamte Virusforsch* 1974; 46: 156-166.
150. Sekiguchi K, Koide F, Kawamura H. Physico-chemical properties of avian reovirus and its nucleic acid. *Arch Gesamte Virusforsch* 1968; 24: 123-136.
151. Shapouri MRS, Arella M, Silim A. Evidence for the multimeric nature and cell binding ability of avian reovirus $\sigma 3$ protein. *J Gen Virol* 1996; 77: 1203-1210.
152. Shapouri MRS, Frenette D, Larochelle R, Arella M, Silim A. Characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus strain S1133. *Avian Pathol* 1996; 25: 57-67.
153. Shapouri MRS, Kane M, Letarte M, Bergeron J, Arella M, Silim A. Cloning, sequencing and expression of the S1 gene of avian reovirus. *J Gen Virol* 1995; 76: 1515-1520.
154. Sharma JM, Karaca K, Pertile T. Virus-induced immunosuppression in chickens. *Poult Sci* 1994; 73: 1082-1086.
155. Shen PC, Chiou YF, Liu HJ, Song CH, Su YP, Lee LH. Genetic variation of the λA and λC protein encoding genes of avian reoviruses. *Res Vet Sci* 2007; 83: 394-402.
156. Shien JH, Yin HS, Lee LH. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to avian reovirus by using protein σB as the coating antigen. *Res Vet Sci* 2000; 69: 107-112.

157. Shih WL, Hsu HW, Liao MH, Lee LH, Liu HJ. Avian reovirus σ C protein induces apoptosis in cultured cells. *Virology* 2004; 321: 65-74.
158. Shirai J, Obata H, Nakamura K, Furuta K, Hihara H, Kawamura H. Experimental infection in specific-pathogen-free chicks with avian reovirus and avian nephritis virus isolated from broiler chicks showing runting syndrome. *Avian Dis* 1990; 34:295-303.
159. Shmulevitz M, Corcoran J, Salsman J, Duncan R. Cell-cell fusion induced by the avian reovirus membrane fusion protein is regulated by protein degradation. *J Virol* 2004; 78: 5996-6004.
160. Shmulevitz M, Epand RF, Epand RM, Duncan R. Structural and functional properties of an unusual internal fusion peptide in a nonenveloped virus membrane fusion protein. *J Virol* 2004; 78: 2808-2818.
161. Shmulevitz M, Salsman J, Duncan R. Palmitoylation, membrane-proximal basic residues, and transmembrane glycine residues in the reovirus p10 protein are essential for syncytium formation. *J Virol* 2003; 77: 9769-9779.
162. Shmulevitz M, Yameen Z, Dawe S, Shou J, O'Hara D, Holmes I, Duncan R. Sequential partially overlapping gene arrangement in the tricistronic S1 genome segments of avian reovirus and Nelson Bay reovirus implications for translation initiation. *J Virol* 2002; 76: 609-618.
163. Songserm T, Engel B, van Roozelaar DJ, Kok GL, Pijpers A, Pol JMA, Ter Huurne, AAHM. Cellular immune response in the small intestine of two broiler chicken lines orally inoculated with malabsorption syndrome homogenates. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 85: 51-62.
164. Songserm T, Pol JMA, van Roozelaar D, Kok GL, Wagenaar F, Ter Huurne AAHM. A comparative study of the pathogenesis of malabsorption syndrome in broilers. *Avian Dis* 2000; 44: 556-567.

165. Songserm T, van Roozelaar D, Kant A, Pol J, Pijpers A, Ter Huurne, A. Enteropathogenicity of Dutch and German avian reoviruses in SPF white leghorn chickens and broilers. *Vet Res* 2003; 34: 285-295.
166. Songserm T, Zekarias B, van Roozelaar DJ, Kok RS, Pol JMA, Pijpers AA, Ter Huurne AAHM. Experimental reproduction of malabsorption syndrome with different combinations of reovirus, *Escherichia coli*, and treated homogenates obtained from broilers. *Avian Dis* 2002; 46: 87-94.
167. Spandidos DA, Graham AF. Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J Virol* 1976; 19: 968-976.
168. Sterner FJ, Rosenberger JK, Margolin A, Ruff MD. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. II. Clinical evaluation of chickens infected with two avian reovirus pathotypes. *Avian Dis* 1989; 33: 545-554.
169. Su YP, Shien JH, Liu HJ, Yin HS, Lee LH. Avian reovirus core protein μ A expressed in *Escherichia coli* possesses both NTPase and RTPase activities. *J Gen Virol* 2007; 88: 1797-1805.
170. Su YP, Su BS, Shien JH, Liu HJ, Lee LH. The sequence and phylogenetic analysis of avian reovirus genome segments M1, M2, and M3 encoding the minor core protein μ A, the major outer capsid protein μ B, and the non-structural protein μ NS. *J Virol Methods* 2006; 133: 146-157.
171. Swanson GJ, Meyers J, Huang DD. Restricted growth of avirulent avian reovirus strain 2177 in macrophage derived HD11 cells. *Virus Res* 2001; 81: 103-111.
172. Takase K, Nishikawa H, Nonaka F, Yamada S. Pathogenic characteristics of highly virulent avian reovirus, strain 58-132, isolated from a chicken with tenosynovitis. *Nippon Juigaku Zasshi* 1985; 47: 567-574.

173. Takase K, Nonaka F, Yamamoto M, Yamada S. Serologic and pathogenetic studies on avian reoviruses isolated in Japan. *Avian Dis* 1987; 31: 464-469.
174. Takase K, Uchimura T, Yamamoto M. Influence of maternal antibodies on susceptibility of embryonating eggs to avian reovirus. *Nippon Juigaku Zasshi* 1988; 50: 949-950.
175. Takehara K, Kimura Y, Tanaka Y, Yoshimura M. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against an avian reovirus. *Avian Dis* 1987; 31: 730-734.
176. Tang KN, Fletcher OJ, Villegas P. Comparative study of the pathogenicity of avian reoviruses. *Avian Dis* 1987; 31: 577-583.
177. Tang KN., Fletcher OJ, Villegas P. The effect on newborn chicks of oral inoculation of reovirus isolated from chickens with tenosynovitis. *Avian Dis* 1987; 31: 584-590.
178. Tantawi HH, Amina N, Youssef YI, Fawzia M, Al-Abdulla JM, El-Batrawi A, El-Ghawas A, Nasser AA, Reda IM. Infectious tenosynovitis in broilers and broiler breeders in Egypt. *Vet Res Commun* 1984; 8: 229-235.
179. Theophilos MB, Huang JA, Holmes IH. Avian reovirus σ C protein contains a putative fusion sequence and induces fusion when expressed in mammalian cells. *Virology* 1995; 208: 678-684.
180. Timms LM. Influence of a 12.5 per cent rapeseed diet and an avian reovirus on the production of leg abnormalities in male broiler breeders. *Res Vet Sci* 1985; 38: 69-76.
181. Tourís-Otero F, Cortez-San Martín M, Martínez-Costas J, Benavente J. Avian reovirus morphogenesis occurs within viral factories and begins with the selective recruitment of σ NS and λ A to μ NS inclusions. *J Mol Biol* 2004; 341: 361-374.

182. Tourís-Otero F, Martínez-Costas J, Vakharia VN, Benavente J. Avian reovirus nonstructural protein μ NS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein σ NS to these structures. *Virology* 2004; 319: 94-106.
183. Tourís-Otero F, Martínez-Costas J, Vakharia VN, Benavente J. Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus non-structural protein σ NS. *J Gen Virol* 2005; 86: 1159-1169.
184. Tsukamoto Y, Kotani T, Kohama K, Sakuma S, Sasaki F. Nuclear proliferation in syncytia during avian reovirus replication. *Can J Vet Res* 1999; 63: 282-283.
185. Tyler KL, Fields BN. Pathogenesis of viral infection. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Hrsg. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott/ Raven Publishers 1996; 173-218.
186. van de Zande S, Kuhn EM. Central nervous system signs in chickens caused by a new avian reovirus strain: a pathogenesis study. *Vet Microbiol* 2007; 120: 42-49.
187. van der Heide L. The history of avian reovirus. *Avian Dis* 2000; 44: 638-641.
188. van der Heide L, Geissler J, Bryant ES. Infectious tenosynovitis: serologic and histopathologic response after experimental infection with a Connecticut isolate. *Avian Dis* 1974; 18: 289-296.
189. van der Heide L, Kalbac M. Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Dis* 1975; 19: 683-688.
190. van der Heide L, Kalbac M, Brustolon M. Development of an attenuated apathogenic reovirus vaccine against viral arthritis/ tenosynovitis. *Avian Dis* 1983; 27: 698-706.

191. van der Heide L, Lütticken D, Horzinek M. Isolation of avian reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis („Brittle bone disease“; „Femoral head necrosis“) in broiler chickens. *Avian Dis* 1981; 25: 847-856.
192. van Loon AAWM, Koopman HC, Kosman W, Mumczur J, Szeleszczuk O, Karpinska E, Kosowska G, Lütticken D. Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chickens. *Vet Q* 2001; 23: 129-133.
193. van Loon AAWM, Kosman W, van Zuilekom HI, van Riet S, Frenken M, Schijns EJ. The contribution of humoral immunity to the control of avian reoviral infection in chickens after vaccination with live reovirus vaccine (strain 2177) at an early age. *Avian Pathol* 2003; 32: 15-23.
194. van Loon AAWM, Suurland B, van der Marel P. A reovirus challenge model applicable in commercial broilers after live vaccination. *Avian Pathol* 2002; 31: 13-21.
195. Varela R, Benavente J. Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *J Virol* 1994; 68: 6775-6777.
196. Varela R, Martínez-Costas J, Mallo M, Benavente J. Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *J Virol* 1996; 70: 2974-2981.
197. Vasserman Y, Eliahoo D, Hemsani E, Kass N, Ayali G, Pokamunski S, Pitcovskiad J. The influence of reovirus sigma C protein diversity on vaccination efficiency. *Avian Dis* 2004; 48: 271-278.
198. Walker ER, Friedman MH, Olson NO. Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis. *J Ultrastruct Res* 1972; 41: 67-79.

199. Walker ER, Friedman MH, Olson NO, de Nee PB. Ultrastructural study of avian synovium infected with an arthrotropic reovirus. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 1269-1277.
200. Wickramasinghe R, Meanger J, Enriquez CE, Wilcox GE. Avian reovirus proteins associated with neutralization of virus infectivity. *Virology* 1993; 194: 688-696.
201. Wilcox GE, Robertson MD, Lines AD. Adaptation and characteristics of replication of a strain of avian reovirus in vero cells. *Avian Pathol* 1985; 14: 321-328.
202. Winship TR, Marcus PI. Interferon induction by viruses. VI. Reovirus: virion genome dsRNA as the interferon inducer in aged chick embryo cells. *J Interferon Res* 1980; 1: 155-167.
203. Wood GW, Muskett JC, Thornton DH. Observations on the ability of avian reovirus vaccination of hens to protect their progeny against the effects of challenge with homologous and heterologous strains. *J Comp Pathol* 1986; 96: 125-129.
204. Wood GW, Nicholas RAJ, Hebert CN, Thornton DH. Serological comparisons of avian reoviruses. *J Comp Pathol* 1980; 90: 29-38.
205. Wood GW, Thornton DH. Experimental infection of broiler chickens with an avian reovirus. *J Comp Pathol* 1981; 91: 69-76.
206. Wu H, Williams Y, Gunn KS, Singh NK, Locy RD, Giambrone JJ. Yeast-derived sigma C protein-induced immunity against avian reovirus. *Avian Dis* 2005; 49: 281-284.
207. Wu WY, Shien JH, Lee LH, Shieh HK. Analysis of the double-stranded RNA genome segments among avian reovirus field isolates. *J Virol Methods* 1994; 48: 119-122.

208. Yamakami T, Doi M, Koimaru H, Ide S, Yoshimura M, Masu S. Modification of three avian viruses passaged in Chinese hamster lung cells (DON) in pathogenicity to chicken embryo. *Avian Dis* 1984; 28: 532-535.
209. Yin HS, Lee LH. Identification and characterization of RNA-binding activities of avian reovirus non-structural protein σ NS. *J Gen Virol* 1998; 79: 1411-1413.
210. Yin HS, Shieh HK, Lee LH. Characterization of the double-stranded RNA genome segment S3 of avian reovirus. *J Virol Methods* 1997; 67: 93-101.
211. Yin HS, Shien JH, Lee LH. Synthesis in *Escherichia coli* of avian reovirus core protein σ A and its dsRNA-binding activity. *Virology* 2000; 266: 33-41.
212. Yin HS, Su YP, Lee LH. Evidence of nucleotidyl phosphatase activity associated with core protein σ A of avian reovirus S1133. *Virology* 2002; 293: 379-385.
213. Zekarias B, Stockhofe-Zurwieden N, Post J, Balk F, van Reenen C, Gruys E, Rebel JMJ. The pathogenesis of and susceptibility to malabsorption syndrome in broilers is associated with heterophil influx into the intestinal mucosa and epithelial apoptosis. *Avian Pathol* 2005; 34: 402-407.
214. Zhang X, Tang J, Walker SB, O'Hara D, Nibert ML, Duncan R, Baker TS. Structure of avian orthoreovirus virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Virology* 2005; 343: 25-35.

7 Zusammenfassung

Aviären Reoviren (ARV) wird eine wichtige Rolle in der Ätiologie des Malabsorptionssyndroms (MAS) zugeschrieben. Durch eine starke Beeinträchtigung der Gewichtsentwicklung entstehen davon erhebliche ökonomische Verluste.

Der vorliegenden Studie liegen ARV zugrunde, die im Vorfeld aus Broilern mit MAS trotz Elterntierimmunisierung isoliert werden konnten. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob es sich bei den Isolaten um Varianten handelt, die den Impfschutz durch vertikal übertragene maternale Antikörper unterlaufen können.

Als Untersuchungsmethode wurden Kreuzneutralisationstests ausgewählt. Um alle ARV-Isolate mit wiederholbaren Ergebnissen untersuchen zu können, wurde ein Plaquereduktionsassay unter Einbeziehung eines immunhistochemischen Färbeverfahrens an ARV adaptiert.

Von unterschiedlichen ARV-Stämmen und -Isolaten wurden dabei sowohl auf HEL- als auch HEF-Zellen drei Plaquetypen ausgebildet: ein „klassischer“ Typ mit großen, runden Plaques, für den exemplarisch der Vakzinestamm S1133 steht, ein Typ mit winzigen Synzytien, der vom MAS-Isolat 8588DP4-6 repräsentiert wird, und der des MAS-Isolats 8474DP4-6 mit ausgedehnten Synzytien.

In die Untersuchungen auf HEL-Zellen wurden Hyperimmunseren gegen den Vakzinestamm S1133, einen stallspezifischen K-Stamm sowie gegen vier in der Klinik für Vögel isolierte MAS-Isolate einbezogen, zudem vier verschiedene Serumpools aus Elterntierherden. Die untersuchten Virusstämme umfassten den Vakzinestamm S1133 als Referenzstamm, vier MAS-Isolate, je drei stallspezifische K-Stämme aus Süd- und Norddeutschland sowie den ERS-Stamm SP2004-00344.

Die verwendeten Hyperimmunseren wiesen dabei eine stark unterschiedliche Neutralisationskapazität auf. Die gegen die MAS-Isolate gerichteten Seren und insbesondere das gegen einen stallspezifischen K-Stamm gerichtete hatten dabei eine deutlich geringere Neutralisationskapazität als das Serum a-S1133.

In den Neutralisationstests selbst zeigten die untersuchten Stämme eine große antigenetische Heterogenität mit deutlichen Unterschieden zum Referenzstamm S1133 bei gleichzeitig ausgeprägter Kreuzreaktivität.

Auffällig war, dass der Vakzinestamm S1133 von allen Seren am besten neutralisiert wurde und die MAS-Isolate demgegenüber eine partielle Neutralisationsresistenz aufwiesen.

Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, ob das verwendete Testsystem ein reines Abbild antigenetischer Verwandtschaft ist oder vom Ursprung der Virusstocks und der verwendeten Zielzelle wesentlich geprägt ist.

Daher wurden Folgeuntersuchungen mit drei ausgewählten Stämmen (S1133, 8588DP4-6, 8474DP4-6) durchgeführt, die von vier verschiedenen Geweben gewonnen worden waren: HEL- und HEF-Zellen, embryonale Leber und embryonaler Darm. Die vier Ursprünge des Isolats 8474DP4-6 wurden zusätzlich vergleichend auf HEL- und HEF-Zellen neutralisiert.

Dabei blieb das Reaktionsmuster des Stamms S1133 durchgängig gleich, während insbesondere das MAS-Isolat 8474DP4-6 embryonalen Ursprungs auf HEL-, nicht jedoch auf HEF-Zellen deutlich besser neutralisiert und die Dominanz des Stamms S1133 aufgehoben wurde.

Ein Erklärungsmodell lässt sich aus Kenntnissen über die Prozessierung von ARV beim Eintritt in die Zelle und über das Vorliegen unterschiedlicher Rezeptoren bei Reoviren der Säuger ableiten.

Zur Bestimmung des antigenetischen Verwandtschaftsgrads der MAS-Isolate wurden R-Werte berechnet (5) und die Interpretation nach einer Definition für Maul- und Klauenseuche vorgenommen (12). Dabei stellten sich die MAS-Isolate als näher oder entfernter verwandte Subtypen des Stamms S1133 bei untereinander enger Verwandtschaft dar.

Berechnete man die R-Werte aus den Ergebnissen der Neutralisation mit Virusstocks embryonalen Ursprungs, ergaben sich Verschiebungen hin zu geringeren Verwandtschaftsgraden.

Wahrscheinlich spiegeln beide Testsysteme einen Teil der in vivo ablaufenden Reaktionen wieder. Für Bekämpfungsstrategien gegenüber aviären Reoviren sind insbesondere die partielle Neutralisationsresistenz sowie die geringere Immunogenität der MAS-Isolate entscheidend. Es ist zu erwarten, dass auch die Aufnahme solcher Varianten in Vakzineprotokolle keine vollkommene Protektion gewährleisten kann, da immer wieder Viren der systemischen humoralen Immunantwort entkommen. Möglicherweise bietet die Stimulierung der T-Zellantwort einiges Potential, aber auch sorgfältige Hygienemaßnahmen mit Überprüfung der Effizienz von Desinfektionsmitteln gegenüber aktuellen ARV-Varianten bleiben unabdingbar.

8 Summary

Avian reoviruses (ARV) are supposed to play an important role in development of malabsorption syndrome (MAS) in broiler flocks. By seriously affecting weight gain, considerable economic losses occur.

The present study deals with ARV which had been isolated from broilers with MAS despite vaccination of parental flocks. Thus, the question arose, if the isolates were antigenic variants which could bypass protection by vertically transmitted maternal antibodies.

For examination, cross neutralization tests were chosen. To gain repeatable results for all ARV isolates, a plaque reduction assay including an immunohistochemical staining method was adapted to ARV.

Thereby, different ARV strains induced three distinguishable plaque types on CEL and CEF cells: a “classical” type with big, round plaques represented by the vaccine strain S1133, a plaque type with tiny syncytia represented by MAS-isolate 8588DP4-6 and a plaque type with extended syncytia represented by MAS-isolate 8474DP4-6.

The examinations on CEL cells included hyperimmune sera raised against vaccine strain S1133, against a flock-specific K-strain and against four MAS-strains isolated in the “Klinik für Vögel”. Additionally, four pooled serum samples from parental flocks were tested.

Besides the vaccine strain S1133, the following ARV strains were examined: four MAS-isolates, the enteric reovirus strain SP2004-00344 and six flock-specific vaccine strains from Southern and Northern Germany.

The neutralization capacity of hyperimmune sera differed considerably. Sera which were directed against the MAS-isolates and particularly the a-K serum showed a clearly reduced neutralization capacity compared to serum a-S1133.

ARV strains displayed a considerable antigenic heterogeneity with clear differences to the reference strain S1133. Concurrently, an extended cross reactivity occurred.

Remarkably, vaccine strain S1133 was neutralized best by every used serum, whereas the MAS-isolates resisted neutralization to a noticeable extent.

These results led to the consideration as to whether the used testing system purely reflects antigenic relatedness or if it is fundamentally affected by the host cell used.

Therefore, neutralization examinations with three selected strains (S1133, 8588DP4-6, 8474DP4-6) followed. These strains were obtained from four different tissues: CEL

and CEF cells, embryonic liver and embryonic gut. Additionally, resulting virus stocks of the isolate 8474DP4-6 were neutralized comparing the reaction pattern on CEL and CEF cells.

Thereby, the reaction pattern of strain S1133 stayed constant, whereas the MAS isolate 8474DP4-6 was neutralized to a greater extent when it was obtained from embryonic instead of cellular origin. Hence, the formerly noted dominance of the S1133 strain was overcome when a CEL cell system was used. On a CEF cell system, these differences did not occur.

An explanatory model can be deduced from knowledge of ARV processing during cell invasion and of cell receptors for mammalian reoviruses.

In order to determine antigenic relatedness of MAS isolates, R-values were calculated (5) and interpreted by a definition given for foot-and-mouth-disease (12).

Thus, MAS isolates were defined as minor and major subtypes of strain S1133 and were all closely related.

When R-values were calculated using the results of neutralization tests with virus stocks from embryonic origin, some shifts occurred which pointed to a more distant relationship to vaccine strain S1133.

It is likely that both testing systems partly reflect reactions taking place in vivo.

For strategies of controlling early ARV infections, especially the partial resistance to neutralization and the lesser immunogenicity of the existing MAS isolates are of great importance.

It can be assumed that the inclusion of novel ARV isolates in vaccination protocols will not guarantee complete protection since ARV will retain the ability to escape the systemic humoral immune response.

Possibly, stimulation of the cytotoxic immune response provides some potential for controlling early ARV infections. Nevertheless, thorough hygiene protocols remain indispensable and should include regular checking of disinfectants, particularly their capacity to degerminate existing ARV variants.

Danksagung

Allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen.

Dabei möchte ich insbesondere Herrn Prof. Dr. habil. R. Korbel für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung vielfältiger Fachkenntniserweiterungen danken.

Für die Einarbeitung in die Virologie und die geduldige Bereitschaft, sich trotz hoher Arbeitsbelastung immer wieder viel Zeit für die Betreuung der vorliegenden Arbeit genommen zu haben, möchte ich mich an dieser Stelle in ganz besonderer Weise bei Herrn PD Dr. habil. Ch. Grund bedanken.

Der PHW-Gruppe, insbesondere Herrn Dr. J. Bachmeier, möchte ich meinen Dank für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit aussprechen.

Den technischen Mitarbeitern der Klinik für Vögel, insbesondere Dana und Kathrin, danke ich herzlich für die Einarbeitung in virologische Arbeitsmethoden sowie für die geduldige Bereitschaft, bei Fragen weiterzuhelfen. Auch bei meinen Mitdotorandinnen in der Virologie möchte ich mich dafür bedanken.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung möchte ich mich besonders bei Herrn F. Scheipl bedanken.

Großer Dank gilt meinen Eltern Margit und Michael. Ohne ihre beständige Unterstützung wäre mir diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch meine Schwester Julia hat mir durch ihre frohe Art sehr geholfen.

Dankbare Erinnerung gilt zuletzt auch meiner Oma Paula Grünwald, die mir mit ihrer Lebenserfahrung und Lebensauffassung sehr geholfen hat, auftretende Schwierigkeiten in der richtigen Dimension zu sehen.