

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

**Ätiologische Bedeutung des aviären Adenovirus (AAV) für das  
Hydroperikard-Syndrom bei Mastküken in Ecuador und Pakistan**

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

vorgelegt von  
**Atoussa Mazaheri**  
Tierärztin aus Teheran / Iran

Berlin 1998  
Journal-Nr.: 2189

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Der Dekan: Univ.-Prof. Dr. K. Hartung

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. G. Monreal

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. V. Bergmann

Tag der Promotion: 23.10.1998

*Meinen lieben Eltern*



# INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
<b>A. EINLEITUNG UND STAND DES WISSENS</b>	11
<b>B. ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN</b>	20
<b>C. MATERIAL UND METHODEN</b>	21
<b>1. <u>Virusstämme</u></b>	21
1.1 Laborstämme	21
1.2 Feldstämme	21
<b>2. <u>Embryonale Leberzellkulturen</u></b>	22
<b>3. <u>Virusvermehrungen</u></b>	23
<b>4. <u>Viruscharakterisierung</u></b>	24
4.1 Serologische Untersuchung	24
4.1.1 Antiserum Herstellung	24
4.1.2 Neutralisationstest zur Typisierung der Isolate	25
4.1.3 Kreuzneutralisationstest	26
4.1.4 Neutralisationstest zur Untersuchung der Seren	26
4.2 Plaque-Reinigung ausgewählter Isolate	26
4.3 Molekularbiologische Untersuchung	27
4.3.1 Virusreinigung	27
4.3.2 Isolierung der Nukleinsäure (DNA) mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	28

4.3.3	Kurzpräparation der Nukleinsäuren (DNA)	28
4.3.4	Restriktionsenzymanalyse der Virus-DNA	29
<b>5.</b>	<b><u>Infektionsversuche</u></b>	<b>31</b>
5.1	Bruteier und Versuchstiere	31
5.2	Embryopathogenitätsprüfung	32
5.3.1	Infektion von SPF-Eintagsküken	32
5.3.2	Infektion von 3 Wochen alten SPF-Tieren	34
5.3.3	Infektion von immunsupprimierten Tieren	35
<b>6.</b>	<b><u>Versuche zu einer vertikalen Übertragung des Feldisolates K31</u></b>	<b>35</b>
<b>7.</b>	<b><u>Virusreisolierung</u></b>	<b>37</b>
7.1	Virusreisolierung aus den Lebern der Versuchstiere	37
7.2	Virusreisolierung aus der Herzbeutel­flüssigkeit	37
7.3	Virusreisolierung aus den Kloakenabstrichen und Mekoniumproben	37
<b>8.</b>	<b><u>ELISA-Tests</u></b>	<b>38</b>
<b>D.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>1.</b>	<b><u>Virusvermehrung</u></b>	<b>39</b>
<b>2.</b>	<b><u>Viruscharakterisierung</u></b>	<b>39</b>
2.1	Serologische Untersuchungen	39
2.1.1	Neutralisationstest zur Typisierung der Isolate	39
2.1.2	Kreuzneutralisationstest	40

2.2.	Molekularbiologische Untersuchungen	42
2.2.1	Präparation der Virus-DNA und Restriktionsenzymanalyse	42
<b>3.</b>	<b><u>Embryopathogenitätsprüfung mit Hühnereiembryonen</u></b>	<b>47</b>
3.1	Mortalität und pathologisch-anatomische Befunde an den Embryonen	47
<b>4.</b>	<b><u>Kükeninfektionsversuche</u></b>	<b>48</b>
4.1	Infektion von SPF-Eintagsküken	48
4.1.1	Klinische Symptome	49
4.1.2	Kükenmortalität	49
4.1.3	Pathologisch-anatomische Befunde	50
4.1.4	Pathologisch-histologische Befunde	51
4.1.5	Virusreisolierung	52
4.1.5.1	Virusreisolierung aus der Leber	52
4.1.5.2	Virusreisolierung aus der Herzbeutel­flüssigkeit	53
4.1.6	Serumneutralisationstest	53
4.1.7	ELISA-Tests	54
4.2	Infektion von 3 Wochen alten SPF-Tieren	54
4.2.1	Klinische Symptome	55
4.2.2	Kükenmortalität	55
4.2.3	Pathologisch-anatomische Befunde	55
4.2.4	Pathologisch-histologische Befunde	56
4.2.5	Virusreisolierung aus der Leber	56
4.2.6	Serumneutralisationstest	56
4.2.7	ELISA-Tests	57
4.3	Infektion von immunsuppremierten Tieren	57
4.3.1	Klinische Symptome	57
4.3.2	Kükenmortalität	57
4.3.3	Pathologisch-anatomische Befunde	58
4.3.4	Pathologisch-histologische Befunde	59

4.3.5	Virusreisolierung	59
4.3.5.1	Virusreisolierung aus der Leber	59
4.3.5.2	Virusreisolierung aus der Herzbeutelflüssigkeit	60
4.3.6	Serumneutralisationstest	60
4.3.7	ELISA-Tests	60
<b>5.</b>	<b><u>Versuche zu einer vertikalen Übertragung des Feldisolates K31</u></b>	<b>61</b>
5.1	Elterntiere	61
5.1.1	Klinische Symptome und Legeleistung bei den Elterntieren	61
5.1.2	Pathologisch-anatomische Befunde bei den Elterntieren	61
5.2	Embryonen	61
5.3	Nachkommen	62
5.3.1	Klinische Symptome und pathologisch-anatomische Befunde bei den Nachkommen	63
5.3.2	Pathologisch-histologische Untersuchungen bei den Nachkommen	64
5.4	Serumneutralisationstest	64
5.4.1	Die Untersuchungen der Seren der Elterntiere	64
5.4.2	Die Untersuchungen der Seren der Nachkommen	67
5.5	Virusausscheidung bei den Versuchstieren	67
5.5.1	Untersuchungen der Kloakentupfer der Elterntiere	67
5.5.2	Untersuchungen der Mekoniumproben und der wöchentlich entnommenen Kloakentupfer der Nachkommen	68
5.6	ELISA-Tests	69
<b>E.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>70</b>
<b>F.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b>	<b>87/88</b>
<b>G.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>89</b>

**ABKÜRZUNGEN**

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
bp	Basenpaare
CAV	Chicken Anemia Virus (Virus der Aviären Infektiösen Anämie)
C2B	Referenzstamm des Serotypes FAV11
CELO-Virus	Chicken Embryo Lethal Orphan-Virus
CPE	Cytopatischer Effekt
d p.i.	day post infectionem (Tag nach der Infektion)
EDS	Egg-Drop-Syndrom
EtBr	Ethidiumbromid
h	Stunde
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendinitrilo-Tetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
FAV	Fowl Adenovirus (Hühner-Adenovirus)
HPS	Hydroperikard-Syndrom
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEL	Hühnerembryoleberzellen
I.E.	Internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IBH	Inclusion Body Hepatitis (Einschlußkörperchenhepatitis)
IBDV	Infectious Bursitis Diseases Virus (Virus der Infektiösen Bursitis)
kb	Kilo Basenpaare
KR5	Referenzstamm des Serotypes FAV4
min	Minute
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
p.i.	post infectionem
SDS	Sodium-(Natrium) dodecylsulfat
SPF	spezifiziert-pathogenfrei

TBE	Tris-Borat-Elektrophoresepuffer
TCID <sub>50</sub>	tissue culture infective dose 50% (Gewebekultur infektiöse Einheiten 50%)
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
UpM	Umdrehungen pro Minute
Wo.	Woche

## A. EINLEITUNG UND STAND DES WISSENS

Die Familie der Adenoviridae wird in zwei Genera unterteilt, wobei zwischen den Mastadenoviren (Säugetieradenoviren) und den Aviadenoviren (Vogeladenoviren) unterschieden wird. Beide Genera sind sich zwar morphologisch ähnlich, besitzen aber kein gemeinsames gruppenspezifisches Antigen.

Bei den Aviadenoviren können drei Gruppen unterschieden werden. Die erste Gruppe umfaßt die sogenannten konventionellen Adenoviren, zu denen u.a. die bisher bekannten 12 Serotypen der Hühneradenoviren (Fowl Adenovirus, FAV1-12) gehören, deren Rolle als Krankheitserreger bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte. Viren des FAV-Typs konnten vielfach sowohl aus erkrankten als auch aus gesunden Vögeln isoliert werden (McFERRAN und CONNOR, 1977; MONREAL, 1992).

Die zweite Gruppe der Aviadenoviren wird vor allem durch den Erreger der Hämorrhagischen Enteritis der Pute repräsentiert, der zu schweren klinischen Erscheinungen mit Todesfolge bei Puten führt. Der diesem Virus sehr ähnliche, wenn nicht identische Erreger der Marmormilzkrankheit des Fasans wird der gleichen Gruppe zugeordnet.

Die dritte Gruppe der Aviadenoviren bildet das Virus des Egg-Drop-Syndrom-1976, das aus Hühnern und Enten isoliert werden kann. Dieses Virus führt bei Hühnern durch Legeleistungsdepression und Schalenschäden zu erheblichen wirtschaftlichen Einbußen in der Geflügelproduktion (VAN ECK et al., 1976).

Unter Berücksichtigung von Sequenzhomologien und der Genomorganisation schlagen HESS et al. (1997) eine neue Klassifizierung für die Familie der Adenoviridae, bestehend aus drei Genera, vor. Dabei bildet das EDS-Virus zusammen mit dem ovinen Adenovirus (OAV287) ein eigenständiges Genus.

Bei der serologischen Klassifizierung der konventionellen Adenoviren (KAWAMARU et al., 1964; McFERRAN et al., 1972; CALNEK und COWEN, 1975) werden außer den 12 Serotypen beim Huhn, 2 Serotypen bei der Pute (Turkey Adenovirus, TAV), 3 Serotypen bei der Gans (Goose Adenovirus, GAV) und 2 Serotypen bei der Ente (Duck Adenovirus, DAV) unterschieden (WIGAND et al., 1982). Die Hühneradenoviren können außerdem aufgrund des DNA-Musters in 5 DNA-Typen (A-E) unterschieden werden (ZSAK und KISARY, 1984).

Da die Einteilung der 12 Serotypen der FAV teilweise auf unterschiedlichen Referenzstämmen beruht, konnte bisher keine einheitliche Klassifizierung vorgelegt werden. Auf der Grundlage verschiedener serologischer Klassifizierungen von McFERRAN (1981) wurde 1992 von MONREAL eine zusammenfassende Darstellung der konventionellen Adenoviren des Huhnes nach Serotypen und DNA-Gruppen vorgenommen (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Einteilung der verschiedenen FAV Stämme nach MONREAL (1992)**

Vorgeschlagene FAV-Serotyp- Numerierungen <sup>a</sup>	FAV- Prototyp <sup>b</sup>	Referenzstämmen verschiedener Autoren			DNA-Typ <sup>f</sup>
		Nordirland <sup>c</sup>	Japan <sup>d</sup>	USA <sup>e</sup>	
1	CELO	OTE	112	E-1	A
2	GAL-1	SR-48	685	DP12-1	D
3	SR-49	SR-49	75	-	D
4	KR-5	KR-5	506	J-2	C
5	340	TR-22	340	M-2	B
6	CR-119	CR-119	-	-	E
7	X-11	YR-36	-	X-11	E
8	TR-59	TR-59	58	T-8	E
9	764	-	764	B-3	E
10	A-2	-	-	A-2	D
11	C-2B	-	-	C-2B	C
12	380	-	380	-	D

<sup>a und b</sup> nach McFERRAN, 1981; <sup>c</sup> nach McFERRAN, 1981 und McFERRAN und CONNOR, 1977; <sup>d</sup> nach KAWAMURA et al., 1964; <sup>e</sup> nach COWEN und NAQI, 1982; <sup>f</sup> nach ZSAK und KISARY, 1984

Die Aviadenoviren sind mittelgroße unbehüllte Viren, deren Genom aus einem einzigen linearen Molekül doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (DNA) besteht. Das Molekulargewicht der DNA der Hühneradenoviren beträgt 43,8 kilo Basen (CHIOCCA et al., 1996). Das Virion besitzt ein ikosaedrisches Kapsid mit 252 Kapsomeren, die von kleineren Kapsidproteinen zusammengehalten werden (STEWART et al., 1993). An den 12 Eckpunkten des Virions befinden sich 12 Eckkapsomere, die sogenannten Pentonkapsomere. Die übrigen 240 Kapsomere, welche die 20 dreieckigen Flächen des Virions bilden, werden als Hexone bezeichnet (VALENTINE und PEREIRA, 1965; GINSBERG et al., 1966). Das Penton besteht aus einer fünfeckigen Pentonbase, an die

über eine nicht-kovalente Bindung die Fiber gebunden ist, welche bei einer Infektion für die Adsorption der Viren an der Zelloberfläche verantwortlich ist und typspezifische Antigene beinhaltet (WIGAND et al., 1982). Die Vertreter der FAV-Gruppe besitzen zusätzlich ein gemeinsames gruppenspezifisches Antigen (KAWAMURA et al., 1964; McFERRAN et al., 1975). Im Unterschied zu allen bisher beschriebenen Adenoviren verfügen die Viren der FAV-Gruppe über Doppelfibern an den Penton-Basen, wobei beim CELO-Virus als einzigem Serotyp zwei Fibern mit unterschiedlicher Länge und unterschiedlichem Muster vorliegen (GELDERBLOM und MAICHLE-LAUPPE, 1982; HESS et al., 1995).

Infolge des Fehlens einer lipidhaltigen Virushülle sind die Adenoviren resistent gegenüber Lipidlösungsmitteln (KAWAMURA et al., 1964) und zeigen eine hohe Thermoresistenz mit einer großen Stabilität in einem pH-Bereich von 2 bis 9. Aufgrund ihrer hohen Resistenz in der Außenwelt sind sie weit verbreitet (MONREAL, 1968).

Für die Vermehrung der FAV-Serotypen eignen sich am besten homologe Zellkulturen vom epithelialen Typ aus Hühnerembryoleber-, Hühnerembryonieren- sowie Kükennierenzellen (BURKE et al., 1959 und 1965). Die Vermehrung der Viren führt in den permissiven Zellkulturen zu einem charakteristischen cytopathischen Effekt vom Rundzelltyp, der für eine Identifizierung herangezogen werden kann (ADAIR, 1978). Cytopathische Veränderungen in Form von basophilen intranukleären Einschlußkörperchen wurden im Lichtmikroskop und in HE-gefärbten histologischen Paraffindünnschnitten FAV-infizierter Zellen beschrieben (KAWAMURA et al., 1964; MAEDA et al., 1967). Entsprechend den lichtmikroskopischen Veränderungen lassen sich im Zellkern Virusantigene mittels des Immunfluoreszenstestes nachweisen (MONREAL, 1968; ADAIR, 1978). Hämagglutinierende Eigenschaften, wie sie für humane Adenoviren und das EDS-Virus beschrieben wurden, konnten bei FAV bisher nur für das CELO-Virus nachgewiesen werden (EL MISHAD et al., 1975).

Die Adenoviren vom FAV-Typ besitzen keine große Kontagiosität, durch ihre hohe Resistenz in der Außenwelt und den hohen Virusgehalt im Kot wird die Möglichkeit der horizontalen Übertragung des Virus jedoch als sehr hoch eingeschätzt (MONREAL, 1966; COOK, 1974). Die Vermehrung erfolgt nach natürlicher Infektion im oberen Respirations- und Verdauungstrakt (CLEMMER, 1965), die Ausscheidung hauptsächlich über den Kot. Die horizontale Ausbreitungen auf alimentärem und

aerogenem Wege sowie die vertikale Übertragung über das Brutei tragen in großem Maße dazu bei, daß FAV heute in nahezu jedem Hühnerbestand gefunden werden können. Untersuchungen ergaben, daß spätestens mit Beginn der Legetätigkeit FAV-Antikörper von einem oder mehreren Serotypen innerhalb einer Herde nachgewiesen werden können (MONREAL, 1987). MONREAL (1984) weist in einer Studie nach, daß mit zunehmendem Alter einer Herde auch deren Durchseuchungsgrad mit immer mehr Serotypen ansteigt. In einer Untersuchung zum Nachweis von Antikörpern gegen aviäre Adenoviren in Herden vom Legetyp wurden bei Tieren im Alter von 10 bis 20 Wochen 53,7% positive Seren und bei über 50 Wochen alten Tieren 99,3% positive Seren nachgewiesen.

Über die pathogenetische Bedeutung der konventionellen Adenoviren bestehen auch heute noch erhebliche Unklarheiten. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens der Hühneradenoviren bei gesunden und erkrankten Tieren muß sorgfältig geprüft werden, ob bei einem Krankheitsausbruch ein isoliertes Adenovirus tatsächlich an der Pathogenese beteiligt ist.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Adenoviren und einer Erkrankung beim Geflügel, der Wachtelbronchitis, wurde erstmals von OLSON (1950) festgestellt. Die Wachtelbronchitis verläuft mit schweren respiratorischen Störungen und mit einer Mortalität bis zu 100%. McFERRAN (1981) konnte Isolate aus verschiedenen Ausbrüchen durch serologische Untersuchungen dem Serotyp FAV1 zuordnen.

In der Zeit von 1960 bis 1970 wurden im Zusammenhang mit Adenovirusinfektionen von verschiedenen Autoren Symptome wie geringgradiges Röcheln, erschwerte Atmung sowie leicht vermehrte Nasensekretion beobachtet. Allerdings traten in diesem Zeitraum zusätzlich auch vermehrt primäre und sekundäre Mykoplasmainfektionen auf. In einer Studie wurde nachgewiesen, daß das CELO-Virus in der Lage ist, latente Mykoplasmainfektionen zu aktivieren (MONREAL, 1966). McFERRAN et al. (1971) konnten aus Herden mit respiratorischen Störungen wesentlich häufiger Adenoviren isolieren, als bei Herden ohne klinische Symptome. Nach der Infektion (oral und intranasal) von spezifiziert pathogenfreien (SPF) Eintagsküken ohne maternale Antikörper gegen FAV konnten verstärkt klinische Symptome der Atmungsorgane, Störungen des Allgemeinbefindens und sogar 31% Mortalität bei einem FAV2 Stamm

festgestellt werden (COOK, 1983). Neuere Untersuchungsergebnisse lassen erkennen, daß eine pathogene Wirkung von FAV im Respirationstrakt maßgeblich von vorausgegangenen Infektionen mit verschiedenen E.coli Stämmen oder dem Virus der infektiösen Bursitis beeinflusst sein dürfte (DHILLON et al., 1982; DHILLON und WINTERFIELD, 1984; DHILLON, 1986).

Nachdem HELMBOLDT und FRAZIER (1963) eine akute infektiöse Einschlußkörperchenhepatitis bei 7 Wochen alten Küken beobachteten, gelang es HOWELL et al. (1970) in Lebern von erkrankten Tieren Einschlußkörperchen vom Cowdry Typ-A nachzuweisen. Die kurze Zeit später bei Junghennen und Mastküken festgestellte Hepatitis mit charakteristischen Einschlußkörperchen (Inclusion body hepatitis, IBH) (FADLY und WINTERFIELD, 1973; ROSENBERGER et al., 1974) konnte eindeutig auf konventionelle Hühneradenoviren zurückgeführt werden. Im Alter zwischen 3 und 12 Wochen ist in Zusammenhang mit der Einschlußkörperchenhepatitis in Broilerherden, aber auch bei Legehühnern und Küken, ein Anstieg der Mortalität innerhalb weniger Tage zwischen 1-30% festzustellen. Die befallenen Tiere erscheinen matt und schlaff und bleiben in der Entwicklung zurück. Die bedeutendste pathologisch-anatomische Gewebeveränderung ist eine gelblich-dunkelrot marmorierte, brüchige, geschwollene und nekrotische Leber. Histologisch sind große, vorwiegend basophile intranukleäre Einschlußkörperchen in den Hepatozyten nachweisbar (BICKFORD, 1972; GALLINA et al., 1973; McFERRAN et al., 1976). Interessanterweise wurden verschiedene FAV-Stämme aus solchen Krankheitsfällen in verschiedenen Ländern isoliert und zwar FAV1 (WINTERFIELD et al., 1973), FAV2, -3 und -4 (McFERRAN et al., 1972), FAV5 (FADLY und WINTERFIELD, 1973) und FAV8 (McFERRAN et al., 1976).

Mit verschiedenen FAV-Serotypen konnte experimentell auch mehrfach das klassische Bild der Einschlußkörperchenhepatitis reproduziert werden (ROSENBERGER et al., 1974; McCracken et al., 1976; GRIMES et al., 1978), allerdings nicht regelmäßig.

McFERRAN (1991) betont, daß der Infektionsweg bei dem Versuch, das IBH Krankheitsbild zu erzeugen, eine große Rolle spielt. Hinzu kommt das Alter der Versuchstiere und die eingesetzte Infektionsdosis. Auch die Beobachtung, daß verschiedene Serotypen, aber auch Stämme des gleichen Serotypes, ein unterschiedliches pathogenes Potential besitzen können, wurde mehrmals erwähnt

(COOK, 1974; DHILLON und WINTERFIELD, 1984; BARR und SCOTT, 1988; MONREAL und HESS, 1994). Der mögliche Zusammenhang von Virulenz und Genotyp wurde von ERNY et al. (1991) aufgezeigt.

Das Krankheitsbild der Einschlußkörperchenhepatitis ist nicht immer einheitlich. Mit der Hepatitis ist häufig eine hochgradige Anämie assoziiert (HOFFMANN et al., 1975 und 1978). In den folgenden Jahren zeigte sich, daß dieses Krankheitsbild durch einen weiteren Erreger, das Kükenanämievirus (CAV), bedingt ist. Bei Küken, die mit CAV und Adenoviren koinfiziert sind, kann ein häufigeres Auftreten von Hepatitiden und Anämien, die zu Todesfällen führen, vorkommen (BÜLOW et al., 1986). Auch das Virus der infektiösen Bursitis unterstützt durch seine immunsuppressive Wirkung die Entstehung einer IBH durch Adenoviren (ROSENBERGER et al., 1975; FADLY et al., 1976a).

Der Stand des Wissens über die pathogenetischen Eigenschaften der Hühneradenoviren vom FAV-Typ und ihrer Potenz, krankhafte Veränderungen hervorzurufen, läßt sich bis zum Ende der 80er Jahre etwa wie folgt zusammenfassen: Die durch Adenoviren bedingten Veränderungen, insonderheit in der Leber einschließlich der charakteristischen Einschlußkörperchen, das heißt also, das pathologisch- anatomische Substrat, können auf die Wirkung der Adenoviren zurückgeführt werden. Zur Entstehung des Krankheitsbildes scheinen indessen weitere Faktoren erforderlich zu sein, so daß als weitere mitbestimmende Ursache Immunsuppressionen, Anämie, bakterielle Infektionen oder weitere Stressoren erforderlich zu sein scheinen. Die Hühneradenoviren vom FAV-Typ schienen nach damaliger Ansicht nicht über eine direkte primäre krankheitserregende Wirkung zu verfügen (MONREAL, 1992). In den folgenden Jahren änderte sich diese Situation offensichtlich.

Ende der 80er Jahre traten in Australien und Neuseeland typische Krankheiten mit Veränderungen der IBH auf, ohne vorherige Immunsuppression. Einigen Wissenschaftlern gelang es nachzuweisen, daß Hühneradenoviren primär pathogen sein können, d.h. IBH direkt auszulösen vermögen (REECE et al., 1986; CHRISTENSEN und SAIFUDDIN, 1989; ERNY et al., 1991).

ERNY et al. (1991) berichteten von einer akuten IBH in Australien, die im Gegensatz zur klassischen IBH bei Tieren, die jünger als 3 Wochen alt waren, eine Mortalität von 30% verursachte. In diesen Fällen wurden Stämme der Serotypen 6 und 8 von den

erkrankten Tieren isoliert. Auch in Neuseeland wurde von IBH erkrankten Tieren ein Adenovirus mit der Zugehörigkeit zum Serotyp 8 isoliert. Diese Tiere zeigten zusätzlich zu den typischen Leberveränderungen eine starke Bursa- und Thymusatrophie (CHRISTENSEN und SAIFUDDIN, 1989). Es gelang SAIFUDDIN und WILKS (1990) durch eine orale Infektion von zwei Tage alten SPF-Küken die Krankheit mit einem Isolat, zugehörig zum Serotyp 8, zu reproduzieren. Dabei wurde eine 30%ige Mortalitätsrate festgestellt.

In der zweiten Hälfte des Jahres 1987 wurden erste Fälle einer neuen Erkrankung in pakistanischen Broilerbeständen beobachtet, die nach der Region ihres Auftretens, in der Nähe von Karachi, als "Angara Disease" bezeichnet wurde. Bis zum Sommer 1988 hatte sich die Krankheit weitgehend über ganz Pakistan ausgebreitet (ANJUM, 1988; JAFFREY, 1988). Die Erkrankung beginnt im Alter von 3-5 Wochen und führt innerhalb von 8-15 Tagen bei geringer Morbidität zu plötzlichen Todesfällen, deren Rate bei infizierten Herden zwischen 20% bis 75% liegt. Charakteristisch ist die Ansammlung einer serösen Flüssigkeit im Herzbeutel, Perikarditis, Leberaufhellung und -schwellung, Lungenödem, Nephritis, Milzschwellung sowie Thymus- und Bursaatrophie. Bei den histologischen Untersuchungen konnten hauptsächlich basophile Einschlusskörperchen in der Leber beobachtet werden (ANJUM et al., 1989; CHEEMA et al., 1989; CONRAD et al., 1991). Entsprechend dem pathologischen Hauptbefund, einem schweren Hydroperikard, wurde vorgeschlagen, die Erkrankung als Hydroperikard-Syndrom (HPS) zu bezeichnen (COWEN, 1992).

Im Veterinärlabor der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, gelang es 1989 aus akuten Krankheitsfällen der Angara disease ein Adenovirus zu isolieren, welches als K31 bezeichnet wurde. In Übertragungsstudien konnte mit dem Virusisolat durch parenterale Infektion von SPF-Eintagsküken die Erkrankung reproduziert werden. Infizierte Tiere erzeugten spezifische Antikörper gegen das Isolat K31. Durch vergleichende Charakterisierung mit zwölf FAV-Antisera im Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin konnte das Isolat dem Serotyp 4 zugeordnet werden (SCHÜLLER et al., 1991).

Desweiteren trat in Deutschland 1993 bei Broilerherden eine mit Leberveränderungen und Kerneinschlüssen einhergehende Krankheit auf, deren Verluste bis zu 10% bei 11 bis 18 Tage alten Küken betragen. Die Küken waren apathisch, die Futter- und

Wasseraufnahme ging deutlich zurück. Erkrankte Tiere starben innerhalb von 24 Stunden. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen bei den betroffenen Tieren erstreckten sich hauptsächlich auf die Leber, welche Schwellungen und petechiale Blutungen aufwies. Zusätzliche Befunde waren Nephritiden mit Harnleiterstau, petechiale Blutungen in der Muskulatur und bei etwa 25% der verendeten Küken auch ein Hydroperikard. In den betroffenen Herden war bereits die Schlupfrate erniedrigt. Von den verstorbenen Küken wurde ein Adenovirus vom FAV-Typ isoliert, das die Bezeichnung K-235 erhielt. Mit diesem Isolat konnte das Krankheitsbild nach parenteraler Injektion in *in vivo* Experimenten reproduziert werden. Das Isolat K-235 wurde von Antikörpern gegen die Serotypen FAV2 und FAV12 neutralisiert, bei weiteren Untersuchungen mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen konnte festgestellt werden, daß dieses Virus dem Serotyp 2 zuzuordnen ist (HESS et al., 1993).

Bereits seit 1986 wurde auch aus mehreren lateinamerikanischen Ländern vermehrt über Krankheitsfälle mit ähnlichen Symptomen wie in Pakistan berichtet, wobei zu diesem Zeitpunkt die Krankheit der IBH zugeordnet wurde (CUBILLOS et al., 1986), obwohl bei diesen Ausbrüchen ein Hydroperikard und die erhöhte Mortalität im Gegensatz zu der klassischen IBH auffällig waren (ALTAMIRANO, 1990).

GAY et al. (1995) isolierten ein Adenovirus von 3 Wochen alten Broilern mit HPS-Symptomen in Mexiko. In diesen Broilerherden wurde eine 45%ige Mortalität beobachtet und das Adenovirus als Serotyp 8 beschrieben. Nach einer intramuskulären Applikation des Isolates in 3-5 Wochen alten SPF-Tieren verendeten 80% der infizierten Tiere. Auch COWEN et al. (1996) führten eine Studie zur Reproduktion der Krankheits Symptome bei zwei Tage alten SPF-Tieren durch, wobei eine orale Infektionen mit einem Feldisolat aus Australien und einem Feldisolat aus Chile eingesetzt wurden. Das australische Isolat wurde dem Serotyp 8 zugeordnet und das chilenische Isolat wurde als Serotyp 4 identifiziert. Eine 5%ige Mortalität wurde bei der ersten Gruppe, eine 45%ige Mortalität bei der letzten Gruppe registriert. Bei einem Teil der künstlich infizierten Tiere beider Gruppen konnten pathologische Befunde wie beim Hydroperikard-Syndrom ermittelt werden.

Insgesamt ist festzustellen, daß sich das Hydroperikard-Syndrom (HPS) offensichtlich nicht nur auf Pakistan und auf lateinamerikanische Länder wie Mexiko, Chile, Peru und Ecuador beschränkt. Vielmehr wurde das Phänomen in den letzten Jahren auch in

mehreren anderen asiatischen Ländern festgestellt. Dazu gehören Länder in Nahost-Regionen wie Irak (ABDUL-AZIZ und AL-ATTAR, 1991) und Kuwait (YOUSSEF, pers. Mitteilung) aber auch in Rußland (BORISOV et al., 1997) sowie in Indien (CHANDRA et al., 1997). Inwieweit in einzelnen Fällen des Auftretens der Krankheit neben den das Krankheitsbild determinierenden Adenoviren des FAV-Typs weitere ätiologische Faktoren eine Rolle spielen, kann auch aus der Literatur nicht immer eindeutig abgeleitet werden. Die vielfach gelungenen Übertragungsversuche zeigen indessen, daß in vielen Fällen Adenoviren das eigentlich auslösende Moment für die Krankheitsausbrüche darstellen.

## **B. ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN**

An Hand der vorausgegangenen Ausführungen wird deutlich, daß die Frage der primären Pathogenität der Virusisolate vom FAV-Typ in einzelnen Fällen eindeutig positiv zu beantworten ist. Indessen bleibt die Frage offen, ob die Krankheitsausbrüche und das Krankheitsbild von IBH und HPS, wie sie endemisch in den letzten Jahren in mehreren Regionen der Welt aufgetreten und beschrieben sind, bestimmten FAV-Serotypen zugeordnet werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, Feldisolate aus erkrankten Tieren in Ecuador (K1013 Nr. 1-6) serologisch und molekularbiologisch zu charakterisieren, in die Reihe der FAV-Serotypen einzuordnen und die Isolate untereinander zu vergleichen, um die Frage beantworten zu können, ob die Isolate aus verschiedenen Regionen eines Landes in serologischer Hinsicht und auf der Genomebene identisch sind.

Gleichzeitig sollte geklärt werden, ob und wie das asiatische Feldisolat K31 sich serologisch bzw. auf der Genomebene im Vergleich zu den lateinamerikanischen Isolaten und den entsprechenden Referenzstämmen unterscheidet.

Um der Frage nach der primären Pathogenität der Adenoviren vom FAV-Typ nachzugehen, wurden verschiedene Pathogenitätsstudien durchgeführt. Dabei sollte geklärt werden, ob tatsächlich die isolierten Adenoviren von HPS erkrankten Tieren für das Krankheitsbild allein verantwortlich sind oder weitere, auch immunsupprimierende Faktoren, für die Entstehung und den Verlauf des Krankheitsgeschehens eine Rolle spielen. Hierzu war es erforderlich, Versuche mit Küken unterschiedlicher Altersgruppen nach Infektion auf verschiedenen Wegen durchzuführen. Unter Verwendung von Isolaten aus Lateinamerika, aus Asien und des entsprechenden Referenzstammes sollten Unterschiede der Pathogenität einzelner Stämme erfaßt werden.

Durch Infektion von Elterntieren sollte die Möglichkeit der vertikalen Virusübertragung und eine daraus resultierende Pathogenität für die Embryonen und Küken über einen Zeitraum von mehreren Wochen verfolgt werden. Während dieses Versuchsabschnittes wurden auch der Verlauf der Virusausscheidung und der Antikörperbildung bei den Elterntieren und ihren Nachkommen mitberücksichtigt und überprüft.

## **C. Material und Methoden**

### **1. Virusstämme**

#### **1.1 Laborstämme**

Für die Untersuchung wurden dreimal plaquegereinigte Stämme der aviären Adenovirus-Serotypen FAV1 bis 12 (McFERRAN, 1981) verwendet, die im Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin als Referenzstämme vermehrt und aufbewahrt werden. Diese sind bereits in mehreren Arbeiten ausführlich beschrieben worden (MONREAL et al., 1980; DORN et al., 1980; MONREAL, 1984). Molekularbiologische und weitere Untersuchungen wurden mit den ebenfalls plaquegereinigten Serotypen FAV4, Stamm KR5 (KAWAMURA et al., 1964) und FAV11, Stamm C2B (CALNEK und COWEN, 1975) durchgeführt.

#### **1.2 Feldstämme**

Das Adenovirusisolat aus einer Feldinfektion der "Angara Disease" bei Broilern in Pakistan wurde 1989 von der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, isoliert und als Isolat K31 bezeichnet. Unter Verwendung von serologischen und molekularbiologischen Untersuchungsmethoden konnte eine enge Verwandtschaft des K31 Isolates mit dem Serotyp 4 der Hühneradenoviren festgestellt werden (SCHÜLLER et al., 1991).

Sechs Virusisolate aus verschiedenen Feldinfektionen aus Ecuador mit ähnlichen Symptomen wie "Angara Disease" wurden in die Untersuchungen einbezogen. Sie wurden von Dr. Valencia (Lafavet, Quito) der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, zur Verfügung gestellt und erhielten die Bezeichnung K1013 (Nr. 1 - 6).

Einzelne Daten über die Herkunft und die Krankheitsausbrüche, aus denen die K1013 (Nr. 1-6) Feldisolate aus Ecuador stammen, sind in der folgenden Übersicht zusammengefaßt:

Labor Nr.	Zahl der Tiere im Bestand	Alter in Wochen	Mortalitätsrate
Nr. 1	2000	4	50%
Nr. 2	3500	4.5	25%
Nr.3	6500	5	47%
Nr.4	1500	6	27%
Nr.5	8000	5	57%
Nr.6	10000	6	18%

Bei der Anzucht auf Hühnerembryoleberzellkulturen zeigten die Stämme einen für das Adenovirus typischen zytopathischen Effekt (CPE).

## **2. Embryonale Leberzellkulturen**

Für die Vermehrung der Virusstämme und -Isolate sowie die Durchführung der Neutralisationsteste wurden Hühnerembryoleberzellen (HEL) benötigt. Zur Herstellung der HEL wurden Embryonen am 11. Bebrütungstag aus SPF-Bruteiern (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) entnommen, dekapitiert und eviszeriert. Die gewonnenen Lebern wurden zerkleinert und mit PBS gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die Suspension mit 0,05 %iger Trypsinlösung (Fa. Difco) versetzt und für 10 min auf einem Magnetrührer gerührt, um die Zellen aus dem Gewebsverband zu lösen. Der Vorgang (Trypsin/Magnetrührer) wurde 4 bis 5x wiederholt, der gesammelte zellhaltige Überstand zentrifugiert (Minifuge GL, Fa. Heraeus Christ, 1000 UpM, 10 min) und die sedimentierten Zellen in Anzuchtmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch 2-fache sterile Baumwollgaze filtriert, nochmals zentrifugiert (1000 UpM, 10 min) und das Zellsediment in 30 ml des Anzuchtmediums aufgenommen.

Die Konzentration vitaler Zellen wurde mikroskopisch nach Kristallviolett färbung mit Hilfe eines Hämozytometers (Fuchs-Rosenthal) gezählt. Die Suspension wurde dann für die Virusanzuchtversuche, die Plaquereinigungen und die Virusvermehrung mit dem Anzuchtmedium auf 800.000 Zellen/ml verdünnt und mit einer Menge von je 35 ml in

Zellkulturschalen gefüllt (Ø 15 cm, Fa. Greiner). Für die Neutralisationsteste in Mikrotiterplatten für Gewebekulturen (Fa. Greiner) wurde die gleiche Zellzahl/ml verwandt.

### **3. Virusvermehrung**

Die Schalen wurden bei 37° C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre bebrütet, nach 24 Stunden war der Zellrasen konfluent. Danach wurde das Anzuchtmedium abgesaugt und 2 ml Virussuspension (Titer ca. 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml) auf dem Rasen verteilt. Nach einer Adsorptionszeit von 1 h bei 37° C wurden 35 ml Erhaltungsmedium zugegeben und die Schalen bis zur Ausbildung eines starken CPE (24-72 h) weiterbebrütet. Virushaltiger Zellrasen und Überstand wurden nach dreimaligem Friertauen geerntet und bei -20° C aufbewahrt.

### **Lösungen**

#### **PBS (pH 7,4):**

	8	g	NaCl
	0,2	g	KCl
	1,15	g	Di-Natriumdihydrogenphosphat x 2H <sub>2</sub> O
	0,20	g	Kaliumdihydrogenphosphat
ad	1000	ml	Aqua dest.

#### **Anzuchtmedium für embryonale Leberzellen:**

			Medium 199 (Fa. Seromed)
	10	%	Tryptosephosphatbouillon (Fa. Difco)
	10	%	Kälberserum (Fa. Seromed)
	100	I.E./ml	Benzyl-Penicillin (Fa. Heyl)
	100	µg/ml	Streptomycin-Sulfat (Fa. Heyl)

Erhaltungsmedium für embryonale Leberzellen:

wie Anzuchtmedium, aber nur  
1 % Kälberserum (Fa. Seromed)

Trypsin-Lösung:

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

**4. Viruscharakterisierung****4.1 Serologische Untersuchung****4.1.1 Antiserum Herstellung**

Zur Produktion des Antiserums gegen K1013 (Nr. 2) wurden jeweils 5 drei Wochen alte SPF-Küken mit plaquegereinigtem Virusmaterial K1013 ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml) (siehe C 4.2) oculo-oral mit 0,1 ml Inokulat infiziert. Die Blutentnahme wurde zwei Wochen später durchgeführt (je 2 ml). Dazu wurde den Küken das Halsgefieder mit lauwarmem Wasser angefeuchtet und die rechte Vena jugularis mit einer Einmal-Kanüle (Sterican, 0,9 x 40 mm, 20G x 1 1/2, Fa. Braun) und aufgesetzter 5-ml Spritze punktiert.

Zur Gerinnung wurde das Blut 2 Stunden bei 38° C inkubiert. Anschließend wurde das Blut 10 min bei 3000 UpM und 4° C (Minifuge GL, Fa. Heraeus Christ) abzentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde portioniert und bei -20° C gelagert.

Die Antiseren gegen das Feldisolat K31 und gegen die Referenzstämme wurden in SPF-Kaninchen im Zentralen Tierlabor der FU-Berlin bereits früher hergestellt und standen im Institut für Geflügelkrankheiten zur Verfügung.

#### 4.1.2 Neutralisationstest zur Typisierung der Isolate

Der Neutralisationstest wurde in Hühnerembryoleberzellkulturen im Mikrotiterplattenverfahren, wie von MONREAL et al. (1980) beschrieben, durchgeführt.

Mit Hilfe von Referenzseren aller FAV-Serotypen (1 bis 12) wurde geprüft, von welchen Antiseren die sechs Isolate neutralisiert wurden.

Dazu wurden die Seren auf einen Antikörpergehalt von 20 Serumeinheiten (eine Serumeinheit entspricht der höchsten Serumverdünnung, die eine vollständige Virusneutralisation ermöglicht) eingestellt. Die zu typisierenden Virusisolate wurden von  $10^0$  bis  $10^{-5}$  mit Medium 199 verdünnt. Virus und Serum jeder Verdünnung wurden im gleichen Verhältnis (je 0,05 ml) in den Mikrotiterplatten gemischt.

Nach einer Inkubation von 2 h bei  $37^\circ\text{C}$  wurden 0,15 ml Zellsuspension zugegeben und die Proben bis zu 5 Tage weiter bebrütet.

Die Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Nach 5 Tagen erfolgte eine Fixierung mit Formalin (10%ig) und anschließend eine Zellfärbung mit Giemsa-Lösung (1:10).

Als Kontrollen dienten:

- Alle Virusverdünnungen ohne Serumzugabe
- Serum ohne Virus
- Zellkontrollen

Beurteilt wurde der CPE im Zellrasen im Vergleich zur Viruskontrolle. Ein Ausbleiben des CPE bedeutete Neutralisation des Virusisolates durch Antikörper des entsprechenden FAV-Serotyps.

#### Lösungen

##### Färbelösung:

Giemsalösung (Fa. Merck), 1:10 verdünnt

Formaldehydlösung 35 %ig (Fa. Merck), 1:10 verdünnt

#### **4.1.3 Kreuzneutralisationstest**

Die genaue Bestimmung der Zugehörigkeit der Isolate zu einem bestimmten Serotyp wurde im Kreuzneutralisationstest geprüft. Im Test wurden alle Antiseren, mit denen die Feldisolate reagiert hatten und die entsprechenden Referenzstämme der Serotypen eingesetzt so daß die Neutralisationstiter jedes Stammes gegen jedes Serum bestimmt werden konnten. Alle Seren wurden in zweifachen Verdünnungsstufen verdünnt (1:10 bis 1:10240) und mit dem gleichen Volumen der entsprechenden Virussuspensionen (30-300 TCID<sub>50</sub> /0,05 ml) gemischt.

Als Neutralisationstiter galt die höchste Serumverdünnung, die noch eine vollständige Virusneutralisation bewirkte.

#### **4.1.4 Neutralisationstest zur Untersuchung der Seren**

Alle zu untersuchenden Seren wurden inaktiviert (56° C, 30 min), 1:10 vorverdünnt und 0,05 ml jedes Serums wurde mit 0,05 ml jedes Referenzstammes aller 12 FAV-Serotypen gemischt. Die Virusstämme waren auf einen Virusgehalt von 30-300 TCID<sub>50</sub>/0,05 ml eingestellt. Die Seren der Elterntiere und ihre Nachkommen wurden in eine Verdünnungsreihe von 1:4 bis zu 1:1024 geprüft. Die Durchführung des Tests erfolgte wie unter C 4.1.2 beschrieben.

#### **4.2 Plaque-Reinigung ausgewählter Isolate**

Nach der Serotypisierung wurde eine Plaque-Reinigung der Isolate K1013 (Nr.2) und K31 zur Standardisierung der Virusstämme für die weiteren Untersuchungen zur Embryopathogenität und für die Infektionsversuche durchgeführt.

HEL-Zellkulturen in Petrischalen (Ø 60 mm, Fa.Greiner) wurden mit dem jeweiligen Virus in einer Konzentration zwischen 30 und 100 TCID<sub>50</sub> beimpft. Das Medium wurde 24 Stunden nach der Infektion entfernt und der Zellrasen mit 6,5 ml verflüssigtem Overlay-Medium überschichtet. Die Zellen wurden bis zum Auftreten von Plaques (5 bis 9 d p.i.) unter festem Overlay-Medium weiterbebrütet.

Unter dem Mikroskop wurden mit Hilfe der Pasteurpipette einzelne Plaques abgesaugt, in Anzuchtmedium überführt und resuspendiert. Anschließend erfolgte eine erneute

Verimpfung jedes isolierten Plaques nach dem gleichen Modus. Nach dreimaliger Plaque-Reinigung wurde das Virus wie unter C 3 beschrieben weiter vermehrt.

## **Lösungen**

### Medium für Overlay:

Lösung A: Medium 199

Lösung B: PBS Agarose - Lösung 1%ig, verflüssigt

Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 Mischen

## **4.3 Molekularbiologische Untersuchung**

### **4.3.1 Virusreinigung**

Das 3 x eingefrorene und aufgetaute Virusmaterial (1000 ml) wurde 3 x 10 Sekunden beschallt (Stufe 5-6, Sonifer, Fa. Branson). Anschließend wurden durch Zentrifugation (Fa. Sorvall, GSA-Rotor) über 20 min bei 4000 UpM und 4° C die Zellreste entfernt. Die vorgeklärte Virussuspension wurde mit 5 ml Cäsiumchlorid-Lösung (Dichte 1,27 g/ml) unterschichtet und im SW 28 Rotor (Fa. Beckmann) 2,5 h lang bei 28.000 UpM und 4° C sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das virushaltige Sediment in 1 ml Cäsiumchloridlösung (Dichte 1,34 g/ml) sorgfältig resuspendiert. Die vereinigten Sedimente wurden einer Gleichgewichtszentrifugation im 50-TI-Rotor (Fa. Beckmann) für 48 h bei 40.000 UpM und 12° C unterzogen. Das Virus, das sich in einer Bande mit einer Dichte von 1,34 g/ml sammelte, wurde durch seitliche Punktion aus dem Röhrchen entnommen (BAUER, 1989).

### **4.3.2 Isolierung der Nukleinsäure (DNA) mittels Phenol-Chloroform-Extraktion**

Das Virusmaterial aus der Gleichgewichtszentrifugation wurde in TE-Puffer resuspendiert und zur Entfernung des Cäsiumchlorids im SW 41 Rotor (Fa. Beckmann) für eine Stunde bei 32.000 UpM und 4° C pelletiert und anschließend in 1 ml SDS-haltigem Lysispuffer resuspendiert.

Nach Behandlung mit 1 mg/ml Proteinase K (Fa. Boehringer Mannheim) wurde das pelletierte Virusmaterial mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (MANIATIS et al., 1989) von den viralen Proteinen getrennt und mit absolutem Ethanol gefällt. Das nach der Zentrifugation gewonnene DNA-Pellet wurde unter Vakuum getrocknet und anschließend in 1 ml TE-Puffer (0,1 mM EDTA) aufgenommen. Die Menge der DNA wurde fluorometrisch bei 260 nm bestimmt.

### **4.3.3 Kurzpräparation der Nukleinsäuren (DNA)**

Für die Kurzpräparation der Nukleinsäure wurde eine am Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin etablierte Methode verwendet.

Hierbei erfolgt die Gewinnung der DNA ohne Gradientenreinigung des Virusmaterials aus infiziertem Zellkulturextrakt. Diese schnell ablaufende Methode hat den Vorteil, daß wesentlich weniger Virusmaterial benötigt wird, liefert andererseits aber nicht so saubere Schnittmuster wie die Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA.

Die 3 x eingefrorene und aufgetaute Zellsuspension (100 ml) wurde mit der halben Menge Chloroform gemischt und anschließend durch Zentrifugation (Fa. Sorvall, GSA-Rotor) für 20 min bei 3500 UpM und 4° C von den Zelltrümmern befreit. Durch Zentrifugation im SW 28 Rotor (Fa. Beckmann) für 90 min bei 28.000 UpM wurde das Virus pelletiert und das Sediment in 1 ml TE-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Lysispuffer mit 1 mg/ml Proteinase K.

Die Mischung wurde für 3 h bei 37° C im Wasserbad belassen und anschließend im Eisbad schnell abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml Kaliumacetat (5M), Zentrifugation (Minifuge GL, Fa. Heraeus Christ) für 60 min bei 10.000 UpM 4° C, wurde das Pellet verworfen und die DNA aus dem Überstand mittels eiskaltem absolutem Ethanol über Nacht bei -20° C gefällt. Nach der Pelletierung der präzipitierten DNA für 60 min bei

10.000 UpM, 4° C (Fa. Sorvall, GSA-Rotor) und Trocknung unter Vakuum wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

## **Lösungen**

### Tris-EDTA (TE-Puffer):

10	mM	Tris-HCL	pH 7,4
0,1	mM	EDTA Di-Natriumsalz	

### Lysispuffer:

100	mM	Tris-HCL	
100	mM	NaCl	
1	mM	EDTA Di-Natriumsalz	
1	%	Natriumdodecylsulfat (SDS)	

### Proteinase K:

1 mg/ml	Lysispuffer
---------	-------------

## **4.3.4 Restriktionsenzymanalyse der Virus-DNA**

Die Spaltung der gereinigten DNA erfolgte mit den Restriktionendonukleasen: Bam HI, Bgl II, Dra I, Eco R I und Pst I (Fa. Life Technologies).

Pro Reaktionsansatz wurden 0,3 µg DNA mit 20 Einheiten des Restriktionsenzym unter Zugabe des entsprechenden Reaktionspuffers 2 h bei 37° C inkubiert. Gestoppt wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 6 µl SDS/EDTA-haltigem Probenpuffer.

Als Längenstandard in der nachfolgenden Gelelektrophorese diente ein 1 kb Molekulargewichtsmarker von 75 bis 12,216 Basenpaaren und ein Hochmolekulargewichtsmarker von 8,271 bis 48,502 Basenpaaren (Fa. Life Technologies).

Die Elektrophorese wurde in einem 0,5%igem horizontalen Agarosegel mit Ethidiumbromid bei 18 Volt über Nacht durchgeführt, anschließend wurden die DNA-Fragmente unter Bestrahlung von 302 nm UV-Licht sichtbar gemacht. Die Bestrahlung

fand auf einem Transilluminator UVT 2035 (Fa. Herolab) statt. Zur Dokumentation wurde das DNA-Spaltungsmuster fotografiert.

## Lösungen

### Reaktionspuffer (10x) für die Restriktionsenzyme (Fa. Gibco-BRL):

Puffer 1: für Dra I

500	mM	Tris-HCl	pH 8,0
100	mM	MgCl <sub>2</sub>	

Puffer 2: für Pst I

500	mM	Tris-HCl	pH 8,0
100	mM	MgCl <sub>2</sub>	
50	mM	NaCl	

Puffer 3: für BamH I, Bgl II und EcoR I

500	mM	Tris-HCl	pH 8,0
100	mM	MgCl <sub>2</sub>	
1	M	NaCl	

### Probenpuffer (4x):

10	%	Ficoll Typ 400 (Fa. Merck)
0,5	%	Bromphenolblau (Fa. Merck)
10	mM	EDTA Di-Natriumsalz
0,1	%	SDS

Tris-Borat-Elektrophoresepuffer (TBE) (10x):

89	mM	Tris-HCL	pH 7,5
89	mM	Borsäure	
2	mM	EDTA Di-Natriumsalz	

Ethidiumbromidlösung (1%ig):

10 mg/ml EtBr in Aqua dest.

Agarosegel (0,5%ig):

	0,5	g	Agarose
	10	µl	Ethidiumbromid-Lösung (1%)
ad	100	ml	TBE-Puffer (1x)

**5. Infektionsversuche****5.1 Bruteier und Versuchstiere**

Für die Untersuchung wurden spezifiziert-pathogenfreie (SPF) Valo Bruteier der Firma Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, verwendet.

Die verwendeten Küken wurden aus VALO-Eiern von SPF-Elterntieren erbrütet, und bis zum Einsatz in den entsprechenden Versuchen unter SPF-Bedingungen gehalten. Die Tiere der Infektionsversuche wurden in Überdruckisolatoren im Veterinärlabor der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, gehalten. Futter und Trinkwasser wurden ad libitum angeboten.

Für die Infektionsversuche von Zuchthühnern standen Hennen und Hähne aus der SPF-Haltung Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, zur Verfügung.

Alle Infektionsversuche wurden im Versuchstierhaus der Firma Lohmann Tierzucht in Cuxhaven durchgeführt.

## 5.2 Embryopathogenitätsprüfung

Fünf Tage alte embryonierte SPF-Hühnereier wurden mit je 0,1 ml plaquegereinigtem Virusmaterial in den Dottersack beimpft. Die Versuchsanordnung ergibt sich aus der folgenden Übersicht. Für jede Versuchsgruppe wurden 15 Embryonen verwendet. Bei jedem untersuchten Virus (K1013, K31, KR5) wurden folgende Virusdosierungen eingesetzt:  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml. Die 15 Kontrolleier wurden mit 0,1 ml sterilem PBS beimpft.

**Übersicht des Embryopathogenitätsversuches**

verimpftes Virus	Virustiter per 0,1 ml	Anzahl der infizierten Eier	Infektionsweg
K1013	$10^5$	15	Dottersack
K1013	$10^4$	15	Dottersack
K1013	$10^3$	15	Dottersack
K31	$10^5$	15	Dottersack
K31	$10^4$	15	Dottersack
K31	$10^3$	15	Dottersack
KR5	$10^5$	15	Dottersack
KR5	$10^4$	15	Dottersack
KR5	$10^3$	15	Dottersack

Die Eier wurden bei einer Temperatur von 37,6° C weiter bebrütet und täglich durchleuchtet, um die Vitalität der Embryonen zu überprüfen. Eier mit abgestorbenen Embryonen wurden an der markierten Luftkammergrenze geöffnet, die Kappe des stumpfen Eipols abgesetzt und die entnommenen Embryonen seziiert. Die Mortalität der Embryonen und die pathologisch-anatomischen Veränderungen wurden registriert und verglichen.

### 5.3.1 Infektion von SPF-Eintagsküken

In dem ersten Infektionsversuch wurden 80 SPF-Eintagsküken in 5 Gruppen zu je 16 Küken eingeteilt. Davon wurden 4 Gruppen mit je einem der beiden plaquegereinigten Feldisolaten K1013 oder K31 in zwei unterschiedlich hohen Virusdosierungen (je Virus mit  $10^3$  bzw.  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml) infiziert. Parallel hierzu erfolgte eine Infektion der

fünften Gruppe mit dem Referenzstamm KR5 mit  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml. Jede Gruppe wurde in einem eigenen Isolator gehalten. Jedem Küken wurde das Inokulat zur Hälfte oral und zur Hälfte oculär in einer Dosis von insgesamt 0,1 ml appliziert.

### Übersicht über den Infektionsversuch von SPF-Eintagsküken

Isolator Nr.	verimpftes Virus	Virustiter per 0,1 ml	Anzahl der Tiere	Infektionsweg
1	K1013	$10^5$	20 <sup>a</sup>	oculo-oral
2	K1013	$10^3$	20	oculo-oral
3	K31	$10^5$	20	oculo-oral
4	K31	$10^3$	20	oculo-oral
5	KR5	$10^5$	20	oculo-oral

<sup>a</sup> = 16 infizierte Tiere und 4 Kontakttiere

Zur Beimpfung wurde virushaltiger Zellkulturüberstand eingesetzt. Außerdem wurden insgesamt 20 nicht infizierte SPF-Eintagsküken besonders gekennzeichnet und als Kontakttiere auf die 5 Gruppen verteilt. Zwanzig weitere Küken der gleichen Charge wurden in einem getrennten Isolator gehalten und dienten als Kontrolltiere. Ihnen wurde jeweils 0,1 ml 1%iges Erhaltungsmedium auf dem gleichen Infektionsweg wie bei den anderen 5 Gruppen appliziert. Die Küken wurden 28 Tage lang in Isolatoren gehalten und klinisch überwacht.

Am 3., 8., 14. und 21. Lebenstag wurden, je nach Verlauf des Infektionsgeschehens, bis zu zwei Tiere aus den verschiedenen Gruppen getötet.

Alle getöteten und gestorbenen Tiere wurden pathologisch-anatomisch, 5 Tiere aus jeder Gruppe auch histologisch untersucht. Jedem Tier wurden nach der Tötung folgende Organproben zu histologischen Untersuchungen entnommen: Leber, Herz, Niere, Milz, Thymus und Bursa Fabricii. Die Proben wurden nach Fixierung in Formaldehyd in Paraffin eingebettet und zur mikroskopischen Untersuchung 6 µm starke Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Für die Virusreisolierung wurde zusätzlich von allen Tieren ein Stück Leber entnommen.

Zum Antikörpernachweis mit Hilfe des ELISA- und Serumneutralisationstestes erfolgte am 28. Lebenstag eine Blutentnahme von den überlebenden Tieren. Anschließend wurden die Tiere getötet.

### 5.3.2 Infektion von 3 Wochen alten SPF-Tieren

Im zweiten Infektionsversuch wurde die Pathogenität der Feldisolate für 3 Wochen alte SPF-Küken nach Infektion über zwei unterschiedliche Infektionswege überprüft.

#### Übersicht über den Infektionsversuch mit 3 Wochen alten SPF-Tieren

Isolator Nr.	verimpftes Virus	Virustiter per 0,1 ml	Anzahl der Tiere	Infektionsweg
1	K1013	$10^5$	$10^a$	oculo-oral
2	K31	$10^5$	10	oculo-oral
3	K31	$10^7$	10	i.m.

<sup>a</sup> = 8 infizierte Tiere und 2 Kontakttiere

In den ersten zwei Gruppen wurde mit K1013 oder K31 (plaquegereinigt) eine oculo-orale Infektion der Tiere durchgeführt. Die dritte Gruppe wurde mit dem Isolat K31 intramuskulär (i.m.) infiziert. Im Unterschied zum ersten Kükeninfektionsversuch wurden in jedem Isolator 10 Tiere eingestallt, wovon 8 Tiere infiziert wurden und 2 jeweils als Kontakttiere dienten. Die Infektionsdosen betragen bei den ersten zwei Gruppen  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml und bei der dritten Gruppe  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml. Injiziert wurde jedem Tier 0,1 ml Virussuspension. Die Tiere der ersten zwei Gruppen wurden aus organisatorischen Gründen über 16 Tage p.i. und die Tiere im Isolator drei über 28 Tage p.i. beobachtet. (Die unterschiedlichen Beobachtungszeiten ergaben sich aus organisatorischen Gründen, um die Isolatoren auszulasten). Nach der Blutentnahme wurden alle Tiere getötet und pathologisch-anatomisch untersucht. Lediglich von zwei Tieren in Isolator 3 wurden Organproben, wie unter C 5.3.1 beschrieben, entnommen und histologisch ausgewertet. Für den Nachweis der erfolgreichen Infektion über den Virusanzuchtversuch wurde zusätzlich von jedem Tier ein Stück Leber entnommen.

### 5.3.3 Infektion von immunsupprimierten Tieren

Zur Untersuchung der Bedeutung des Immunsystems im Infektionsgeschehen wurde in diesem Versuch das Immunsystem der Tiere durch Medikamenteneinfluß geschädigt, um eine Immunsuppression hervorzurufen.

Diese medikamentöse Immunsuppression wurde mit einem Cyclophosphamid Präparat mit dem Handelsnamen CYCLOSTIN® 200-N (Fa. Pharmacia GmbH) vorgenommen.

Insgesamt wurden 36 SPF-Eintagsküken in 4 Isolatoren eingestallt und zwar je Isolator 9 Tiere. Am vierten Lebenstag wurde das Präparat CYCLOSTIN® 200-N in Aqua dest. gelöst und nach einer 1:10 Verdünnung, 0,3 ml intraperitoneal (i.p.) injiziert (3 mg/Tier). Die Tiere wurden bis zum 8. Lebenstag täglich, wie beschrieben, mit CYCLOSTIN® behandelt.

Am 21. Lebenstag wurden die Tiere in 4 Isolatoren mit den plaquegereinigten Feldstämmen und dem Referenzstamm infiziert und über einen Zeitraum von 28 Tagen p.i. beobachtet. Danach wurden alle überlebenden Tiere getötet. Der Versuchsablauf sowie die Probenentnahme erfolgte wie in dem oben beschriebenen Versuch C 5.3.2.

#### Infektionsversuch mit 3 Wochen alten SPF-Tieren nach einer CYCLOSTIN®- Behandlung der Tiere

Isolator Nr.	verimpftes Virus	Virustiter per 0,1 ml	Anzahl der Tiere	Infektionsweg
1	K1013	10 <sup>7</sup>	9 <sup>a</sup>	oculo-oral
2	K31	10 <sup>7</sup>	9	oculo-oral
3	KR5	10 <sup>7</sup>	9	oculo-oral
4	K31	10 <sup>7</sup>	9	i.m.

<sup>a</sup> = 8 infizierte Tiere und 1 Kontakttier

### 6. Versuche zu einer vertikalen Übertragung des Feldisolates K31

Um eine vertikale Übertragung der Feldisolate zu prüfen, wurden 16 SPF-Legetiere im Alter von 30 Wochen in Einzelkäfige eingestallt. Die Tiere wurden 2 Wochen nach der

Einstellung künstlich besamt. Dazu wurde der Samen von einem Hahn, der in einem separaten Raum gehalten wurde, entnommen.

Die eingestellten Tiere wurden eine Woche nach der ersten künstlichen Besamung mit je 1 ml Inokulum K31 mit einem Virustiter von  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/0,1 ml oral infiziert. Nach der Infektion wurden von den Tieren Blut und Kloakenabstriche zum Virus- und Antikörper-Nachweis entnommen, danach wurden die Tiere wiederum künstlich besamt.

Eine regelmäßige Blutentnahme sowie Kloakenabstriche und die Besamung der Tiere erfolgte in den folgenden 3 Wochen. Bis zu weiteren Untersuchungen wurden die gewonnenen Seren und Kloakenabstriche eingefroren.

Die Eier wurden täglich gesammelt und mit der Käfignummer beschriftet. Die von jeder Woche gesammelten Eier wurden in den Brutschrank (Temp. 38° C) eingelegt, sie wurden jeden 3. Tag durchleuchtet und die abgestorbenen Embryonen, soweit beurteilbar, pathologisch-anatomisch untersucht. Ein Stück Leber wurde für den Virusnachweis entnommen.

Am 18. Tag nach jeder Einlage wurden die Eier jeder Henne zur Identifizierung der Tiere beim Schlupf unter Pedigree-Hauben verbracht. Beim Schlupf wurde ein Küken, dem Elterntier entsprechend, mit einer Kükenmarke im rechten Flügel gekennzeichnet. Die restlichen Küken wurden nach der Blut- und Mekoniumentnahme getötet.

Die gekennzeichneten Tiere jeder einzelnen Woche wurden in separaten Käfigen, getrennt von den Elterntieren, eingestallt, so daß sich in diesem Raum 5 Käfige mit den entsprechend gekennzeichneten Küken befanden.

Am 7., 14., 21. und 28. Lebenstag wurden regelmäßig Kloakenabstriche für einen Virusanzuchtversuch entnommen. Nach 35 Lebenstagen wurden die Tiere nach der Blutentnahme für die Serumneutralisations- und ELISA-Tests getötet. Alle Tiere wurden pathologisch-anatomisch untersucht. Von zwei Tieren aus jeder Gruppe wurden folgende Organproben zu histologischen Untersuchungen entnommen: Leber, Herz, Niere, Milz, Thymus und Bursa Fabricii.

Die Elterntiere wurden sechs Wochen p.i. getötet, d.h. im Alter von 39 Wochen pathologisch-anatomisch untersucht. Für die ELISA-Tests erfolgte eine letzte Blutentnahme am Tag der Tötung.

## **7. Virusreisolierung**

### **7.1 Virusreisolierung aus den Lebern der Versuchstiere**

Zur Virusreisolierung aus den Lebern der infizierten Tiere sowie der Kontakt- und Kontrolltiere und der abgestorbenen Embryonen aus Versuch C 6 wurde mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel KG) aus jedem entnommenen Organ ein Homogenat hergestellt, das 1:10 mit dem Erhaltungsmedium verdünnt wurde. Das Homogenat wurde 10 min bei 5000 UpM zentrifugiert (Minifuge GL, Fa. Heraeus Christ), um gröbere Zellbestandteile abzutrennen. Anschließend wurde der Überstand durch einen sterilen Filter (Fa. Sarstedt) mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert und 0,2 ml davon auf embryonale Leberzellsuspensionen in Zellkulturschalen (Ø 60 mm, Fa. Nunc) verimpft. Die Kulturen wurden mikroskopisch nach 72 h beurteilt, ob ein CPE zu erkennen war. Beim Ausbleiben eines CPE wurden bis zu 3 weitere Passagen durchgeführt.

### **7.2 Virusreisolierung aus der Herzbeutelflüssigkeit**

Bei dem Versuch, das Virus aus der Herzbeutelflüssigkeit nach Erkrankung gestorbener Versuchstiere zu reisolieren, wurde nach der Herzbeutelpunktion mit einer sterilen Nadel von der abgesaugten Flüssigkeit ca. 0,1 ml auf embryonale Leberzellsuspensionen in kleinen Zellkulturschalen (Ø 10 mm, Fa. Greiner) direkt aufgebracht und nach 72 h mikroskopisch beurteilt. Das Material wurde bis zum Auftreten eines CPE, maximal dreimal passagiert.

### **7.3 Virusreisolierung aus den Kloakenabstrichen und Mekoniumproben**

Alle Kloakenabstriche und Mekoniumproben aus dem Versuch C 6 wurden einzeln untersucht. Die Virusanzucht erfolgte ebenfalls auf den HEL-Zellen. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben in je 2 ml des Erhaltungsmediums eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Probenmaterial auf eine 2 ml-Spritze gezogen, durch einen sterilen Filter (Fa. Sarstedt) mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert und 0,2 ml des filtrierten Materials auf embryonale Leberzellsuspensionen in Zellkulturschalen (Ø 60

mm, Fa. Nunc) verimpft. Die Kulturschälchen wurden mikroskopisch nach 72 h beurteilt, beim Ausbleiben eines CPE wurde das Material bis zu 3 mal weiter passagiert.

## **8. ELISA-Tests**

Um das Vorhandensein von Fremdvirusinfektionen in den Infektionsversuchen auszuschließen, wurden die entnommenen Seren der überlebenden Tiere am Ende jedes Versuches auf das Vorliegen von Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Kükenanämie (CAV) und das Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) mit Hilfe des ELISA untersucht

Für die Untersuchungen wurden kommerzielle ELISA-Testsysteme eingesetzt. Der Testkit für die Untersuchungen auf Antikörpern gegen CAV mit dem entsprechenden Testsystem wurde von der Firma FLOCKSCREEN geliefert. Parallel dazu wurden die Untersuchungen auf Antikörpern gegen IBDV mit dem Testkit und entsprechend den Anweisungen der Firma IDEXX durchgeführt.

## **D. ERGEBNISSE**

### **1. Virusvermehrung**

Bei allen Versuchen zur Anzüchtung, Vermehrung und Plaquereinigung aller sechs Isolate K1013 (Nr. 1-6) konnten, ebenso wie bei dem plaquegereinigten Isolat K31 und den Laborstämmen der für die aviären Adenoviren vom FAV-Typ bekannte cytopathische Effekt in Leberzellkulturen beobachtet werden. Die Veränderungen in der Zellkultur begannen bereits nach ca. 16-24 Stunden p.i. in Form eines Zusammenziehens der Leberzellen mit nachfolgender Abrundung der Zellen im Zellverband. Die abgerundeten Zellen waren nahezu einheitlich groß und scharf konturiert. Morphologische Unterschiede der Zellveränderungen zwischen den untersuchten Virusisolaten bestanden nicht.

Nach 72 Stunden trat bei ca. 70% der Zellen Zellyse ein. Zu diesem Zeitpunkt war erfahrungsgemäß der höchste Virustiter erreicht und die Zellreste einschließlich des Zellkulturüberstandes wurden zur weiteren Verwendung geerntet.

### **2. Viruscharakterisierung**

#### **2.1 Serologische Untersuchungen**

##### **2.1.1 Neutralisationstest zur Typisierung der Isolate**

Die sechs Virusisolate aus Ecuador (K1013 Nr.1-6) wurden mit Hilfe des Virusneutralisationstests im Mikrotitersystem gegenüber den im Institut für Geflügelkrankheiten vorhandenen Referenzseren gegen die 12 FAV-Stämme untersucht. Dabei zeigte sich, daß eine Neutralisation aller o.g. Isolate mit den Antiseren gegen die Serotypen FAV4 (Stamm KR5), FAV11 (Stamm C2B) und das Isolat K31 erreicht werden konnte, wobei die Seren anderer FAV-Serotypen keine Neutralisation der Virusisolate bewirkten. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die Ergebnisse des Virusneutralisationstestes deuteten auf eine Verwandtschaft zwischen den untersuchten Virusisolaten K1013 (Nr. 1 - 6) und den Serotypen FAV4 (Stamm KR5) und FAV11 (Stamm C2B) sowie dem Stamm K31 hin.

**Tabelle 2: Neutralisationstest mit Antisera der Referenzstämme FAV 1-12 und K31 gegen die Feldisolate K1013 (Nr.1-6) und K31**

Isolat Nr.	FAV-Antiserum											
	1 <sup>a</sup> OTE	2 SR48	3 SR49	4 KR5	5 340	6 CR119	7 YR36	8/9 H6	10 A2	11 C2B	12 UF71	K31
1	- <sup>b</sup>	-	-	+ <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	+	-	+
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
K31	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+

<sup>a</sup> FAV Serotypen

<sup>b</sup> keine Neutralisation

<sup>c</sup> Neutralisation

### 2.1.2 Kreuzneutralisationstest

Um die Zugehörigkeit der Feldisolate zu einem bestimmten Serotyp weiter zu differenzieren, wurden die Isolate im Kreuzneutralisationstest geprüft. Da die Antisera der Referenzstämme FAV4 (KR5) und FAV11 (C2B) alle K1013 (Nr. 1-6) Isolate in gleicher Weise neutralisiert hatten, wurde eines der sechs Isolate (Nr.2) im Kreuzneutralisationstest als Vertreter eingesetzt.

**Tabelle 3: Kreuzneutralisationstest der Referenzstämme (KR5, C2B) und der Feldisolate K1013 (Nr. 2) und K31 mit den Antiseren aller FAV-Referenzstämme und den Antiseren der Feldisolate**

Virus-stamm	FAV-Antiserum												
	1 <sup>a</sup> OTE	2 SR48	3 SR49	4 KR5	5 340	6 CR119	7 YR36	8/9 H6	10 A2	11 C2B	12 UF71	K1013 (Nr. 2)	K31
K1013 (Nr. 2)	- <sup>b</sup>	-	-	1280 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	320	-	1280	320
K31	-	-	-	640	-	-	-	-	-	320	-	640	640
KR5	-	-	-	1280	-	-	-	-	-	640	-	640	640
C2B	-	-	-	80	-	-	-	-	-	2560	-	80	80

<sup>a</sup> FAV Serotypen

<sup>b</sup> Serumtiter <20

<sup>c</sup> Die Höhe des Titers ist die reziproke Serumverdünnung, die eine Neutralisation von 100TCID<sub>50</sub> erreicht

Tabelle 3 zeigt die sich im Kreuzneutralisationstest ergebenden Serumtiter, die noch eine völlige Neutralisation des Virus erreichen, dargestellt als reziproke Werte. Alle Stämme wiesen mit den entsprechenden homologen Seren die höchsten Titer auf und zeigten allerdings auch Kreuzreaktionen mit den KR5-, C2B-, K1013- und K31-Antiseren. Dabei zeigte der Stamm C2B (FAV11) lediglich eine sehr geringe Kreuzneutralisation mit den heterologen Seren, der homologe Titer von dem Stamm C2B betrug mit 2560 das 32 fache aller heterologen Titer. Dieser Unterschied zwischen heterologen und homologen Seren war bei den Feldisolaten und dem Stamm KR5 (FAV4) wesentlich geringer. Der homologe Titer des Stammes KR5 betrug 1280 und stellte damit den doppelten Wert aller heterologen Titer dar. Das Isolat K1013 (Nr. 2) wurde von seinem eigenen Antiserum genauso neutralisiert wie von dem KR5-Antiserum. Die Neutralisation des Isolates K1013 (Nr. 2) durch das C2B-Antiserum erfolgte jedoch in viel geringerem Maße.

Der homologe Titer des Stammes K31 war zu den heterologen Titern des K1013 (Nr. 2) bzw. KR5-Antiserums mit dem Wert 640 gleich hoch, nur die heterologen Titer mit dem C2B-Antiserum wiesen einen um eine Verdünnungsstufe geringeren Titer auf.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, daß die Feldisolate wesentlich geringere Titerunterschiede zu dem Stamm KR5 besitzen als zu dem Stamm C2B. Dies weist auf eine enge serologische Verwandtschaft der Feldisolate zu dem FAV4 Serotyp

hin, so daß die Feldisolate serologisch in die Reihe des FAV4 Serotypes einzuordnen sind.

## **2.2. Molekularbiologische Untersuchungen**

### **2.2.1 Präparation der Virus-DNA und Restriktionsenzymanalyse**

Nach der serologischen Einordnung der sechs zu untersuchenden Isolate K1013 (Nr. 1-6) durch den Neutralisationstest wurde eine weitere Charakterisierung des Virusgenoms mit Hilfe von fünf verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt.

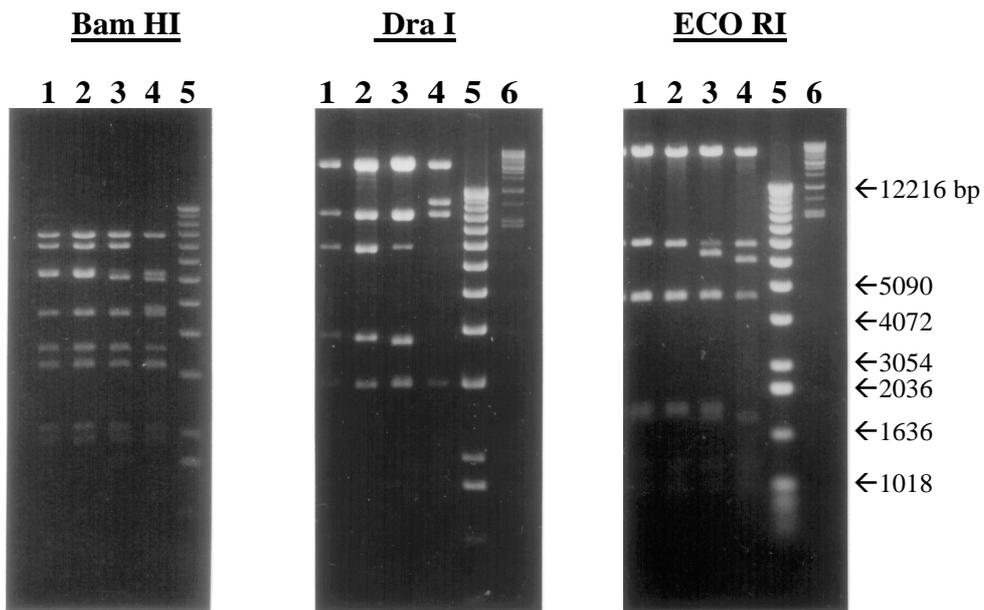
Die Virus-DNA wurde nach Inkubation mit dem entsprechenden Restriktionsenzym an definierten Stellen gespalten und die entstandenen Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dadurch ergab sich für jede Nukleinsäure ein typisches DNA-Spaltungsmuster.

Das Spaltungsmuster, d.h. die Anzahl und das Molekulargewicht der DNA-Fragmente der verschiedenen Proben wurden miteinander verglichen. Zunächst erfolgte ein Vergleich des Virusgenoms von K1013 mit FAV4 (KR5), K31 und FAV11 (C2B), wobei auch in diesem Versuch das Isolat K1013 (Nr. 2), das auch beim Kreuzneutralisationstest untersucht wurde, als repräsentativ ausgewählt wurde. Die von diesem Virus extrahierte Nukleinsäure wurde gemeinsam mit den drei anderen o.g. Proben (KR5, K31, C2B) mit Hilfe von fünf Restriktionsenzymen (Bam HI, Bgl II, Dra I, Eco RI, Pst I) gespalten. Die Spaltungsmuster der untersuchten Virus-DNAs der Referenzstämme FAV4 (KR5) und FAV11 (C2B) wurden mit den Literaturangaben von ZSAK und KISARY (1984) und ERNY et al. (1995) verglichen. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abb. 1 und Abb. 2 dargestellt

Beim Vergleich der Bam HI-, Dra I- und Eco RI-Spaltungsmuster aller vier Adenoviren ist eine 100%ige Übereinstimmung zwischen K1013 (Nr. 2), K31 und FAV4 (KR5) auffällig mit Ausnahme einer zusätzlichen Bande, entstanden durch partiellen Verdau bei dem ECO RI-Spaltungsmuster des Isolates K31 (Abb. 1). Lediglich der Stamm C2B unterscheidet sich deutlich von den drei anderen Stämmen. Beim Spalten der Nukleinsäuren der Isolate K1013 (Nr. 2), K31 und der Referenzstämme (KR5, C2B) mit den Enzymen Bgl II und Pst I konnte allerdings kein identisches Fragmentmuster festgestellt werden (Abb. 2). Dies unterstreicht die Unterschiede der Feldisolate

untereinander und mit den Referenzstämmen KR5 und C2B. Zusammenfassend deuten jedoch diese in den beiden Abbildungen dargestellten Befunde auf eine nahe Genomverwandtschaft zwischen den Isolaten K1013 (Nr. 2) und K31 und dem Referenzstamm KR5 hin.

Laut Vorbericht sind die sechs Isolate K1013 (Nr. 1-6) von verschiedenen Feldinfektionen in Ecuador isoliert. Daraus ergab sich die Frage, ob diese Isolate auf Genomebene untereinander differieren. Die DNA-Fragmente der sechs Proben wurden nach der Spaltung mit zwei verschiedenen Enzymen (Bgl II und Pst I) einem Vergleich unterzogen. Ausgewählt wurden diese zwei Enzyme, weil sie bei den Referenzstämmen und dem Feldisolat K1013 (Nr. 2) ein unterschiedliches Spaltungsmuster gezeigt hatten. Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, zeigen die sechs Isolate K1013 indessen mit beiden Enzymen ein einheitliches Schnittmuster. Mit Hilfe der Restriktionsenzymanalyse unter Verwendung der Bgl II- und Pst I-Enzyme konnte daher kein Genomunterschied zwischen den sechs Isolaten aus Ecuador festgehalten werden. Daraufhin wurde für die weiteren Untersuchungen das Isolat K1013 (Nr. 2) als Repräsentant für diese Gruppe verwendet.



Bahn 1 : KR5 (FAV4)

Bahn 2 : K1013 (Nr. 2)

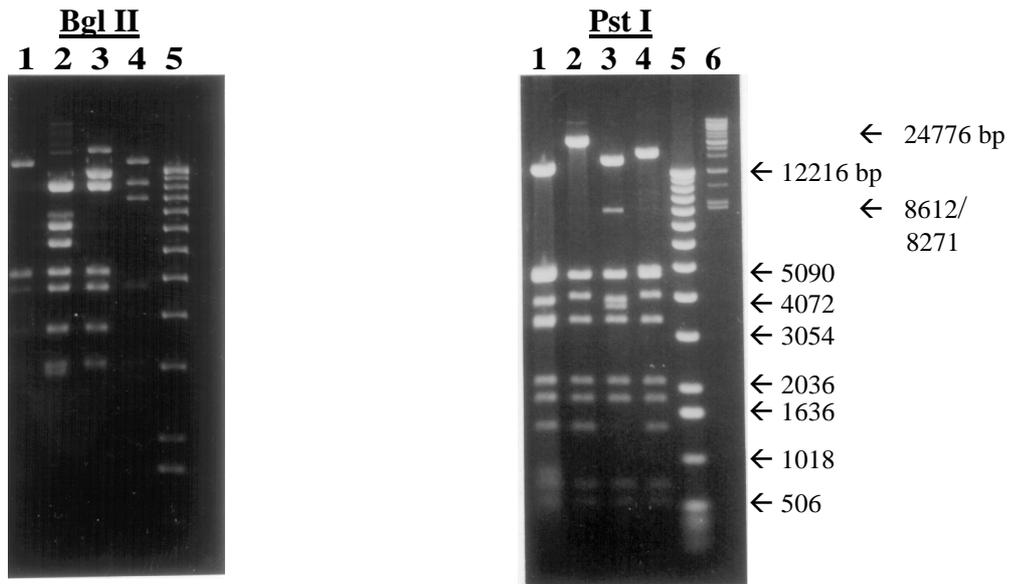
Bahn 3 : K31

Bahn 4 : C2B (FAV11)

Bahn 5 : 1 kb Molekulargewichtsmarker

Bahn 6 : Hochmolekulargewichtsmarker

**Abb. 1: Vergleichende Darstellung der Spaltungsmuster der Restriktionsenzyme Bam HI, Dra I und Eco RI für die DNA von KR5, K1013, K31 und C2B.**



Bahn 1 : KR5 (FAV4)

Bahn 2 : K1013 (Nr. 2)

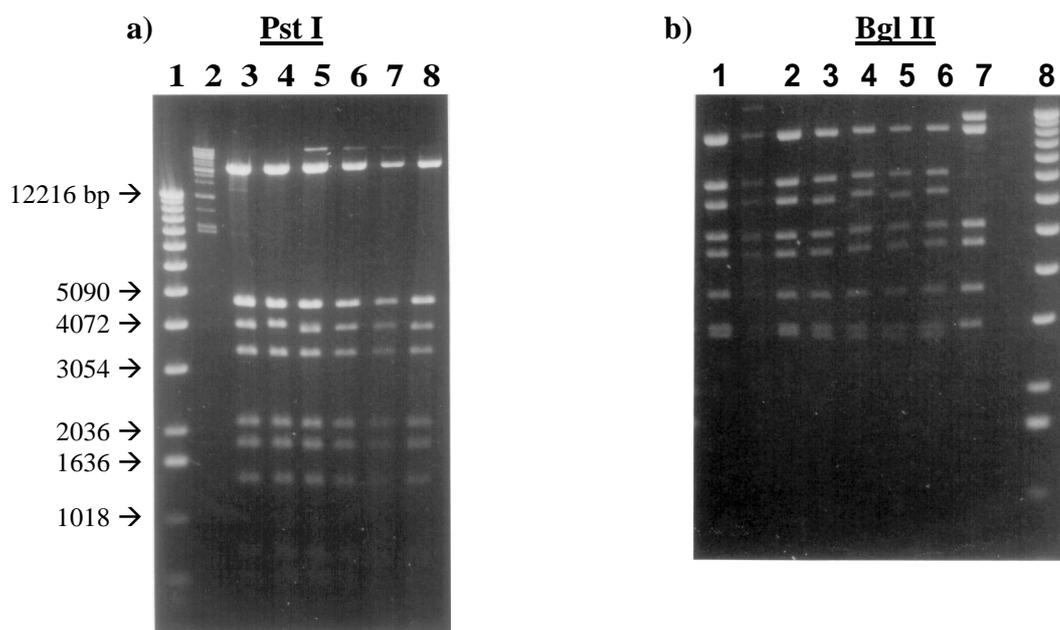
Bahn 3 : K31

Bahn 4 : C2B (FAV11)

Bahn 5 : 1 kb Molekulargewichtsmarker

Bahn 6 : Hochmolekulargewichtsmarker

**Abb. 2: Restriktionsenzym-Spaltung der KR5-, K1013-, K31- und C2B-DNA mit jeweils zwei Restriktionsenzyme Bgl II und Pst I.**



a )

Bahn 1 : 1 kb Molekulargewichtsmarker

Bahn 2 : Hochmolekulargewichtsmarker

Bahn 3 : K1013 (Nr. 1)

Bahn 4 : K1013 (Nr. 2)

Bahn 5 : K1013 (Nr. 3)

Bahn 6 : K1013 (Nr. 4)

Bahn 7 : K1013 (Nr. 5)

Bahn 8 : K1013 (Nr. 6)

b )

Bahn 1 : K1013 (Nr. 1)

Bahn 2 : K1013 (Nr. 2)

Bahn 3 : K1013 (Nr. 3)

Bahn 4 : K1013 (Nr. 4)

Bahn 5 : K1013 (Nr. 5)

Bahn 6 : K1013 (Nr. 6)

Bahn 7 : K31

Bahn 8 : 1 kb

Molekulargewichtsmarker

**Abb. 3:** a) Restriktionsenzym-Muster von K1013 (1-6) nach Pst I-Spaltung  
b) Restriktionsenzym-Muster von K1013 (1-6) und K31 nach Bgl II-Spaltung

### 3. Embryopathogenitätsprüfung mit Hühnerembryonen

#### 3.1 Mortalität und pathologisch-anatomische Befunde an den Embryonen

Zur Untersuchung der Embryopathogenität der Virusisolate wurden insgesamt 150 Hühnerembryonen in SPF-Valo Bruteiern herangezogen. Das Versuchsschema und die daraus folgenden Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Embryomortalität nach der Inokulation der SPF-Hühnerembryonen mit dem FAV4 Referenzstamm und den Feldisolaten**

verimpftes Virus	Virustiter per 0.1 ml	Embryomortalität nach der Infektion								Mortalität
		5 d p.i.	6 d p.i.	7 d p.i.	8 d p.i.	9 d p.i.	10 d p.i.	11 d p.i.	12 d p.i.	
K1013	10 <sup>5</sup>	5	10							15/15 <sup>b</sup> (100%)
	10 <sup>4</sup>	- <sup>a</sup>	1	7	6					14/14 (100%)
	10 <sup>3</sup>	-	1	5	9					15/15 (100%)
K31	10 <sup>5</sup>	10	2	2						14/14 (100%)
	10 <sup>4</sup>	-	-	7	6					13/13 (100%)
	10 <sup>3</sup>	-	-	1	3	7	2			13/13 (100%)
KR5	10 <sup>5</sup>	-	-	-	1	1	4	1	3	10/14 (71%)
	10 <sup>4</sup>	1	-	-	-	1	2	-	4	8/14 (57%)
	10 <sup>3</sup>	-	-	-	-	1	-	-	-	1/15 (7%)

<sup>a</sup> - keine Mortalität

<sup>b</sup> abgestorbene Embryonen / Anzahl der beimpften Eier

Die infizierten Bruteier wurden bis zum 15. d p.i. täglich durchleuchtet, um die Vitalität der Embryonen zu beurteilen. Ein Absterben innerhalb der ersten 24 h p.i. wurde als unspezifisch gewertet. Insgesamt konnte eine hohe Mortalitätsrate bei allen zur Untersuchung eingesetzten Viren beobachtet werden. Die spezifische Mortalität begann bereits am 5. d p.i. und dauerte, wie aus Tabelle 4 abzulesen ist, bis zum 12. d p.i.. Bei den Embryonen, die mit den beiden Feldstämmen K1013 und K31 mit einer hohen Infektionsdosis infiziert worden waren (10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>), ist schon am 7. d p.i. eine Gesamtmortalitätsrate von 100% feststellbar. Die Infektion mit den niedrigeren Virusdosen führte zu einer Mortalitätsrate in gleicher Höhe, jedoch setzte das Absterben der Embryonen zu einem späteren Zeitpunkt ein (Tabelle 4).

Im Gegensatz zu dem frühen Eintritt der Mortalität bei den Isolaten K1013 und K31 führte die Infektion mit dem Referenzstamm KR5 bei einer Infektiionsdosis von  $10^5$  TCID<sub>50</sub> lediglich zu einer Mortalitätsrate von 71%, während reduzierte Infektionsdosen von  $10^4$ - und  $10^3$  TCID<sub>50</sub> eine noch geringere Sterberate von 57% bzw. 7% im Vergleich zu beiden geprüften Feldstämmen zeigten. Bei den beiden Feldisolaten trat auch bei geringerer Viruskonzentration eine Mortalität von 100% auf (Tabelle 4). Bei den Kontrollembryonen konnte bis zum 15. d p.i. keine Embryomortalität registriert werden.

Auffällig waren bei fast allen abgestorbenen Embryonen deutliche Hämorrhagien an distalen Körperteilen und am Kopf sowie dunkle nekrotische Lebern. Von den abgestorbenen Embryonen waren in jeder Gruppe ein bis zwei Embryonen kleiner als die Kontrollembryonen.

Aus den Versuchsergebnissen ist eindeutig abzuleiten, daß die Pathogenität der beiden Isolate K31 und K1013 für Hühnerembryonen wesentlich höher ist als die pathogene Wirkung des FAV-Stammes KR5.

#### **4. Kükeninfektionsversuche**

Um die Pathogenität der plaquegereinigten Feldstämme K1013 und K31 im Vergleich zu dem Referenzstamm KR5 zu überprüfen, wurden die folgenden Infektionsversuche durchgeführt:

- 4.1 Infektion von SPF-Eintagsküken
- 4.2 Infektion von 3 Wochen alten SPF-Tieren
- 4.3 Infektion von immunsupprimierten SPF-Tieren

##### **4.1 Infektion von SPF-Eintagsküken**

Die erzielten Ergebnisse sowie eine zusammenfassende Darstellung des ausgeführten Infektionsversuches bei den Eintagsküken sind in der Tabelle 5 dargestellt. Weitere wesentliche Einzelheiten werden in den Abschnitte D 4.1.1. bis D 4.1.7. gesondert beschrieben.

**Tabelle 5: Mortalität von Eintagsküken, die mit demFAV4 Referenzstamm und den Feldisolaten infiziert wurden.**

Isolator Nr.	Virusstamm	Virustiter per 0.1 ml	Anzahl der Tiere	Kükenmortalität nach dem Infektionstag										Mortalität
				6 d p.i.	7 d p.i.	8 d p.i.	9 d p.i.	10d p.i.	11 d p.i.	12 d p.i.	13 d p.i.	14 d p.i.	15 d p.i.	
1	K1013	10 <sup>5</sup>	15 <sup>a</sup>	- <sup>d</sup>	6	6	2	1						15/15 (100%)
			4 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
2	K1013	10 <sup>3</sup>	15	-	-	2	6	2	2	-	-	-	-	12/15 (80%)
			4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	K31	10 <sup>5</sup>	15	-	12	3								15/15 (100%)
			4	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-
4	K31	10 <sup>3</sup>	15	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	3/15 (20%)
			4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	KR5	10 <sup>5</sup>	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/15 (0%)
			4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6			20 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/20 (0%)

<sup>a</sup> infizierte Tiere

<sup>b</sup> Kontakttiere

<sup>c</sup> Kontrolltiere

<sup>d</sup> keine Mortalität

#### 4.1.1 Klinische Symptome

Die Küken wurden 28 Tage lang klinisch beobachtet. Die mit den Isolaten K1013 und K31 infizierten Tiere, Infektionsdosis 10<sup>5</sup>- und 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>, ebenso die in diese Gruppen eingesetzten Kontakttiere, zeigten eindeutige Krankheitserscheinungen in Form einer starken Apathie zwischen dem 6. und 11. d p.i.. Die Tiere lagen mit geschlossenen Augen auf dem Brustbein, verweigerten Futter- und Wasseraufnahme, die meisten Tiere starben in dieser Zeit. Nach dem 11. d p.i. erholten sich die nicht an der Infektion gestorbenen Tiere wieder.

Die mit KR5 infizierten Tiere, ebenso wie die Kontrolltiere, zeigten keine klinischen Symptome.

#### 4.1.2 Kükenmortalität

Bei den SPF-Valo-Küken in den Isolatoren 1 und 3, die am ersten Lebenstag mit 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> der Isolate K1013 und K31 infiziert wurden, traten am 7. d p.i. die ersten Todesfälle auf (Tabelle 5). Berücksichtigt man, daß am 3. d p.i. je Gruppe ein Tier zu Probeuntersuchungen getötet wurde, so starben alle infizierten Tiere in den Isolatoren 1

und 3 bis zum 10. bzw. 8. d p.i.. Ebenso starb je ein Kontakttier am 10 d p.i. in den beiden Isolatoren.

Später starb lediglich ein Kontakttier in Isolator 3 am 14. d p.i. ohne zuvor Krankheitssymptome gezeigt zu haben.

Die niedrigere Infektionsdosis ( $10^3$  TCID<sub>50</sub>) führte zu einer geringeren Mortalitätsrate. Von den mit dem Isolat K1013 infizierten Tieren starben etwa 80%, von den mit dem Isolate K31 nur noch etwa 20% der Küken.

Im Gegensatz dazu wurde bei der Gruppe der mit KR5 infizierten Tiere sowie bei der Kontrollgruppe keine Mortalität registriert.

#### **4.1.3 Pathologisch-anatomische Befunde**

Alle 120 Küken wurden nach ihrem Verendung bzw. Tötung einer pathologisch-anatomischen Untersuchung unterzogen. Die pathologisch-anatomischen Befunde bei den verendeten und den getöteten Tieren wichen deutlich voneinander ab.

Bei allen verendeten Tieren waren die Befunde weitgehend ähnlich. Als charakteristisch können die großen und stark geschwollenen Lebern mit starken Aufhellungen, gelblich brauner Farbe und vereinzelt Nekroseherden gelten. Die Herzbeutel dieser Tiere waren mit einer klaren, leicht gelben Flüssigkeit mehr oder weniger stark angefüllt. Die Nieren zeigten Schwellungen und Aufhellungen. Eine hypertrophische Milz und ein stark atrophischer Thymus waren bei fast allen verendeten Tieren erkennbar.

Am 3. d p.i. wurde von jedem Isolator ein infizierte Tier getötet. Bei allen getöteten Küken waren keine pathologisch-anatomischen Veränderungen feststellbar. Da in den ersten 4 Isolatoren noch am 8. d p.i. Tiere verendeten (Tabelle 5), war es nicht erforderlich, wie zu Anfang geplant (siehe C 5.3.1), weitere Tiere aus diesen Isolatoren zur Probenentnahme zu töten. Lediglich aus den Isolatoren 5 und 6 wurden am 8., 14. und 21. d p.i. noch je 2 Tiere zur Entnahme von Proben getötet. Am 28. d p.i. erfolgte die Tötung aller überlebender Tiere. Bei keinem der getöteten Tiere, unabhängig vom Tage p.i., konnten pathologisch-anatomische Veränderungen beobachtet werden.

#### 4.1.4 Pathologisch-histologische Befunde

Diese Befunde sollen des besseren Verständnisses halber für die Isolatoren 1 bis 4 und 5 bis 6 gesondert besprochen werden.

##### **Isolatoren 1-4**

Von den ersten 3 Isolatoren wurden je vier verendete Tiere und ein getötetes Tier, vom Isolator 4 ein verendetes und drei getötete Tiere für die histologischen Untersuchungen ausgewählt. Von jedem Tier wurden folgende Organe histologisch untersucht: Leber, Herz, Milz, Nieren, Thymus und Bursa Fabricii. Unterschiedliche Befunde konnten zwischen den abgestorbenen und den getöteten Tieren registriert werden.

##### -Verendete Tiere:

Eine großtropfige Verfettung mit Zelldegenerationen der Lebern war bei allen 13 infizierten Tieren in den Isolatoren 1-4 eindeutig erkennbar. Große intranukleäre basophile Einschlusskörperchen konnten bei insgesamt 6 der untersuchten Lebern beobachtet werden. Bei zwei Tieren, infiziert mit dem Isolat K31, waren herdförmige Blutungen unter dem Epikard zu erkennen. Bei einem Tier, infiziert mit dem Isolat K1013, konnten herdförmige granulozytäre Infiltrate unter dem Epikard konstatiert werden. Eine herdförmige perivaskuläre Infiltration im Myokard fand sich bei einem anderen mit K1013 infizierten Tier. Von den untersuchten Nieren zeigten zwei Exemplare herdförmige Blutungen im Interstitium. In 4 Fällen machte sich im Thymus ein reduzierter Lymphozytengehalt und eine Atrophie der Rinde bemerkbar. Bei der Untersuchung der Milzen war bei drei Tieren ein reduzierter Lymphozytengehalt erkennbar. Die Bursaveränderungen zeigten sich in Form von Follikelatrophie bei 6 von insgesamt 13 untersuchten Tieren.

##### -Getötete Tiere:

Die untersuchten Organe von drei Tieren aus den Isolatoren 1-3, die am 3. d p.i. getötet wurden, wiesen keine pathologisch-histologischen Veränderungen auf. Von den 3 untersuchten Tieren des Isolators 4, getötet am 14., 21. und 28. d p.i. waren nur bei

einem untersuchten Tier am 21. d p.i., follikelartige lymphozytäre Infiltrate in der Leber feststellbar.

## **Isolatoren 5 und 6**

Aus diesen beiden Isolatoren wurde je ein am 8., 14., 21. und 28. d p.i. getötetes Tier untersucht. Nach der Untersuchung der 4 getöteten Tiere, die mit dem Stamm KR5 infiziert waren, wurden in den Lebern der Tiere, die am 8. und 28. d p.i., getötet wurden, follikelartige lymphozytäre Infiltrate mit großtropfigen Verfettungen der Leberzellen beobachtet.

Schließlich wurden vergleichend Organe von insgesamt 4 Kontrolltieren histologisch untersucht. Bei keinem dieser Kontrolltiere konnten spezifische pathologisch-histologische Befunde registriert werden.

### **4.1.5 Virusreisolierungen**

#### **4.1.5.1 Virusreisolierung aus der Leber**

Zum Nachweis der erfolgreichen Infektion wurde eine Virusreisolierung aus den Lebern aller infizierten Versuchsküken durchgeführt. Zur Überprüfung einer horizontalen Übertragung wurden auch Leberproben der Kontakttiere in die Untersuchung einbezogen. Die Lebern der Kontrolltiere dienten als Negativkontrolle.

Die entnommenen Organe wurden aufbereitet und auf embryonale Leberzellkulturen verbracht. Nach 72 Stunden wurde der entstandene CPE in einzelnen Petrischalen beurteilt.

Zur Probeuntersuchung wurde in allen Gruppen je ein Tier am 3. d p.i. getötet und je zwei Tiere von den Isolatoren 5 und 6 am 8., 14. und 21. d p.i..

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

**Tabelle 6: Reisolierung von Feldisolaten und dem Referenzstamm aus Lebern gestorbener und getöteter Tiere**

Isolator Nr.	Virus-stamm	Virustiter per 0.1 ml	3 d p.i.	7 d p.i.	8 d p.i.	9 d p.i.	10d p.i.	11 d p.i.	14d p.i.	21d p.i.	28d p.i.
1	K1013	10 <sup>5</sup>	- <sup>b</sup>	+ <sup>c</sup>	+	+	+	Kein Tier mehr am Leben			
2	K1013	10 <sup>3</sup>	-	k.O	+	+	+	+	k.O	k.O	-
3	K31	10 <sup>5</sup>	-	+	+	Kein Tier mehr am Leben					
4	K31	10 <sup>3</sup>	-	+	+	k.O	+	k.O	k.O	k.O	-
5	KR5	10 <sup>5</sup>	-	k.O	+	k.O	k.O	k.O	+	-	-
6 <sup>a</sup>			-	k.O	-	k.O	k.O	k.O	-	-	-

<sup>a</sup> = Kontrolltiere

<sup>b</sup> - = Virusisolation negativ

<sup>c</sup> + = Virusisolation positiv

k. O = kein Organmaterial zur Verfügung, da an diesem Tag kein Versuchstier starb oder zur Probeuntersuchung getötet wurde

Bei allen verendeten Tieren, einschließlich der Kontakttiere, gelang eine Virusreisolierung. Im Gegensatz dazu war von den Proben der getöteten Tiere im Isolator 5, infiziert mit dem Stamm KR5, ein Virusnachweis nur am 8. und 14. d p.i. erfolgreich.

#### 4.1.5.2 Virusreisolierung aus der Herzbeutelflüssigkeit

Die Herzbeutelflüssigkeit von 4 der gestorbenen Tiere in den Isolatoren 1-4 wurde, wie schon unter C 7.2 beschrieben, für Virusanzuchtversuche verwendet. Alle 4 Proben zeigten bei der Anzucht auf den embryonalen Leberzellen einen starken und typischen CPE, damit ist das Vorhandensein von Adenoviren in der Herzbeutelflüssigkeit als nachgewiesen anzusehen.

#### 4.1.6. Serumneutralisationstest

Alle am 28. d p.i. entnommenen Blutproben der überlebenden Tiere wurden serologisch untersucht (siehe C 4.1.4). Die Seren der überlebenden Tiere der Isolatoren 1-5 enthielten Antikörper gegen FAV4 (KR5) und FAV11 (C2B). Bei den Kontrolltieren in Isolator 6 wurden keine Antikörper gegen Adenoviren gefunden.

#### 4.1.7 ELISA-Tests

Um auszuschließen, daß ein Einfluß immunsupprimierender Viren in diesem Versuchsabschnitt vorliegen könnte, wurden die gewonnenen Seren aller überlebender Tiere auf das Vorliegen von Antikörpern gegen das Virus der Infektiösen Kükenanämie (CAV) und das Virus der Infektiösen Bursitis (IBDV) mit Hilfe des entsprechenden ELISA untersucht. Insgesamt wurden 54 Serumproben bearbeitet, wobei die untersuchten Proben des ersten und des dritten Isolators von den Kontakttieren stammten.

In keinem Falle konnten Antikörper gegen CAV und IBDV nachgewiesen werden (Tabelle 7), infolgedessen ist ein Einfluß dieser beiden immunsuppressiven Viren auszuschließen. Die in den Kits beigegebenen Kontrollen verliefen positiv.

**Tabelle 7: Ergebnisse der Untersuchung auf CAV- und IBDV-Ak in den ELISA-Tests**

Isolator Nr.	Infektionsmaterial	Anzahl der untersuchten Serumproben	CAV-Ak	IBDV-Ak
1	K1013 ( $10^5$ )	3 <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	-
2	K1013 ( $10^3$ )	7	-	-
3	K31 ( $10^5$ )	2 <sup>b</sup>	-	-
4	K31 ( $10^3$ )	16	-	-
5	KR5 ( $10^5$ )	13	-	-
6 <sup>a</sup>		13	-	-

<sup>a</sup> Kontrolltiere

<sup>b</sup> Die untersuchten Seren stammten von den Kontakttieren

<sup>c</sup> keine Antikörper

#### 4.2 Infektion von 3 Wochen alten SPF-Tieren

Um eine pathogene Wirkung der Virusisolate auf ältere Tiere zu prüfen, wurde entsprechend den Angaben unter C 5.3.2 ein Versuch mit drei Wochen alten SPF-Küken durchgeführt (zum Versuchsablauf siehe C 5.3.2). Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

#### 4.2.1 Klinische Symptome

Während des Versuchsverlaufs wurden keine klinische Symptome bei den Tieren in Isolator 1 (Infektionsmaterial: K1013, Infektionsroute: oculo-oral, Dosis  $10^5$ ), Isolator 2 (Infektionsmaterial: K31, Infektionsroute: oculo-oral, Dosis  $10^5$ ) und dem Isolator 3 (Infektionsmaterial: K31, Infektionsroute: i.m., Dosis  $10^7$ ) beobachtet. Dies betrifft die in jedem Versuch infizierten 8 Küken wie auch die 2 jeweiligen Kontrollküken. Während des gesamten Versuchsablaufes machten die Tiere einen lebhaften Eindruck ohne Krankheitsanzeichen.

#### 4.2.2 Kükenmortalität

Weder bei den oculo-oral noch bei den i.m. infizierten Tieren traten Todesfälle auf.

**Tabelle 8: Mortalität bei 3 Wochen alten SPF-Tieren, infiziert mit den Feldisolaten K31 und K1013**

Isolator Nr.	Verimpftes Virus	Virustiter per 0,1 ml	Infektionsweg	Mortalität
1	K1013	$10^5$	oculo-oral	0/10 <sup>a</sup>
2	K31	$10^5$	oculo-oral	0/10
3	K31	$10^7$	i.m.	0/10

<sup>a</sup> = 8 infizierte Tiere und 2 Kontakttiere

#### 4.2.3 Pathologisch-anatomische Befunde

Nach der Tötung der Tiere im ersten und zweiten Isolator am 16. d p.i. bzw. der Tiere im dritten Isolator am 28. d p.i. wurden alle Tiere pathologisch-anatomisch untersucht. Pathologisch-anatomische Veränderungen bei den betreffenden Tieren waren nicht zu registrieren.

#### 4.2.4 Pathologisch-histologische Befunde

Aus dem Isolator 3 wurden zwei Tiere pathologisch-histologisch untersucht.

Die Organproben der zwei untersuchten Tiere wiesen keine Veränderungen auf.

#### 4.2.5 Virusreisolierungsversuche aus der Leber

Eine Virusreisolierung aus den Lebern der am 16. d p.i. getöteten Tiere der Isolatoren 1 und 2 gelang zum Teil erst nach drei Passagen. Das Ergebnis zeigt, daß in diesem Versuch eine erfolgreiche Infektion der Küken stattgefunden hat.

Die Leberproben von den am 28. d p.i. getöteten Tieren im Isolator 3 waren dagegen negativ.

**Tabelle 9: Virusreisolierung aus den Lebern der getöteten Tiere**

Isolator Nr.	Verimpftes Virus	Virustiter per 0,1 ml	Infektionsweg	16 d p.i.	28. d p.i.
1	K1013	$10^5$	oculo-oral	+ <sup>a</sup>	k.O <sup>b</sup>
2	K31	$10^5$	oculo-oral	+	k.O <sup>b</sup>
3	K31	$10^7$	i.m.	k.O <sup>c</sup>	- <sup>d</sup>

<sup>a</sup> + = Virusreisolierung positiv

k.O<sup>b</sup> = kein Organmaterial zur Verfügung, da schon alle Versuchsiere am 16. d p.i. getötet wurden

k.O<sup>c</sup> = Kein Organmaterial zur Verfügung, da in diesen Tagen kein Tier starb oder zur Probeuntersuchung getötet wurde

<sup>d</sup> - = Virusreisolierung negativ

#### 4.2.6 Serumneutralisationstest

Bei der serologischen Untersuchung aller infizierten Tiere konnten Antikörper gegen Serotyp 4 (KR5) und Serotyp 11 (C2B) nachgewiesen werden. Der Nachweis der Immunantwort der Tiere zeigt, daß die Infektion erfolgreich verlaufen ist.

#### **4.2.7 ELISA-Tests**

Alle 30 gewonnenen und durch ELISA-Tests geprüften Seren der am 28. d p.i. getöteten Tiere enthielten wiederum keine Antikörper gegen das Virus der Infektiösen Kükenanämie und das Virus der Infektiösen Bursitis.

### **4.3 Infektion von immunsupprimierten Tieren**

#### **4.3.1 Klinische Symptome**

Die eingestellten Tiere wurden während des ganzen Versuchsablaufs, nämlich in einem Zeitraum von 7 Wochen, klinisch überwacht. Am 4. Lebenstag erfolgte eine Behandlung der Tiere mit Cyclostin<sup>®</sup> für eine Dauer von 4 Tagen. Klinische Symptome bei den Tieren nach der Cyclostin<sup>®</sup>-Behandlung konnten nicht beobachtet werden, die Tiere machten einen gesunden Eindruck.

Am 21. Lebenstag wurden die Tiere wie unter C 5.3.3. beschrieben, mit den Feldisolaten K1013, K31 und dem Referenzstamm KR5 infiziert. Am 4. d p.i. machten die Tiere im Isolator 4 (Infektionsmaterial: K31, Infektionsroute: i.m.) einen sehr teilnahmslosen Eindruck. Am 6. d p.i. waren alle Tiere in den Isolatoren 1, 2, und 4 sehr apathisch und zeigten klinische Symptome, die denjenigen der erkrankten Küken aus dem ersten Infektionsversuch mit Eintagsküken ähnlich waren. Die klinischen Symptome dauerten etwa 5 Tage lang an. Am 10. d p.i. erholten sich alle Tiere in den genannten Isolatoren und es traten weiterhin keinerlei Anzeichen von Erkrankungen auf. Bei den Tieren im Isolator 3, die mit dem Referenzstamm KR5 oculo-oral beimpft wurden, machte sich lediglich am 6. und 7. d p.i. eine leichte Mattigkeit bemerkbar, am 8. d p.i. waren diese Tiere jedoch wieder klinisch unauffällig.

#### **4.3.2 Kükenmortalität**

Das erste tote Tier wurde am 4. d p.i. im Isolator 4 bei den mit K31 i.m. infizierten Tieren aufgefunden (Tabelle 10). Weitere Tiere starben in den anderen Gruppen, wie aus der Tabelle 10 zu entnehmen ist. Am 6. d p.i. starb ein Kontakttier im Isolator 2.

Nur in der Gruppe, die mit dem Stamm KR5 infiziert wurde, konnte keine Mortalität beobachtet werden.

**Tabelle 10: Mortalität bei 3 Wochen alten SPF-Tieren nach einer Cyclostin® -  
Behandlung und nachfolgender Infektion mit den Feldstämmen und dem  
Referenzstamm**

Isolator Nr.	Virus-stamm	Virustiter per 0,1ml	Anzahl der Tiere	Infektionsweg	4 d p.i.	5d p.i.	6 d p.i.	7 d p.i.	8 d p.i.	Mortalität
1	K1013	10 <sup>7</sup>	8 <sup>a</sup>	oculo-oral	- <sup>c</sup>	1	2	-	-	3/8 <sup>d</sup> (37,5%)
			1 <sup>b</sup>		-	-	1		-	1/1 (100%)
2	K31	10 <sup>7</sup>	8	oculo-oral	-	-	-	1	1	2/8 (25%)
			1		-	-	-	-	-	0/1 (0%)
3	KR5	10 <sup>7</sup>	8	oculo-oral	-	-	-	-	-	0/8 (0%)
			1	-	-	-	-	-	-	0/1 (0%)
4	K31	10 <sup>7</sup>	8	i.m.	1	2	-	1	-	4/8 (50%)
			1		-	-	-	-	-	0/1 (0%)

<sup>a</sup> infizierte Tiere

<sup>b</sup> Kontaktiere

<sup>c</sup> keine Mortalität

<sup>d</sup> gestorbene Tiere / Anzahl der infizierten Tiere

#### 4.3.3 Pathologisch-anatomische Befunde

Bei den pathologisch-anatomischen Untersuchungen wurden bei den verendeten Tieren ähnliche Befunde wie bei den infizierten Eintagsküken (siehe D 4.1.3) festgestellt. Charakteristisch waren die großen und stark geschwollenen Lebern mit vereinzelt Nekroseherden. Der Herzbeutel war mit klarer gelblicher Flüssigkeit angefüllt. Im Unterschied zum Eintagskükenversuch wurde in diesem Falle eine starke Bursaatrophie bei allen verendeten Tieren beobachtet.

Die überlebenden Tiere, die am Ende des Versuches pathologisch-anatomisch untersucht wurden, zeigten eine ebenso starke Bursaatrophie wie die verendeten Tiere jedoch wurden keine sonstigen Organveränderungen bei diesen Tieren registriert.

#### **4.3.4 Pathologisch-histologische Befunde**

Bei je 2 verendeten Tieren aus den Isolatoren 1, 2 und 4 wurde eine Gewebeuntersuchung vorgenommen. Da in dem Isolator 3 keines der infizierten Tiere gestorben war, wurden 2 Tiere am Ende des Versuches getötet und zu weiteren Untersuchungen herangezogen.

##### -Verendete Tiere:

Die pathologisch-histologischen Veränderungen bei allen 6 untersuchten Lebern zeigten zahlreiche intranukleäre basophile Einschlusskörperchen, großtropfige Verfettungen mit herdförmigen Nekrosen und Kernpolymorphie.

Bei zwei Tieren wurden herdförmige Blutungen im Myokard festgestellt. Alle untersuchten Bursen wiesen Veränderungen in Form von kleinen, weitgehend lymphozytenfreien Follikeln mit Nekrosen und Makrophagen auf. Vier der sechs untersuchten Thymusdrüsen zeigten eine verschmälerte Rinde mit Einzelnekrosen. Die Nieren ließen eine herdförmige entzündliche Infiltration im Interstitium erkennen. In zwei Nieren wurden einzelne basophile Kerneinschlüsse in Tubulusepithelzellen gefunden.

##### -Getötete Tiere:

Der einzige pathologische Befund konnte in den Bursen observiert werden. Eindeutig zu sehen war die schmale Rinde und die weitgehend lymphozytenfreien Follikel, was auf den Einfluß der Cyclostin<sup>®</sup>-Behandlung zurückzuführen ist.

#### **4.3.5 Virusreisolierung**

##### **4.3.5.1 Virusreisolierung aus der Leber**

Die erfolgreichen Virusreisolierungen erfolgten aus den Lebern der an der Infektion gestorbenen Tiere. Eine Reisolierung aus den Lebern der am 28 d p.i. getöteten Tiere gelang nicht.

**Tabelle 11: Isolierung von Feldstämmen und Referenzstämmen aus den Lebern gestorbener und getöteter Tiere**

Isolator Nr.	Virusstamm	Virustiter per 0,1ml	Infektionsweg	4 d p.i.	5 d p.i.	6 d p.i.	7 d p.i.	8 d p.i.	28 d p.i.
1	K1013	10 <sup>7</sup>	oculo-oral	k.O <sup>a</sup>	+	+	k.O	k.O	- <sup>c</sup>
2	K31	10 <sup>7</sup>	oculo-oral	k.O	k.O	k.O	+	+	-
3	KR5	10 <sup>7</sup>	oculo-oral	k.O	k.O	k.O	k.O	k.O	-
4	K31	10 <sup>7</sup>	i.m.	+ <sup>b</sup>	+	k.O	+	k.O	-

<sup>a</sup> k.O = Kein Organmaterial vorhanden, da an diesem Tag kein Versuchstier starb oder zur Probeuntersuchung getötet wurde

<sup>b</sup> + = Virusreisolierung positiv

<sup>c</sup> - = Virusreisolierung negativ

#### 4.3.5.2 Virusreisolierung aus der Herzbeutelflüssigkeit

Von den Tieren, die mit den Feldisolaten infiziert waren, wurde von jedem Isolator je ein Tier mit stärker ausgeprägtem Hydroperikardium ausgewählt, um die Herzbeutelflüssigkeit auf das Vorhandensein von Adenovirus zu untersuchen.

Bei allen vier Proben verlief die Virusreisolierung erfolgreich.

#### 4.3.6 Serumneutralisationstest

Die Seren der Tiere, die am 28 d p.i. getötet wurden, enthielten Antikörper gegen den Serotyp 4 (KR5) und den Serotyp 11 (C2B) der FAV. Die Immunantwort bestätigte die erfolgreiche Infektion.

#### 4.3.7 ELISA-Tests

Die Seren von den bis zum 28 d p.i. überlebenden Tieren wurden auf das Vorhandensein von CAV- und IBDV-Antikörpern mit Hilfe der ELISA überprüft. Eine Gesamtmenge von 26 Seren wurde in die Untersuchung miteinbezogen, wobei kein Hinweis auf Anwesenheit von Antikörpern gegen die beiden Viren gefunden wurde.

## **5. Versuche zu einer vertikalen Übertragung des Feldisolates K31**

Die Versuche zur vertikalen Übertragung aviärer Adenoviren vom FAV-Typ wurden entsprechend den Angaben unter C.6 mit dem Isolat K31 durchgeführt. Die Ergebnisse werden für die Elterntiere und für deren Nachkommen gesondert dargestellt.

### **5.1 Elterntiere**

#### **5.1.1 Klinische Symptome und Legeleistung bei den Elterntieren**

Während des ganzen Versuchsablaufes waren nach der oralen Infektion mit dem Isolat K31 bei den 16 zum Zeitpunkt der Infektion 33 Wochen alten SPF-Elterntieren (Nr. 1-16) keine klinischen Symptome festzustellen. Die Elterntiere machten während des Versuches einen gesunden Eindruck, kein Tier verendete. Die Legeleistung war nach der Infektion unverändert. Durchschnittlich legte jedes Tier nach der Infektion 6 Eier pro Woche, was dem Durchschnitt der gelegten Eier vor der Infektion entsprach.

#### **5.1.2 Pathologisch-anatomische Befunde bei den Elterntieren**

Die 16 Elterntiere wurden 6 Wochen p.i. getötet. Bei den Untersuchungen konnten keine pathologischen Organveränderungen beobachtet werden.

### **5.2 Embryonen**

Die Elterntiere wurden wöchentlich künstlich besamt, die gesammelten Eier innerhalb einer Woche nach jeder Besamung bei 38° C im Brutschrank bebrütet und jeden 3. Tag geschickt (siehe C 6).

Abgestorbene Embryonen aus den Bruteiern, die in den Zeitabschnitten von der ersten Woche vor der Infektion bis zur dritten Woche nach der Infektion anfielen, wurden bei ausreichender Größe seziiert und pathologisch-anatomisch beurteilt.

Aufgrund der Kennzeichnung der Elterntiere war die Unterscheidbarkeit der Eier und damit die entsprechende Nummerierung der abgestorbenen Embryonen gewährleistet

(Tabelle 12). Insgesamt sind im Gesamtzeitraum des Versuches neun Embryonen gestorben.

**Tabelle 12: Embryomortalität der bebrüteten Eier infizierter Elterntiere**

Elterntiere	Zeitpunkt des Einsammelns der befruchteten Eier	Anzahl der abgestorbenen Embryonen	Alter der abgestorbenen Embryonen in Tagen
Nr.4	2 Wo. p.i.	1	6
Nr. 5	2 Wo. p.i.	3	6
Nr. 10	3 Wo. p.i.	1	8
Nr. 11	2 Wo. p.i.	1	8
	3 Wo. p.i.	2	8
Nr. 14	3 Wo. p.i.	1	18

Die vier 6 Tage alten abgestorbenen Embryonen waren nicht weit genug entwickelt, um an ihnen einen Nachweis pathologischer Veränderungen erbringen zu können. Die restlichen 5 Embryonen, die zu einem späteren Zeitpunkt gestorben waren, zeigten sich bei der Obduktion ohne pathologische Veränderungen. Von diesen Embryonen wurde Lebersubstanz für die Virusreisolierung gewonnen, nach Anzucht der Leberhomogenate auf Embryoleberzellkulturen konnte auch nach dreimaligen Passagen kein Adenovirus isoliert werden.

### 5.3 Nachkommen

Die 16 SPF-Elterntiere waren zum Zeitpunkt der ersten künstlichen Besamung, die eine Woche vor der Infektion stattfand, frei von Adenoviren. Die von diesen Tieren innerhalb einer Woche nach der ersten künstlichen Besamung gesammelten Eier wurden als Kontrolleier, die geschlüpften Küken als Kontrolltiere betrachtet. Unmittelbar nach dem Schlupfvorgang unter Pedigree-Hauben wurde von den Nachkommen jedes einzelnen Elterntieres ein Küken markiert und eingestallt. Von dem restlichen Kükenaufkommen wurde Blut und Mekonium zur serologischen und virologischen Untersuchung entnommen.

### **Zusammenfassende Darstellung der Nachkommengruppen**

Gruppe K	Nachkommen, eine Woche vor der Infektion der Elterntiere
Gruppe 0	Nachkommen, im Zeitraum unmittelbar nach der Infektion bis zu einer Woche nach der Infektion der Elterntiere (erste Woche p.i.)
Gruppe 1	Nachkommen aus der zweiten Woche nach der Infektion der Elterntiere
Gruppe 2	Nachkommen aus der dritten Woche nach der Infektion der Elterntiere
Gruppe 3	Nachkommen aus der vierten Woche nach der Infektion der Elterntiere

Demnach ergaben sich 5 Gruppen von Nachkommen, wobei die erste Gruppe die erwähnten Kontrolltiere umfaßte (Gruppe K). Die zweite Gruppe bestand aus den Tieren, die aus den gesammelten Eiern des Zeitraumes unmittelbar nach der Infektion bis zum Ablauf der ersten Woche p.i. geschlüpft waren (Gruppe 0). Die Gruppen 1, 2 und 3 setzten sich aus den in der zweiten, dritten und vierten Woche p.i. geschlüpften Tieren zusammen.

Es muß erwähnt werden, daß in den Gruppen 1 bis 3 nicht von allen Elterntieren gleichmäßig viele Nachkommen geschlüpft waren. Die Gründe für diesen Umstand lagen in den unterschiedlichen Befruchtungsraten bzw. in der erwähnten Embryomortalität (Tabelle 12). In den Fällen, in denen nur ein Tier geschlüpft war, wurde auf die Entnahme des Mekoniums und der Blutproben verzichtet, damit mindestens ein Tier eingestallt werden konnte.

#### **5.3.1 Klinische Symptome und pathologisch-anatomische Befunde bei den Nachkommen**

Die Nachkommen wurden über 5 Wochen beobachtet. Die Tiere sahen während dieses Zeitraumes klinisch gesund aus und kein Tier verendete.

Nach der Tötung der Tiere konnten keine pathologisch-anatomischen Veränderungen bei den Tieren nachgewiesen werden (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Mortalität von Nachkommen infizierter Elterntiere**

Nachkommengruppen	Mortalität
Gr. k	0/16
Gr. 0	0/16
Gr. 1	0/12
Gr. 2	0/10
Gr. 3	0/13

### 5.3.2 Pathologisch-histologische Untersuchungen bei den Nachkommen

Von zwei beliebig ausgewählten 35 Tage alten Tieren jeder Gruppe wurden Organproben von Leber, Herz, Niere, Milz, Thymus und Bursa Fabricii entnommen und histologisch untersucht.

Nur bei einem der Nachkommen in Gruppe 2 konnten Einzelzellnekrosen in der Leber und herdförmige lymphozytäre Infiltrationen unter dem Epikard festgestellt werden. Desweiteren zeigte das zweite untersuchte Tier dieser Gruppe pathologische Veränderungen in der Bursa Fabricii. Das Epithel wies in diesem Fall eine tiefe Einziehung auf, die Follikel waren lymphozytenfrei und das Follikelmark war von Nekrosen und Makrophagen durchsetzt.

Auch bei den Nachkommen in der Gruppe 3 stellte sich nur bei einem der untersuchten Tiere eine herdförmige lymphozytäre Infiltration im Myokard als histologische Veränderung heraus. Weitere pathologisch-histologischen Veränderungen konnten nicht gefunden werden.

## 5.4 Serumneutralisationstest

### 5.4.1 Die Untersuchungen der Seren der Elterntiere

Die Entnahme von Blutproben erfolgte wöchentlich jeweils vor jeder Besamung der Elterntiere, die Serumantikörpertiter gegen das Feldisolat K31 wurden quantitativ bestimmt. Die ersten Proben, die vor der Infektion der Elterntiere entnommen wurden, enthielten wie erwartet keine Antikörper gegen das Isolat K31. Erst in der zweiten Woche nach der Infektion wurden geringe Antikörpertiter mit einem Titer bis 1:32 bei 13 von 16 untersuchten Hühnern festgestellt (Tabelle 14). Der Antikörpertiter stieg in

der dritten Woche p.i. bis zu einem Wert von 1:32 bis 1:1024 und verhielt sich auch über die vierte Woche p.i. konstant. Bei den 16 Elterntieren ergaben sich naturgemäß bei der Bestimmung der Antikörper in der dritten und vierten Woche p.i. verschieden hohe Titer, je nach der unterschiedlichen Intensität der Immunreaktion der Tiere auf die Virusinfektion. Der höchste reziproke Antikörpertiter betrug 1024, der niedrigste Titer wurde bei 32 ermittelt.

**Tabelle 14: Antikörpernachweis gegen das Feldisolat K31 bei den infizierten Elterntieren und deren Nachkommen**

Elterntiere	Bezeichnung der Nachkommen	Elterntiere		Nachkommen			
		Ak-Nachweis gegen K31	Ak-Titer gegen K31	Ak-Nachweis gegen K31		Ak-Titer gegen K31	
				1.Lebenstag	35.Lebenstag	1.Lebenstag	35.Lebenstag
1 Wo. vor der Infektion	Gr. K	0/16	- <sup>a</sup>	0/16	0/16	-	-
Zeitpunkt der Infektion		0/16	-				
1 Wo. P.i.	Gr. 0			0/16	0/16	-	-
2 Wo. p.i.	Gr. 1	13/16	1:8 -1:32	0/12	0/12	-	-
3 Wo. p.i.	Gr. 2	16/16	1:32 -1:1024	10/10	4/10	1:16 -1:256	1:8 -1:32
4 Wo. p.i.	Gr. 3	16/16	1:32 -1:1024	13/13	6/13	1:32 -1:512	1:4 -1:64

<sup>a</sup> - Serumtiter < 4

**Tabelle 15: Adenovirusausscheidung bei den Elterntieren und deren Nachkommen in den verschiedenen Stadien des Versuches**

Elterntiere	Bezeichnung der Nachkommen	Elterntiere	Nachkommen (Virusnachweis)				
			Virusnachweis (Kloakentupfer)	Virusnachweis (Mekoniumproben)	Virusnachweis (Kloakentupfer) 7 Tage alte Tiere	Virusnachweis (Kloakentupfer) 14 Tage alte Tiere	Virusnachweis (Kloakentupfer) 21 Tage alte Tiere
1 Wo. vor der Infektion	Gr. K	0/16	0/16	0/16	0/16	0/16	0/5
Zeitpunkt der Infektion		0/16					
1 Wo. P.i.	Gr. 0		0/16	0/5	0/5	0/5	0/5
2 Wo. p.i.	Gr. 1	16/16	9/12	0/5	0/5	0/5	5/5
3 Wo. p.i.	Gr. 2	0/16	0/10	5/5	5/5	5/5	5/5
4 Wo. p.i.	Gr. 3	16/16	4/13	5/5	5/5	5/5	5/5

#### **5.4.2 Die Untersuchungen der Seren der Nachkommen**

Die Seren der 5 Nachkommengruppen wurden am ersten Lebenstag und am 35. Lebenstag nach dem gleichen Muster wie die der Elterntiere quantitativ auf Antikörper gegen das Isolat K31 untersucht (Tabelle 14).

##### -Untersuchung der Seren vom ersten Lebenstag

Erst die Serumproben der Nachkommen der Gruppe 2 (3. Woche p.i.) wiesen am ersten Lebenstag mittlere Titer maternaler Antikörper bis zu einem Wert von 1:256 gegen das Isolat K31 auf. Höhere reziproke Antikörpertiter bis zu 512 wurden bei den Eintagsküken der dritten Gruppe (4. Woche p.i.) gemessen. Wie aus der Tabelle 14 ersichtlich ist, wurden bei den Nachkommen in der gleichen Weise wie bei den Elterntieren erhebliche Unterschiede in der Höhe der Antikörpertiter bei den einzelnen Küken festgestellt.

##### -Untersuchung der Seren vom 35. Lebenstag

Die Untersuchungen ergaben, daß der Antikörpergehalt am 35. Lebenstag bei der zweiten und der dritten Gruppe geringer war als am ersten Lebenstag. Gemessen wurde hier ein reziproker Antikörpertiter, der sich zwischen 4 und 64 bewegte (Tabelle 14). Dies spiegelt das Absinken der maternalen Antikörpertiter vom ersten Lebenstag bis zum 35. Lebenstag deutlich wieder.

#### **5.5 Virusausscheidung bei den Versuchstieren**

##### **5.5.1 Untersuchungen der Kloakentupfer der Elterntiere**

Der Nachweis der Ausscheidung von Adenoviren bei den Elterntieren wurde durch die Überprüfung der Kloakentupfer (siehe C 7.3) erbracht. Wie in Tabelle 15 beschrieben, schieden alle Versuchstiere nach einer Woche (in der zweiten Woche) p.i. Adenoviren aus, so daß die erfolgreiche Infektion aller Tiere nachgewiesen ist.

Interessanter Weise konnte in der dritten Woche p.i. bei keinem der 16 Versuchstieren eine Virusausscheidung festgestellt werden, während in der vierten Woche p.i. wiederum eine Virusausscheidung bei allen Elterntieren ermittelt werden konnte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Virusausscheidung keinen permanenten, sondern einen intermittierenden Verlauf aufwies.

### **5.5.2 Untersuchungen der Mekoniumproben und der wöchentlich entnommenen Kloakentupfer der Nachkommen**

Die Mekoniumproben der Nachkommen wurden nach dem Schlupf entnommen und im gleichen Verfahren wie die Kloakentupfer bearbeitet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 aufgelistet. Bei den Küken aus der Gruppe 1 konnten in 9 von 12 Proben Adenovirus isoliert werden, während in keiner der 10 untersuchten Mekoniumproben aus der folgenden Woche (3. Woche p.i.) das Vorhandensein von Adenovirus nachzuweisen war, ein Ergebnis, das demjenigen der Kloakentupferproben der Elterntiere entspricht. Ein Virusnachweis aus Mekoniumproben der letzten Gruppe (Gr. 3, 4. Woche p.i.) gelang bei 4 von 13 Proben.

Von den 16 Elterntieren wurden 5 Hennen beliebig ausgewählt. Den Nachkommen dieser Hennen in den Gruppen K, 0, 1, 2 und 3 wurden jeweils am 7., 14., 21. und 28. Lebensstag Kloakentupfer entnommen. Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollte die Virusausscheidung der Tiere zu den verschiedenen Zeiten weiter verfolgt werden. Insgesamt ergaben sich hieraus 100 separate Anzuchtversuche.

Erwartungsgemäß verliefen die Anzuchtversuche in den Gruppen K und 0 zu allen Zeitpunkten negativ, die Versuche können insofern auch als Kontrollen angesehen werden. Ebenfalls negativ erwiesen sich die Kloakentupferproben bei 7, 14 und 21 Tage alten Küken der Gruppe 1, obgleich aus Mekoniumproben geschlüpfter Küken aus der selben Gruppe ein Virusnachweis bei 9 von 12 Proben gelang. Jedoch konnte nach 28 Tagen wieder bei allen Küken Adenovirus nachgewiesen werden.

Bei den Küken aus der dritten Woche p.i., in der sowohl bei den Elterntieren als auch in den Mekoniumproben in keinem Falle das Virus nachzuweisen war, verliefen die Anzuchtversuche bei allen Küken zu allen Zeitpunkten der Probenentnahme positiv. Ein Befund, der zeigt, daß trotz nicht gelungener Anzuchtversuche das Virus durchaus vertikal übertragen werden kann. Ebenso wie die Kloakentupferproben aus der

3. Woche, zeigten auch alle Anzuchtversuche aus den Küken der vierten Woche einen positiven Nachweis von Adenoviren.

### **5.6 ELISA-Tests**

Um wie bei den anderen Infektionsversuchen eine zusätzliche Infektion mit den CAV und IBDV auszuschließen, wurden alle Blutproben, die von den Elterntieren und ihren Nachkommen nach der Tötung entnommen wurden, auf ein etwaiges Vorhandensein von Antikörpern gegen die o.g. Viren untersucht.

Das Untersuchungsmaterial umfaßte 16 Blutproben von den Elterntieren und insgesamt 50 Blutproben von den Nachkommen. In allen Fällen waren die Ergebnisse negativ, so daß sich alle Versuchstiere als frei von CAV- und IBDV-Antikörpern erwiesen.

## E. DISKUSSION

Wie in der Einleitung zu dieser Arbeit beschrieben wurde, steht die Frage der primären pathogenen Wirkung der aviären Adenoviren vom FAV-Typ, zumindest soweit dies bestimmte Virusisolate angeht, nach wie vor zur Diskussion. Der Ausbruch des Hydroperikard-Syndroms (HPS) bei Broilern in verschiedenen Regionen der Welt stellte diese Frage wieder in den Vordergrund. Für die ätiologische Klärung dieser Krankheitsfälle ist es von Bedeutung zu ermitteln, ob Adenoviren als primäre und möglicherweise alleinige Ursache für diese Erkrankung anzusehen sind. Im Einzelfall ist es wichtig zu wissen, inwieweit sich ein isoliertes Adenovirus aus erkrankten Tieren mit den aufgetretenen Fällen von HPS in Verbindung bringen läßt. Im Rahmen dieses Problemkomplexes beschäftigte sich diese Arbeit zunächst mit der serologischen Klassifizierung und dem serologischen Vergleich sowie der molekularbiologischen Charakterisierung der isolierten Stämme aus HPS - erkrankten Tiere in Ecuador (K1013 1-6) und Pakistan (K31), um danach weitere Untersuchungen zur Pathogenität der Isolate durchzuführen.

Die Firma Lohmann Tierzucht stellte dem Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin diese als Adenoviren bezeichneten Feldisolate zur Verfügung. Die im Institut durchgeführte Virusanzucht war schon in der 1. Passage positiv, wobei in der Zellkultur ein für Adenoviren typischer CPE vom Rundzelltyp auftrat, was den Vorbericht bestätigte.

Um eine Einordnung der Isolate in die Reihe der FAV-Serotypen zu ermöglichen, wurden Virusneutralisationsteste, wie von MONREAL et al. (1980) beschrieben, im Mikrotiterplatten-Verfahren ausgeführt. Dabei wurden die Isolate K1013 (Nr. 1-6) und das Isolat K31 sowohl vom FAV4- (KR5) als auch vom FAV11- (C2B) Antiserum neutralisiert. Da bei Viren der FAV-Gruppe im Neutralisationstest zwischen den FAV-Serotypen oftmals Kreuzneutralisationen auftreten, kann die genaue Identifikation eines Isolates erschwert sein. Eine Kreuzneutralisation der beiden Stämme KR5 und C2B wurde auch von McFERRAN und CONNOR (1977) in einer Studie zur Klassifizierung der FAV-Serotypen festgestellt. Als Ursache hierfür wird die breite Antigenität der FAV-Gruppe angesehen (McFERRAN et al., 1972; McFERRAN und ADAIR, 1977;

COWEN et al., 1977). Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des Kreuzneutralisationstests die genauere serologische Zuordnung zu einem der beiden Referenzstämme angestrebt. Die Durchführung des Kreuzneutralisationstests erfolgte nach dem Standardprotokoll von McFERRAN et al. (1972). Hierbei werden die Virusstämme gegen das eigene homologe Antiserum und die heterologen Antiseren sämtlicher FAV-Serotypen in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt, wodurch die Bestimmung der Neutralisationstiter ermöglicht wird.

Bei der Auswertung der Ergebnisse stellte sich heraus, daß alle untersuchten Stämme einen hohen Neutralisationstiter mit ihren eigenen Antiseren und zusätzliche Kreuzneutralisation mit den Antiseren anderer Stämme aufwiesen. Allerdings war der Unterschied zwischen heterologen und homologen Seren bei den Feldisolaten und dem Stamm KR5 (FAV4) wesentlich geringer als der Unterschied zwischen den Feldisolaten und dem Stamm C2B (FAV11). Der Stamm C2B reagierte 32 mal höher mit seinem homologen Serum als mit den heterologen KR5-, K1013- (Nr. 2) und K31-Antiseren. Diese Ergebnisse wiesen auf einen deutlichen Unterschied der Feldisolate zum Stamm C2B hin. Es liegt jedoch eine Einweg-Kreuzneutralisation der Stämme KR5, K1013 (Nr. 2) und K31 mit dem C2B-Antiserum vor, die möglicherweise auf eine unspezifische Reaktion des im Institut hergestellten Serums zurückzuführen ist. Aus den Ergebnissen kann indessen der Schluß gezogen werden, daß die Feldisolate serologisch dem Serotyp FAV4 zugeordnet werden können.

Für die genauere Klassifizierung von Adenovirusstämmen wird von WADELL et al. (1980) der Einsatz der Restriktionsenzymanalyse mit verschiedenen Enzymen empfohlen. Ein neuer humaner Adenovirusstamm konnte durch diese Methode identifiziert werden (AIRD et al., 1983).

ZSAK und KISARY (1984) unterteilten die FAV-Serotypen anhand der Restriktionsenzymanalyse mit den zwei Restriktionsenzymen Bam HI und Hind III in DNA-Gruppen. In dieser Einteilung der 12 Serotypen in 5 DNA-Gruppen (A-E) gehören die beiden Serotypen 4 und 11 derselben DNA-Gruppe (D) an. Dies erklärt die enge Verwandtschaft der beiden Serotypen auch auf der Genomebene. ERNY et al. (1991) wandten die Methode der Restriktionsenzymanalyse ebenfalls an, um die virulenten Stämme, die im Zusammenhang mit der akuten Einschlußkörperchenhepatitis bei

Broilern in Australien isoliert wurden, von nicht virulenten FAV-Stämmen zu unterscheiden.

Ein Vergleich der Virus-DNAs von FAV4 und FAV10 wurde 1995 von ERNY et al. unternommen. Dabei wurden zehn Restriktionsenzyme, unter anderem Bgl II, Dra I, Eco RI, für die Untersuchungen eingesetzt. Es sollte erwähnt werden, daß die genannte Studie auf der älteren Klassifikation von McFERRAN und CONNOR (1977) basiert, in der der Stamm C2B noch als FAV10 bezeichnet wurde.

Um die entstandenen Spaltungsmuster der Referenzstämmen in dieser Arbeit mit den Literaturangaben vergleichen zu können, wurden die vier Enzyme (Bam HI, Bgl II, Dra I und Eco RI), die von ZSAK und KISARY (1984) sowie von ERNY et al. (1995) angewendet wurden, ausgewählt. Zusätzlich wurde das Enzym Pst I zu Untersuchungen herangezogen.

Eine Übereinstimmung der Fragmentmuster der Referenzstämmen (KR5 und C2B) mit den Literaturangaben war eindeutig zu erkennen. Beim Vergleich der Bam HI-, Dra I- und Eco RI- Spaltungsmuster des Isolates K1013 (Nr. 2) und des Isolates K31 mit den Referenzstämmen wurde eine 100%ige Übereinstimmung der Feldisolate mit dem Stamm KR5 (FAV4) festgestellt. Die Spaltung der DNA mit den zwei anderen Enzymen Bgl II und Pst I erlaubte Differenzierungen im Fragmentmuster der Referenzstämmen und der Feldisolate. Hervorzuheben ist, daß bei allen aufgestellten DNA-Vergleichen keine Übereinstimmung des Stammes C2B mit den Feldisolaten zu beobachten war. Dies schließt eine Zugehörigkeit der Feldisolate zu dem Serotyp 11 aus. Eine andere wichtige Schlußfolgerung war, daß die Feldisolate auf der Genomebene untereinander und mit dem FAV4 Referenzstamm eng verwandt sind, die Anzahl und das Molekulargewicht der DNA-Fragmente aber in Abhängigkeit vom eingesetzten Enzym differieren können. Es scheint durchaus möglich, daß neue Stämme durch Rekombination von zwei serologisch unterschiedlichen Elternstämmen auftreten können (SAMBROOK et al., 1980). Die weite Verbreitung von Adenoviren erhöht dabei die Wahrscheinlichkeit für derartige Rekombinationsereignisse. Dem pakistanischen Isolat K31 wurde auf Grund serologischer und molekularbiologischer Untersuchungen bereits eine Verwandtschaft zum Serotyp 4 zugesprochen (SCHÜLLER et al., 1991), was durch die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit bestätigt wurde.

Es stellte sich nun die Frage, ob alle sechs Isolate aus den verschiedenen Regionen eines Landes identische DNA-Spaltungsmuster besitzen. Für diese Untersuchungen wurden

die zwei Enzyme (Bgl II, Pst I) ausgewählt, bei deren Einsatz sich Unterschiede des Spaltungsmusters des Isolates K1013 (Nr. 2) zum Referenzstamm KR5 und zum Isolat K31 gezeigt hatten. Wie aus Abb. 3 erkennbar ist, sind die sechs Isolate aus Ecuador nicht nur serologisch, sondern auch auf der Genomebene identisch, deshalb wurde für die folgenden Untersuchungen nur mit einem der sechs Isolate weitergearbeitet.

Nach der serologischen und genetischen Einordnung der Feldisolate in die Serogruppe FAV4 folgte die Prüfung ihrer Embryopathogenität. KAWAMURA et al. (1964) führten Untersuchungen zur Embryopathogenität in Hühnereiern durch. Bei diesen Versuchen wurden die 9 Tage alten embryonierten Eier mit unterschiedlichen Dosierungen von 8 FAV-Serotypen über die Allantoishöhle beimpft. In diesen Versuchen konnte eine Embryomortalität nach dem 3. bis zum 11. d p.i. bei denjenigen Embryonen beobachtet werden, die mit einer hohen Dosis von FAV1, FAV5 und FAV6 infiziert wurden. Eine Studie von COWEN aus dem Jahre 1988 beschreibt die Embryopathogenität und Embryomortalität nach der Beimpfung der SPF-Hühnerembryonen mit 11 FAV-Serotypen in die Allantoishöhle bzw. den Dottersack. Die Virustiter betragen bis zu  $10^7$  PBE/ml bei einem Volumen von 0,1 ml. Die Infektion über die Allantoishöhle erfolgte bei Embryonen im Alter von 10-12 Tagen, die über den Dottersack bei 5-7 Tage alten Embryonen. Dabei ergab eine Inokulation mit den Serotypen FAV2-11 in die Allantoishöhle nur eine sehr geringe Embryomortalität, bei manchen Serotypen starben keine Embryonen ab. Die Infektion über den Dottersack mit FAV2-11 führte hingegen zu einer höheren Mortalität mit pathologisch-anatomischen Veränderungen in Form von nekrotischen Lebern, geschwollenen Milzen und Hämorrhagien in verschiedenen Körperteilen. Mit FAV1 konnte in beiden Versuchen die höchste Embryomortalität im Vergleich zu anderen FAV-Serotypen erreicht werden. Demzufolge machte COWEN (1988) den Vorschlag, die Inokulation über den Dottersack gegenüber der intraallantoidalen Infektion zu bevorzugen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 5 Tage alte embryonierte SPF-Eier mit K1013, K31 und dem Referenzstamm KR5 in drei unterschiedlichen Dosen über den Dottersack infiziert, um die embryopathogene Wirkung dieser Viren vergleichend zu untersuchen.

Die Isolate K1013 und K31 verursachten in den drei eingesetzten Dosierungen eine 100%ige Mortalität. Mit einer Dosis von  $10^5$  TCID<sub>50</sub> infizierte Embryonen starben

früher ab als die mit niedrigeren Dosen ( $10^4$ -,  $10^3$  TCID<sub>50</sub>) infizierten, und zwar erst zwischen dem 5. und dem 7. d p.i.. Damit zeigte sich eine eindeutige Abhängigkeit von der Virusdosis. Der Stamm KR5 hingegen zeigte eine eindeutig niedrigere Mortalitätsrate, da bei einer Dosis von  $10^5$  TCID<sub>50</sub> nur 71% der Embryonen abstarben, bei der niedrigeren Dosierung nur noch 57% bzw. 7% respektiv. Im Vergleich dazu verursachten die von COWEN (1988) untersuchten Stämme des Serotypes 4 eine viel geringere Mortalität von lediglich 9%. Da der Arbeit nicht zu entnehmen ist, um welche Stämme des Serotypes 4 es sich handelt, ist ein Vergleich der Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit schwierig. Bei fast allen abgestorbenen Embryonen wurden nekrotische Lebern und Hämorrhagien in distalen Körperteilen beobachtet. Dies entspricht den von COWEN (1988) angeführten pathologisch-anatomischen Veränderungen.

Dieser Versuch zeigt eindeutig, daß die Feldstämme K1013 und K31 eine höhere Pathogenität als der Referenzstamm KR5 aufweisen. Bei der Interpretation sollte aber auch berücksichtigt werden, daß nach den Angaben von COWEN (1988) alle FAV-Serotypen potentiell eine Embryomortalität verursachen können. Bei geringerer Pathogenität eines Stammes für Embryonen und bei Reduktion der Infektionsdosis tritt der Tod zu einem späteren Zeitpunkt ein.

Die 100%ige Embryopathogenität der Feldisolate K31 und K1013 ließ es sinnvoll erscheinen, die Frage der Pathogenität nach Infektion von SPF-Eintagsküken auf natürlichem Infektionsweg mit unterschiedlichen Dosierungen zu prüfen.

Untersuchungen zur Pathogenität verschiedener FAV Isolate wurden vielfach mit unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. Nachdem FADLY und WINTERFIELD (1973) zum ersten Mal ein Adenovirus im Zusammenhang mit IBH isoliert hatten, wurde mehrfach versucht, diese Erkrankung experimentell zu reproduzieren, wobei auch Isolate aus unterschiedlichen Serotypen von verschiedenen IBH-Feldinfektionen geprüft wurden. ROSENBERGER et al. (1974) gelang es, mit FAV5 im Kükeninfektionsversuch eine klassische IBH herbeizuführen. Die Bedeutung der Infektionsroute bei der Reproduzierung der Krankheit beschreibt COOK (1974). Während die Mortalität bei intraperitoneal infizierten Eintagsküken mit FAV2 68% betrug, ergab eine orale Infektion (natürlicher Infektionsweg) eine Verminderung derselben auf 5%. Zahlreiche Untersuchungen zur Reproduktion des Krankheitsbildes

der Einschlußkörperchenhepatitis unter Einhaltung des natürlichen Infektionsweges gelangen nicht. Bei diesen Untersuchungen wurden auch Isolate unterschiedlicher FAV-Serotypen eingesetzt. KOHN (1962) benutzte Serotyp 2, KAWAMURA und TSUBAHARA (1963) Serotyp 1, McDOUGALL und PETERS (1974) die Serotypen 1, 2, 5, 8 und McCracken et al. (1976) die Serotypen 2, 3, 4, 5 und 8.

Über erfolgreiche Versuche zur Induktion der IBH mit FAV Isolaten bei Küken in einem Alter zwischen einem Tag und vier Wochen mit verschiedenen Isolaten über den natürlichen Infektionsweg berichteten WINTERFIELD et al. (1973), FADLY und WINTERFIELD (1973) und COOK (1974).

Daß über den natürlichen Infektionsweg eine geringere Mortalität hervorgerrufen wird, zeigte die Studie von SAIFUDDIN und WILKS (1990) in Neuseeland. Küken im Alter von 2 Tagen wurden mit einem Feldisolat vom Serotyp 8 infiziert und zwar in einer Gruppe oral und in einer anderen Gruppe intraperitoneal. Das Ergebnis zeigte, daß intraperitoneal infizierte Tiere früher starben und eine höhere Sterberate aufwiesen. Die Mortalität der intraperitoneal infizierten Tiere betrug 45%, diejenige der oral infizierten Gruppe lediglich 30%.

Nach der oro-nasalen Infektion der SPF-Eintagsküken mit zwei verschiedenen Isolaten (TR59 und H6), die serologisch dem FAV8 zuzuordnen waren, beschreibt COOK (1983) eine 3%ige Mortalität, mit einem anderen Isolat (HV7) jedoch, welches ebenfalls dem Serotyp 8 angehörte, wurde eine 30%ige Mortalität hervorgerufen. Auch REECE et al. (1986) sahen eine 30%ige Mortalität nach der oralen Infektion von SPF-Eintagsküken mit dem Isolat VRI-33, das ebenfalls dem Serotyp 8 zugehörte. Aus verschiedenen Beobachtungen u.a. von DHILLON und WINTERFIELD (1984), BÜLOW et al. (1986) und ERNY et al. (1991) kann geschlossen werden, daß die Zugehörigkeit eines Isolates zu einem bestimmten Serotypen hinsichtlich seiner Pathogenität ohne Bedeutung ist, da die verschiedenen Serotypen, aber auch Stämme innerhalb eines Serotypes, ein ganz unterschiedliches pathogenes Potential besitzen können.

Die Tatsache, daß aus erkrankten Tieren isolierte Adenovirusstämme primär, ohne Einwirkung immunsupprimierender Faktoren, ein typisches Erkrankungsbild von Einschlußkörperchenhepatitis mit darausfolgender Mortalität der Tiere hervorrufen

können (REECE et al., 1986; CHRISTENSEN und SAIFUDDIN, 1989; ERNY et al., 1991), spricht für die primäre Pathogenität der untersuchten Stämme.

Die Frage der primären Pathogenität aviärer Adenoviren vom FAV-Typ trat erneut in den Vordergrund, als Adenoviren aus Krankheitsfällen isoliert werden konnten, deren pathologisches Substrat von den bisher beobachteten, vornehmlich auf die Leber konzentrierten Veränderungen, sich insofern unterschied, als ein ausgeprägtes Hydroperikard als dominierender Befund in Erscheinung trat. Obwohl bei der in den letzten Jahren in Asien und Lateinamerika aufgetretenen und als Hydroperikard-Syndrom (HPS) bezeichneten Krankheit auch ähnliche pathologische und histologische Veränderungen wie der IBH vorkommen, unterscheidet sich das Bild dieser Erkrankung hauptsächlich durch Hydroperikardveränderungen und durch die Auslösung höherer Sterberaten, die bis zu 75% (ANJUM et al., 1989; CHEEMA et al., 1989) betragen können. Zwar wird in zwei Arbeiten, die sich mit der Einschlußkörperchenhepatitis in Australien befassen, auch über das Auftreten von Ascitis und Hydroperikard als pathologische Veränderungen berichtet (GRIMES et al., 1977; GRIMES und KING, 1977), indessen schienen diese pathologischen Erscheinungen jedoch während der langjährigen Untersuchungen dieser Krankheit lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Bei durch HPS verendeten Tieren wurden Adenoviren bei elektronmikroskopischen Untersuchungen der Lebern eindeutig nachgewiesen (CHEEMA et al., 1989; CHANDRA et al., 1997). Die Isolierung von Adenoviren aus erkrankten Tieren gelang vielfach (ANJUM, 1990; VOß und MONREAL, 1995; NAEEM et al., 1995). Zahlreiche experimentelle Arbeiten in den letzten Jahren konzentrierten sich auf ätiologische Zusammenhänge zwischen den isolierten Adenoviren und der Erkrankung sowie auf die Pathogenese. In den meisten Fällen wurden zunächst zur Reproduktion des HPS Leberhomogenate für die Infektion eingesetzt (AFZAL et al., 1991; AKHTAR, 1995; ABDUL-AZIZ und HASAN, 1995; CHANDRA et al., 1997). Obwohl in allen genannten Studien das Krankheitsbild ausgelöst werden konnte, muß berücksichtigt werden, daß in diesen Versuchen Leberhomogenat, nicht aber ein reines Adenovirusisolat eingesetzt wurde. Aufgrund dessen kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob das Adenovirus das alleinige verursachende Agens dieser Erkrankung war. In späteren Untersuchungen hingegen wurden isolierte Adenoviren in

den Experimenten eingesetzt, wobei in der Mehrzahl die parenterale Infektion der Versuchstiere angewandt wurde (VOß und MONREAL, 1995; NAEEM et al., 1995; GAY et al., 1995; RABBANI und NAEEM, 1996), was nicht dem natürlichen Infektionsweg entsprach. Nur COWEN et al. (1996) wählten für ihr Vorgehen den natürlichen Infektionsweg, sie beobachteten eine 45%ige Mortalität nach der oralen Infektion von 2 Tage alten SPF-Küken.

In der vorliegenden Arbeit wurden SPF-Eintagsküken zum Nachweis der primären Pathogenität der zwei Feldisolate K1013 und K31 eingesetzt. Die Infektion erfolgte mit definierten Dosen über den okulo-nasalen Weg, um den natürlichen Infektionsweg zu imitieren und damit die ätiologische Bedeutung der Feldisolate für das Krankheitsbild der HPS zu dokumentieren. Die applizierte Virusdosis betrug  $10^5$ - und  $10^3$  TCID<sub>50</sub> um zu prüfen, ob die Feldisolate bereits bei einer niedrigen Dosierung eine pathogene Wirkung zeigen. Der Referenzstamm KR5 dagegen wurde nur mit der hohen Dosierung eingesetzt. Auf der Grundlage der Ergebnisse von COOK (1983), daß eine orale Infektion mit dem Stamm KR5 bei einer hohen Impfdosis bei SPF-Eintagsküken nur eine 8%ige Mortalitätsrate hervorrief, wurde der Referenzstamm KR5 lediglich mit einer Dosierung von  $10^5$  TCID<sub>50</sub> eingesetzt.

Bei den mit den Isolaten K1013- und K31 infizierten Küken konnten in den vorliegenden Versuchen zwischen dem 6. und 11. d p.i., erhebliche Störung des Allgemeinbefindens mit Anzeichen von Apathie festgestellt werden. Über ähnliche Symptome berichteten nach der experimentellen Infektion mit Viren der FAV-Gruppe auch LAMICHANE et al. (1991) sowie MENDELSON et al. (1995). Als Folge der Infektion starben in beiden Isolatoren, in denen die Küken mit der höheren Dosis an plaquegereinigten Feldisolaten infiziert waren, innerhalb eines kurzen Zeitraumes alle infizierten Tiere. Die niedrigere Infektionsdosis verursachte bei den mit K1013 infizierten Tieren eine 80%ige Mortalität, bei den mit K31 infizierten Tieren lag die Sterberate mit 20% erheblich niedriger. Auch bei den Kontakttieren traten Erkrankungs- und Todesfälle auf, wodurch die horizontale Übertragung bestätigt ist. Die mit dem Stamm KR5 infizierten Tiere zeigten hingegen keine klinischen Symptome. Bis zum Ende des Versuches starb in dieser Gruppe kein Tier.

Die Ergebnisse zeigen einerseits die primäre pathogene Wirkung beider Feldisolate, andererseits bestätigt der Versuch, daß innerhalb eines Serotypes, in diesem Fall Serotyp 4, Stämme mit unterschiedlicher Pathogenität vorkommen können.

Im Vordergrund des pathologischen Geschehens standen die starke Ansammlung seröser Flüssigkeit im Herzbeutel, die geschwollene Leber, Milz- und Nierenschwellungen sowie eine Thymusatrophie. Lungenödeme wurden im Gegensatz zu anderen Untersuchungsberichten (ANJUM, 1990; CONRAD, 1991) bei den gestorbenen Tieren nicht beobachtet.

Histologisch wiesen alle gestorbenen Tiere Leberveränderungen verschiedenen Grades auf, in Übereinstimmung mit vielen Literaturangaben, die die Leber als ein Hauptzielorgan der Viren der FAV-Gruppe beschreiben (BICKFORD, 1972; PETTIT und CARLSON, 1972; GALLINA et al., 1973; COOK 1974 und 1983; McFERRAN et al., 1976; SAIFUDDIN und WILKS, 1991). Bei 6 von 13 durch Feldisolate gestorbenen Tieren wurden große basophile intranukleäre Einschlusskörperchen festgestellt wie sie auch von HOWELL et al., 1970; CHRISTENSEN und SAIFUDDIN, 1989 und McFERRAN, 1991 als charakteristisch beschrieben wurden und wie sie auch in Lebern an HPS erkrankter Tiere, sowohl in der natürlichen Feldinfektion als auch bei der Reproduktion der Erkrankung auftraten (ANJUM et al., 1989; CHEEMA et al., 1989; KHAWAJA et al., 1988; ABDUL-AZIZ und HASAN, 1995; COWEN et al., 1996). Auch bei überlebenden Tieren der vorliegenden Versuche fanden sich histologisch großtropfige Verfettungen und follikelartige lymphozytäre Infiltrate in den Lebern.

Die Resultate der vorliegenden histologischen Untersuchungen der Lebern wiesen bei einem Teil der gestorbenen Tiere nicht auf das Vorhandensein von Einschlusskörperchen hin, jedoch kann das Vorkommen selbst einer geringen Anzahl von intranukleären hepatischen Einschlusskörperchen als höchst charakteristisch für die Infektion mit Adenoviren gelten (BICKFORD, 1972; GALLINA et al., 1973; KLOPP et al., 1975). Neben der gelungenen Virusreisolierung und dem Nachweis der Antikörper gegen die FAVs, liefert dies auch einen entscheidenden Beweis für den Erfolg der Virusvermehrung im Tierkörper (COOK, 1974; McCRACKEN et al., 1976).

Histologische Veränderungen im Myokard und Epikard traten lediglich bei 4 nach der Infektion gestorbenen Tieren auf. Auch andere Autoren erwähnen histologische Veränderungen des Herzens in Form von Ödemen, Nekrosen und mononukleären Infiltraten im Herzmuskel (ANJUM et al., 1989; CHEEMA et al., 1989; COWEN et al.,

1996). Nach der Studie von NIAZI et al. (1989) wurde jedoch die Ursache für das Hydroperikard als die Folge einer Leberschädigung, die eine reduzierte Albuminbildung mit Hypoproteinämie nach sich zog, beschrieben. Weitere Untersuchungen über die pathogenetische Bedeutung dieses Adenovirus für die Veränderungen am Herzen sollten zur Klärung dieser Frage durchgeführt werden.

Weitere pathologische Veränderungen fanden sich auch in Bursa und Thymus nach Infektion mit den beiden Feldisolaten. Histologisch fanden sich Follikelatrophien in den Bursen von 6 der 13 gestorbenen Tiere, ein reduzierter Lymphozytengehalt bei 4 von 13 untersuchten Thymen und 3 von 13 untersuchten Milzen. Einige Autoren stellten bei Küken aus IBH- und HPS-Feldinfektionen und experimentellen Versuchen diese degenerativen Prozesse an den lymphatischen Organen ebenfalls fest (MacPHERSON et al., 1974; GRIMES et al., 1977; FADLY et al., 1980; REECE et al., 1985a; SAIFUDDIN und WILKS, 1990; SAIFUDDIN und WILKS, 1992; ABDUL-AZIZ und HASAN, 1995), allerdings ist nicht in jedem dieser Fälle eindeutig erkennbar, ob nicht weitere Erreger an den jeweiligen Krankheitsfällen beteiligt waren.

Klinische Krankheitsfälle nach Infektionsversuchen wie auch spezifische pathologische Veränderungen bedürfen aber auch des Erreger- und Antikörpernachweises, um eindeutige ätiologische Zusammenhänge zu klären. Für den Virusnachweis wurde, ausgehend von den Befunden, daß bei den Adenoviren die Leber das Hauptzielgewebe bildet (COOK, 1983; SAIFUDDIN und WILKS, 1991), in den verschiedenen Abschnitten des Versuches von den gestorbenen Tieren Leberteile für die Virusreisolierung entnommen. Der Nachweis der Virusvermehrung in den Lebern gelang bei allen verendeten Versuchstieren. Die am 8. und 14. d p.i. geprüften Lebern von den mit dem Stamm KR5 infizierten Tieren lieferten ebenso positive Ergebnisse. Von den 4 untersuchten Küken mit Hydroperikard war es möglich, aus der Flüssigkeit des Perikardsackes Adenoviren zu reisolieren. Diese Ergebnisse bestätigen die erfolgreich verlaufene Infektion. Außerdem wurden am Ende des Versuches die Seren der überlebenden Tiere auf Vorkommen von FAV-Antikörpern untersucht. In allen geprüften Seren ließen sich Antikörper gegen die Serotypen 4 und 11 finden. Damit ist auch der Nachweis für die Auseinandersetzung des Immunsystems mit den zur Infektion eingesetzten Adenoviren geführt. Schließlich ist für die Bewertung der pathogenen Bedeutung der Isolate K1013 und K31 von Bedeutung, daß die Infektion mit dem Stamm KR5 ebenfalls gelang, aber keine Zeichen von pathologisch-anatomischen

Veränderungen bei diesen Tieren festgestellt werden konnten. Diese Befunde zeigen, daß der Stamm KR5 keine Erkrankung bei den Küken hervorruft.

Die pathogene Wirkung aviärer Adenoviren vom FAV-Typ kann durch immunsuppressive und potentiell mitauslösende Faktoren, auch hinsichtlich des Krankheitsbildes, von HPS verstärkt werden. VOß und MONREAL (1995) beobachteten bei ihren Übertragungsversuchen mit dem Organhomogenat von an HPS erkrankten Tieren eine Antikörperbildung nicht nur gegen das Adenovirus, sondern auch gegen das Virus der Infektiösen Bursitis und gegen das Virus der infektiösen Anämie. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Seren von den überlebenden Tieren auf das Vorhandensein von CAV- und IBDV-Antikörpern mit negativem Ergebnis untersucht. Hierdurch wird bestätigt, daß das verimpfte Ausgangsmaterial keine Kontamination mit den immunsuppressiven Viren CAV und IBDV aufwies.

Unter Berücksichtigung der klinischen, der makroskopischen und mikroskopischen pathologischen Befunde, der vielfach gelungenen Reisolierung des Infektionsvirus und der Abwesenheit begleitender Faktoren ist festzustellen, daß die beiden Feldisolate aus Ecuador und Pakistan primär pathogen sind und bei den Eintagsküken eine hohe Mortalitätsrate bis zu 100% hervorrufen können. Von Bedeutung ist ferner, daß vor allem nach Infektion mit dem Stamm K1013 deutliche Veränderungen an den lymphatischen Organen beobachtet werden konnten. Obwohl die beiden Isolate dem Serotyp 4 zugehörig sind, ist aus dem begleitenden Infektionsversuch mit dem Stamm KR5 eindeutig abzuleiten, daß innerhalb eines Serotypes Stämme, die sich genetisch unterscheiden, größere Schwankungen der Intensität der pathogenen Wirksamkeit vorkommen können.

Die Felddausbrüche des HPS wurden bisher bei Tieren im Alter von 3 bis 5 Wochen beschrieben (AFZAL et al., 1991). Daher wurde ein weiterer Pathogenitätstest mit den beiden Isolaten mit 3 Wochen alten SPF-Tieren durchgeführt. Da der Stamm KR5 bei den Eintagsküken keine Mortalität hervorrief, erschien eine Infektion von 3 Wochen alten SPF-Tiere mit diesem Stamm nicht erforderlich.

Die Infektion erfolgte auf natürlichem Wege mit einer Dosis von  $10^5$  TCID<sub>50</sub> oculo-oral. Zusätzlich wurden in einem der Isolatoren 3 Wochen alte Küken mit dem Isolat K31 mit einer hohen Dosis von  $10^7$  TCID<sub>50</sub> intramuskulär infiziert. Bei keinem der Versuchstiere

traten klinische Erkrankungen oder Todesfälle auf, noch ließen sich pathologisch-anatomische und histologische Veränderungen nachweisen. Die oculo-oral infizierten Küken wurden am 16. d p.i. getötet, aus den Lebern konnte das Infektionsvirus wieder nachgewiesen werden, während bei den i.m. infizierten Küken nach 28 Tagen ein Virusnachweis nicht mehr gelang. In den Seren aller getöteten Küken waren Antikörper gegen Serotyp 4 und 11 im Neutralisationstest nachweisbar, die Testergebnisse können als gesicherter Nachweis für die erfolgreiche Infektion gelten.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß für die Entfaltung der pathogenen Eigenschaften des Virus auch das Alter der Versuchstiere von Bedeutung sein dürfte. Auch muß in Erwägung gezogen werden, daß bei den Erkrankungen im Feld vornehmlich Mastküken betroffen sind, während die hier verwandten SPF-Küken dem Legetyp zugerechnet werden müssen.

Bei weiteren Untersuchungen, deren Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt werden, hat sich gezeigt, daß eine Reproduktion des Krankheitsbildes mit einer 46%igen Mortalität durch orale Infektion von SPF-Küken im Alter von einer Woche mit einer Impfdosis von  $10^8$  TCID<sub>50</sub> des Isolates K1013 gelang. Ferner konnte mit dem gleichen Feldisolat auch bei 3 Wochen alten SPF-Tieren durch i.m. Injektion eine 100%ige Mortalität herbeigeführt werden (MAZAHERI et al., 1998). Auch in diesen Versuchen ergab sich wie auch bei den SPF-Eintagsküken eine stärkere Pathogenität des Isolates K1013 gegenüber dem Isolat K31.

Bei Feldinfektion und entsprechenden Erkrankungen ist immer damit zu rechnen, daß neben pathogenen FAV Stämmen andere infektiöse bzw. nicht infektiöse Faktoren, die eine Immunsuppression hervorrufen können, für das Krankheitsgeschehen bei 3 bis 5 Wochen alten Mastküken verantwortlich sind. Daher wurde in einem weiteren Versuch die Auswirkung einer oculo-oralen Infektion mit den Feldisolaten K1013 und K31 einschließlich der i.m. Infektion mit K31 bei 3 Wochen alten immunsupprimierten SPF-Tieren mit einer hohen Infektionsdosis von  $10^7$  TCID<sub>50</sub> geprüft. Diese Untersuchungen wurden auch auf den als nicht krankheitsauslösend eingeschätzten Stamm KR5 ausgedehnt.

In dem hier beschriebenen Versuch wurde eine chemisch bedingte Immunsuppression vorgenommen, wie sie von FADLY et al. (1976b) beschrieben wurde. SPF Küken wurden am 4. Lebenstag beginnend 4 Tage lang mit CYCLOSTIN® 200-N (Wirkstoff:

Cyclophosphamid, 3 mg/Tier, i.p.) behandelt, um zum Zeitpunkt der Infektion im Alter von 3 Wochen eine Schädigung des Immunsystems zu erreichen. Die Tiere blieben im Zeitraum nach der Behandlung bis zum Infektionszeitpunkt klinisch unauffällig. Nach der Infektion schienen die am 4. d p.i. i.m. infizierten Tiere und die ab dem 6. d p.i. mit den Feldisolaten oculo-oral infizierten Tiere apathisch. Die Hälfte der i.m. infizierten Tiere starben in einem Zeitraum vom 4. bis zum 7. d p.i.. Die Mortalitätsrate bei den oculo-oral infizierten Tieren war wie erwartet geringer. Sie betrug bei den mit K1013 infizierten Tieren etwa 37,5%, bei den mit K31 infizierten Tieren 25%. Die pathologisch-anatomischen Symptome bei den verendeten Tieren ähnelten denen der Eintagsküken des ersten Versuchs. Alle mit Cyclophosphamid behandelten Tiere wiesen deutlich kleinere Bursen auf. Auch in diesem Experiment zeigte sich der Stamm KR5 trotz der Immunschwäche der Tiere als nicht krankheitsauslösend. Die lediglich leichte Mattigkeit vom 6. bis zum 7. d p.i. bei den mit KR5 infizierten Tieren könnte auf die Immunschwäche und den zusätzlichen Infektionsdruck zurückgeführt werden.

Für den Nachweis der gelungenen Infektion wurden wie in den letzten Versuchen, aus den Lebern der gestorbenen Tiere Adenoviren isoliert. Ebenso waren in den 3 geprüften Herzbeutelflüssigkeitsproben Adenoviren nachweisbar. Der Nachweis der Antikörper gegen die Serotypen 4 und 11 war bei allen untersuchten Seren möglich. Durch die ELISA-Tests wurde auch das Zusammenspiel der beiden immunsupprimierenden Viren CAV und IBDV in dem Krankheitsprozeß ausgeschlossen.

Die histologischen Ergebnisse bei allen Versuchstieren bestätigten die Wirkung des Cyclophosphamids auf die Bursen. Eindeutig lymphozytenfreie Follikel sind nicht nur bei den verendeten Tieren festgestellt worden, sondern auch bei den Tieren, die keine anderen pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen zeigten. Alle untersuchten Lebern der verendeten Tiere zeichneten sich durch zahlreiche intranukleäre Einschlusskörperchen aus. Desweiteren waren bei 4 von 6 Tieren histologische Veränderungen in den Nieren deutlich erkennbar. Das Nierengewebe wies entzündliche, herdförmige Infiltrationen im Interstitium auf, bei zwei Tieren konnten basophile Kerneinschlüsse in den Tubulusepithelzellen aufgefunden werden. Von histologischen Veränderungen in den Nieren bei an HPS erkrankten Hühnern berichteten auch andere Autoren (ANJUM et al., 1989; CHEEMA et al., 1989; ABDUL-AZIZ und HASAN, 1995; COWEN et al., 1996).

Insgesamt zeigt sich also, daß bei Küken, deren Immunsystem geschädigt ist, nach Infektion mit den Isolaten K1013 und K31 ein Krankheitsgeschehen hervorgerufen werden kann, das demjenigen nach Infektion von Eintagsküken entspricht. Die Befunde erlauben den Schluß, daß nach einer horizontalen Infektion von 3 Wochen alten SPF-Tieren mit den beiden Feldisolaten ohne eine vorrausgegangene Schädigung des Immunsystems die HPS-Erkrankung unter Laborbedingungen nicht reproduziert werden kann.

Für die Beurteilung der pathogenen Wirksamkeit der Erreger und der jeweiligen Situation bei Krankheitsfällen im Feld sind die hier ermittelten Ergebnisse von Bedeutung. Einerseits wurde nachgewiesen, daß die Isolate K31, noch mehr K1013, eindeutig pathogen für Embryonen und Eintagsküken sind, sie unterscheiden sich erheblich von dem zur gleichen Serogruppe gehörenden Stamm KR5. Andererseits ist selbst das stärker pathogene Isolat K1013 bei 3 Wochen alten SPF-Küken nur dann in der Lage eine Krankheit auszulösen, wenn eine Schädigung des Immunsystems der Tiere vorausgegangen ist. Vergleicht man die Befunde im Laboratoriumsversuch indessen mit dem Geschehen in großen Herden, sind allerdings noch weitere Faktoren zu berücksichtigen.

Für die Pathogenität eines Isolates ist es entscheidend, ob die Infektion, wenn auch mit hohen Dosierungen, im kleinen Laborversuch mit wenigen Tieren stattfindet, oder ob sich dasselbe Isolat in einer Herde unter normalen Haltungsbedingungen mit großer Populationsgröße vermehren und ausbreiten kann. Die große Zahl der Tiere in der normalen Tierhaltung bewirkt rasche Passagen der Erreger und massive Erregersausscheidungen, was zu einem erhöhten Infektionsdruck führen kann. Zusätzlich sind die Tiere in diesen Haltungen noch einer Vielzahl weiterer ungünstiger Faktoren und Infektionen ausgesetzt. Von ebenso großer Bedeutung sind die Auswirkungen der Züchtung auf die genetischen Dispositionen, die eine wichtige Rolle bei der Immunitätslage der Tiere spielen. Die als HPS bezeichnete Krankheit, die hauptsächlich als eine Krankheit bei Broilerherden auftritt (AFZAL et al., 1991; VOß und MONREAL, 1995) ist ein eindrucksvolles Beispiel für den Ablauf eines derartigen Infektionsgeschehens in den Herden. Für die weitere Klärung der pathogenen Wirksamkeit der Isolate wären Pathogenitätsuntersuchungen mit Mastküken im Alter von 3 Wochen unter Laborbedingungen wünschenswert.

Eine Reihe von epidemiologischen Untersuchungen lassen es möglich erscheinen, daß für das Auftreten von Erkrankungen durch Adenoviren der vertikalen Übertragung des Virus von infizierten Elterntieren über das Brutei eine stärkere Bedeutung zukommt (MONREAL, 1984; MONREAL und HESS, 1994; HESS et al., 1993; SAIFUDDIN und WILKS, 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde daher zuletzt der Frage nachgegangen, welche Folgen sich ergeben, wenn ein für Küken pathogener Stamm über das Brutei auf antikörperfreie Küken übertragen wird. Für den Versuch wurde das Isolat K31 aus Pakistan eingesetzt. Dabei war zu prüfen, ob die Infektion von SPF-Elterntieren eine verminderte Schlupfrate und womöglich eine hohe Embryomortalität hervorruft, und in welcher Weise sich die Infektion auf die Nachkommenschaft auswirkt. Ebenso war die Verfolgung der Virusausscheidung, der Antikörperbildung und eine eventuelle Korrelation beider Komponenten bei den Elterntieren und ihren Nachkommen von großem Interesse.

Im einzelnen konnte während des ganzen Versuchszeitraumes weder eine reduzierte Legeleistung noch klinische Symptome bei den Elterntieren beobachtet werden, ebensowenig wies die pathologisch-anatomische Untersuchung der Elterntiere sechs Wochen nach der Infektion auf Organveränderungen hin. Die embryonierten Eier wurden während des Bebrütungszeitraumes geschickt, um eine eventuelle Embryomortalität registrieren zu können, wobei kein Virus aus den gestorbenen Embryonen isoliert werden konnte. Ob das Absterben von 9 Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten durch das Adenovirus verursacht wurde, war in diesem Versuch nicht nachzuweisen.

Die Zahl der gestorbenen Embryonen im Vergleich zur Gesamtzahl der embryonierten Eier im Versuchsablauf war zu gering, um eine Aussage über eine erhöhte Mortalität bei den Embryonen zuzulassen. Auch REECE et al. (1985b) gelang es nicht, von den Embryonen der mit dem Serotyp 8 infizierten Elterntiere Adenoviren zu isolieren. In dieser Arbeit wurde der Schluß gezogen, daß eine vertikale Übertragung intermittierend stattgefunden hat.

Zur Verfolgung der Virusausscheidung der Elterntiere wurden Kloakentupfer entnommen, da bereits KOHN (1962) feststellen konnte, daß die Ausscheidung des Adenovirus hauptsächlich über den Kot stattfindet. Die Virusausscheidung bei den Elterntieren erfolgte in der zweiten Woche p.i., jedoch waren in der dritten Woche p.i.

bei keinem der 16 Elterntiere Adenoviren nachweisbar. Erst in der vierten Woche p.i. wurde erneut eine Virusausscheidung nachgewiesen. Die Befunde lassen den Schluß zu, daß die Virusausscheidung nicht permanent, sondern periodisch auftritt.

Der Nachweis des Virus in den Mekoniumproben ist ein deutlicher Beweis für die vertikale Übertragung des Isolates K31 von den infizierten Elterntieren auf ihre Nachkommen. Auch hier konnte ein periodischer Verlauf beobachtet werden. Dabei ist erstaunlich, daß trotz der in den Mekoniumproben nachgewiesenen frühen (vertikalen) Infektionen der Tiere in der Gruppe 1 eine weitere Virusausscheidung erst am 28. Lebenstag nachzuweisen war. Andererseits waren in der Gruppe 2 Mekoniumproben adenovirusfrei, die Tiere schieden jedoch am 7., 14., 21. und 28. Lebenstag Viren aus. Hier wird die Aussage von MONREAL et al. (1979) bestätigt, daß der Verlauf der Virämien nicht permanent sondern eher periodisch erfolgt.

Die Antikörperbildung bei den 16 Elterntieren begann in der vorliegenden Arbeit eine Woche p.i., stieg in der zweiten Woche p.i. an und der hohe Titer blieb bis zur dritten Woche p.i. konstant. Im Vergleich mit dem Verlauf der Antikörperbildung bei den infizierten Elterntieren zeigt sich, daß das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern die Virusausscheidung nicht beeinflusst. In beiden Gruppen schieden die Tiere das Virus aus, obwohl inzwischen Antikörper vorhanden waren.

Letztendlich wurden alle Seren der Elterntiere und ihrer Nachkommen auf das Auftreten von CAV- und IBDV-Antikörpern geprüft. Die Ergebnisse ließen wie bei den anderen Versuchsabschnitten darauf schließen, daß ein Zusammenspiel der beiden Viren in dem Experiment nicht stattfand.

Klinische Erscheinungen und eindeutige pathologische Veränderungen, die für das Vorliegen von HPS spezifisch sind, konnten bei keinem der Küken aus der Nachkommenschaft der infizierten Elterntiere festgestellt werden. Daraus ist abzuleiten, daß die Übertragung des Stammes K31 selbst auf die noch antikörperfreien Nachkommen nicht zu einer HPS-Erkrankung geführt hat. Das Ergebnis entspricht demnach nicht den Beobachtungen, die HESS et al. (1993) in einer Felduntersuchung in Deutschland beschrieben. Bei einer untersuchten Broiler-Elterntierherde, in der auch eine verminderte Schlupfleistung festgestellt wurde, erkrankten die Nachkommen an IBH. Nachdem aus den erkrankten Tieren FAV2 isoliert wurde, wurde nachgewiesen, daß die betroffene Herde während der Aufzuchtperiode frei von Antikörpern gegen diesen Serotypen war. Erst als in der 36. Lebenswoche die Seren der Elterntiere hohe

Antikörpertiter gegen FAV2 und FAV12 gezeigt hatten, normalisierte sich die Schlupfrate. Nach der 36. Lebenswoche traten keine Krankheitsfälle mehr auf.

Bei der Beurteilung der vorliegenden Versuche sollte, wie bereits erwähnt, berücksichtigt werden, daß nicht Masteltern- sondern SPF-Legetiere infiziert wurden. Zudem unterscheiden sich die experimentellen Bedingungen und die Anzahl der Tiere von den Verhältnissen in kommerziellen Beständen, was von entscheidender Bedeutung für das Resultat des Versuchsablaufs ist. Schließlich ist darauf hinzuweisen, daß in dem Versuch das weniger pathogene Isolat K31 eingesetzt wurde, da zum Zeitpunkt der experimentellen Infektion der Elterntiere der erhebliche Unterschied der pathogenen Wirkung der Isolate K31 und K1013 noch nicht bekannt war.

Es bleibt kein Zweifel, daß die beiden Stämme aus Ecuador und Pakistan für die Küken primär pathogen sind. Sie sind in der Lage, ohne Hilfe von anderen Erregern das Krankheitsbild von HPS mit einer hohen Mortalitätsrate auszulösen. Beide Isolate gehören dem gleichen Serotyp 4 an, obwohl sie aus zwei unterschiedlichen Regionen der Welt stammen und in dem Serotyp 4, wie die Untersuchungen mit dem Stamm KR5 gezeigt haben, auch Virusstämme vorkommen, die nicht pathogen sind

Schließlich ist noch einmal darauf hinzuweisen, daß alle drei FAV4 Stämme Unterschiede auf der Genomebene aufweisen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, weitere umfangreichere und vergleichende Untersuchungen der DNA-Sequenzen pathogener und apathogener Stämmen durchzuführen, um genetische Unterschiede deutlich zu machen oder sogar Pathogenitätsfaktoren zu erkennen. Besondere Bedeutung kommt dabei offenbar den Fibern zu, da diese eine wichtige Rolle bei der Virulenz der Stämme innerhalb eines Serotypes spielen können (PALLISTER et al., 1996).

Schließlich könnte es ratsam sein, weitere Feldisolate aus unterschiedlichen geographischen Regionen, wie Rußland, Kuwait, Indien, Irak, Mexico, Chile, Pakistan, Ecuador, die von der HPS-Erkrankung betroffen sind, in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

## F. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Mastküken mit Hydroperikard-Syndrom in Ecuador und Pakistan wurden Adenoviren isoliert, die mittels Neutralisationstest, Kreuzneutralisationstest und Restriktionsenzymanalysen als Stämme des Serotypes FAV4 identifiziert werden konnten. Restriktionsenzymanalysen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) von 6 Isolaten aus Ecuador (K1013/1-6) zeigten keine Unterschiede auf der Genomebene, sie unterschieden sich indessen von dem Isolat K31 aus Pakistan und dem Referenzstamm des Serotypes FAV4 (KR5).

Eine 100%ige Embryomortalität wurde von einem Feldisolat aus Ecuador und einem Feldisolat aus Pakistan, in embryonierten SPF-Hühnereiern nach Infektion des Dottersackes mit drei verschiedenen Virusdosen verursacht. Der Referenzstamm zeichnete sich durch eine niedrigere Embryomortalität aus.

Die Infektion von SPF-Eintagsküken mit einer  $10^5$  TCID<sub>50</sub> Dosis der beiden Feldstämme durch oculo-orale Infektionsweg führte zu klinischen Symptomen, einer 100%igen Mortalität und pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen, die charakteristisch für das Hydroperikard-Syndrom waren.

Die Reproduktion des Krankheitsbildes durch oculo-orale Infektion von 3 Wochen alten SPF-Küken mit den beiden Isolaten gelang nicht. Auch mit dem Isolat K31 i.m. infizierte SPF-Küken gleichen Alters erkrankten nicht. Hingegen führte die i.m. Infektion mit K31 und die oculo-orale Infektion mit beiden Feldisolaten bei gleichaltrigen medikamentel immungeschwächten SPF-Küken zu einer bis zu 50%igen Mortalität mit pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen.

Eine orale Infektion von 33 Wochen alten SPF-Hühnern mit K31 führte zu einer vertikalen Übertragung auf die Nachkommen, ohne die Schlupfrate zu beeinflussen. Bei den Nachkommen konnten keine klinischen und pathologisch-anatomischen Veränderungen festgestellt werden, selbst bei solchen Küken, die noch keine maternalen Antikörper hatten. Die Elterntiere zeigten in der zweiten Woche p.i. hohe Antikörpertiter, die Virusausscheidung verlief periodisch.

## SUMMARY

### **The role of avian adenovirus (AAV) in hydropericard syndrome in broilers in Ecuador and Pakistan**

Adenoviruses were isolated from broiler flocks with hydropericard syndrome in Ecuador and Pakistan. The isolates were identified using neutralization test, cross-neutralization test and restriction enzyme analysis and proved to be fowl adenovirus serotype 4. The restriction enzyme analysis of the Desoxyribonucleic acid (DNA) showed no genetical differentiation among the six field isolates from Ecuador (K1013/1-6), however they varied from the isolate K31, isolated from flocks in Pakistan and from the reference strain of FAV4 (KR5).

In experimental studies embryonated SPF-chicken-eggs were inoculated via the yolk sac with three different infectious doses of one field isolate from Ecuador and the field isolate from Pakistan. Both induced 100% embryo mortality. A reduced embryo mortality was obtained with the reference strain.

Infection of one-day-old SPF-chicks with  $10^5$  TCID<sub>50</sub> via oculo-oral routes with both field isolates produced characteristic clinical signs, gross and microscopic lesions of hydropericard syndrome accompanied with 100% mortality.

Oculo-oral infection of 3-weeks-old SPF-chicks, with both isolates failed to reproduce the disease. Also SPF-chicks of the same age showed no diseases after intramuscular inoculation with K31. Contrary, intramuscular infection with K31 and oculo-oral infection with both field isolates in the same age group SPF-chicks, that had previously been medically immuno-compromised, lead to 50% mortality accompanied with characteristic gross and microscopic lesions.

Infection of 33-weeks-old SPF-parent flock with K31, via oral routes, resulted vertical transmission of the virus without any effect on hatchability. Neither clinical symptoms nor gross lesions could be observed in the progeny, even in those with no detectable maternal antibodies. The parent flocks showed in the second weeks post infection a high antibody titer. The virus excretion was periodical.

## G. LITERATURVERZEICHNIS

- ABDUL-AZIZ, T.A. and M.A. AL-ATTAR, (1991). New syndrome in Iraqi chicks. Vet. Rec. 129, 272
- ABDUL-AZIZ, T.A. and S.Y. HASAN (1995). Hydropericardium syndrome in broiler chickens: ist contagious nature and pathology. Res. Vet. Sci., 59, 219-221
- ADAIR, B.M. (1978). Studies on the development of avian adenoviruses in cell cultures. Avian Pathol. 7, 541-550
- AFZAL, M., R. MUNEER and G. STEIN (1991). Studies of the aetiology of hydropericardium (Angara disease) in broilers. Vet. Rec. 128, 591-593
- AIRD, F., J.J. KING and H.B. YOUNGHUSBAND (1983). Identification of a new strain of adenovirus type 2 by restriction endonuclease analysis. Gene 22, 133-134
- AKHTAR, S. (1995). Lateral spread of the aetiologic agent(s) of hydropericardium syndrome in broiler chickens. Vet. Rec. 136, 118-120
- ALTAMIRANO, L. q col. (1990). Hepatitis con cuerpos de inclusion y su relacion con atlas mortalidades en el pollo de engorda en Mexico. Memorias de la XV Covencion Aneca
- ANJUM, A.D. (1988). Study of pathogenicity of the hydropericardium syndrome agent. Proc. of National Seminar on Hydropericardium syndrome in chickens in Pakistan, Rawalpindi, S.111-115
- ANJUM, A.D., M.A. SABRI and Z. IQBAL (1989). Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan. Vet. Rec. 124, 247-248

- ANJUM, A.D. (1990). Experimental transmission of hydropericardium syndrome and protection against it in commercial broiler chickens. *Avian pathol.* 19, 655-660
- BARR, D.A. and P. SCOTT (1988). Adenoviruses and IBH. *Proc. 2nd Asian/Pacific Poultry Health Conf.* 112, 323-326
- BAUER, A. (1989). Transfektion von Zellkulturen des Huhnes mit der DNA des aviären Adenovirus und Nachweis der Vermehrung des aviären adenoassoziierten Virus den transfizierten Zellen. *Vet. med. Diss. - Berlin, Journal Nr.* 1441
- BICKFORD, A.A. (1972). Inclusion body hepatitis in chickens. *Poult. Digest* 31, 345-347
- BORISOV, V.V., A.V. BORISOV and A.A. GUSEV (1997). Hydropericardium syndrome in chickens in Russia. *Proc. of the XIth International Congress of the World Veterinary Poultry Association. Budapest, Hungary, S.* 258
- BÜLOW, V. v., R. RUDOLPH und B. FUCHS (1986). Folgen der Doppelinfektion von Küken mit Adenovirus oder Reovirus und dem Erreger der Aviären Infektiösen Anämie (CAA). *J. Vet. Med. B* 33, 717-726
- BURKE, C.N., R.E. LUGINBUHL and E.L. JUNGHERR (1959). Avian enteric cytopathogenic viruses. I. Isolation. *Avian Dis.* 3, 412-419
- BURKE, C.N., R.E. LUG1NBUHL and C.F. HELMBOLDT (1965). The isolation of a latent adeno like virus from chicken kidney cell cultures. *Avian Dis.* 9, 31-43
- CALNEK, B.W. and B.S. COWEN (1975). Adenoviruses of chickens: Serological groups. *Avian Dis.* 19, 91

- CHANDRA, R., S.K. SHUKLA, M. KUMAR and S.K. GARG (1997). Electron microscopic demonstration of an adenovirus in the hepatocytes of birds experimentally infected with hydropericardium syndrome. *Vet. Rec.* 140, 70-71
- CHEEMA, A.H., J. AHMAD, and M. AFZAL (1989). An adenovirus infection of poultry in Pakistan. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 8, 789-795
- CHIOCCA, S., R. KREUZBAUER, G. SCHAFFNER, A. BAKER, V. MAUTNER and M. COTTEN (1996). The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus Celo. *J. Virol.* 70, 2939-2949
- CHRISTENSEN, N.H. and Md. SAIFUDDIN (1989). A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. *Avian Dis.* 33, 622-630,
- CLEMMER, D.I. (1965). Experimental enteric infection of chickens with an avian adenovirus (strain 93). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118, 394-403
- CONRAD, C., M. VOß und E. VIELITZ (1991). Hydropericardium Syndrom in Pakistanischen Broilern, Feld und Laboruntersuchungen. Tagungsbericht Internationale Fachtagung über Geflügelkrankheiten, Budapest, Ungarn, 26.-30.8.1991, S. 13
- COOK, J.K.A. (1974). Pathogenicity of avian adenoviruses for day-old chicks. *J. Comp. Pathol.* 84, 505-515
- COOK, J.K.A. (1983). Fowl adenoviruses: Studies on aspects of the pathogenicity of six strains for 1 -day-old chicks. *Avian Pathol.* 12, 35-43
- COWEN, B., B.W. CALNEK and S.B. HITCHNER (1977). Broad antigenicity exhibited by some isolates of avian adenoviruses. *Am. J. Vet. Res.* 38, 959-962
- COWEN, B.S. and S. NAQI (1982). Classification of avian adenoviruses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181, 283

- COWEN, B.S. (1988). Chicken embryo propagation of type I avian adenoviruses. *Avian Dis.* 32, 347-352
- COWEN, B.S. (1992). Inclusion body hepatitis-anaemia and hydropericardium syndromes: aetiology and control. *World Poult. Sci. J.* 48, 247-254
- COWEN, B.S., H. LU, D. WEINSTOCK and A.E. CASTRO (1996). Pathogenicity studies of fowl adenoviruses isolated in several regions of the world. *Proc. of the International Symposium on Adenovirus and Reovirus Infections in Poultry. Rauschholzhausen, Germany*, S. 79-88
- CUBILLOS, A., G. SANDOVAL, J. ULLOA, V. CUBILLOS and M. AGUILAR (1986). Aislamiento y tipificación del virus hepatitis a cuerpo de inclusión en broilers en Chile. *Archives de Medicina Veterinaria (Valdivia)* 18, 115-122
- DHILLON, A.S., R.W. WINTERFIELD, H.L. THACKER and D.S. FELDMAN (1982). Lesions induced in the respiratory tract of chickens by serologically different adenoviruses. *Avian Dis.* 26, 478-486
- DHILLON, A.S. and R.W. WINTERFIELD (1984). Pathogenicity of various adenovirus serotypes in the presence of *Escherichia coli* in chickens. *Avian Dis.* 28, 147-153
- DHILLON, A.S. (1986). Pathology of avian adenovirus serotypes in the presence of *Escherichia coli* in infectious -bursal-disease-virus-infected specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* 30, 81-86
- DORN, R., M. KASSIM und G. MONREAL (1980). Antikörperbildung nach experimenteller Infektion von Hühnern mit verschiedenen Adenovirus-Stämmen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 93, 492-494
- EL MISHAD, A.M., K.J. McCORMICK, W.A. STENBACK, V.J. YATES and J.J. TRENTIN (1975). Hemagglutinating properties of CELO, an oncogenic avian adenovirus. *Avian Dis.* 19, 761-772

- ERNY, K. M., D. A. BARR and K. J. FAHEY (1991). Molecular characterization of highly virulent fowl adenoviruses associated with outbreaks of inclusion body hepatitis. *Avian Pathol.* 20, 597-606
- ERNY, K.M., J. PALLISTER and M. SHEPPARD (1995). Immunological and molecular comparison of fowl adenovirus serotypes 4 and 10. *Arch. Virol.* 140, 491-501
- FADLY, A.M. and R.W. WINTERFIELD (1973). Isolation and some characteristics of an agent associated with inclusion body hepatitis, hemorrhages, and aplastic anemia in chickens. *Avian Dis.* 17, 182-193
- FADLY, A.M., R.W. WINTERFIELD and H.J. OLANDER (1976a). Role of the bursa of Fabricius in the pathogenicity of inclusion body hepatitis. *Am. J. Res.* 36, 532-534
- FADLY, A.M., R.W. WINTERFIELD and H.J. OLANDER (1976b). Role of the bursa of fabricius in the pathogenicity of inclusion body hepatitis and infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 20, 467-477
- FADLY, A.M., B.J. RIEGLE, K. NAZERIAN and E.A. STEPHENS (1980). Some observations on an adenovirus isolated from specific pathogen free chickens. *Poult. Sci.* 59, 467-477
- GALLINA, A.M., R.W. WINTERFIELD and A.M. FADLY (1973). Adenovirusinfection and disease. II. Histopathology of natural and experimental disease. *Avian Dis.* 17, 343-353
- GAY, G.M., R.A. RENATA, M.M.E. ARANDA and A.D. Vasquez (1995). Impelementation de las pruebas de precipitation en agar, inmunofluorescencia e inhibicion de focos fluuorescentes para et diagnostico de la hepatitis con cuerpos de inclusion. *Proc. 7th Avi-Mex Conference, Mexico, S.* 34-37

- GELDERBLOM, H. and I. MAICHLE-LAUPPE (1982). The fibres of fowl adenovirus. *Arch. Virol.* 72, 289-298
- GINSBERG, H.S., H.G. PERREIRA, R.C. VALENTINE and G.C. WILCOX (1966). A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits. *Virology* 28, 782-783
- GRIMES, T.M., D.J. KING, S.H. KLEVEN and O.J. FLETCHER (1977). Involvement of type-8 avian adenovirus in the etiology of inclusion body hepatitis. *Avian Dis.* 21, 26-38
- GRIMES, T.M. and D.J. KING (1977). Effect of maternal antibody on experimental infections of chickens with a Type-8 Avian Adenovirus. *Avian Dis.* 21, 97-112
- GRIMES, T.M., D.J. KING, O.J. FLETCHER and R.K. PAGE (1978). Serologic and pathogenicity studies of avian adenovirus isolated from chickens with inclusion body hepatitis. *Avian Dis.* 22, 177-180
- HELMBOLDT, C.F. and M.N. FRAZIER (1963). Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance. *Avian Dis.* 7, 446-450
- HESS, M., U. LÖHREN, E. VIELITZ, M. VOß und G. MONREAL (1993). Auftreten einer Einschlußkörperchenhepatitis bei Mastkühen; Untersuchungen zur Epidemiologie und zum Erregernachweis. Internationale Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft über Geflügelkrankheiten, 28.-30.7.1993, Potsdam, Tagungsbericht, Hrsg. G. Monreal, 164-170
- HESS, M., A. CUZANGE, R.W.H. RUIGROK, J. CHROBOCZEK and B. JACROT (1995). The avian adenovirus penton: two fibers and one base. *J. Mol. Biol.* 252, 379-385

- HESS, M., H. BLÖCKER and P. BRANDT (1997). The Complete Nucleotide Sequence of the Egg Drop Syndrom Virus: An intermediate between Mastadenoviruses and Aviadenoviruses. *Virology* 238, 145-156
- HOFFMANN, R., E. WESSLING, R. DORN and H. DANGSCHAT (1975). Lesions in chickens with spontaneous or experimental infectious hepatic-myelopoietic disease (inclusion body hepatitis) in Germany. *Avian Dis.* 19, 224-236
- HOFFMANN, R. (1978). Adenoinfektion beim Jungtier-Einschlußkörperchenhepatitis. Tagungsbericht Symposium der Fachgruppe Geflügelkrankheiten in Verb. mit dem Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Fachabt. Geflügelgesundheitsdienst Hrsg. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Gießen, S 44-52
- HOWELL, J., D.W. MacDONALD and R.G. CHRISTIAN (1970). Inclusion body hepatitis in chickens. *Can. Vet. J.* 11, 99-101
- JAFFREY, M.S. (1988). A Treatise on Angara Disease in Chicken. *Pakistan Vet. Med. Assoc.* 1-33
- KAHWAJA, D.A., S. AHMAD, A.M. RAUF, M. ZULFIQUAR, S.M.I. MAHMOOD and M. MAHMOOD-UL-HASAN (1988). Isolation of adenovirus from hydropericardium syndrome in broiler chicks. *Pakistan J. Vet. Res.* 1, 2-17
- KAWAMURA, H. and H. TSUBAHARA (1963). Serological relationship between CELO and GAL viruses. *Nat. Inst. Anim. Health Quart. (Tokyo)* 4, 31-39
- KAWAMURA, H., F. SHIMIZU and H. TSUBAHARA (1964). Avian adenovirus: its properties and serological classification. *Nat. Inst. Anim. Health Quart. (Tokyo)* 4, 183-193
- KLOPP, S., K. ROSENBERGER and W.C. KRAUSS (1975). Diagnosis of inclusion body hepatitis and hemorrhagic anemia syndrome in Delmarva broiler chickens. *Avian Dis.* 19, 608-611

- KOHN, A. (1962). Gallus Adeno-like Virus in Chicken-Studies on Infection, Excretion, and immunity. *Am. J. Vet. Res.* 23, 562-568
- LAMICHHANE, C.M., D.B. SNYDER and M.A. GOODWIN (1991). Vertical and horizontal transmission of a highly pathogenic adenovirus associated with spiking mortality in broiler chickens on the Delmarva Peninsula. *Proc. of the 40th Western Poultry Disease Conference, Acapulco, Guerrero Mexico*, S 260-261
- MacPHERSON, I., J.S. McDOUGALL and A.P. LAURSEN-JONES (1974). Inclusion body hepatitis in a broiler integration. *Vet. Rec.* 95, 286-289
- MAEDA, M., A. OKANIWA and H. KAWAMURA (1967). Morphological studies on intranuclear inclusion bodies in chicken kidney cell culture infected with avian adenovirus. *Nat. Inst. Anim. Health Quart. (Tokyo)* 7, 164-177
- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH and J. SAMBROOK (1989). *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- MAZAHERI, A., C. PRUSAS, M. Voß and M. HESS (1998). Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens. *Avian pathol.* 27, 269-276
- McCRACKEN, R.M., J.B. McFERRAN, R.T. EVANS and T.J. CONNNOR (1976). Experimental studies on the aetiology of inclusion body hepatitis. *Avian Pathol.* 5, 325-339
- McDOUGALL, J.S. and R.W. PETERS (1974). Avian adenoviruses: a study of 8 field isolates. *Res. Vet. Sci.* 16, 12-18

- McFERRAN, J.B., W.A.M. GORDON, S.M. TAYLOR and P.J. McPHARLAND (1971). Isolation of viruses from 94 flocks of fowl with respiratory disease. *Res. Vet. Sci.* 12, 565-569
- McFERRAN, J.B., J.K. CLARKE and T.J. CONNOR (1972). Serological classification of avian adenoviruses. *Archiv ges. Virusforsch.* 39, 132-139
- McFERRAN, J.B., B. ADAIR and T.J. CONNOR (1975). Adenoviral antigens (CELO, QBV, GAL). *Am. J. Vet. Res.* 36, 527-529
- McFERRAN, J.B., R.M. McCracken, T.J. CONNOR and R.T. EVANS (1976). Isolation of viruses from clinical outbreaks of inclusion body hepatitis. *Avian Pathol.* 5, 315-324
- McFERRAN, J.B. and B. ADAIR (1977). Avian adenoviruses - a review. *Avian Pathol.* 6, 189-217
- McFERRAN, J.B. and T.J. CONNOR (1977). Further studies on the classification of fowl adenoviruses. *Avian Dis.* 21, 585-595
- McFERRAN, J.B. (1981). Immunity to adenoviruses. In *Avian Immunology*, ed. M.D. Rose, L.N. PAYNE, B.M. Freeman, British Poultry Science Ltd. Edinburgh, S. 187-203
- McFERRAN, J.B. (1991). Adenovirus infections. In: *Diseases of Poultry*, 9th ed. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid, H.W. Yoder, Jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, S. 552-563
- MENDELSON, C., H.B. NOTHELPER and G. MONREAL (1995). Identification and characterization of an avian adenovirus isolated from a spiking mortality syndrom field outbreak in broilers on the Delmarva Peninsula, USA. *Avian Pathol.* 24, 693-706

- MONREAL, G. (1966). Der Einfluß des CELO-Virus auf die künstliche Infektion mit *Mycoplasma gallisepticum*. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 79, 295-297
- MONREAL, G. (1968). Untersuchungen über ein aviäres Adenovirus. Zbl. Vet. Med. B 15, 685-757
- MONREAL, G., R. DORN und M. KASSIM (1979). Verbreitung von den Adenoviren in den Organsystemen des Huhnes. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 92, 264-266
- MONREAL, G., R. DORN und M. KASSIM (1980). Bestimmung von Antikörpern gegen aviäre Adenoviren im Mikrotiter-Zellkultursystem. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 93, 125-128
- MONREAL, G. (1984). Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen 11 Serotypen der aviären Adenoviren. Arch. Geflügelk. 48, 245-250
- MONREAL, G. (1987). Adenoviren beim Huhn: Versuch einer zusammenfassenden Darstellung. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 100, 37-41
- MONREAL, G. (1992). Adenoviruses and adeno-associated viruses of poultry. Poult. Sci. Rev. 4, 11-27
- MONREAL, G. und M. HESS (1994). Zur Frage der Pathogenität der aviären Adenoviren beim Huhn. Tierärztl. Prax. 22, 364-367
- NAEEM, K., T. NIAZI, S.A. MALIK and A.H. CHEEMA (1995). Immunosuppressive potential and pathogenicity of an avian adenovirus isolate involved in hydropericardium syndrome in broilers. Avian Dis. 39, 723-728
- NIAZI, A.K., M.Z. KHAN, M. SIDDIQUE (1989). Haematological studies on naturally occurring hydropericardium syndrome in broiler chicks. Vet. Rec. 125, 400

- OLSON, N.O. (1950). A respiratory disease (bronchitis) of quail, caused by a virus. Proc. U.S. Livestock Sanit. Ass. 54, 171-174
- PALLISTER, J., P.J. WRIGHT and M. SHEPPARED (1996). A single gene encoding the fiber is responsible for variations in virulence in the fowl adenovirus. J. Virol. 70, 5115-5122
- PETTIT, J.R. and C.H. CARLSON (1972). Inclusion body hepatitis in broiler chickens. Avian Dis. 16, 858-863
- RABBANI, M. and K. NAEEM (1996). In vitro and in vivo evaluation of avian adenovirus isolates from outbreaks of hydropericardium syndrom. Proc. of the International Symposium on Adenovirus and Reovirus Infections in Poultry. Rauisschholzhausen, Germany, S. 26-31
- REECE, R.L., D.C. GRIX and D.A. BARR (1985a). An unusual case of inclusion body hepatitis in a cockerel. Avian Dis. 30, 224-227
- REECE, R.L., D.A. BARR and D.C. GRIX (1985b). An investigation of vertical transmission of a fowl adenovirus serotyp 8. Aust. Vet. J. 62, 136-137
- REECE, R.L., D.A. BARR, D.C. GRIX, W.M. FORSYTH, R.J. CONDRON and M. HINDMARSH (1986). Observations on naturally occurring inclusion body hepatitis in Victorian chickens. Aust. Vet. J. 63, 201-202
- ROSENBERGER, J.K., R.J. ECKROADE, S. KLOPP and W.C. KRAUSS (1974). Characterization of several viruses isolated from chickens With inclusion body hepatitis and aplastic anemia. Avian Dis. 18, 399-409

- ROSENBERGER, J.K., S. KLOPP, R.J. ECKROADE and W.C. KRAUSS (1975).  
The role of infectious bursal agent and several avian adenoviruses in the  
hemorrhagic-aplastic-anemia syndrome and gangrenous dermatitis.  
*Avian Dis.* 19, 717-729
- SAIFUDDIN, Md. and C.R. WILKS (1990). Reproduction of inclusion body hepatitis  
in conventionally raised chickens inoculated with a New Zealand isolate of avian  
adenovirus. *New Zealand Vet. J.* 38, 62-65
- SAIFUDDIN, Md. and C.R. WILKS (1991). Pathogenesis of an acute viral  
hepatitis: inclusion body hepatitis in the chicken. *Arch. Virol.* 116, 33-43
- SAIFUDDIN, M. and C.R. WILKS (1992). Effects of fowl adenovirus infection on the  
immune system of chickens. *J. Comp. Path.* 107, 285-294
- SAMBROOK, J., M. SLEIGHT, J.A. ENGLER and T.R. BROKER (1980). The  
evolution of the adenoviral genome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 354, 426-452
- SCHÜLLER, S., A. FRANCKE, G. PAUL, C. MENDELSON und G. MONREAL  
(1991). Charakterisierung von Adenovirusisolaten aus erkrankten Beständen.  
Internationale Fachtagung für Geflügelkrankheiten, Budapest, Ungarn,  
26.-30.8.1991
- STEWART, P.L., S.D. FULLER and R.M. BURNETT (1993). Difference imaging of  
adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray cristallography and  
electron microscopy. *EMBO J.* 12, 2589-2599
- VALENTINE, R.C. and H.G. PEREIRA (1965). Antigens and structure of the  
adenovirus. *J. Mol. Biol.* 13, 13-20

- VAN ECK, J.H.H., F.G. DAVELAAR, T.A.M. VAN DEN HEUVEL-PLESMAN, N. VAN KOL, B. KOUWENHOVEN and F.H.M. GULDIE (1976). Dropped egg production, soft shelled and shell-less eggs associated with appearance of precipitins to adenovirus in flocks of laying fowl. *Avian Pathol.* 5, 261-272
- VOß, M. and G. MONREAL (1995). Aislamiento e identificación de adenovirus de lasaves, con atención especial en el síndrome del hidropericardio. Proc. 20th Annu ANECA Conf., S. 417-423
- WADELL, G., M.-L. HAMMARSKJÖLD, G. WINBERG, T.W. VARSANYI and G. SUNDELL (1980). Genetic variability of adenoviruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 354, 16
- WIGAND, R., A. BARTHA, R.S. DREIZIN, H. ESCHE, H.S. GINSBERG, M. GREEN, J.C. HIERHOLZER, S.S. KALTER, J.B. McFERRAN, U. PETERSON, E.C. RUSSEL and G. WADELL (1982). Adenoviridae: Second report. *Intervirology* 18, 169-176
- WINTERFIELD, R.W., A.M. FADLY and A.M. GALLINA (1973). Adenovirus infection and disease. 1. Some characteristics of an isolate from chickens in Indiana. *Avian Dis.* 17, 334-342
- ZSAK, L. and J. KISARY (1984). Grouping of fowl adenoviruses based upon the restriction patterns of DNA generated by Bam H1 and Hind III. *Intervirology* 22, 110-114

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. G. Monreal danke ich recht herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die jederzeit entgegengebrachte Hilfe und freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. Hess und Frau Dr. Prusas möchte ich meinen herzlichen Dank für ihre Diskussionsbereitschaft und umfassende Betreuung aussprechen.

Bei Herrn Dr. Vielitz und Herrn Dr. Voß möchte ich mich für ihre wertvollen Anregungen praktischer und theoretischer Art, und besonders für die großzügige Bereitstellung eines Arbeitsplatzes für alle in dem Lohmann-Veterinärlabor, Cuxhaven, durchgeführten Versuche herzlich bedanken. Ferner bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Lohmann-Veterinärlabors, Cuxhaven, für die überaus freundliche Aufnahme, insbesondere bei Herrn Kramer für die hilfsbereite und geduldige Unterstützung.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institut für Geflügelkrankheiten Berlin für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Weikel, Tiergesundheitsdienst Bayern, danke ich für die Anfertigung und Auswertung der histologischen Schnitte.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Hafez für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Meinen Freunden und vor allem Frau Zellner danke ich für die Anteilnahme und das mühevollen Korrekturlesen des Manuskriptes.

Herrn Dadgar bin ich für die technische Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Der Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die gewährte Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Veerkamp und dem Diakonischen Werk, für die Förderung dieser Arbeit bedanken.

## Lebenslauf

Atoussa Mazaheri, geboren am 29.08.1967 in Teheran / Iran

### Schulausbildung:

1974 - 1979	Grundschulbesuch in Teheran / Iran
1979 - 1981	Mittelschulbesuch in Teheran / Iran
1981-1985	Besuch des Gymnasiums in Teheran / Iran
1985	Abitur in Teheran / Iran

### Beruflicher Werdegang:

1986	Immatrikulation an der Freien Universität Teheran im Fach Germanistik
1987 - 1989	Studienkolleg an der Freien Universität Berlin zur Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
1989 - 1995	Studium der Veterinärmedizin, an der Freien Universität Berlin
August 1995	Dritter Abschnitt des Tierärztlichen Staatexamens
seit Januar 1996	Doktorandin am Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin und der Firma Lohmann Tierzucht, Cuxhaven
seit Januar 1998	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin